

Sofia Martins Proença Couceiro

**EFEITOS DE UM EXTRACTO NATURAL DE UVAS
NA PATOGÉNESE DA DIABETES TIPO 1 MURINA**

*IV Curso de Mestrado em Controlo de Qualidade e
Toxicologia dos Alimentos*



Faculdade de Farmácia
Universidade de Lisboa
Lisboa 2007

Sofia Martins Proença Couceiro

**EFEITOS DE UM EXTRACTO NATURAL DE UVAS
NA PATOGÉNESE DA DIABETES TIPO 1 MURINA**

Dissertação orientada por: Sr. Doutor Carlos Penha-Gonçalves e
Sr^a. Professora Doutora Maria Manuela Beirão Catarino

*IV Curso de Mestrado em Controlo de Qualidade e
Toxicologia dos Alimentos*



Faculdade de Farmácia
Universidade de Lisboa
Lisboa 2007

Índice

RESUMO/ ABSTRACT	1
Abreviaturas	3
A. INTRODUÇÃO	4
1. A diabetes tipo 1	5
1.1. Auto-anticorpos na diabetes tipo 1	5
1.2. Factores genéticos	7
1.3. Factores não genéticos	9
1.3.1. Dieta	10
1.3.2. Exposição a vírus	11
1.4. Disfunção glicémica	12
1.5. O modelo NOD	13
1.5.1. Origem da estirpe	14
1.5.2. Papel das células T na diabetes tipo 1	15
1.5.3. Semelhanças e diferenças entre a diabetes tipo 1 nos humanos e no modelo NOD	18
2. Envolvimento de espécies reactivas de oxigénio e nitrogénio na diabetes tipo 1	19
3. Compostos polifenólicos- os flavonóides	21
B. MATERIAL E MÉTODOS	23
1. Animais	24
2. Extracto natural de uvas	24
3. Preparação de suspensões celulares	24
4. Enriquecimento em células T por fibra de lã de nylon	25
5. Culturas celulares primárias	26
6. Análise de populações linfocitárias - Citometria de fluxo	26
6.1 Fundamento	26

6.2 Procedimento e análise das populações linfocitárias	27
6.3 Anticorpos	27
7. <i>Status</i> da diabetes	28
7.1 Glicémia	28
7.2 Insulite	29
7.2.1 Coloração hematoxilina/eosina	29
7.2.2 Determinação do Índice de insulite (<i>I</i>)	30
7.3 Tratamentos com extracto natural de uvas	30
C. RESULTADOS	32
1. <u>Ensaaios <i>in vitro</i></u>	33
1.1. Percentagem de linfócitos T CD4+	34
1.2. Percentagem de linfócitos T CD8+	35
1.3. Níveis de activação das sub-populações T CD4+ e T CD8+	36
2. <u>Ensaaios <i>ex vivo</i></u>	37
2.1. Linfócitos T	37
2.1.1. Níveis de activação	39
2.1.2. Linfócitos T CD4+ e T CD8+	40
2.2. Linfócitos B	41
2.3. Insulite	43
2.4. Glicémia	45
3. <u>Ensaaios <i>in vivo</i></u>	46
D. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	49
E. BIBLIOGRAFIA	61
Agradecimentos	75

Resumo

Na última década tem havido intensos esforços para identificar componentes genéticos que predisponham para a diabetes tipo 1 ou que modifiquem o decurso da patogénese da doença. É sabido que factores não-genéticos podem actuar como indutores diabetogénicos ou como protectores da doença em indivíduos geneticamente predispostos. A investigação de factores não-genéticos que interfiram com a patogénese da doença é necessária para o desenvolvimento de intervenções preventivas da doença nos indivíduos em risco.

O presente trabalho relata estudos sobre um extracto natural de uvas (E.N.U.) rico em compostos polifenólicos, na patogénese da diabetes tipo 1. Foi estudada a bioactividade deste extracto em ensaios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* no modelo murino NOD da diabetes tipo 1. Os resultados mostram que: *a)* o E.N.U. tem um efeito potenciador na activação de células T CD4+ e T CD8+, principalmente em suspensões linfocitárias de gânglios linfáticos de NOD.Lt/J, quando comparados com murganhos da estirpe não autoimune C57Bl/6; *b)* na fase pré-diabética, o tratamento *in vivo* com E.N.U. activa os linfócitos T CD4+ e T CD8+, principalmente nos NOD.Lt/J; *c)* durante a fase pré-diabética o E.N.U. tem um efeito potencialmente hipoglicémico em murganhos NOD.Lt/J; *d)* o efeito hipoglicemiante do extracto é dependente de linfócitos. Foram assim evidenciados um efeito directo de activação celular e um efeito sistémico hipoglicemiante. Estes efeitos poderão ser atribuíveis a componentes do extracto com potencial valor de intervenção na patogénese da diabetes tipo 1. Estes estudos corroboram a noção geral de que os alimentos contêm compostos bioactivos que poderão ser aplicados na prevenção e na terapêutica de doenças influenciáveis por factores ambientais.

Palavras-chave: Diabetes tipo 1; *non-obese diabetic* (NOD) *mouse*; extracto natural de uvas (E.N.U.); activação linfocitária; hipoglicémia.

Abstract

Much of the research on type 1 diabetes prevention has been targeted to identify genetic components that predispose or modify the course of the disease pathogenesis. Non-genetic diabetogenic factors are considered either disease triggers or pathogenesis modifiers in genetically predisposed individuals. The discovery of non-genetic factors that interfere with disease pathogenesis are needed to develop preventing interventions to abrogate the disease process in such individuals.

This work discusses studies of a natural grape extract (N.G.E.) rich in polyphenolic compounds, on the pathogenesis of type 1 diabetes. The bioactivity of this extract was evaluated *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* experiments on the NOD mouse model of type 1 diabetes. The results show that: *a)* N.G.E has a potentiation effect on T CD4+ and T CD8+ cells, particularly on cellular suspensions from NOD.Lt/J lymph nodes, when compared to C57Bl/6 non-autoimmune mouse strain; *b)* in pre-diabetic phase, *in vivo* treatment with N.G.E. activates T CD4+ and T CD8+ lymphocytes, mainly in NOD.Lt/J; *c)* in the pre-diabetic phase N.G.E. shows a potentially hypoglycaemic effect in NOD.Lt/J mice; *d)* the hypoglycaemic effect of the extract is lymphocyte dependent. Thus, it was showed a direct effect of cellular activation and a systemic hypoglycaemic effect. These effects could be attributable to extract compounds with potential intervention value on type 1 diabetes pathogenesis. These studies corroborate the general idea that foods contain bioactive compounds that could be used on prevention and therapeutics of diseases that are susceptible to environment factors.

Keywords: Type 1 diabetes; *non-obese diabetic* (NOD) *mouse*; natural grape extract (N.G.E.); lymphocyte activation; hypoglycaemia.

Abreviaturas

IAs- auto-anticorpos anti-insulina (do inglês: *insulin autoantibodies*)

IA-2- antígeno-2 insulinoma (do inglês: *insulinome-antigen 2*)

APC- células apresentadoras de antígeno (do inglês: *antigen presenting cells*)

BCR-receptor de células B (do inglês: *B cell receptor*)

CTLA-4- antígeno 4 linfocitário T citotóxico (do inglês: *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*)

C57Bl/6- estirpe de murganhos não-autoimune

E.N.U.- extracto natural de uvas

GAD- descarboxilase do ácido glutâmico (do inglês: *glutamic acid descarboxylase*)

G.R.A.S.- geralmente reconhecido como seguro (do inglês: *generally recognized as safe*)

HLA- antígenos leucocitários humanos (do inglês: *human leukocyte antigen*)

ICAs- anticorpos para células dos ilhéus (do inglês: *islet cell antibodies*)

IFN- interferão

iNOS- sintetase induzível de óxido de nítrico (do inglês: *inducible nitrogen oxide synthetase*)

INS- gene da insulina

MHC- complexo major de histocompatibilidade (do inglês: *major histocompatibility complex*)

NOD.Igμ^{null}- murganhos NOD com mutação nula para a cadeia pesada μ do *locus Ig*

NOD.Lt/J- estirpe de murganhos com predisposição genética para diabetes tipo 1 *non-obese-diabetic mice*

PBS- tampão salino de fosfato (do inglês: *phosphate buffer saline*)

PI- iodeto de propídio (do inglês: *propidium iodide*)

PTPN22- gene da proteína linfóide tirosina fosfatase (do inglês: *lymphoid protein tyrosine phosphatase*)

RNS- espécies reactivas de nitrogénio (do inglês: *reactive nitrogen species*)

ROS- espécies reactivas de oxigénio (do inglês: *reactive oxygen species*)

scid- imunodeficiência severa combinada (do inglês: *severed combined immunodeficiency*)

SOD- superóxido dismutase

TCR- receptor de células T (do inglês: *T cell receptor*)

TNF- factor de necrose tumoral (do inglês: *tumor necrosis factor*)

INTRODUÇÃO

A. INTRODUÇÃO

1. A diabetes tipo 1

A diabetes tipo 1 é uma doença autoimune que destrói especificamente as células β dos ilhéus de Langerhans pancreáticos, produtoras de insulina: auto-antígenos específicos dos ilhéus são recolhidos e processados por células apresentadoras de antígenos (APC), nomeadamente células dendríticas ou macrófagos, que migram para os gânglios linfáticos.

No microambiente dos gânglios linfáticos, as APC podem apresentar os auto-antígenos às células T auto-reativas, que escaparam à selecção negativa no timo e aos mecanismos de tolerância periférica. Estas células T auto-reativas sofrem expansão clonal e migram para o pâncreas, onde são capazes de atacar especificamente as células β dos ilhéus pancreáticos (Mathis *et al* 2001; Mandrup-Poulsen *et al* 2003).

O processo de invasão do pâncreas por células mononucleares, e que resulta numa reacção inflamatória denominada insulite, conduz a uma perda da maioria das células β (Cnop *et al* 2005). Os sinais de auto-reatividade contra as células β , na forma de auto-anticorpos circulantes e disfunção das células β pancreáticas, ocorrem meses/anos antes do aparecimento de manifestações clínicas de diabetes tipo 1 (Abiru e Eisenbarth, 1999; Amrani *et al* 2000).

1.1. Auto-anticorpos na diabetes tipo 1

Meses (mesmo anos) antes do aparecimento clínico da diabetes tipo 1, podem ser detectados marcadores de autoimunidade, bem como alterações metabólicas nos indivíduos susceptíveis (Korhnen *et al* 2002).

O aparecimento de auto-anticorpos dirigidos contra as células β pancreáticas - incluindo anticorpos contra o citoplasma das células dos ilhéus de Langherhans (ICAs - *islet cell antibodies*), que representam um grupo heterogéneo de auto-anticorpos para antígenos associados à diabetes tipo 1, precede o desenvolvimento clínico da diabetes. Por isso, tais anticorpos são usados como marcadores pré-clínicos da doença (Korhnen *et al* 2002; Pihoker *et al* 2005).

Os primeiros auto-anticorpos contra proteínas específicas encontrados nos ilhéus de Langerhans foram descritos pela primeira vez em 1974 (Bottazzo *et al* 1974). Estudos subsequentes demonstraram a presença de uma proteína de 64kDa que possuía uma actividade de descarboxilase de ácido glutâmico (*GAD - glutamic acid descarboxilase*) e que representava uma isoforma desconhecida - a *GAD65* (Baekkeskov *et al* 1990). Mais tarde, foi verificado que pacientes com diabetes tipo 1 recém-diagnosticada tinham auto-anticorpos anti-insulina (*IAs-insulin autoantibodies*) (Palmer *et al* 1983; Wegmann *et al* 2000). Posteriormente, e analisando em detalhe os auto-antígenos dos ilhéus de Langerhans, foi descoberto o antígeno 2 insulinooma (*IA-2 -insulinoma-antigen 2*), por co-precipitação com *GAD65* em soros de doentes 64kDa+.

A utilização de técnicas baseadas na reacção entre auto-anticorpos e auto-antígenos específicos (recombinantes) conduziu à noção de que muitas doenças autoimunes poderiam ser detectadas antes do diagnóstico clínico. Devido ao período relativamente longo entre a detecção inicial dos auto-anticorpos e o início da diabetes tipo 1, assim como o seu elevado valor preditivo, os auto-anticorpos são um marcador preditivo da doença (Pihoker *et al* 2005).

Parece não haver um tipo de auto-anticorpos com melhor valor preditivo que outro por, aparentemente, não haver uma ordem específica para o aparecimento de cada um: vários estudos apontam para o facto de o número de auto-anticorpos diferentes ser mais preditivo do que a ordem pela qual estes surgem (Gardner *et al* 1999). Tanto os auto-anticorpos anti-insulina como os *IA-2* são afectados pela idade e pelo sexo dos pacientes, sendo que a sensibilidade no diagnóstico diminui com o aumento da idade (Feeney *et al* 1997; Karvonen *et al* 1997; Graham *et al* 2002). Enquanto os auto-anticorpos anti-insulina têm uma maior capacidade predictiva no diagnóstico em crianças com menos de 10 anos de idade (~50-60%), os auto-anticorpos anti-*GAD65* permanecem elevados independentemente da idade (70-80%) (Graham *et al* 2002; Pihoker *et al* 2005).

Vários estudos apontam no sentido de que cada auto-anticorpo adicional encontrado em familiares em primeiro grau, de indivíduos com diabetes tipo 1 aumenta significativamente o risco de desenvolver diabetes tipo 1 (Notkins *et al* 2001).

Apesar das várias abordagens de detecção, chegou-se à conclusão de que quer os níveis elevados de auto-anticorpos como a presença de diversidade dos mesmos representam um elevado valor preditivo, tanto em familiares em primeiro grau de indivíduos diabéticos, como no resto da população (Hagopian *et al* 1995; Bingley *et al* 1997; Pihoker *et al* 2005). Desconhece-se, no entanto, se a quantidade de auto-anticorpos

específicos diferentes presentes num indivíduo é mais importante do que uma combinação específica de auto-anticorpos, e se combinações específicas conferem diferentes graus de risco (Gardner *et al* 1999; Greenbaum *et al* 1999; Pihoker *et al* 2005).

Embora a detecção de auto-anticorpos contra *GAD65*, *IAA* e *IA-2* seja altamente preditiva da diabetes tipo 1, o facto de a reactividade dos *ICAs* nem sempre se correlacionar com a reactividade face a auto-antígenios específicos já definidos, sugere que permanecem por identificar auto-antígenios específicos adicionais (Korhonen *et al* 2002; Notkins *et al* 2001; Mansson *et al* 2001; Pihoker *et al* 2005).

A série de eventos que leva à formação de auto-anticorpos dirigidos contra as células dos ilhéus de Langerhans é desconhecida. Assume-se que ocorre um aumento de auto-antígenios dentro dos ilhéus e que os auto-antígenios são recolhidos por células dendríticas e macrófagos residentes ou circulantes, que depois migram para os gânglios linfáticos pancreáticos, onde ocorre a apresentação de antígeno (Mathis *et al* 2001).

Uma função potencialmente importante dos auto-anticorpos no desenvolvimento da diabetes tipo 1 será o processamento e apresentação de auto-antígenios pelo *MHC* (complexo *major* de histocompatibilidade) classe II. Os receptores específicos de antígeno das células B e receptores Fc nos monócitos, macrófagos e células dendríticas aumentam a eficiência de captura dos antígenios pelas *APC* diminuindo, assim, o limiar para a resposta das células T (A. Lanzavecchia, 1990; Pihoker *et al* 2005).

Recentemente ficou demonstrado que a presença de auto-anticorpos sem a presença de células B (num modelo murino da diabetes tipo 1 modificado), não é suficiente para o desenvolvimento da doença; as células B apresentam auto-antígenios das células β via receptores de células B (*BCR*) e moléculas *MHC* classe II às células T, potenciando as respostas auto-reativas das células T CD4+ (Silveira *et al* 2006).

1.2. Factores genéticos

Estudos genéticos em famílias e em gémeos mostram que a diabetes tipo 1 é geneticamente determinada. Poderia pensar-se que o facto de haver famílias mais afectadas do que outras, se devia a uma exposição tanto de factores genéticos como ambientais, pelo que estudos em gémeos são úteis na distinção entre ambos (Leslie *et al* 2004). As elevadas taxas de concordância para as doenças autoimunes aquando da comparação de

gémeos idênticos e não idênticos é consistente com a existência de um componente genético nestas doenças (Salveti *et al* 2000).

O principal factor genético de risco para a diabetes tipo 1 é o (*HLA*) (antigénio leucocitário humano) localizado no cromossoma 6, conferindo 40 a 50% do risco hereditário da doença (Pugliese *et al* 2004). Estudos genéticos demonstraram que o haplótipo DQB1*0302-A1*0301 (DQ8) confere o risco maior, com um efeito diabetogénico aditivo se o alelo DRB1*0401 for herdado como parte do haplótipo. Mais de 40% das crianças com diabetes tipo 1 recém-diagnosticada têm o maior factor genético de risco que é conferido pelo genótipo DQB1*0301-A1*0301/DQB1*0201-A1*0501 (DQ8/DQ2), em comparação com 3% em crianças saudáveis. Outros alelos têm também sido descritos como factores de risco de associação negativa (efeito protector) para a diabetes tipo 1, com maior proeminência HLA DQB1*0602-A1*0102 (DQ6) (Pihoker *et al* 2005).

Vários estudos têm demonstrado haver correlação entre a presença de auto-anticorpos e os alelos *HLA*, sugerindo que o genótipo *HLA* pode ter um efeito modificador na geração de auto-anticorpos contra auto-antigénios específicos na diabetes tipo 1. No entanto, não foram encontradas associações de exclusividade entre certos alelos *HLA* e a auto-imunidade para antigénios específicos.

No **Quadro I** encontram-se representadas algumas associações descritas entre auto-anticorpos envolvidos na diabetes tipo 1 e alelos com associação positiva ou negativa com a doença.

Quadro I - Associação entre auto-anticorpos e factores genéticos na diabetes tipo 1

Auto-anticorpo	Haplótipo	Tipo de associação	Referências
<i>GAD65Ab</i>	DR3 e/ou DQB1*0201	positiva	Graham <i>et al</i> 2002, Hagopian <i>et al</i> 1995
<i>IA-2Ab</i>	DQ8 e/ou DR4	positiva	Graham <i>et al</i> 2002, Hagopian <i>et al</i> 1995,
	DR3/DQB1*0201	negativa	Savola <i>et al</i> 1998; Knip <i>et al</i> 2002
<i>IAs</i>	DR4, DQ8	positiva	Ziegler <i>et al</i> 1991, Graham <i>et al</i> 2002
<i>ICAs</i>	DR4, DQ8	positiva	Ziegler <i>et al</i> 1991, Graham <i>et al</i> 2002

Na medida em que o alelo DR4/DQ8 confere o maior risco para o desenvolvimento da diabetes tipo 1 e o alelo DR3/DQ2 confere um risco mais alargado no sentido da autoimunidade, tem sido sugerido que a resposta anti-*GAD65* associada a DR3 é um marcador de autoimunidade em geral, e que a resposta anti-*IA-2* associada a DR4 será um marcador mais específico de destruição das células β (Savola *et al* 1998; Pihoker *et al* 2005). Deste modo, os genótipos particulares de *HLA* em indivíduos geneticamente predispostos à diabetes tipo 1 são factores de predição da doença, tal como a presença de auto-anticorpos específicos.

O padrão de incidência específico da idade observado em doentes com diabetes tipo 1 é semelhante em todo o mundo, com um pico de incidência na infância e com um declínio acentuado no período que se segue à puberdade (Leslie *et al* 1994).

Existe uma série de factores maternos associados ao aumento do risco de desenvolvimento da diabetes tipo 1 que é apenas verificado em crianças (Leslie *et al* 2004). O risco que representa para os filhos ter um pai diabético é superior ao de ter uma mãe diabética; além disso, o risco associado às mães é inferior ao risco que se esperaria baseado no genótipo *HLA* (Warran *et al* 1984). Atendendo ao facto de o risco dos filhos fruto de gravidez tardia ser mais elevado, e o efeito da idade do pai no risco de vir a desenvolver a doença ser menor (Bingley *et al* 2000), os primogénitos têm um risco mais elevado que decresce 15% a cada nascimento.

Além dos genes da região *HLA*, que conferem uma grande parte do risco genético para a diabetes tipo 1, apenas o gene da insulina (*INS*) foi conclusivamente associado à susceptibilidade para a diabetes autoimune, conferindo 10% do risco (Bell *et al* 1984; Steck *et al* 2005). Além do gene *INS*, outros genes candidatos têm sido identificados fora da região *HLA*, nomeadamente: *Ctla-4* (gene do antigénio 4 linfocitário T citotóxico) (Colucci *et al* 1997) e *PTPN22* (gene da proteína tirosina fosfatase N22) (Bottini *et al* 2004; Vang *et al* 2005; Kawasaki *et al* 2006).

1.3. Factores não-genéticos

A incidência de doenças autoimunes tem aumentado consideravelmente nas últimas três décadas (J.F. Bach, 2002; Leslie *et al* 2004). A presente estabilidade relativa dos polimorfismos de *HLA* indica que o aumento da incidência não pode ser resultado de pressões genéticas selectivas, pelo menos a operar através de genes *HLA* (Leslie *et al* 2004). Há quem defenda que a proporção de indivíduos com genótipos *HLA* de elevado

risco tem diminuído nas últimas décadas entre doentes com diabetes tipo 1 diagnosticada, enquanto a proporção de pessoas com diabetes tipo 1 com genótipos de baixo risco, ou mesmo genótipos *HLA* protectores tem aumentado (Hermann *et al* 2003; Gillespie *et al* 2004).

Como demonstram estudos de populações geneticamente estáveis, ou estudos populacionais de migração, há factores não-genéticos que desempenham um papel determinante na diabetes tipo 1. Um dos estudos mostra que, em apenas quatro gerações, a população de uma região dos Estados Unidos da América subiu de 1,3 casos/100 000 habitantes em 1890 para 11,3 casos/100 000 habitantes em 1961 (H.A. Sultz, 1972; Leslie *et al* 2004). Estas alterações são ainda mais evidentes em crianças diagnosticadas com diabetes tipo 1 com menos de 5 anos de idade na Suíça, cuja incidência aumentou de 4,5 casos/100.000 habitantes para 10,5 casos/100.000 habitantes entre 1965 e 2000 (Schoenle *et al* 2001). Mesmo dentro da Europa há uma grande variação geográfica na incidência da diabetes tipo 1; desde incidências baixas, como 3,2/100.000 habitantes na Macedónia, a 54 casos/100.000 habitantes na Finlândia, em crianças com menos de 15 anos de idade; esta diferença, superior a 15 vezes, dificilmente pode ser explicada apenas por factores genéticos (Knip *et al* 2005).

Assim, a progressão para a diabetes clínica poderá requerer uma combinação de susceptibilidade genética à doença, um despoletador temporalmente crítico, ou uma elevada exposição a um determinado antigénio. Se algum destes determinantes está ausente, ou se algum dos factores exógenos actua extemporaneamente, o risco de desenvolvimento da diabetes será reduzido, mesmo na presença de outros elementos de predisposição (Knip *et al* 2005).

1.3.1. Dieta

Na infância, a dieta afecta o desenvolvimento da diabetes tipo 1: crianças que não são amamentadas têm um risco maior de desenvolver diabetes do que crianças que foram amamentadas, e se a amamentação for superior a 3 meses há uma protecção relativamente a esta patologia (Vaarala *et al* 1999; Paronen *et al* 2000).

Esta protecção poderá ser devida a um atraso na introdução de antigénios pela dieta, nomeadamente através de proteínas lácteas de vaca. O aumento de anticorpos circulantes contra proteínas de leite de vaca em crianças com diabetes tipo 1 foi descrito pela primeira vez em 1988 e mais tarde confirmado (Savilahti *et al* 1988; Åkerblom *et al*

1998). Estes anticorpos são principalmente do tipo IgA anti-BSA, anti- β -lactoglobulina e contra o leite de vaca.

Apesar de o risco de desenvolver diabetes tipo 1 aumentar proporcionalmente ao consumo de leite de vaca, mesmo durante a idade adulta, parece haver apenas um reduzido espaço de tempo de oportunidade no início da vida, durante o qual os factores ambientais poderão operar sobre factores genéticos de susceptibilidade no sentido de promover a progressão da doença. A maior resposta humoral a proteínas do leite de vaca em doentes com diabetes tipo 1 em comparação com indivíduos controlo parece ser específica para esta patologia porque, geralmente, não são observados níveis tão elevados noutras doenças autoimunes (Knip *et al* 2005).

Pelo menos dois estudos independentes demonstram que uma dieta sem glúten não tem efeito nos sinais de autoimunidade contra as células β em familiares em primeiro grau de doentes com diabetes tipo 1. No entanto, esta dieta parece aumentar a secreção endógena de insulina em membros das famílias com elevado risco de virem a desenvolver a doença, podendo ter um papel benéfico na preservação da função das células β (Hummel *et al* 2002; Pastore *et al* 2003).

Teoricamente, um antigénio proveniente da dieta pode ser um factor que induz a progressão da doença, uma vez que a exposição à maioria dos factores da dieta tende a ser frequente, e mesmo assim, com variações de exposição entre populações (Knip *et al* 2005).

1.3.2. Exposição a vírus

A ideia de que antigénios virais possam estar envolvidos na etiologia da diabetes tipo 1 tem recebido uma atenção considerável. Estudos epidemiológicos, imunológicos e histológicos envolvendo principalmente doentes com diabetes tipo 1 com menos de 15 anos de idade na altura do diagnóstico, apoiam a hipótese do envolvimento de vírus na etiologia da doença, particularmente enterovírus (Leslie *et al* 2004; Ylipaasto *et al* 2004).

Além de uma aparente sazonalidade no aparecimento de auto-anticorpos associados à diabetes tipo 1 - principalmente no Outono e no Inverno -, existe uma relação temporal entre o seu surgimento e infecções por enterovírus nos 6 meses que precedem a detecção dos auto-anticorpos (Lonnrot *et al* 2000; Kimpimäki *et al* 2001).

Estas observações sugerem que, dos factores exógenos que poderão contribuir para a variação sazonal do aparecimento da autoimunidade contra as células β , terão que ser

excluídos os factores que representem uma exposição estável, ou que aumentem de forma consistente, como será o caso de alguns constituintes da dieta na infância (Knip *et al* 2005).

Apesar da controvérsia existente, é possível que a exposição a antigénios virais específicos e/ou superantigénios possa provocar a activação de células T por reactividade cruzada com auto-antigénios, conduzindo ao início da doença em indivíduos geneticamente susceptíveis. Para apoiar a hipótese de que a reactividade contra antigénios virais e auto-antigénios apresentados pela molécula I-A^{g7} poderá promover a destruição das células β dos ilhéus de Langerhans, tem sido realçado o mimetismo molecular entre peptídeos do vírus *Coxsackie* e a *GAD65*, um reconhecido auto-antigénio na diabetes tipo 1 (Frisk *et al* 2004).

A diabetes tipo 1 poderá ser prevenida evitando os factores ambientais que levam à sua progressão - prevenção primária -, ou modulando o processo destrutivo antes do aparecimento da diabetes clínica - prevenção secundária. A prevenção primária requer o reconhecimento e remoção dos factores ambientais como a dieta e os vírus (Leslie *et al* 2004).

1.4. Disfunção glicémica

A diabetes tipo 1 ocorre quando a destruição autoimune das células β conduz a instabilidade metabólica (Tsai *et al* 2006). Quando a diabetes tipo 1 se manifesta clinicamente, a maioria das células β já morreu, e já não há produção suficiente de insulina para regular os níveis de glucose, resultando em hiperglicémia (Mathis *et al* 2001).

Gordon Weir *et al* (2004) propuseram a existência de uma progressão da diabetes por fases, cada uma marcada por importantes alterações na massa, fenótipo e função das células β . No início da progressão para a diabetes, os valores de glucose plasmáticos podem aumentar de valores perfeitamente normais (80mg/dl) para valores mais elevados que podem ser tão baixos como 89mg/dl. Esta alteração na glicémia não seria reconhecida como clinicamente anormal porque falharia na inclusão da categoria oficial de "*impaired fasting glucose*" (≥ 100 mg/dl) ou "*impaired glucose tolerance*" (2h após administração de glucose - superior a 140mg/dl). Os indivíduos que mais tarde desenvolvem a doença progridem para estes valores, onde permanecem durante anos antes de desenvolver a diabetes (Weir *et al* 2004).

A primeira fase é descrita como compensação: a secreção da insulina aumenta para manter os níveis normais de glucose de modo a fazer face à resistência à insulina resultante da obesidade, inactividade física e predisposição genética.

Grande parte deste aumento de secreção de insulina resulta de um aumento da massa celular β como comprovam alguns estudos em autópsias em humanos e em modelos roedores. Este aumento provavelmente resulta do aumento do número de células β , embora possa ocorrer uma hipertrofia das células β , ou mesmo um aumento de secreção de insulina por uma dada unidade de massa celular β . Uma explicação proposta poderá ser a existência de um mecanismo de retro-regulação com a resistência à insulina a provocar um aumento de glucose que estimulará a secreção e crescimento das células β . Esta regulação, a verificar-se, deverá encontrar-se sob um controlo rigoroso, nomeadamente através da enzima glucocinase das células β que controla a taxa da glicólise, e por conseguinte as taxas de secreção da insulina (Weir *et al* 2004).

A segunda fase ocorre quando os níveis de glucose sobem (89-130mg/dl), sendo um estado de adaptação estável das células β . Nesta fase as células β já não se encontrarão numa fase de compensação porque os níveis de glucose não são mantidos.

Posteriormente verifica-se um período de descompensação, no qual os níveis de glucose sobem relativamente depressa para a fase de descompensação estável.

Por fim, ocorre uma severa descompensação que representa uma falência profunda das células β com progressão para a cetoacidose. Com excepção da última fase, o movimento através das fases pode ser em ambos os sentidos, mesmo em pacientes sob tratamento (Weir *et al* 2004).

1.5. O modelo NOD

Estudar a patogénese da diabetes tipo 1 directamente nos humanos é difícil, devido a vários factores: o decurso assintomático do processo da doença antes das manifestações clínicas; a localização retroperitoneal do pâncreas; e o facto de os eventos imunológicos nos ilhéus não serem nem facilmente detectáveis, nem reflectidos no sangue periférico (Roep *et al* 2004).

Face a estas limitações, tornou-se necessário o desenvolvimento de modelos que reproduzissem a elevada incidência da diabetes e que permitissem estudar a doença de uma maneira que possibilitasse o acompanhamento da sua progressão (Roep *et al* 2004).

1.5.1. Origem da estirpe

A estirpe de murganhos *non-obese diabetic* (NOD) foi desenvolvida por Susumu Makino, no Japão, através do cruzamento co-sanguíneo de murganhos Jcl:ICR (também conhecidos por murganhos suíços) (Makino *et al* 1980).

O objectivo inicial de Makino era desenvolver uma estirpe em que todos os animais tivessem cataratas, assim como uma estirpe controlo sem cataratas. Na geração 6, a estirpe que desenvolvia cataratas foi dividida em duas sub-linhas adicionais com o intuito de obter um modelo para o desenvolvimento espontâneo da diabetes. Uma das linhas tinha níveis normais de glicémia em jejum, enquanto a outra tinha níveis hiperglicémicos na mesma condição. Enquanto que da última linha se esperaria obter um modelo de desenvolvimento espontâneo da diabetes, da primeira esperar-se-ia uma estirpe normoglicémica controlo. Na geração 20 da primeira linha surgiu uma fêmea que desenvolveu hiperglicémia espontaneamente com infiltração leucocitária nos ilhéus pancreáticos (insulite). Esta estirpe é denominada NOD (*non-obese diabetic*) e a segunda estirpe, inicialmente denominada NON referindo-se a *non-obese normal* (Makino *et al* 1980) passou a significar *non-obese non-diabetic* (Atkinson *et al* 1999).

Foram derivadas outras estirpes de cruzamentos da estirpe ICR que, apesar de possuírem o mesmo haplótipo diabetogénico I-A^{g7} do *locus MHC* do NOD, não desenvolveram espontaneamente diabetes tipo 1. Apenas os NOD tinham a combinação de genes *MHC* e não-*MHC* necessária para, num ambiente livre de patogénese, produzirem sintomatologia clínica (hiperglicémia) (Roep *et al* 2004).

De um modo geral, os NOD desenvolvem diabetes espontaneamente, o que parece reflectir muitos aspectos importantes da doença humana, incluindo o desenvolvimento de inflamação e auto-anticorpos específicos para os ilhéus pancreáticos (Makino *et al* 1980).

Nos modelos animais, o desenvolvimento de diabetes espontânea depende estritamente dos alelos *MHC*. O alelo I-A^{g7} representado no murganho NOD é um ortólogo do alelo de susceptibilidade *HLA-DQ0302* nos humanos. Uma das implicações será assumir que a diabetes tipo 1 é provavelmente uma doença autoimune associada às células T CD4+, na qual os alelos de susceptibilidade do *MHC* classe II serão importantes na apresentação de auto-antígenos e na determinação da selecção de especificidades auto-agressivas (J.F. Bach, 1994).

Embora clones de células T CD4+ provenientes de NOD sejam capazes de induzir a diabetes quando transferidos para recipientes imunodeficientes (Haskins *et al* 1990),

sugerindo a possibilidade de curar a doença por via imunológica, estudos mais recentes vieram evidenciar que a diabetes tipo 1 era muito mais complexa do que se esperaria.

Foram identificados muitos genes não relacionados com o *MHC* que conferem susceptibilidade à doença (Serreze *et al* 2001); é difícil definir a especificidade das células T que iniciam os eventos imunológicos que levam ao início e à progressão da patologia, assim como é difícil identificar factores ambientais que poderão estar envolvidos na patogénese da diabetes tipo 1 (Roep *et al* 2004).

Adicionalmente, observou-se que muitas das terapias preventivas da diabetes tipo 1 que pareciam promissoras nos NOD, não têm a mesma eficácia nos humanos (Makino *et al* 1980). É importante, por isso, considerar com precaução as semelhanças e diferenças entre a diabetes autoimune no modelo NOD e nos humanos (Roep *et al* 2004).

1.5.2. Papel das células T na diabetes tipo 1

O processo diabetogénico pode ser bloqueado ou diminuído por reagentes que interferem com a função das células T (não só nos modelos roedores como também em humanos), o que aponta para o seu envolvimento e importância na doença (Mathis *et al* 2001).

O modelo NOD e outros modelos murinos da diabetes tipo 1, assim como modelos transgénicos deles derivados, têm vindo a fornecer informações que ajudam a esclarecer alguns aspectos cruciais sobre a diabetogénese nos humanos. Murganhos NOD geneticamente atímicos (Makino *et al* 1986), ou T linfopénicos (Harada e Makino, 1986), não chegam a desenvolver diabetes tipo 1.

Uma experiência simples que demonstra a importância das células T na doença, consiste em transferir células T provenientes de dadores NOD diabéticos para recipientes NOD não-diabéticos, o que resulta na precipitação do desenvolvimento da diabetes nos recipientes (Wicker *et al* 1986; Bendelac *et al* 1987; Miller *et al* 1988).

As células T com propriedades diabetogénicas pertencem às classes CD4+ *helper* e CD8+ citotóxicas, ambas participando no desenvolvimento da diabetes tipo 1. No caso das células T CD4+, os antígenos são apresentados pelas moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade classe II (*MHC* classe II) expressas em células apresentadoras de antígeno (*APC*) e, no caso das células T CD8+, os antígenos são apresentados por moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade classe I (*MHC* classe I), que estão presentes na maioria dos tipos celulares. As células T diabetogénicas respondem a diferentes antígenos que são específicos das células β pancreáticas.

Pensa-se que os auto-antígenos das células β pancreáticas surgem por renovação celular ou por danos nestas células, e são processados e apresentados às células T *helper* por APC. Os macrófagos e as células dendríticas são os primeiros tipos celulares a infiltrar os ilhéus pancreáticos; de seguida, células T CD4+ *naive* circulantes podem reconhecer os peptídeos das células β pancreáticas apresentados pelos macrófagos e pelas células dendríticas (Yoon *et al* 2005).

Ao mesmo tempo, células T CD8+ específicas para os antígenos das células β são activadas pela interleucina-2 (IL-2) produzida pelas células T CD4+ activadas, diferenciam-se em células T citotóxicas e são recrutadas para os ilhéus de Langerhans (Yoon *et al* 2005).

Tanto as células T CD8+ citotóxicas como as T CD4+ activadas estão envolvidas na destruição das células β . Estas células podem ser danificadas por granzimas e perforina, libertadas pelas células T CD8+ citotóxicas, e por mediadores solúveis como citocinas e moléculas reactivas de oxigénio libertadas pelos macrófagos activados nos ilhéus pancreáticos (Yoon *et al* 2005).

Os linfócitos T *helper* (Th) têm sido divididos em duas classes funcionais – Th1 e Th2 – com base nas citocinas que produzem e nos seus efeitos na imunidade celular e humoral. Assim, tem sido proposto (Mosmann e Coffman 1989) que:

- as células Th1 . produzem IFN- γ , IL-2, IL-12 TNF- α ;
 - . exercem efeitos reguladores negativos na imunidade humoral;
 - . promovem a imunidade celular.
- as células Th2 . produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13;
 - . exercem efeitos reguladores negativos na imunidade celular;
 - . promovem a imunidade humoral.

Rabinovitch (1998) propôs que as respostas efectoras do tipo Th1 estariam associadas ao processo inflamatório da insulite nos NOD e que, pelo contrário, as respostas do tipo Th2, através da sua acção reguladora sobre Th1, poderiam contrariar as respostas inflamatórias, opondo-se ao desenvolvimento da diabetes tipo 1.

As respostas do tipo Th1 efectuam-se através do reconhecimento de antígeno por células T *naive* pelo seu receptor (*TCR*), juntamente com um sinal co-estimulatório dado pelas moléculas B7-1 e B7-2 expressas na superfície das APC.

Este sinal co-estimulatório é dado às células T pela interacção de B7 com os seus receptores nas células T - CD28 e CTLA-4 (Reeves *et al* 1997).

O aumento da expressão B7 nas APC é necessário para uma apresentação óptima de antígenos às células T; esta co-estimulação das células T mediada por B7 é importante na patogénese da diabetes 1. De modo geral, a importância de sinais co-estimulatórios na patogénese da diabetes tipo 1 nos NOD acentua a importância das células apresentadoras de antígeno (APC) (Aoki *et al* 2005). Os NOD apresentam um aumento na percentagem de células B que expressam B7-1⁺ e B7-2⁺ nos ilhéus (Hussain *et al* 2005). Deste modo, o efeito co-estimulatório CD28/B7, pode promover uma resposta do tipo Th1 a auto-antígenos (Bour-Jordan *et al* 2004).

Outro membro da via co-estimulatória é o CTLA-4 cuja expressão parece estar diminuída nos linfócitos dos NOD quando comparada com outras estirpes (Colucci *et al* 1997). O CTLA-4 é uma molécula co-estimulatória negativa que regula a activação e proliferação das células T por ligação a B7-1/2 das APC, competindo com CD28 para os mesmos ligandos e com maior afinidade (Peach *et al* 1994; Tivol *et al* 1995). Quando expressa por células T activadas, o CTLA-4 inibe a proliferação das células T, a produção de IL-2 e a proliferação do ciclo celular (Walunas *et al* 1994; Krummel e Allison, 1995; Krummel e Allison, 1996; Krummel *et al* 1996; Aoki *et al* 2005).

Alguns autores sugerem que uma combinação de marcadores genéticos Th2 e metabólicos poderá conferir predisposição genética adicional, em que a transmissão de génotipos de baixa expressão Th2, aliada a um perfil genético Th1 normal, poderá resultar em perfis de expressão predominantemente pro-inflamatórios (Eerligh *et al* 2004).

Os mecanismos intrínsecos (vias de sinalização de activação) e as deficiências extrínsecas (células acessórias) conferem capacidades proliferativas reduzidas aos timócitos e às células T periféricas após activação via TCR. Esta fraca resposta pode tornar as células T CD4⁺ e T CD8⁺ mais resistentes aos mecanismos de morte celular induzida por activação (AICD - *activation induced cell death*) (Colucci *et al* 1997; Arreaza *et al* 2003). A resistência à apoptose das células T CD4⁺ e T CD8⁺ nos NOD sugere que estes possuem uma capacidade reduzida de eliminar células T auto-reactivas, o que é compatível com a natureza autoimune da diabetes tipo 1 (Arreaza *et al* 2003).

1.5.3. Semelhanças e diferenças entre a diabetes tipo 1 nos humanos e no modelo NOD

Tanto os murganhos NOD como os humanos com diabetes tipo 1 possuem uma predisposição genética que não é monogénica, com uma contribuição de *loci* não-MHC igualmente múltipla. Parece haver uma influência ambiental em ambos os casos, assim como uma regulação imunológica periférica deficiente. Acrescendo ao facto da doença poder ser transmitida por transplantação de medula óssea, os auto-antígenos parecem ser os mesmos, desconhecendo-se, em ambos, qual o(s) auto-antígeno(s) iniciador da doença.

Existem diferenças importantes a considerar em relação à diabetes autoimune nos NOD e nos humanos. Enquanto nos humanos existe apenas um gene que codifica para a insulina, nos murganhos NOD existem dois genes; nestes últimos a reactividade humoral às células β reside nos auto-anticorpos anti-insulina, enquanto nos seres humanos existem também auto-anticorpos anti-*GAD65* e anti-*IA2*, sendo que as células β pancreáticas dos murganhos NOD não expressam *GAD65*.

Ao invés do que acontece nos NOD, em que há uma maior prevalência da diabetes tipo 1 nas fêmeas em relação aos machos, tal não acontece nos humanos, embora a incidência seja consideravelmente superior nos NOD – 0,25 a 0,40% nos humanos *versus* mais de 80% nos NOD -, sendo que a incidência pode chegar a atingir 30% nos humanos em indivíduos geneticamente susceptíveis (Rosmalen *et al* 2002).

Em relação à insulite mediada por células T, esta é mais severa nos NOD do que nos humanos, sendo que estes não apresentam peri-insulite e apenas um número reduzido de indivíduos apresenta infiltrados linfocitários noutros tecidos, ao passo que o mesmo não acontece nos NOD.

Uma diferença igualmente importante reside no facto de os auto-anticorpos maternos serem diabetogénicos no modelo NOD (Andersson *et al* 1991; Greeley *et al* 2002), ao contrário do que se passa nos humanos, em que a transferência placentária de auto-anticorpos reduz potencialmente o risco de desenvolvimento da diabetes tipo 1 (Koczwara *et al* 2004). Acresce dizer que embora haja mais de 195 intervenções com agentes terapêuticos que são bem sucedidas nos NOD, nos seres humanos aguarda-se o desenvolvimento de terapias verdadeiramente eficazes contra o desenvolvimento da diabetes tipo 1 (Roep *et al* 2004).

2. Envolvimento de espécies reactivas de oxigénio e nitrogénio na diabetes tipo 1

Tem sido acumulada evidência experimental de que as espécies reactivas de oxigénio (*ROS*) desempenham um papel crucial na transdução de sinal das células T e B, bem como em outros tipos celulares. Por isso, tem sido proposto que as espécies reactivas de oxigénio possam actuar como segundos mensageiros numa miríade de eventos de transdução de sinais (Chen *et al* 2000).

Apesar da diabetes tipo 1 ser descrita como uma doença autoimune, as espécies reactivas de oxigénio *ROS*, assim como espécies reactivas de nitrogénio (*RNS*) poderão actuar como moduladores das reacções autoimunes a diferentes níveis.

Existem vários estudos que sugerem que as *ROS* estão envolvidas na destruição das células β pancreáticas, o fenótipo chave da doença, independentemente dos factores que a despoletam (Ho *et al* 1999).

Evidências de que o processo envolve mediadores como o óxido nítrico e radicais livres de oxigénio, incluem as seguintes observações (Kawasaki *et al* 2004):

- as células β expressam muito pouco enzimas de neutralização de *ROS*, indicando que poderão ser susceptíveis a danos por radicais livres;
- IL-1, sozinha ou em combinação com IFN- γ , induz a produção de *NO* que aumenta a apoptose das células β ; a apoptose induzida pelas citocinas é mediada através de um aumento da expressão de *iNOS* (*NO* sintetase induzível) e consequente produção de *NO*;
- ilhéus de Langerhans que são deficientes em *iNOS* são mais resistentes à morte induzida por citocinas do que ilhéus *wild type*;
- Kubisch *et al* (1994) - a sobre-expressão de superóxido dismutase (*SOD*) aumenta a resistência ao stresse oxidativo;
- A sobre-expressão de *SOD* de manganésio, catalase e glutathione peroxidase em células insulinoma, previne a citotoxicidade induzida por IL-1;
- Hotta *et al* (1998) - a sobre-expressão da tioredoxina nas células β em NOD transgénicos conduz a uma redução acentuada na diabetes;
- Ihara *et al* (1999) - mostrou que os ilhéus pancreáticos de ratos diabéticos possuíam um aumento de *ROS*;
- Piganelli *et al* (2002) - mostraram que a administração de uma metaloporfirina baseada em *SOD* previne o aparecimento da diabetes tipo 1 e inibe a insulite em NOD.*scid* injectados com um mimetista da *SOD*, antes da transferência do

clone de células TBDC2.5. Estes resultados sugerem que este mimetista pode ser usado para inibir as respostas das células T a auto-antígenos.

Na presença da principal citocina Th1 - IFN- γ -, as células dos ilhéus pancreáticos humanos libertam níveis elevados de óxido nítrico (Marselli *et al* 2001) que pode alterar a secreção de insulina e provocar disfunção nas células β por esgotamento de antioxidantes das células dos tecidos durante a inflamação pancreática (Laybutt *et al* 2002).

De facto, a fase pré-diabética na qual os ilhéus de Langerhans estão infiltrados com células imunitárias e inflamatórias, que ocorre antes da morte das células β pancreáticas, é acompanhada pela libertação de ROS e RNS citotóxicas (Rabinovitch *et al* 1998). Alguns autores propõem que a destruição das células produtoras de insulina poderá resultar da exposição directa a radicais livres produzidos pelas células imunitárias (Nathan *et al* 1986; Ho *et al* 1999). Um potencial mecanismo é o efeito tóxico dos radicais livres de oxigénio produzidos como resultado do influxo de células inflamatórias para o pâncreas (Cornellius *et al* 1993).

Tem sido sugerido que indivíduos com diabetes tipo 1 poderão ter defeitos significativos nas suas defesas antioxidantes quando comparados com indivíduos saudáveis não diabéticos (Maxwell *et al* 1997). Danos peroxidativos sistémicos associados a mecanismos de defesa insuficientes contra ROS já estarão presentes na altura do aparecimento clínico da diabetes tipo 1 em crianças e adolescentes (Martin-Gallan *et al* 2005).

No entanto, é pouco provável que qualquer efeito tóxico de radicais livres de oxigénio nas células β dos NOD resulte, directa ou exclusivamente, de uma deficiência enzimática antioxidante, já que animais da estirpe NOD não diferem significativamente na sua actividade enzimática antioxidante, quando comparados com estirpes não autoimunes (Cornellius *et al* 1993). Outros autores referem que o modelo NOD possui um número superior de marcadores de stresse oxidativo nas células β na fase pré-diabética, comparado com estirpes controlo, tendo sido sugerido que poderá existir uma correlação entre a capacidade de regeneração dos ilhéus de Langerhans e a sua resistência ao stresse oxidativo (Haskins *et al* 2003; Haskins *et al* 2004).

Adicionalmente, as células β pancreáticas têm uma sensibilidade pronunciada em relação ao stresse oxidativo (Zhang *et al* 1995; Lapidot *et al* 2002). O'Brien e colaboradores (1997) demonstraram que a morte de células β por apoptose precede a infiltração nos ilhéus de Langerhans, levantando a hipótese de que a susceptibilidade das células β à

apoptose pode influenciar a ocorrência da diabetes por mecanismos autoimunes e não-autoimunes no modelo NOD (O'Brien *et al* 1997).

Tal como acontece com os auto-anticorpos, ainda não é claro se a produção de ROS é a causa directa da morte das células β , ou simplesmente uma consequência da progressão da doença, apesar de alguns distúrbios nas defesas antioxidantes surgirem mesmo no estado pré-diabético (Ho *et al* 1999).

Espécies reactivas de oxigénio desempenham funções importantes nos processos inflamatórios, nomeadamente através da activação de factores de transcrição (Rahman *et al* 2006). A modulação do estado redox pode afectar os mecanismos intracelulares envolvidos na diferenciação linfocitária, o que torna a transdução de sinal dos linfócitos influenciável pelo stresse oxidativo (Krejsa *et al* 1997; Gong *et al* 2003).

Adicionalmente, tem sido sugerido que um fraco estado nutricional e dietas ricas em nitritos e nitratos estarão relacionadas com o aumento da incidência da diabetes tipo 1, produzindo um ambiente mais susceptível ao dano oxidativo resultante de um decréscimo nas defesas antioxidantes (Dahlquist *et al* 1990; Virtanen *et al* 1994; Ho *et al* 1999).

3. Compostos polifenólicos - os flavonóides

É reconhecido que as estruturas dos produtos naturais têm uma elevada diversidade química, especificidade bioquímica e propriedades biológicas, que as tornam particularmente interessantes para a descoberta de novas drogas e que servem para diferenciá-los das bibliotecas sintéticas e compostos combinatórios de químicos (Clardy *et al* 2004).

Produtos naturais e seus derivados têm sido tradicionalmente a fonte maioritária de drogas, representando 30% do mercado farmacêutico (Kirkpatrick *et al* 2002). Os produtos naturais são ainda as maiores fontes de agentes terapêuticos inovadores para doenças infecciosas, cancro, desordens lipídicas e imunomodulação (Altmann *et al* 2001).

Os produtos naturais são um bom ponto de partida para que seja(m) encontrado(s) um ou vários compostos que tenham actividade(s) biológica(s) úteis, especialmente em áreas terapêuticas. Mesmo grandes combinações de compostos químicos usados, muitas vezes não reflectem o mesmo espectro alargado e diversidade química que muitos dos produtos naturais exibem ((Brohm *et al* 2002; Dobson *et al* 2004; Basso *et al* 2005).

Compostos polifenólicos, em particular os flavonóides, têm sido descritos como substâncias moduladoras de uma variedade de processos inflamatórios e de funções

imunitárias (Middleton *et al* 2000; Nair *et al* 2002). De uma maneira geral, atribui-se aos polifenóis naturais funções importantes na defesa imunitária, nomeadamente actuando como quimioprotectores contra processos inflamatórios mediados pelo sistema imunitário sob estimulação crónica de antigénios.

A literatura refere que os flavonóides veiculados pela dieta poderão ser responsáveis por uma variedade de acções bioquímicas e farmacológicas como: anticarcinogénicas, cardioprotectoras, antimicrobianas, anti-trombóticas, anti-virais, hepatoprotectoras e anti-inflamatórias (Middleton *et al* 2000). Os mecanismos moleculares pelos quais estes compostos exercem os seus efeitos permanecem por esclarecer.

Os compostos flavonóides são produzidos como metabolitos das plantas. A quercetina, um dos flavonóides com maior representatividade na dieta - abundantemente presente na pele de frutos, folhas de chá e de tabaco - tem sido alvo de investigação no sentido de melhorar/tratar muitas doenças inflamatórias (Rice-Evans *et al* 1996; Chen S-S *et al* 2000). Por exemplo, a quercetina inibe a encefalomielite alérgica experimental (EAE) em murganhos SJL/J, bloqueando a produção de IL-12 e a diferenciação Th1 (Yanagida *et al* 1994; Nguyen *et al* 2000; Muthian e Bright, 2004).

Antioxidantes como a quercetina alteram o desenvolvimento Th1 *versus* Th2 e a produção de IgE (Jeannin *et al* 1995; Peterson *et al* 1998; Gong *et al* 1999; Masbad *et al* 1999). Estes antioxidantes aumentam a glutathiona intracelular, por múltiplos mecanismos de neutralização directa de ROS, quelatação de metais de transição, e aumento da expressão de genes antioxidantes (Xie *et al* 1995; Gong *et al* 2003).

Alguns autores sugerem que, apesar dos alvos intracelulares envolvidos nas acções anti-inflamatórias da quercetina, e de compostos polifenólicos de uma maneira geral, ainda não estarem bem definidos, esta poderá ser útil no tratamento de doenças autoimunes inflamatórias mediadas por células Th1 (Muthian e Bright, 2004).

O trabalho realizado pretendeu avaliar a actividade biológica de um extracto natural de uvas, rico em compostos polifenólicos, obtido através de tecnologias limpas, ao nível da diabetogénese, ao nível da inflamação pancreática e ao nível das funções linfocitárias no modelo murino NOD da diabetes tipo 1.

MATERIAL E MÉTODOS

B. MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Para prossecução do trabalho foram criados murganhos das estirpes C57Bl/6, NOD.Lt/J e NOD.LtSz/*scid*. Estes foram mantidos num ambiente de temperatura controlada (22-24°C) sob ciclos de luz/escuro 12:12 no biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência, em Oeiras.

2. Extracto natural de uvas

O extracto natural de uvas (E.N.U.) foi obtido a partir de resíduos da produção de vinho branco, e preparado pelo Laboratório de Nutracêuticos do Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica utilizando procedimentos *G.R.A.S.* (*generally-recognised-as-safe*).

Resumidamente, resíduos de uvas brancas (variedade Arinto) foram triturados e extraídos com 50:50 H₂O/etanol (2ml solvente/g resíduo) durante 30 minutos à temperatura ambiente. A fase líquida foi centrifugada a 9000 r.p.m. a 20°C durante 15 minutos, sendo posteriormente concentrada em vácuo, a 40°C, usando um evaporador rotativo. O extracto natural de uvas foi finalmente filtrado (0,2µm) e armazenado a 20°C até à sua utilização. A quantificação dos polifenóis revelou que a quercetina estava presente em maior quantidade no extracto da matriz natural, encontrando-se numa concentração total de 0,1mg/ml.

3. Preparação de suspensões celulares

Para os ensaios *in vitro* foram utilizados murganhos NOD.Lt/J e C57Bl/6 com idades compreendidas entre 6 e 8 semanas de idade. Os murganhos foram eutanaziados com CO₂ e os gânglios linfáticos (axilares, braquiais, mesentéricos, inguinais, paravertebrais e pancreáticos) foram colhidos em *Hank's Bovine Salt Solution* (HBSS) com 2% de soro fetal de bovino (com CaCl₂ e MgCl₂) (GIBCO).

Para cada estirpe de murganhos foram reunidos gânglios linfáticos provenientes de vários animais. As suspensões celulares foram preparadas forçando suavemente os gânglios

através de uma fibra de rede de nylon. As suspensões celulares foram centrifugadas a 1200 r.p.m. durante 10min e o *pellet* ressuspendido em meio RPMI 1640 com GlutaMAX™ suplementado com 10% de soro fetal de bovino, HEPES 1M, piruvato de sódio MEM 10mM, penicilina-estreptomicina e β -mercaptoetanol (GIBCO).

O número de linfócitos viáveis foi determinado por exclusão do corante vital azul de tripano numa câmara de Neubauer. O azul de tripano é um corante vital diazo que, incapaz de penetrar membranas plasmáticas intactas, apenas cora de azul as células mortas que podem ser visualizadas por microscopia e excluídas da contagem.

4. Enriquecimento em células T por fibra de lã de nylon

Para a obtenção de suspensões linfocitárias enriquecidas em células T foi utilizado um método que permite a obtenção de preparações celulares enriquecidas em células T, ficando relativamente livres de células aderentes, células mortas e restos celulares. Este método consiste na incubação de suspensões celulares em colunas preenchidas com lã de nylon (Nylon Wool Fiber - Polysciences, Inc.).

Após contagem, as suspensões celulares foram acertadas a 2ml de meio de cultura RMPI completo, e menos de 2×10^8 células foram inseridas em colunas com 10ml de capacidade com lã de nylon previamente descompactada. Após a eliminação de eventuais bolhas de ar, as colunas foram incubadas com meio RMPI completo a 37°C durante 1 hora. Após a adição das suspensões linfocitárias às colunas, estas foram incubadas durante 1 hora a 37°C.

A maioria das células B permaneceram na malha da lã de nylon e as células T, não-aderentes, foram recolhidas na parte inferior das colunas. A fracção enriquecida em células T foi centrifugada a 1200 r.p.m. durante 10min e ressuspensa em meio completo RPMI adicional. De modo a aumentar a pureza das suspensões em células T, este processo foi repetido.

Os *pellets* obtidos foram ressuspensos em 3-5ml de meio RPMI completo e a viabilidade celular determinada pela técnica de exclusão de azul de tripano. Este procedimento, que envolve a contagem das células que não incorporam o azul de tripano, foi realizado imediatamente antes dos ensaios *in vitro*.

O grau de pureza das suspensões foi estimado por citometria de fluxo através da determinação das percentagens de células T e de células B presentes nas suspensões enriquecidas.

5. Culturas celulares primárias

Nos ensaios *in vitro* foram usadas suspensões enriquecidas em células T após determinação da pureza por citometria de fluxo. As suspensões celulares dos baços utilizadas continham, após enriquecimento, 59,8% ($\pm 8,8$) de células T nos C57Bl/6 e 64,3% ($\pm 3,3$) nos NOD.Lt/J. Relativamente às suspensões celulares dos gânglios linfáticos, foram utilizadas suspensões enriquecidas contendo, em média 83,5% ($\pm 3,4$) de linfócitos T viáveis provenientes de murganhos C57Bl/6 *versus* 89,9% ($\pm 4,8$) de NOD.Lt/J.

As células foram depositadas em placas plásticas com poços de fundo liso (1×10^6 células viáveis/ml) e incubadas em meio RPMI completo com concanavalina A ($2 \mu\text{g/ml}$) (SIGMA) a 37°C numa câmara com uma atmosfera de 5% CO_2 durante 24h. Após este período, foi adicionada interleucina 2 (IL-2) (10U/ml) como factor de crescimento das subpopulações de células T, durante 24h adicionais. A IL-2 é um factor de proliferação não específico para as células T que induz a progressão do ciclo celular nas células em repouso permitindo, por isso, a expansão clonal de células T activadas. O extracto natural de uvas ($3 \mu\text{l/ml}$) foi adicionado aos linfócitos pré-activados, com excepção dos controlos, a que se seguiu um período de incubação de 24h. As células foram recolhidas e preparadas para análise no citómetro de fluxo.

6. Análise de populações linfocitárias - Citometria de fluxo

6.1. Fundamento

A identificação e quantificação de antigénios celulares com anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos – imunofenotipagem - é uma das aplicações mais importantes da citometria de fluxo.

O princípio fundamental da utilização deste método analítico para identificação de subpopulações celulares baseia-se na expressão diferencial de proteínas de superfície celulares - marcadores de superfície. As populações linfocitárias podem ser distinguidas entre si através da utilização de anticorpos específicos que reconhecem proteínas de superfície que lhes conferem diferentes capacidades funcionais.

Na análise por citometria de fluxo são necessárias preparações de células únicas. Várias sondas ou anticorpos podem ser ligados ao(s) antigénio(s) de interesse. A suspensão

celular é aspirada pelo interior de um tubo fino onde, rodeada por uma corrente líquida fina, as células passam individualmente, espaçadas entre si por intervalos regulares, por um feixe de laser. A luz é reflectida, deflectida ou absorvida quando encontra uma célula. A luz absorvida num determinado comprimento de onda pode ser re-emitada como fluorescência se a célula contém uma substância naturalmente fluorescente, ou um ou mais anticorpos marcados com fluorocromos ligados à superfície ou a estruturas celulares internas. A luz deflectida é dependente da estrutura interna da célula (granulosidade), e a luz reflectida é dependente do seu tamanho.

As substâncias fluorescentes absorvem luz num determinado comprimento de onda (c.d.o.) e re-emitem-na noutra. Assim, o fluorocromo de cada anticorpo monoclonal pode ser excitado a um determinado c.d.o. por um laser e emitir fluorescência noutra c.d.o. A luz e/ou os sinais de fluorescência difundidos são detectados por tubos fotomultiplicadores e amplificados.

6.2. Procedimento e análise das populações linfocitárias

Após o período de incubação, as células foram centrifugadas a 2000 r.p.m. durante 30 segundos e os sobrenadantes rejeitados. As suspensões celulares foram lavadas com uma solução tampão adequada (*PBS* 2% soro fetal bovino; 0,015% azida de sódio) e marcadas com anticorpos monoclonais fluorescentes para análise no citómetro de fluxo.

Para a aquisição dos eventos (sendo cada detecção de uma única célula considerada um evento) as células foram seleccionadas nos linfócitos pela morfologia (tamanho e complexidade). Para detecção das células mortas as suspensões linfocitárias foram incubadas com iodeto de propídio (*PI*).

Nos linfócitos viáveis, determinados através dos linfócitos que não emitiam fluorescência com iodeto de propídio (*PI* negativos), foi analisada a expressão de CD4+, CD8+ e B220 assim como a expressão do marcador de activação CD69, em cada população linfocitária.

O equipamento analítico utilizado na aquisição dos dados foi o citómetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences), e para a análise, o *software* FlowJo (BD Biosciences).

6.3. Anticorpos

De modo a bloquear marcações por ligações inespecíficas foi utilizado um anticorpo anti-receptor Fc: Anti-FcR-IgG2b CD16/CD32 (2.4G2). Os linfócitos foram marcados na superfície com anti-TCR $\delta\beta$ marcado com isotiocinato de fluoresceína (*FITC*) (H57-597),

anti-B220 marcado com alofococianina (APC) (RA3-6B2), anti-CD4 FITC (L3T4; GK 1.5) (B.D. Biosciences Pharmingen™), anti-CD8 (APC) (YTS169.4), anti-CD69 biotilado (H1.2F3) (B.D. Biosciences Pharmingen™), estreptavidina marcada com ficoeritrina (PE) (B.D. Biosciences Pharmingen™).

7. Status da diabetes

A diabetes tipo 1 foi diagnosticada através da medição dos níveis de glicose presentes no sangue que resulta de uma descompensação na regulação da glicose sanguínea que se traduz num estado de hiperglicémia.

Esta desregulação é consequência da destruição selectiva das células produtoras de insulina do pâncreas, resultado de uma infiltração leucocitária que pode ser visualizada após coloração pancreática *post mortem* e quantificada através da determinação do índice de insulite.

7.1. Glicémia

O desenvolvimento da diabetes tipo 1 nos murganhos NOD.Lt/J foi acompanhado através de medições frequentes da glicémia pelo teste Accu-Chek® Sensor Comfort (Roche Diagnostics GmbH). O aparelho Accu-Chek determina a concentração de glicose no sangue por amperometria. A tira-teste contém glicose-desidrogenase que converte a glicose presente na amostra de sangue em gliconolactona que, na presença da coenzima pirroloquinolinoquinona (P.Q.Q.), gera uma corrente eléctrica que o aparelho integra e reconhece como glicose no sangue. O limite de detecção do teste é de 10mg de glicose por decilitro de sangue (0,6mmol/l) para a tira-teste. O limite superior do teste é de 600mg/dl (33,3mmol/l).

Para medir a glicémia dos animais foi efectuado um corte na extremidade da cauda, e recolhido sangue suficiente preenchendo a totalidade do espaço disponível na tira-teste de modo a obter resultados fiáveis. Os murganhos foram considerados diabéticos quando os níveis de glucose no sangue excederam 250mg/dl em três medições consecutivas, ao longo do período de monitorização.

Na experiência *in vivo*, a monitorização da glicémia foi iniciada quando os animais atingiram as 11 semanas de idade, e pelo menos até que os animais tivessem 36 semanas de idade.

7.2. Insulite

A infiltração leucocitária dos ilhéus pancreáticos (insulite) é a principal característica histopatológica do desenvolvimento da diabetes tipo 1.

Para a sua avaliação procedeu-se à determinação do índice de insulite (*I*) em fêmeas C57Bl/6, NOD.Lt/J e NOD.LtSz/*scid*. Os animais foram sujeitos a suplementação com E.N.U. durante duas semanas *ad libitum* na água de bebida, sendo eutanaziados com CO₂ após esse período.

7.2.1. Coloração hematoxilina/eosina

Os pâncreas dos animais foram recolhidos com o auxílio de tesouras e pinças cirúrgicas e, após uma breve lavagem com PBS para remover vestígios de sangue, foram colocados em frascos de vidro contendo uma solução de formalina 10% para fixação.

Após serem embebidos em parafina, os pâncreas foram seccionados com micrótopo e os cortes foram montados em lâminas de vidro antes de serem sujeitos a uma coloração com hematoxilina/eosina que permite a visualização microscópica dos ilhéus de Langerhans.

Resumidamente, as lâminas contendo os cortes pancreáticos foram sujeitas a uma desparafinização com xilol durante 10 min, seguindo-se uma série de lavagens, em imersão, com soluções em percentagens decrescentes de etanol:

- ◆ etanol 100%-----5 min;
- ◆ etanol 95%-----2 min;
- ◆ etanol 70%-----2 min;
- ◆ etanol 50%-----2 min.

Após imersão em água destilada durante 2 min, os cortes histológicos foram corados com hematoxilina (*Harris Hematoxylin solution modified (SIGMA)*) durante 8 min, ao fim dos quais se procedeu a uma passagem por água destilada seguida de uma imersão em álcool clorídrico 0,5% durante 15 seg. A coloração azulada aparece ao fim de 2 min em água morna corrente. Seguiu-se nova imersão em etanol 95% durante 1min. Uma incubação em eosina alcoólica (0,5% w/v, em etanol 90%v/v) (SIGMA) durante 2 min antecedeu duas lavagens por imersão em etanol 100% durante 1 min (2x). A montagem foi efectuada em xilol durante 5min.

7.2.2. Determinação do Índice de insulite (I)

Um sub-fenótipo valioso no diagnóstico da pré-diabetes nos murganhos NOD.Lt/J, é a determinação do índice de insulite, permitindo uma medida da extensão do processo autoimune.

Os cortes foram obtidos de maneira a conseguir uma boa representatividade dos ilhéus pancreáticos. Para tal, cortes histológicos, com 10µm de espessura foram recolhidos, desprezando secções sobrepostas de modo a não serem observados os mesmos ilhéus e, com isso evitando que os mesmos ilhéus fossem repetidamente avaliados, introduzindo erros na determinação do índice de insulite.

Após coloração com hematoxilina/eosina, os cortes histológicos foram observados ao microscópio óptico com objectivas de ampliação de 10x e 20x para avaliação do estado de infiltração dos ilhéus de Langerhans. Para o cálculo do índice de insulite foram observados 30 a 50 ilhéus por animal.

O cálculo do índice de insulite foi efectuado de acordo com a seguinte fórmula (adaptado de E. Leiter, 1997):

$$I \text{ (índice de insulite)} = [(n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)] / [4 \times (n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4)]$$

Consideram-se 5 graus de infiltração sendo n_x o número de ilhéus observados (n) de acordo com o estado de infiltração de cada ilhéu de Langerhans:

- ◆ 0- sem infiltração;
- ◆ 1- infiltrados perivasculares/periductulares com leucócitos no perímetro dos ilhéus, mas sem os penetrar (peri-insulite);
- ◆ 2- penetração leucocitária até 25% da massa do ilhéu;
- ◆ 3- penetração leucocitária até 75% da massa do ilhéu;
- ◆ 4- fase final da insulite, <20% da massa do ilhéu permanece intacta.

Um índice de insulite próximo de 1,0 significa que praticamente todos os ilhéus foram abundantemente infiltrados.

7.3. Tratamentos com extracto natural de uvas

Para os ensaios *in vitro* e *in vivo* o E.N.U. foi descongelado ao abrigo da luz, à temperatura ambiente e diluído na água de bebida dos animais. Os bebedouros foram igualmente protegidos da luz durante o tempo em que continham o E.N.U e esta mistura

foi administrada continuamente como água de bebida durante todo o período de tratamento.

No início de cada ensaio, cada gaiola continha entre 3 e 5 animais para garantir o livre acesso à água de bebida.

Nos ensaios *ex vivo* foram utilizadas várias concentrações de extracto natural de uvas. Procedeu-se a um ensaio durante 15 dias com 8 animais C57Bl/6 (tendo 5 sido sujeitos a suplementação com E.N.U. na água de bebida, e 3 utilizados como controlos) e 5 murganhos NOD.Lt/J em que dois foram utilizados como controlos.

No sentido de avaliar se o fenótipo se manteria com uma diminuição da concentração de E.N.U. na água de bebida (diluição 1:30) mantendo o mesmo tempo de tratamento, foi utilizado um grupo de 10 fêmeas NOD.Lt/J (5 animais controlo e 5 animais teste).

Utilizando uma concentração superior aos primeiros ensaios, procedeu-se à suplementação com E.N.U. utilizando animais NOD.Lt/J (n=5) e NOD.LtSz/*scid* (n=4), fêmeas, com animais controlo (n=4) para cada estirpe.

Para a experiência *in vivo*, murganhos fêmea NOD.Lt/J (n=76) foram mantidos sob uma dieta normal. Entre as 4-5 semanas de idade 45 murganhos NOD.Lt/J fêmea foram sujeitos a uma suplementação constante com extracto natural de uvas na água de bebida (diluição 1:72) *ad libitum* durante 20 semanas. Como controlos foram utilizados 31 murganhos fêmeas da mesma estirpe e idade às quais não foi adicionado E.N.U. à sua água de bebida.

A evolução do estado glicémico dos animais tratados e não tratados com E.N.U. foi analisada, assim como a progressão das respectivas curva de morte.

RESULTADOS

C. RESULTADOS

Para estudar o potencial efeito do extracto natural de uvas sobre o decurso da diabetes tipo 1, foram conduzidos ensaios: a) *in vitro* sobre as principais populações linfocitárias envolvidas na patogénese da diabetes tipo 1; b) *ex vivo* nas quais se avaliou o efeito de uma suplementação *per os* de E.N.U. em murganhos sobre populações linfocitárias previamente definidas, assim como o grau de infiltração linfocitária nos ilhéus de Langerhans (índice de insulite) e glicémia; e c) *in vivo* no qual murganhos geneticamente predispostos à diabetes tipo 1 foram submetidos a uma suplementação com E.N.U. durante 5 meses, de modo a determinar a influência do E.N.U. na incidência da diabetes autoimune neste modelo.

1. Ensaio *in vitro*

Os ensaios *in vitro* foram realizados com o intuito de avaliar a actividade do extracto natural de uvas (E.N.U.) sobre linfócitos de murganhos NOD.Lt/J e, por comparação, sobre linfócitos de C57Bl/6.

Para condução dos ensaios *in vitro* foram analisadas suspensões celulares de baço e gânglios linfáticos de murganhos com 7 semanas de idade. As suspensões foram enriquecidas em linfócitos T conforme descrito em Material e métodos e, submetidas a pré-activação *in vitro* com um mitogénio (concanavalina A), na presença de interleucina 2 (IL-2).

Na figura 1 encontram-se representados os resultados obtidos da análise das subpopulações T CD4+ e T CD8+ para cada estirpe, C57Bl/6 e NOD.Lt/J, na presença e na ausência de 3µl/ml de E.N.U. Os resultados representam as mesmas tendências observadas em pelo menos três ensaios independentes em murganhos fêmea com a mesma idade.

1.1. Percentagem de linfócitos T CD4+

As sub-populações linfocitárias T que expressam receptores CD4 ou receptores CD8 estão representadas como percentagens de linfócitos viáveis presentes em cada suspensão, T CD4+ e T CD8+, respectivamente.

Relativamente às células T CD4+ originárias do baço (figura 1 A., painel superior) observa-se que, na ausência de estimulação com E.N.U., os NOD.Lt/J apresentam maior percentagem de T CD4+ do que os C57Bl/6. As percentagens desta sub-população T nas células tratadas com extracto natural de uvas durante 24h mantiveram qualitativamente esta diferença. Notamos ainda que na presença de E.N.U. a percentagem de linfócitos T CD4+ diminui em ambas as estirpes. Esta redução é superior nas células da estirpe controlo não diabética quando comparada com a estirpe geneticamente predisposta à diabetes autoimune - NOD.Lt/J.

Analisando os resultados relativos às suspensões celulares provenientes de gânglios linfáticos dos mesmos animais, verificamos que as percentagens de linfócitos T CD4+ se mantêm superiores nas suspensões dos animais NOD.Lt/J, em comparação com as dos animais C57Bl/6 (figura 1 B., painel superior). Na presença de E.N.U. a diferença de células T CD4+ entre estirpes é maior nos gânglios linfáticos do que nas células provenientes do baço.

Nestes ensaios *in vitro*, a percentagem de células T CD4+ de baço e gânglios linfáticos de ambas as estirpes diminui na presença de E.N.U. No entanto, este efeito parece ser mais acentuado nas células dos gânglios linfáticos dos murganhos NOD.Lt/J em comparação com o efeito nas células do baço.

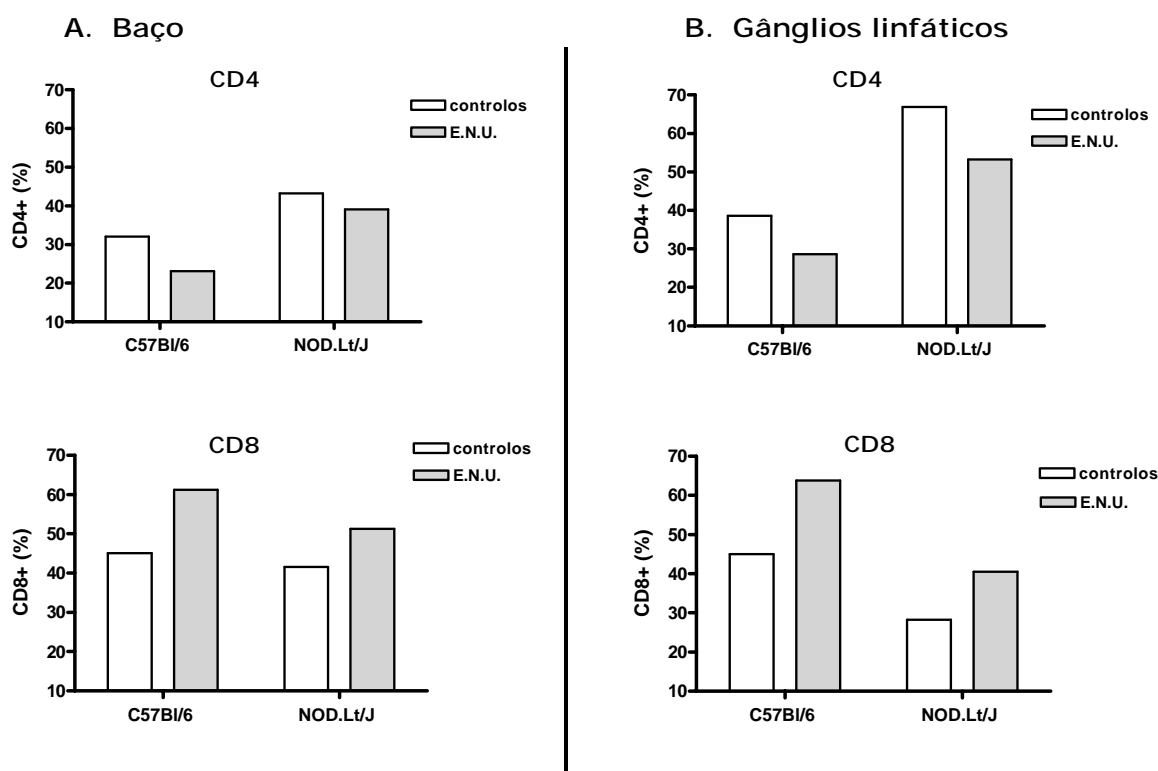


Figura 1- Níveis das sub-populações T CD4+ e T CD8+. Percentagem de linfócitos T viáveis que expressam CD4 (painel superior) e CD8 (painel inferior) em suspensões celulares enriquecidas em células T provenientes de baços (A.) e gânglios linfáticos (B.). Na preparação das suspensões celulares foram usados murganhos macho das estirpes C57Bl/6 (n=8) e NOD.Lt/J (n=8). As colunas em branco representam as células que não foram incubadas com E.N.U., e as colunas a cinzento representam os resultados das suspensões incubadas com E.N.U. durante 24h a 37°C em atmosfera de 5% CO₂.

1.2. Percentagem de linfócitos T CD8+

Ao contrário dos resultados obtidos respeitantes às células T CD4+, a percentagem de linfócitos T CD8+ nas células dos NOD.Lt/J são inferiores às dos C57Bl/6, sendo mais evidente nas suspensões dos gânglios linfáticos (figura 1 A. e B., painéis inferiores).

Na ausência de E.N.U., a percentagem de células T CD8+ dos animais C57Bl/6 são semelhantes no baço e nos gânglios linfáticos. O mesmo não acontece nos NOD.Lt/J que, percentualmente, possuem níveis de CD8+ inferiores nos gânglios linfáticos, em relação ao baço. As diferenças constatadas nas populações linfocitárias T CD4+ e T CD8+ que foram tratadas com E.N.U. sugerem que este possa ter um efeito na activação destas populações celulares.

1.3. Níveis de activação das sub-populações T CD4+ e T CD8+

Para avaliação dos níveis de activação das sub-populações de linfócitos T, CD4+ e CD8+, resultante da actividade do E.N.U. foi analisado o nível de expressão do marcador de activação celular CD69.

Em termos de activação das células do baço, a percentagem de células CD4+ que expressam CD69 não difere significativamente nos controlos de ambas as estirpes (figura 2 A., painel superior). No entanto, nos gânglios linfáticos a percentagem de células T CD4+ activadas é maior nos controlos NOD.Lt/J do que nos C57Bl/6.

No que diz respeito às suspensões do baço tratadas com E.N.U., observamos que o aumento da percentagem de células activadas é semelhante em ambas as estirpes (figura 2 A., painel superior). O gráfico que corresponde aos gânglios linfáticos (figura 2 B., painel superior) mostra que as células T CD4+ dos NOD.Lt/J têm um grau de activação mais acentuado quer na presença, quer na ausência de E.N.U.

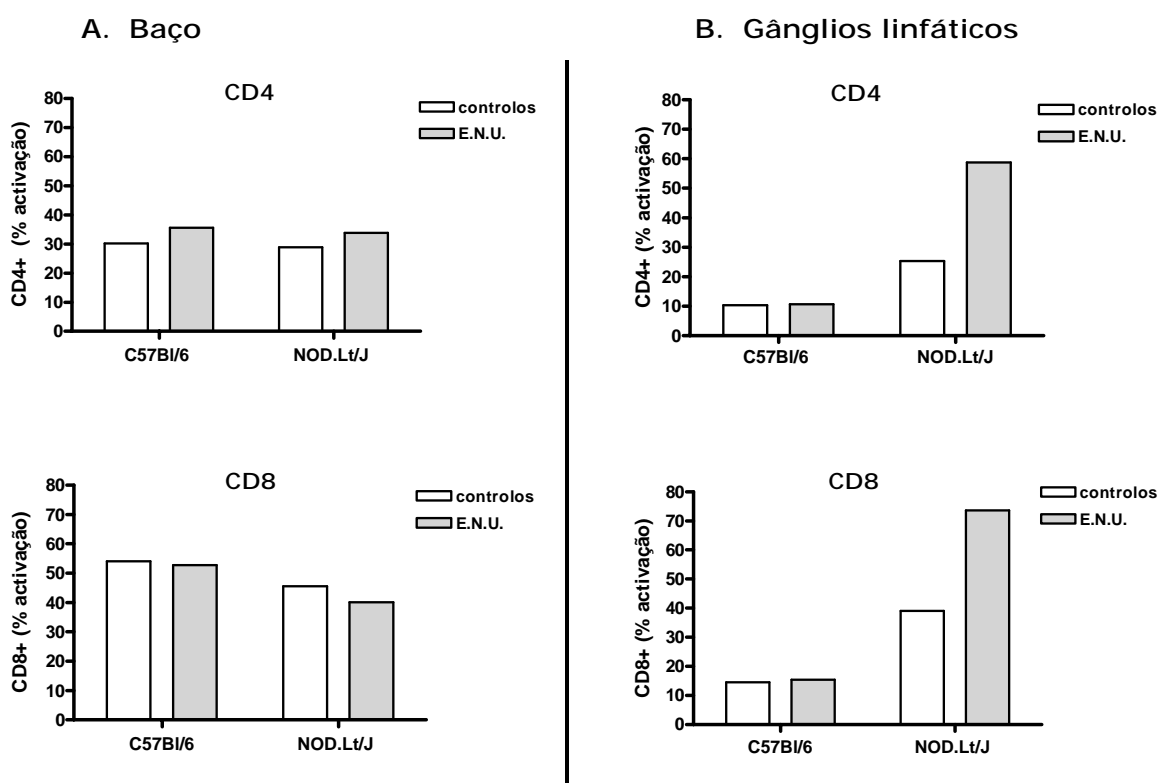


Figura 2- Níveis de activação das sub-populações T CD4+ e T CD8+. Percentagem de expressão de CD69 nos linfócitos T CD4+ (painel superior) e T CD8+ (painel inferior) viáveis em suspensões celulares enriquecidas em células T provenientes de baços (A.) e gânglios linfáticos (B.). Foram usados murganhos macho das estirpes C57Bl/6 (n=8) e NOD.Lt/J (n=8). As colunas em branco representam as suspensões que não foram incubadas com E.N.U., e as colunas a cinzento representam os resultados das suspensões incubadas com E.N.U. durante 24h a 37°C em atmosfera de 5% CO₂.

No gráfico da figura 2 A., painel inferior, observamos que a percentagem de células T CD8+ activadas é maior nos controlos C57Bl/6 do que na estirpe NOD.Lt/J e bastante superior à observada nos níveis de activação T CD4+ no baço. Contudo, a diferença de activação das sub-populações não é tão evidente nos gânglios linfáticos dos C57Bl/6. É interessante notar que a incubação com E.N.U. não aumenta o nível de activação das células T CD8+ no baço, ao contrário do que foi observado nas células T CD4+. De facto, nos NOD.Lt/J, a activação das células T CD8+ do baço decresce na presença de E.N.U.

Nos gânglios linfáticos, os níveis de activação das células T CD8+ representam a tendência observada nas células T CD4+ (figura 2 B.). A estirpe controlo apresenta percentagens muito semelhantes em ambas as condições de ensaio, ao passo que nos NOD.Lt/J, a diferença percentual absoluta entre os controlos e as suspensões celulares sujeitas a E.N.U. é muito acentuada.

No seu conjunto, os resultados dos ensaios *in vitro* sugerem que a participação do E.N.U. na activação de sub-populações de células T é particularmente evidente nos gânglios linfáticos.

2. Ensaio *ex vivo*

Para testar se a actividade do E.N.U. nas populações linfocitárias dos gânglios linfáticos também é evidenciável *in vivo*, foram analisados os linfócitos T e B de animais tratados com E.N.U.

Para tal, submetemos murganhos fêmea das estirpes C57Bl/6 e NOD.Lt/J a uma suplementação da água de bebida com extracto natural de uvas (E.N.U.) *ad libitum*, durante 2 semanas, numa diluição de 1:20. Após este período, foram recolhidos gânglios linfáticos, e determinadas as frequências relativas, viabilidade e activação das principais populações linfocitárias.

2.1. Linfócitos T

A percentagem de células T viáveis foi determinada nos gânglios linfáticos extraídos dos animais tratados e não tratados com E.N.U. Os resultados encontram-se representados no gráfico da figura 3. Por análise dos dados referentes aos animais controlo de ambas as estirpes, observamos que a percentagem de linfócitos T é inferior na estirpe C57Bl/6 quando comparada com a estirpe predisposta à diabetes tipo 1. Os níveis de células T viáveis obtidos nos animais C57Bl/6 submetidos à suplementação com o extracto natural de uvas, na dose utilizada foram semelhantes aos dos animais controlo da mesma estirpe

($P < 0,05$). Assim, o E.N.U. não parece ter um efeito significativo na percentagem de células T de C57Bl/6.

Pelo contrário, os níveis de linfócitos T viáveis nos NOD.Lt/J sujeitos à suplementação com E.N.U. na água de bebida *ad libitum* durante 2 semanas foram ligeiramente inferiores aos animais controlo.

De igual modo, comparando a percentagem das células incubadas com E.N.U. constatamos que existe uma diferença estatisticamente significativa entre as duas estirpes ($P < 0,05$). Assim, os NOD.Lt/J apresentam maior percentagem de células T que os C57Bl/6, e esta diferença parece não ser afectada pelo tratamento *in vivo* com o E.N.U.

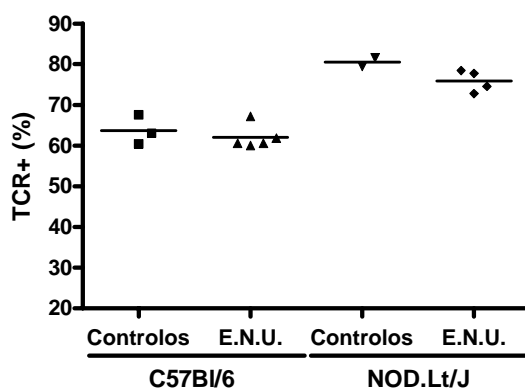


Figura 3- Percentagem de células T. Linfócitos T provenientes de gânglios linfáticos de murganhos fêmea submetidos a suplementação oral *ad libitum* durante 2 semanas com extracto natural de uvas (E.N.U.) na água de bebida (diluição 1:20), e respectivos controlos. Cada ponto representa a média de pelo menos duas medições por animal.

2.1.1. Níveis de activação

Determinados os valores percentuais de células T dos gânglios linfáticos, foi em seguida estudada a percentagem de activação destas células através da medição da expressão de CD69, e da intensidade média de fluorescência deste marcador.

Os resultados obtidos mostram que a percentagem de células activadas é semelhante nos animais controlo, tanto nos C57Bl/6 como nos NOD.Lt/J (figuras 4 e 5). Esta percentagem não é significativamente alterada pelo tratamento com E.N.U. Contudo, quando a activação das células T é analisada pelo nível de expressão de CD69, é revelado o efeito activador do extracto, que é mais expressivo nos NOD.Lt/J que nos C57Bl/6.

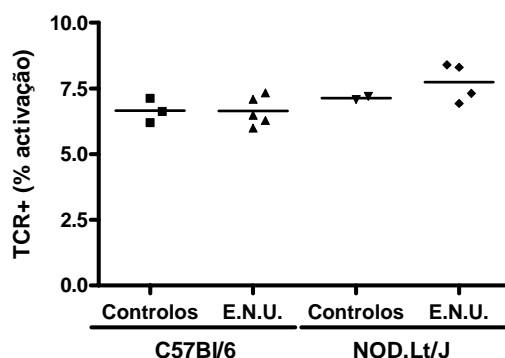


Figura 4- Percentagem de células T activadas. Linfócitos TCR+ que expressam CD69 provenientes gânglios linfáticos de murganhos fêmea submetidos a suplementação oral *ad libitum* durante 2 semanas com extracto natural de uvas (E.N.U.) na água de bebida (diluição 1:20), e respectivos controlos.

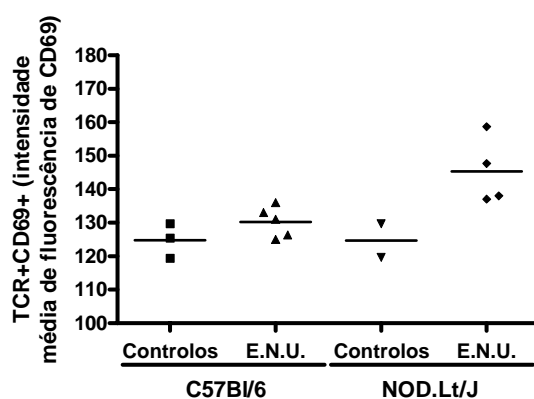


Figura 5- Intensidade média de fluorescência de CD69 de linfócitos T. Intensidade média de fluorescência de CD69 em linfócitos T provenientes de gânglios linfáticos de murganhos fêmea submetidos a suplementação oral *ad libitum* durante 2 semanas com extracto natural de uvas (E.N.U.) na água de bebida (diluição 1:20), e respectivos controlos.

2.1.2. Linfócitos T CD4+ e T CD8+

Nesta secção apresentamos os resultados referentes às determinações, por citometria de fluxo, das sub-populações T principais, T CD4+ e T CD8+, dos gânglios linfáticos dos animais da experiência *ex vivo*.

O gráfico da figura 6 A. representa os resultados obtidos pela determinação da expressão de CD69 como intensidade média de fluorescência das células T CD4+.

Observamos que os níveis basais de activação das células T CD4+ dos animais controlo das duas estirpes não diferem entre si. Contudo, a intensidade média de fluorescência do marcador de activação na sub-população T CD4+ dos animais sujeitos a E.N.U. diferem dos animais controlo na estirpe C57Bl/6 ($P < 0,05$).

Este efeito é mais acentuado quando se analisa a intensidade de expressão nas células T CD4+ dos NOD.Lt/J.

É interessante verificar que a expressão de CD69 nas células T CD4+ dos NOD.Lt/J é superior às dos C57Bl/6, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($P = 0,0317$).

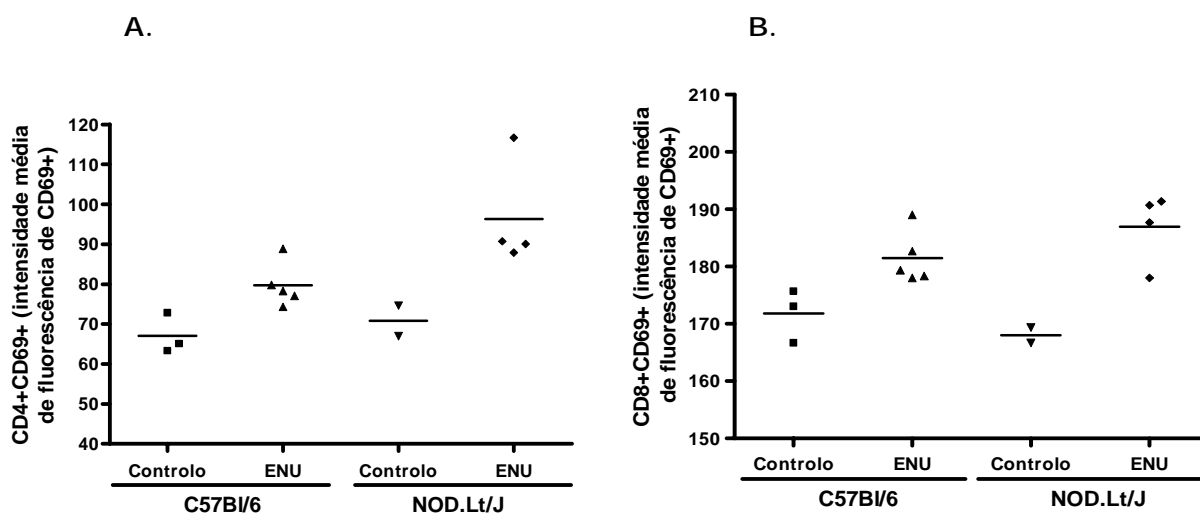


Figura 6- Percentagem de activação de células T CD4+ e T CD8+. Intensidade média de fluorescência de CD69 das células A.) T CD4+ activadas e B.) T CD8+ activadas. As células foram provenientes de gânglios linfáticos de murganhos fêmea submetidos a suplementação oral *ad libitum* durante 2 semanas com extracto natural de uvas (E.N.U.) na água de bebida (diluição 1:20), e respectivos controlos.

O gráfico da figura 6 B. reflecte os resultados obtidos pela determinação da expressão de CD69 como intensidade média de fluorescência das células T CD8+.

À semelhança do que foi observado para as células T CD4+, os níveis basais de activação de T CD8+ dos animais controlo das duas estirpes não diferem entre si.

De igual modo, a intensidade média de fluorescência do marcador de activação na sub-população T CD8+ dos animais sujeitos a E.N.U. demonstrou ser superior à dos animais controlo em ambas as estirpes, sendo esta diferença mais evidente nos NOD.Lt/J.

2.2. Linfócitos B

Para determinar se a população de linfócitos B também era afectada pelo tratamento *in vivo* com E.N.U. foi estudada a activação desta população linfocitária.

A percentagem relativa de linfócitos B é superior na estirpe C57Bl/6 em relação à estirpe NOD.Lt/J nos animais controlo (figura 7). Este fenótipo não é alterado significativamente com a suplementação com E.N.U. na dose utilizada ($P < 0,05$).

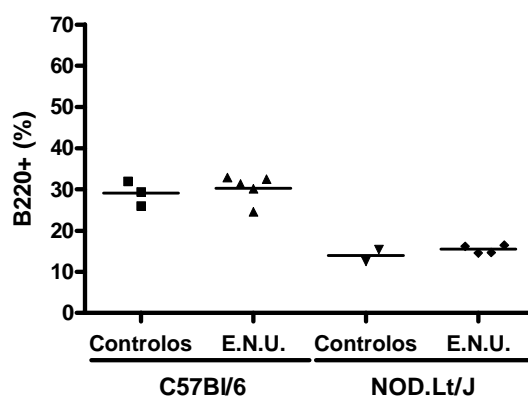


Figura 7- Percentagem de células B viáveis. Linfócitos viáveis que expressam o marcador B220 provenientes de gânglios linfáticos de murganhos fêmea submetidos a suplementação oral *ad libitum* durante 2 semanas com extracto natural de uvas (E.N.U.) na água de bebida (diluição 1:20), e respectivos controlos.

A activação da população de linfócitos B foi estudada através da determinação da expressão do marcador de activação CD69, assim como a sua intensidade média de fluorescência (figura 8 A. e B.).

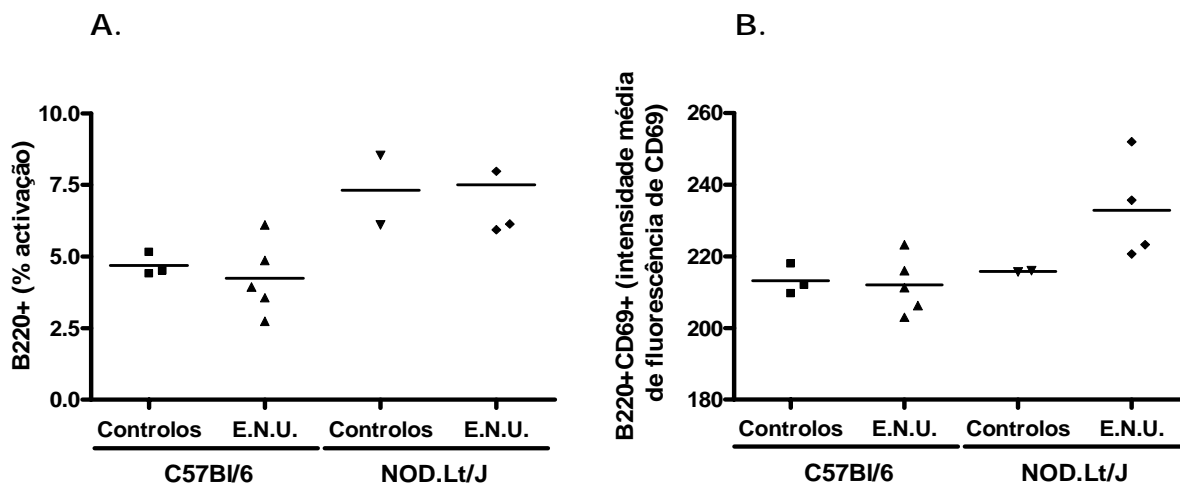


Figura 8- Linfócitos B activados. Células B que expressam o marcador de activação CD69 de gânglios linfáticos de murganhos fêmea submetidos a suplementação oral *ad libitum* durante 2 semanas com extracto natural de uvas (E.N.U.) na água de bebida (diluição 1:20), e respectivos controlos. A.) Percentagem de linfócitos B que expressam CD69; B.) Intensidade média de fluorescência de CD69 nos linfócitos B.

Os resultados indicam que os valores basais de activação das células B nos animais controlo, tanto nos C57Bl/6 como nos NOD.Lt/J, são relativamente baixos e não diferem significativamente (figura 8 B.).

A percentagem de células activadas e o grau de activação das células B não é alterado na estirpe controlo. Contudo, a intensidade de expressão de CD69 nos linfócitos B de murganhos NOD.Lt/J suplementados com E.N.U. mostra um sensível aumento em relação ao controlo.

No seu conjunto, os resultados dos ensaios *ex vivo* sugerem que o E.N.U. tem um efeito mensurável ao nível da activação das populações linfocitárias, especialmente na estirpe NOD.Lt/J, e que o tratamento *in vivo* com E.N.U. poderá ter um impacto ao nível dos processos imunológicos que conduzem à diabetes autoimune.

2.3. Insulite

No intuito de avaliar o grau de infiltração mononuclear dos ilhéus de Langerhans dos animais sujeitos à suplementação da água de bebida com E.N.U., procedeu-se à coloração com hematoxilina e eosina de cortes de parafina dos pâncreas. A título de exemplo, na figura 9, mostra-se uma fotomicrografia de um corte histológico pancreático onde se visualiza uma secção de um ilhéu de Langerhans não infiltrado, após coloração.

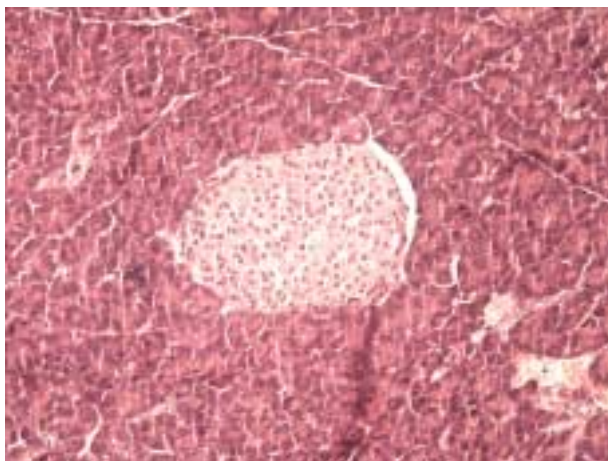


Figura 9- Ilhéu de Langerhans. Fotomicrografia de corte histológico (10 μ m) de pâncreas de um murganho NOD.Lt/J fêmea com 9 semanas de idade após coloração com hematoxilina/eosina. Note-se a ausência de infiltração linfocitária.

A figura 10 ilustra os vários graus de infiltração nos ilhéus de Langerhans que foram utilizados para calcular o índice de insulite, tendo sido observados para cada animal pelo menos 30 ilhéus.

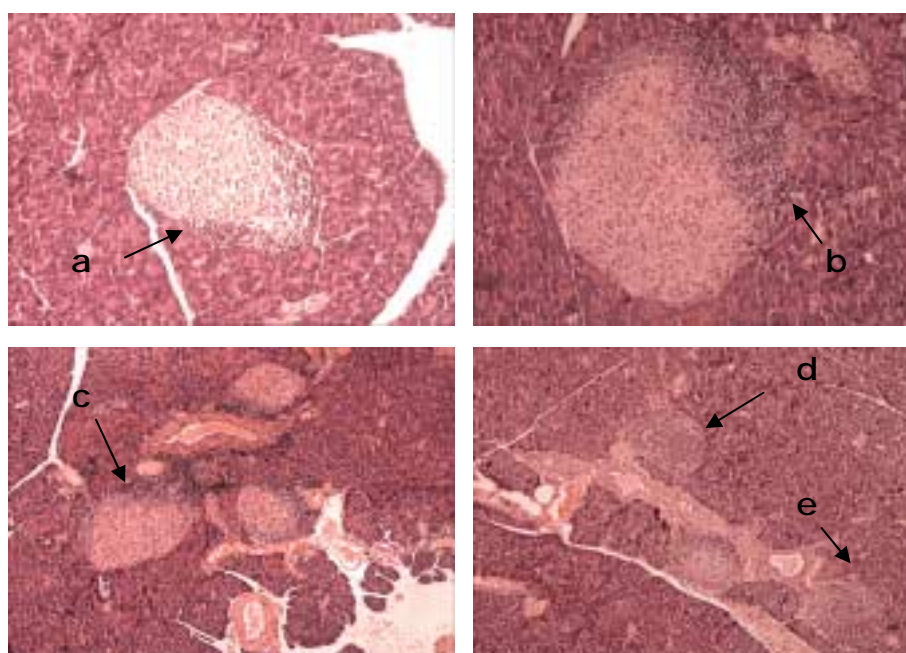


Figura 10- Insulite. Diferentes graus de infiltração dos ilhéus de Langerhans pancreáticos de murganhos fêmea NOD.Lt/J. Vários graus de insulite consoante a percentagem de penetração leucocitária nos ilhéus de Langerhans*

<i>Extensão da infiltração insulítica</i>	<i>Grau de insulite</i>
Ausência de infiltração	0
Infiltrados perivascularres/periductulares com leucócitos a tocar o perímetro do ilhéu, mas sem o penetrar	1
Penetração leucocitária até 25% da massa do ilhéu	2
Penetração leucocitária até 75% da massa do ilhéu	3
Fase final da insulite, <20% da massa do ilhéu permanece intacta	4

a) grau 2; b) e c) grau 3; d) e e) grau 4. *Leiter, E.H. *Current Protocols in Immunology* (1997) 15.9.1-15.9.23

A influência do tratamento *in vivo* com E.N.U. no índice de insulite foi estudada em três experiências independentes utilizando diferentes concentrações de E.N.U. A título de exemplo, a figura 11 representa os resultados referentes ao índice de insulite obtidos numa destas experiências.

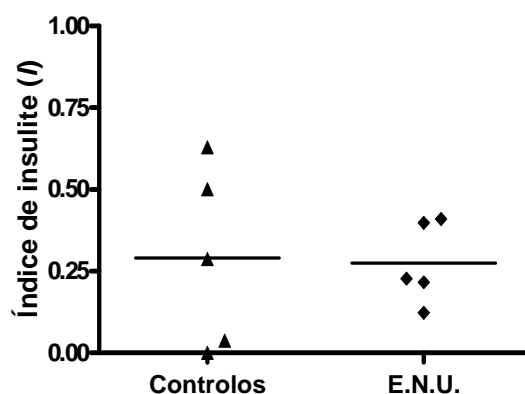


Figura 11-Índice de insulite. Índice de infiltração celular nos ilhéus de Langerhans pancreáticos de fêmeas NOD.Lt/J com 9 semanas de idade após 2 semanas de suplementação com E.N.U. na água de bebida (diluição 1:30) (n=5) e respectivos controlos (n=5).

No seu conjunto, os resultados parecem indicar que a suplementação oral com E.N.U. durante 15 dias não tem um efeito mensurável ao nível do índice de insulite nas concentrações testadas - diluições de 1:15, 1:20 e 1:30 de E.N.U. na água de bebida.

2.4 Glicémia

Os ensaios *ex vivo* revelam que o tratamento parece não afectar a infiltração linfocitária no pâncreas. Assim, procurou verificar-se se o E.N.U. podia interferir com a fase efectora do ataque autoimune que leva à destruição das células β pancreáticas, e o nível da glicémia foi usado como medida indirecta da destruição das células β . Nesta experiência foram utilizados animais NOD desprovidos de linfócitos (NOD.LtSz/*scid*) para controlar efeitos do E.N.U. que fossem independentes das populações linfocitárias.

Os resultados indicam que, na ausência de tratamento não existe diferença significativa entre as glicémias das estirpes NOD.Lt/J e NOD.LtSz/*scid* (figura 12).

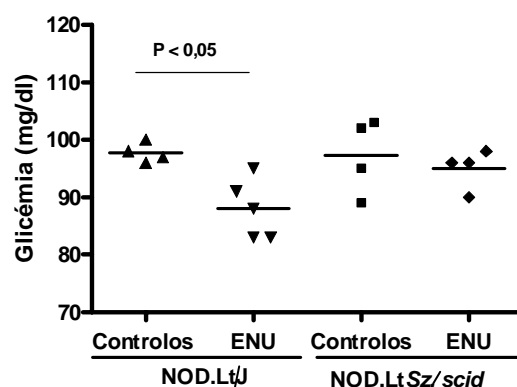


Figura 12- Glicémia. Níveis de glicose sanguínea de fêmeas NOD.Lt/J e NOD.LtSz/scid com 9 semanas de idade após 2 semanas de suplementação com E.N.U. (diluição 1:15) na água de bebida e respectivos controlos. Cada ponto representa a glicémia de cada animal no dia da morte.

Surpreendentemente, os animais NOD.Lt/J submetidos à suplementação com E.N.U. revelam uma tendência para a hipoglicémia que é estatisticamente significativa em relação aos animais NOD.Lt/J não tratados (figura 12). Na estirpe NOD.LtSz/scid, observa-se que os níveis de glucose sanguíneos dos animais sujeitos a suplementação na água de bebida são semelhantes aos dos animais controlo.

Acresce que nenhum dos animais NOD.LtSz/scid apresentava infiltração linfocitária, nem nenhuma anormalidade que indicasse ou sugerisse qualquer efeito de toxicidade pancreática. Assim, estes resultados sugerem que a exposição dos murganhos NOD.Lt/J ao E.N.U. pode afectar a função pancreática e eventualmente interferir com o processo diabetogénico.

3. Ensaio *in vivo*

No sentido de avaliar a influência do extracto natural de uvas no curso da diabetes tipo 1, um grupo de murganhos fêmea NOD.Lt/J foi tratado continuamente com E.N.U. na água de bebida durante cerca de 20 semanas logo após o desmame (4-5 semanas de idade).

O grupo tratado, com 45 animais, foi sujeito a uma suplementação na água de bebida com E.N.U. numa diluição de 1:72 *ad libitum*. O grupo controlo envolveu 31 animais da mesma estirpe e mesmo sexo, sujeito às mesmas condições ambientais e sem E.N.U. na água de bebida.

A glicémia foi medida em todos os animais a partir das 11 semanas de idade, várias vezes por semana e, pelo menos, até à altura em que todos os animais tinham 36 semanas de idade. Na tabela I encontram-se representados os resultados do estudo do estado glicémico dos animais tratados e controlos.

Tabela I - Estado glicémico. Percentagem de animais em cada grupo, de acordo com o nível de glucose no sangue.

Glicémia (mg/dl)	Controlos	E.N.U.
hipoglicémia (<100)	9,68% (3/31)	20,0% (9/45)
normoglicémia (100-250)	16,13% (5/31)	8,89% (4/45)
hiperglicémia (>250*)	74,19% (23/31)	71,11% (32/45)

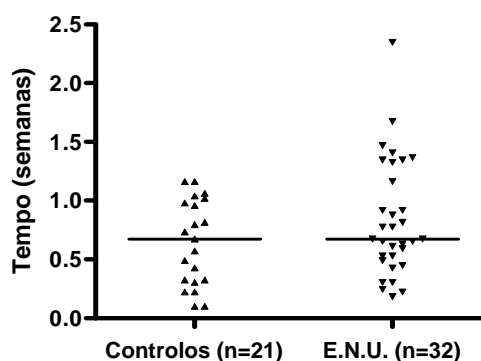
*Limite superior de detecção do teste de glicémia: 600mg/dl.

Constata-se que a percentagem de animais que foram sujeitos à suplementação com E.N.U. e que mantiveram um estado de hipoglicémia (<100mg/dl) é superior à sua correspondente no grupo controlo. Por outro lado, a percentagem de animais que mantiveram níveis normoglicémicos, ou que desenvolveram um estado de hiperglicémia estável durante o período em questão, mostra-se superior nos animais controlo.

Como a desregulação dos níveis de glucose no sangue, nomeadamente o estado continuado de hiperglicémia, é um dos sintomas que melhor define a diabetes tipo 1, propusémo-nos avaliar a influência do E.N.U. no tempo entre o estabelecimento efectivo do estado hiperglicémico e a morte (figura 13).

Verifica-se que as medianas não diferem significativamente, sendo que a maioria dos animais morre durante a primeira semana e meia após a hiperglicémia estar instalada, em ambos os grupos de animais.

Figura 13- Dispersão entre hiperglicémia e morte. Tempo entre a morte e o estabelecimento do estado hiperglicémico dos animais (semanas). Os resultados representam os animais hiperglicémicos. Excluídos dois animais controlo (um eutanaziado e um outlier: 7,34 semanas). Os traços horizontais representam a mediana. Teste de Mann Whitney (P=0,2409).



A data de morte de cada animal foi acompanhada até à 68ª semana. O gráfico da figura 14 representa a curva de morte de cada grupo de animais.

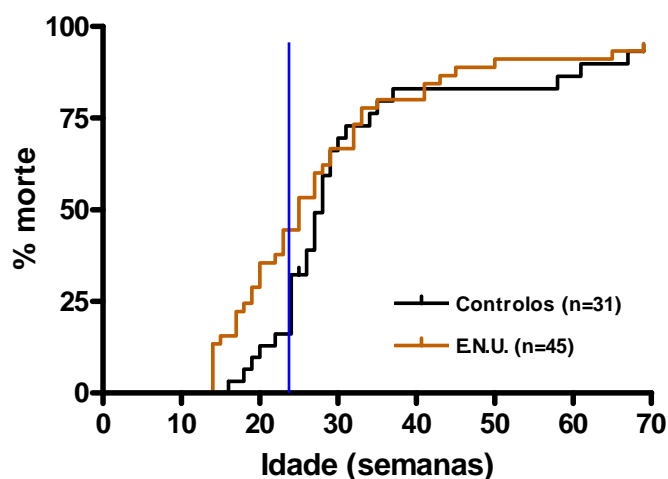


Figura 14- Curva de morte. Percentagem de animais que morreram em cada semana. Foram censurados os animais que permaneceram vivos à 68ª semanas de idade, assim como um animal do grupo controlo que desenvolveu um abscesso, tendo sido eutanaziado à 25ª semana. Foi utilizado o teste logrank ($P=0,4278$) usando GraphPad Prism versão 4.00 para Windows. Mediana: controlos - 28 semanas; ENU - 25 semanas. A linha vertical indica o fim da suplementação com E.N.U.

O declive da curva de morte correspondente ao grupo controlo aumenta às 25 semanas. Pelo contrário, a percentagem de morte dos animais que foram sujeitos a suplementação com E.N.U. cresce de uma forma sensivelmente linear até às 35 semanas.

O afastamento entre as curvas aumenta até ao fim da suplementação com E.N.U., verificando-se que a curva teste se inicia antes da curva controlo.

Por volta das 29 semanas, as curvas aproximam-se, terminando praticamente coincidentes à altura do fim do estudo (às 68 semanas). Nessa altura permaneciam vivos 5 animais: 2 do grupo controlo e 3 do grupo E.N.U.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

D. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A diabetes tipo 1 no modelo NOD é consequência de disfunções do sistema imunológico de carácter hereditário que estão sob um controlo poligénico complexo cuja penetrância genética é influenciada pelo ambiente, nomeadamente a dieta e a exposição a patogénios microbianos (E. Leiter, 1997).

Os produtos naturais com alegada actividade anti-inflamatória têm sido sujeitos a um estudo intensivo das suas actividades biológicas para confirmar o seu papel na prevenção ou tratamento de doenças inflamatórias. Tem vindo a ser demonstrado que um grupo de fitoquímicos fenólicos, os flavonóides, afectam a inflamação e influenciam uma grande diversidade de eventos de sinalização intracelular (Natarajan *et al* 2002; Muthian e Bright, 2004; Hougee *et al* 2005).

Dada a importância da sinalização intracelular envolvida na activação, proliferação e diferenciação dos linfócitos, estas células são potenciais alvos para modulação pelos flavonóides (Muthian e Bright, 2004).

Neste trabalho, propusémo-nos avaliar a actividade de uma matriz natural, rica em compostos polifenólicos, no processo diabetogénico no modelo murino NOD da diabetes autoimune.

Ensaio *in vitro*

Em primeiro lugar, pretendeu-se avaliar a actividade do extracto natural de uvas (E.N.U.) sobre linfócitos T, cujo envolvimento no processo autoimune da diabetes tipo 1 se encontra estabelecido, comparando os linfócitos de murganhos da estirpe NOD.Lt/J com os de murganhos da estirpe não autoimune C57Bl/6.

Utilizámos animais com 7 semanas de idade - altura correspondente à fase pré-diabética que envolve o aparecimento da insulite, e em que será de esperar a presença de células diabetogénicas tanto nos órgãos linfóides secundários, como nos ilhéus pancreáticos. As suspensões celulares de órgãos linfóides secundários foram sujeitas a um método de enriquecimento em células T, permitindo obter suspensões relativamente livres de células aderentes, como as células B.

O estado funcional das células T pode ser inferido por medição da proliferação celular na presença de diferentes estimulantes como mitogénios, alloantigénios e antigénios específicos (Lim *et al* 1998). Assim, suspensões enriquecidas foram sujeitas a uma activação prévia com concanavalina A na presença de IL-2.

Na ausência de estimulação pelo E.N.U., os resultados obtidos mostram que existe uma diferença na frequência relativa de células T CD4+ entre NOD.Lt/J e C57Bl/6. Esta diferença observa-se tanto nas células dos baços, como dos gânglios linfáticos; existe igualmente uma diferença na frequência relativa de T CD8+ entre estirpes, embora pouco clara nos baços, é evidente nos gânglios linfáticos. Os resultados sugerem a existência de uma dinâmica celular distinta nas células T da estirpe autoimune. Os resultados mostram ainda que:

- as percentagens de células T CD4+ são mais elevadas nos NOD.Lt/J do que nos C57Bl/6, sendo que essa diferença é mais evidente nas células provenientes do gânglios linfáticos;
- pelo contrário, a frequência relativa de T CD8+ é inferior nos NOD.Lt/J, sendo mais expressiva nas células provenientes dos gânglios linfáticos;
- a adição de extracto natural de uvas às células pré-activadas diminui a percentagem de células T CD4+ provenientes tanto dos baços como dos gânglios linfáticos e em ambas as estirpes;
- a par do decréscimo de T CD4+, verifica-se um aumento relativo de CD8+ nas células tratadas com E.N.U, sugerindo que o E.N.U. poderia ter um efeito na actividade tanto de T CD4+ como de T CD8+.

A diminuição das percentagens relativas das células T CD4+ após o tratamento com E.N.U. sugere que estas células poderão estar a ser activadas e que isso é acompanhado por alguma morte celular (*AICD*).

Níveis de activação

A determinação da expressão de CD69 na superfície das células T é um método eficaz de avaliação do estado funcional destas células (Ziegler *et al* 1994; Lim *et al* 1998; Rutella *et al* 1999), uma vez que linfócitos não activados não expressam CD69. A expressão de CD69 tem um pico entre as 16h e as 24h e depois decresce gradualmente, embora varie consoante o estímulo (Biselli *et al* 1992; Lim *et al* 1998). Como CD69 é um antigénio de activação precoce nas células T após estimulação *in vitro*, alguns autores propõem que o

CD69 poderá servir como receptor co-estimulatório para receber sinais de activação adicionais que conduzem as células a proliferar (Lim *et al* 1998).

As diferenças observadas nos níveis das sub-populações T - CD4+ e CD8+ - sugere que o E.N.U. tem efeito na activação destas células, o que foi verificado através da determinação dos níveis de expressão de CD69 em ambas as sub-populações.

Surpreendentemente, o efeito potenciador da activação do E.N.U. é particularmente relevante porque é bastante mais evidente nos gânglios linfáticos da estirpe autoimune-NOD.Lt/J.

De facto, os gânglios linfáticos são os órgãos que suportam as interacções entre células do sistema imunitário que conduzem à imunidade adquirida, e onde os linfócitos auto-reactivos encontram pela primeira vez os antigénios específicos dos tecidos e onde são tolerizados ou activados (Andrian *et al* 2003). Por isso, os gânglios linfáticos podem ser indicadores sensíveis de compostos com efeitos imunomodulatórios/tóxicos regionais ou sistémicos (Elmore *et al* 2006).

Os ensaios *in vitro* indicam que os linfócitos T da estirpe NOD.Lt/J são especialmente sensíveis ao efeito potenciador de activação do E.N.U. em comparação com os dos C57Bl/6. Estas diferenças podem ser consequência do facto dos linfócitos dos NOD.Lt/J poderem já encontrar-se num estado de pré-activação resultante do processo autoimune; este facto pode conferir aos linfócitos dos NOD.Lt/J uma maior capacidade de resposta à activação da concanavalina A, podendo ser responsável pelo maior efeito potenciador da activação do E.N.U. observado nos NOD.Lt/J.

Uma vez que o efeito é superior nas suspensões enriquecidas provenientes dos gânglios linfáticos, sugere que o E.N.U., a verificar-se esta actividade biológica *in vivo*, poderá potenciar a activação de células T diabetogénicas.

Ensaio *ex vivo*

Na presença de uma co-estimulação adequada, as células T sofrem expansão clonal e adquirem funções efectoras após alguns dias (Andrian *et al* 2003).

Ao contrário das células T *naive*, as células T efectoras de tipo citotóxico podem produzir citocinas, destruir as células que expressam os antigénios que reconhecem, enquanto que as células T efectoras de tipo *helper* podem modificar o comportamento de outros leucócitos, e expressam moléculas de endereçamento, o que lhes permite migrar até à fonte de antígeno nos tecidos periféricos.

A maioria das células efectoras morre assim que o antigénio é eliminado, mas uma pequena fracção permanece como células de memória. As células de memória podem ser divididas em células efectoras - que migram para os tecidos periféricos - e células de memória central - que continuam a circular através dos gânglios linfáticos, nos quais respondem fortemente sempre que voltam a encontrar o antigénio (Andrian *et al* 2003).

Havendo um efeito de potenciação de activação nas duas sub-populações principais de linfócitos T, cujas evidências indicam que poderão estar envolvidas no processo diabetogénico, procurou saber-se se a actividade do E.N.U. também era evidenciável *in vivo*.

Para isso procedeu-se a uma suplementação via oral *ad libitum* durante 2 semanas em grupos de murganhos fêmea C57Bl/6 e NOD.Lt/J. Foram determinadas as frequências relativas, a viabilidade e os níveis de activação das principais populações linfocitárias, imediatamente após o tratamento.

Células T

O tratamento *per os* com E.N.U. não afectou a frequência de células T observada entre C57Bl/6 e NOD.Lt/J, sendo que estes apresentam níveis superiores destas células. Estas experiências revelaram que o E.N.U. administrado por via oral resulta em activação celular *in vivo*. Esta situação sugere que os componentes do E.N.U. responsáveis pela activação celular, conseguem ultrapassar eficazmente os processos de biotransformação no murganho mantendo a sua capacidade activadora.

A manutenção da actividade biológica do E.N.U., quando administrado oralmente, sugere que a biotransformação dos compostos responsáveis pelo fenótipo de activação linfocitária, a verificar-se, não interfere com a sua acção. No entanto, a formação de metabolitos potencialmente bioactivos tem que ser considerada.

Analisando em detalhe as sub-populações T - CD4+ e CD8+ - observámos que o E.N.U. tem um efeito muito semelhante ao observado *in vitro*, verificando-se um aumento de activação em ambas as sub-populações. Este aumento é, à semelhança do que foi observado *in vitro*, superior nos linfócitos dos NOD.Lt/J, e a diferença do efeito do E.N.U. é estatisticamente significativa entre as estirpes.

Estes resultados indicam que os NOD.Lt/J, na fase pré-diabética, possuem níveis de activação linfocitária superiores aos da estirpe C57Bl/6 que permitem ao E.N.U. ter o seu efeito potenciador.

As células T CD8+ são importantes na fase inicial da diabetes tipo 1, como são efectores essenciais na morte das células β (Katz *et al* 1993; Allison *et al* 2005). A activação das células T CD8+ pelas células APC é necessária para o desenvolvimento da insulite invasiva que leva à destruição das células β ; pelo contrário, as células β não são capazes de fornecer os sinais de activação necessários para que as células T CD8+ *naive* sejam recrutadas, retidas nos ilhéus, nem activá-las para se tornarem diabetogénicas (Jersey *et al* 2007). Assim, será pouco provável que uma acção citotóxica pancreática *in vivo* provocada pelo E.N.U. esteja na origem do aumento dos níveis de activação das células T CD8+ por danos causados nas células β pancreáticas.

Células B

A diabetes tipo 1 envolve a interacção de diferentes sub-populações linfocitárias com células apresentadoras de antigénio (APC). Apesar de a capacidade de produzir anticorpos parecer não ser necessária para as células B terem um efeito no desenvolvimento da diabetes, a par dos macrófagos e das células dendríticas, as células B desempenham uma função importante como células apresentadoras de antigénio (Wong *et al* 2004). Por isso, adicionalmente, verificámos se o tratamento *in vivo* com E.N.U. também afectaria esta população celular.

Em ambas as estirpes, a percentagem de activação de células B pelo E.N.U. é baixa. Verificámos que o tratamento *in vivo* com E.N.U. não afecta os níveis de células B em nenhuma das estirpes. O E.N.U. aumenta sensivelmente a activação das células B nos NOD.Lt/J, mantendo-se no nível dos controlos na estirpe não autoimune.

Estes resultados indicam que o E.N.U. tem capacidade para activar células T e B, e sugerem que poderá ser interessante estudar quais os componentes do E.N.U. detêm capacidade de activação, bem como determinar se as vias de activação utilizadas são comuns às células T e células B. Alternativamente, o efeito observado nas células B poderá resultar de uma activação indirecta via células Th.

Como a presença de células B provavelmente contribui para uma maior eficiência da activação e expansão das células T, potenciando o desenvolvimento da diabetes (Chiu *et al* 2001), o conjunto dos resultados sugere que o E.N.U. também poderá influenciar os processos imunológicos que conduzem à diabetes, através de uma acção sobre as células B.

Insulite

Avaliámos o efeito induzido pelo tratamento com E.N.U. sobre o grau de infiltração leucocitária nos ilhéus de Langerhans através da determinação do índice de insulite em pâncreas de animais sujeitos a suplementação oral com E.N.U. Os resultados indicam que não existe uma diferença significativa no grau de infiltração entre animais tratados e não tratados. Este fenótipo não é alterado quando usamos doses de E.N.U. de 1:20 e 1:30.

Uma vez que o E.N.U. tem um efeito de activação nas células T *in vivo*, pretendemos avaliar se o extracto estaria a interferir com a fase efectora da doença. Mais, pretendemos excluir a possibilidade da activação observada poder estar associada a um fenómeno de toxicidade, e não a uma acção mediada pelos linfócitos como esperaríamos pelos resultados dos ensaios *in vitro*.

Glicémia

A estirpe NOD.LtSz/*scid*, que não possui linfócitos, apresenta os mesmos parâmetros de homeostasia da glucose que os murganhos NOD, isto é, baixos níveis basais de glicémia e elevada insulinémia (Amrani *et al* 1998).

Assim, através da medição do estado glicémico de animais NOD.LtSz/*scid* tratados e não tratados com E.N.U., verificamos que o E.N.U. não influencia os níveis de glucose sanguínea nos NOD.LtSz/*scid*. Mais ainda, verificamos que na dose utilizada, o tratamento com E.N.U. tem um efeito hipoglicémico nos NOD.Lt/J, que não foi observado nos NOD.LtSz/*scid*.

Estes resultados indicam que na ausência de linfócitos, o E.N.U. não tem um efeito directo sobre a homeostasia da glucose. Acresce o facto de não terem sido detectados efeitos de toxicidade induzidos pelo E.N.U. nos pâncreas dos NOD.LtSz/*scid* por métodos histoquímicos.

O tratamento *per os* parece indicar que o E.N.U. só afecta a função pancreática na presença de linfócitos, o que leva a crer que o E.N.U. poderá interferir com o processo diabetogénico.

Ensaio *in vivo*

No sentido de avaliar o efeito do E.N.U. no decurso do desenvolvimento da diabetes, submetemos um grupo de animais da estirpe NOD.Lt/J (n=45) a uma suplementação constante com E.N.U. durante um período de aproximadamente 20 semanas.

O tratamento iniciou-se após o desmame, uma altura em que os animais estarão mais susceptíveis a uma modulação da doença, uma vez que o processo de infiltração se encontra numa fase inicial (Delovitch *et al* 1997).

Acompanhámos a evolução do estado glicémico e a incidência cumulativa da diabetes através da curva de morte dos animais e verificámos que, inesperadamente, o E.N.U. parece ter um efeito precipitador da doença nestes animais: quando comparados com os controlos, existe um maior número de animais que morre mais cedo.

Este efeito do E.N.U. parece estar associado à indução de hipoglicémia prolongada exibida por uma fracção dos animais tratados. A morte associada a hipoglicémia só foi observada durante o período do tratamento com o E.N.U.; pelo contrário, após o fim do tratamento com E.N.U., as curvas de morte do grupo tratado e do grupo controlo (n=31) aproximam-se, e os animais morrem por hiperglicémia (diabetes). Estes resultados indicam que o efeito hipoglicemiante do E.N.U. não é perdurável e que não foi detectado um efeito protector no processo diabetogénico.

Por volta das 40 semanas existe um novo distanciamento entre as incidências cumulativas nos dois grupos de animais e, no fim da experiência, a incidência da diabetes tipo 1 nos animais tratados e não tratados é semelhante, embora antecedida por um novo aumento do número de animais que morreram diabéticos. Esta diferença entre os grupos tratados e não tratados, embora não significativa, poderá ser resultado do efeito activador do E.N.U., de que poderá advir o aumento da capacidade diabetogénica mediada pelos linfócitos.

O modelo NOD desenvolve espontaneamente a diabetes autoimune mediada por células, em que o aparecimento de uma infiltração mononuclear efectora nos ilhéus ou insulite destrutiva, é geralmente precedido por uma fase longa de insulite "benigna", onde os infiltrados de células T auto-reactivas apenas rodeiam os ilhéus, sem levarem a cabo qualquer processo destrutivo. Os mecanismos necessários à transformação desta auto-reactividade "benigna" para uma insulite destrutiva que conduz à diabetes continuam por identificar.

O facto de o tempo entre o estabelecimento da hiperglicémia e a morte não variar entre os grupos da experiência *in vivo*, sugere que o E.N.U. estará a interferir nos processos que precedem a fase que ocorre desde a progressão da insulite destrutiva até à morte, nos animais que morrem com hiperglicémia.

O ensaio *in vivo* mostra que cerca de 20% dos animais tratados com E.N.U. tinham níveis de glicémia inferiores aos controlos com a mesma idade. No entanto, este estado de relativa hipoglicémia induzida pelo E.N.U. manteve-se, prolongadamente, conduzindo à morte.

O efeito hipoglicemiante observado tanto nos ensaios *ex vivo* como durante o desenvolvimento da diabetes poderá estar relacionado com uma excessiva duração e/ou dose destes tratamentos. Assim, seria interessante determinar se tratamentos menos agressivos conseguiriam controlar a hiperglicémia nos murganhos NOD, prolongando a fase pré-diabética.

Existe a noção de que a massa de células β é estável antes do início da autoimunidade e que ocorre uma perda gradual de células β à medida que a doença progride e que, quando é atingido um ponto crítico no declínio da massa de células β , a diabetes manifesta-se (Atkinson e Eisenbarth, 2001; Sherry *et al* 2006).

Como já foi referido, o processo patogénico começa por volta das 3-4 semanas nos NOD com acumulação de células APC, especialmente células dendríticas, à volta dos ilhéus de Langerhans (Duran *et al* 2002). Existe uma hiperinsulinémia e ligeira hiperglucagonémia, que não se sabe se constitui uma causa ou uma consequência da infiltração inicial de APC. No estado pré-diabético, os murganhos NOD.Lt/J possuem geralmente níveis de glicémia mais baixos do que murganhos C57Bl/6 controlo de ambos os sexos com a mesma idade (Amrani *et al* 1998).

Estudos *in vitro* demonstraram que co-cultura de células dendríticas e ilhéus de NOD com 8 semanas produzem mais insulina que os controlos C57Bl/6. Tal como *in vivo*, os ilhéus dos NOD produzem mais insulina do que os C57Bl/6. Os autores sugerem que as células dendríticas são bons candidatos para a estimulação da hiper-reatividade das células β pancreáticas dos NOD que é observada *in vitro* e *in vivo* e que podem, por isso, sensibilizar os ilhéus para o ataque autoimune (Duran *et al* 2002).

O extracto natural de uvas poderá estar a induzir a manutenção deste estado de hiper-reatividade das células β pancreáticas. A medição dos níveis de insulinémia destes animais poderia ajudar a compreender se este mecanismo explica a hipoglicémia observada em alguns animais tratados. Adicionalmente, poder-se-ia avaliar o efeito do E.N.U. sobre a massa celular β pancreática, uma vez que esta pode aumentar em resposta a situações de exigência metabólica acrescida. De facto, os NOD pré-diabéticos têm um aumento da replicação destas células que ocorre antes do aumento da glucose

sanguínea e de uma diminuição acentuada que segue a fase pré-diabética (Sherry *et al* 2006).

A administração intraperitoneal de quercetina em ratos cuja diabetes foi induzida por administração de estreptozocina, diminui o nível de glucose plasmática, enquanto que em ratos em que a diabetes não foi induzida, a quercetina não teve qualquer efeito a esse nível (Vessal *et al* 2003; Coskun *et al* 2005). Em concordância com este estudo, não excluimos a possibilidade da quercetina poder ser, pelo menos em parte, responsável pelo fenótipo de hipoglicémia observado em alguns animais tratados com E.N.U.

No entanto, o fenótipo observado dificilmente será explicado pelas propriedades antioxidantes da quercetina. A sobre-expressão de proteínas antioxidantes nas células β pancreáticas em murganhos da estirpe NOD - nomeadamente metalotionina (MT) e catalase - acelera o desenvolvimento da diabetes tanto espontânea, como induzida por ciclofosfamida, em machos (Li *et al* 2006). Mais, a precipitação da diabetes coincide com um aumento da morte das células β , mas não com um aumento do ataque autoimune. Este estudo sugere que espécies reactivas de oxigénio poderão ter uma função importante, mas na protecção das células β contra o ataque autoimune uma vez que os ilhéus dos *MTNOD* são mais sensíveis aos danos provocados pelas citocinas (Li *et al* 2006).

CONCLUSÕES

As experiências *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* realizadas com o E.N.U. permitem as seguintes conclusões:

- o extracto natural de uvas tem um efeito potenciador na activação de células T CD4+ e T CD8+, principalmente em suspensões linfocitárias de gânglios linfáticos de NOD.Lt/J, quando comparados com murganhos da estirpe controlo não autoimune C57Bl/6;
- de igual modo, o tratamento *per os* com E.N.U. também activa mais eficientemente os linfócitos T CD4+ e T CD8+ dos NOD.Lt/J quando comparados com os da estirpe C57Bl/6;
- o extracto natural de uvas dado *per os* revela um efeito hipoglicémico em murganhos NOD.Lt/J quando sujeitos a suplementação com E.N.U. na água de bebida;
- As experiências com NOD.LtSz/*scid* mostram que o efeito hipoglicemiante do E.N.U. é dependente da presença de linfócitos.

Como o efeito hipoglicemiante do E.N.U. se exerce ao nível dos linfócitos, seria interessante investigar se estes efeitos são mediados pelos mesmos componentes do extracto, para determinar se o efeito hipoglicémico é ou não uma consequência da activação linfocitária.

Apesar de a quercetina ser o composto polifenólico presente em maior quantidade na matriz estudada, não é possível afirmar que este, ou outro, flavonóide seja responsável, *de per si*, pelo fenótipo de potenciação de activação das células T nos NOD.Lt/J. Além disso, como os compostos presentes no E.N.U. podem estar a actuar de modo sinérgico, é possível que o efeito de compostos presentes em menor quantidade seja importante.

No sentido de esclarecer a influência da quercetina nos fenótipos observados *in vivo*, seria pertinente estudar-se a bioactividade de fracções do E.N.U. e em paralelo com o E.N.U.

Os estudos efectuados demonstram a potencialidade da utilização de compostos naturais associados aos alimentos como agentes bioactivos que podem influenciar processos patogénicos. A demonstração de que os compostos utilizados nestes estudos mantêm a sua bioactividade ao nível dos linfócitos após administração *in vivo*, encoraja nova investigação que conduza à identificação destes compostos e ao estudo dos seus mecanismos de acção.

BIBLIOGRAFIA

E. BIBLIOGRAFIA

Abiru, N., Eisenbarth, G. (1999). "Autoantibodies and autoantigens in type 1 diabetes: role in pathogenesis, prediction and prevention." *Can. J. Diab. Care* 23: 59-65.

Åkerblom, H.K., Knip, M. (1998). "Putative environmental factors in type 1 diabetes." *Diabetes Metab. Rev.* 14(1): 31-67.

Allison, J., Thomas, H.E., Catterall, I.T., Kay, T.W., Strasser, A. (2005). "Transgenic expression of dominant-negative Fas-associated death domain protein in beta cells protects against Fas ligand-induced apoptosis and reduces spontaneous diabetes in nonobese diabetic mice." *J. Immunol.* 175(1): 293-301.

Altmann, K.H. (2001). "Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs." *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5: 424-431.

Amrani, A., Durant, S., Throsby, M., Coulaud, J., Dardenne, M., Homo-Delarche, F. (1998). "Glucose homeostasis in the nonobese diabetic mouse at the prediabetic stage." *Endocrinology* 139(3): 1115-1124.

Amrani, A., Verdaguer, J., Serra, P., Tafuro, S., Tan, R., Santamaria, P. (2000). "Progression of autoimmune diabetes driven by avidity maturation of a T-cell population." *Nature* 406: 739-742.

Andersson, A., Forsgren, S., Soderstrom, A., Holmberg, D. (1991). "Monoclonal, natural antibodies prevent development of diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse." *J. Autoimmun.* 4: 733-742.

Andrian, U.H., Mempel, T.R. (2003). "Homing and Cellular Traffic in Lymph Nodes." *Nature Reviews Immunology* 3(Nov.): 867-878.

Aoki, C.A., Borchers, A.T., Ridgway, W.M., Keen, C.L., Ansari, A.A., Gershwin, M.E. (2005). "NOD mice and autoimmunity." *Autoimmunity Reviews* 4: 373- 379.

Arreaza, G., Salojin, K., Yang, W., Zhang, J., Gill, B., Mi, Q.-S., Gao, J.-X., Meagher, C., Cameron, M., Delovitch, T.L. (2003). "Deficient activation and resistance to activation-induced apoptosis of CD8+ T cells is associated with defective peripheral tolerance in non obese diabetic mice." *Clinical Immunology* 107: 103-115.

Atkinson, M.A., Leiter, E.H. (1999). "The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets?" *Nature Med.* 5: 601-604.

Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S. (2001). "Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment." *Lancet* 358: 221-229.

Bach, J.F. (1994). "Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease." *Endocr. Rev.* 15: 516-542.

Bach, J.F. (2002). "The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases." *N. Engl. J. Med.* 347: 911-920.

Baekkeskov, S., Aanstoot, H.J., Christgau, S., Reetz, A., Solimena, M., Cascalho, M., Folli, F., Richter-Olesen, H., De Camilli, T. (1990). "Identification of the 64KDa auto-antigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase" *Nature* 347: 151-156.

Basso, L.A., da Silva, L.H., Fett-Neto, A.G., de Azevedo, W.F. Jr, Moreira, I.S., Palma, M.S., Calixto, J.B., Astolfi, Filho S., dos Santos, R.R., Soares, M.B., Santos, D.S. (2005). "The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases- a review." *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100(6): 475- 506.

Bell, G.I., Horita, S., Karam, J.H. (1984). "A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus." *Diabetes* 33: 176-183.

Bendelac, A., Carnaud, C., Boitard, C., Bach, J.F. (1987). "Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells." *J. Exp. Med.* 166(4): 823-832.

Bingley, P.J., Bonifacio, E., Williams, A.J.K., Genovese, S., Bottazzo, G.F., Gale, E.A.M. (1997). "Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers." *Diabetes* 46: 1701-1710.

Bingley, P.J., Douek I.F., Rogers C.A., Gale E.A. (2000). "Influence of maternal age at delivery and birth order on risk of type 1 diabetes in childhood: prospective population based family study." *Br. Med. J.* 321(7258): 420-424.

Biselli, R., Matricardi, P.M., D'Amelio, R., Fattorossi, A. (1992). "Multiparametric flow cytometric analysis of the kinetics of surface molecule expression after polyclonal activation of human peripheral blood T lymphocytes." *Scand. J. Immunol.* 35: 439-447.

Bottazzo, G.F., Florin-Christensen, A., Doniach, D. (1974). "Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies." *Lancet* 2: 1279-1283.

Bottini, N., Musumeci, L., Alonso, A., Rahmouni, S., Nika, K., Rostamkhani, M., MacMurray, J., Meloni, G.F., Lucarelli, P., Pellicchia, M., Eisenbarth, G.S., Comings, D., Mustelin, T. (2004). "A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes." *Nat. Genet.* 36(4): 337-338.

Bour-Jordan, H., Salomon, B.L., Thompson, H.L., Szot, G.L., Bernhard, M.R., Bluestone, J.A. (2004). "Costimulation controls diabetes by altering the balance of pathogenic and regulatory T cells." *J. Clin. Invest.* 114(7): 979-987.

Brohm, D., Metzger, S., Bhargava, A., Muller, O., Lieb, F., Waldmann, H. (2002). "Natural products are biologically validated starting points in structural space for compound library development: solid-phase synthesis of dysidiolide-derived phosphatase inhibitors." *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 41: 307-311.

Chen, S.-S., Gong, J., Liu, F.-T., Mohammed, U. (2000). "Naturally occurring polyphenolic antioxidants modulate IgE-mediated mast cell activation." *Immunology* 100: 471-480.

Chiu, P.P.L., Jevnikar, A.M., Danska, J.S. (2001). "Genetic control of T and B lymphocyte activation in nonobese diabetic mice." *J. Immunol.* 167: 7169-7179.

Clardy, J., Walsh, C. (2004). "Lessons from natural molecules." *Nature* 432: 829-837.

Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J.-C., Jörns, A., Lenzen, S., Eizirik, D.L. (2005). "Mechanisms of pancreatic β -cell death in type 1 and type 2 diabetes." *Diabetes* 54(S2): S97-S107.

Colluci, F., Bergman, M.L., Penha-Gonçalves, C., Cílio, C.M., Holmberg, D. (1997). "Apoptosis resistance of nonobese diabetic peripheral lymphocytes linked to the Idd5 diabetes susceptibility region." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(16): 8670-8674.

Cornelius, J.G., Luttge, B.G., Peck, A.B. (1993). "Antioxidant enzyme activities in IDD-prone and IDD-resistant mice: a comparative study." *Free Rad. Biol. Med.* 14(4): 409-420.

Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., Oter S. (2005). "Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas." *Pharmacological Research* 51: 117-123.

Dahlquist, G.G., Blom, L.G., Persson, L.A., Sandstrom, A.I., Wall S.G. (1990). "Dietary factors and the risk of developing insulin-dependent diabetes in childhood." *B.M.J.* 300: 1302-1306.

Delovitch, T.L., Singh, B. (1997). "The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD." *Immunity* 7: 727-738.

Dobson, C.M. (2004). "Chemical space in biology." *Nature* 432: 824-828.

Durant, S., Alves, V., Coulaud, J., Homo-Delarche, F. (2002). "Nonobese diabetic (NOD) mouse dendritic cells stimulate insulin secretion by prediabetic islets." *Autoimmunity* 35(7): 449-455.

Eerligh, P., Koeleman, B.P., Dubdrige, F., Jan Bruining, C., Roep, B.O., Gipbart, M.J. (2004). "Functional genetic polymorphisms in cytokines and metabolic genes as additional genetic markers for susceptibility to develop type 1 diabetes." *Genes Immun* 5(1): 36-40.

Elmore, S.A. (2006). "Enhanced histopathology of the lymph nodes." *Toxicol. Pathol.* 34(5): 634-647.

Feeney, S.J., Myers, M.A., Mackay, I.R., Zimmet, P.Z., Howard, N., Verge, C.F., Rowley, M.J. (1997). "Evaluation of ICA512As in combination with other islet cell autoantibodies at the onset of IDDM." *Diabetes Care* 20: 1403-1407.

Frisk, G., Tuvemo, T. (2004). "Enterovirus infections with beta-cell tropic strains are frequent in siblings of children diagnosed with type diabetes and in association with elevated levels of GAD65 antibodies." *J. Med. Virol.* 73: 450-459.

Gardner, S.G., Gale, E.A., Williams, A.J., Gillespie, K.M., Lawrence, K.E., Bottazzo, G.F., Bingley, P.J. (1999). "Progression to diabetes in relatives with islet autoantibodies: is it inevitable?" *Diabetes Care* 22: 2049-2054.

Gillespie, K.M., Bain, S.C., Barnett, A.H., Bingley, P.J., Christie, M.R., Gill, G.V., Gale, E.A. (2004). "The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of high-risk HLA haplotypes." *Lancet* 364(9446): 1645-1647.

Gong, J., Masbad, J., Liu, F.-T., Chen, S-S. (1999). "Natural occurring polyphenolic antioxidants of tobacco leaves are IgE adjuvant." *FASEB J.* 13: 255.17.

Gong, J., Chen, S.S. (2003). "Polyphenolic antioxidants inhibit peptide presentation by antigen-presenting cells." *Int Immunopharmacol* 3(13-14): 1841-1852.

Graham, J., Hagopian, W.A., Kockum, I., Li, L.S., Sanjeevi, C.B., Lowe, R.M., Schaefer, J.B., Zarghami, M., Day, H.L., Landin-Olsson, M., Palmer, J.P., Janer-Villanueva, M., Hood, L., Sundkvist, G., Lernmark, A., Breslow, N., Dahlquist, G., Blohme, G. (2002). "Genetic effects on age-dependent onset and islet cell autoantibody markers in type 1 diabetes." *Diabetes* 51: 1346-1355.

Greeley, S.A., Katsumata, M., Yu, L., Eisenbarth, G.S., Moore, D.J., Goodarzi, H., Barker, C.F., Najj, A., Noorchashm, H. (2002). "Elimination of maternally transmitted auto-antibodies prevents diabetes in nonobese diabetic mice." *Nat Med.* 8(4): 399-402.

Greenbaum, C.J., Sears, K.L., Kahn, S.E., Palmer, J.P. (1999). "Relationship of beta-cell function and autoantibodies to progression and non-progression of sub-clinical type 1 diabetes." *Diabetes* 48: 170-175.

Hagopian, W.A., Sanjeevi, C.B., Kockum, I., Landin-Olsson, M., Karlsen, A.E., Sundkvist, G., Dahlquist, G., Palmer, J., Lernmark, A. (1995). "Glutamate decarboxylase-, insulin- and islet cell-antibodies and HLA typing to detect diabetes in a general population-based study of Swedish children." *J. Clin. Invest.* 95: 1505-1511.

Harada, M., Makino, S. (1986). "Suppression of overt diabetes in NOD mice by anti-thymocyte serum or anti-Thy 1, 2 antibody." *Jikken Dobutsu* 35(4): 501-504.

Haskins, K., McDuffie, M. (1990). "Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet specific T cell clone." *Science* 249: 1433-1436.

Haskins, K., Bradley, B., Powers, K., Fadok, V., Flores, S., Ling, X., Pugazhenti, S., Reusch, J., Kench, J. (2003). "Oxidative stress in type 1 diabetes." *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1005: 43-54.

Haskins, K., Kench, J., Powers, K., Bradley, B., Pugazhenti, S., Reusch, J., McDuffie, M. (2004). "Role for oxidative stress in the regeneration of islet beta cells?" *J. Investig. Med.* 52(1): 45-49.

Hermann, R., Knip, M., Veijola, R., Simell, O., Laine, A.P., Akerblom, H.K., Groop, P.H., Forsblom, C., Petterson-Fernholm, K., Ilonen, J. the FinnDIANE Study Group (2003). "Temporal changes in the frequencies of HLA genotypes in patients with type 1 diabetes: indication of an increased environmental pressure?" *Diabetologia* 46(3): 420-425.

Ho, E., Bray, T.M. (1999). "Antioxidants, NFkappaB activation, and diabetogenesis." *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222(3): 205-213.

Hotta, M., Tashiro, F., Ikegami, H., Niwa, H., Ogihara, T., Yodoi, J., Miyazaki, J. (1998). "Pancreatic beta-cell specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes." *J. Exp. Med.* 188(8): 1445-1451.

Hougee, S., Sanderris, A., Faber, J., Graus, Y.M.F., Berg, W.B., Garssen, J., Smit, F., Hoijer, M.A. (2005). "Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages." *Biochem. Pharmacol.* 69: 241-248.

Hummel, M., Bonifacio, E., Naserke, H.E., Ziegler, A.G. (2002). "Elimination of dietary gluten does not reduce titers of type 1 diabetes-associated autoantibodies in high-risk subjects." *Diabetes Care* 25(7): 1111-1116.

Hussain, S., Delovitch, T.L. (2005). "Dysregulated B7-1 and B7-2 expression on non-obese diabetic mouse B cells is associated with increased T cell costimulation and the development of insulinitis." *J. Immunol.* 174(2): 680-687.

Ihara, Y., Toyokuni, S, Uchida, K, Odaka, H., Tanaka, T., Ikeda, H., Hiai, H., Seino, Y., Yamada, Y. (1999). "Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic β -cells of GK rats a model of type 2 diabetes." *Diabetes* 48: 927-932.

Jeannin, P., Delneste, Y., Lecoanet, Henchoz S., Gauchat, J.F., Life, T., Holmes, D., Bonnfof, J.Y. (1995). "Thiols decrease human interleukin (IL-4) production and IL-4-induced immunoglobulin synthesis." *J. Exp. Med.* 182: 1785-1792.

Jersey, J., Snelgrove, S.L., Palmer, S.E., Teteris, S.A., Mullbacher, A., Miller, J.F.A.P., Slattery, R.M. (2007). "Beta cells cannot directly prime diabetogenic CD8 T cells in nonobese diabetic mice." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(4): 1295-1300.

Karvonen, M., Pitkaniemi, M., Pitkaniemi, J., Kohtamaki, K., Tajima, N., Tuomilehto, J. (1997). "Sex difference in the incidence of insulin-dependent diabetes mellitus: an analysis of the recent epidemiological data. World Health Organization DIAMOND Project Group." *Diabetes Metab. Rev.* 13: 275-291.

Katz, J., Benoist, C., Mathis, D. (1993). "Major histocompatibility complex class I molecules are required for the development of insulinitis in non-obese diabetic mice." *Eur. J. Immunol.* 23(12): 3358-3360.

Kawasaki, E., Abiru, N., Eguchi, K. (2004). "Prevention of type 1 diabetes: from the view point of β -cell damage." *Diabetes Research and Clinical Practice.* 6: S27-S32.

Kawasaki, E., Awata, T., Ikegami, H., Kobayashi, T., Maruyama, T., Nakanishi, K., Shimada, A., Uga, M., Kurihara, S., Kawabata, Y., Tanaka, S., Kanazawa, Y., Lee, I., Eguchi, K. (2006). "Systematic search for single nucleotide polymorphisms in a lymphoid tyrosine phosphatase gene (PTPN22): Association between a promoter polymorphism and type 1 diabetes in Asian populations." *Am. J. Med. Genet. A.* 140(6): 586-593.

Kimpimäki, T., Kupila, A., Hämäläinen, A.-M., Kukko, M., Kulmala, P., Savola, K., Simell, T., Muona, P., Ilonen, J., Simell, O., Knip, M. (2001). "The first signs of β -cell autoimmunity appear in infancy in genetically susceptible children from the general population: the Finish Type 1 Diabetes Prediction and Prevention Study." *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 4782-4788.

Kirkpatrick, P. (2002). "Antibacterial drugs: stitching together naturally." *Nature Rev. Drug Discov.* 1: 748.

Knip, M., Kukko, M., Kulmala, P., Veijola, R., Simell, O., Akerblom, H.K., Ilonen, J. (2002). "Humoral beta-cell autoimmunity in relation to HLA-defined disease susceptibility in preclinical and clinical type 1 diabetes." *Am. J. Med. Genet.* 115: 48-54.

Knip, M., Veijola, R., Virtanen, S.M., Hyoty, H., Vaarala, O., Akerblom, H.K. (2005). "Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes." *Diabetes* 54(2): S125-S136.

Koczwara, K., Bonifacio, E., Ziegler, A.G. (2004). "Transmission of maternal islet antibodies and risk of autoimmune diabetes in offspring of mothers with type 1 diabetes." *Diabetes* 53(1): 1-4.

Korhonen, S., Knip, M.M., Kulmala, P., Savola, K., Akerblom, H.K., Knip, M. (2002). "Autoantibodies to GAD, IA-2 and insulin in ICA-positive first-degree relatives of children with type 1 diabetes: a comparison between parents and siblings." *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 18: 43-48.

Krejsa, C.M., Nadler, S.G., Esselstyn, J.M., Kavanagh, T.J., Ledbetter, J.A., Schieven, G.L. (1997). "Role of oxidative stress in the action of vanadium phosphotyrosine phosphatase inhibitors. Redox independent activation of NF-kappaB. ." J. Biol. Chem. 272(17): 11541-11549.

Krummel, M.F., Allison, J.P. (1995). "CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation." J.Exp.Med. 182(2): 459-465.

Krummel, M.F., Allison, J.P. (1996). "CTLA-4 engagement. inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells." J. Exp. Med. 183(6): 2533-2540.

Krummel, M.F., Sullivan, T.J., Allison, J.P. (1996). "Superantigen responses and co-stimulation: CD28 and CTLA-4 have opposing effects on T cell expansion in vitro and in vivo." Int.Immunol. 8(4): 519-523.

Kubisch, H.M., Wang, J., Luche, R., Carlson, E., Bray, T.M., Epstein, C.J., Phillips, J.P. (1994). "Transgenic Copper/Zinc Superoxide Dismutase Modulates Susceptibility to Type I Diabetes." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9956-9959.

Lanzavecchia, A. (1990). "Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes." Annu. Rev. Immunol. 8: 773-793.

Lapidot, T., Walker, M.D., Kanner, J. (2002). "Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic β -cells *in vitro*." J. Agric. Food Chem. 50: 7220-7225.

Laybutt, D.R., Kaneto, H., Hasenkamp, W., Grey, S., Jonas, J.C., Sgroi, D.C., Groff, A., Ferran, C., Bonner-Weir, S., Sharma, A., Weir, G.C. (2002). "Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to beta-cell survival during chronic hyperglycemia." Diabetes 51: 413-423.

Leiter, E.H. (1997). Current Protocols in Immunology: 15.9.1-15.9.23.

Leslie, R. D., Elliott, R.B. (1994). "Early environmental events as a cause of IDDM: evidence and implications." Diabetes 43: 843-850.

Leslie, R.D.G., Castelli, M.D. (2004). "Age-dependent influences on the origins of autoimmune diabetes: vidence and implications." Diabetes 53: 3033-3039.

Li, X., Chen, H., Epstein, P.N. (2006). "Metallothionein and catalase sensitize to diabetes in nonobese diabetic mice - Reactive oxygen species may have a protective role in pancreatic beta-cells." Diabetes 55: 1592-1604.

Lim, L.C.L., Fiordalisi, M.N., Mantell, J.L., Schimtz, J.L., Folds, J.D. (1998). "A whole-blood assay for qualitative and semiquantitative measurments of CD69 surface expression on CD4 and CD8 T lymphocytes using flow cytometry." Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology (May): 392-398.

Lonnrot, M., Korpela, K., Knip, M., Ilonen, J., Simell, O., Korhonen, S., Savola, K., Muona, P., Simell, T., Koskela, P., Hyoty, H. (2000). "Enterovirus infection as a risk factor for beta-cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort: the Finnish Diabetes Prediction and Prevention Study." *Diabetes* 49(2): 1314-1318.

Makino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K., Tochino, Y. (1980). "Breeding of a non-obese diabetic strain of mice." *Exp. Anim.* 29: 1-13.

Makino, S., Harada, M., Kishimoto, Y., Hayashi, Y. (1986). "Absence of insulinitis and overt diabetes in athymic nude mice with NOD genetic background." *Jikken Dobutsu* 35(4): 495-498.

Mandrup-Poulsen, T. (2003). "Beta cell death and protection." *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1005: 32-42.

Mansson, L., Torn, C., Landin-Olsson, M. (2001). "Islet cell antibodies represent autoimmune response against several antigens." *Int. J. Exp. Diabetes Res.* 2: 85-90.

Marselli, L., Dotta, F., Piro, S., Santangelo, C., Masini, M., Lupi, R., Realacci, M., del Guerra, S., Mosca, F., Boggi, U., Purrello, F., Navalesi, R., Marchetti, P. (2001). "Th2 Cytokines Have a Partial, Direct Protective Effect on the Function and Survival of Isolated Human Islets Exposed to Combined Proinflammatory and Th1 Cytokines." *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(10): 4974-4978.

Martin-Gallan, P., Carrascosa, A., Gussinve, M., Dominguez, C. (2005). "Estimation of lipoperoxidative damage and antioxidant status in diabetic children: relationship with individual antioxidants." *Free Radic. Rev.* 39(9): 933-942.

Masbad, J., Gong, J., Chen, S-S. (1999). "Small molecules present in smokeless tobacco extract (STE) inhibit antigen presentation." *FASEB J.* 13: 4241.11.

Mathis, D., Vence, L., Benoist C. (2001). "Beta-cell death during progression to diabetes." *Nature* 414: 792-798.

Maxwell, S.R., Thomason, H., Sandler, D., Leguen, C., Baxter, M.A., Thorpe, G.H., Jones, A.F., Barnett, A.H. (1997). "Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus." *Eur. J. Clin. Invest.* 27;484-490.

Middleton, E.J., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000). "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer." *Pharmacological Reviews* 52: 673-751.

Miller, B.J., Appel, M.C., O'Neil, J.J., Wicker, L.S. (1988). "Both the Lyt-2+ and L3T4+ T cell subsets are required for the transfer of diabetes in nonobese diabetic mice." *J. Immunol.* 140(1): 52-58.

Mosmann, T.R., Coffman, R.L. (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." *Annu. Rev. Immunol.* 7: 145-173.

Muthian, G., Bright, J.J. (2004). "Quercetin, a flavonoid phytoestrogen, ameliorates experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through JAK-STAT pathway in T lymphocyte." *J. Clin. Immunol.* 24(5): 542-552.

Nair, M.P.N., Kandaswami, C., Mahajan, S., Chadha, K.C., Chawda, R., Nair, H., Kumar, N., Nair, R.E., Schwartz, S.A. (2002). "The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFN γ) and Th-2 (IL-4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells." *Bioch. Bioph. Acta* 1593: 29-36.

Natarajan, C., Bright, J.J. (2002). "Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through JAK-STAT pathway in T cells and differentiation of neural antigen specific Th1 cells." *J. Immunol.* 169: 6506-6513.

Nathan, C.F., Tsunawaki, S. (1986). "Secretion of toxic oxygen products by macrophages: Regulatory cytokines and their effects on the oxidase." *Ciba Found Symp* 118: 211-230.

Nguyen, T., Wang, R., Russell, J.H. (2000). "IL-12 enhances IL-2 function by inducing CD25 expression through a p38 mitogen-activated protein kinase pathway." *Eur. J. Immunol.* 30: 1445-1452.

Notkins, A.L., Lernmark, A. (2001). "Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues." *Journal of Clinical Investigation* 108: 1247-1252.

O'Brien, B. A., Harmon, B.V., Cameron, D.P., Allan, D.J. (1997). "Apoptosis is the model of beta-cell death responsible for the development of IDDM in the nonobese diabetic (NOD) mouse." *Diabetes* 46: 750-757.

Palmer, J.P., Asplin C.M., Clemons, P., Lyen, K., Tatpati, O., Raghu, P.K., Raghu, P.K., Paquette, T.L. (1983). "Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment." *Science* 222: 1337-1339.

Paronen, J., Knip, M., Savilahti, E., Virtanen, S.M., Ilonen, J., Åkerblom, H. K., Vaarala, O., and the Finnish Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk Study Group (2000). "Effect of cow's milk exposure and maternal type 1 diabetes on cellular and humoral immunization to dietary insulin in infants at genetic risk for type 1 diabetes." *Diabetes* 49: 1657-1665.

Pastore, M.R., Bazzigaluppi, E., Belloni, C., Arcovio, C., Bonifacio, E., Bosi, E. (2003). "Six months of gluten-free diet do not influence autoantibody titers, but improve insulin secretion in subjects at high risk for type 1 diabetes." *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88(1): 162-165.

Peach, R.J., Bajorath, J., Brady, W., Leytze, G., Greene, J., Naemura, J., Linsley, P.S. (1994). "Complementarity determining region 1 (CDR1)- and CDR3-analogous regions in CTLA-4 and CD28 determine the binding to B7-1." *J. Exp. Med.* 180(6): 2049-2058.

Peterson, J.D., Herzenberg, L.A., Vasquez, K., Waltenbaugh, C. (1998). "Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3071-3076.

Piganelli, J.D., Flores, S.C., Cruz, C., Koepp, J., Batinic-Haberle, I., Crapo, J., Day, B., Kachadourian, R., Young, R., Bradley, B., Haskins, K. (2002). "A metalloporphyrin-based superoxide dismutase mimic inhibits adoptive transfer of autoimmune diabetes by a diabetogenic T-cell clone." *Diabetes* 51(2): 347-355.

Pihoker, C., Gillian, L.K., Hampe, C.S., Lernmärke, A. (2005). "Autoantibodies in Diabetes." *Diabetes* 54(Supplement 2): S52-S61.

Pugliese, A. (2004). "Genetics of type 1 diabetes." *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 33: 1-16.

Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W. L. (1998). "Cytokines and Their Roles in Pancreatic Islet β -Cell Destruction and Insulin-Dependent Diabetes Mellitus." *Biochem. Pharmacol.* 55: 1139-1149.

Rahman, I., Biswas, S.K., Kirkham, P.A. (2006). "Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols." *Biochem. Pharmacol.* 72(11): 1439-1452.

Reeves, R.H., Patch, D., Sharpe, A.H., Borriello, F., Freeman, G.J., Edelhoff, S., Disteche, C. (1997). "The coestimulatory genes Cd80 and Cd86 are linked on mouse chromosome 16 and human chromosome 3." *Mammalian Genome* 8: 581-582.

Rice-Evans, C., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." *Free Radical Biology & Medicine* 20(7): 933-956.

Roep, R.O., Atkinson, M., Von Herrath, M. (2004). "Satisfaction (not) guaranteed: re-evaluating the use of animal models of type 1 diabetes." *Nature Reviews Immunology* 4(Dec.): 989-997.

Rosmalen, J.G.M., van Ewijk, W., Leenen, P.J.M. (2002). "T-cell education in autoimmune diabetes: teachers and students." *TRENDS in Immunology* 23(1): 40-46.

Rutella, S., Rumi, C., Lucia, M.B., Barberi, T., Puggioni, P.L., Lai, M., Romano, A., Cauda, R., Leone, G. (1999). "Induction of CD69 Antigen on normal CD4+ and CD8+ lymphocytes subsets and its relationship with the phenotype of responding T-cells." *Cytometry* 38: 95-101.

Salveti, M., Ristori, G., Bompreszi, R., Pozzilli, P., Leslie, R.D.G. (2000). "Twins: mirrors of the immune system." *Immunol. Today* 21: 342-347.

Savilahti, E., Åkerblom, H.K., Tainio, V.-M., Koskimies, S. (1988). "Children with newly diagnosed insulin dependent diabetes mellitus have increased levels of cow's milk antibodies." *Diabetes Res.* 7(3): 137-140.

Savola, K., Bonifacio, E., Sabbah, E., Kulmala, P., Vahasalo, P., Karjalainen, J., Tuomilehto-Wolf, E., Merilainen, J., Åkerblom, H., Knip, M. (1998). "IA-2 antibodies: a sensitive marker of IDDM with clinical onset in childhood and adolescence." *Diabetologia* 41: 424-429.

Schoenle, E.J., Lang-Muritano, M., Gschwend, S., Laimbacher, J., Mullis, P.E., Torresani, T., Bion-Laubert, A., Molinari, L. (2001). "Epidemiology of type 1 diabetes." *Diabetologia* 44: 286-289.

Serreze, D.V., Leiter, E.H. (2001). "Genes and cellular requirements for autoimmune diabetes susceptibility in nonobese diabetic mice." *Curr. Dir. Autoimmun.* 4: 31-67.

Sherry, N.A., Kushner, J.A., Glandt, M., Kitamura, T., Brillantes, M.B., Herold, K.C. (2006). "Effects of autoimmunity and immune therapy on beta-cell turnover in type 1 diabetes." *Diabetes* 55(12): 3238-3245.

Silveira, P.A., Chapman, H.D., Stolp, J., Johnson, E., Cox, S.L., Hunter, K., Wicker, L.S., Serreze, D.V. (2006). "Genes within the Idd5 and Idd9/11 diabetes susceptibility loci affect the pathogenic activity of B cells in nonobese diabetic mice." *Journal of Immunology* 177(10): 7033-7041.

Steck, A.K., Bugawan, T.L., Valdes, A.M., Emery, L.M., Blair, A., Norris, J.M., Redondo, M.J., Babu, S.R., Erlich, H.A., Eisenbarth G.S., Rewers, M.J. (2005). "Association of Non-HLA Genes With Type 1 Diabetes Autoimmunity." *Diabetes* 54: 2482-2486.

Sultz, H.A. (1972). "Childhood diabetes mellitus. In Long-term Childhood Illness." Ed. Pittsburg, PA, University of Pittsburg Press: 223-248.

Tivol, E.A., Borriello, F., Schweitzer, A.N., Lynch, W.P., Bluestone, J.A., Sharpe, A.H. (1995). "Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4." *Immunity* 3(5): 541-547.

Tsai, E.B., Sherry, N.A., Palmer, J.P., Herold, K.C. (2006). "The rise and fall of insulin secretion in type 1 diabetes mellitus." *Diabetologia* 49(2): 261-270.

Vaarala, O., Knip, M., Paronen, J., Hamalainen, A.-M., Muona, P., Vaatainen, M., Ilonen, J., Simell, O., Åkerblom, H.K. (1999). "Cow milk formula feeding induces primary immunization to insulin in infants at genetic risk for type 1 diabetes." *Diabetes* 48: 1389-1394.

Vang, T., Congia, M., Macis, M.D., Musumeci, L., Orru, V., Zavattari, P., Nika, K., Tautz, L., Tasken, K., Cucca, F., Mustelin, T., Bottini, N. (2005). "Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant." *Nat Genet.* 37(12): 1317-1319.

Vessal, M., Hemmati, M., Vasej, M. (2003). "Antidiabetic effects of quercetin in streptozotocin-induced diabetic rats." *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 135C(3): 357-364.

Virtanen, S. M., Aro, A. (1994). "Dietary factors in the aetiology of diabetes." *Ann. Med.* 26: 469-478.

Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Green, J.M., Thompson, C.B., Bluestone, J.A. (1994). "CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation." *Immunity* 1(5): 405-413.

Warran, J.H., Krolewski, A.S., Gottlieb, M.S., Kahn, C.R. (1984). "Differences in risk of insulin-dependent diabetes in offspring of diabetic mothers and diabetic fathers." *N. Engl. J. Med.* 311(3): 149-152.

Wegmann, D.R., Eisenbarth, G.S. (2000). "It's insulin." *J. Autoimmun.* 15: 286-291.

Weir, G.C., Bonner-Weir, S. (2004). "Five Stages of Evolving β -Cell Dysfunction During Progression of Diabetes." *Diabetes* 53(S3): S16-S21.

Wicker, L.S., Miller, B.J., Mullen, Y. (1986). "Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice." *Diabetes* 35(8): 855-860.

Wong, F.S., Wen, L., Tang, M., Ramanathan, M., Visintin, I., Daugherty, J., Hannum, L.G., Janeway Jr., C.A., Shlomchik, M.J. (2004). "Investigation of the Role of B-Cells in Type 1 Diabetes in the NOD Mouse." *Diabetes* 53: 2581-2587.

Xie, T., Belinsky, M., Xu, Y., Jaiswal, A.K. (1995). "ARE- and TRE-mediated regulation of gene expression. Response to xenobiotics and antioxidants." *J. Biol. Chem.* 270(6): 894 - 900.

Yanagida, T., Kato, T., Igarashi, O., Inoue, T., Nariuchi, H. (1994). "Second signal activity of IL-12 on the proliferation and IL-2R expression of T helper cell-1 clone." *J. Immunol.* 152: 4919-4928.

Ylipaasto, P., Klingel, K., Lindberg, A.M., Otonkoski, T., Kandolf, R., Hovi, T., Roivainen, M. (2004). "Enterovirus infection in human pancreatic islet cells, islet tropism in vivo and receptor involvement in cultured islet beta cells." *Diabetologia* 47(2): 225-239.

Yoon, J.W., Jun, H.S. (2005). "Autoimmune destruction of pancreatic beta cells." *Am. J. Ther.* 12(6): 580-591.

Zhang, H., Ollinger, K., Brunk, U. (1995). "Insulinoma cells in culture show pronounced sensitivity to alloxan-induced oxidative stress." *Diabetologia* 38: 635-641.

Ziegler, R., Alper, C.A., Awdeh, Z.L., Castano, L., Brink, S.J., Soeldner, J.S., Jackson, R.A., Eisenbarth, G.S. (1991). "Specific association of HLA-DR4 with increased prevalence and level of insulin autoantibodies in first-degree relatives of patients with type 1 diabetes." *Diabetes* 40: 709-714.

Ziegler, S.F., Ramsdell, F., Alderson, M.R. (1994). "The activation antigen CD69." *Stem Cells* 12(5): 456-465.

Agradecimentos

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

À Exma. Sra. Professora Doutora Maria Manuela Beirão Catarino, pela co-orientação e acompanhamento dos trabalhos da tese.

Ao Laboratório de Nutracêuticos do Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica.

À Exma. Sra. Doutora Catarina Duarte, à Teresa e à Ana Matias pela preparação do extracto natural de uvas, sem o qual este trabalho não teria sido possível.

Ao Instituto Gulbenkian de Ciências.

Ao Exmo. Sr. Doutor Carlos Penha-Gonçalves pela orientação, apoio e disponibilidade durante todo o desenvolvimento dos trabalhos que culminaram na presente dissertação de mestrado.

A todo o grupo de Genética das Doenças do IGC, pelo companheirismo, apoio e amizade: Joana, Lígia, Paulo, Rita, Joana Côrte-Real, Maria de Jesus, Cláudio, Maria do Rosário e Céu.

À Íris e à Lurdes pela disponibilidade e partilha dos conhecimentos do "mundo NOD".

À Marisa e à Ana Gaspar pelo apoio técnico de histologia.

A todos, muito obrigada.

