

UNIVERSIDADE PAULISTA

ANA PAULA SOARES DA SILVA

**TERAPIA CELULAR ADOTIVA: O POTENCIAL DE LINFÓCITOS B-1 NA
MODULAÇÃO DA GLICEMIA E PRESERVAÇÃO DO PÂNCREAS
ENDÓCRINO NO DIABETES EXPERIMENTAL**

SÃO PAULO

2026

ANA PAULA SOARES DA SILVA

**TERAPIA CELULAR ADOTIVA: O POTENCIAL DE LINFÓCITOS B-1 NA
MODULAÇÃO DA GLICEMIA E PRESERVAÇÃO DO PÂNCREAS
ENDÓCRINO NO DIABETES EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto-Sensu* em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP como requisito para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Anuska Marcelino Alvares
Saraiva

SÃO PAULO

2026

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Ana Paula Soares da.

Terapia celular adotiva: o potencial de linfócitos B-1 na modulação da glicemia e preservação do pâncreas endócrino no diabetes experimental / Ana Paula Soares da Silva. - 2026.

78 f. : il. color.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2026.

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Anuska Marcelino Alvares Saraiva.

1. Diabetes *mellitus* tipo 1. 2. Insulina. 3. Transferência adotiva. 4. Estreptozotocina. 5. Tolerância à glicose. I. Saraiva, Anuska Marcelino Alvares (orientadora). II. Título.

ANA PAULA SOARES DA SILVA

**TERAPIA CELULAR ADOTIVA: O POTENCIAL DE LINFÓCITOS B-1 NA
MODULAÇÃO DA GLICEMIA E PRESERVAÇÃO DO PÂNCREAS
ENDÓCRINO NO DIABETES EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto-Sensu* em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP como requisito para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

_____/_____/_____
Profa. Dr.a Anuska Marcelino Alvares Saraiva
Universidade Paulista - UNIP

_____/_____/_____
Prof. Dr.a Ellen Emi Kato
Instituto Butantan

_____/_____/_____
Prof. Dr. Ronni Rômulo Novaes e Brito
Centro Universitário São Camilo

_____/_____/_____
Prof. Dr.a Maria Anete Lallo
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____/_____
Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Universidade Paulista – UNIP

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus avós Valdemar e Gildete. Quanta falta vocês fazem em minha vida e o quanto estariam felizes de ver que o trabalho de suas mãos hoje rende frutos. Sempre os amarei.

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro e eterno agradecimento ao autor da vida, ao Deus forte e eterno, que me sustenta, inspira e me move a ser alguém que deseja ser melhor a cada dia.

Aos meus filhos e filhas que Deus guarda no céu, minhas belas dádivas. E às joias preciosas que me permitiu ter aqui comigo, minha Isis e Elis, vocês são o ar que respiro, minha força e motivação.

Ao esposo incrível que sempre me incentiva a buscar os meus sonhos e embarca em todos eles ao meu lado sendo sempre meu apoio e sustento.

Ao meus pais e avós que me ensinaram que através da educação poderia mudar o mundo, eles que sempre me fizeram crer que tudo é possível, assim como dizia o poeta “basta ser sincero e desejar profundo. Você será capaz de sacudir o mundo!”

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – PROSUP) pela concessão da bolsa.

À Universidade Paulista – UNIP pela infraestrutura.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da UNIP pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao corpo docente do referido programa de pós-graduação por todo conhecimento compartilhado.

À Prof^a Dr^a Anuska Marcelino Alvares Saraiva que me enxergou muito além da aluna, viu a mulher, mãe, esposa e profissional e soube me conduzir com maestria pelos caminhos do aprendizado, minha eterna admiração e respeito.

Aos amigos do grupo de pesquisa que tornaram real todo projeto e me ouviram e me acolheram em todas as minhas dificuldades e necessidades.

À amiga Caren Ingrid que desde a graduação partilha comigo muito do seu conhecimento, que me apresentou ao programa de doutorado da Unip e ao longo de todo esse tempo é minha confidente, amiga e parceira querida, gratidão por tanto.

Caio, Nicole e Lucas, o trio mais incrível de pessoas que poderia querer ao meu lado, vocês tornaram real a execução desse trabalho e me apoiaram nos momentos que não daria conta sozinha, meu agradecimento e reconhecimento.

*“Deus não colocaria desejos em
nosso coração que Ele mesmo não
seja capaz de realizar”.
Santa Terezinha do Menino Jesus*

RESUMO

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune caracterizada pela destruição das células β pancreáticas, resultando em deficiência de insulina e comprometimento da homeostase glicêmica. Estudos têm demonstrado que os linfócitos B-1 desempenham funções imuno reguladoras importantes e podem atuar na prevenção do diabetes autoimune experimental. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da transferência adotiva de linfócitos B-1 reprogramados metabolicamente sobre parâmetros glicêmicos, histopatológicos e imunológicos em camundongos XID submetidos à indução experimental do diabetes por estreptozotocina (STZ). Os animais foram distribuídos em grupos tratados com linfócitos B-1 produtores de insulina em diferentes momentos, precocemente ou após o estabelecimento do diabetes induzido. Foram avaliados quanto ao peso, evolução da glicemia, teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGip), distribuição de linfócitos B-1 em diferentes tecidos, rastreo das células transferidas, morfologia pancreática e expressão de insulina nas ilhotas pancreáticas. A indução do diabetes por STZ promoveu hiperglicemia persistente, intolerância à glicose e alterações estruturais severas nas ilhotas pancreáticas. A transferência adotiva de linfócitos B-1 reprogramados resultou em respostas heterogêneas entre os animais, sendo observados indivíduos respondedores e não respondedores ao tratamento. Os animais respondedores apresentaram melhor controle glicêmico, melhor capacidade de recuperação glicêmica após sobrecarga de glicose. Além disso, exibiram melhor preservação da arquitetura pancreática, com presença de ilhotas mais organizada morfolologicamente e imunomarcção compatível com produção residual de insulina. Em contrapartida, os animais não respondedores apresentaram perfil semelhante ao grupo diabético não tratado, caracterizado por hiperglicemia persistente, elevada AUC e maior comprometimento estrutural pancreático, apesar da presença de insulina no tecido pancreático. A análise morfométrica das ilhotas não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para área e perímetro, embora tenha sido observada tendência de melhor preservação morfológica em parte dos animais respondedores. A avaliação fenotípica revelou aumento da frequência de linfócitos B-1 no peritônio dos grupos tratados, no entanto, a análise individual demonstrou ausência dessas células no peritônio de animais respondedores enquanto aumentavam no fígado, diferentemente do observado em animais não respondedores. No baço foi observada redução significativa dessa população em comparação ao

grupo STZ, sugerindo possível modulação da resposta imune sistêmica após a transferência adotiva. A análise morfológica do inóculo revelou o surgimento de uma população celular de menor tamanho, que aparece com maior frequência que os linfócitos esperados pelo cultivo padrão. Em conjunto, os resultados demonstram que a transferência adotiva de linfócitos B-1 reprogramados metabolicamente foi capaz de promover efeitos benéficos em parte dos animais tratados, contribuindo para melhora da tolerância à glicose e preservação parcial da função pancreática. Entretanto, a variabilidade observada entre os indivíduos indica que a resposta terapêutica pode depender de fatores relacionados tanto às características dos linfócitos transferidos, sua capacidade migratória e estabelecimento em diferentes órgãos, quanto a fatores ainda desconhecidos no hospedeiro, reforçando a complexidade dos mecanismos envolvidos e o potencial dos linfócitos B-1 como alvo para estratégias inovadoras no tratamento do DM1.

Palavras-chave: Diabetes mellitus tipo 1; Insulina; Transferência adotiva; Estreptozotocina; Tolerância à glicose.

ABSTRACT

Type 1 Diabetes (T1D) is an autoimmune disease characterized by pancreatic β -cells destruction, resulting in insulin deficiency and impaired glycemic homeostasis. Studies have demonstrated that B-1 lymphocytes play an important immunoregulatory function and may contribute to the prevention of experimental autoimmune diabetes. In this context, the present study aimed to evaluate the effects of the adoptive transfer of metabolically reprogrammed B-1 lymphocytes on glycemic, histopathological, and immunological parameters in XID mice subjected to streptozotocin (STZ)-induced experimental diabetes. Animals were allocated into groups receiving insulin-producing B-1 lymphocytes either at an early stage or after the establishment of STZ-induced diabetes. Body weight, blood glucose progression, intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT), B-1 lymphocyte distribution in different tissues, tracking of transferred cells, pancreatic morphology, and insulin expression within pancreatic islets were evaluated. STZ-induced diabetes promoted persistent hyperglycemia, glucose intolerance, and severe structural alterations in pancreatic islets. Adoptive transfer of metabolically reprogrammed B-1 lymphocytes resulted in heterogeneous responses among treated animals, allowing the identification of responder and non-responder individuals. Responder animals exhibited improved glycemic control and enhanced glucose clearance following glucose challenge. Furthermore, they showed better preservation of pancreatic architecture, with morphologically more organized islets and immunostaining compatible with residual insulin production. In contrast, non-responder animals displayed a profile similar to that of untreated diabetic mice, characterized by persistent hyperglycemia, increased area under the curve (AUC) values during glucose tolerance testing, and greater pancreatic structural impairment, despite the presence of insulin-positive staining within pancreatic tissue. Morphometric analysis of pancreatic islets revealed no statistically significant differences among groups regarding islet area and perimeter, although a trend toward better morphological preservation was observed in some responder animals. Phenotypic analysis demonstrated an increased frequency of B-1 lymphocytes in the peritoneal cavity of treated groups. However, individual analysis revealed the absence of these cells in the peritoneum of responder animals, concomitant with increased frequencies in the liver, a pattern distinct from that observed in non-responders. In the spleen, a significant reduction in this population was observed compared with the STZ group, suggesting a possible modulation of the systemic immune response following adoptive transfer.

Morphological evaluation of the inoculum also revealed the emergence of a smaller-sized cell population, occurring at a higher frequency than the lymphocytes typically observed under standard culture conditions. Taken together, these findings demonstrate that the adoptive transfer of metabolically reprogrammed B-1 lymphocytes could promote beneficial effects in a subset of treated animals, contributing to improved glucose tolerance and partial preservation of pancreatic function. However, the variability observed among individuals indicates that therapeutic responsiveness may depend on factors related to the characteristics of the transferred lymphocytes, their migratory capacity and establishment within different organs, as well as host-related factors that remain to be elucidated. These findings highlight the complexity of the mechanisms involved and support the potential of B-1 lymphocytes as a target for innovative therapeutic strategies in T1D.

Keywords: Type 1 diabetes mellitus; Insulin; Adoptive transfer; Streptozotocin; Glucose tolerance.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivos Específicos	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Delineamento Experimental	20
3.1.1	<i>In Vitro</i>	20
3.1.2	<i>In Vivo</i>	20
3.2	Animais (BALB/c e BALB/c XID) e os Grupos Experimentais	22
3.3	Obtenção de Linfócitos B-1 da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c e aplicação do protocolo de reprogramação metabólica	23
3.4	Análise Morfológica por Flow Imaging Microscopy (FIM)	24
3.5	<i>In Vivo</i>	24
3.5.1	Indução do diabetes em Camundongos XID	24
3.5.2	Marcação de células B-1 com <i>cell trace FarRed</i>	24
3.5.3	Transferência adotiva de Linfócitos B-1 marcados ou não com <i>cell trace FarRed</i>	25
3.5.4	Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGip)	25
3.5.5	Necrópsia e coleta dos órgãos	26
3.5.6	Histopatologia	26
3.5.7	Rastreio de células B-1 no baço, pâncreas e fígado pela expressão do <i>FarRed</i> usando a técnica de <i>print</i>	27
3.5.8	Análise das populações de células B-1 presentes na cavidade peritoneal, baço e fígado, por citometria de fluxo	27
3.5.9	Marcação de grânulos de insulina pela técnica de imunofluorescência	28
3.5.10	Análise Estatística	29
4	RESULTADOS	30
5	DISCUSSÃO	50
6	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS BALB/c	73

ANEXO 2 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	74
ANEXO 3 - APROVAÇÃO DO RELATÓRIO PARCIAL DO PROJETO DE PESQUISA.....	75
ANEXO 4 - APROVAÇÃO DA EMENDA PARA AUMENTO NO NÚMERO DE ANIMAIS.....	76
ANEXO 5 - CÉLULA B PANCREÁTICAS CORADAS POR IMUNOFLOURESCÊNCIA, EM VERDE A PRODUÇÃO DE INSULINA E AZUL OS NÚCLEOS CELULARES.....	77

1 INTRODUÇÃO

O diabetes *melittus* tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune órgão específica onde ocorre a destruição das células beta pancreáticas que são produtoras de insulina. Por se tratar de uma doença onde há produção ou ação insuficientes da insulina compreende como sinais e sintomas o aumento dos níveis glicêmicos, distúrbios no metabolismo de proteínas, gorduras e carboidratos (HOLT et al., 2021). Há possibilidade ainda de desenvolvimento de alterações estruturais em outros sistemas, com o surgimento de retinopatias, nefro e neuropatia, além de doenças coronarianas e outros.

Desde 1996, com os estudos clássicos de Serreze et al. (1996), fala-se do papel relevante dos linfócitos B no desenvolvimento do DM1 (SERREZE et al., 1996). No início do século, sua participação foi considerada controversa, havendo autores que defendiam sua contribuição para o desenvolvimento da doença (ANDERSON; BLUESTONE, 2005. FIFE et al., 2006) enquanto outros sugeriam que essas células poderiam não ser essenciais para o processo (WONG; WEN, 2005). Atualmente, evidências indicam os linfócitos B como autores ativos da imunopatogênese do DM1, atuando não apenas na produção de autoanticorpos, mas também na apresentação de autoantígenos, ativação de linfócitos T autorreativos e modulação da resposta inflamatória das ilhotas pancreáticas (BOLDISON; WONG, 2021. SCHEM; et. Al., 2022), embora os linfócitos T permaneçam como os principais efetores da destruição pancreática.

Dentre as populações de linfócitos B, o subtipo B-1 apresenta um papel ainda controverso no desenvolvimento do diabetes. Embora a literatura venha, ao longo dos anos, reforçando a participação dos linfócitos B na patogênese e na regulação da doença, a atuação específica dos linfócitos B-1 permanece pouco esclarecida.

Os linfócitos B-1 diferem dos linfócitos B-2 convencionais, quanto sua ontogenia, características funcionais e fenotípicas (SMITH; BAUMGARTH, 2019). Quanto a sua origem, os linfócitos B-1 possuem precursores diferentes dos linfócitos B-2, além de características genéticas distintas para manter as gerações de populações celulares (MONTECINO-RODRIGUEZ et al., 2016).

As células B-1 têm origem a partir de tecidos embrionários e fetais. No entanto, duas são as hipóteses acerca de sua origem, sendo que na primeira os

precursores das células B-1 derivam de células que reorganizam seus genes durante o período fetal e neonatal, sendo então ativados em diferentes momentos do sistema imunitário (HARDY; HERZENBERG; KANTOR, 1993). Na segunda hipótese entende-se que tanto linfócitos B-1 quanto linfócitos B-2 vêm de um progenitor comum que sob influência de sinais específicos durante seu processo de desenvolvimento e seleção dará origem a um ou outro (HAUGHTON et al., 1993). Embora sua origem permaneça controversa é concordante que a manutenção dos linfócitos B-1 depende da sua capacidade de autorrenovação em camundongos adultos (BAUMGARTH, 2011; SMITH; BAUMGARTH, 2019).

Além das já citadas diferenças ontogênicas há as diferenças fenotípicas entre essas células, dentre elas, os linfócitos B-1 além dos marcadores comuns ao linfócito B como CD19, IgM, IgD e B220, apresenta também a molécula CD11b, marcador este típico de macrófago. Anteriormente acreditava-se que diferentemente das células B-2, os linfócitos B-1 não expressassem a molécula CD23 (KANTOR; HERZENBERG, 1993), entretanto evidências mais recentes indicam que a expressão de CD23 pode ocorrer em determinadas subpopulações ou sob condições específicas de ativação, não sendo, portanto, absolutamente ausente (GRIFFIN; ROTHSTEIN, 2012). Podem ainda ser subdivididos em linfócito B-1a, quando há o marcador CD5 e linfócito B-1b quando não o possuem. (HARDY, 2006). Os linfócitos do tipo B-1 são também conhecidos por um maior repertório de IgMs naturais (HERZENBERG et al., 1986; KANTOR; HERZENBERG, 1993).

Em camundongos, os linfócitos B-1 encontram-se predominantemente nas cavidades peritoneal e pleural, onde representam uma parcela significativa da população de células B locais. Em contraste, os linfócitos B-2 predominam em órgãos linfoides secundários, como baço e medula óssea, estando principalmente associados às respostas adaptativas convencionais (SUCHANEK; CLATWORTHY, 2023; HIÉRONIMUS; HUAUX, 2023; YENSON; BAUMGARTH, 2021).

Os linfócitos B-1 podem ser encontrados no peritônio, linfonodos mesentéricos e lâmina própria intestinal. Estas células podem através do omento sair da cavidade peritoneal, desenvolverem-se nos linfonodos para-tímicos e alcançar a corrente sanguínea através dos ductos linfáticos (ANSEL; HARRIS; CYSTER, 2002). Há ainda a possibilidade de que estas células cheguem ao intestino diretamente através do omento (ALLMAN; PILLAI, 2008).

Para estudar a importância das células B-1 na resposta imune através da

transferência adotiva de linfócitos B é comumente utilizado os camundongos com imunodeficiência ligada ao cromossomo X (XID), já que devido uma mutação os receptores de linfócitos B não são ativados, levando ao não desenvolvimento normal destas células e consequentemente uma redução no número de linfócitos do tipo B-2 e deficiência severa naqueles do tipo B-1 (KHAN et al., 1995).

Os linfócitos B-1 apresentam multifuncionalidade e já foi descrito seu papel na proteção contra agentes infecciosos (ALUGUPALLI et al., 2004. BAUMGARTH et al., 1999. CHOI; BAUMGARTH, 2008). Neste contexto, pode modular o perfil de citocinas, as populações peritoneais, incluindo o papel de linfócitos TCD8+ (LANGANKE DOS SANTOS et al., 2018. DE OLIVEIRA et al., 2024). Em contrapartida os linfócitos B-1 também podem atuar como facilitadores de infecções microbianas como, por exemplo, no caso de tornar os camundongos BALB/c mais suscetíveis à infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* quando comparados aos camundongos BALB/c XID (POPI et al., 2008).

Linfócitos B-1 são capazes de gerar imunoglobulinas (Ig) poli específicas de baixa afinidade quando comparados às células B convencionais (LALOR; MORAHAN, 1990). São células sensíveis aos agonistas de Receptores do Tipo Toll (TLRs) que ativam diretamente essas células e provocam a secreção de Igs (GURURAJAN; JACOB; PULENDRAN, 2007).

Devido sua característica de ativação direta por Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), as células B-1 são também chamadas de células timo independente (TI) (RAWLINGS et al., 2012), assim como as células MZB (linfócitos B da zona marginal). Ambas são conhecidas como células B inatas, (ILBs, do inglês Innate-like B cells) (KEARNEY, 2005).

As células B-1 que saem do peritônio rumo ao foco inflamatório se diferenciam em fagócitos mononucleares derivados de células B-1 também conhecidos por “fagócitos derivados de células B-1 (B-1 CDP, do inglês: *B-1 cells derived phagocytes*) (ALMEIDA et al., 2001). Neste processo os linfócitos perdem alguns marcadores como IgM, CD19 e B220 mas permanecem expressando o marcador mieloide CD11b e passa a expressar o F4/80, também mieloide (POPI et al., 2008; POPI et al., 2009).

O potencial pluripotente das células B-1 também foi descrito em outros trabalhos da literatura que demonstram, por exemplo, o potencial dessas em se diferenciar em células semelhantes ao osteoclasto. Nestes estudos células B-1

provenientes de culturas de células peritoneais foram replaqueadas e estimuladas e após 11 dias apresentaram células que expressavam fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP, do inglês: tartrate-resistant acid phosphatase), sendo este um marcador para identificação de osteoclastos, estes por sua vez apresentaram *in vitro* a capacidade de desmineralização (SHEN et al., 2015).

Nesse contexto, Alvares-Saraiva et al., descreveram pela primeira vez em 2015 a atividade reguladora dos linfócitos B1 no controle do diabetes autoimune induzido por injeções de estreptozotocina (STZ), quando foi realizada a transferência de linfócitos B-1 de camundongos saudáveis WT para animais XID, que são deficientes em células B-1, estes tornaram-se resistentes ao desenvolvimento induzido de diabetes por STZ. Foi demonstrado, ainda, que a injeção intramuscular do sobrenadante das culturas de linfócito B-1 é capaz de realizar o controle glicêmico em camundongos diabéticos (ALVARES-SARAIVA et al., 2015).

O papel dessas células na patogênese do diabetes permanece desconhecido e controverso. Estudos conduzidos com camundongos NOD que desenvolveram diabetes de forma espontânea mostraram que os linfócitos B-1 atuam nas ilhotas pancreáticas provocando o início da insulite e por consequência desenvolvendo o diabetes e seus sintomas (KENDALL et al., 2004). Estes camundongos possuem maior quantidade de células B-1 no baço, onde produzem IgMs que irão se ligar a antígenos da ilhota (CORTE-REAL et al., 2009).

Mais tarde, os mesmos autores demonstraram que *in vitro* os linfócitos B-1a secretam IgM e que, após se ligarem às células β pancreática, expressam óxido nítrico sintase levando ao estresse oxidativo (CORTE-REAL et al., 2012).

A plasticidade funcional dos linfócitos B-1, embora amplie seu potencial terapêutico, representa desafio experimental, uma vez que culturas *ex vivo* apresentam limitada manutenção e expansão celular, dificultando obtenção de populações estáveis e padronizadas para aplicações translacionais.

Estudos de Alvares-Saraiva, levando em consideração o potencial de se diferenciar e a responsividade a estímulos dos linfócitos B-1, propôs a aplicação de um protocolo para aperfeiçoar a produção de insulina por essas células, além de levar em conta aspectos como a sobrevivência e expansão *in vitro*, visando à construção de uma terapia para controle glicêmico de indivíduos diabéticos. Tal protocolo utilizou camundongos BALB/c saudáveis, de onde foram coletadas as

células peritoneais aderentes. O protocolo de cultivo foi dividido em duas partes: expansão e diferenciação. Na primeira fase, os linfócitos B-1 e os macrófagos obtidos foram cultivados em meio suplementado com 20mM de glicose e crotoxina por três dias (MELO; LUZ; SARAIVA, 2022). A crotoxina (CTX) é uma subunidade do veneno da cascavel com ação na regulação metabólica de células do sistema imune (FARIAS et al., 2017. LIMA et al., 2012) e, sobre as células B-1, promoveu maior viabilidade celular e diminuição da taxa de morte por apoptose no protocolo de reprogramação proposto (ALVARES-SARAIVA et.al., 2021). Na segunda fase, as células foram recultivadas em meio contendo 30mM de glicose e nicotinamida, por mais três dias, caracterizando a fase de diferenciação celular (MELO; LUZ; SARAIVA, 2022). A nicotinamida, individualmente, promoveu aumento na expressão dos grânulos de insulina, aumento do citoplasma celular e surgimento de novas organelas, o que sugere autofagia e aumento da atividade metabólica celular (ALVARES-SARAIVA, et.al. 2021).

Um dos achados mais relevantes relacionados à plasticidade metabólica dos linfócitos B é a demonstração de que essas células não apenas aumentam sua atividade energética após ativação, mas remodelam dinamicamente múltiplas vias metabólicas de forma integrada, incluindo glicólise, fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS) e metabolismo de ácidos graxos (VIVAS-GARCÍA; EFEYAN, 2022), suprimindo a demanda energética e atuando diretamente na definição do fenótipo funcional celular.

Células B-1 apresentam perfil metabolicamente mais ativo que linfócitos B-2 foliculares, exibindo maiores taxas basais de glicólise, metabolismo lipídico e respiração mitocondrial, sugerindo que o metabolismo participa diretamente da manutenção de suas propriedades funcionais e de sua plasticidade fenotípica (CLARKE et al., 2018). Além disso, os autores reforçam que essas adaptações metabólicas são reversíveis e altamente reguladas, permitindo que estímulos ambientais modulem a função celular por meio de mecanismos metabólicos e epigenéticos interligados. Esses achados sustentam a hipótese de que intervenções capazes de modificar o metabolismo celular podem alterar funcionalmente linfócitos B, influenciando sua sobrevivência, proliferação, diferenciação e potencial terapêutico.

Em linfócitos B-1 reprogramados *in vitro* para a produção de insulina, diferentemente do que ocorre nas células beta pancreáticas, o transportador de

glicose responsável pela entrada dessa molécula na célula é o GLUT1 e a fosforilação em glicose-6-fosfato (G6F) se dá por meio da hexoquinase (MELO; LUZ; SARAIVA, 2022). A reprogramação metabólica aumentou a sobrevivência e proliferação celulares, mantendo a expressão do gene de insulina (MELO; LUZ; SARAIVA, 2022). Nos leucócitos a presença do transportador de glicose 1 (GLUT1) é o responsável pela entrada da glicose na célula, sendo esta molécula a fonte principal de energia para célula (JELLUSOVA; RICKERT, 2016). A oxidação da glicose gera compostos importantes para manutenção da célula. Outras importantes vias de geração de ATP nessas células são através da oxidação de ácidos graxos e glutamina (NEWSHOLME; GORDON; NEWSHOLME, 1987). Já dentro das células β pancreáticas a glicose passa pelo processo de fosforilação e se transforma em G6F por intermédio das glicoquinases, sendo este um processo altamente eficaz (MEGLASSON; MATSCHINSKY, 1984).

Embora o protocolo tenha aumentado sobrevivência e expansão celular, permanece desconhecido se a população resultante mantém o potencial terapêutico previamente observado para linfócitos B-1 nativos ou se a reprogramação altera funcionalmente sua atividade *in vivo*. E, considerando a natureza multifuncional dos linfócitos B-1, a reprogramação *ex vivo* pode favorecer subpopulações funcionalmente distintas, tornando necessária a validação do comportamento biológico dessas células após transferência adotiva.

Deste modo, o presente estudo avaliou os efeitos da transferência adotiva de linfócitos B-1 reprogramados em diferentes tempos de inoculação e observação. O estudo *in vivo* do potencial hipoglicemiante dessas células, reprogramadas *in vitro*, é passo fundamental para validar o protocolo de reprogramação metabólica e, assim, permitir o avanço nos estudos de linfócitos B-1 como potencial terapia celular para pacientes diabéticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de linfócitos B-1 reprogramados metabolicamente para produção de insulina *in vitro* de regular a glicemia de camundongos diabéticos após a transferência celular adotiva.

2.2 Objetivos Específicos

- Reproduzir o protocolo de reprogramação metabólica em culturas de células peritoneais aderentes, a fim de aumentar a produção de insulina por linfócitos B-1;
- Testar *in vivo* a capacidade reguladora da glicemia de linfócitos B-1 após serem submetidas ao protocolo de reprogramação metabólica;
- Rastrear os linfócitos B-1 marcados com *cell trace FAR RED* transferidos adotivamente para camundongos XID.
- Investigar o controle do diabetes em camundongos diabéticos submetidos à terapia com linfócitos B-1.
- Determinar o melhor momento para a realização da transferência adotiva de linfócitos B-1 reprogramados, a partir dos resultados de controle glicêmico.
- Avaliar histologicamente o tecido pancreático de camundongos XID submetidos à STZ, transferidos ou não com células B-1.
- Determinar a área, o perímetro e a expressão de insulina em ilhotas pancreáticas de camundongos XID submetidos à STZ, transferidos ou não com células B-1.
- Avaliar diferenças morfológicas, distribuição de tamanho e concentração celular do inóculo de linfócitos B-1 reprogramados comparado com os linfócitos cultivado em meio R10.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento Experimental

3.1.1 *In Vitro*

Esta pesquisa consistiu no cultivo de células peritoneais aderentes submetidas a um protocolo de reprogramação metabólica (PRM), com expansão e diferenciação de linfócitos B-1 em células produtoras de insulina. Foram utilizados camundongos BALB/c para obtenção de linfócitos B-1 peritoneais. As células peritoneais aderentes foram tratadas por três dias com crotoxina em meio *High Glucose* (HG) com 20mM de glicose para proliferação da população. No terceiro dia foi realizada a troca do meio e acrescido HG 30mM e nicotinamida para otimizar a produção dos grânulos de insulina. No sexto dia as células B-1 contendo grânulos de insulina foram coletadas e para serem administradas nos animais previamente induzidos ao DM com STZ.

3.1.2 *In Vivo*

Camundongos BALB/c XID foram induzidos ao diabetes com STZ e receberam de forma adotiva a transferência de linfócitos B-1 aos 6 ou 15 dias após o início do protocolo com STZ e foram monitorados quanto ao peso e valores glicêmicos semanalmente até o fim do experimento. Lotes de animais que receberam linfócitos B-1 no 6º dia foram eutanasiados aos 15 e 22 dias e os que receberam a transferência adotiva no 15º dia foram eutanasiados aos 22 e 29 dias após o início do protocolo com STZ. Animais do grupo controle que não foram induzidos ao diabetes, ou seja, não passaram pelo protocolo com STZ e não receberam transferência adotiva de linfócitos B-1 e os do grupo STZ, ou seja, aqueles que passaram pelo protocolo com STZ, mas não receberam o tratamento com linfócitos B-1 foram ambos eutanasiados aos 29 dias, juntamente com o último lote experimental.

Os momentos de eutanásia foram decididos visando mimetizar o diagnóstico precoce da doença bem como seu estágio crônico.

A figura 1 mostra esquematicamente A) o protocolo de reprogramação metabólica de linfócitos B-1 e B) as etapas *in vivo* do experimento.

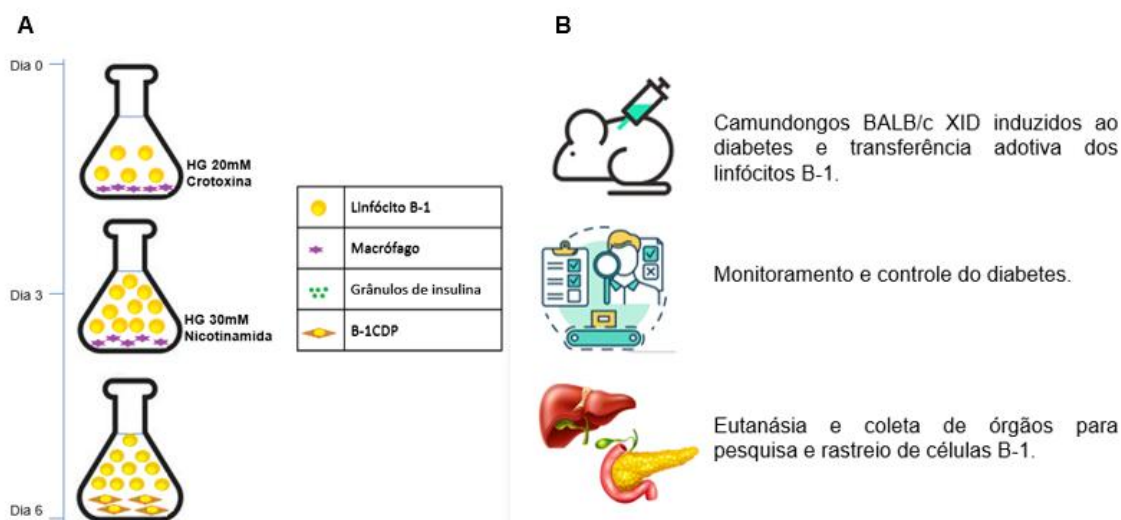


Figura 1- A) Esquema do protocolo de Reprogramação Metabólica (PRM) aplicado aos linfócitos B-1 ao longo de 6 dias de cultura, incluindo suplementação sequencial com altas concentrações de glicose (HG), crotoxina e nicotinamida, resultando na diferenciação de células B-1 produtoras de insulina. B) Delineamento experimental *in vivo* utilizando camundongos BALB/c XID induzidos ao diabetes e submetidos à transferência adotiva de linfócitos B-1, seguido de monitoramento glicêmico, eutanásia e coleta de órgãos para rastreamento celular

A Figura 2 mostra o delineamento experimental e os processos que ocorrem concomitantemente *in vivo* e *in vitro*.

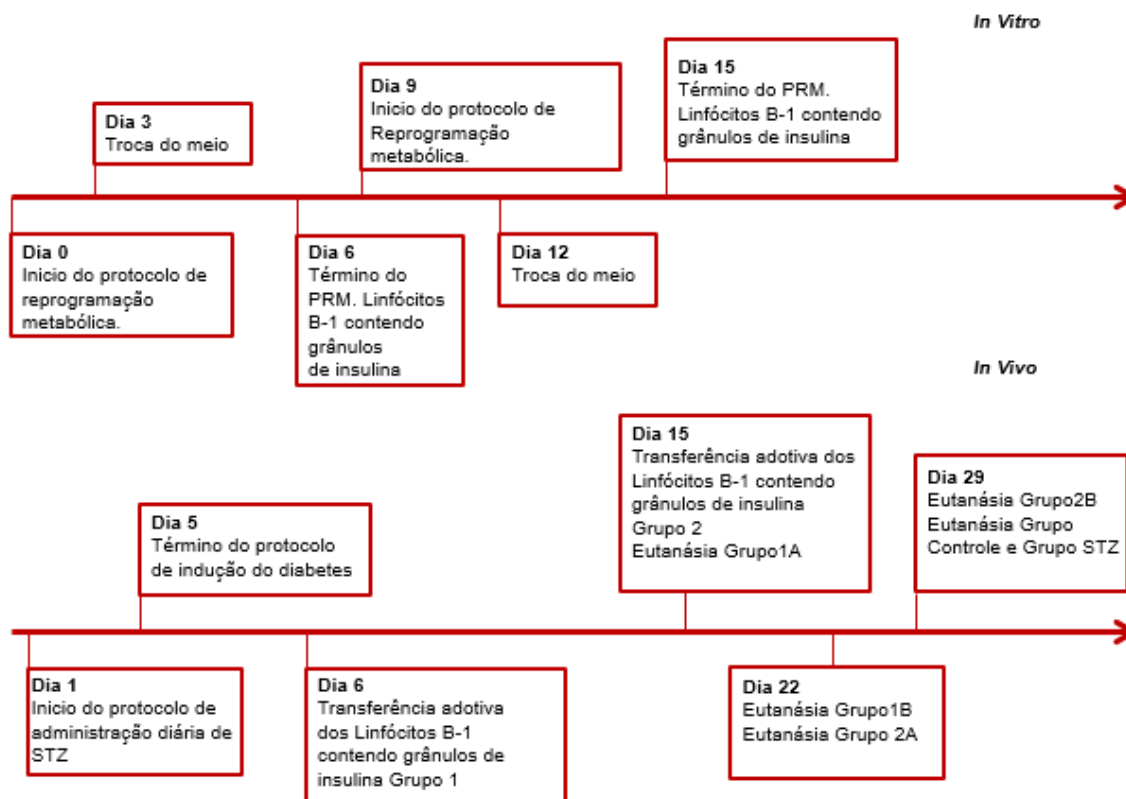


Figura 2- Delineamento experimental das etapas in vitro e in vivo, conduzidas concomitantemente. No protocolo in vitro, nos dias 0 e 9, células peritoneais aderentes são submetidas ao protocolo de reprogramação metabólica; nos dias 3 e 12, realizou-se a troca do meio; nos dias 6 e 15, linfócitos B-1 são coletados da porção não aderente da cultura para transferência adotiva em camundongos XID em momentos diferentes pós estreptozotocina (STZ). Paralelamente, no protocolo in vivo, a administração de STZ foi iniciada no dia 1 e, após injeções diárias, o protocolo de indução de diabetes finalizou no dia 5. Nos dias 6 e 15, foi realizada a transferência adotiva de linfócitos B-1 produtores de insulina para os Grupos 1 e 2, respectivamente. Então, lotes de camundongos XID foram eutanasiados para necrópsia nos dias 15 (Grupo 1A), 22 (Grupo 1B e Grupo 2A) e 29 (Grupo 2B), visando a coleta e análise dos órgãos.

3.2 Animais (BALB/c e BALB/c XID) e os Grupos Experimentais

Foram utilizados camundongos machos, de 8 a 12 semanas de idade, das linhagens BALB/c e BALB/c XID, que foram obtidos do Biotério Central do Instituto Butantan e do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais da Universidade Federal de São Paulo, respectivamente. Foram mantidos no Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Paulista com livre acesso à água e ração durante todo o período experimental e posteriormente eutanasiados por aprofundamento anestésico com isoflurano, em câmara com atmosfera saturada. Todos os procedimentos foram desenhados conforme diretrizes do CONSEA e aprovados pela CEUA UNIP sob número 8454220124 e CEUA IB sob número 6526280824.

Os 32 animais estudados foram divididos em 6 grupos, sendo eles agrupados em relação ao tempo de início do tratamento e quanto ao tempo de acompanhamento da terapia. Todos os animais estudados passaram pelo protocolo de indução diabética com STZ com exceção do Grupo Controle. O N experimental variou intragrupo, considerando as múltiplas análises realizadas.

Os animais que receberam a transferência adotiva de linfócitos B-1 um dia após o fim do tratamento com STZ foram chamados Grupo 1, os que receberam a transferência no dia da determinação da condição diabetes induzido, ou seja, no D15 foram chamados Grupo 2. Dentro dos grupos 1 e 2 os animais foram subdivididos em A e B, sendo o subgrupo A aqueles que foram analisados após 7 dias de acompanhamento pós-tratamento e o subgrupo B os que foram acompanhados por 14 dias.

A glicemia dos animais foi avaliada semanalmente e, então, lotes de animais foram eutanasiados aos 15 (Grupo 1A), 22 (Grupo 1B e 2A) e 29 (Grupo 2B) dias após o início do protocolo com STZ. O Grupo STZ foi avaliado desde o 1º dia após

o protocolo com STZ, já o Grupo Controle não recebeu o protocolo de STZ e foi eutanasiado aos 29 dias juntamente com o Grupo 2B e Grupo STZ. A figura 3 mostra esquematicamente toda essa divisão de grupos.

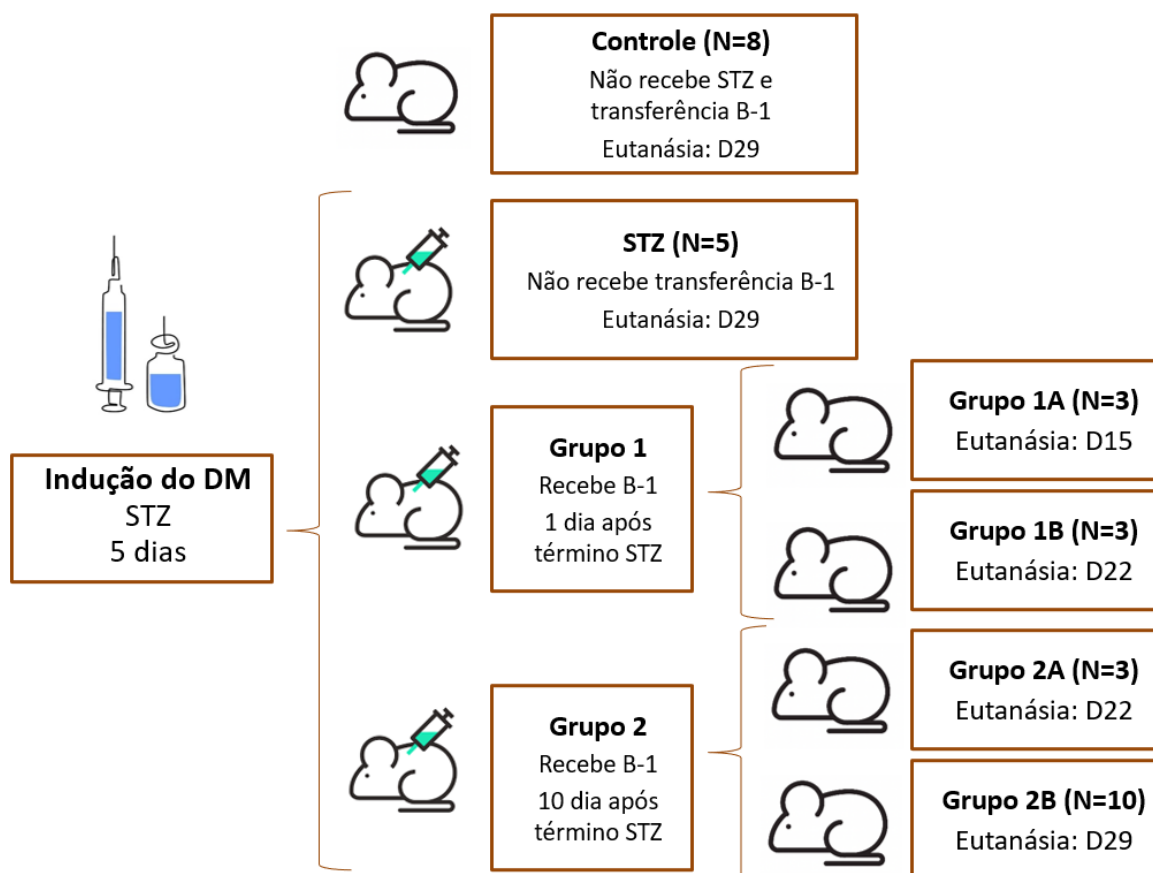


Figura 3- Divisão dos grupos e subgrupos experimentais. Com exceção do Grupo Controle, os grupos passaram pelo protocolo diário de indução do diabetes com STZ, por 5 dias. O Grupo STZ – submetido ao protocolo STZ, não recebeu transferência adotiva de linfócitos B-1 reprogramados e foram acompanhados por 29 dias (D29). Grupos 1 e 2 – submetidos ao protocolo STZ, receberam linfócitos B-1 reprogramados em D6 e D15, respectivamente e foram subdivididos em A e B quanto ao período de acompanhamento experimental. Grupos A, de análise precoce e grupo B, análise mais tardia.

3.3 Obtenção de Linfócitos B-1 da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c e aplicação do protocolo de reprogramação metabólica

Os linfócitos B-1 foram obtidos por meio da coleta de células peritoneais de camundongos BALB/c por sucessivas lavagens com 2mL de meio RPMI. Este lavado foi então cultivado por 40 minutos a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Pós incubação o sobrenadante é descartado e às células aderentes foi adicionado meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (R10) ou meio R10 suplementado com crotoxina (1,2ug/mL) e 20mM de glicose (meio *High Glucose*

HG-20mM). Após 3 dias de incubação, foi realizada a troca do meio, contendo HG-30mM acrescido de nicotinamida (10mM) e as células foram incubadas por 3 dias para otimizar a produção de grânulos de insulina. No sexto dia a porção não aderente da cultura, enriquecida em células B-1 contendo grânulos de insulina foi coletada para transferência adotiva para camundongos XID.

3.4 Análise Morfológica por Flow Imaging Microscopy (FIM)

A caracterização morfológica do inóculo de linfócitos B-1, submetidos ao PRM (ou amostras controle, cultivadas em meio R10) foi realizada por meio da técnica de Flow Imaging Microscopy (FIM), utilizando equipamento FlowCam® 8100 (Yokogawa Fluid Imaging Technologies), conforme protocolo executado em colaboração técnica especializada. Após coletadas das culturas, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 20 minutos e, então, lavadas e ressuspensas em PBS filtrado (22µm) para aquisição. Foram analisados 100uL de cada amostra, na velocidade de 150uL/minuto. As imagens de cada partícula (com tamanho entre 2µm e 1mm) foram adquiridas em câmera HD colorida, com aumento de 2x, 4x, 10x e 20x.

Os dados foram expressos em gráficos do tipo histograma (frequência *versus* tamanho celular) e imagens representativas da variedade celular presente em faixas separadas pelo tamanho.

3.5 In Vivo

3.5.1 Indução do diabetes em Camundongos XID

Os camundongos BALB/c XID foram injetados, intraperitonealmente (i.p.), com STZ, nas doses de 40mg/Kg (os camundongos foram pesados individualmente antes de cada injeção), durante cinco dias consecutivos e mantidos em jejum durante 5h antes de cada injeção. Após 10 dias do término do tratamento foram coletados aproximadamente 10µL de sangue da veia da cauda de camundongos tratados, e os valores glicêmicos foram aferidos por glicosímetro FreeStyle Optium Neo (Abbott). A condição diabetes induzido será considerada quando os animais apresentarem taxa glicêmica acima 250mg/dL.

3.5.2 Marcação de células B-1 com *cell trace FarRed*

Os reagentes CellTrace™ é facilmente difundido nas células e ligam-se às

aminas intracelulares, o que resulta na coloração fluorescente estável que pode ser fixada com fixadores de aldeído. Para marcação dos linfócitos B-1, foi seguido o protocolo indicado pelo fabricante onde foram utilizadas concentrações celulares até 10^6 células/mL. Foi adicionado 1uL do reagente CellTrace™, previamente diluído em DMSO a 10uM, em 1mL de PBS, misturando bem. Desta solução preparada para cada 10^6 células, 1mL foi adicionado ao *pellet* celular. As células foram incubadas por 20 minutos a 37°C em banho-maria. Então, foi adicionado cinco vezes o volume do meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino às células e incubados por cinco minutos. As células foram centrifugadas e ressuspensas em PBS, 100uL para cada 10^6 células, para inoculação nos camundongos XID.

3.5.3 Transferência adotiva de Linfócitos B-1 marcados ou não com cell trace FarRed

Foram ressuspensas 10^6 células B-1 ou células B-1^{FarRed+} em volume final de 100uL de PBS. Este volume foi injetado na cavidade peritoneal de camundongos XID, 1 dia após o fim do tratamento com STZ (Grupo 1) ou no dia da determinação da condição diabetes induzido (Grupo 2), ou seja, 6 ou 15 dias após o início do protocolo de STZ, respectivamente.

3.5.4 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGip)

O teste de tolerância à glicose foi realizado um dia antes da eutanásia. No dia anterior ao teste os animais passaram por jejum de 5 horas antes de ser ofertada, pelo período de 2 horas, a última refeição do dia. Então, a ração foi novamente removida e, após o jejum de 12 horas, a glicemia foi determinada pela coleta de 5uL de sangue, da cauda, utilizando glicosímetro (FreeStyle Optium Neo - Abbott) e fitas glicêmicas nos períodos: 0 (pré-estímulo) e após administração de glicose intraperitoneal (2 g/kg de massa corporal) em solução de PBS a 50% de glicose, nos tempos de 15, 30, 60 e 90 minutos. Os resultados foram apresentados como curva glicêmica nos intervalos de tempo e a área sob a curva calculada para cada animal, sendo avaliado nos respectivos grupos.

A área sob a curva (AUC) foi calculada pelo método trapezoidal, utilizada como uma medida integrada da exposição glicêmica ao longo do tempo após a administração de glicose intraperitoneal. Nesse contexto, a AUC reflete a eficiência

global dos mecanismos de regulação da homeostase glicêmica, incluindo secreção de insulina e captação periférica de glicose. Assim, menores valores de AUC indicam maior capacidade de retorno à normoglicemia após o estímulo glicêmico, caracterizando melhor tolerância à glicose, conforme descrito em protocolos experimentais para testes de tolerância à glicose em camundongos (AYALA et al., 2010; ANDRIKOPOULOS ET AL., 2008).

3.5.5 Necrópsia e coleta dos órgãos

Os animais foram eutanasiados pelo aprofundamento anestésico inalatório, em ambiente atmosférico saturado com isoflurano, até completa parada cardiorrespiratória. As células peritoneais foram obtidas por sucessivas lavagens peritoneais com 2mL de meio RPMI (Sigma, St Louis, MO, USA), centrifugadas e re-suspensas em 100µL de PBS contendo 2% de soro fetal bovino. O abdome foi aberto e então os órgãos: baço, fígado e pâncreas foram removidos com auxílio de tesoura e pinça e processados conforme detalhado a seguir.

3.5.6 Histopatologia

Após o processo de fixação em formalina tamponada a 10% por 72 horas, os tecidos passaram por desidratação em gradiente crescente de etanol (70% a 100%) e, em seguida, incluídos em parafina. Posteriormente, os órgãos foram seccionados em cortes de 3 a 5 µm utilizando micrótomo, sendo os fragmentos obtidos montados em lâminas de vidro estéreis. As amostras foram então submetidas à desparafinização em xilol, reidratadas e coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina (H&E), permitindo a avaliação da morfologia celular. As lâminas foram devidamente identificadas e armazenadas em condições apropriadas até a análise microscópica. Por fim, as lâminas foram observadas em fotomicroscópio óptico Opticam® acoplado à câmera digital OPUHDV14,3MP e por fotomicroscópio Olympus® Bx41 acoplado à câmera digital Olympus SC30 obtendo-se imagens digitalizadas para documentação dos achados. Posteriormente, as imagens de ilhotas pancreáticas foram analisadas em software Image J para determinação da área e perímetro de cada ilhota. Os dados foram expressos como média do grupo.

3.5.7 Rastreio de células B-1 no baço, pâncreas e fígado pela expressão do FarRed usando a técnica de *print*

Após coletados conforme descrito anteriormente, baço, fígado e pâncreas foram suavemente pressionados sobre lâminas de vidro estéreis para obtenção dos *prints* teciduais. Em seguida, as lâminas foram acondicionadas em ambiente protegido da luz e analisadas em microscópio de fluorescência para detecção do marcador CellTrace™ FarRed previamente incorporado aos linfócitos B-1 antes da transferência adotiva.

As imagens foram adquiridas em microscópio confocal Leica TCS SP8 (Leica Microsystem), alocado no Núcleo de Microscopia Confocal da UNIFESP, Campus Diadema. E avaliadas quanto à presença, distribuição e intensidade do sinal fluorescente nos diferentes órgãos. As imagens foram comparadas às obtidas em campo claro/DIC, permitindo correlação entre o sinal fluorescente e as estruturas teciduais observadas.

3.5.8 Análise das populações de células B-1 presentes na cavidade peritoneal, baço e fígado, por citometria de fluxo

Após o *print*, o baço foi dividido e metade foi dissociado mecanicamente com uso do êmbolo de uma seringa de 10mL em PBS-SFB 2%. A amostra foi aspirada e passada em *cell strainer* de 70 µm e acondicionada em gelo, em tubo Falcon de 15mL. O maior lobo do fígado foi fragmentado em cubos de 2mm² e posteriormente dissociado mecanicamente com o auxílio de sistema para desagregação mecânica automatizada BD™ Medimachine (BD Biosciences, San Jose, USA). O lisado celular foi ressuspensionado em PBS-SFB2% e passado em *cell strainer* de 70 µm. Amostras de baço e fígado foram centrifugadas durante 5 minutos a 2000rpm, o sobrenadante foi descartado, ao *pellet* foi adicionado tampão hemolítico, para remoção das hemácias, incubado por 2 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, acrescentado 10mL de PBS-SFB 2%, para bloqueio da ação hemolítica. As amostras foram centrifugadas por 5 min a 2000 rpm. Foi, então, realizado o descarte do sobrenadante e transferidos 30uL do *pellet* celular para um tubo de 1,5mL e mantido no gelo até o início da imunomarcagem.

As amostras de lavado peritoneal, baço e fígado (já processados para hemólise) foram centrifugadas a 2000rpm por 5 minutos, ressuspensas em tampão MACS (PBS 1%, 0,5% BSA e 2 mM EDTA) e o *pellet* celular incubado previamente

com anti-CD16/CD32 para bloqueio dos receptores de Fcγ II e III, a 4 ° C por 20 minutos. Após incubação, as células foram lavadas e ressuspensas novamente em tampão MACS e cada alíquota incubada com os anticorpos monoclonais adequados para análise dos marcadores de superfície por 30 minutos a 4°C. Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: Nas amostras do fígado foram utilizados anticorpo monoclonal anti-CD45 conjugado com Isotiocianato de Fluoresceína (CD45 FITC), Anticorpo monoclonal anti-CD23 marcado com ficoeritrina (CD23 PE), Anticorpo monoclonal anti-CD11b conjugado ao fluorocromo PerCP (CD11b PerCP) e Anti-CD19 conjugado à aloficocianina (CD19 APC). Para as amostras de peritônio e baço os anticorpos utilizados foram anti-CD23 conjugado à fluoresceína (CD23 FITC), anti-CD19 conjugado à ficoeritrina (CD19 PE) e anti-CD11b conjugado à aloficocianina (CD11b APC). As células foram lavadas em tampão MACS e ressuspensas em 200µL de PBS para aquisição em citômetro de fluxo BD Accuri C6Sampler (BD Biosciences, Mountain View, CA). Amostras de baço e fígado foram previamente filtradas (filtro integrado à tampa do tubo de 5mL, feito em nylon, 40µm) para remoção de restos teciduais. Os dados obtidos foram analisados em Software FlowJo v8.1 (BD Biosciences, Mountain View, CA) e os dados numéricos percentuais das populações foram plotados em gráficos como média do grupo.

3.5.9 Marcação de grânulos de insulina pela técnica de imunofluorescência

Células peritoneais aderentes ou células B-1 recultivadas foram fixadas em lamínulas com álcool metílico por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram hidratadas com lavagens em PBS. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com solução PGN (0,2% de gelatina e 0,1% de azida em PBS), seguida da permeabilização da membrana plasmática com solução PGN contendo 0,2% de saponina por 30 minutos. As células foram então incubadas overnight a 4°C com anticorpo primário anti-insulina conjugado à Alexa Fluor 488 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Após lavagens em PBS, as lamínulas foram montadas com DAPI-Fluoroshield™ (Sigma-Aldrich) e analisadas em microscópio confocal Leica TCS SP8 (Leica Microsystem), alocado no Núcleo de Microscopia Confocal da UNIFESP, Campus Diadema. Agradecemos ao prof Dr Wagner Luiz Batista, Professor Associado do Departamento de Ciências Farmacêuticas, que gentilmente nos recebeu na UNIFESP e ao técnico Wilson, pela

aquisição das imagens.

3.5.10 Análise Estatística

Os dados foram organizados e analisados utilizando o software GraphPad Prism versão 11.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para análise do teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGip) foi utilizada análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA), seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. As análises da área sob a curva (AUC) e da distribuição de linfócitos B-1 por citometria de fluxo foram realizadas por análise de variância de uma via (One-way ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, sendo considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

A glicemia foi aferida em D15, dia em que foi diagnosticada a condição diabética e, semanalmente, durante todo o período de observação experimental (D22 e D29), a fim de acompanhar a evolução do quadro hiperglicêmico e efeitos associados à transferência adotiva de linfócitos B-1 reprogramados metabolicamente. Os gráficos a seguir apresentam a evolução desses valores (Figura 4).

Dos 26 animais que passaram pela indução de diabetes via STZ, apenas 1 não se tornou diabético durante todo o período de observação e foi excluído das análises relacionadas ao diabetes induzido. Outros 3 animais apresentaram glicemia abaixo de 250 mg/dL em D15, porém atingiram critério glicêmico compatível com diabetes em D22. Dos 26 animais, 6 receberam linfócitos B-1 em D6 e 4 não estavam diabéticos em D15, 1 do grupo 1A e 3 do grupo 1B.

No grupo experimental 1A tratado precocemente, em D6, a determinação do diagnóstico de diabetes coincidiu com o fim do período experimental (D15). Os valores glicêmicos aferidos mostraram que o animal C1A-2 não estava diabético nesta data. Já os outros animais deste grupo (C1A-1 e C1A-3) estavam diabéticos neste dia (Figura 4C).

Do grupo 1B, apenas 1 animal mostrou aumento da glicemia entre D15 e D22 (C1B-3), indicando ausência de controle glicêmico nesse período inicial pós-tratamento com linfócitos B-1 (Figura 4D). Entretanto, os outros dois animais deste mesmo grupo apresentaram glicemias abaixo de 250mg/dL tanto em D15 quanto em D22, ou seja, abaixo do critério adotado para diabetes, durante o período observado (Figura 4D).

Em D15, após a determinação da condição diabetes, 13 animais receberam a transferência de linfócitos B-1 PRM, constituindo o grupo 2. O Grupo 2A, representado na Figura 4E, foi observado até D22, uma semana após o tratamento e, nele, observa-se valores acima de 250mg/dL até o final do período de observação.

O Grupo 2B mostrou flutuação individual entre os animais, em D15 apenas 1 animal estava com glicemia limítrofe (248mg/dL, C2B-5), porém tornou-se diabético e permaneceu com glicemia alta até o fim da observação experimental. Em D22 os animais C2B-2, C2B-3 e C2B-9 apresentaram valores glicêmicos de 213

mg/dL, 229mg/dL e 183mg/dL respectivamente, enquanto os demais apresentaram valores superiores a 250mg/dL. Em D29 o animal C2B-4 apresentou regulação da glicemia (158mg/dL), além da manutenção de valores abaixo do limiar nos animais C2B-2 e C2B-3 (Figura 4F). Sendo assim, dos 10 animais do Grupo 2B, 3 apresentaram controle glicêmico que perdurou durante o período observacional.

O Grupo Controle (CTRL) não recebeu a STZ, representado na Figura 4A, e todos os animais apresentaram normoglicemia em D29, momento da eutanásia deste grupo. No Grupo STZ, Figura 4B, ou seja, o grupo que passou pelo protocolo de indução do diabetes com STZ por 5 dias, mas ao longo do experimento não recebeu transferência celular, a glicemia apresentou elevação progressiva ao longo do período experimental, com valores mais altos observados no dia 29, na maioria dos animais, demonstrando a manutenção do estado hiperglicêmico e a ausência de melhora espontânea.

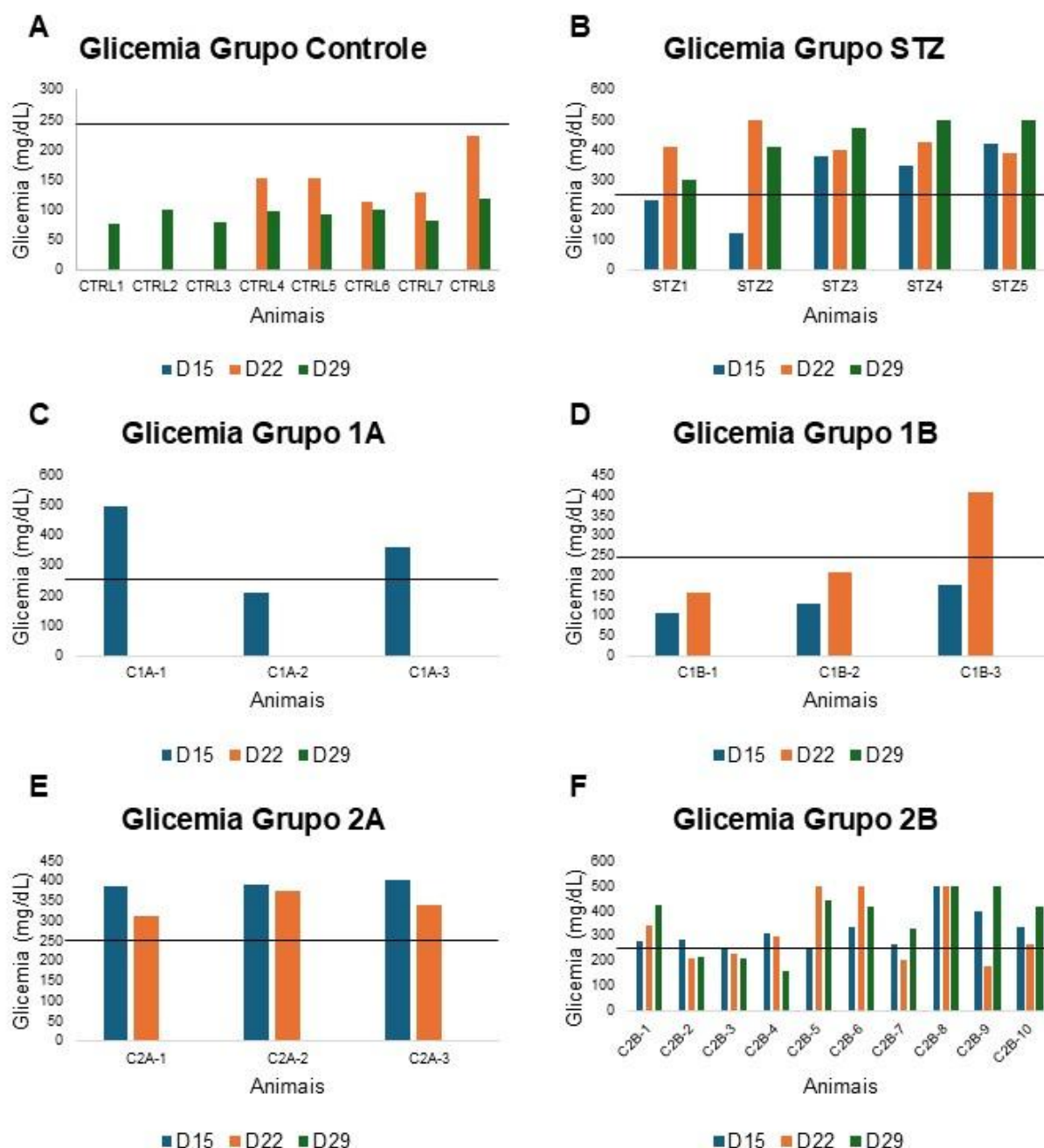


Figura 4 - Evolução da glicemia de animais submetidos ou não à indução do diabetes por estreptozotocina (STZ; D1 a D5) e transferidos adotivamente com linfócitos B-1 produtores de insulina nos dias 6 ou 15, com acompanhamento glicêmico realizado nos dias 15 (D15), 22 (D22) e 29 (D29). A) Grupo Controle. B) Grupo STZ. C) Grupo 1A; transferido adotivamente em D6 e acompanhado até D15. D) Grupo 1B; transferido adotivamente em D6 e acompanhado até D22. E) Grupo 2A; transferido adotivamente em D15 e acompanhado até D22. F) Grupo 2B; transferido adotivamente em D15 e acompanhado até D29. C= camundongo. D= dias. A linha horizontal indica o valor de referência para a indução efetiva de diabetes

Os níveis de glicemia apontados acima demonstraram que a resposta ao tratamento foi bastante variável entre os grupos. Deste modo, a partir daqui os resultados serão apresentados como média do grupo e, também, individualmente

quando fizer sentido. Assumimos que a média do grupo pode não refletir dados importantes, que podem se correlacionar com o sucesso ou não da transferência celular adotiva. Para melhor compreensão e associação dos possíveis efeitos causados pela transferência adotiva, animais que tiveram a glicemia abaixo de 250mg/dL ao final da observação experimental serão chamados de respondedores e, aqueles que não apresentaram controle glicêmico, não-respondedores.

O peso corporal dos camundongos foi acompanhado como parâmetro de monitoramento metabólico e do estado geral de saúde dos animais após a indução do diabetes e da transferência adotiva de linfócitos B-1 reprogramados metabolicamente. A pesagem dos animais foi realizada diariamente durante o protocolo de indução com STZ e, após os cinco dias, foi realizada semanalmente até o final da observação experimental, conforme os gráficos a seguir.

De modo geral, os grupos apresentaram redução inicial do peso corporal nos primeiros dias durante a administração de STZ (D1 a D5), compatível com o impacto metabólico da STZ (Figura 5A). No Grupo 1B, apesar da queda ponderal inicial até D6, houve recuperação progressiva até D22. Já nos grupos 2A e 2B, mesmo após a transferência de linfócitos B-1 produtores de insulina em D15, o peso dos animais seguiu diminuindo até D22 e D29, respectivamente.

No grupo 1A (Figura 5B), vale ressaltar o comportamento individual. Os animais C1A-1 e C1A-3 apresentaram maior variação entre o peso final e inicial, apresentando 4,25g e 4,92g a menos de peso respectivamente. Já o animal C1A-2, apresentou neste grupo uma menor variação da relação peso final menos o peso inicial, sendo essa diferença de menos 1,18g, esse mesmo animal apresentou recuperação do peso entre os dias 6 e 15, período que ocorreu o recebimento dos linfócitos B-1.

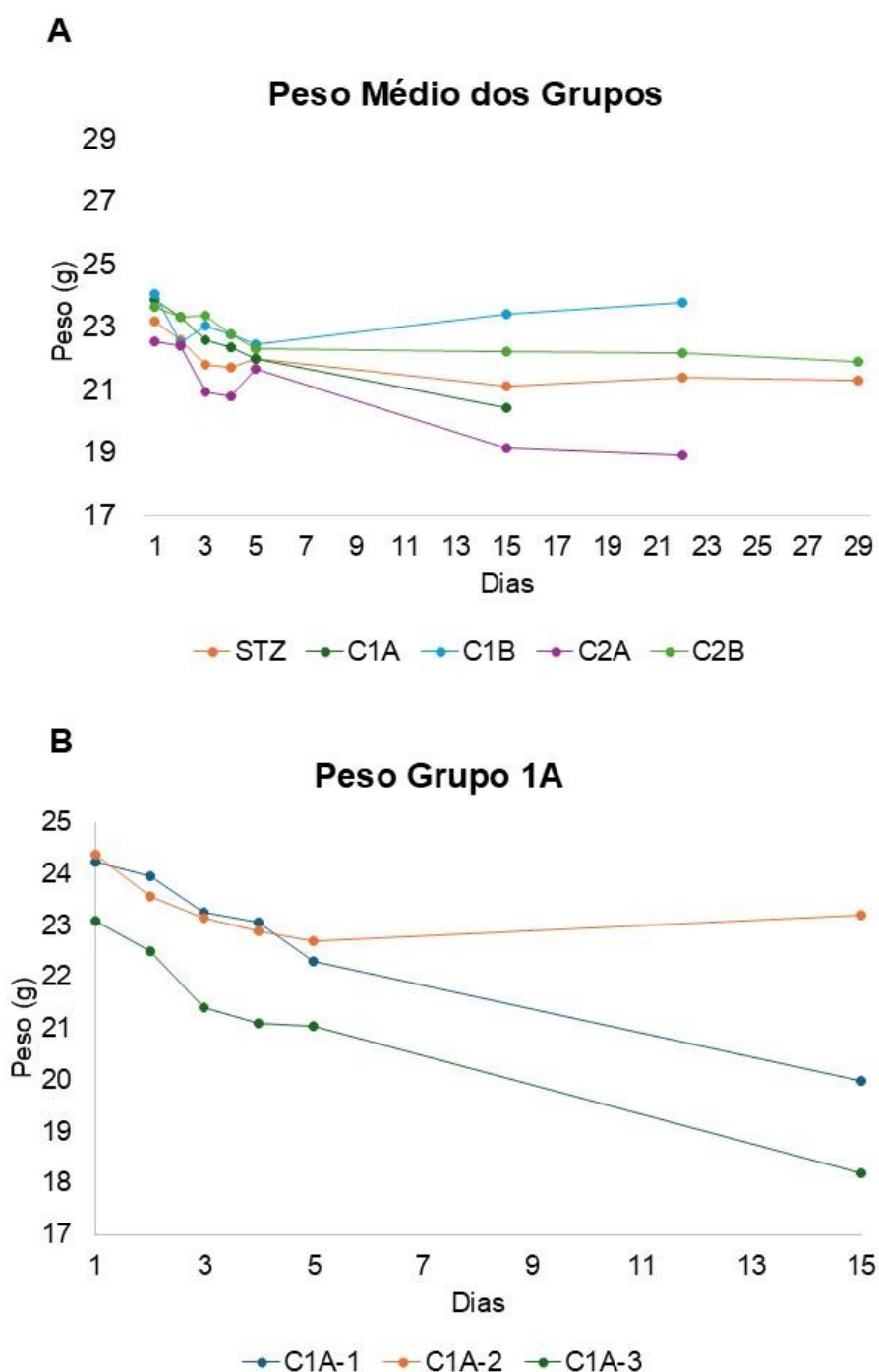


Figura 5 - Evolução do peso de animais submetidos ou não à indução do Diabetes por estreptozotocina (STZ; D1 a D5) e à transferência adotiva de linfócitos B-1 produtores de insulina nos dias 6 ou 15, com acompanhamento realizado nos dias 15 (D15), 22 (D22) e 29 (D29), aferido durante todo o período experimental. A) Peso médio dos grupos estudados. B) Grupo 1A; transferido adotivamente em D6 e acompanhados até D15.

A indução de diabetes em camundongos XID já havia sido padronizada anteriormente, com ótima eficiência de indução (ALVARES-SARAIVA ET AL, 2015). Aqui, alguns animais não apresentaram glicemia acima de 250mg/dL e D15,

incluindo animais tratados com linfócitos B-1 reprogramados e animais que foram injetados com STZ e não receberam a transferência adotiva de linfócitos B-1. Este fato levantou a hipótese desses níveis glicêmicos abaixo de 250mg/dL estarem associados ou não ao efeito da terapia com linfócitos B-1. Deste modo, para avaliar a capacidade desses animais de metabolizar a glicose, foi realizado o teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGip), que avalia os valores glicêmicos aos 0, 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração intraperitoneal de uma sobrecarga de glicose.

No grupo STZ observou-se elevação acentuada da glicemia já aos 15 minutos após a administração de glicose, atingindo valores próximos ao limite máximo de detecção do glicosímetro (~500 mg/dL). Embora tenha ocorrido discreta redução ao longo do teste, os níveis glicêmicos permaneceram elevados até os 90 minutos, caracterizando intolerância à glicose e manutenção da hiperglicemia durante todo o período experimental. A análise estatística da curva glicêmica média demonstrou diferença significativa entre esse grupo e o grupo Controle (saudável) aos 15 ($p<0,01$) e 30 ($p<0,01$) minutos, confirmando a alteração metabólica induzida pela estreptozotocina (Figura 6A).

O grupo G1B apresentou perfil glicêmico distinto do grupo STZ. Embora tenha ocorrido aumento inicial da glicemia entre 15 e 30 minutos, observou-se redução progressiva nos tempos subsequentes, com retorno para valores próximos ao basal aos 90 minutos. Individualmente, os animais respondedores C1B-1 e C1B-2 apresentaram melhor controle glicêmico dentro do grupo, com retorno da glicemia para valores inferiores a 250 mg/dL ao final do teste (Figura 6B).

O grupo G2B apresentou comportamento intermediário entre os grupos Controle e STZ (Figura 6B). Embora alguns animais tenham demonstrado redução parcial da glicemia ao final do teste, a maior parte do grupo manteve valores elevados durante os tempos intermediários, indicando resposta insuficiente à sobrecarga glicêmica (Figura 6B). Os animais respondedores C2B-4 e C2B-7 apresentaram redução da glicemia para valores inferiores a 250 mg/dL aos 90 minutos; entretanto, suas curvas glicêmicas permaneceram amplas nos tempos anteriores, refletindo controle metabólico incompleto (Figura 6B).

O animal respondedor C1B-1 apresentou a menor AUC de todo o estudo (18.262,5), seguido pelo animal C1B-2 (20.737,5), também respondedor (Figura 6B), corroborando os achados observados na curva glicêmica individual e

reforçando o efeito benéfico do tratamento precoce. Em contraste, os animais do grupo STZ apresentaram AUCs superiores a 37.000, associadas à manutenção prolongada de glicemias extremamente elevadas durante o TTGip.

A comparação estatística das AUCs médias entre os grupos (Figura 6C) demonstrou aumento significativo da área sob a curva no grupo STZ em relação ao grupo Controle ($p < 0,001$), confirmando a intolerância glicêmica induzida experimentalmente. O grupo G1B também apresentou diferença significativa em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$), porém com valores de AUC inferiores aos observados no grupo STZ, indicando controle glicêmico parcial após a transferência celular. Já o grupo G2B apresentou AUC significativamente maior que o grupo Controle ($p < 0,0001$), mantendo perfil compatível com intolerância glicêmica persistente (Figura 6C).

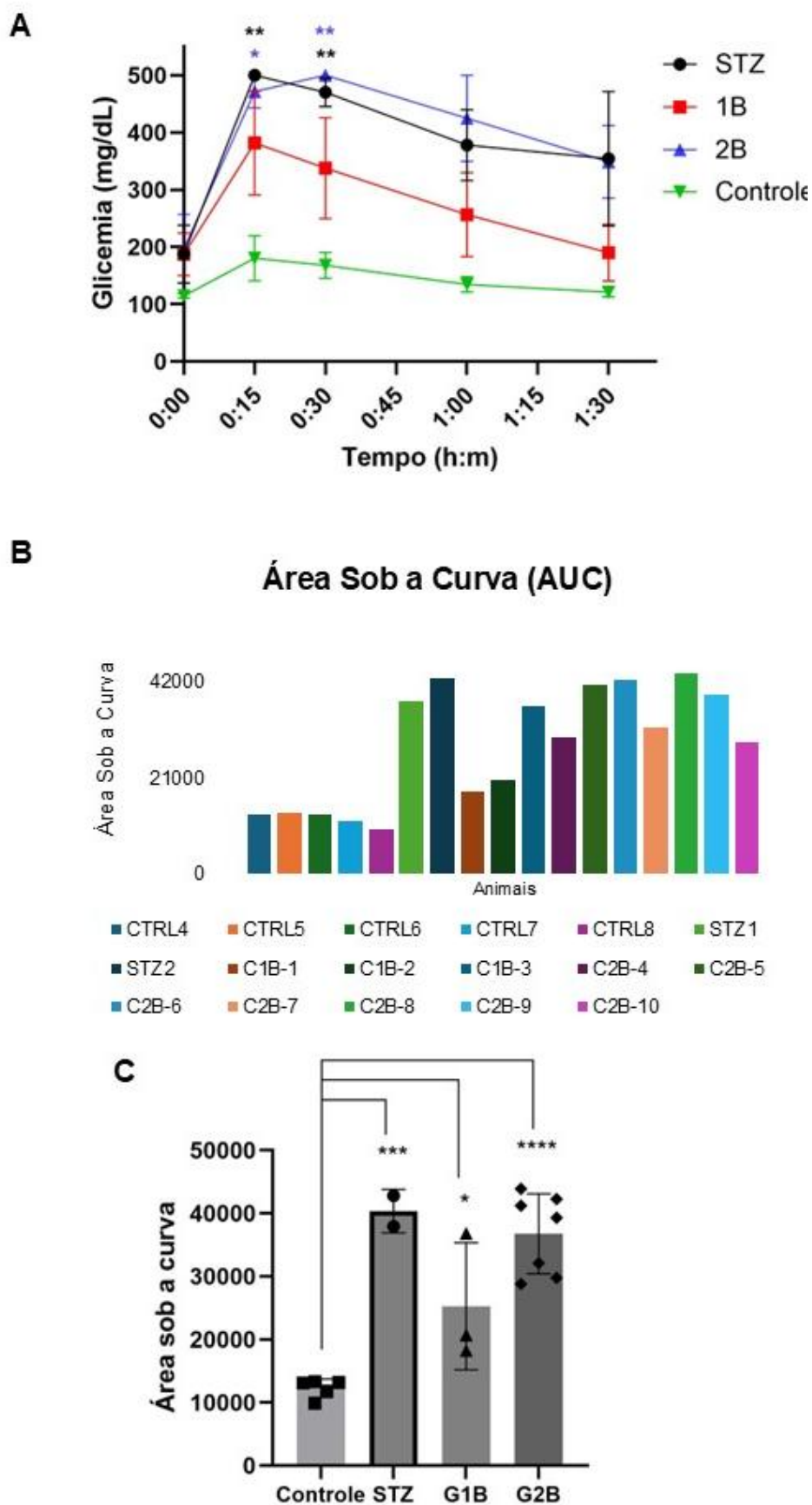


Figura 6 - Gráfico do Teste de Tolerância a Glicose intraperitoneal com controle inicial, 15, 30, 60 e 90 minutos. A) Média dos valores glicêmicos por grupo B) Área Sob a Curva

individual. C) Média dos valores de AUC por grupos.

Ao final do período experimental, representantes dos grupos: controle, STZ, G1 e G2, foram submetidos a avaliação das populações de linfócitos B-1 CD19⁺CD23⁻ presentes no lavado peritoneal, fígado e baço. Inicialmente, as populações de linfócitos foram determinadas pelas características de menor tamanho (FSC) e menor complexidade (SSC) no baço (Figura 7A) e no lavado peritoneal (Figura 7B) ou a marcação pan-leucocitária CD45⁺ no fígado definiu a população de leucócitos (Figura 7C), por citometria de fluxo.

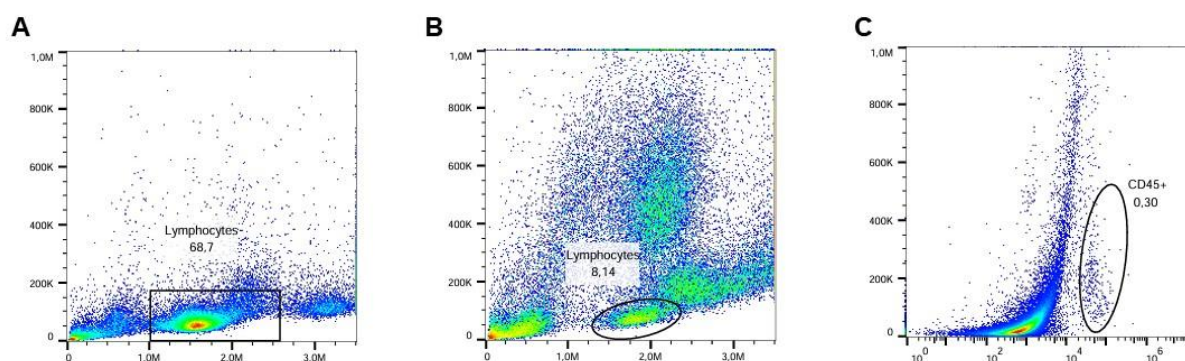


Figura 7- Seleção das populações de linfócitos em A) baço e B) peritônio de acordo com os parâmetros SSC versus FSC e leucócitos no C) fígado, de acordo com a presença de CD45, extraídos de camundongos XID submetidos à estreptozotocina e transferidos adotivamente.

As populações de linfócitos B-1 nos diferentes órgãos foram determinadas pelo fenótipo CD19⁺CD23⁻ a partir dos *gates* de linfócitos ou leucócitos no peritônio, baço e fígado. Na cavidade peritoneal observou-se maior variabilidade individual entre os animais dos grupos tratados, porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados. Conforme esperado, não foi vista a população de linfócitos B-1 no grupo controle. O grupo STZ apresentou média de 1,04% de células B-1, enquanto os grupos G1B e G2B apresentaram médias de 12,05% e 10,43%, respectivamente, demonstrando a eficiência da transferência adotiva. Apesar da tendência de aumento nos grupos tratados, especialmente em relação ao grupo STZ, a análise estatística não demonstrou significância ($p > 0,05$) (Figura 8A).

No baço, foi observada redução significativa da população de linfócitos B-1 nos grupos tratados em comparação ao grupo STZ. O grupo STZ apresentou média de 6,34% de células B-1, enquanto os grupos G1B e G2B apresentaram médias de 2,32% e 1,54%, respectivamente. A comparação estatística demonstrou diferença

significativa entre STZ e G1B ($p=0,0009$) e entre STZ e G2B ($p=0,0003$), enquanto não houve diferença significativa entre os grupos tratados ($p>0,05$) (Figura 8B).

No fígado, o grupo STZ apresentou média de 7,26% de linfócitos B-1, enquanto os grupos G1B e G2B apresentaram médias de 3,96% e 2,92%, respectivamente. Embora tenha sido observada tendência de redução da população de células B-1 nos grupos tratados, as diferenças entre os grupos não atingiram significância estatística ($p>0,05$).

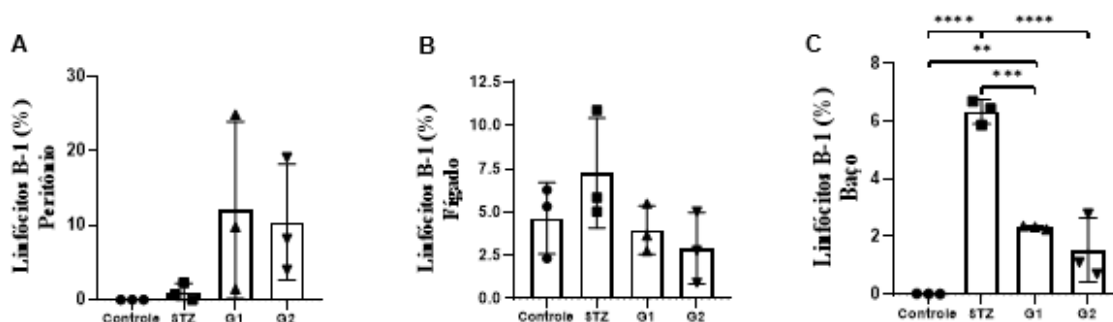


Figura 8 - Distribuição da população de linfócitos B-1, por citometria de fluxo, nos diferentes órgãos dos animais submetidos ou não à indução do Diabetes por estreptozotocina (STZ) e à transferência adotiva de linfócitos B-1 produtores de insulina nos dias 6 (Grupo 1- G1) ou 15 (Grupo 2- G2) ou seus controles, que não passaram por nenhum procedimento prévio. Frequência de linfócitos B-1 no A) peritônio, B) baço e C) fígado, dos grupos Controle, STZ, G1B e G2B.

A análise individual de animais respondedores e não respondedores revelou um padrão intrigante no Grupo 1. No peritônio, as células B-1 estavam presentes nos animais não-respondedores C1A-1 (5%) e C1A-3 (18%), já o animal respondedor C1A-2 não apresentou esta população (Figura 9). Enquanto no fígado, o percentual de linfócitos B-1 foi de 5,49% no animal respondedor C1A-2 contra 2,75%, e 3,64%, respectivamente, nos animais C1A-1 e C1A-3, não respondedores (Figura 9). É importante ressaltar que esse padrão não se repetiu no grupo 2, já que o animal não respondedor C2B-8 foi o que apresentou maior percentual de linfócitos B-1 no peritônio (19,1%) (*dado individual não mostrado*).

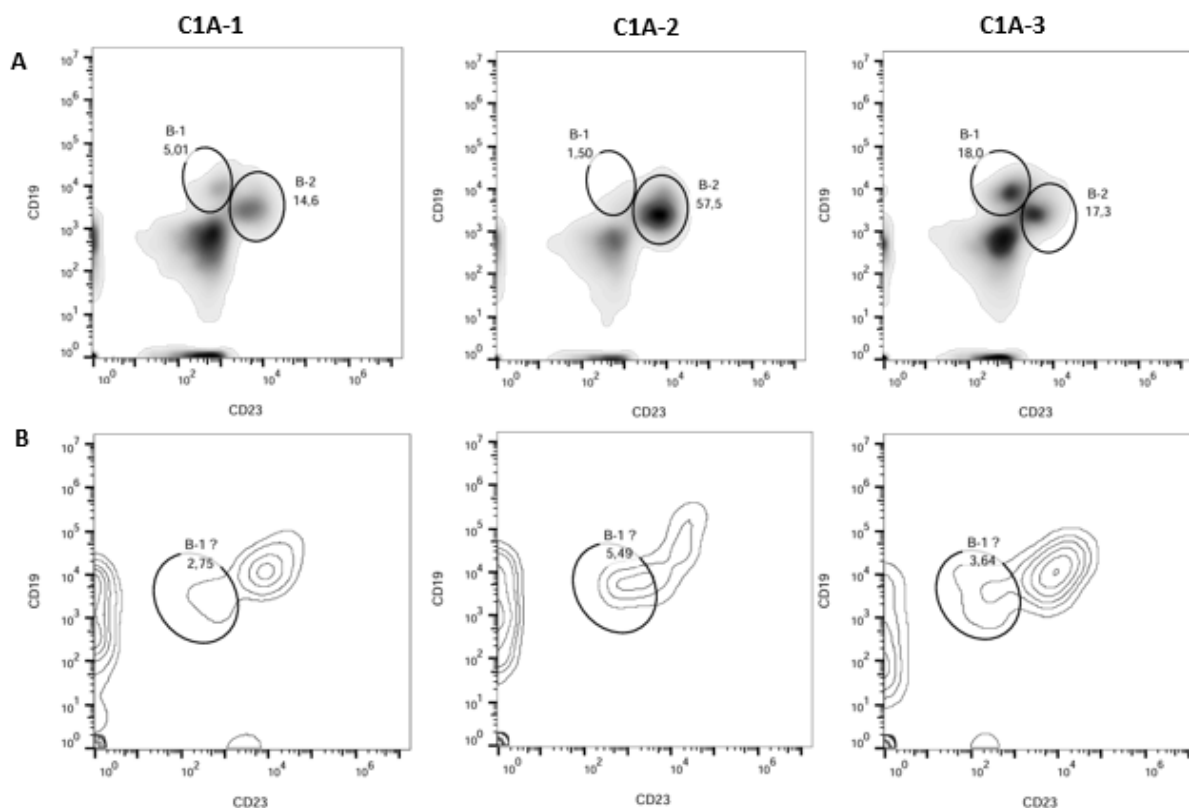


Figura 9 – Análise por citometria de fluxo dos linfócitos B-1 obtidos da A) cavidade peritoneal e B) fígado de camundongos XID submetidos à indução do diabetes por estreptozotocina (STZ) e à transferência adotiva de linfócitos B-1 em D6. Os gráficos representam a expressão de CD19 *versus* CD23. Linfócitos B-1 foram destacados segundo as populações com fenótipo CD19⁺CD23⁻ em cada órgão, a partir da população de linfócitos ou leucócitos.

A fim de rastrear a migração das células B-1 transferidas adotivamente para a cavidade peritoneal de camundongos XID induzidos ao diabetes com STZ, os animais C2B-1, C2A-2 e C2A-3 receberam a transferência adotiva de linfócitos B-1 previamente marcados com *cell trace FarRed* e, então, após o término do período experimental de cada grupo específico, o fígado, baço e pâncreas dos animais foram coletados, pressionados sobre uma lâmina de vidro e após preparação adequada, levados ao microscópio de fluorescência para pesquisa da presença de células B-1^{FarRed+}.

A análise por microscopia confocal foi conduzida utilizando dois modos distintos de observação. O primeiro modo, a Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial (DIC), possibilitou visualizar células e estruturas sob incidência de luz, preservando detalhes morfológicos finos. O segundo modo, baseado em fluorescência, permitiu a detecção da emissão de luz proveniente do marcador FarRed, indicando a presença das células B-1^{FarRed+} marcadas nos

diferentes órgãos (Figura 10).

Apesar dessas limitações metodológicas, a combinação das imagens obtidas em DIC e fluorescência sugere que os linfócitos B-1 transferidos para a cavidade peritoneal podem migrar para outros órgãos, como baço (Figura 10A), fígado (Figura 10B) e pâncreas (Figura 10C).

Esses resultados são ainda preliminares e futuras análises deverão confirmar se os sinais observados são realmente derivados das células B-1 transferidas, e não artefatos do preparo.

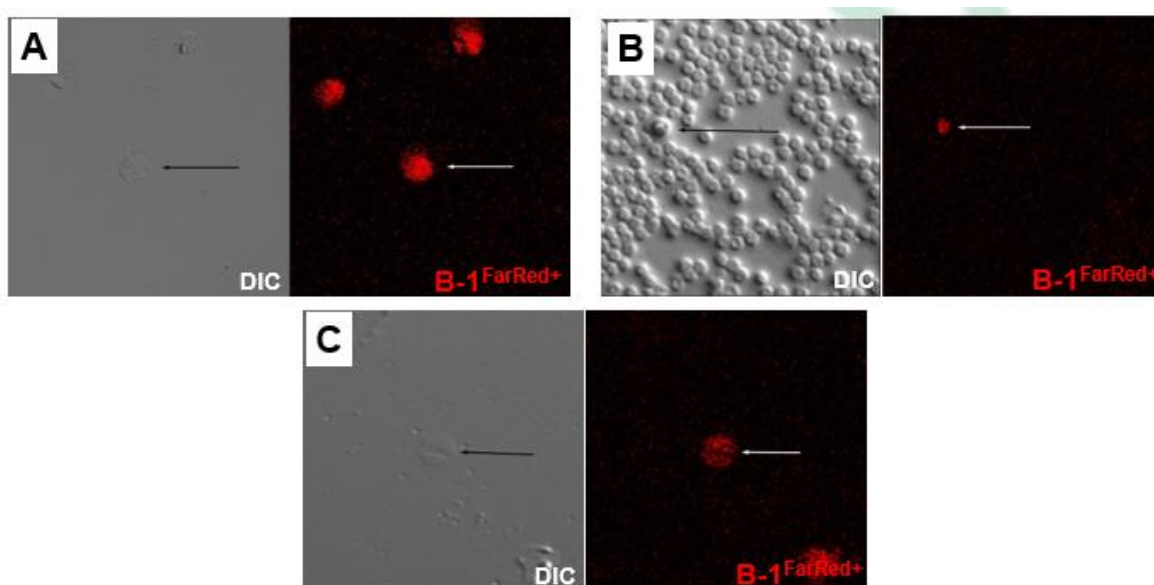


Figura 10 – Expressão da fluorescência FarRed em fotomicrografias do *print* de A) baço, B) fígado e C) pâncreas do animal C2A-3 após a transferência adotiva de linfócitos B-1 marcados com *cell trace* FarRed (B-1^{FarRed+} - vermelho). Registro em microscópio confocal Leica TCS SP8, aumento de 200x, em ganho alto. Laser excitação: 633; Emissão: 630-720. DIC= Contraste de Interferência Diferencial. Setas: indicam a mesma estrutura em DIC (pretas) e campo fluorescente (brancas).

Os órgãos foram analisados morfológicamente quanto à presença de alterações teciduais compatíveis com o processo inflamatório e alterações decorrentes da indução do diabetes por STZ, além de possíveis efeitos associados à transferência adotiva de linfócitos B-1 reprogramados metabolicamente.

No Grupo STZ, nos animais 1 (Figura 11A) e 2 (Figura 11B), observou-se preservação parcial da arquitetura pancreática, porém com presença de infiltrado inflamatório mononuclear perivascular, evidenciado por agregados celulares adjacentes aos vasos sanguíneos pancreáticos, sugerindo processo inflamatório compatível com o modelo experimental de diabetes induzido. As ilhotas pancreáticas apresentaram-se identificáveis, porém com discreta desorganização

tecidual em algumas áreas.

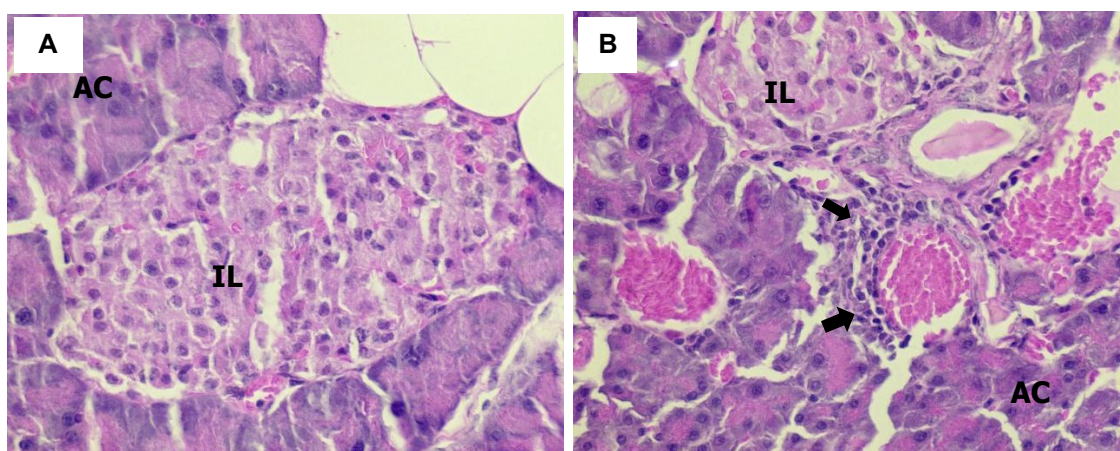


Figura 11 – Fotomicrografia de pâncreas dos animais submetidos ao protocolo para indução de diabetes com STZ. A) Animal STZ1. B) Animal STZ2. AC: Ácino pancreático. IL: Ilhotas de Langerhans. Setas: Infiltrado mononuclear perivascular. Coloração H.E. Aumento 200x

No grupo 1A, representado na Figura 12, transferidos precocemente com linfócitos B-1 reprogramados metabolicamente e avaliado em D15, foram observadas diferenças morfológicas entre os animais respondedores e não-respondedores. O animal respondedor C1A-2 (Figura 12A) apresentou degeneração vacuolar em células do epitélio acinar pancreático. O animal não-respondedor C1A-1 (Figura 12B) apresentou alterações compatíveis com dano pancreático associado à hiperglicemia persistente, com discreta desorganização do parênquima pancreático. Apesar da presença dessa alteração degenerativa, as ilhotas pancreáticas permaneceram preservadas morfolologicamente.

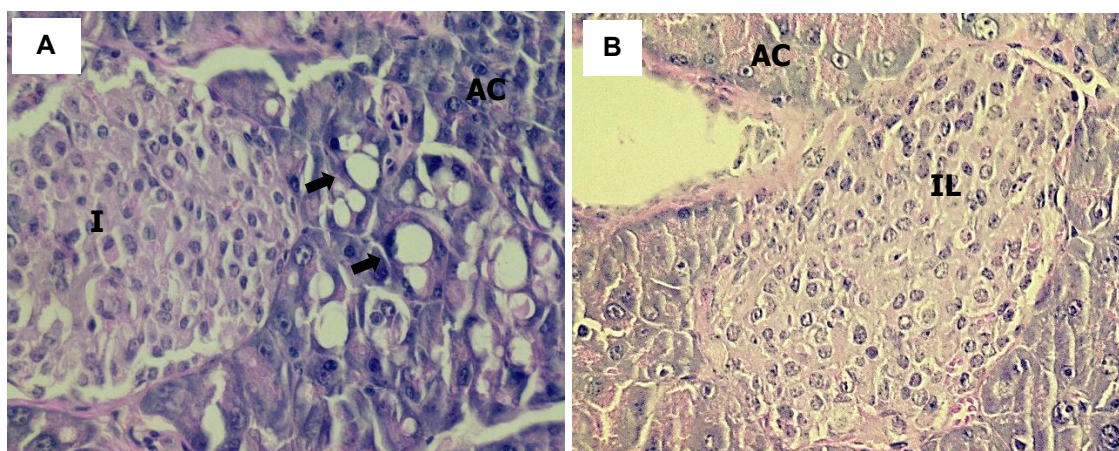


Figura 12 – Fotomicrografia de pâncreas dos animais submetidos à indução de diabetes por STZ, transferidos adotivamente com linfócitos B-1 reprogramados em D6 e avaliados em D15. A) Animal C1A-2. B) Animal C1A-1. AC: Ácino pancreático. IL: Ilhotas de Langerhans. Setas: Degeneração vacuolar em epitélio acinar pancreático. Coloração H.E. Aumento 200x

Nos animais do Grupo 1B, tratados em D6 e acompanhados até D22, foram observados achados histológicos compatíveis com resposta inflamatória moderada e alterações estruturais discretas nas ilhotas pancreáticas. O animal C1B-2 (Figura 13A) apresentou ilhotas pancreáticas atróficas representadas pelas setas, sugerindo redução da massa endócrina pancreática, embora tenha mantido valores glicêmicos compatíveis com normoglicemia durante o acompanhamento experimental. O animal respondedor C1B-1 (Figura 13B) demonstrou infiltrado leucocitário mononuclear perivascular focal (Figura 13B), sem destruição acentuada da arquitetura pancreática.

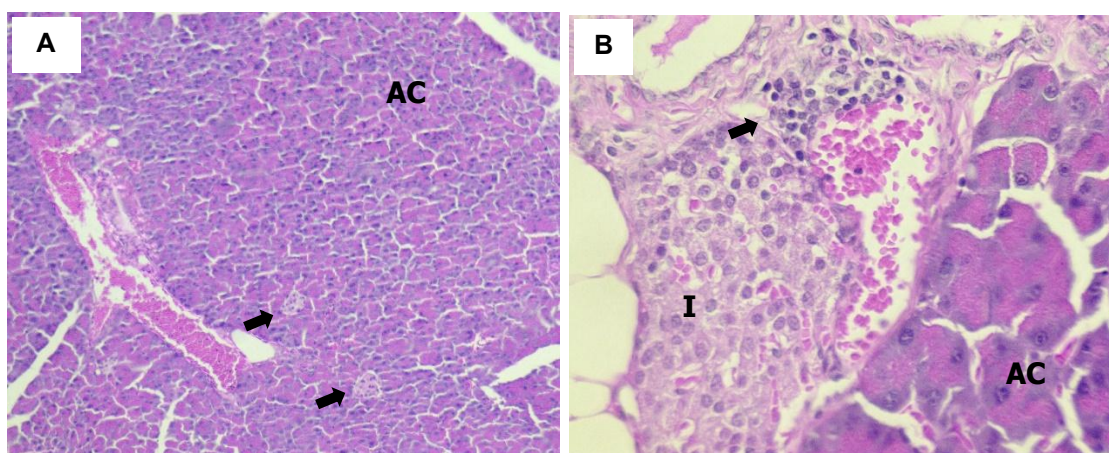


Figura 13 – Fotomicrografia de pâncreas de animais submetidos à indução de diabetes por STZ, transferidos adotivamente com linfócitos B-1 em D6 e avaliados em D22. A) Animal C1B-2. Setas: Ilhotas atróficas. Aumento 100x. B) Animal C1B-1. Seta: Infiltrado leucocitário mononuclear perivascular, Aumento 400x. AC: Ácino pancreático. IL: Ilhotas de Langerhans. Coloração H.E.

No Grupo 2B (Figura 14), tratado após confirmação do diabetes induzido, foram observadas alterações histopatológicas mais heterogêneas. Os animais respondedores C2B-2 (Figura 14A) e C2B-3 (Figura 14B) apresentaram relativa preservação das ilhotas pancreáticas e da arquitetura acinar. Em contraste, os animais não respondedores C2B-5 (Figura 14C) e C2B-6 (Figura 14D) demonstraram infiltrado leucocitário mononuclear, associado à desorganização tecidual focal.

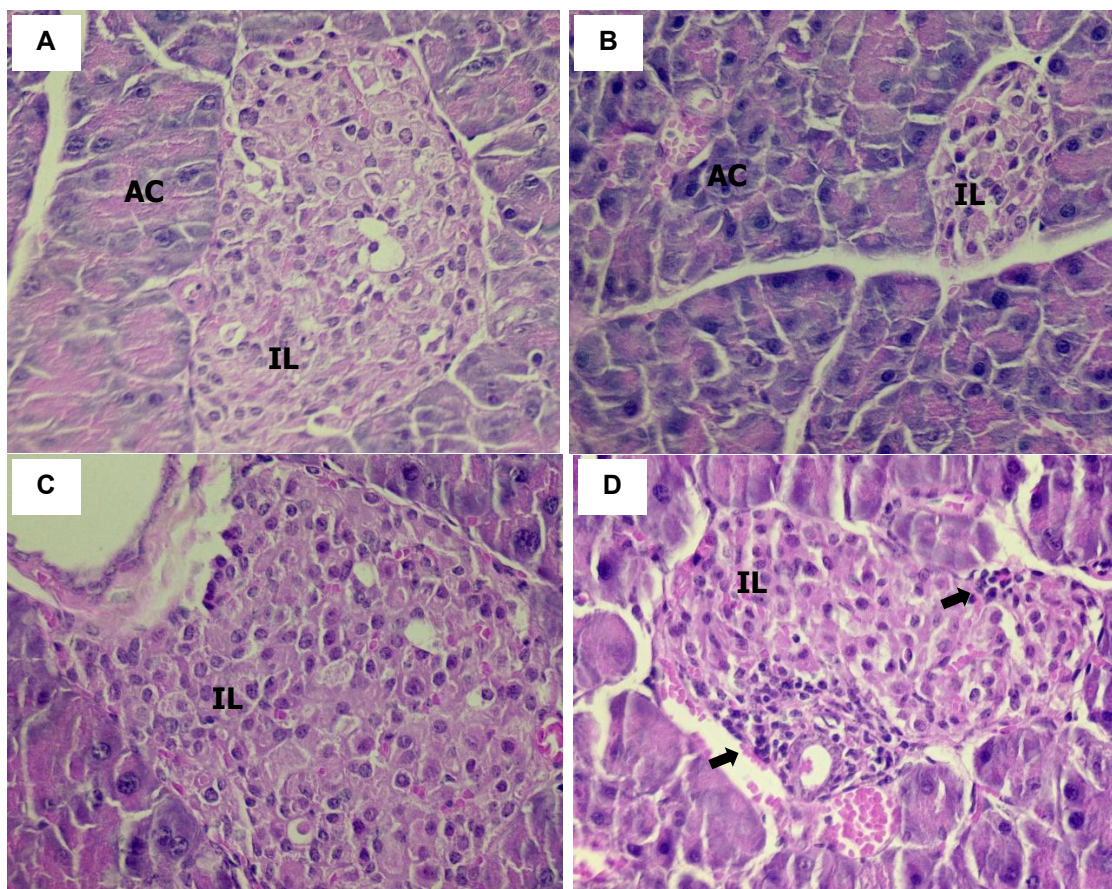


Figura 14 – Fotomicrografia de pâncreas de animais submetidos à indução de diabetes por STZ, transferidos adotivamente com linfócitos B-1 em D15 e avaliados em D29. A) Animal C2B-2. B) Animal C2B-3. C) Animal C2B-5. D) Animal C2B-6. AC: Ácino pancreático. IL: Ilhotas de Langerhans. Setas. Infiltrado leucocitário mononuclear. Coloração H.E. Aumento 400x.

Após a observação de ilhotas atrofiadas nos tecidos pancreáticos, foi realizada análise métrica das ilhotas pancreáticas para identificar possíveis diferenças associadas à transferência celular de linfócitos B-1. Quanto ao perímetro das ilhotas, observa-se que os grupos G1A, G1B e G2B apresentaram médias relativamente próximas ao grupo STZ, sugerindo preservação parcial da arquitetura insular. Entretanto, o grupo G2A apresentou maior variabilidade individual e tendência ao aumento do perímetro das ilhotas, com algumas ilhotas exibindo valores substancialmente elevados (Figura 15A).

A análise da área das ilhotas reforça esse comportamento. O grupo G2A apresentou a maior média e a maior dispersão dos valores, indicando presença de ilhotas aumentadas (Figura 15B), apesar de não haver significância estatística. Por outro lado, os grupos G1B e G2B apresentaram áreas mais próximas às observadas no grupo STZ (Figura 15B).

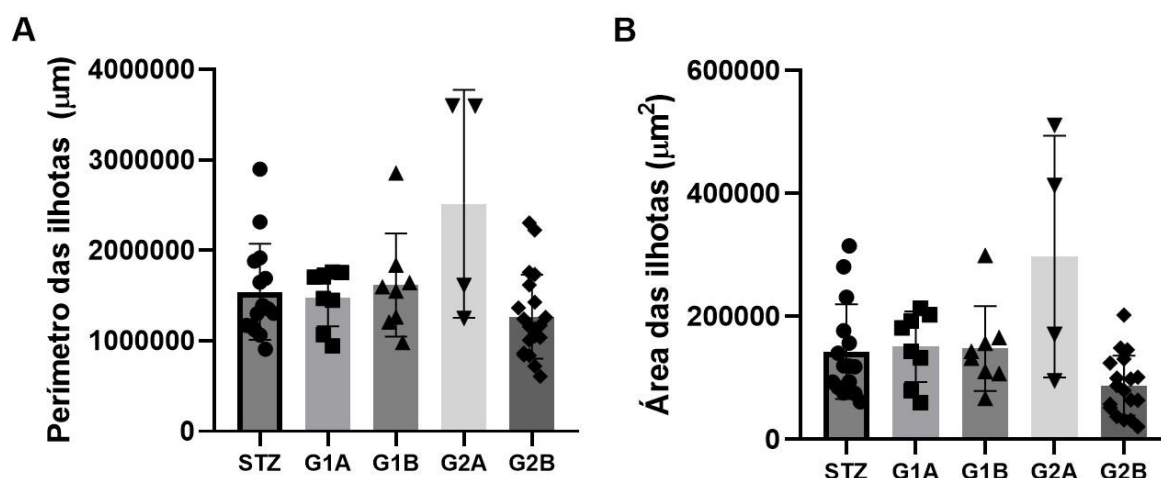


Figura 15 – Avaliação métrica das ilhotas pancreáticas de animais submetidos à indução de diabetes por STZ e transferidos ou não com linfócitos B-1 em D6 (G1) ou em D15 (G2) e avaliados aos 15 (G1A), 22 (G1B e G2A) e 29 (G2B) dias de experimentação. A) Perímetro e B) Área, das ilhotas pancreáticas determinados pela análise em software ImageJ. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós teste para múltiplas comparações de Games-Howell's não revelou significância.

Foi realizada a técnica de imunofluorescência, aplicada em cortes histológicos do pâncreas para detecção específica de insulina. Para fins de comparação com as imagens obtidas, o Anexo 1 traz a representação de uma ilhota pancreática de animal saudável produzindo quantidade normal de insulina.

De modo geral, todos os grupos analisados apresentaram baixa expressão de insulina, compatível com a destruição de células β pancreáticas causada pela ação da STZ (ver ANEXO 5). Para compreender a possível influência da transferência celular adotiva na produção de insulina nas ilhotas de Langerhans serão apontadas as diferenças observadas entre animais respondedores, ou seja, que apresentaram glicemia abaixo de 250mg/dL e animais não-respondedores, que se mantiveram diabéticos até o fim do período observado.

No grupo 1B, os animais respondedores C1B-1 e C1B-2 apresentaram ilhotas pancreáticas contendo células positivas para insulina, com presença de grânulos fluorescentes mais evidentes ou maior quantidade de células positivas quando comparados ao animal não-responder C1B-3, com baixa ou ausente expressão de grânulos de insulina observados (Figura 16).

Nos animais do grupo 2A observou-se, de maneira geral, reduzida expressão de insulina em todos os cortes analisados. Esses animais não responderam à transferência adotiva de linfócitos B-1 e permaneceram diabéticos durante o

período experimental observado (Figura 16).

No grupo 2B, apesar das diferenças morfológicas já apontadas, todos os animais do grupo, tanto o animal não-responder C2B-1 quanto os animais respondedores C2B-2 e C2B-3 apresentaram moderada quantidade de células positivas para insulina (Figura 16).

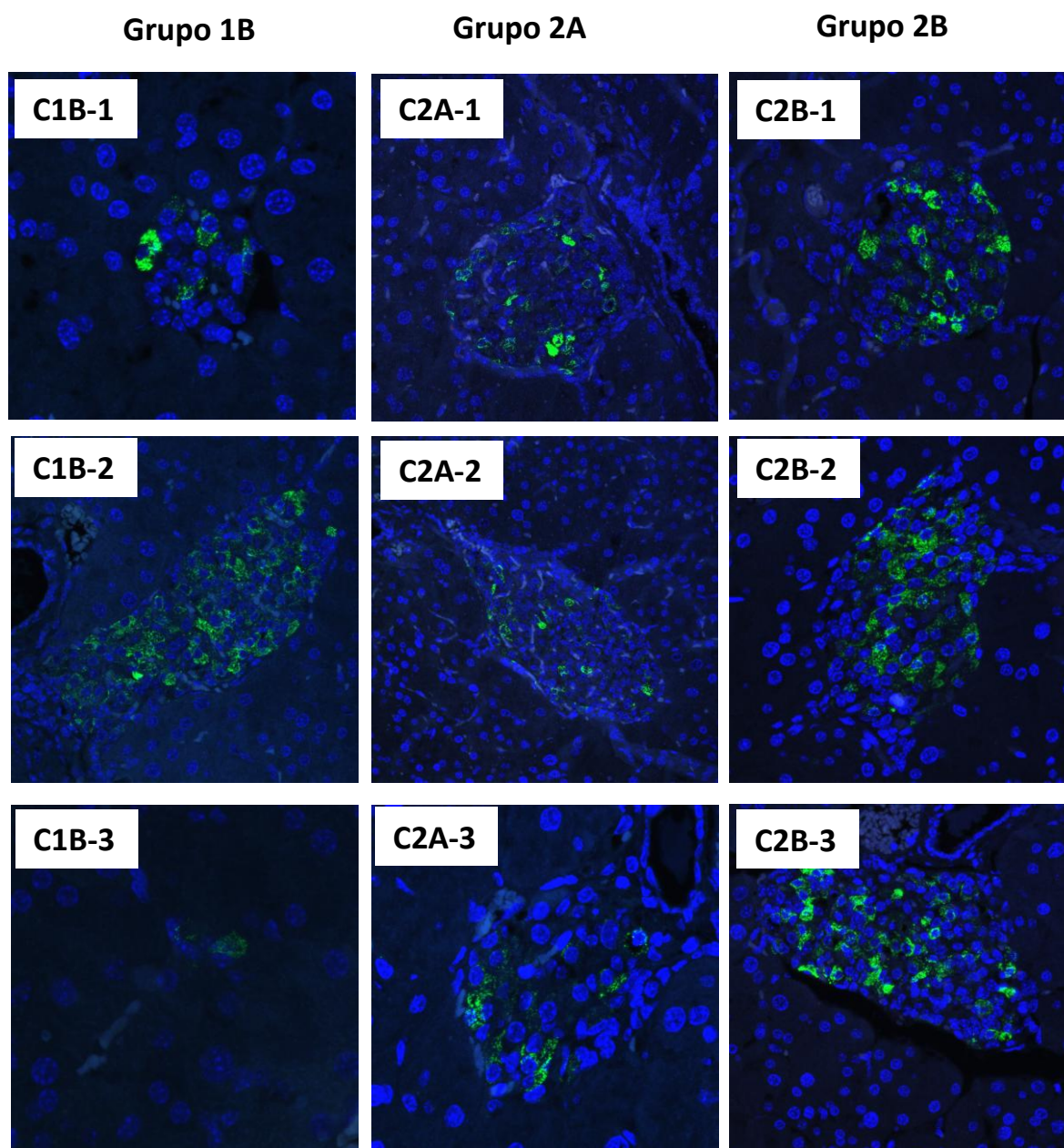


Figura 16 – Expressão de grânulos de insulina por imunofluorescência em ilhotas pancreáticas de camundongos XID submetidos à indução de diabetes por STZ, transferidos adotivamente com linfócitos B-1 em D6 (Grupo 1) e em D15 (Grupos 2) e avaliados em D22 (Grupos 1B e 2A) e D29 (Grupo 2B). Azul=DAPI; Verde=Insulina.

A fim de compreender a heterogeneidade de resposta observada após a

transferência adotiva, foi feita a análise do inóculo de linfócitos B-1 reprogramados metabolicamente por Flow Imaging Microscopy (FIM), para caracterizar a composição celular e investigar possíveis diferenças morfológicas induzidas pelo PRM. O estudo evidenciou diferenças importantes entre as células cultivadas em meio R10 (Controle) e aquelas submetidas ao PRM, tanto na distribuição das populações celulares quanto nas características morfológicas observadas.

Inicialmente, a análise da distribuição de tamanho demonstrou que as amostras controles apresentaram uma população celular relativamente mais homogênea, composta predominantemente por células com diâmetro entre 8 e 10,5 μ m (Figura 17). O histograma exibiu distribuição estreita, com menor frequência de eventos fora da população principal, indicando baixa variabilidade dimensional (Figura 17). Por outro lado, as amostras submetidas ao protocolo PRM apresentaram composição populacional mais heterogênea. Embora também contivessem a mesma população observada no grupo controle, foi identificada a presença de populações adicionais compostas por células de menor e maior tamanho (Figuras 18).

A população celular mais frequente na amostra controle apresentou tamanho médio de 9 μ m enquanto na amostra PRM a população celular mais frequente apresentou tamanho médio de 5 μ m (Figura 17). Além das diferenças dimensionais, foram observadas alterações na intensidade óptica das células. De modo geral, as células controles (8-10 μ m) apresentaram aspecto mais uniforme, com tonalidade mais clara e baixa variação visual entre os eventos analisados. Já as células provenientes do grupo PRM (8-10 μ m) exibiram maior diversidade de intensidade óptica, incluindo células visualmente mais escuras e com maior contraste interno (Figura 17).

Já na população de 5 μ m, na amostra PRM estão presentes células pequenas, arredondadas, com bordas regulares e maior brilho/intensidade óptica aparente quando comparadas às células controle, cuja frequência de células com esse tamanho foi bem mais baixa e o aspecto morfológico apontou células mais irregulares, com coloração escura e algumas fragmentadas (Figura 18). Em contraste, as populações de maior tamanho observadas nas amostras PRM apresentaram maior diversidade morfológica, incluindo células com contornos menos regulares, variação de forma e maior complexidade estrutural aparente (Figuras 18) enquanto na amostra controle as células maiores tinham aspecto mais

homogêneo (Figura 18). Em ambas as amostras foram observados *dublets* celulares (Figura 18).

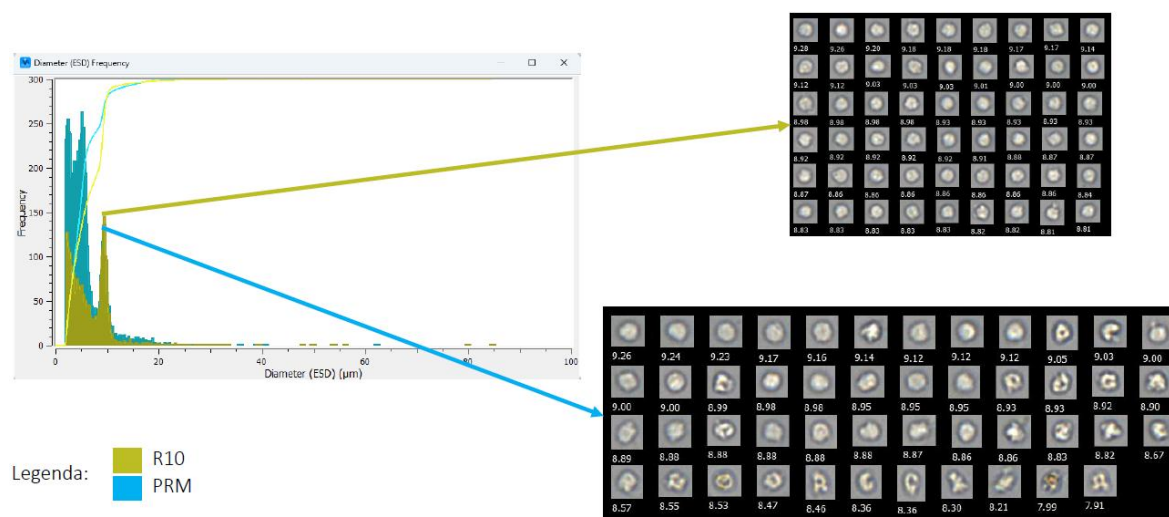
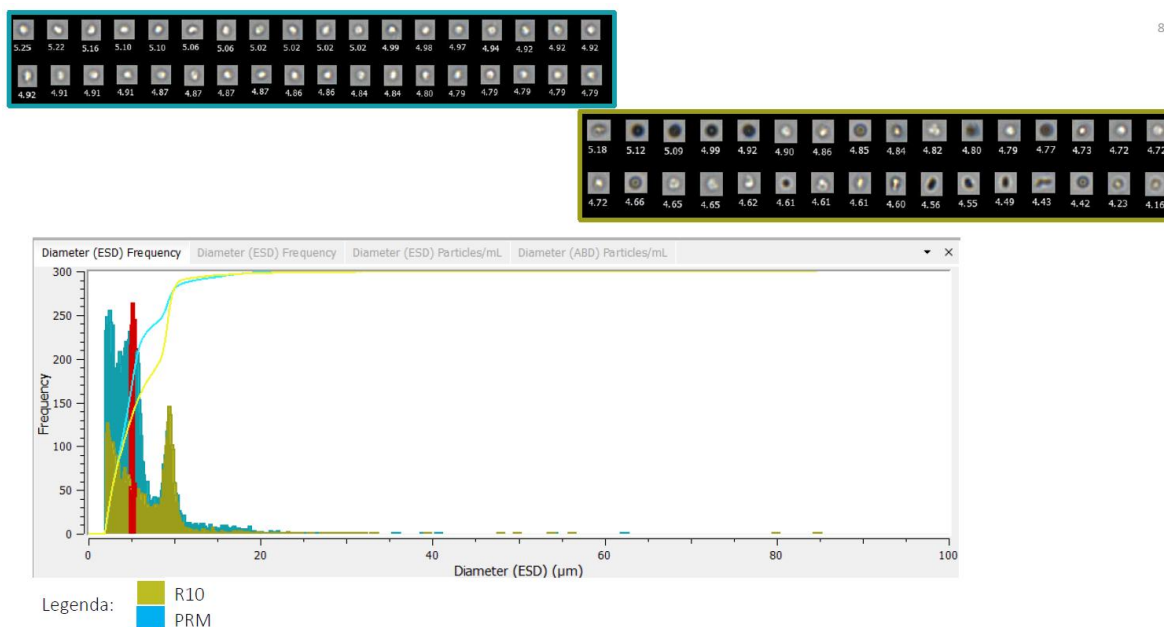


Figura 17. Distribuição do diâmetro equivalente esférico (ESD) e imagens representativas obtidas por Flow Imaging Microscopy das populações celulares presentes em amostras de linfócitos B-1 submetidos ao protocolo de reprogramação metabólica (PRM - azul) ou amostras controle cultivadas em meio padrão R10 (verde). Histograma (Frequência x Diâmetro); imagens ilustram diferenças no aspecto morfológico e intensidade óptica.

A



B

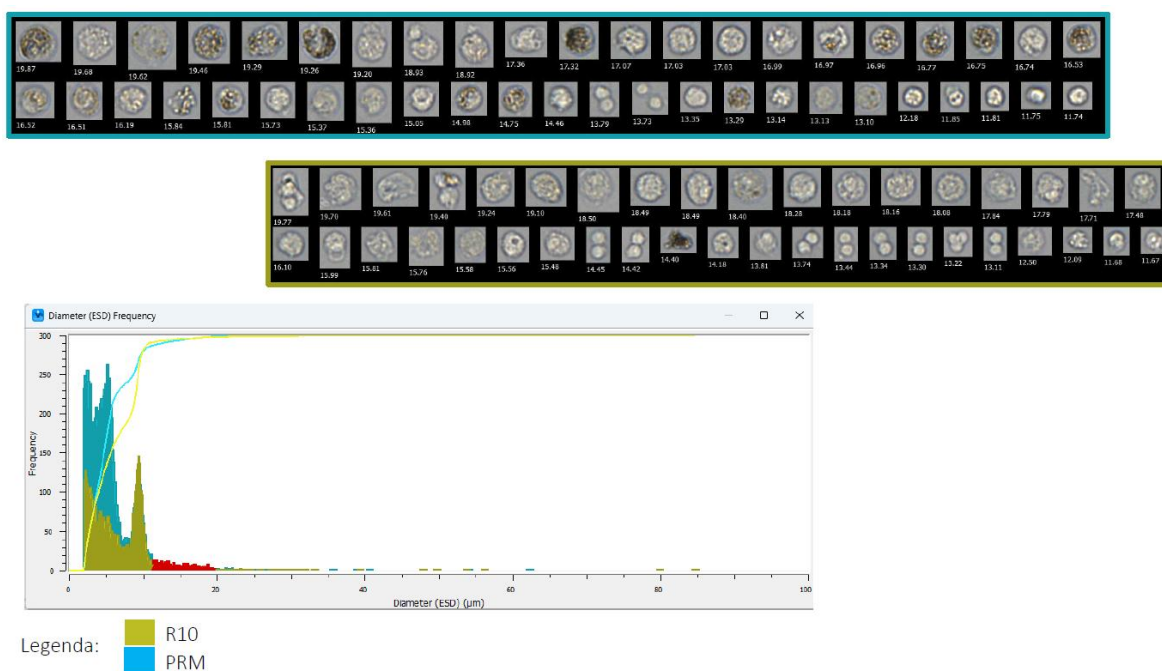


Figura 18. Análise por Flow Imaging Microscopy das populações celulares identificadas (vermelho) na amostra submetida ao protocolo de reprogramação metabólica (PRM - azul) e as populações correspondentes em amostra controle cultivada em meio R10 (verde). A) População celular predominante, concentrada na faixa de 4–5 μm de diâmetro equivalente esférico (ESD). B) População celular menos frequente, composta por células de maior porte (15–25 μm de ESD). As imagens representativas evidenciam diferenças na distribuição de tamanho, morfologia e intensidade óptica entre as populações.

5 DISCUSSÃO

A presente pesquisa se insere no panorama da busca por terapias celulares inovadoras para o DM, particularmente o tipo 1 (DM1), cuja patogênese é marcada pela destruição autoimune das células β pancreáticas (MILECH, 2014; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2021). O trabalho explora a plasticidade funcional de linfócitos B-1, células tradicionalmente conhecidas por sua atuação na imunidade inata e cujo potencial como produtoras de insulina e capacidade de atenuar a hiperglicemia já foi descrito. O sucesso do protocolo de capacitação metabólica *in vitro*, seguido pelo controle glicêmico em parte dos animais, observada após a transferência adotiva em modelo murino diabético induzido por STZ, marca um avanço significativo rumo à eficácia terapêutica.

O debate sobre a função dos linfócitos B no DM1 é complexo. Evidências clássicas, como as de Serreze *et al.* (1996), demonstram que os linfócitos B são essenciais para a iniciação da autoimunidade mediada por células T, atuando como células apresentadoras de antígeno e produtoras de autoanticorpos (RAWLINGS *et al.*, 2012). Entretanto, a linhagem B-1, distinta das células B-2 foliculares em termos de ontogenia e na produção de anticorpos (IgM naturais em B-1) (KANTOR & HERZENBERG, 1993; SMITH; BAUMGARTH, 2019), apresenta uma dualidade de papéis.

Em 2015, foi descrito por Alvares-Saraiva e seus colaboradores o papel regulador de linfócitos B-1 no controle glicêmico e proteção de camundongos suscetíveis contra o desenvolvimento do diabetes induzido por STZ. Por outro lado, a literatura científica tem apontado para os linfócitos B-1 como facilitadores do desenvolvimento do diabetes (RYAN *et al.*, 2010. CORTE-REAL *et al.*, 2012), especialmente promovendo a infiltração de células T autorreativas após sua migração para o tecido pancreático (KENDALL *et al.*, 2004. RYAN *et al.*, 2010). O que esses animais, que desenvolvem diabetes espontaneamente, têm em comum é uma resposta imune deficiente, seja pelo repertório T CD4⁺ quase monoclonal para OVA com a expressão desse mesmo antígeno nas células β , em camundongos DO11 x RIP-mOVA (RYAN *et al.*, 2010. CORTE-REAL *et al.*, 2012) ou a mutação característica no MHC II (Ser β 57) de camundongos NOD, que altera a apresentação de peptídeos e favorece a seleção e sobrevivência de T CD4⁺ autorreativos (ANDERSON; BLUESTONE, 2005) que, em ambos os modelos,

defeitos genéticos que distorcem a apresentação de antígenos e levam à quebra de tolerância e à expansão de clones T diabetogênicos. Dessa forma, mesmo por vias distintas, DO11 × RIP-mOVA e NOD convergem para o mesmo desfecho: um sistema imune estruturalmente predisposto à autoimunidade contra as ilhotas (RYAN et al., 2010), onde o papel regulador de linfócitos B-1 também é prejudicado.

Neste mesmo sentido, Conway e colaboradores (2024) demonstraram que alterações nas vias metabólicas dos linfócitos B podem modular seu perfil funcional, direcionando-os para um fenótipo inflamatório, que favorece o desenvolvimento do diabetes, ou para um fenótipo regulador, associado à proteção contra a doença. Deste modo, o desafio presente consiste na superação do potencial papel patogênico dos linfócitos B-1. A abordagem proposta assume que essas células, devido à sua capacidade de autorrenovação e potencial intrínseco de diferenciação, podem ser reprogramadas metabolicamente (CHONG et al., 2001).

Estudos prévios demonstraram que o tratamento *in vitro* com CTX, nicotinamida e alta glicose induz alterações morfológicas e funcionais nos linfócitos B-1, permitindo a expressão de genes relacionados ao metabolismo da glicose e, crucialmente, à produção de insulina (ALVARES-SARAIVA et.al., 2021). A CTX, em particular, demonstrou ser essencial nesse processo de diferenciação e capacitação, possivelmente pela modulação de vias de sinalização que culminam na plasticidade fenotípica (RODRIGUES et al., 2023).

A CTX, principal toxina do veneno da *Crotalus durissus terrificus*, a cascavel, aumentou a atividade de enzimas glicolíticas, como a hexoquinase e G6PD, a síntese de citrato e o metabolismo de glicose e glutamina, promovendo maior liberação de NO, H₂O₂ e as citocinas pró-inflamatórias IL-1β, TNF-α, IL-6 em macrófagos peritoneais de ratos (FAIAD et al., 2022). Kato e seus colaboradores (2021) mostrou que a CTX inibe funções endoteliais fundamentais à angiogênese, interferindo na polimerização de actina, na expressão de integrinas (αv, α2) e em eventos dependentes de adesão, migração e proliferação celular (KATO et al., 2021). A CTX também foi capaz de modular o fenótipo e o metabolismo de macrófagos, aumentando a expressão de CD86, iNOS, TNF-α e IL-1β *in vitro* concomitantemente à redução de Arg-1, CD206 e IL-10, revelando um perfil mais inflamatório, M1 (NEVES et al., 2023).

Em estudo anterior, a reprogramação metabólica de linfócitos B-1 *in vitro* foi demonstrada (MELO; LUZ; SARAIVA, 2022), com aumento da sobrevivência e

capacidade proliferativa das células, além da manutenção de sua capacidade de codificar insulina. Aqui, a transferência adotiva desses linfócitos reprogramados apresentou efeito hipoglicemiante para cerca de 31% dos animais que receberam o tratamento. Evidências apontam para uma população heterogênea, após a reprogramação metabólica, conforme observado no estudo de Bueno (2025). O protocolo de reprogramação resulta em duas populações que diferem na captação de glicose, sugerindo que apenas uma parte da população de linfócitos B-1 aumenta o transporte de glicose e é reprogramada (BUENO, 2025). A análise morfológica realizada aqui confirma essa premissa, onde a amostra do inóculo de linfócitos B-1, submetida ao PRM, apresentou maior heterogeneidade morfológica, aumento da diversidade de tamanho celular, alterações no padrão óptico e, ainda, revelou o aparecimento de uma população diferente do observado no controle, com menor tamanho e maior frequência, sugerindo intensa modulação na população cultivada, que pode ter culminado em alterações funcionais importantes.

O sucesso dessa população, quando transferidas para camundongos diabéticos, conforme já discutido, pode variar de acordo com o ambiente inflamatório e metabólico do hospedeiro. As razões pelas quais o tratamento apresentou eficácia variável, ainda deverá ser mais bem discutido e, para melhor compreender os mecanismos que envolvem o sucesso da transferência celular, a discussão será focada nos efeitos positivos que o tratamento promoveu e nas diferenças observadas entre animais respondedores e não respondedores quanto ao efeito hipoglicemiante e proteção contra o desenvolvimento de diabetes.

Os desfechos metabólicos oferecem a primeira evidência funcional da terapia celular. A análise do peso corporal dos animais constitui um indicador fisiológico relevante do estado metabólico dos animais. No modelo de DM induzido por STZ, que causa destruição seletiva das células β via GLUT2, sabe-se que a deficiência absoluta de insulina precipita um estado catabólico severo, no qual ocorre proteólise e lipólise não controladas para suprir a gliconeogênese hepática com substratos provenientes do músculo e do tecido adiposo, levando a perda de peso progressiva e sustentada (FURMAN, 2021), assim como também observado no diabetes tipo 1 humano (KOEPPEN; STANTON, 2018; NELSON; COX, 2018). Essa condição é observada em todos os animais, que apresentaram queda ponderal acentuada durante o protocolo de STZ, compatível com persistência do estado catabólico. E, embora o padrão geral dos animais seja marcado pela

incapacidade de recuperação ponderal sustentada, foi observada variabilidade individual, onde 4 animais apresentaram reganho igual ou acima do peso inicial.

Quando analisamos os grupos tratados, o tempo da intervenção desempenha papel importante na prevenção ou reversão do catabolismo. Nos grupos submetidos ao tratamento precoce (G1A e G1B), nos quais a transferência de linfócitos B-1 capacitados ocorreu em D6, um dia após STZ, observa-se que a perda de peso inicial também é atenuada precocemente, seguida pela estabilização do peso corporal, especialmente no grupo 1B, cuja retomada ponderal atingiu ou ultrapassou o nível basal em 2 animais. Já nos grupos tratados tardiamente (G2A e G2B), que receberam as células apenas em D15, nota-se uma perda de peso acumulada mais pronunciada antes da intervenção, característica de um estado catabólico mais prolongado. Entretanto, após o tratamento, ocorre estabilização do peso e, nos animais respondedores, início de recuperação ponderal. Esse padrão sugere que a terapia foi capaz de reverter o catabolismo já estabelecido, embora aparentemente, de forma mais lenta que nos grupos de intervenção precoce.

Além disso, a comparação entre os tempos de permanência da terapia sugere que a ação das células B-1 é contínua e cumulativa. Os grupos mantidos por mais tempo (G1B e G2B, 14 dias) apresentaram desempenho ponderal superior aos grupos avaliados mais precocemente (G1A e G2A), revelado pelo delta do peso total avaliado. Esses resultados, juntamente com os achados da expressão de insulina nas ilhotas pancreáticas, sugerem que a produção de insulina detectável e aumentada ao longo do tempo permite a melhora do estado metabólico, refletida na recuperação e/ou estabilização ponderal dos animais. Esse comportamento, observado tanto na intervenção precoce quanto tardia, é compatível com a persistência de atividade funcional das células B-1 na restauração da produção de insulina e que o tempo de exposição à insulina, produzida ou não por essas células, parece influenciar diretamente o ganho ponderal.

Os estudos de Rezania et al. (2014) e Bruin et al. (2015) demonstram que o aumento da presença de células positivas para insulina nas ilhotas, seja por diferenciação de células-tronco em células β -like funcionais ou pelo amadurecimento de progenitores pancreáticos após o transplante, respectivamente, está diretamente associado à restauração progressiva do controle metabólico em modelos de diabetes. A recuperação da arquitetura insulínica e a secreção de insulina responsiva à glicose foram acompanhadas pela reversão da

hiperglicemia em camundongos (REZANIA et al., 2014). Já no estudo de Bruin, enxertos que exibiram maior densidade e maturação de células produtoras de insulina também apresentaram melhor desempenho fisiológico, refletido em maiores níveis de peptídeo C humano e resposta glicêmica mais eficiente (BRUIN et al., 2015). Esses achados reforçam que a intensificação da expressão de insulina nas ilhotas está funcionalmente ligada à recuperação metabólica. No presente estudo, a estabilização e a recuperação do peso corporal nos grupos tratados constituem evidência funcional relevante de que a restauração da insulina, promovida pela transferência adotiva dos linfócitos B-1 pode ter modulado vias metabólicas clássicas. Se a insulina que estava funcional *in vivo* corresponde à produzida pelos linfócitos B-1, ainda precisa ser investigado. A ação anabólica restaurada é compatível com a inibição da gliconeogênese hepática exacerbada, processo amplamente descrito como dependente da supressão insulínica (PERRY et al., 2014), o que, do ponto de vista fisiológico, seria atribuível à reativação de síntese proteica e lipogênese, indicando melhora do balanço energético e estabelecimento de um estado mais anabólico e estável.

Os resultados de tolerância à glicose e o cálculo da AUC sugerem maior eficácia do tratamento precoce. No grupo G1B (tratamento no D6 após indução do diabetes e análise em D22) 2 de 3 animais alcançaram a normoglicemia ao final do TTGip e apresentaram boa tolerância à sobrecarga de glicose no cálculo da AUC, apresentando curva menor que o grupo STZ, que manteve intolerância à glicose em resposta ao mesmo teste. Tal resposta sugere que a transferência das células B-1 capacitadas foi capaz de modular a tolerância à glicose e/ou, hipoteticamente, refletir melhora da sensibilidade à insulina, seja esta exógena ou endógena induzida pelas células transferidas. Em contraste, no grupo G2B (tratamento tardio em D15 e analisado em D22) nenhum animal apresentou boa tolerância à sobrecarga de glicose pela AUC, muito embora três de dez animais tenha terminado o teste com glicemia menor que 250mg/dL. Este achado sugere que o sucesso da terapia celular é dependente da fase da doença. Hipotetizamos que, em um estágio mais precoce, quando a destruição das células beta não está completa, a intervenção pode atuar de forma mais eficiente, seja protegendo as células beta remanescentes, seja na manutenção da tolerância à glicose. Esse aspecto é particularmente relevante, pois indica que os efeitos da terapia celular podem estar associados à modulação de vias metabólicas sistêmicas, e não exclusivamente à

produção de insulina. Nesse contexto, torna-se plausível considerar que a atuação dos linfócitos B-1 reprogramados possa envolver mecanismos adicionais, como a modulação do microambiente inflamatório e a interação com tecidos metabolicamente ativos, de forma dependente do momento em que é feita a transferência celular adotiva.

Os linfócitos B-1 têm emergido como elementos importantes na regulação metabólica sistêmica, particularmente no controle da tolerância à glicose. Estudos demonstram que B-1a são capazes de modular a homeostase glicêmica por meio da produção de citocinas regulatórias, como IL-10, atenuando inflamação metabólica e contribuindo para maior sensibilidade à insulina (SHEN et al., 2015). Além disso, essa subpopulação exerce efeito protetor frente à resistência insulínica, sendo associada a melhor desempenho nos testes de tolerância à glicose em modelos experimentais (PUGLIESE et al., 2012). Evidências recentes reforçam que a plasticidade metabólica intrínseca das células B-1 permite sua adaptação a estados inflamatórios ou anabólicos, favorecendo um perfil funcional compatível com a manutenção da homeostase energética e da resposta glicêmica (WANG et al., 2024). Em conjunto, esses dados indicam que alterações no número, função ou programação metabólica das células B-1 podem impactar diretamente a tolerância à glicose e o equilíbrio metabólico do organismo.

Estes resultados sugerem que os linfócitos B-1, uma vez transferidos, podem manter e/ou amplificar sua capacidade de se comportar como células produtoras de insulina *in vivo*, representando um novo paradigma na biologia do DM. Além disso, os achados metabólicos motivam a análise estrutural do pâncreas, essencial para interpretar a relação entre função e morfologia.

A análise integrada da histopatologia pancreática e da imunomarcagem de insulina permite estabelecer um panorama claro da extensão da destruição endócrina induzida pela STZ e das diferenças entre animais respondedores e não respondedores à terapia com linfócitos B-1 reprogramados. Nos animais diabéticos não tratados, observou-se o padrão clássico descrito na literatura (FURMAN, 2021), caracterizado por ilhotas escassas, irregulares, atróficas e, em alguns casos, completamente ausentes, refletindo a destruição pancreática severa decorrente da ação citotóxica seletiva da STZ sobre as células β pancreáticas. Esse perfil extremo foi evidente no animal C1A-3, no qual nenhuma ilhota foi identificada.

Em contrapartida, animais que apresentaram valores glicêmicos normais ao

término do período experimental, como por exemplo C1A-2 e C2A-3, apresentaram ilhotas grandes, regulares, bem delimitadas e com vasos aparentes. A presença de vacúolos no tecido exócrino destes animais pode refletir atividade metabólica aumentada, embora a natureza dessa alteração permaneça a ser esclarecida.

Nos grupos tratados, observou-se um padrão distinto entre animais respondedores e não respondedores, especialmente quando considerado o tempo de intervenção e o tempo de observação. No grupo 1B, tratado precocemente com análise tardia, animais respondedores apresentaram múltiplas ilhotas preservadas, ainda que com imunomarcção de insulina menos intensa que a de animais saudáveis. Já o animal não respondedor, que se tornou diabético ao final, exibiu acentuada redução no número de ilhotas, sem sinal detectável de insulina. Nos grupos de tratamento tardio (2A e 2B), a heterogeneidade também foi marcada: enquanto a maioria dos animais de 2A apresentou poucas ilhotas remanescentes, um animal pontual exibiu preservação notável; no grupo 2B, avaliado mais tardiamente, três dos 10 animais, os respondedores, mostraram múltiplas ilhotas regulares e bem vascularizadas, sugerindo preservação estrutural parcial ao longo do tempo.

A imunomarcção de insulina complementa esses achados estruturais. Em todos os grupos experimentais observou-se redução da intensidade de marcação quando comparados ao padrão saudável, coerente com a condição diabética. No grupo 1B, animais respondedores mantiveram sinal positivo, embora reduzido, enquanto o não respondedor exibiu ausência de insulina. No grupo 2A, a imunomarcção foi discretamente positiva ou muito baixa em todos os animais, independentemente da glicemia, sugerindo que o intervalo de sete dias após o tratamento tardio pode ter sido insuficiente para permitir recuperação funcional. Já no grupo 2B, a preservação morfológica observada sugere que níveis discretamente superiores de insulina poderiam ser esperados, corroborando com estudos que demonstram a recuperação funcional parcial de células β remanescentes após redução da glicotoxicidade (SAISHO, 2015).

Integrando os achados morfológicos e funcionais, observa-se uma tendência de melhor preservação pancreática nos animais respondedores ao tratamento. Embora as análises morfométricas de área e perímetro das ilhotas não tenham demonstrado diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, foi observada maior frequência de ilhotas identificáveis em amostras dos grupos

respondedores, particularmente nos animais que apresentaram melhor controle glicêmico. Além disso, esses animais exibiram melhor preservação tecidual, vascularização mais evidente e imunomarcação compatível com produção residual de insulina. Em contraste, animais não respondedores apresentaram alterações morfológicas mais pronunciadas, incluindo redução do número de ilhotas observadas. Quanto à presença de insulina, animais não respondedores do tratamento precoce apresentaram menor marcação para insulina, enquanto os não respondedores avaliados mais tardiamente, apesar da ausência de controle glicêmico, apresentaram marcação moderada para insulina nas ilhotas pancreáticas, não havendo diferenças observáveis entre respondedores e não respondedores neste quesito. Esses achados sugerem que a melhora funcional observada em parte dos animais tratados pode estar associada à preservação parcial da arquitetura pancreática, ainda que as diferenças morfométricas entre os grupos não tenham atingido significância estatística. A literatura sustenta que vascularização adequada, redução da inflamação local e um microambiente tecidual favorável são fatores essenciais para a sobrevivência e manutenção da função das células β remanescentes (NASTESKA; HODSON, 2018). Nesse sentido, os resultados sugerem que as células B-1 reprogramadas podem ter exercido papel imunomodulador relevante, capaz de preservar estruturalmente as ilhotas ou mitigar a progressão da destruição induzida pela STZ, promovendo um ambiente propício à recuperação funcional, especialmente quando houve tempo suficiente para a manifestação dos efeitos terapêuticos.

Além das alterações pancreáticas, o comportamento dos linfócitos B-1 nos tecidos periféricos revelou um componente adicional relevante da resposta terapêutica. Um dos achados mais intrigantes e merecedores de atenção aprofundada do presente estudo foi a redistribuição preferencial, no fígado, dos linfócitos B-1 transferidos adotivamente para a cavidade peritoneal. No animal C1A-2, que exibiu controle glicêmico completo e não desenvolveu diabetes, foi identificada uma fração elevada das células B-1 no fígado, paralela à ausência no peritônio. Esse dado sugere fortemente um mecanismo de *homing* seletivo e retenção hepática, possivelmente facilitado pelo microambiente do órgão. Dado que o fígado é reconhecido não apenas como órgão metabólico, mas também como sítio linfoide associado rico em células imunes residentes e migratórias (FREITAS-LOPES et al., 2017), essa observação ganha relevância funcional.

Do ponto de vista metabólico, o fígado exerce papel central na regulação da glicemia, sendo responsável pela gliconeogênese, glicogenólise e armazenamento de glicogênio, tornando-se alvo essencial da insulina (KOEPPEN; STANTON, 2018; KÖNIG, BULIK & HOLZHÜTTER, 2012). Neste contexto, a presença persistente de linfócitos B-1 no fígado poderia representar não somente um reservatório celular, mas um núcleo funcional para o restabelecimento da homeostase glicêmica, agindo diretamente sobre os hepatócitos, inibindo a gliconeogênese e estimulando a captação e armazenamento de glicose, uma vez que permaneça produzindo e secrete insulina *in vivo*. A correlação entre o aumento da frequência dessas células no ambiente hepático e a normoglicemia observada sustenta essa premissa. Ainda que não seja possível estabelecer uma relação causal direta com os dados atuais, essa associação sugere que o fígado possa atuar como um nicho funcional permissivo para a ação dos linfócitos B-1 reprogramados. Nesse cenário, a eficácia da terapia celular poderia depender não apenas da capacidade dessas células em produzir insulina, mas de sua habilidade em alcançar e persistir em microambientes capazes de potencializar sua atividade metabólica.

Adicionalmente, o microambiente hepático pode favorecer a manutenção, sobrevivência e funcionalidade das B-1 transferidas. Em condições fisiológicas e patológicas, o fígado abriga populações de linfócitos B, T, NK e outras células imunes, além de células residentes como os macrófagos de Kupffer e células endoteliais sinusoidais, que regulam a imunidade, tolerância imunológica e imunometabolismo (FREITAS-LOPES et al., 2017; KOTLYAROV, 2025). A afinidade natural dos linfócitos B-1 por sítios imunes não convencionais e sua capacidade de migrar e se infiltrar em tecidos (Smith & Baumgarth, 2019), reforça a hipótese de que a expressão de moléculas de adesão no endotélio hepático pode facilitar a migração e a residência das células B-1 neste nicho.

Diante desses achados, futuros estudos devem incluir 1) a pesquisa de níveis da insulina e peptídeo C no tecido hepático, 2) a expressão hepática de receptores de insulina e transportadores de glicose (GLUTs) e 3) o perfil de citocinas e mediadores inflamatórios e regulatórios no fígado, após o tratamento, para confirmar a relevância funcional desse *homing* hepático na homeostase glicêmica.

Os resultados obtidos para os linfócitos B-1 demonstraram comportamento distinto entre os órgãos avaliados. Enquanto peritônio e fígado não apresentaram

diferenças significativas entre os grupos, o baço exibiu alterações importantes na frequência dessa população celular. Curiosamente, os maiores percentuais de linfócitos B-1 foram observados no grupo STZ, enquanto os grupos tratados com linfócitos B-1 reprogramados apresentaram frequências significativamente menores. Considerando o papel do baço como importante órgão linfóide secundário e centro regulador das respostas imunes sistêmicas, esse achado sugere que o diabetes induzido pela estreptozotocina pode favorecer alterações na composição das populações nesse órgão. Por outro lado, a redução observada nos grupos tratados pode indicar que a transferência adotiva de linfócitos B-1 reprogramados promoveu modulação da resposta imune sistêmica, interferindo na dinâmica dessas populações celulares. A regulação da inflamação e da interação com outras populações imunes já foi descrito para os linfócitos B-1 produtores de IL-10 e imunoglobulinas naturais (BAUMGARTH, 2011; SUCHANEK; CLATWORTHY, 2023).

Essas observações orientam interpretações mais amplas sobre o potencial terapêutico dos linfócitos B-1 que transcendem o tratamento do DM, mas também, para abordagens regenerativas e imuno modulatórias. Em teoria, a terapia baseada em linfócitos B-1 poderia oferecer vantagens importantes sobre a terapia de substituição de células beta tradicionais, como o transplante de ilhotas. A capacidade de autorrenovação dos Linfócitos B-1 (KANTOR & HERZENBERG, 1993; SMITH; BAUMGARTH, 2019), quando no hospedeiro, poderia conferir à terapia celular uma durabilidade potencialmente maior. Em modelo murino, a transferência de linfócitos B-1 conferiu proteção contra o desenvolvimento do diabetes por sete meses (ALVARES-SARAIVA et al, 2015). Além disso, em cenários clínicos futuros, o uso de células B-1 autólogas mitigaria o risco de rejeição imunológica e a necessidade de imunossupressão contínua, uma limitação crítica das terapias atuais.

Dessa forma, os resultados aqui apresentados ampliam a compreensão do papel dos linfócitos B-1 no contexto do diabetes experimental, sugerindo que essas células podem atuar não apenas como efetores metabólicos, mas como elementos dinâmicos capazes de integrar sinais imunológicos e metabólicos em diferentes tecidos. Em conjunto, os resultados obtidos demonstram que a transferência adotiva de linfócitos B-1 reprogramados metabolicamente foi capaz de promover efeitos reguladores detectáveis em parte dos animais tratados, refletidos

principalmente pela melhora dos parâmetros glicêmicos e pela preservação parcial de características estruturais pancreáticas. Entretanto, a resposta ao tratamento não ocorreu de forma uniforme, sendo observada a coexistência de animais respondedores e não respondedores dentro dos grupos experimentais. Essa heterogeneidade sugere que os efeitos terapêuticos observados dependem não apenas das características funcionais dos linfócitos B-1 transferidos, mas também da interação dessas células com o microambiente imunológico e metabólico do hospedeiro, bem como do grau de comprometimento pancreático previamente estabelecido. Nesse contexto, os achados do presente estudo reforçam o potencial dos linfócitos B-1 como moduladores da homeostase imunometabólica, ao mesmo tempo em que evidenciam a complexidade dos mecanismos envolvidos e a necessidade de estudos adicionais para compreender os fatores associados à variabilidade da resposta terapêutica.

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo demonstram que linfócitos B-1 reprogramados metabolicamente apresentam capacidade de modular a fisiopatologia do diabetes induzido por STZ, promovendo melhora da homeostase glicêmica, preservação parcial da arquitetura pancreática e manutenção de sinalização residual de insulina. A eficácia foi mais pronunciada quando a intervenção ocorreu precocemente e quando houve maior tempo de permanência das células no organismo, sugerindo ação progressiva e dependente do estágio da doença. O achado de acúmulo das células B-1 no fígado de um animal respondedor aponta para a relevância de tecidos extra pancreáticos na mediação terapêutica, destacando o potencial dos linfócitos B-1 como plataforma celular inovadora e biologicamente plausível para estratégias futuras de tratamento do diabetes. A variabilidade morfológica destacada no inóculo de linfócitos B-1 deve ser alvo de estudos futuros para a compreensão das diferenças não apenas estruturais, mas funcionais ocasionadas pela reprogramação metabólica.

REFERÊNCIAS

ALLMAN, D.; PILLAI, S. Peripheral B cell subsets. *Current Opinion in Immunology*, London, v. 20, n. 2, p. 149-157, abr. 2008. DOI: 10.1016/j.coi.2008.03.014.

ALMEIDA, S. R.; AROEIRA, L. S.; FRYMULLER, E.; DIAS, M. A. et al. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. *International Immunology*, Oxford, v. 13, n. 9, p. 1193-1201, set. 2001. DOI: 10.1093/intimm/13.9.1193.

ALUGUPALLI, K. R.; LEONG, J. M.; WOODLAND, R. T.; MURAMATSU, M. et al. B1b lymphocytes confer T cell independent long-lasting immunity. *Immunity*, Cambridge, v. 21, n. 3, p. 379-390, set. 2004. DOI: 10.1016/j.immuni.2004.06.019.

ALVARES-SARAIVA AM, NOVO MC, DE OLIVEIRA VC, MARICATO JT, LOPES JD, POPI AF, MARIANO M. B-1 cells produce insulin and abrogate experimental streptozotocin-induced diabetes. *Eur J Immunol*. 2015 May;45(5):1452-61. doi: 10.1002/eji.201445409.

ALVARES-SARAIVA, A. M.; LALLO, M. A.; SPADACCI-MORENA, D. D.; ARAUJO, R. S.; NEVES, C. L.; KATO, E. E.; MARIANO, M.; SAMPAIO, S. C.; CURI, R. Metabolic reprogramming of B-1 cells for the establishment of cell therapy. In: XLV ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY, 45., 2021, Online. Anais [...]. São Paulo: Brazilian Society of Immunology, 2021.

ANDERSON, M. S.; BLUESTONE, J. A. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annual Review of Immunology*, Palo Alto, v. 23, p. 447-485, 2005. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115643.

ANDRIKOPOULOS, S.; BLAIR, A. R.; DELUCA, N.; FAM, B. C.; PROIETTO, J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*, v. 295, n. 6, p. E1323–E1332, 2008. DOI: 10.1152/ajpendo.90617.2008

ANSEL, K. M.; HARRIS, R. B.; CYSTER, J. G. CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity*, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 67-76, jan. 2002. DOI: 10.1016/S1074-7613(01)00257-6.

AYALA, J. E.; SAMUEL, V. T.; MORTON, G. J.; OBICI, S.; CRONIGER, C. M.; SHULMAN, G. I.; WASSERMAN, D. H.; McGUINNESS, O. P. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Disease Models & Mechanisms*, v. 3, n. 9–10, p. 525–534, 2010. DOI: 10.1242/dmm.006239

BAUMGARTH, N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nature Reviews Immunology*, London, v. 11, n. 1, p. 34-46, jan. 2011. DOI: 10.1038/nri2901.

BAUMGARTH, N.; HERMAN, O. C.; JAGER, G. C.; BROWN, L. et al. Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 96, n. 5, p. 2250-2255, mar. 1999. DOI: 10.1073/pnas.96.5.2250.

BAUMGARTH, N. B-1 cell heterogeneity and the regulation of natural and antigen-induced IgM production. *Frontiers in Immunology*, Lausanne, v. 7, p. 324, 2016. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00324.

BOLDISON, J.; WONG, F. S. Regulatory B Cells: Role in Type 1 Diabetes. *Frontiers in Immunology*, Lausanne, v. 12, p. 746187, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.746187.

BRUIN, J. E.; ASADI, A.; FOX, J. K.; ERENER, S.; REZANIA, A.; KIEFFER, T. J. Accelerated maturation of human stem cell-derived pancreatic progenitor cells into insulin-secreting cells in immunodeficient rats relative to mice. *Stem Cell Reports*, Cambridge, v. 5, n. 6, p. 1081-1096, 2015. DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.10.013.

BUENO, T. A. Reprogramação metabólica restaura capacidade de produzir insulina em linfócitos B-1 de camundongos C57BL/6. 2025. Dissertação (Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental) – Universidade Paulista, São Paulo, 2025.

CHOI, Y. S.; BAUMGARTH, N. Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 205, n. 13, p. 3053-3064, dez. 2008. DOI: 10.1084/jem.20080979.

CHONG, S. Y.; LIN, Y. C.; CZARNESKI, J.; ZHANG, M.; COFFMAN, F.; KASHANCHI, F.; RAVECHE, E. S. Cell cycle effects of IL-10 on malignant B-1 cells. *Genes and Immunity*, London, v. 2, n. 5, p. 239-247, 2001. DOI: 10.1038/sj.gene.6363773.

CLARKE, A. J.; RIFFELMACHER, T.; BRAAS, D.; CORNALL, R. J.; SIMON, A. K. B1a B cells require autophagy for metabolic homeostasis and self-renewal. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 215, n. 2, p. 399-413, fev. 2018. DOI: 10.1084/jem.20170771.

CORTE-REAL J, DUARTE N, TAVARES L, PENHA-GONÇALVES C. Autoimmunity triggers in the NOD mouse: a role for natural auto-antibody reactivities in type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Sep;1173:442-8. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04661.x.

CORTE-REAL, J.; DUARTE, N.; TAVARES, L.; PENHA-GONCALVES, C. Innate stimulation of B1a cells enhances the autoreactive IgM repertoire in the NOD mouse: implications for type 1 diabetes. *Diabetologia*, Berlin, v. 55, n. 6, p. 1761-1772, jun. 2012. DOI: 10.1007/s00125-012-2498-0.

CONWAY, H.; PEREZ, D.; SWAR-ELDAHAB, M.; PIGANELLI, J.; EVANSMOLINA, C.; FELTON, J. Altered B Cell Metabolic Pathways Characterize Type 1 Diabetes Progression. *bioRxiv*, 2024. DOI: 10.1101/2024.07.03.601778v2.

DE OLIVEIRA, C. G. N.; PEREZ, E. C.; ALVARES-SARAIVA, A. M.; LALLO, M. A. CD8 T lymphocytes from B-1 cell-deficient mice down-regulates fungicidal activity

of macrophages challenged with *E. cuniculi*. *Immunobiology, Jena*, v. 229, n. 4, p. 152827, jul. 2024. DOI: 10.1016/j.imbio.2024.152827.

DONATH, M. Y.; SHOELSON, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology, London*, v. 11, n. 2, p. 98-107, fev. 2011. DOI: 10.1038/nri2925.

EHRENSTEIN, M. R.; NOTLEY, C. A. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nature Reviews Immunology, London*, v. 10, n. 11, p. 778-786, nov. 2010. DOI: 10.1038/nri2849.

FAIAD, O. J.; FRANCISCO, A. M. S. D. C.; BRIGATTE, P.; CURI, R.; SAMPAIO, S. C. Crotoxin modulates metabolism and secretory activity of peritoneal macrophages from Walker 256 tumor-bearing rats. *Toxicon*, v. 217, p. 46–55, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.07.011>

FARIAS, L. H. S.; RODRIGUES, A. P. D.; COÊLHO, E. C.; SANTOS, M. F.; SAMPAIO, S. C.; SILVA, E. O. Crotoxin stimulates an M1 activation profile in murine macrophages during *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitology*, v. 144, n. 11, p. 1458–1467, 2017. DOI: 10.1017/S0031182017000944.

FIFE, B. T.; GRIFFIN, M. D.; ABBAS, A. K.; LOCKSLEY, R. M.; BLUESTONE, J. A. Inhibition of T cell activation and autoimmune diabetes using a B cell surface-linked CTLA-4 agonist. *Journal of Clinical Investigation*, v. 116, n. 8, p. 2252–2261, 2006. DOI: 10.1172/JCI27856.

GURURAJAN, M.; JACOB, J.; PULENDRAN, B. Toll-like receptor expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal B-cell subsets. *PLoS ONE*, v. 2, n. 9, e863, 2007. DOI: 10.1371/journal.pone.0000863.

FREITAS-LOPES, M. A.; MAFRA, K.; DAVID, B. A.; CARVALHO-GONTIJO, R.; MENEZES, G. B. Differential location and distribution of hepatic immune cells. *Cells*, v. 6, n. 4, p. 48, 2017. DOI: 10.3390/cells6040048.

FURMAN, B. L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current Protocols*, v. 1, n. 4, e78, 2021. DOI: 10.1002/cpz1.78.

GRIFFIN, D. O.; ROTHSTEIN, T. L. Human B1 cell frequency: isolation and analysis of human B1 cells. *Frontiers in Immunology*, v. 3, p. 122, 2012. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00122.

HARDY, R. R. B-1 B cell development. *Journal of Immunology*, v. 177, n. 5, p. 2749–2754, 2006. DOI: 10.4049/jimmunol.177.5.2749.

HARDY, R.; HERZENBERG, L. A.; KANTOR, A. B. Debate: the nature of B-cell subpopulations—B-cell lineages exist in the mouse. *Immunology Today*, v. 14, n. 2, p. 79–83, 1993.

HAUGHTON, G.; ARNOLD, L. W.; WHITMORE, A. C.; CLARKE, S. H. B-1 cells are made, not born. *Immunology Today*, v. 14, n. 2, p. 84–87, 1993. DOI: 10.1016/0167-5699(93)90064-R.

HAYAKAWA, K.; HARDY, R. R.; HONDA, M.; HERZENBERG, L. A.; STEINBERG, A. D. Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, v. 81, n. 8, p. 2494–2498, 1984. DOI: 10.1073/pnas.81.8.2494.

HERZENBERG, L. A., STALL, A. M., LALOR, P. A., SIDMAN, C., MOORE, W. A., PARKS, D. R., & HERZENBERG, L. A. (1986). The Ly-1 B cell lineage. *Immunological reviews*, 93, 81–102. DOI: 10.1111/j.1600-065x.1986.tb01503.x

HIÉRONIMUS, L.; HUAUX, F. B-1 cells in immunotoxicology: mechanisms underlying their response to chemicals and particles. *Frontiers in Toxicology*, v. 5, 2023. DOI: 10.3389/ftox.2023.960861

HOLT, R. I. G.; DEVRIES, J. H.; HESS-FISCHL, A.; HIRSCH, I. B.; KIRKMAN, M. S.; KLUPA, T.; LUDWIG, B.; NØRGAARD, K.; PETTUS, J.; RENARD, E.; SKYLER,

J. S.; SNOEK, F. J.; WEINSTOCK, R. S.; PETERS, A. L. The management of type 1 diabetes in adults: a consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*, v. 44, n. 11, p. 2589–2625, 2021. DOI: 10.2337/dci21-0043

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. *IDF Diabetes Atlas*. 10. ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2021.

JELLUSOVA, J.; RICKERT, R. C. The PI3K pathway in B cell metabolism. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 51, n. 5, p. 359–378, 2016. DOI: 10.1080/10409238.2016.1215288.

KANTOR, A. B.; HERZENBERG, L. A. Origin of murine B cell lineages. *Annual Review of Immunology*, v. 11, p. 501–538, 1993. DOI: 10.1146/annurev.iy.11.040193.002441.

KATO, E. E.; PIMENTA, L. A.; ALMEIDA, M. E. S.; ZAMBELLI, V. O.; SANTOS, M. F.; SAMPAIO, S. C. Crotoxin inhibits endothelial cell functions in two- and three-dimensional tumor microenvironment. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, p. 713332, 2021. DOI: 10.3389/fphar.2021.713332.

KEARNEY, J. F. Innate-like B cells. *Springer Seminars in Immunopathology*, v. 26, n. 4, p. 377–383, 2005. DOI: 10.1007/s00281-004-0184-0.

KENDALL, P. L.; WOODWARD, E. J.; HULBERT, C.; THOMAS, J. W. Peritoneal B cells govern the outcome of diabetes in non-obese diabetic mice. *European Journal of Immunology*, v. 34, n. 9, p. 2387–2395, 2004. DOI: 10.1002/eji.200324744.

KHAN, W. N.; ALT, F. W.; GERSTEIN, R. M.; MALYNN, B. A.; LARSSON, I.; RATHBUN, G.; DAVIDSON, L.; MÜLLER, S.; KANTOR, A. B.; HERZENBERG, L. A. Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity*, v. 3, n. 3, p. 283–299, 1995. DOI: 10.1016/1074-7613(95)90114-0.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. *Berne & Levy fisiologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

KÖNIG, M.; BULIK, S.; HOLZHÜTTER, H. G. Quantifying the contribution of the liver to glucose homeostasis: a detailed kinetic model of human hepatic glucose metabolism. *PLOS Computational Biology*, v. 8, n. 6, e1002577, 2012. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002577.

KOTLYAROV, S. N. Liver immunology: biological role and clinical significance. *World Journal of Hepatology*, v. 17, n. 7, p. 107541, 2025. DOI: 10.4254/wjh.v17.i7.107541.

LALOR, P. A.; MORAHAN, G. The peritoneal Ly-1 (CD5) B cell repertoire is unique among murine B cell repertoires. *European Journal of Immunology*, v. 20, n. 3, p. 485–492, 1990. DOI: 10.1002/eji.1830200305.

LANGANKE DOS SANTOS, D.; ALVARES-SARAIVA, A. M.; XAVIER, J. G.; SPADACCI-MORENA, D. D.; et al. B-1 cells upregulate CD8 T lymphocytes and increase proinflammatory cytokine serum levels in oral encephalitozoonosis. *Microbes and Infection*, v. 20, n. 3, p. 196–204, 2018. DOI: 10.1016/j.micinf.2017.11.004.

Liu, T. S.; CATANEO, S. C.; IRITUS, A. C.; SAMPAIO, S. C.; DELLA-CASA, M. S.; CIRILLO, M. C. Crotoxin, a rattlesnake toxin, induces a long-lasting inhibitory effect on phagocytosis by neutrophils. *Experimental Biology and Medicine*, v. 237, n. 10, p. 1219–1230, 2012. DOI: 10.1258/ebm.2012.012010.

MEGLASSON, M. D.; MATSCHINSKY, F. M. New perspectives on pancreatic islet glucokinase. *American Journal of Physiology*, v. 246, n. 1 Pt 1, p. E1–E13, 1984. DOI: 10.1152/ajpendo.1984.246.1.E1.

MELO, E. S.; LUZ, I. C.; SARAIVA, A. M. A. Linfócitos B-1 produtores de insulina como alvo terapêutico no diabetes tipo 1: estudo in vitro. Trabalho apresentado no *Encontro de Iniciação Científica e Tecnológica da Universidade Paulista (UNIP)*, São Paulo, 2022. Disponível em:

https://www.unip.br/eceeic/admin/Anexos/Conteudo/C2022/C9/file_28092022103011597.pdf. Acesso em: 27 maio 2026.

MILECH, A. et al. *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013–2014*. São Paulo: AC Farmacêutica, 2014.

MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; DORSHKIND, K. B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity*, v. 36, n. 1, p. 13–21, 2012. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.11.017.

MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; FICE, M.; CASERO, D.; BERENT-MAOZ, B.; BARBER, C. L.; DORSHKIND, K. Distinct genetic networks orchestrate the emergence of specific waves of fetal and adult B-1 and B-2 development. *Immunity*, v. 45, n. 3, p. 527–539, 2016. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.07.012.

NASTESKA, D.; HODSON, D. J. The role of beta cell heterogeneity in islet function and insulin release. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 61, n. 1, p. R43–R60, 2018. DOI: 10.1530/JME-18-0011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger: principles of biochemistry*. 8. ed. New York: W. H. Freeman, 2018.

NEVES, C. L.; BARBOSA, C. M. V.; RANEIA-SILVA, P. A.; FAQUIM-MAURO, E. L.; SAMPAIO, S. C. Crotoxin modulates macrophage phenotypic reprogramming. *Toxins*, v. 15, n. 10, art. 616, 2023. DOI: 10.3390/toxins15100616.

NEWSHOLME, P.; GORDON, S.; NEWSHOLME, E. A. Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages. *Biochemical Journal*, v. 242, n. 3, p. 631–636, 1987. DOI: 10.1042/bj2420631.

PERRY, R. J.; SAMUEL, V. T.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, v. 510, n. 7503, p. 84–91, 2014. DOI: 10.1038/nature13478.

POPI, A. F.; GODOY, L. C.; XANDER, P.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. B-1 cells facilitate *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice via IL-10 secretion. *Microbes and Infection*, v. 10, n. 7, p. 817–824, 2008. DOI: 10.1016/j.micinf.2008.04.012.

POPI, A. F.; MOTTA, F. L. T.; MORTARA, R. A.; SCHENKMAN, S.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. Co-ordinated expression of lymphoid and myeloid specific transcription factors during B-1b cell differentiation into mononuclear phagocytes in vitro. *Immunology*, v. 126, n. 1, p. 114–122, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2008.02883.x.

PUGLIESE, L. S.; GONÇALVES, T. O.; POPI, A. F.; MARIANO, M.; PESQUERO, J. B.; LOPES, J. D. B-1 lymphocytes differentiate into functional osteoclast-like cells. *Immunobiology*, v. 217, n. 3, p. 336–344, 2012. DOI: 10.1016/j.imbio.2011.07.014.

RAMOS, G. B.; CARDOSO, A. L. de P.; SARAIVA, A. M. A. Efeito da crotoxina na diferenciação de linfócitos B-1 em fagócitos derivados de células B-1 (B-1CDP). Trabalho apresentado no *XXVI Encontro de Iniciação Científica e Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da Universidade Paulista – UNIP*, São Paulo, 2024. Disponível em: <https://www.unip.br/encontros-cientificos/assets/download/programacao-completa-encontro-online-23-10-2024.pdf>. Acesso em: 27 maio 2026.

RAWLINGS, D. J.; SCHWARTZ, M. A.; JACKSON, S. W.; MEYER-BAHLBURG, A. Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nature Reviews Immunology*, v. 12, n. 4, p. 282–294, 2012. DOI: 10.1038/nri3190.

REZANIA, A.; BRUIN, J. E.; ARORA, P.; et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, v. 32, p. 1121–1133, 2014. DOI: 10.1038/nbt.3033.

RODRIGUES, M. P.; BARBOSA, C. M. V.; RANEIA-SILVA, P. A.; FAQUIM-MAURO, E. L.; SAMPAIO, S. C. Crotoxin modulates macrophage phenotype and promotes anti-inflammatory and pro-resolving immune responses via regulation of

intracellular signaling pathways. *Toxins*, v. 15, n. 10, art. 616, 2023. DOI: 10.3390/toxins15100616.

RYAN, G. A.; WANG, C. J.; CHAMBERLAIN, J. L.; ATTRIDGE, K.; SCHMIDT, E. M.; KENEFECK, R.; CLOUGH, L. E.; DUNUSSI-JOANNOPOULOS, K.; TOELLNER, K.-M.; WALKER, L. S. K. B-1 cells promote pancreas infiltration by autoreactive T cells. *Journal of Immunology*, v. 185, n. 5, p. 2800–2807, 2010. DOI: 10.4049/jimmunol.1000856.

SAISHO, Y. β -cell dysfunction: its critical role in prevention and management of type 2 diabetes. *World Journal of Diabetes*, v. 6, n. 1, p. 109–124, 2015. DOI: 10.4239/wjd.v6.i1.109.

SEDIQ, A. S.; KLEM, R.; NEJADNIK, M. R.; MEIJ, P.; JISKOOT, W. Label-free, flow-imaging methods for determination of cell concentration and viability. *Pharmaceutical Research*, New York, v. 35, n. 150, p. 1–10, 2018. DOI: 10.1007/s11095-018-2422-5

SERREZE, D. V.; CHAPMAN, H. D.; VARNUM, D. S.; HANSON, M. S.; REIFSNYDER, P. C.; RICHARD, S. D.; FLEMING, S. A. B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new “speed congenic” stock of NOD.Ig mu null mice. *Journal of Experimental Medicine*, v. 184, p. 2049–2053, 1996. DOI: 10.1084/jem.184.5.2049.

SHEN, L.; CHNG, M. H. Y.; ALONSO, M. N.; YUAN, R.; WINER, D. A.; ENGLEMAN, E. G. *B-1a lymphocytes attenuate insulin resistance*. *Diabetes*, v. 64, n. 2, p. 593–603, 2015. DOI: 10.2337/db14-0554

SMITH, F. L.; BAUMGARTH, N. B-1 cell responses to infections. *Current Opinion in Immunology*, v. 57, p. 23–31, 2019. DOI: 10.1016/j.coi.2018.12.001.

SUCHANEK, O.; CLATWORTHY, M. R. Homeostatic role of B-1 cells in tissue immunity. *Frontiers in Immunology*, v. 14, 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1106294.

USP. LEMMC β – Laboratório de Endocrinologia Molecular e Metabolismo. Imunofluorescência de células β pancreáticas. Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://sites.usp.br/lemmcbeta/>. Acesso em: 28/11/2025.

VIVAS-GARCÍA, Y.; EFEYAN, A. The metabolic plasticity of B cells. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 9, art. 991188, 2022. DOI: 10.3389/fmolb.2022.991188.

WANG, Y.; LI, R.; HUANG, Y.; CHEN, H.; NIE, H.; LIU, L.; ZOU, X.; ZHONG, J.; ZHENG, B.; GONG, Q. The role of B cells in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Frontiers in Immunology*, v. 15, p. 1450366, 2024. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1450366.

WONG, F. S.; WEN, L. B cells in autoimmune diabetes. *Reviews in Diabetic Studies*, v. 2, p. 121–135, 2005. DOI: 10.1900/RDS.2005.2.121.

YENSON, V.; BAUMGARTH, N. Purification and immune phenotyping of B-1 cells from body cavities of mice. In: *Methods in Molecular Biology*. v. 2270, p. 27–45, 2021. DOI: 10.1007/978-1-0716-1237-8_2.

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS BALB/c



Instituto Butantan de São Paulo
Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo do potencial terapêutico de linfócitos B-1 produtores de insulina no controle glicêmico no diabetes: investigação funcional, metabólica e epigenética", protocolada sob o CEUA nº 6526280824 (ID 003672), sob a responsabilidade de **Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni e equipe; Anuska Marcelino Alvares Saraiva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan de São Paulo (CEUAIB) na reunião de 29/10/2024.

We certify that the proposal "Study of the therapeutic potential of insulin-producing B-1 lymphocytes in glycemic control in diabetes: functional, metabolic and epigenetic investigation", utilizing 170 Isogenics mice (170 males), protocol number CEUA 6526280824 (ID 003672), under the responsibility of **Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni and team; Anuska Marcelino Alvares Saraiva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute of São Paulo (CEUAIB) in the meeting of 10/29/2024.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 10/2024 a 10/2027 Área: Laboratório de Fisiopatologia

Origem:	Biotério Central			
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	idade: 6 a 8 semanas
Linhagem:	C57BL/6			Quantidade: 30
				Peso: 20 a 25 g
Origem:	Biotério Central			
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	idade: 6 a 8 semanas
Linhagem:	Balb/c			Quantidade: 140
				Peso: 20 a 25 g

São Paulo, 30 de maio de 2026

Luís Roberto de Camargo Gonçalves
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan de São Paulo

Milene Silva Tino
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan de São Paulo



ANEXO 2 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.



Universidade Paulista

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo in vivo do potencial de linfócitos B-1 capacitados metabolicamente à produção de insulina como alvo terapêutico no controle de diabetes mellitus", protocolada sob o CEUA nº 8454220124 (ID 001113), sob a responsabilidade de **Anuska Marcelino Alvares Saraiva e equipe; Ana Paula Soares da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista (CEUA/UNIP) na reunião de 15/03/2024.

We certify that the proposal "In vivo investigation of the potential of B-1 lymphocytes metabolically capable to insulin production as a therapeutic target in the control of diabetes mellitus", utilizing 35 Isogenics mice (35 males), protocol number CEUA 8454220124 (ID 001113), under the responsibility of **Anuska Marcelino Alvares Saraiva and team; Ana Paula Soares da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Paulista University (CEUA/UNIP) in the meeting of 03/15/2024.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2024 a 07/2026** Área: **Patologia Ambiental E Experimental**

Origem:	Biotério de Experimentação			
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	idade: 8 a 12 semanas Quantidade: 20
Linhagem:	BALB/c			Peso: 20 a 25 g
Origem:	Biotério de Experimentação			
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	idade: 8 a 10 semanas Quantidade: 15
Linhagem:	BALB/c XID			Peso: 20 a 25 g

São Paulo, 30 de maio de 2026

Profa. Dra. Maria Martha Bernardi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista

Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista



ANEXO 3 – APROVAÇÃO DO RELATÓRIO PARCIAL DO PROJETO DE PESQUISA



Universidade Paulista

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO : RELATÓRIO PARCIAL v19/02/2026

Certificamos que o RELATÓRIO PARCIAL (versão de 19/02/2026) da proposta intitulada "Estudo in vivo do potencial de linfócitos B-1 capacitados metabolicamente à produção de insulina como alvo terapêutico no controle de diabetes mellitus", CEUA nº 8454220124 (ID 021890), sob a responsabilidade de **Anuska Marcelino Alvares Saraiva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista (CEUA/UNIP) em 12/03/2026.

Pedido apresentado à CEUA: 1. Qual o estágio do estudo no momento? Resp: O estudo encontra-se em andamento. O relatório em anexo corresponde a resultados apresentados como Iniciação Científica (agosto de 2025) e Tese de Doutorado (qualificada em dezembro de 2025). Está em andamento a repetição de 2 grupos experimentais e falta a inclusão da metodologia aprovada no último adendo solicitado, em que o acompanhamento dos animais será feito por 4 meses após a indução de diabetes. Inclusive, após depósito de relatório parcial, será feito um pedido de adendo para inclusão de novos animais, já que diferentemente do previsto, a indução de diabetes não foi consistente e tivemos perdas durante os experimentos. Na solicitação serão dados mais detalhes. 2. Por quanto tempo mais o estudo se estenderá? Resp: O estudo se estenderá até julho de 2027. O último relatório (IC da aluna Nicole na FAPESP) será entregue em janeiro de 2027 e precisamos de tempo hábil caso seja solicitada alguma alteração por parte dos revisores. 3. Resultados parciais ou totais apresentados em congresso? Resp: Sim. Os resultados obtidos até agora já foram apresentados em congressos nacionais, como Encontro Científico da UNIP, Encontro de Iniciação Científica da UNIP (com premiação pelo 1º lugar na área da saúde), Congresso Multidisciplinar da ANAD, Encontro de Meninas e Mulheres Cientistas da SBPC e também no congresso internacional da Sociedade Brasileira de Imunologia durante o ano de 2025. 4. Resultados parciais ou totais já publicados? Resp: Os resultados totais serão publicados após o término das etapas experimentais e apresentação final da tese de Doutorado da aluna Ana Paula e aprovação do relatório FAPESP da aluna Nicole.

Considerações da CEUA: 03/03/2026 : APROVADO - Ref. CEUA Nº 8454220124 Avaliação de relatório parcial. Segundo informações do responsável, o estudo encontra-se em andamento. Foi apresentado relatório completo, contemplando resultados parciais. O estudo se estenderá até julho de 2027. Os resultados foram apresentados em congressos nacionais e internacionais e ainda não foram publicados. Relatório aprovado.

Término previsto: 07/2026

ANIMAIS UTILIZADOS

		Quantidade Aprovada	Quantidade Utilizada
Camundongos isogênicos	Machos	90	80

Profa. Dra. Maria Martha Bernardi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista

Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista



ANEXO 4 – APROVAÇÃO DA EMENDA PARA AUMENTO NO NÚMERO DE ANIMAIS



Universidade Paulista

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO : EMENDA v20/02/2026

Certificamos que a EMENDA (versão de 20/02/2026) da proposta intitulada "Estudo in vivo do potencial de linfócitos B-1 capacitados metabolicamente à produção de insulina como alvo terapêutico no controle de diabetes mellitus", CEUA nº 8454220124 (ID 036038), sob a responsabilidade de **Anuska Marcelino Alvares Saraiva e equipe; Ana Paula Soares da Silva; Lucas Miranda Corona; Nicole Erculana Phelippe** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista (CEUA/UNIP) em 12/03/2026.

Pedido apresentado à CEUA: Os resultados obtidos até o momento têm demonstrado o potencial de linfócitos B-1 reprogramados metabolicamente no controle glicêmico de camundongos diabéticos. Já avançamos na demonstração do potencial da transferência celular adotiva em modular o metabolismo de glicose in vivo e atuar não somente promovendo a normoglicemia, mas também na melhora da tolerância à glicose. Quanto ao rastreamento celular, tivemos dificuldade com a técnica aplicada, uma vez que não foi possível recuperar o sinal fluorescente após o período experimental proposto. No entanto, há evidências do aumento da população de linfócitos B-1 no fígado de camundongos XID de animais que apresentaram normoglicemia após a transferência celular adotiva, apontando o fígado como um órgão alvo para aprofundar as investigações. Independentemente desses achados, em último adendo já havíamos proposto a investigação dos animais por período prolongado, para investigação de potencial transformação maligna das células em órgãos-chave. No final de 2025, foi iniciado o protocolo para este fim, no entanto, nenhum animal desenvolveu diabetes após as injeções de estrptozotocina, totalizando uma perda de 13 camundongos XIDs. Durante todo o estudo, dos 40 BALB/c XID aprovados, 38 foram utilizados. Desse, 1 animal morreu durante o tratamento com STZ para indução de diabetes, 17 foram excluídos do estudo, pois não desenvolveram diabetes (13 animais supracitados + 4 animais do protocolo de observação aguda). 20 animais seguiram no estudo até eutanásia. Para cada XID que será inoculado com linfócitos B-1, performamos uma cultura de células peritoneais aderentes de 2 BALB/c. Durante o estudo, dos 50 BALB/c aprovados, 42 animais foram utilizados. Desse, houve perda de, pelo menos, 24 animais, pois uma vez iniciada a cultura, não conseguimos recuperar as células, caso a indução de diabetes não seja satisfatória. Ainda, após passar por exame de qualificação, foi proposto pela banca um controle adicional ao estudo, tratando-se de animais XID que não passarão pelas injeções com STZ ou pela transferência adotiva de linfócitos B-1 reprogramados metabolicamente, n=3. Deste modo, para reprodução do protocolo experimental proposto, incluindo reposição de perda experimental e que ainda será executado, serão necessários 20 BALB/c XID e 35 BALB/c adicionais para finalizar as etapas experimentais, já contando com possíveis perdas devido à indução de diabetes. Informamos que todos os procedimentos experimentais já foram apresentados à CEUA no projeto. Nesta proposta, segue em anexo os resultados obtidos até o momento (Relatório Parcial) e outro arquivo com os procedimentos que ainda serão executados (Projeto IC FAPESP Nicole) para esclarecimento. Esperando contar com o apoio desta CEUA para continuar e finalizar este estudo que tem se demonstrado de alta relevância científica, traduzida pelo apoio FAPESP e premiações concedidas pela apresentação de seus resultados parciais, subscrevemos atenciosamente e nos mantemos à disposição para quaisquer esclarecimentos.

Considerações da CEUA: 03/03/2026 : APROVADO - Ref. CEUA Nº 8454220124 Apreciação de solicitação de emenda para o acréscimo de sujeitos experimentais. Foram apresentadas justificativas no sentido de intercorrências metodológicas durante a execução do estudo e a necessidade de inclusão de um novo grupo controle. Solicitação aprovada.

Término previsto: 07/2026

Origem: Biotério de Experimentação

Espécie: Camundongos isogênicos	sexo: Machos	idade: 8 a 12 semanas	Quantidade solicitada: +35
Linhagem: BALB/c		Peso: 20 a 25 g	

Origem: Biotério de Experimentação

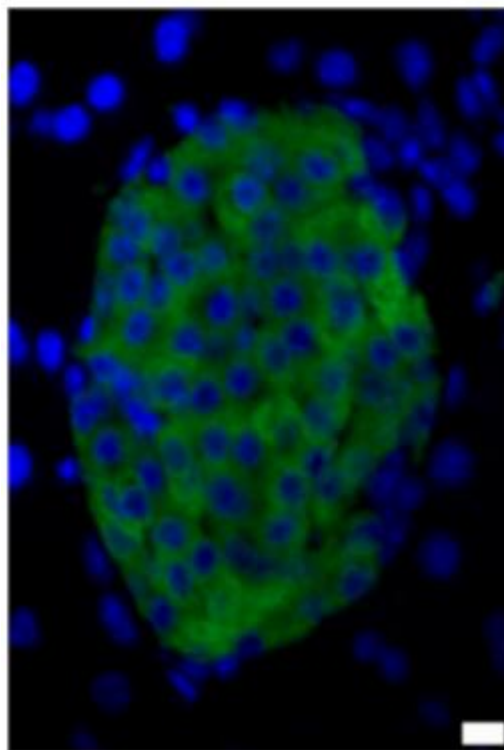
Espécie: Camundongos isogênicos	sexo: Machos	idade: 8 a 10 semanas	Quantidade solicitada: +20
Linhagem: BALB/c XID		Peso: 20 a 25 g	

ANIMAIS UTILIZADOS

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Camundongos isogênicos	Machos	145	0



ANEXO 5 - CÉLULA B PANCREÁTICAS CORADAS POR IMUNOFLOURESCÊNCIA, EM VERDE A PRODUÇÃO DE INSULINA E AZUL OS NÚCLEOS CELULARES.



Fonte: LEMMC β – Laboratório de Endocrinologia Molecular e Metabolismo, USP.
Disponível em: <https://sites.usp.br/lemmcbeta/>