

***KARLA PRISCILA VIEIRA FERRO***

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO  
GANGLIOSÍDEO GM1 NA MODULAÇÃO DO DIABETES  
MELLITUS AUTOIMUNE E EXPRESSÃO DE CITOCINAS,  
NERVE GROWTH FACTOR E SEU RECEPTOR TRKA EM  
CAMUNDONGOS NOD (NON OBESE DIABETIC)**

***CAMPINAS***

***2007***

**KARLA PRISCILA VIEIRA FERRO**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO  
GANGLIOSÍDEO GM1 NA MODULAÇÃO DO DIABETES  
MELLITUS AUTOIMUNE E EXPRESSÃO DE CITOCINAS,  
NERVE GROWTH FACTOR E SEU RECEPTOR TRKA EM  
CAMUNDONGOS NOD (NON OBESE DIABETIC)**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual  
de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Clínica  
Médica, área de concentração em Ciências Básicas.*

*Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner*

**CAMPINAS**

**2007**

*FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA*

*BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP*

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

F417a

Ferro, Karla Priscila Vieira

Avaliação dos efeitos da administração do gangliosídeo GM1 na modulação do diabetes mellitus autoimune e expressão de citocinas, Nerve Growth Factor e seu receptor TrKA em camundongos NOD (non obese diabetic) / Karla Priscila Vieira Ferro. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Ricardo de Lima Zollner  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Gangliosídeos. 2. Diabetes tipo 1. 3. Citocinas. 4. Camundongos NOD. I. Zollner, Ricardo de Lima. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Effects of GM1 administration on autoimmune diabetes modulation and cytokines expression, Nerve Growth Factor and TrKa receptor in NOD mice (non obese diabetic)**

**Keywords:** • Gangliosides  
• Diabetes Mellitus type 1  
• Cytokines  
• NOD Mice

**Área de concentração : Ciências Básicas**

**Titulação: Mestrado em Clínica Médica**

*Banca examinadora: Prof Dr Ricardo de Lima Zollner*

**Profa. Dra. Paulina Sannomiya  
Prof Dr Rogério Frigerio Castilho**

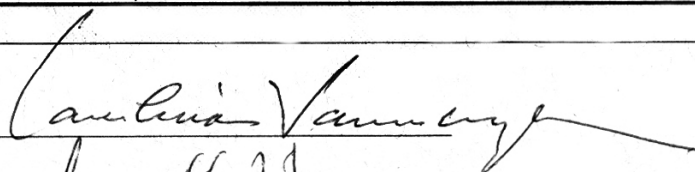
*Data da defesa: 12-02-2007*

## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

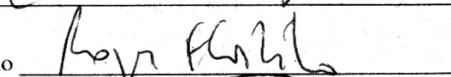
Orientador(a): *Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner*

### Membros:

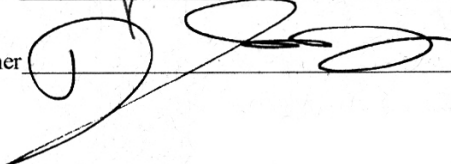
1. Prof(a). Dr(a) Paulina Sannomiya



2. Prof(a). Dr(a). Roger Frigério Castilho



3. Prof(a). Dr(a). Ricardo de Lima Zollner



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 12/02/2007.

## **DEDICO**

*Às pessoas que mais amo:*

*Aos meus pais, Carlos e Iredi, meu espelho em muitos aspectos, exemplos de integridade, honestidade e dedicação. Agradeço o amor verdadeiro, esforço incansável para me proporcionar o melhor, o carinho, o incentivo, o apoio incondicional. Este trabalho também é mérito de vocês!*

*Ao meu marido Marcos, que acompanhou todo o meu crescimento pessoal e profissional, sempre com palavras de incentivo, conforto e otimismo, acreditando e me fazendo acreditar no meu potencial. Por toda sua paciência e compreensão pelos momentos de ausência necessários para esta conquista, agradeço.*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

---

*Ao meu orientador, Prof. Ricardo de Lima Zollner, pelos ensinamentos e valiosa orientação, pelo incentivo e confiança em meu trabalho.*

## ***AGRADECIMENTOS***

---

Aos Professores Roger Frigerio Castilho e Paulina Sannomiya por aceitarem compor a presente banca, pelas sugestões e considerações.

A todos que fizeram ou ainda fazem parte da equipe do Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental: Dr Ricardo, Ana Paula, Ana Rachel, Carina, Conceição, Fabiola, Giovanna, Gláucia, Léo, Maira, Meg, Priscila, Rika, Rhubia e Thiago. Com todos vocês aprendi o verdadeiro significado do trabalho em equipe!!!

A Conceição, pela amizade, companheirismo e auxílio em todas as etapas deste trabalho. Pelo exemplo de fé, paciência e humildade. Por ser minha “mãe-irmã-amiga”.

A Carina, Giovanna, Gláucia, Priscila, Rika e Rhubia, por toda solidariedade, disponibilidade para qualquer situação e acima de tudo pela amizade. Vocês se tornaram parte importante da minha vida!

A Meg, por todo carinho, palavras de conforto, por toda sua boa-vontade e prontidão.

Ao Prof. Dr. Lício Augusto Velloso pelo uso e disponibilização do microscópio de fluorescência.

Ao Prof. Dr. Gentil Alves Filho e funcionários do Laboratório de Nefrologia/FCM por permitirem o uso do microscópio.

A Cristiane, secretária da Pós-Graduação/Clínica Médica, pela disposição e paciência (principalmente!).

A TRB Pharma pela doação do gangliosídeo GM1 utilizado neste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

	<i>Pág.</i>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xi</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xiii</i>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1.1 - O Diabetes Mellitus</b> .....	16
<b>1.2 – Camundongos NOD (Non Obese Diabetic)</b> .....	18
<b>1.3- Imunoregulação, citocinas e destruição das ilhotas pancreáticas</b> .....	21
<b>1.4- Neurotrofinas</b> .....	24
1.4.1- NGF.....	25
<b>1.5- Gangliosídeos e seu potencial imunomodulador</b> .....	26
1.5.1- GM1.....	29
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	30
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
<b>3.1- Animais</b> .....	33
<b>3.2- Grupos experimentais</b> .....	33
<b>3.3- Diagnóstico do diabetes e sacrifício dos animais</b> .....	34
<b>3.4- Análise morfológica</b> .....	34
<b>3.5- Imunofluorescência</b> .....	38
3.5.1- CD4+, CD8+ e CD11+.....	38
3.5.2- NGF e TrkA.....	38
3.5.3- GM1.....	39
<b>3.6- Isolamento de células mononucleares do baço</b> .....	41
<b>3.7- Isolamento de ilhotas</b> .....	42
<b>3.8- Extração de RNA total (RNAT)</b> .....	43
<b>3.9- Análise do RNA total extraído</b> .....	44



<b>3.10- Transcrição reversa do rna total extraído (CDNA) .....</b>	<b>44</b>
<b>3.11- Amplificação de CDNA por reação de polimerase em cadeia (PCR) .....</b>	<b>45</b>
<b>3.12- Análise dos produtos da reação em cadeia de polimerase (PCR) por eletroforese em gel de agarose.....</b>	<b>46</b>
<b>3.13- Análise semiquantitativa dos produtos de PCR.....</b>	<b>46</b>
<b>3.14- ELISA - citocinas.....</b>	<b>47</b>
3.14.1- IL-12, IFN- $\gamma$ e IL-1 $\beta$ .....	47
3.14.2- TNF- $\alpha$ .....	47
<b>3.15- Análise estatística.....</b>	<b>48</b>
<b>3.16- Formatação do texto.....</b>	<b>48</b>
<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<b>4.1- Efeito do tratamento com GM1 sobre a manifestação do diabetes autoimune espontâneo.....</b>	<b>50</b>
<b>4.2- Efeito do tratamento com GM1 sobre o processo inflamatório e índice de infiltrado nas ilhotas pancreáticas.....</b>	<b>51</b>
<b>4.3- Imunofluorescência.....</b>	<b>52</b>
<b>4.4- Efeitos da administração de GM1 sobre a expressão gênica de citocinas, ngf e trka em ilhotas pancreáticas isoladas e células esplênicas.....</b>	<b>58</b>
4.4.1- Ilhotas.....	58
4.4.2- Células Esplênicas.....	61
<b>4.5- Efeitos da administração de GM1 sobre a concentração sérica de citocinas - ELISA.....</b>	<b>64</b>
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>6- CONCLUSÕES.....</b>	<b>74</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>76</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

---

<b>APC</b>	Células apresentadoras de antígeno
<b>BDNF</b>	Brain derived neurotrophic factor
<b>CD</b>	Cluster designation
<b>cDNA</b>	Dna complementar
<b>CEMIB</b>	Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica
<b>CFA</b>	Adjuvante completo de Freund
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbamato
<b>DM-1</b>	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
<b>DM-2</b>	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxinucleotídio tri-fosfato
<b>GABA</b>	Ácido aminobrutérico gama
<b>GAD</b>	Glutamato descarboxilase
<b>GFAP</b>	Glial fibrillary acidic protein
<b>GM1</b>	Monossialotetraexosilgangliosídeo
<b>GM1-DB</b>	Grupo GM1 diabético
<b>GM1-ND</b>	Grupo GM1 não-diabético
<b>HE</b>	Hematoxilina e eosina
<b>HSP 65</b>	Proteína de choque térmico 65
<b>ICA</b>	Islet cells antibodies
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>LIAE</b>	Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental

<b>MHC</b>	Complexo de histocompatibilidade principal
<b>NGF</b>	Nerve growth factor
<b>NK</b>	Natural killer
<b>NOD</b>	Non obese diabetic/diabético não-obeso
<b>NT-3</b>	Neurotrofina 3
<b>NT-4/5</b>	Neurotrofina 4/5
<b>PBS</b>	Salina fosfatada tamponada
<b>PTK</b>	Proteína quinase
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>RNA<sub>T</sub></b>	Ácido ribonucléico total
<b>RT-PCR</b>	Reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa
<b>Salina – DB</b>	Grupo salina diabético
<b>Salina - ND</b>	Grupo salina não diabético
<b>SBF</b>	Soro fetal bovino
<b>SPF</b>	Specific pathogen free
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor $\beta$
<b>Th</b>	T auxiliar/T helper
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral-alfa
<b>TNF-R</b>	Receptor de fator de necrose tumoral
<b>TrkA</b>	Tyrosine receptor kinase A
<b>TrkB</b>	Tyrosine receptor kinase B
<b>TrkC</b>	Tyrosine receptor kinase C
<b>UA</b>	Unidades arbitrárias



## ***RESUMO***

A linhagem de camundongos NOD (non obese diabetic) desenvolve espontaneamente diabetes mellitus tipo 1 (DM-1) com marcante similaridade ao observado em humanos, que se estabelece entre 12<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> semana de vida, com presença de autoanticorpos específicos contra antígenos pancreáticos. Grande parte das células encontradas são linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e, embora células NK, linfócitos B, células dendríticas e macrófagos também possam ser identificados nas lesões, o desenvolvimento da doença é primariamente dependente de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> auto-reativos. A diferenciação e funcionamento de células  $\beta$  são regulados por uma variedade de hormônios e fatores de crescimento, incluindo Nerve Growth Factor (NGF). Sabe-se que células- $\beta$  pancreáticas expressam receptores funcionais para NGF e esta neurotrofina induz modificações morfológicas e fisiológicas, incluindo estimulação da secreção de insulina. Estudos de terapias para o DM-1 baseadas na intervenção sobre o sistema imunológico revelam que estas podem ser estratégias promissoras para impedir a instalação e/ou evolução da doença. Neste contexto, investigamos os efeitos da administração de GM1 sobre a incidência do DM-1 e insulite em camundongos NOD, expressão de citocinas, NGF e seu receptor de alta afinidade TrkA. Nossos resultados sugerem que administração de GM1 na dose de 100mg/kg/dia em camundongos NOD fêmeas a partir da 4<sup>a</sup> semana de vida é capaz de diminuir o índice de infiltrado inflamatório e conseqüentemente a expressão do diabetes, modulando negativamente o infiltrado inflamatório bem como a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), além de aumentar a expressão gênica e protéica de NGF e TrkA, que pode atuar como regulador de sobrevivência da célula  $\beta$  de maneira a inibir a apoptose desta célula.



***ABSTRACT***

The strain of NOD mice (non obese diabetic) spontaneously develops diabetes mellitus type 1 (DM-1) with strong similarity to the observed in humans. In this model, the diabetes manifestation occurs among 12<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> weeks of life, with presence of pancreas-specific autoantibodies. Great part of the cells are CD4+ and CD8+T cells, and even so NK cells, lymphocytes B, dendritic cells and macrophages also can be identified in the injuries, the development of the disease is essentially dependent of autoreactive CD4+ and CD8+ T cells. It was demonstrated that  $\beta$  - pancreatic cells express NGF functional receptors and that this neurotrophin induces morphological and physiological modifications in pancreatic  $\beta$  cells, including stimulation in insulin secretion. The inquiries of therapies for the DM-1 based on the intervention on the immune system disclose that these can be promising strategies to hinder the installation and/or evolution of the disease. In this context, we investigate the effect of GM1 administration on the incidence of DM-1 and insulinitis in NOD mice, cytokines expression, NGF and its high affinity receptor TrkA. Our results suggest that administration of GM1 in the dose of 100mg/kg/dia in female NOD mice from 4<sup>a</sup> week of life are capable to reduce the index of inflammatory infiltrated and consequently the expression of diabetes, down-modulating the inflammatory infiltrated as well as the gene expression of pro-inflammatory cytokines (IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ), besides increasing the gene and protein expression of NGF and TrkA, that can act as regulating of  $\beta$  cell - survival in way to inhibit apoptosis of this cell.



## ***1- INTRODUÇÃO***



## 1.1 - O Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus é definido como desordem metabólica de múltipla etiologia caracterizada por hiperglicemia crônica, que afeta o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, resultante do déficit de produção de insulina pancreática e/ou da presença de fatores que se opõem à ação desse hormônio. Considerando-se as características etiológicas do diabetes mellitus e seus mecanismos desencadeantes, essa doença é classificada em quatro tipos: a) Diabetes mellitus tipo 1; b) Diabetes mellitus tipo 2; c) outros tipos específicos de diabetes, incluindo diabetes secundário ou associado a outras patologias; e d) diabetes mellitus gestacional [1].

O diabetes mellitus tipo 1 (DM-1) autoimune tem como característica geral início agudo, acometendo mais freqüentemente crianças e adolescentes. O(s) fator (es) desencadeante(s) e os mecanismos envolvidos na sua evolução, ainda não são totalmente elucidados [1-4].

No DM-1, o processo inflamatório nas ilhotas pancreáticas apresenta-se como infiltração progressiva de células mononucleares com destruição seletiva de células  $\beta$  produtoras de insulina, resultando na deficiência desse hormônio, mediada por clones auto-reativos de linfócitos T [5-7]. Esse processo seria decorrente da perda da tolerância desses linfócitos a determinados constituintes da célula  $\beta$  pancreática [8-10]. Além disso, o estudo do diabetes mellitus autoimune espontâneo em modelos animais experimentais, fortalece a hipótese da ocorrência de desequilíbrio entre sub-populações de células T efectoras e protetoras na indução do diabetes [8, 11, 12].

Vários são os mecanismos propostos para ruptura da tolerância imunológica no DM-1, explorados em modelos experimentais murinos associados a distúrbios da tolerância central tímica e, sobretudo da tolerância periférica pós-tímica. Assim, a manifestação do DM-1 seria decorrente da crescente falha no bloqueio, anergia e/ou supressão periféricas da reatividade anti-células  $\beta$ . Desta maneira, estes distúrbios convergiriam para a resposta comandada por linfócitos T CD4+ contra constituintes da célula  $\beta$ , processados e expostos por células apresentadoras de antígeno (APC), favorecendo deste modo a manifestação do DM-1 [13, 14].

Embora linfócitos T auto-reativos participem ativamente na patogênese do diabetes autoimune, autoanticorpos anticélula da ilhota ou ICA (“islet-cell antibodies”), descritos em 1974 por BOTTAZZO *et al* [15] desempenham importante papel no diagnóstico da doença [10]. ICA são anticorpos policlonais que reagem com as células  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  da ilhota pancreática [1]. A especificidade de autoanticorpos presentes no soro de pacientes com DM-1 e animais diabéticos tem sido extensivamente investigada. Os ICA são detectados precocemente antes da manifestação clínica do diabetes e são considerados marcadores imunológicos do DM-1 sem efeito patogênico direto [16].

Um número cada vez maior de antígenos presente nas células das ilhotas vem sendo identificado, entre eles: sialoglicolípídeo, insulina, receptor de insulina, transportador de glicose (GLUT-2), proteína de choque térmico 65 (hsp 65), carboxipeptidase H, ICA 512/IA-2 (tyrosine phosphatase-like) [1, 2, 17]. A proteína glutamato descarboxilase (GAD) encontrada na membrana das células  $\beta$  é o principal marcador no DM-1, o qual converte ácido glutâmico em ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central [18-20]. O GAD possui duas formas isoméricas denominadas GAD<sub>65</sub> e GAD<sub>67</sub>, os quais estão presentes em 85-90% dos indivíduos com DM-1 [2, 12, 21-23].

Por outro lado, considera-se que a expressão de peptídeos imunogênicos na célula  $\beta$ , induzidos por toxinas e infecções virais, poderia aumentar a suscetibilidade a reações autoimunes [24]. Diversos autores têm investigado a hipótese de susceptibilidade da célula  $\beta$  pancreática a fatores variados de agressão como os radicais livres e, especialmente, os oriundos do sistema imunológico, como as citocinas [1, 25-27]. Além disso, a predisposição genética do indivíduo para a destruição autoimune, juntamente com fatores ambientais, parece favorecer o desencadeamento de mecanismos de autoimunidade.

Nesse cenário em particular, deve-se considerar o papel fundamental do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) na predisposição genética ao DM-1 com a associação de genes I<sup>A</sup> e I<sup>E</sup>. Esses genes influenciam o desenvolvimento do DM-1 através da seleção positiva de clones auto-reativos no timo (presença de alelos de suscetibilidade); pela ausência de seleção negativa no timo (falta de alelos protetores para

delir clones auto-reativos) e, ainda pela ausência de anergia periférica de clones auto-reativos (gradiente de afinidade do MHC com o complexo peptídeo/TCR e ausência de linfócitos T supressores restritos ao MHC) [28-30].

Outro aspecto importante do envolvimento direto dos linfócitos na determinação do DM-1 é a produção e liberação de citocinas por essas células no decurso da insulite. Tais moléculas mediarão o processo inflamatório local, alterando a função das células  $\beta$  e contribuindo para a destruição das ilhotas pancreáticas [31]. Neste sentido, embora os mecanismos de destruição das ilhotas mediados por citocinas não estejam ainda bem caracterizados, diversos trabalhos têm evidenciado que os efeitos citotóxicos dessas moléculas sobre as ilhotas pancreáticas induzem a apoptose das células  $\beta$  [32-34].

As ilhotas de Langerhans são circundadas por teia de fibras frouxas nervosas e por um tipo de células de Schwann não-mielinizadas, marcadas pela expressão das proteínas S100 $\beta$  e GFAP (glial fibrillary acidic protein) [35, 36]. Antes de invadir as ilhotas, as células do sistema imune se acumulam fora das ilhotas em associação muito próxima à rede de células de Schwann. Com o avanço da insulite, estas células são destruídas [36, 37]. Entretanto, ainda não está confirmado se a perda de tolerância às células de Schwann é um passo crucial para o desenvolvimento do DM-1 [37].

A análise da patogênese do diabetes em humanos é limitado e por essa razão é importante destacar que grande parte das informações que sustentam a hipótese da participação dos linfócitos T na imunopatogênese do DM-1 decorre de investigação em modelos animais geneticamente predispostos a essa doença, como os camundongos da linhagem NOD (diabético não obeso), que desenvolvem espontaneamente o diabetes autoimune.

## **1.2 – Camundongos NOD (*Non obese Diabetic*)**

Os camundongos NOD representam modelo experimental descrito por MAKINO *et al.* (1980) que desenvolvem espontaneamente diabetes mellitus autoimune com marcante similaridade ao observado em humanos. Desde seu desenvolvimento, esta

linhagem é utilizada para entender os complexos processos envolvidos em doenças autoimunes. A linhagem de camundongos NOD foi inicialmente desenvolvida no Japão, após o cruzamento de sublinhagem CTS (propensa à catarata) com uma linhagem não consanguínea ICR. O primeiro relato de DM-1 espontâneo foi observado em apenas um camundongo fêmea e a partir de cruzamentos seletivos de sua prole, a linhagem NOD isogênica foi estabelecida em 1980 no Laboratório SHIONOGI ABURAHY como modelo animal para o DM-1 [38].

No Brasil, a linhagem foi introduzida e implantada na Universidade Estadual de Campinas por PAVIN & ZOLLNER (1994) [39], a partir de colônias matrizes provenientes do laboratório INSERM U-25-Necker, Paris, França.

A colônia NOD/Shi demonstrou prevalência de diabetes entre 70-80% para fêmeas e 20% para machos. Contudo, diferenças na manifestação do diabetes entre diversas colônias têm sido relatadas. A colônia NOD estabelecida e mantida no Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB) em condições livres de patógenos (SPF), apresenta prevalência de diabetes entre 60-90% nas fêmeas e 5-20% nos machos. Fatores ambientais como dieta e exposição a vírus têm sido considerados como causa das diferenças de incidência [5, 40].

O DM-1 clínico neste modelo animal desenvolve-se espontaneamente entre a 12<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> semana de vida, mais freqüentemente em fêmeas. Polidipsia, poliúria, glicosúria elevada, hiperglicemia e deficiência de insulina são observados nestes animais, acompanhados de uma rápida perda de peso [38]. Estudos histológicos evidenciaram que ao redor do primeiro mês de vida são observadas poucas células imunes infiltradas nas ilhotas com subseqüentes infiltrados mononucleares que circundam as ilhotas, caracterizando peri-insulite. Estes infiltrados de células mononucleares nas ilhotas pancreáticas progridem e invadem as ilhotas (insulite). Neste período, grande parte das células encontradas são linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e, embora células NK, linfócitos B, células dendríticas e macrófagos também possam ser identificados nas lesões, o desenvolvimento da doença é primariamente dependente de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> [5, 13, 24, 41].

Assim, células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> exercem papel sinérgico, uma vez que o diabetes apenas se desenvolverá na presença de ambos os subtipos [41]. Portanto, linfócitos T CD4<sup>+</sup> podem ter papel essencial, não somente no início da insulite, como também na progressão do diabetes, uma vez que sua eliminação através da utilização de anticorpos monoclonais anti-CD4<sup>+</sup> pode suprimir a insulite e, conseqüentemente, o aparecimento do diabetes no camundongo NOD [42]. Linfócitos CD4<sup>+</sup> são predominantemente observados na fase precoce da infiltração da ilhota (periinsular), onde são requeridos nos processos de expansão clonal através da produção de IL-2 e, dessa forma, aumentam a ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> [41]. A proporção de células CD8<sup>+</sup> no infiltrado de células T cresce substancialmente com o tempo de destruição das células produtoras de insulina [43]. Entretanto, existem evidências do papel dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> na fase efetora final da patogênese do diabetes, independente da presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> [44, 45]. Dentre os mecanismos de destruição das ilhotas pancreáticas está a capacidade de realizar funções citotóxicas através da utilização de grânulos de perforinas e granzimas bem como indução de apoptose através da interação Fas/Fas-L [46-48].

Dessa maneira, linfócitos T auto-reativos desempenham papel crucial no aparecimento do diabetes nesses animais e a ineficiência de sua eliminação pode contribuir para a manifestação da doença. Assim, observou-se que a prevenção do DM espontâneo no camundongo NOD pode ser obtida através da timentomia neonatal. Além disso, em camundongos NOD/nude (atímicos), verifica-se redução da incidência de insulite sem manifestação do diabetes [49]. Muitos estudos têm demonstrado que o DM-1 pode ser induzido através da transferência de células recém isoladas de baço de camundongos NOD diabéticos para camundongos NOD jovens não diabéticos, camundongos NOD irradiados e camundongos NOD-SCID, os quais não desenvolvem diabetes [41, 50, 51]. Complementando essas observações, autores descreveram que a administração de imunossupressores com função direcionada preferencialmente para linfócitos T e administração de anticorpos anti-CD3<sup>+</sup> [52] são capazes de suprimir a ocorrência do DM autoimune espontâneo [24, 41, 53, 54].

No conjunto, essas observações relacionadas à participação de linfócitos T tanto na insulite e, evolutivamente no diabetes, têm reforçado, direta ou indiretamente, a hipótese da etiologia autoimune. Contudo, apesar de experimentos com camundongos NOD fornecerem evidências do papel chave de substâncias mediadoras da destruição das células  $\beta$  produzidas por linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$ , existem evidências da presença de mecanismos efetores finais apoptóticos pelos quais essas células são destruídas.

### **1.3- Imunoregulação, Citocinas e Destruição das Ilhotas Pancreáticas**

A resposta imune é coordenada por linfócitos T auxiliares (*Th-Helper*) cujas funções diferem de acordo com o estímulo antigênico e condições do microambiente no qual ocorre a resposta. Desta forma, os linfócitos Th são subdivididos nos fenótipos de resposta Th1, caracterizados pela expressão local de citocinas específicas como IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . A resposta Th1 genericamente manifesta-se nas doenças autoimunes mediando a inflamação através da resposta imune celular, representada pelos linfócitos T citotóxicos, “natural killer” e macrófagos. Por outro lado, o fenótipo Th2 direciona resposta imune humoral com liberação local de citocinas do tipo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 [55]. No contexto dos possíveis mecanismos envolvidos nas desordens autoimunes, o desequilíbrio entre as populações de células Th1 e Th2 com predominância do fenótipo Th1 parece ter substrato na fisiopatologia da quebra de tolerância e reações autoimunes que ocorrem na linhagem de camundongos NOD [56].

A hipótese na qual a destruição das células  $\beta$  ocorre quando há predomínio de citocinas do tipo Th1 sobre Th2 é proveniente de experimentos de imunidade passiva empregando-se linfócitos  $CD4^+$  de camundongos NOD, tratados com superantígenos incorporados a adjuvante completo de Freund (CFA). A transferência destes linfócitos para animais NOD com 4 semanas de vida evitou a ocorrência do diabetes, em virtude de provável desvio da resposta imune de Th1 para Th2, devido a ação do superantígeno, com liberação de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10) [57, 58]. Postulou-se, então, que os mecanismos deste tipo de proteção envolveriam ação seletiva sobre certas sub-populações linfocitárias T  $CD4^+$ , desviando a resposta imune de padrão Th1 para Th2 com ampliação da resposta humoral, modulando a resposta celular no sentido de retorno a homeostasia imune.

O padrão de resposta observado em pacientes com DM-1 bem como em camundongos NOD, é marcado pelo predomínio de citocinas características da resposta Th1 [31, 32, 55, 59-61]. Acredita-se ainda, que haja o envolvimento direto das células linfocitárias designadas células efectoras sobre as células  $\beta$  pancreáticas, designadas células-alvo, resultando na liberação de mediadores solúveis responsáveis pelo processo inflamatório local contribuindo para a destruição das ilhotas [31, 32, 61].

No campo experimental, diversos autores têm estudado os efeitos *in vitro* de citocinas como IL-1, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  utilizando ilhotas isoladas de modelos animais. Nas ilhotas pancreáticas recém isoladas, os efeitos dessas citocinas têm sido amplamente estudados [33, 55] mostrando que são capazes de, isoladamente, inibir a liberação de insulina pelas ilhotas pancreáticas e, combinadas, de induzir a fragmentação do DNA e destruição das células  $\beta$  pancreáticas [55, 62, 63]. Contudo, é possível que estudos *in vitro* não representem a magnitude da fisiopatologia da lesão pancreática que ocorre *in vivo*. A simples presença da citocina na lesão da insulite não identifica seu papel na patogênese do DM-1, uma vez que esta pode ter função pró-inflamatória, ou mesmo anti-inflamatória, regulando desta maneira, o processo inflamatório [32].

O IFN- $\gamma$  é produzido por células NK e linfócitos T através de estimulação por outras citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-18) derivadas de macrófagos. Embora IFN- $\gamma$  seja originalmente definido por sua atividade antiviral, esta citocina possui efeitos imunomodulatórios que podem estar envolvidos na patogênese do DM-1, e dentre eles podemos citar regulação da expressão de moléculas MHC, desenvolvimento de fenótipo celular tipo 1, ativação de macrófagos, bem como apoptose e adesão [64]. No camundongo NOD, a expressão de IFN- $\gamma$  nas células infiltradas das ilhotas foi relacionada com a insulite destrutiva [33, 65, 66]. Essa citocina, assim como TNF- $\beta$ , tem expressão aumentada de forma consistente com o envelhecimento dos camundongos NOD sugerindo que a destruição da ilhota e a manifestação do DM-1 associam-se com o aumento de sua produção pelas células do infiltrado inflamatório [67].

Já IL-1 $\beta$  é produzida principalmente por macrófagos ativados e afeta quase todos os tipos celulares, frequentemente em conjunção com outras citocinas [68]. Pode induzir danos ao DNA bem como morte celular [64].

Outra citocina importante na patogênese do DM-1 é TNF- $\alpha$ , produzido principalmente por macrófagos ativados e linfócitos T. O TNF- $\alpha$  possui uma variedade de atividades que incluem a regulação de moléculas de adesão em células endoteliais para promover a migração de leucócitos para as ilhotas [69], indução de expressão de moléculas de MHC classe I e II nas ilhotas pancreáticas [70] e ativação de APCs e linfócitos T [64]. Apesar dos efeitos diretos do TNF- $\alpha$  sobre as células  $\beta$  e progressão do diabetes permanecerem ainda não totalmente elucidados, há evidências de que esta citocina seja capaz de induzir a apoptose de células  $\beta$  [64].

Como referido anteriormente, variedade de mecanismos tem sido proposta para explicar os efeitos citotóxicos das citocinas nas ilhotas pancreáticas, os quais incluem a formação de óxido nítrico que é mediador citotóxico da ação dessas citocinas, por induzir a lise das células das ilhotas precedendo a lesão do DNA e ocasionando a sua destruição [32, 61, 71]. Sendo assim, pode-se sugerir que a destruição das células  $\beta$  ocorre por apoptose onde a fragmentação de DNA típica tem sido observada em ilhotas pancreáticas tratadas com a combinação de IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  [33, 63, 72].

Baseando-se em experimentos com camundongos NOD, outros mediadores também são capazes de efetuar a destruição das células  $\beta$ . Dentre os mediadores envolvidos nessa destruição incluem-se: conteúdos granulares das células T CD8<sup>+</sup>, como perforinas e granzimas, moléculas de superfície como Fas, Fas-L, TNF-R e outros membros da família TNF, reconhecidos por induzir a fragmentação do DNA e mudanças morfológicas características da apoptose através de sinalização de receptores que envolvem a ativação de proteases ou caspases [48, 64].

Desta forma, de acordo com estes dados experimentais, fica evidente que o controle da resposta imune é múltiplo e, provavelmente, depende da somatória de efeitos de



várias citocinas que constituem um microambiente propício para a destruição das ilhotas pancreáticas.

#### **1.4- Neurotrofinas**

Há cinquenta anos, um polipeptídeo que induz crescimento neuronal foi descoberto e denominado fator de crescimento neuronal (Nerve Growth Factor - NGF) [73]. Algumas décadas mais tarde, uma série de outras moléculas com função e estrutura similares foram identificadas e, juntas, formam uma família de polipeptídeos de fatores de crescimento denominada neurotrofinas. Além do NGF, essa família compreende: fator neurotrófico cérebro-derivado (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3) e neurotrofina-4/5 (NT-4/5), sendo encontrados em todos os tetrápodes, com exceção de NT-4/5 que não foi identificado em aves. As neurotrofinas provavelmente são oriundas da duplicação de um gene ancestral, cujos dois genes intermediários deram origem ao NGF e NT-3, e ao BDNF e NT-4/5, respectivamente [74].

As neurotrofinas ligam-se a dois tipos de receptores com constantes de dissociação de  $10^{-9}$  M e  $10^{-11}$  M, denominados como receptores de baixa afinidade e de alta afinidade, respectivamente [75, 76]. O receptor de baixa afinidade é o  $p75^{\text{NTR}}$  [77, 78]. Seu papel funcional ainda não está bem fundamentado [79, 80]. Entretanto, sabe-se que age como co-receptor para os receptores de alta afinidade [81] e como mediador de programas pró-apoptóticos induzidos por NGF dependendo do estágio de desenvolvimento celular bem como de seu estado fisiológico [82-85].

Os receptores tirosina quinase (Trk) TrkA (gp140trkA), TrkB (gp145trkB) e TrkC (gp145trkC) agem como receptores específicos e de alta afinidade de neurotrofinas [76, 86-88]. Estes receptores Trk possuem um domínio extracelular, que se liga a diferentes neurotrofinas, e um domínio citosólico, em que a atividade tirosina-quinase é essencial para a transdução sinal. Cada membro da família Trk possui ligantes preferenciais entre as neurotrofinas [89]. NGF liga-se preferencialmente ao TrkA, que também liga com eficiência mais baixa, NT-3 e NT-4/5 [90, 91]. TrkB é o receptor para BDNF e , em menor extensão, para NT-3 [91, 92]. Já TrkC interage exclusivamente com NT-3 [93].

Como ocorre com as neurotrofinas, os genes codificadores dos receptores Trk provavelmente também são oriundos de um gene ancestral comum. Dessa maneira, neurotrofinas e receptores Trk estão presentes em todos os vertebrados e suas seqüências são altamente conservadas ao longo da filogenia [74, 94].

As ações das neurotrofinas no sistema nervoso foram amplamente estudadas e são extensivamente revisadas, embora o conceito de que o papel das neurotrofinas está confinado à células do sistema nervoso venha sendo reconsiderado [95]. Assim, alguns estudos têm revelado ações significantes das neurotrofinas em uma variedade de tecidos fora do sistema nervoso, especialmente, no sistema imune [95-99].

#### 1.4.1- NGF

NGF, um dos fatores neurotróficos mais estudados, possui papel crucial na sobrevivência e desenvolvimento de neurônios cerebrais e periféricos [100-102]. Recentemente, no entanto, numerosos estudos revelam que NGF não age somente em células dos sistemas nervoso periférico e central; também possui ação nos sistema imunológico e endócrino, sendo produzido e liberado por uma variedade de células [95-99]

Os efeitos biológicos do NGF em células imunohematopoiéticas são similares aos encontrados em células nervosas, sendo mediados tanto pelo receptor de baixa afinidade  $p75^{NTR}$  quanto por TrkA, receptor de alta afinidade [88, 97].

Sob condições normais, NGF está presente na corrente sanguínea de roedores e humanos. Numerosos estudos mostram que o nível circulante desta neurotrofina é afetado não somente em eventos de estresse e outras alterações neuroendócrinas, mas também por mudanças na idade, seguido por surtos neurológicos e durante doenças alérgicas e autoimunes [103, 104].

Diversos estudos mostraram que NGF induz a diferenciação e proliferação de linfócitos T e B [105], promove o crescimento, sobrevivência e propriedades funcionais de neutrófilos, como quimiotaxia, fagocitose e produção de superóxidos [106, 107], age como

fator de sobrevivência para linfócitos B de memória, além de estar envolvido na proliferação e/ou diferenciação de diversas células hematopoiéticas, incluindo granulócitos, monócitos e mastócitos [108-110].

Foi demonstrado que células- $\beta$  pancreáticas expressam receptores funcionais para NGF e, que esta neurotrofina exerce alguns efeitos sobre as mesmas. Particularmente, induz modificações morfológicas e fisiológicas, incluindo estimulação da corrente de sódio que aumenta a secreção de insulina devido a uma forte despolarização que aumenta a entrada de cálcio e excitose [111-115].

A expressão dos receptores de baixa e alta afinidade para NGF foi demonstrada em ilhotas de ratos no período fetal e em ratos adultos [116, 117]. A localização celular de NGF e TrkA é regulada conforme o desenvolvimento, sugerindo que este sistema possui papel importante no desenvolvimento da célula- $\beta$  [114].

### **1.5- Gangliosídeos e seu Potencial Imunomodulador**

Os gangliosídeos pertencem à classe de glicoesfingolipídeos formados por uma porção hidrofóbica de ácido graxo amido de esfingosina e uma cadeia hidrofílica de carboidratos, contendo uma ou mais moléculas de ácido siálico. A cadeia oligossacarídica do gangliosídeo pode variar em composição, porém a seqüência básica compreende quatro sacarídeos: glicose, galactose, N acetilgalactosamina e eventualmente, frutose. Nestes compostos, a cadeia oligossacarídica contém pelo menos um açúcar ácido ligado a ceramida (esfingosina + acil CoA). Vários resíduos de ácido siálico são ligados à cadeia de carboidrato, sendo que o resíduo siálico predominante é o ácido N-acetilneuramínico (NANA). Na molécula individual do gangliosídeo, o número e posição dos resíduos de ácido siálico são variáveis e, a partir desta característica surgiu o método para classificá-los [118]:

Monossialotetraexosilgangliosídeo (GM1) – contém uma unidade NANA;

Dissialotetraexosilgangliosídeo (GD1a, GD1b) – contém duas unidades NANA ligadas em posições diferentes;

Trissialotetraexosilgangliosídeo (GT1b) – apresenta três unidades NANA ligadas em posições diferentes;

Tetrassialotetraexosilgangliosídeo (GQ) – com quatro unidades NANA ligadas em posições diferentes.

Embora sejam componentes normais da membrana celular da maioria dos tipos celulares, são encontrados em maior concentração nas células do sistema nervoso [119, 120]. Localizam-se externamente à bicamada lipídica, sendo importantes em diversos processos biológicos como neurotroficidade, adesão intercelular, crescimento e diferenciação celular [121], apoptose e transformação oncogênica [122]. Além disso, atuam como receptor e co-receptor de várias substâncias bioativas como hormônios e citocinas, e na tradução de sinais para o meio intracelular [123].

MERRIT *et al.* (1984) [124] observaram que gangliosídeos foram capazes de inibir *in vitro* a proliferação de linfócitos T citotóxicos dependente de IL-2. OFFNER *et al.* (1987) [125], por sua vez, mostraram que estas moléculas induzem alterações na orientação molecular de CD4 presente nos linfócitos T helper atuando como moduladores do sistema imune.

A hipótese da modulação dos gangliosídeos no desenvolvimento do DM-1 recebeu subsidio importante com as evidências da natureza sialoglicoconjugado do antígeno alvo do anticorpo anticitoplasma da célula  $\beta$  pancreática (ICA) [126]. Posteriormente, COLMAN *et al.* (1988) [127] verificaram que uma fração de monogangliosídeo extraído de pâncreas humano inibiu a ligação do ICA às células  $\beta$  em cortes de pâncreas, processados através de imunohistoquímica. Frente a esses fatos, WILBERZ, *et al.* (1988) [128], trataram camundongos NOD com gangliosídeos objetivando o estudo de seu efeito sobre a incidência do diabetes mellitus nestes animais. Estes autores verificaram que a incidência da doença diminuiu significativamente em

fêmeas e machos tratados a partir da quarta semana de vida, embora o tratamento com gangliosídeos não tenha reduzido a ocorrência da perivasculite, precursora da invasão das ilhotas de Langerhans pelas células inflamatórias.

Ao analisarem o padrão de distribuição dos gangliosídeos no pâncreas humano, DOTTA *et al* (1989) [129], verificaram que o gangliosídeo GM2-1 está expresso intensamente nas ilhotas pancreáticas analisadas em cortes de tecido pancreático humano e pouco abundante no restante do órgão. Posteriormente, DOTTA *et al* (1993) [130] a partir de estudo comparativo entre a expressão de gangliosídeos em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD e camundongos C57BL/10, mostraram expressão aumentada do gangliosídeo GM2-1 nas ilhotas daqueles animais. Além disso, observaram que a redução da quantidade dos gangliosídeos GM2-1 e GM3 estavam associadas tanto com o avanço da idade quanto com o início do diabetes nestes animais. Estes achados foram interpretados como evidência da participação do monosialogangliosídeo GM2-1 como antígeno alvo dos ICA.

Por sua vez, PAPACCIO *et al.* (1993) mostraram que a administração de mistura de gangliosídeos em camundongos NOD fêmeas, a partir da quinta semana até a vigésima primeira semana de vida, interferiu no aumento gradual da glicemia, postergando assim a instalação do diabetes clínico. Coerente com estes dados, observaram que o tratamento com gangliosídeos retardou a progressiva desorganização da cito-arquitetura das células  $\beta$ . Contudo, curiosamente, estes autores não encontraram diferença significativa entre os animais tratados e os animais controle quanto ao aparecimento da insulite e sua progressão. Além disso, segundo os autores os dados obtidos neste trabalho não seriam suficientes para provar a eficiência da ação terapêutica dos gangliosídeos sobre a instalação e evolução do DM autoimune [131].

Apesar destas considerações, o conjunto de informações disponíveis tem reforçado a hipótese de que os gangliosídeos desempenham papel modulador importante na atividade imunológica e tem dado suporte à investigação de seu emprego para terapêutica dos distúrbios imunológicos [132].

### 1.5.1- GM1

O gangliosídeo GM1, um dos poucos sialoglicoconjugados na natureza resistente à sialidase, é uma molécula pluripotente capaz de modular as atividades de uma grande variedade de proteínas de membrana incluindo receptores, enzimas, canais iônicos e moléculas de adesão [133-136].

GM1, bem como alguns derivados de gangliosídeos, parecem ser efetivos na redução da expressão de CD4 na superfície de células T de diferentes espécies [125]. SAGGIORO *et al.*, (1993) [137] demonstraram que o GM1 mascara epítomos de CD4, reconhecidos por diferentes anticorpos monoclonais, localizados entre os dois domínios amino-terminais, o que induz a internalização da molécula CD4 em um compartimento endocítico onde é eventualmente degradada. KRIFUKS *et al.* (1998) [138], por sua vez, demonstraram o envolvimento de proteínas quinases e fosfatases na modulação por gangliosídeos sobre a expressão das moléculas de CD4 dos linfócitos presentes no sangue periférico. Para tanto, trataram estes linfócitos com inibidores de proteínas kinases, e verificaram que houve uma inibição da imunossupressão de CD4 induzida por GM1.

Em células neuronais em cultura, GM1 induz uma variedade de respostas características da neurotrofina NGF. *In vivo*, há evidências que este gangliosídeo, assim como o NGF, previne a apoptose de neurônios colinérgicos após dano cortical [139]. Juntos estes dados sugerem que GM1 e outros gangliosídeos exercem atividade neurotrófica similar ao NGF e que o GM1 pode ser utilizado para restaurar funções neurológicas [140].

Aparentemente, GM1 mimetiza os efeitos do NGF através de interação com o receptor de alta afinidade para NGF, TrkA, e ativação subsequente de proteínas sinalizadoras específicas. O mecanismo exato utilizado pelo GM1 na estimulação de TrkA ainda não foi definido [141]. A ativação do TrkA é atribuída à formação de dímeros que resultam em trans- ou autofosforilação dos resíduos de tirosina, dessa maneira, alguns autores sugerem que o GM1 não deve se ligar diretamente ao receptor, mas sim auxiliar na formação de agregados de TrkA na membrana celular. Estes agregados catalisariam a formação de dímeros de TrkA, passo necessário para ativar a atividade tirosina quinase do receptor e, conseqüentemente, a transdução sinal [140]. Este tipo de interação e indução de fosforilação da tirosina por GM1 também explicaria a habilidade deste gangliosídeo em potencializar o efeito do NGF *in vitro* e *in vivo* [139, 142].



## ***2- OBJETIVOS***

A partir dos conhecimentos provenientes da literatura e de resultados prévios obtidos no LIAE referentes à modulação dos gangliosídeos sobre o processo inflamatório imune mediado, este trabalho tem como objetivos:

**Objetivo Geral:**

Estudar os efeitos do tratamento com o gangliosídeo GM1 em camundongos fêmeas da linhagem NOD na expressão do diabetes e alguns marcadores inflamatórios.

**Objetivos específicos:**

**Avaliar:**

1. o efeito da administração crônica do gangliosídeo GM1 sobre a incidência e morbidade do diabetes autoimune espontâneo em fêmeas dessa linhagem.
2. em cortes histológicos a intensidade do processo inflamatório nas ilhotas pancreáticas, bem como a expressão de NGF, seu receptor de alta afinidade TrkA e GM1.
3. os efeitos do tratamento com GM1 sobre a expressão gênica de citocinas (IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), NGF e TrkA, em ilhotas pancreáticas isoladas e células esplênicas.
4. a concentração sérica de citocinas (IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ).





### ***3- MATERIAL E MÉTODOS***

### **3.1- Animais**

Os camundongos utilizados neste estudo eram provenientes da colônia NOD proveniente do INSERM U-25, Hospital Necker (Paris, França), implantada e mantida pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB) desde 1994, em condições livres de patógenos específicos (SPF). A frequência cumulativa do DM-1 clínico espontâneo registrado na colônia de camundongos NOD-Uni com 25 semanas de idade, tem se mantido ao redor de 85% entre as fêmeas e de 5 a 20% entre os machos, revelando-se similar à da colônia de origem [39].

Os protocolos utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **3.2- Grupos Experimentais**

70 camundongos NOD/Uni fêmeas objetos de estudo provenientes do Cemib/Unicamp eram mantidos em condições SPF, com controle de luz, temperatura e umidade no Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental (LIAE), recebendo água e ração padrão autoclavadas e oferecidas *ad libitum*. Os grupos experimentais eram estabelecidos como descrito a seguir:

Grupo GM1: 30 camundongos NOD fêmeas tratados com GM1(SYGEN<sup>®</sup>, gentilmente cedido pela TRB PHARMA) na dose de 100 mg/kg/ dia, administrados intraperitonealmente (ip) a partir da 4<sup>a</sup> semana até a 28<sup>a</sup> semana de vida.

Grupo Salina: 40 camundongos NOD fêmeas que constituíram o grupo controle, nos quais era injetada solução fisiológica estéril, sendo monitorizados até o final do protocolo.

### **3.3- Diagnóstico do Diabetes e Sacrifício dos animais**

A ocorrência do diabetes mellitus era monitorada em todos os animais a partir da 10ª semana de vida. As glicemias eram monitoradas semanalmente através de glicosímetro Prestige LX® (Home Diagnostic, EUA) retirando-se amostra de sangue da veia caudal do animal. Os animais eram considerados diabéticos após confirmação de hiperglicemia, medidas por meio de glicosímetro por duas semanas consecutivas, com valores de glicemia superiores a 250 mg/dl (13,8mM) [60, 143, 144].

Os animais que apresentavam diabetes ou ao completarem o tempo de 28 semanas, eram anestesiados com tiopental sódico 2,5% (Thiopentax®, Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA) (15 a 30mg/kg de peso corpóreo) e submetidos à coleta de sangue periférico por meio de punção cardíaca, com transferência imediata para tubo plástico de 1,5 ml (livre de *RNAse*) para centrifugação e posterior separação de soro utilizado para dosagem de citocinas séricas por meio da técnica de Elisa. Após este procedimento, realizava-se a remoção do pâncreas juntamente com a retirada do baço. O baço, era acondicionado em tubo de vidro estéril contendo solução tampão de Hanks (Sigma, EUA) para extração de células mononucleares, conservadas em guanidina sarcosyl para futura extração de RNA total. O pâncreas era depositado em cápsulas contendo meio de inclusão O.C.T (Tissue Tek® Miles – EUA) e rapidamente congelados em nitrogênio líquido ou submetido à digestão com colagenase para extração de ilhotas, as quais eram conservadas em guanidina sarcosyl para futura extração de RNA total. As peças incluídas em OCT eram conservadas em bio-freezer a - 80°C até processamento histológico. Após este procedimento os pâncreas eram submetidos à criocortes para estudo morfológico e imunofluorescência, empregando-se cortes obtidos em criostato (Leica, CM 1850, Alemanha).

### **3.4- Análise Morfológica**

A avaliação histológica dos pâncreas tinha como objetivo analisar os aspectos morfológicos das ilhotas pancreáticas e de seu eventual grau de insulite.

Os pâncreas eram transferidos e posicionados no suporte do criostato de maneira a se obter a maior área possível de corte. Os cortes eram coletados em série de 14 cortes consecutivos de 5µm de espessura e depositados em lâminas histológicas previamente silanizadas ( $\gamma$ -Methacryl-Oxipropil-Methoxysilane - Sigma St Louis, EUA). Após a obtenção da primeira série de cortes, o pâncreas era desbastado 300µm e, a seguir, outra série de 14 cortes era igualmente processada. Repetia-se este procedimento outras quatro vezes obtendo-se os conjuntos de lâminas representados no esquema 1.

As lâminas nº: 1, 8, 15 e 22 - obtidas através de criocortes eram corados pela técnica da hematoxilina e eosina, observadas em microscópio óptico (Axioscope, Zeiss, Darmstad-Alemanha), permitindo detectar a presença de infiltrado inflamatório em toda extensão do órgão. Os cortes, nos quais se evidenciava a presença de infiltrado inflamatório, eram submetidos a contagem de ilhotas de Langerhans e classificados segundo o grau de infiltrado celular (insulite) apresentado. As lâminas subseqüentes eram utilizadas para a caracterização linfocitária para CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD11<sup>+</sup> e, detecção de NGF, TrkA e GM1.

A classificação utilizada nas ilhotas pancreáticas, segundo o grau de insulite apresentado, era realizada atribuindo-lhes seguinte escore segundo critérios propostos por SIGNORE *et al.* (1989) [145] e adaptado [60].

**0** = ilhota normal, na ausência de infiltrado.

**1** = peri-insulite, presença < 25% de infiltrado ao redor e no interior da ilhota.

**2** = insulite moderada, 25 - 80% da ilhota invadida pelo infiltrado.

**3** = insulite invasiva, > 80% da ilhota invadida pelo infiltrado. Ocupação extensiva da ilhota.

**4** = insulite destrutiva, invasão total da ilhota pelo infiltrado.

As ilhotas eram contadas e classificadas por grau, em três planos de cortes diferentes por órgão. Os resultados eram representados pela média e desvio padrão referente relação número de ilhotas de cada grau/total de ilhotas contadas por animal, para cada grupo experimental, e calculava-se o índice de infiltrado celular, segundo a fórmula [146]:

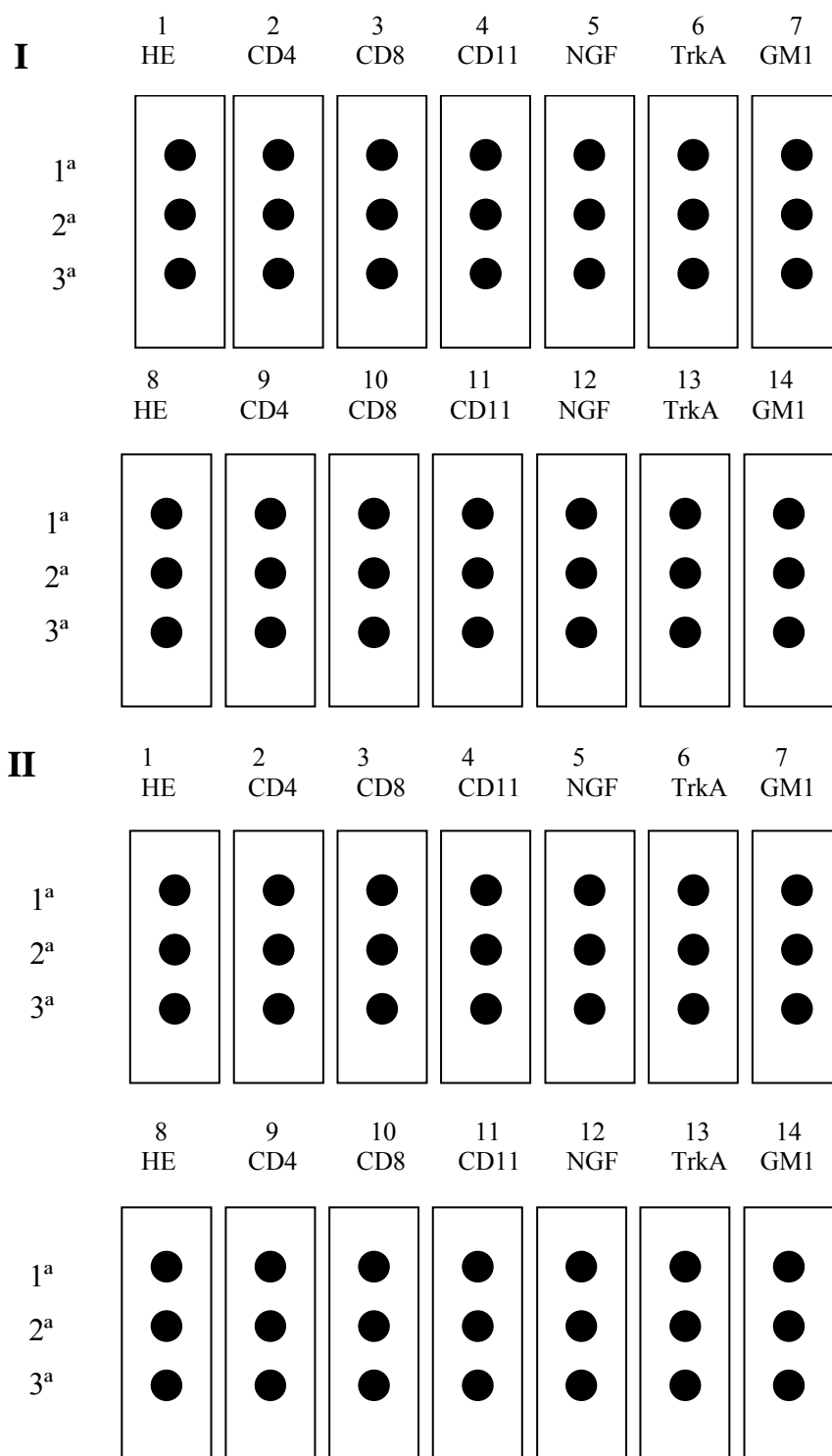
$$I = (0 \times N_0) + (1 \times N_1) + (2 \times N_2) + (3 \times N_3) + (4 \times N_4)$$

---

$$4 \times (N_0 + N_1 + N_2 + N_3 + N_4)$$

Índice = 1 - destruição total da ilha

0, 1, 2, 3 e 4 representam os diferentes graus de insulite (como descrito anteriormente) e  $N_0$ ,  $N_1$ ,  $N_2$ ,  $N_3$  e  $N_4$ , o número total de ilhotas com seus respectivos graus de infiltração.



**Esquema 1** - Representação do procedimento para a obtenção dos conjuntos de cortes analisados para estudo morfológico, quantitativo e imunohistoquímico das ilhotas pancreáticas.

### 3.5- Imunofluorescência

#### 3.5.1- CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD11<sup>+</sup>

Para a especificação do infiltrado inflamatório nas ilhotas pancreáticas realizava-se a fenotipificação do infiltrado para linfócitos T expressando marcadores CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e, macrófagos que expressam CD11<sup>+</sup> como marcador de superfície, provenientes de cortes histológicos congelados.

A técnica empregada era de imunofluorescência indireta. As lâminas após prévia fixação em acetona durante 15 minutos eram lavadas três vezes em PBS (solução de salina fosfatada tamponada) e em seguida os cortes eram incubados em 2,5% BSA V (albumina bovina fração V; GibcoBRL, EUA); 2%; leite desnatado em pó e 8% SFB (soro fetal bovino HyClone – Utah, EUA) durante 2 horas, para bloqueio de sítios inespecíficos. Aproximadamente 50µl do anticorpo primário anti- CD4, anti-CD8 e anti-CD11 (produzidos em rato) (BD PHARMINGEN, Califórnia, EUA) eram adicionados a cada corte (diluição 1:25) e incubados por toda noite, em temperatura ambiente, em câmara úmida, protegida contra luminosidade. Em seguida, as lâminas eram lavadas três vezes com PBS e 50µl do anticorpo secundário (5 µg/mL) conjugado com FITC anti- rato IgG para CD4, CD8 e CD11 (Vector Laboratories Inc., Califórnia, EUA) era adicionado e incubado por duas horas nas mesmas condições descritas anteriormente. As lâminas eram lavadas uma vez em PBS e montadas em glicerol, sendo observadas em microscópio Leica DM 4500B e as imagens captadas através do software Leica FW4000.

#### 3.5.2- NGF e TrkA

Para detecção de NGF e TrkA, empregava-se a técnica de imunofluorescência indireta. Após 15 minutos de fixação em acetona gelada, as lâminas eram lavadas três vezes em PBS e, em seguida bloqueadas com 2% leite desnatado em pó e 8% SFB (HyClone – Utah, EUA) em PBS durante toda a noite, a 4°C, em câmara úmida. Novas lavagens eram realizadas e, aproximadamente 50 µl do anticorpo primário anti-NGF e anti TrkA (produzidos em coelho) ( Santa Cruz Biotechnology, EUA) eram adicionados a cada

corde (diluição 1:50). As lâminas eram então incubadas por toda a noite nas mesmas condições descritas anteriormente. Em seguida, adicionava-se 50µl/corde do anticorpo secundário conjugado com FITC IgG anti-coelho ( Vector Laboratories Inc., Califórnia, EUA), na concentração de 10 µg/ml, mantendo-se por 2 horas ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas eram lavadas uma vez e montadas em glicerol, sendo observadas em fotomicroscópio Leica DM 4500B e as imagens captadas através do software Leica FW4000.

### 3.5.3- GM1

#### 3.5.3.1- Soros

Os soros utilizados para purificação de anticorpos anti-GM1 foram obtidos de protocolo prévio em que camundongos NOD fêmeas eram tratados com mistura de gangliosídeos (GM1, GD1a, GD1b, GT1b). Para a identificação de anticorpos anti-GM1, era utilizada a técnica de Elisa, a partir de protocolo preliminarmente padronizado no LIAE.

#### 3.5.3.2- ELISA – Anticorpos anti-GM1

Placas de polietileno de fundo chato com 96 poços eram adsorvidas com 100 µl de GM1 na concentração de 50 µg/ml solubilizado em metanol e incubadas overnight a 4°C para evaporação do solvente. Após secagem completa, as placas eram lavadas 3 vezes com 0,05% de Tween 20 em PBS. Para bloqueio dos sítios inespecíficos era utilizada uma solução de leite em pó desnatado 3% em PBS pH 7,4 , por 2 horas, em temperatura ambiente. As placas eram lavadas novamente por 3 vezes e, a seguir amostras de soro previamente diluídas 1:100 em PBS eram adicionadas aos poços e incubadas overnight em temperatura ambiente. Após lavagem, eram adicionados 100 µl de anticorpo conjugado com peroxidase anti-camundongo cadeia µ ou γ específico diluído 1:5000 em PBS e mantido por 90 minutos em temperatura ambiente. A placa era, então, lavada por 5 vezes, e



a reação de cor, produzida pela adição de tetrametilbenzidina (TMB OptEIA™ BD – Biosciences, EUA), durante 30 minutos, protegida de luminosidade, sendo bloqueada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N. Os valores de absorvância eram obtidos após leitura em 450nm utilizando espectrofotômetro Spectra Max 190 (Medical device, EUA). Os títulos dos anticorpos anti-GM1 foram tabelados, e as médias e os desvios padrão para cada grupo foram calculados e estabelecidos em Unidades Arbitrárias (UA)

#### 3.5.3.3- Identificação dos soros

A partir das unidades arbitrárias, 3 intervalos para agrupar os soros contendo anticorpos anti-GM1 foram estabelecidos. O limite inferior das faixas estabelecidas (A) era calculado à partir da média mais 2 desvios padrão das unidades arbitrárias de anticorpo anti-GM1 obtidas à partir de soro de animais controles não tratados e não diabéticos, sendo então , estabelecidas as faixas intermediária (B) a elevada (C).

A- 0,2-0,40

B- 0,401- 0,6

C- >0,6

Após analisar cada grupo de resultados, procedia-se ao isolamento de anticorpos anti-GM1 a partir de *pool* formado por alíquotas 50 µl de 10 soros tratados com gangliosídeos, que continham mais de 0,6 UA de anticorpo, ou seja, estavam no intervalo C.

#### 3.5.3.4- Isolamento dos anticorpos anti- GM1

Para isolar os anticorpos anti-GM1 era utilizada resina de cromatografia DEAE-Sephadex [147]. Adicionava-se 50mg de DEAE- Sephadex sem tratamento adicional a 70 mg de GM1, mantendo-se a suspensão sob agitação magnética suave, durante 2 horas e meia, em temperatura ambiente. Após este período, eram realizadas 3 lavagens com 1ml de metanol-água 1:1 e outras 3 lavagens com solução de lavagem, contendo 0,1M Tris-HCL, 0,1M NaCl, 0,01M EDTA, pH 7.3. A suspensão era mantida durante a noite à 4° C. No dia

seguinte, eram adicionadas as alíquotas dos 10 soros selecionados (faixa de concentração C) diluídos 1:100 (v/v) em volume final de 500 µl de Tris, adicionando-se a seguir 100 µl do DEAE- GM1 e 2400 µl de Tris, completando 3ml. Esta preparação era submetida à agitação magnética suave durante 60 minutos e à centrifugação por 5 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante era excluído e o *pellet*, lavado 2 vezes com 1 ml de solução de lavagem. Era então feita a eluição dos anticorpos anti-GM1, adicionando ao *pellet* 1ml de glicina-HCl 0,2M, pH 2,8. Após 3 minutos de agitação suave, procedia-se centrifugação como descrito anteriormente. O sobrenadante era imediatamente neutralizado com NaOH 0,1N, e o título dos anticorpos estimado por meio de leitura espectrofotométrica em 280 nm em relação ao coeficiente de extinção da IgG ( $\Sigma^{1\%}_{280}$ )=13.6.

#### 3.5.3.5- Imunofluorescência – GM1

Para observação dos sítios de ligação do gangliosídeo GM1, empregava-se a técnica de imunofluorescência indireta. Após 15 minutos de fixação em acetona gelada, as lâminas eram lavadas três vezes em PBS e, em seguida bloqueadas com 2% leite desnatado em pó em PBS durante toda a noite, a 4°C, em câmara úmida. Novas lavagens eram realizadas e, aproximadamente 50 µl do anticorpo primário anti-GM1 (produzidos em camundongo) eram adicionados a cada corte (diluição 1:10). As lâminas eram então incubadas por toda a noite nas mesmas condições descritas anteriormente. Na manhã seguinte, adicionava-se 50µl/corte do anticorpo secundário conjugado com Texas Red® IgG anti-camundongo (Vector Laboratories Inc., Califórnia, EUA), na concentração de 5 µg/ml, mantendo-se por 2 horas ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas eram lavadas uma vez e montadas em glicerol, sendo observadas em fotomicroscópio Leica DM 4500B e as imagens captadas através do software Leica FW4000.

### 3.6- Isolamento de Células Mononucleares do Baço

Sob anestesia de tiopental sódico 2,5% os animais tiveram seus baços removidos assepticamente e colocados em tubo de ensaio estéril, contendo solução salina de Hank (Sigma Co, St Louis, EUA). Posteriormente, os baços eram cuidadosamente

macerados, utilizando-se peneiras estéreis (Sigma). A seguir, as células eram lavadas em solução salina de Hank (Sigma) e centrifugadas por 10 minutos, a 1500 rpm. A seguir, o botão celular era tratado com tampão de lise, durante 10 minutos, em repouso, com o objetivo de eliminar eritrócitos. Eram realizadas mais duas lavagens com solução de Hank e ao pellet obtido, era adicionado solução de guanidina-sarcosyl. As amostras eram armazenadas a - 80°C para posterior extração de RNA total.

### **3.7- Isolamento de Ilhotas**

As ilhotas eram isoladas seguindo-se a técnica descrita por Boschero *et al.* (1981) [148], e adaptações, quanto ao tempo de reação e concentração de colagenase, realizadas no LIAE [60], visando melhorar o rendimento, conforme descrição a seguir.

Sob anestesia de tiopental sódico 2,5%, os animais tiveram suas cavidades abdominais abertas e os pâncreas localizados. Após distensão e seu isolamento dos outros órgãos, o pâncreas era infundido com solução de Hank contendo 2,5 mg/ml de colagenase (Sigma) através de seringa de 1 ml até seu intumescimento. A seguir, o órgão era removido e transferido para uma placa de Petri onde sofria fragmentação suave com o auxílio de tesoura cirúrgica. A suspensão era transferida para tubo de ensaio vedado com rolha e encubado em banho térmico a 37°C durante 24 minutos. Decorrido esse período e sob banho térmico, o tubo era agitado manualmente por aproximadamente 1 minuto, para finalizar a digestão do órgão. Em seguida, o conteúdo era transferido para um becker vidro de 100ml e adicionado Hank até completar volume de 80 ml. Após intervalo de 2 minutos, aspirava-se o sobrenadante com uma seringa, repetindo-se este procedimento por 3 vezes, com a finalidade de separação do tecido adiposo, colagenase e enzimas pancreáticas.

O isolamento das ilhotas era realizado manualmente através de lupa, colocando-se por volta de 10 ml da suspensão de ilhotas em Hank contendo 2,8mM de glicose e 3mg/ml de albumina em uma placa de Petri com fundo escuro. As ilhotas eram coletadas por aspiração, com auxílio de pipeta Pasteur tratada com albumina (solução de Hank contendo 10 mg/ml de albumina). A seguir, eram transferidas para outra placa de Petri com fundo escuro, também tratada com albumina. A partir dessa solução límpida, realizava-se nova coleta.

Eram coletadas 30 ilhotas/animal, sendo transferidas para tubo plástico de 1,5ml livre de RNAase, adicionando-se a seguir cerca de 400µl de solução preservadora de guanidina-sarcosyl. Esta preparação era mantida a -80°C até sua utilização.

### **3.8- Extração de RNA Total (RNAT)**

As amostras de RNA total eram extraídas das células esplênicas e ilhotas, através do método de Guanidina Tiocianato - Fenol - Clorofórmio [149]adaptado no LIAE conforme descrição a seguir.

As células esplênicas e ilhotas isoladas eram respectivamente agrupadas e homogeneizadas em solução de extração de RNA, 4M guanidina tiocianato contendo 2-mercaptoetanol (Sigma) e 0,5% sarcosil pH 7,0.

Para a separação das proteínas dos ácidos nucleicos adicionava-se volume igual de solução Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1). A seguir, esta mistura era agitada vigorosamente formando emulsão e centrifugada por 5 minutos à temperatura ambiente, a 10.000 x g, recuperando-se a fase aquosa (superior). Repetia-se a extração com Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico até que não houvesse proteínas na interfase.

A retirada do excesso de fenol era realizada pela extração com Clorofórmio-Álcool Isoamílico (24:1). O RNA na fase aquosa era precipitado pela adição de 3 volumes de etanol absoluto e acetato de sódio pH 5,2, na concentração final de 0,3M. Esta preparação era mantida à - 80°C por 48 horas.

Para a precipitação do RNAT a preparação era centrifugada a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C. Ao precipitado celular, era adicionada 40µl de água ultrapura estéril preparada com Dietil Pirocarbamato (DEPC, Sigma) e armazenando à - 80°C.

### 3.9- Análise do RNA Total Extraído

A qualidade do RNA total extraído era analisada através da relação entre suas leituras em espectrofotômetro (Spectramax 190, Molecular Devices, EUA) nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm. Eram consideradas adequadas as amostras com relação entre 1.6 e 1.8.

A quantificação do RNA total era feita através da fórmula: (densidade óptica a 260nm/0,025) x diluição de leitura/1000= RNA µg/µl.

### 3.10- Transcrição Reversa do RNA total Extraído (cDNA)

A síntese do cDNA era realizada a partir de 5µg de RNA total. Para a realização PCR de transcrição reversa (RT-PCR), adicionava-se à amostra 0,5µl de Oligo d(pt) e água ultra pura em quantidade suficiente para 28µl. Aquecia-se os tubos com as respectivas amostras em termocicladora (GeneAmp® 9700, Perkin Ellmer, EUA) por 10 minutos a 65°C e resfriava-se para 4°C por 5 minutos.

Para permitir a ligação complementar dos *primers* ao RNA, adicionava-se 21µl de solução de reação (10µl de tampão Super RT, 5µl de dNTP mix 0,5mM, 5µl de DTT 0,1M e 1µl de RNAsin) seguidos da incubação por 2 minutos a 42°C. Após adição de 1µl de enzima Super Transcriptase reversa (500U), a reação processava-se em termocicladora nas condições: 42°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos, resfriamento da amostra até 4°C (adaptado no LIAE) [150].

Após a ultima etapa, as amostras com volume de 50µl eram armazenadas a -20°C como DNA complementar (cDNA).

### 3.11- Amplificação de cDNA por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

O procedimento padrão de PCR era realizado adicionando-se ao tubo de reação, 2µl de amostra de cDNA, 100ng de primer 5' sense, 100ng de primer 3' anti-sense, 45µl de solução de reação (5µl de tampão Taq polimerase - *Thermus aquaticus* DNA polimerase gene (Invitrogen, EUA); 5µl de dNTP mix 5nM, 1,5µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM e 33.5µl de água ultra pura) e 1µl de óleo mineral. Em seguida os tubos contendo as misturas de cDNA eram transferidas para termocicladora programada para as seguintes condições: Desnaturação a 94°C por 2 minutos, 80°C por 5 minutos para aplicação de 1µl da enzima Taq polimerase, Pareamento 58°C por 45 segundos, Extensão dos *primers* a 72°C por 90 segundos, Desnaturação dos *primers* a 95°C por 45 segundos, 40 ciclos, extensão final 72°C por 10 minutos, temperatura de espera 4°C. Os produtos dos PCR eram armazenados a -20°C.

**Tabela 1-** Os *primers* utilizados com suas seqüências descritas abaixo obedeciam à estratégia sense e anti-sense: TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, NGF, TrkA e ciclofilina (gene estrutural). **pb**= pares de bases.

Primer	Sense (5' – 3')	Anti-sense (5' – 3')	Produto
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	CTTAGACTTTGCGGAGTCCG	CCCTGTCACTGGACCTA	254 pb
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	AAGTGGCATAGATGTGGAA	CTGGACCTGTGGGTTGTA	265 pb
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	AGGCTCCGAGATGAACAA	AAGGCATTAGAAACAGTCC	450 pb
<b>IL-12</b>	AGCTTTTGTGACAACCAATAAC	CAAACCTCACAGAGATCTGCCTG	297 pb
<b>NGF</b>	TGAAGCCCACTGGACTAAA	ACCTCCTTGCCCTTGATG	372 pb
<b>TrkA</b>	GGGGCTAACTCTGGTCAAT	AGGGTG TAGTTCCCGTTGT	345 pb
<b>Ciclofilina</b>	GACAGCAGAAAACCTTTCGTGC	GGTTCTGACTCACCGACC T	276 pb

### **3.12- Análise dos Produtos da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) por Eletroforese em Gel de Agarose**

As ampliações dos cDNA através de primers específicos para citocinas eram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, e revelados com brometo de etídio, através de excitação em UV e documentadas fotograficamente em sistema de documentação fotográfica (NucleoVision, Nucleo Tech, CA, EUA).. A intensidade das bandas era analisada por captação da imagem dos géis e submetidos à análise com *software* GelExpert (NucleoTech). Todas as amostras eram submetidas a dois novos procedimentos de PCR, objetivando excluir falsos negativos resultantes de erros de procedimento.

#### Preparo de 50ml de gel de Agarose 1,5%:

Agarose 1,5% era preparada em tampão TBE (Ácido Bórico/Tris/EDTA/H<sub>2</sub>O ultrapura) e adicionada de 2µl de brometo de etídio.

#### Preparo das amostras:

As amostras eram preparadas misturando 8µl de cDNA e Tampão GBX (tampão de amostra de PCR) e 5,5µl de água ultrapura. Utilizava-se como tampão de corrida eletroforética Tampão TBE adicionado de 2µl de brometo de etídio. O padrão de DNA (DNA marker φX174 RF Hae III Fragments (Invitrogen) era aplicado em todas as eletroforeses. As condições de eletroforese eram: 45 minutos a 70 volts, 150mA.

### **3.13- Análise Semiquantitativa dos Produtos de PCR**

A semi-quantificação do RNAm era obtida pela relação entre as áreas de pixel determinadas para as bandas correspondentes ao RNA mensageiro em questão e aquelas observadas para a ciclofilina (gene estrutural). Os valores foram normalizados e transformados em Unidades arbitrárias (pixel index) através da seguinte fórmula:

Expressão semiquantitativa (Unidades arbitrárias) = (área de pixel do RNA mensageiro a ser avaliado/ área de pixel da ciclofilina) x 100.

### 3.14- ELISA - Citocinas

#### 3.14.1- IL-12, IFN- $\gamma$ e IL-1 $\beta$

As placas eram adsorvidas com anticorpo de captura específico para as citocinas IL-12, IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  (CytoSet™ – Biosource, EUA) na concentração de 1,25 $\mu$ g/ml, diluído em solução tampão carbonato-bicarbonato (p.H. 9.4) e incubadas por 18 horas em temperatura de 4°C. A seguir, as placas eram lavadas por 3 ciclos rápidos com solução salina e 0,1% de Tween 20 (Merck - Alemanha). Para bloqueio dos sítios inespecíficos utilizava-se solução de soro albumina bovina 1% em PBS (p.H. 7,4) (tampão de ensaio), por 2 horas em temperatura ambiente. Novamente as placas eram lavadas por 3 ciclos rápidos e 100  $\mu$ l de amostras de soros diluídos 1:2 em tampão de ensaio era adicionado, e eram mantidas em câmara úmida por 90 minutos em temperatura ambiente, com exceção de IL-1 $\beta$ , incubada a 37°C. Após o processo de lavagem, era adicionado 100  $\mu$ l de anticorpo de detecção biotilado diluído 0,125  $\mu$ g/ml em tampão de ensaio suplementado com 5% de soro bovino fetal para IL-12 e IFN- $\gamma$ , e a concentração utilizada era de 0,05  $\mu$ g/ml para IL-1 $\beta$ , sendo que as placas permaneciam em câmara úmida por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida as lavagens, era adicionada solução de estreptavidina/peroxidase, na concentração de 0,3  $\mu$ g/ml diluído em tampão de ensaio e então, mantidas por 45 minutos em temperatura ambiente protegida de luminosidade. Posterior às lavagens, a reação de cor era produzida pela adição de tetrametilbenzidina (TMB OptEIA™ BD - Biosciences), sendo bloqueada após 30 minutos com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N. Os valores de absorbância eram obtidos após leitura em 450nm utilizando espectrofotômetro Spectra Max 190 (Medical Device, EUA) e os cálculos eram realizados através do software SOFT MAX-PRO 3.0. Para cada experimento, era utilizada curva de referência, para determinação da concentração de citocina.

#### 3.14.2- TNF- $\alpha$

As placas eram adsorvidas com 100 $\mu$ l de anticorpo de captura específico para TNF- $\alpha$  (CytoSet™ – Biosource, EUA) na concentração de 1,25 $\mu$ g/ml, diluído em solução tampão carbonato-bicarbonato (p.H. 9.4) e incubadas por 18 horas a 4°C. A seguir, a solução de adsorção era aspirada e, para bloqueio dos sítios inespecíficos adicionava-se 300



μl de solução de soro albumina bovina 1% em PBS (p.H. 7,4) (tampão de ensaio), por 2 horas em temperatura ambiente. A seguir, as placas eram aspiradas e 100 μl de amostras de soros diluídos 1:2 em tampão de ensaio eram adicionados, e imediatamente, adicionava-se 50 μl do anticorpo de detecção biotilado na concentração de 0,05 μg/ml em tampão de ensaio, sendo mantidas em câmara úmida por 2 horas em temperatura ambiente. Após 4 ciclos rápidos de lavagem com solução salina e 0,1% de Tween 20 (Merck-Alemanha), eram adicionados 100 μl de anticorpo solução de estreptavidina/peroxidase, na concentração de 0,15 μg/ml diluído em tampão de ensaio e então, as placas eram mantidas por 30 minutos em temperatura ambiente protegida de luminosidade. Posterior às lavagens, a reação de cor era produzida pela adição de tetrametilbenzidina (TMB OptEIA™ BD - Biosciences), sendo bloqueada após 20 minutos com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N. Os valores de absorbância eram obtidos após leitura em 450nm utilizando espectrofotômetro Spectra Max 190 (Medical Device, EUA) e os cálculos eram realizados através do software SOFT MAX-PRO 3.0. Era utilizada curva de referência, para determinação da concentração da citocina em estudo.

### **3.15- Análise Estatística**

Os resultados eram expressos como média e desvio padrão. Os dados eram submetidos à análise de variância (ANOVA) entre grupos pelo teste Kruskal-Wallis com *post-test* Dunn. O teste Mann-Whitney era aplicado para comparação entre os grupos tratados e seus respectivos controles. Eram considerados estatisticamente significativos  $p < 0.05$ . Para análise do efeito do GM1 sobre a expressão do diabetes, a razão de chance da condição nos expostos e não expostos era calculada, assim como o intervalo de confiança (95%).

### **3.16- Formatação do texto**

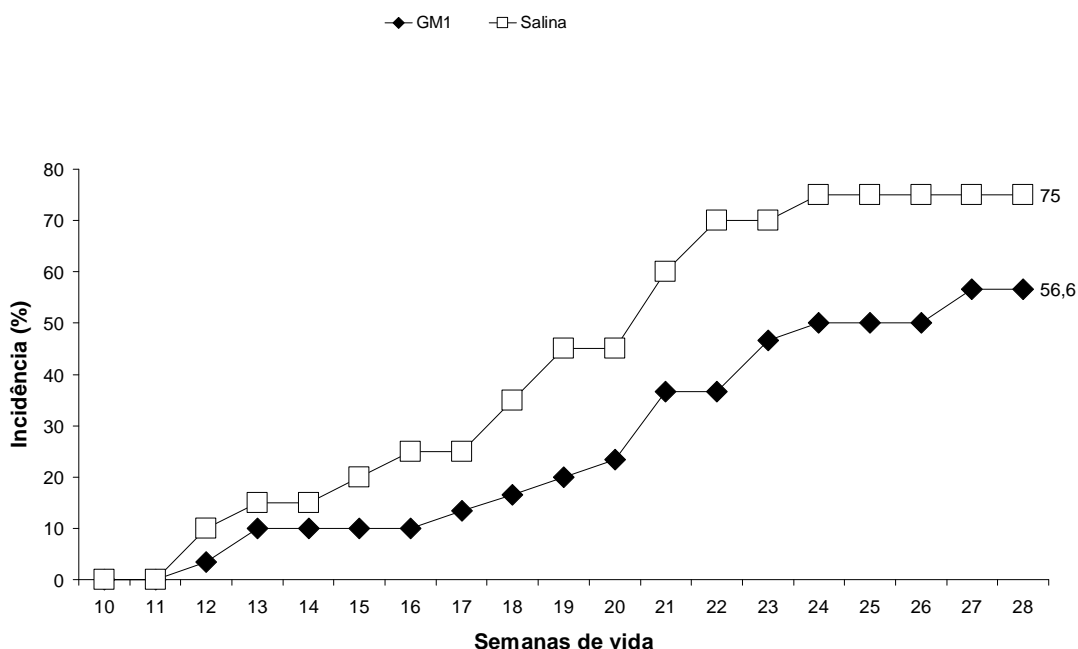
Para a formatação do texto no que se refere às citações e bibliografia, empregou-se o programa computacional EndNote 9.0 (Copyright© 2006 The Thomson Corporation, EUA, licenciado para o Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental) e o formato Vancouver, segundo as normas da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp.



## ***4- RESULTADOS***

#### 4.1- Efeito do tratamento com GM1 sobre a manifestação do diabetes autoimune espontâneo

O tratamento de camundongos NOD com GM1 mostrou-se capaz de reduzir a manifestação do diabetes, visto que apenas 56,6% dos animais tratados (17/30) apresentaram níveis glicêmicos superiores a 250 mg/dl. Por outro lado, nos animais tratados com salina verificou-se a ocorrência de glicemias superiores a 250 mg/dl em 75% dos animais (30/40). Foi calculada a razão de chance da condição nos expostos e não expostos para analisar o efeito do GM1 sobre a expressão do diabetes, levando em consideração o intervalo de confiança. O risco relativo dos animais tratados com GM1 foi de 0.75, com intervalo de confiança de 0.52 a 1.23. Esses valores indicam o favorecimento do tratamento com GM1 em relação à doença (Figura 1, pág. 63).

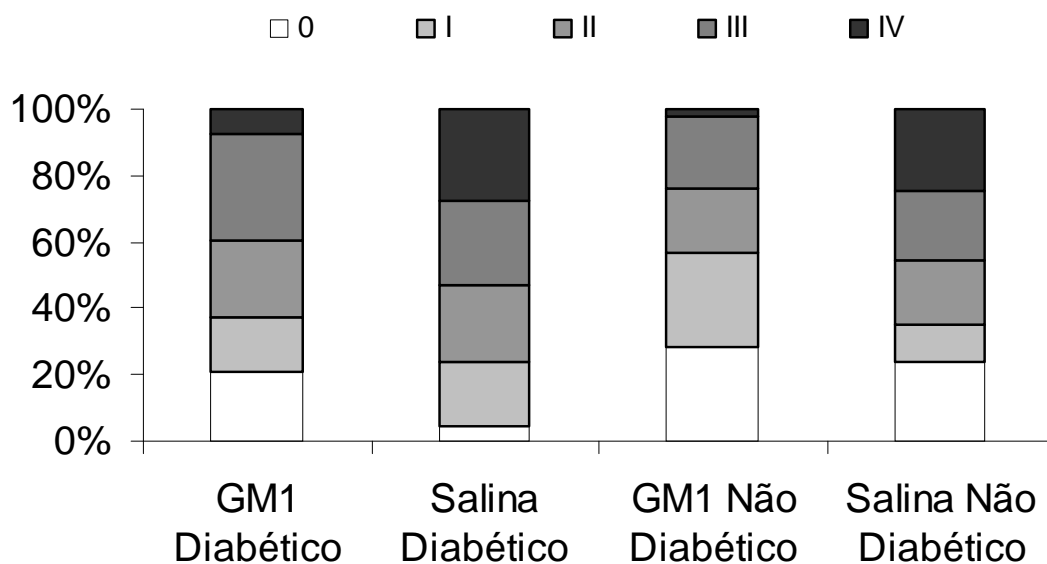


**Figura 1**– Incidência cumulativa do diabetes no camundongo NOD submetido ao tratamento com GM1 ou salina. Observa-se que nos animais tratados com GM1 56,6% ficaram diabéticos (n=17/30), enquanto que 75% dos animais do grupo salina apresentaram a doença (n=30/40). O risco relativo à administração de GM1 foi de 0.75, com intervalo de confiança de 0.52 a 1.23, indicando o favorecimento do tratamento com GM1 em relação à doença.

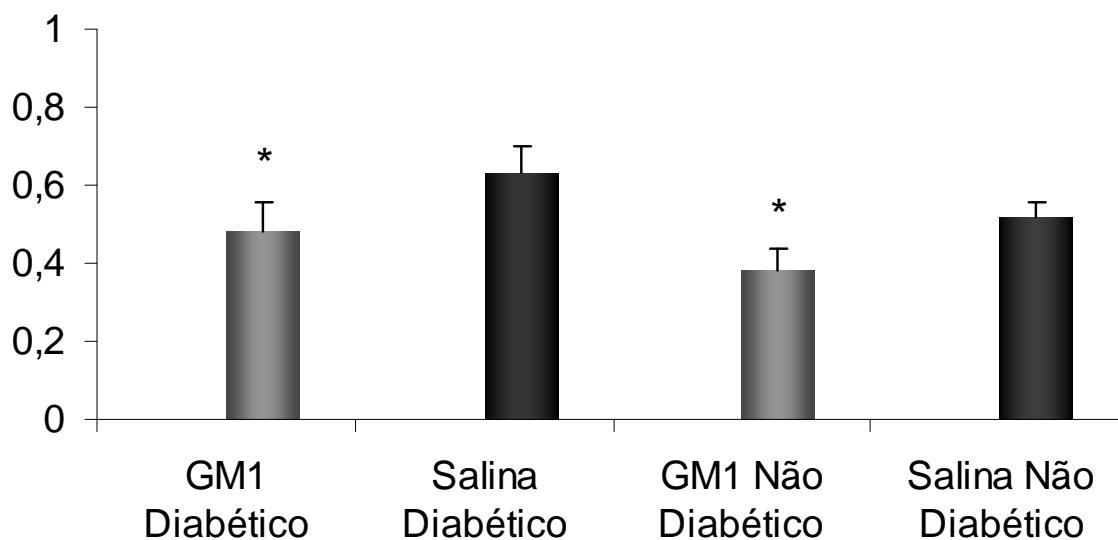
#### 4.2- Efeito do tratamento com GM1 sobre o processo inflamatório e índice de infiltrado nas ilhotas pancreáticas

A quantificação do grau de infiltrado nas ilhotas de animais tratados com GM1 e salina foi determinada por meio do grau de infiltrado linfomononuclear (Figura 2, pág. 65). A análise morfológica seguida pela classificação das ilhotas segundo o grau de infiltrado celular revelou que nos animais não diabéticos e diabéticos tratados com GM1, a presença de ilhotas com infiltrado grau IV é menor quando comparada, respectivamente, com os animais não diabéticos e diabéticos do grupo salina. Pode-se também observar maior número de ilhotas com grau 0 nos animais tratados com GM1.

A partir da análise do índice de insulite, pode-se observar que os animais tratados com GM1 apresentam resultados significativamente menores (GM1-diabético,  $0.48 \pm 0.08$ ; GM1-não diabético,  $0.38 \pm 0.06$ ) ( $p < 0.05$ ) que o grupo salina (Salina – diabético,  $0.63 \pm 0.07$ ; Salina-não diabético,  $0.52 \pm 0.03$ ) (Figura 3, pág. 66).



**Figura 2** - Gráfico representativo da classificação das ilhotas de Langerhans segundo o grau de insulite em camundongos NOD diabéticos (n=5) e não diabéticos (n=5) tratados com GM1 e seus respectivos controles salina (n=5).



**Figura 3** – Índice de infiltrado celular em ilhotas de camundongos NOD tratados com GM1 e tratados com salina. Os animais tratados com GM1 apresentam índices significativamente reduzidos quando comparados aos seus respectivos controles salina. Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (\* $p < 0,05$  – Mann-Whitney).

### 4.3- Imunofluorescência

A imunofluorescência do infiltrado insular revelou a presença de linfócitos  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  e macrófagos ( $CD11^+$ ), especialmente intensos em animais diabéticos, independente do tratamento (Prancha I, pág. 70).

Nos animais não diabéticos tratados com GM1, observou-se presença de infiltrado na periferia da ilhota de Langerhans constituído por linfócitos  $CD4^+$  e  $CD8^+$  e macrófagos, igualmente distribuídos, apresentando padrão semelhante de marcação para estas células (Prancha I – figuras A, B e C, pág. 70). Já nos animais não diabéticos do grupo salina, observou-se um aumento no número dessas células, especialmente de linfócitos  $CD8^+$  e de  $CD11^+$  (Prancha I – figuras E, F e G, pág. 70).

Foi possível observar nos animais diabéticos tratados com GM1, um aumento substancial de células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e macrófagos, ocupando quase a totalidade da ilhota (Prancha I – figuras I, J e K, pág. 70). Da mesma forma, a imunofluorescência dos animais diabéticos do grupo salina revelou padrão semelhante de marcação observado no grupo GM1 diabético, com apresentação de infiltrado celular em quase toda a totalidade da ilhota (Prancha I – figuras M, N e O, pág. 70).

A imunofluorescência para detecção de NGF, TrkA e GM1 demonstrou maior expressão destes marcadores em animais não diabéticos de ambos os grupos, GM1 e salina. (Prancha II, pág.72).

Nos animais não diabéticos tratados com GM1 observou-se maior expressão de NGF, TrkA e GM1 em relação aos outros grupos estudados. O NGF e seu receptor de alta afinidade TrkA foram demonstrados na região peri-ilhota, assim como o GM1, sendo também encontrado mais disperso por toda a ilhota (Prancha II – figuras A, B e C, pág.72). No grupo salina não diabético observou-se o mesmo padrão de marcação encontrado nos animais não diabéticos tratados com GM1, porém com imunoreatividade reduzida (Prancha II – figuras E, F e G, pág.72).

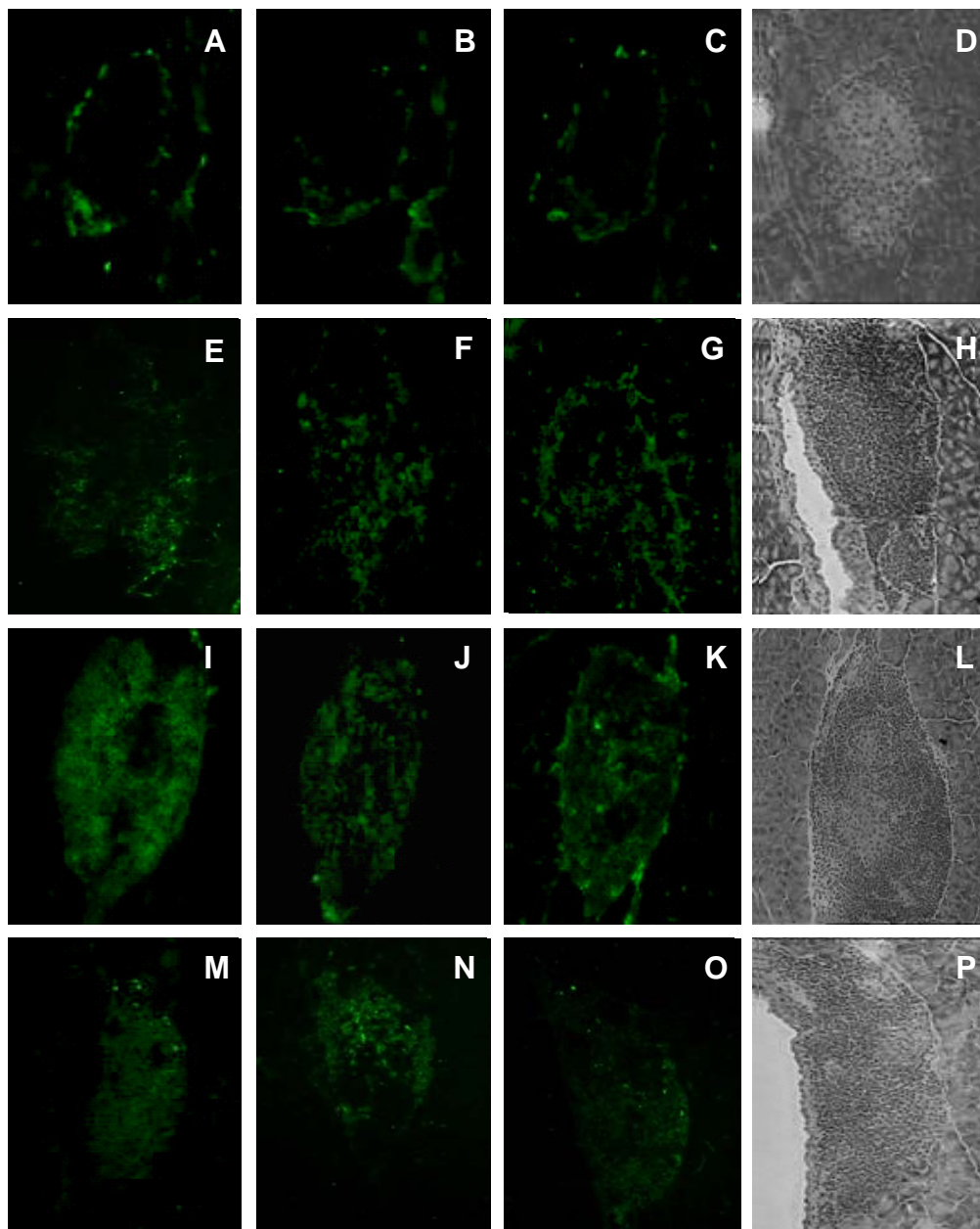
Já os animais diabéticos tratados com GM1 (Prancha II – figuras I, J e K, pág.72) ou com salina (Prancha II – figuras M, N e O, pág.72) revelaram expressão substancialmente reduzida dos três marcadores analisados.

**Prancha I** – Imunofluorescência de pâncreas para detecção de linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e macrófagos (CD11<sup>+</sup>) em animais não diabéticos e diabéticos tratados com GM1 ou salina.

- **Grupo GM1 - não diabético:** (A) células CD4<sup>+</sup>; (B) células CD8<sup>+</sup>; (C) células CD11<sup>+</sup>. Localizadas na região peri-ilhota. (D) coloração HE.
- **Grupo Salina - não diabético:** observa-se número maior de células. (E) células CD4<sup>+</sup> em menor número; (F) células CD8<sup>+</sup>; (G) células CD11<sup>+</sup>; (H) coloração HE.
- **Grupo GM1 – diabético:** aumento substancial de células (I) CD4<sup>+</sup>; (J) CD8<sup>+</sup>; (K) CD11<sup>+</sup>; (L) coloração HE.
- **Grupo Salina – diabético:** observa-se grande número de células (M) CD4<sup>+</sup>; (N) CD8<sup>+</sup>; (O) CD11<sup>+</sup> que se estendem de maneira uniforme por toda a ilhota. (P) coloração HE.

Aumento: 200x

**Prancha I-** Imunofluorescência para detecção de linfócitos T CD4+, CD8+ e macrófagos (CD11+) em camundongos NOD



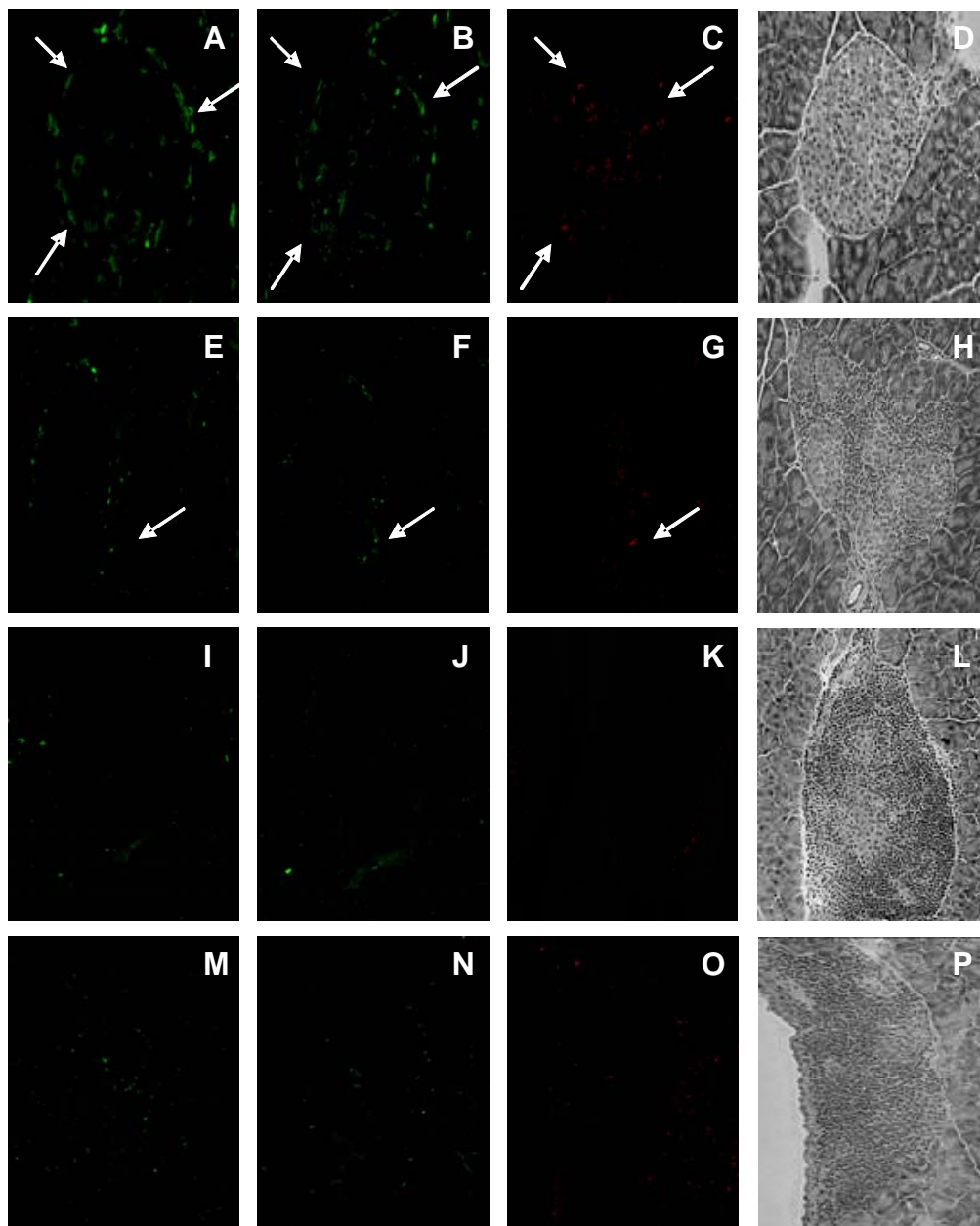


**Prancha II** – Imunofluorescência de pâncreas para detecção de NGF, seu receptor de alta afinidade Trka e GM1 em animais não diabéticos e diabéticos tratados com GM1 ou salina.

- **Grupo GM1 - não diabético:** (A) NGF e (B) TrkA, localizados na região periférica, juntamente com (C) GM1, com maior distribuição por toda ilhota (D) coloração HE.
- **Grupo Salina - não diabético:** observa-se o mesmo padrão de marcação, porém com imunoreatividade menor. (E) NGF; (F) TrkA; (G) GM1; (H) coloração HE.
- **Grupo GM1 – diabético:** os animais diabéticos exibem expressão substancialmente menor de (I) NGF; (J) TrkA e (K) GM1; (L) coloração HE.
- **Grupo Salina – diabético:** observa-se pequena expressão de (M) NGF distribuído pela ilhota; (N) TrkA e (O) GM1 estão localizados na região peri-ilhota, fracamente marcados; (P) coloração HE.

Aumento: 200x

**PRANCHA II-** Imunofluorescência para detecção de NGF, TrkA e GM1 em camundongos NOD.



#### **4.4- Efeitos da administração de GM1 sobre a expressão gênica de citocinas, NGF e TrkA em ilhotas pancreáticas isoladas e células esplênicas**

Para avaliação do efeito do tratamento com GM1, realizou-se a detecção da expressão gênica de citocinas, NGF e TrkA em ilhotas de Langerhans isoladas e em células esplênicas.

##### 4.4.1- Ilhotas

A expressão gênica de IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , NGF e TrkA foi avaliada em ilhotas isoladas de camundongos NOD tratados com GM1 ou tratados com salina.

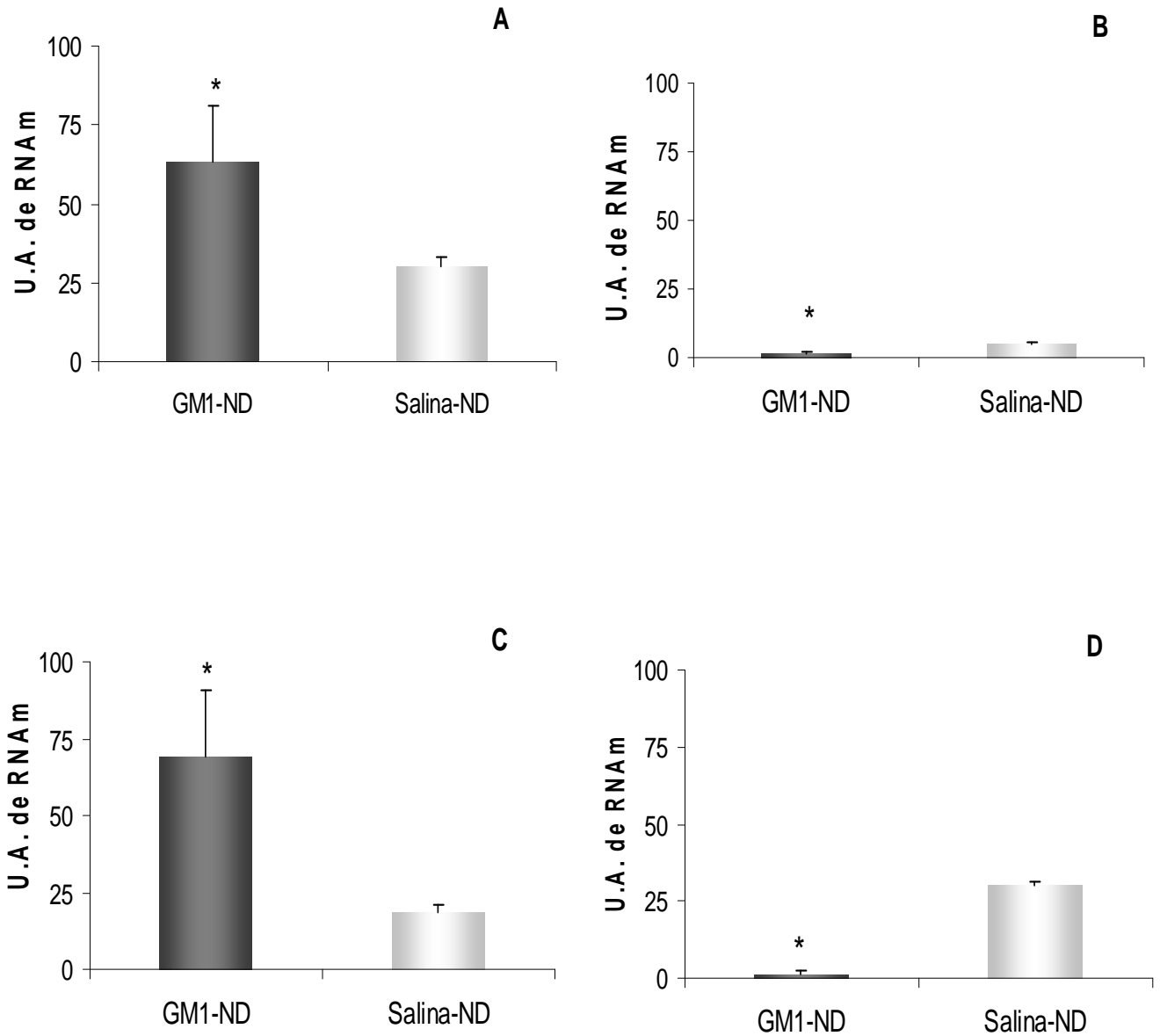
Nos animais não diabéticos tratados com GM1 (GM1-ND) a expressão de IL-12 (Figura 4A, pág. 75) estava significativamente aumentada ( $63.2 \pm 18.0$ ) ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo tratado com salina (Salina-ND) ( $30.2 \pm 2.7$ ).

A expressão de RNAm de IFN- $\gamma$  (Figura 4B, pág 75), ao contrário de IL-12, estava significativamente diminuída nos animais tratados com GM1 ( $1.4 \pm 0.6$ ) ( $p < 0.05$ ) quando comparado ao grupo salina ( $4.9 \pm 0.6$ ).

Já a análise de TNF- $\alpha$  (Figura 4C, pág. 75) revelou que os animais tratados com GM1 apresentavam expressão significativamente maior ( $68.9 \pm 21.8$ ) ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo tratado com salina ( $18.7 \pm 1.9$ ).

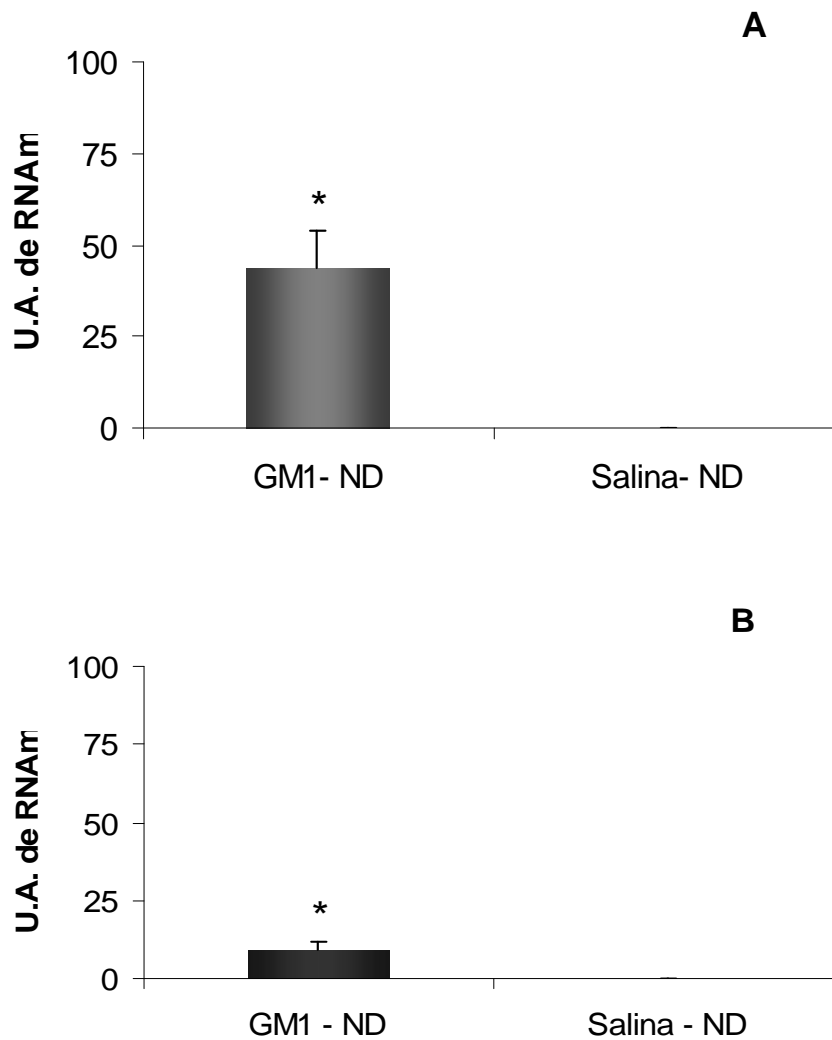
Por outro lado, a expressão de IL-1- $\beta$  (Figura 4D, pág. 75) estava significativamente reduzida nos animais que receberam tratamento com GM1 ( $1.5 \pm 0.8$ ) ( $p < 0.05$ ).

Os animais tratados com GM1 expressaram níveis elevados de RNAm de NGF ( $43.6 \pm 10.4$ ) (Figura 5A, pág. 76) e TrkA ( $9.0 \pm 2.5$ ) (Figura 5B, pág. 76) quando comparados aos animais que receberam salina, que não expressaram esta neurotrofina e seu receptor de alta afinidade.



### Grupos Experimentais

**Figura 4** – Expressão gênica de IL-12 (A), IFN- $\gamma$  (B), TNF- $\alpha$  (C) e IL-1 $\beta$ (D) em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos NOD tratados com GM1 não diabéticos (GM1-ND) (n=5) e salina (Salina-ND) (n=5). Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (\*p< 0,05 – Mann-Whitney).



### Grupos Experimentais

**Figura 5** – Detecção de RNAm de NGF (A) e TrkA (B) em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos NOD não diabéticos tratados com GM1 (n=5) e salina (n=5). Pode-se observar que os animais que receberam salina não expressaram NGF e TrkA ao final do protocolo em 28s. Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (\*p< 0,05 – Mann-Whitney).

#### 4.4.2- Células Esplênicas

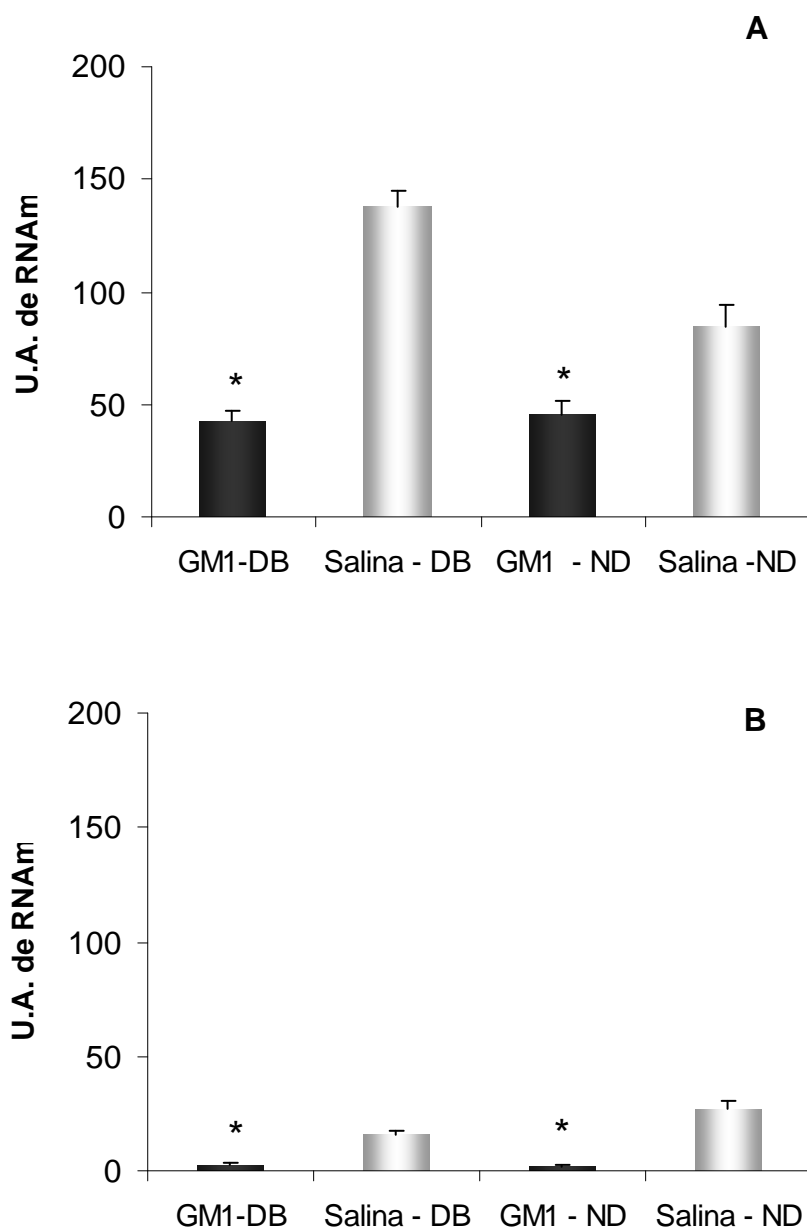
Em células esplênicas de camundongos NOD tratados com GM1 ou com salina, a expressão gênica de IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1- $\beta$  foi avaliada.

Nos animais tratados com GM1, diabéticos (GM1-DB) e não diabéticos (GM1-ND), houve uma redução significativa da expressão de IL-12 (GM1-DB,  $42.66 \pm 4.2$ ; GM1-ND,  $45.55 \pm 6.0$ ) ( $p < 0.05$ ) quando comparados aos seus respectivos controles salina (Salina-DB,  $138.17 \pm 6.6$ ; Salina-ND,  $84.39 \pm 10.2$ ) (Figura 6A, pág. 78).

A expressão de IFN- $\gamma$ , semelhante à IL-12, mostrou-se significativamente reduzida nos animais tratados com GM1 (GM1-DB,  $2.90 \pm 0.9$ ; GM1-ND,  $1.38 \pm 0.9$ ) ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo salina (Salina-DB,  $15.86 \pm 61.4$ ; Salina-ND,  $27.43 \pm 3.1$ ) (Figura 6B, pág. 78).

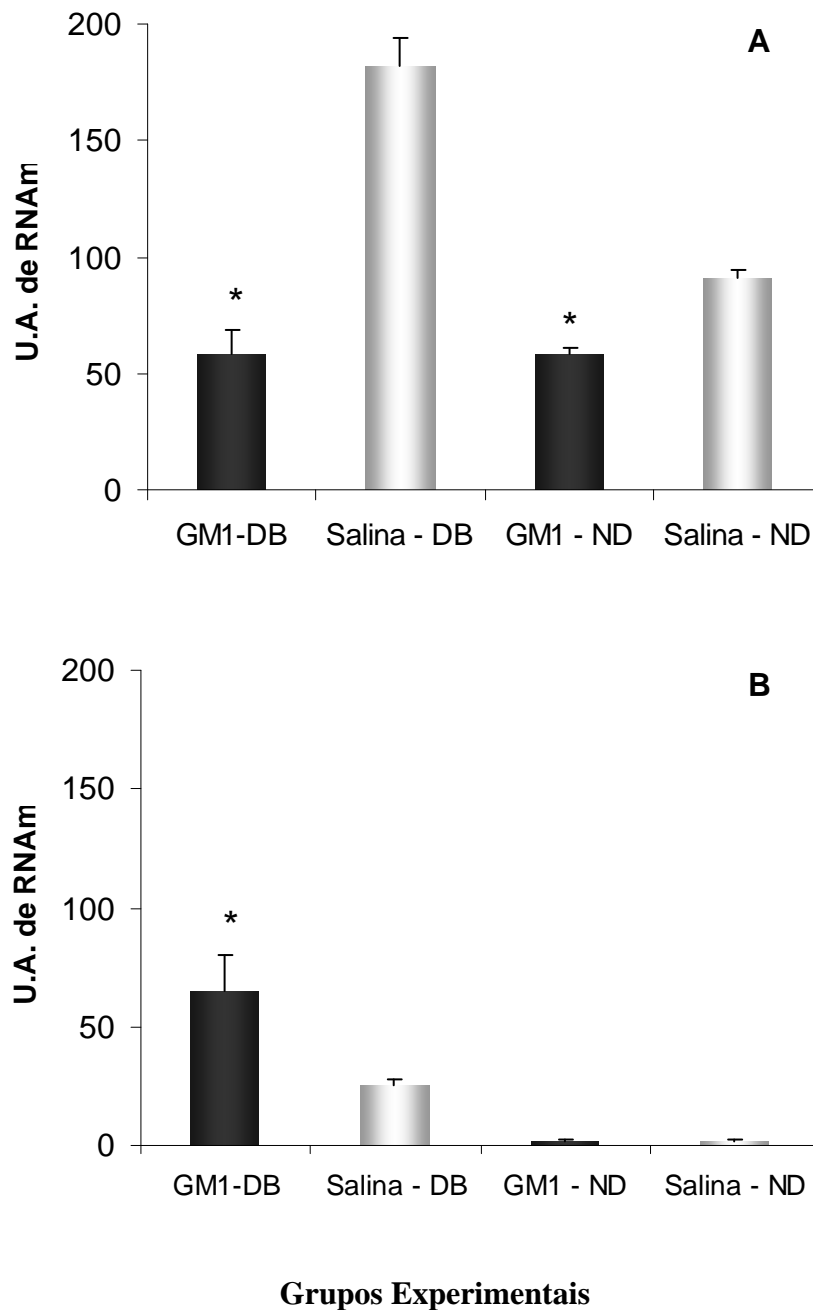
Da mesma maneira, os animais tratados com GM1 produziram níveis de RNAm significativamente reduzidos de TNF- $\alpha$  (GM1-DB,  $58.60 \pm 10.5$ ; GM1-ND,  $58.06 \pm 2.7$ ) ( $p < 0.05$ ) quando comparados aos seus respectivos controles salina (Salina-DB,  $182.09 \pm 11.8$ ; Salina-ND,  $90.68 \pm 3.4$ ) (Figura 7A, pág. 79).

A avaliação da expressão de IL-1 $\beta$  (Figura 7B, pág. 79) revelou que os animais diabéticos do grupo GM1 apresentaram níveis elevados significativos de RNAm desta citocina (GM1-DB,  $64.72 \pm 15.4$ ) ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo salina diabético (Salina-DB,  $25.32 \pm 2.7$ ). Já os animais não diabéticos de ambos os grupos tiveram produção reduzida de IL-1 $\beta$  (GM1-ND,  $1.75 \pm 0.6$ ; Salina-ND,  $1.59 \pm 0.7$ ), porém, sem diferença estatística.



### Grupos Experimentais

**Figura 6-** Expressão gênica de IL-12 (A) e IFN- $\gamma$  (B) em células esplênicas de camundongos NOD tratados com GM1, diabéticos (GM1-DB) (n=5) e não diabéticos (GM1-ND) (n=5), e salina, diabéticos (Salina-DB) (n=5) e não diabéticos (Salina-ND) (n=5). Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (\* p<0,05 – Mann-Whitney).



**Figura 7** - Expressão gênica de TNF- $\alpha$  (A) e IL-1 $\beta$ (B) em células esplênicas de camundongos NOD tratados com GM1, diabéticos (GM1-DB) (n=5) e não diabéticos (GM1-ND) (n=5), e salina, diabéticos (Salina-DB) (n=5) e não diabéticos (Salina-ND) (n=5). Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (\* p<0,05 – Mann-Whitney).



#### 4.5- Efeitos da administração de GM1 sobre a expressão sérica de citocinas – ELISA

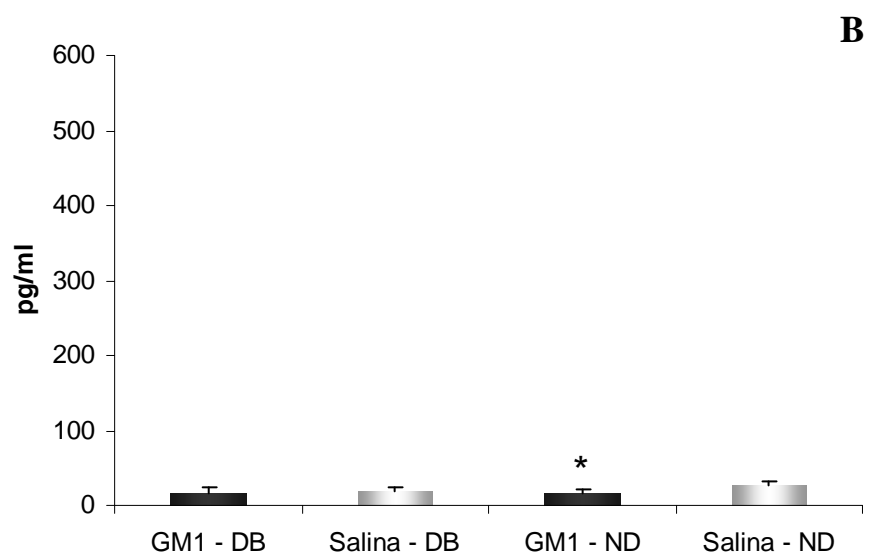
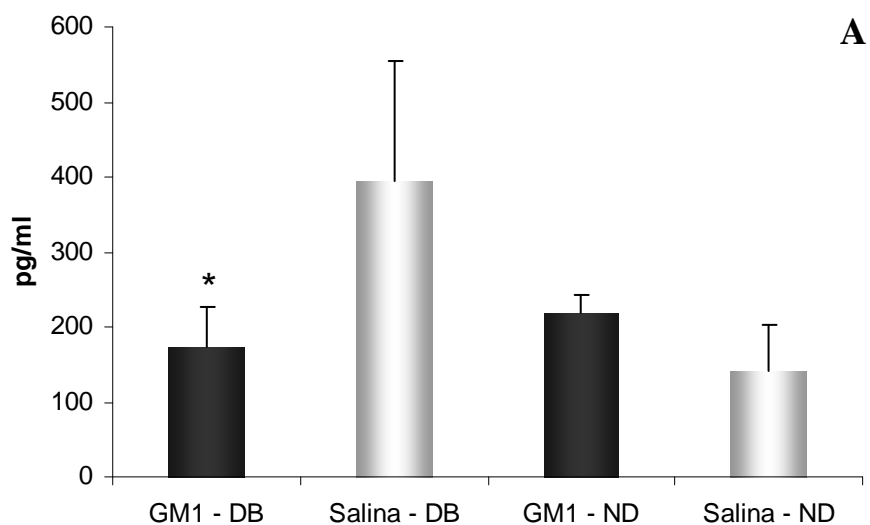
As citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1- $\beta$  foram dosadas no soro dos animais tratados com GM1 e salina.

Na análise de IL-12 (Figura 8A, pág.82), pode-se observar que os animais tratados com GM1 produziram níveis reduzidos dessa citocina quando comparados ao seu grupo controle salina, porém só existe diferença significativa entre os animais diabéticos (GM1-DB,  $172.8 \pm 52.7$ ; Salina-DB,  $395.1 \pm 158.9$ ; GM1-ND,  $218 \pm 24.7$ ; Salina-ND,  $140.3 \pm 63.6$ ) ( $p < 0.05$ ).

Os níveis séricos de IFN- $\gamma$  (Figura 8B, pág.82) estavam reduzidos nos animais do grupo GM1 não-diabéticos em relação àqueles não diabéticos que receberam salina (GM1-ND,  $14.78 \pm 5.2$ ; Salina-ND,  $27.11 \pm 3.6$ ) ( $p < 0.05$ ), porém sem diferenças nos animais diabéticos (GM1-DB,  $16.66 \pm 6.3$ ; Salina-DB,  $18.83 \pm 5.7$ ).

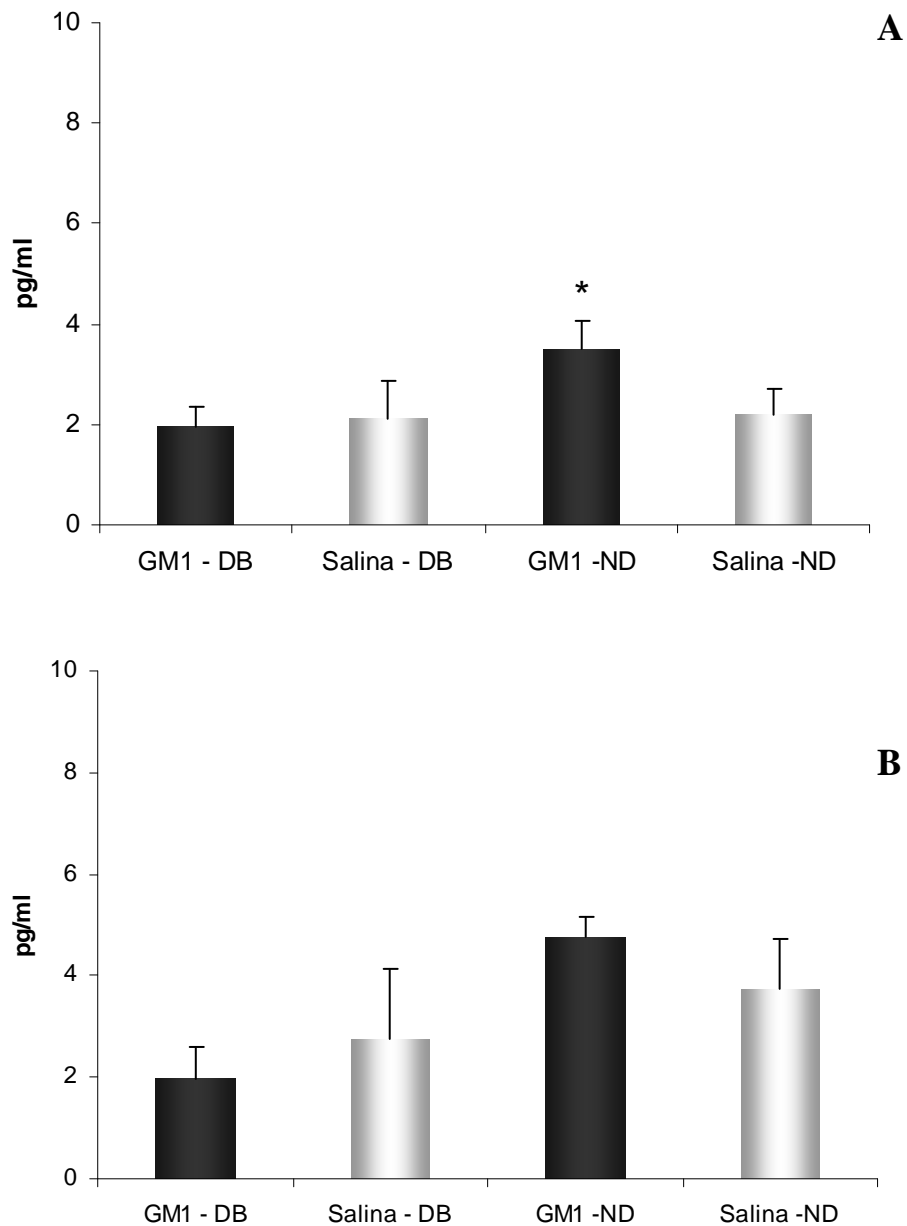
A avaliação sérica de TNF- $\alpha$  (Figura 9A, pág.83) revelou o contrário de IFN- $\gamma$ , visto que os níveis encontrados nos animais não diabéticos tratados com GM1 estavam aumentados quando comparados ao seu respectivo controle (GM1-ND,  $3.52 \pm 0.5$ ; Salina-ND,  $2.18 \pm 0.5$ ) ( $p < 0.05$ ).

Quanto à produção de IL-1 $\beta$  (GM1-DB,  $1.96 \pm 0.6$ ; Salina-DB,  $2.74 \pm 1.4$ ; GM1-ND,  $4.77 \pm 0.4$ ; Salina-ND,  $3.72 \pm 1.0$ ) (Figura 9B, pág.83) não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados e seus respectivos controles salina. Porém, os animais não diabéticos tratados com GM1 apresentaram níveis mais elevados desta citocina quando comparados aos animais diabéticos deste mesmo grupo ( $p < 0.05$ ).



### Grupos Experimentais

**Figura 8** – Dosagem sérica de IL-12 (A) e IFN- $\gamma$  (B) pelo método imunoenzimático ELISA em camundongos NOD tratados com GM1, diabéticos (GM1-DB) (n=5) e não diabéticos (GM1-ND) (n=5), e salina, diabéticos (Salina-DB) (n=5) e não diabéticos (Salina-ND) (n=5). Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (\* p<0,05 – Mann-Whitney).



### Grupos Experimentais

**Figura 9** – Dosagem sérica de TNF- $\alpha$  (A) e IL-1 $\beta$  (B) pelo método imunoenzimático ELISA em camundongos NOD tratados com GM1, diabéticos (GM1-DB) (n=5) e não diabéticos (GM1-ND) (n=5), e salina, diabéticos (Salina-DB) (n=5) e não diabéticos (Salina-ND) (n=5). Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (\* p<0,05 – Mann-Whitney).



## ***5- DISCUSSÃO***

O desenvolvimento do DM-1 é resultado da destruição das células  $\beta$  nas ilhotas pancreáticas através de um processo inflamatório crônico autoimune [151]. Grande parte dos conhecimentos da fisiopatologia desta doença está fundamentada em estudos realizados com camundongos da linhagem NOD. Nestes animais, hiperglicemia e início do diabetes são atribuídos à infiltração de leucócitos auto-reativos nas ilhotas de Langerhans que induzem a destruição das células  $\beta$  [152]. Devido à grande similaridade ao DM-1 em humanos, o camundongo NOD é usado amplamente como ferramenta para estudos pré-clínicos visando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas [13].

As investigações de terapias para o DM-1 baseadas na intervenção sobre o sistema imunológico revelam que estas podem ser estratégias promissoras para impedir a instalação e/ou evolução da doença. Assim, o estudo de substâncias com propriedades imunomodulatórias tem atraído o interesse de grupos de pesquisa [40] e, dentre elas, destacamos os gangliosídeos [128, 131, 153].

A ação dos gangliosídeos no sistema imune vem sendo amplamente estudada. Especificamente, foi demonstrado que gangliosídeos suprimem a atividade de linfócitos citotóxicos [124], a ativação de linfócitos Th [125, 154], citotoxicidade de células natural killer (NK) [155], ao mesmo tempo em que ativam células T com atividade supressora [156]. WILBERZ et al. (1988) [128] verificaram que o tratamento de camundongos NOD com gangliosídeos reduzia significativamente a incidência do diabetes nesses animais, embora não houvesse diminuição na perivasculite, primeira modificação histopatológica que precede a insulite. Posteriormente, PAPACCIO et al. (1993) [131] constataram que a administração de mistura de gangliosídeos em camundongos NOD da 5<sup>a</sup> a 21<sup>a</sup> semanas de vida controlava a hiperglicemia, postergando a instalação do diabetes clínico. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas entre animais tratados e controles quanto ao aparecimento e progressão da insulite. Resultados prévios em nosso laboratório demonstram que o tratamento de fêmeas NOD com 150 mg/kg/dia de mistura de gangliosídeos (21% GM1, 40% GD1a, 16% GD1b e 19% de GT1b) a partir da 4<sup>a</sup> semana de vida protege os animais da manifestação do DM-1, com modulação sobre os elementos celulares e supressão de citocinas pró-inflamatórias em ilhotas e células esplênicas.

Especificamente, o GM1 é capaz de modular as atividades de uma grande variedade de proteínas de membrana incluindo receptores, enzimas, canais iônicos e moléculas de adesão [45, 133-135]. Além disso, pode suprimir proliferação de linfócitos T, atividade citolítica e expressão de CD4 [157]. Este gangliosídeo mascara epítomos de CD4, induzindo a internalização da molécula CD4 em um compartimento endocítico onde é eventualmente degradada [137].

Nossos resultados mostram que a administração de GM1 na dose diária de 100 mg/kg é capaz de reduzir a incidência do diabetes, visto que, 56,6% dos animais tratados desenvolveram a doença, contrastando com os animais do grupo salina, cuja incidência de DM-1 foi de 75%.

No camundongo NOD a insulite inicia-se na 4ª semana de vida com progressão visualizada pelo aumento de células inflamatórias infiltrativas que ocorre em paralelo à destruição das células  $\beta$  nas ilhotas pancreáticas [5, 13, 131]. Nos animais tratados com GM1, o índice de insulite, representativo da gravidade do comprometimento das ilhotas, estava diminuído em relação ao controle salina. Podemos observar ainda, número de ilhotas residuais (Grau 0) superior aos animais que receberam salina, bem como, um número reduzido de ilhotas completamente destruídas (Grau IV), sugerindo, desta maneira, a existência de fator(es) de proteção ou regeneração das ilhotas pancreáticas.

As primeiras células imunes que se acumulam ao redor das ilhotas e ductos dos camundongos NOD com três semanas de idade são macrófagos e células dendríticas (perinsulite) [158-160]. Subsequentemente, células T migram para o pâncreas, iniciando a invasão das ilhotas, seguidas por macrófagos, células NK e linfócitos B [159, 161].

O fenótipo das subpopulações de linfócitos T,  $CD4^+$  e  $CD8^+$ , associados à insulite no DM-1, foi identificado por KIKUTANI E MAKINO (1992) [5]. Posteriormente, outros autores descreveram as propriedades sinérgicas destas células na patogênese do diabetes. Com a progressão do diabetes há um aumento na proporção de células  $CD8^+$ , macrófagos, linfócitos B e células NK em associação a destruição das células  $\beta$  [41, 53, 64].

A inativação de macrófagos com sílica, substância tóxica para este tipo celular, resulta na prevenção de insulite e diabetes em camundongos NOD. Este resultado sugere que macrófagos possuem papel importante no desenvolvimento da insulite e diabetes nesses animais, participando ativamente do processo inflamatório da ilhota [151, 162].

Neste contexto, nos ensaios de imunofluorescência, verificamos que linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos T CD8<sup>+</sup> e macrófagos nos animais tratados com GM1 e não diabéticos concentram-se na periferia da ilhota de Langerhans, com padrão semelhante de marcação, em número substancialmente menor quando comparado ao grupo salina não diabético. Já nos animais diabéticos, tratados com GM1 ou salina, observamos presença mais marcante dessas células, que ocupam a totalidade da ilhota. Nossos dados, desta maneira, sugerem ação supressora do GM1 sobre linfócitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e macrófagos.

Sabe-se que as ilhotas de Langerhans são circundadas por células de Schwann não-mielinizadas. WINER et al. (2003) [37] demonstraram que camundongos NOD podem exibir respostas espontâneas às proteínas das células de Schwann, incluindo os antígenos compartilhados com as ilhotas, como GAD<sup>65</sup>, bem como proteínas neuronais como S100β e GFAP. As similaridades entre células pancreáticas e neurônios sugerem que estes tipos celulares podem dividir os mesmos fatores de crescimento e diferenciação [163].

A função e sobrevivência das células β dependem fortemente de nutrientes e de fatores de crescimento, como glicose e NGF, respectivamente. A interação desses nutrientes e fatores de crescimento promove o crescimento e manutenção destas células por meio de mecanismos ainda não elucidados [164]. A sinalização de NGF via seu receptor de alta afinidade TrkA possui um importante papel na proliferação e sobrevivência de células β [165-167].

Em células neuronais, sabe-se que os efeitos tróficos de neurotrofinas podem ser reproduzidos pelo gangliosídeo GM1, embora as neurotrofinas sejam farmacologicamente mais potentes. As propriedades neuroprotetoras do GM1 são semelhantes às neurotrofinas, e por esta razão, sugerem mecanismos de ação similares [119]. Estudos anteriores demonstraram que GM1 é capaz de ativar TrkA, sugerindo que este gangliosídeo mimetiza a atividade trófica do NGF [141]. Além disso, gangliosídeos

exercem atividade trófica por induzir rápida liberação de neurotrofinas em células neuronais e não neuronais que ativam seus respectivos receptores. Entretanto, os mecanismos utilizados para tanto permanecem desconhecidos [141].

Baseados nestas considerações, analisamos a expressão de NGF, TrkA e GM1 em cortes histológicos de pâncreas de camundongos NOD tratados com GM1 e tratados com salina. Verificamos que animais tratados com GM1 e não diabéticos exibem marcação definida e mais intensa de NGF e TrkA na região periférica da ilhota, juntamente com GM1 que se apresenta melhor distribuído por toda a ilhota quando comparado aos demais grupos.

Estudos recentes demonstram que a fase pré diabética, tem como alvo principal as células de Schwann peri-ilhotas. Tanto autoanticorpos contra essas células, quanto células T auto-reativas são encontradas em humanos com provável pré-diabetes e fêmeas NOD jovens. Os antígenos prováveis são principalmente constituintes do tecido nervoso central e periférico [37, 168]. Deste modo, sugere-se uma possível relação de localização destes marcadores com a bainha de Schwann peri-ilhota, protegendo seus componentes e mantendo a integridade da ilhota.

MALLEI et al. (2004) [169] expuseram células NIH-3T3 que expressam receptores TrkA a seu respectivo ligante NGF e a GM1, conhecido por ativar este receptor. A síntese de NGF foi então determinada em nível gênico e protéico. Estes autores verificaram que o GM1 aumentou de maneira tempo-dependente a expressão gênica e os níveis protéicos de NGF. Interessantemente, outros autores demonstraram que GM1 também aumenta os níveis de RNAm de NGF in vivo, em cérebro de ratos, indicando que os efeitos deste gangliosídeo não ocorrem somente em linhagens celulares in vitro [170].

De maneira semelhante a estes resultados, verificamos que expressão gênica de NGF e TrkA estava aumentada em ilhotas isoladas de animais tratados com GM1 e não diabéticos, contrastando com animais do grupo salina que não expressaram esta neurotrofina e seu receptor. Estes achados podem sugerir a ação do NGF como regulador de sobrevivência da célula  $\beta$ , preservando a biossíntese e secreção de insulina, além de inibir a apoptose desta célula [166, 171].



Estudos prévios sugerem que a resposta autoimune direcionada contra célula  $\beta$  da ilhota de Langerhans é mediada por linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1), responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias na fase efetora da insulite no camundongo NOD [31, 67]. Uma variedade de citocinas é encontrada em nível gênico e/ou protéico na lesão pancreática deste modelo experimental correlacionando a insulite destrutiva com a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e citocinas Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-12). Por outro lado, citocinas Th2 (IL-4 e IL-10) e citocinas Th3 (TGF- $\beta$ ) podem regular o processo inflamatório autoimune [32, 56, 153].

Neste contexto, analisamos a expressão de RNAm das citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1- $\beta$  em ilhotas isoladas e células esplênicas dos animais tratados com GM1 e salina bem como seus níveis séricos.

Os resultados da expressão gênica em ilhotas de animais não diabéticos revelaram que IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  eram significativamente menores nos animais tratados com GM1, ocorrendo o contrário com IL-12 e TNF- $\alpha$ , que estavam aumentados neste grupo, em concordância com os resultados da dosagem sérica, que também estavam aumentados neste grupo.

Considerando-se as células esplênicas como compartimento periférico ao estudo dos efeitos da administração de GM1 na expressão de citocinas, observamos níveis reduzidos de RNAm nos animais não diabéticos tratados com GM1 em relação aos animais tratados com salina, com exceção de IL-1 $\beta$  que não apresentou diferenças significativas.

Estes resultados sugerem que a participação das citocinas no processo de lesão e suas propriedades funcionais estão condicionadas a diferentes fatores, como o microambiente inflamatório, origem do estímulo e equilíbrio das propriedades sinérgicas e antagônicas das citocinas presentes no compartimento. Dessa maneira, nossos resultados sugerem diferenças na modulação das citocinas em ambos os compartimentos, local e periférico, em resposta à administração de GM1.

Dessa forma, nossos resultados reforçam a ação imunomodulatória do GM1, provavelmente relacionada à inibição da proliferação de linfócitos T e expressão de CD4, propriedades conhecidas deste gangliosídeo, agindo em sinergismo com fatores de crescimento de maneira a proteger as células  $\beta$  dos processos apoptóticos.



## ***6- CONCLUSÕES***

A partir dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

1. A administração de GM1 na dose de 100mg/kg/dia em camundongos NOD fêmeas a partir da 4<sup>a</sup> semana de vida mostrou-se capaz de diminuir o índice de infiltrado inflamatório e conseqüentemente a expressão do diabetes em relação ao grupo controle.
2. A análise da imunofenotipificação do infiltrado celular em animais tratados com GM1 e não diabéticos sugere ação supressora deste gangliosídeo sobre linfócitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e macrófagos.
3. Cortes histológicos de pâncreas de camundongos NOD tratados com GM1 e não diabéticos exibem intensa marcação de NGF e TrkA na região periférica da ilhota com possível relação de localização destes marcadores com a bainha de Schwann peri-ilhota, sugerindo proteção e manutenção da integridade da ilhota.
4. GM1 é capaz de modular negativamente a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) em células esplênicas. Em ilhotas isoladas esta modulação só é observada sobre a expressão gênica de IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ .



## ***7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

- [1] Wasserfall CA, MA. Autoantibody markers for the diagnosis and prediction of type 1 diabetes. *Autoimmun Rev.* 2006;5:424-8
- [2] Atkinson MA, Kaufman DL, Campbell L, Gibbs KA, Shah SC, Bu DF, et al. Response of peripheral-blood mononuclear cells to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *Lancet.* 1992 Feb 22;339(8791):458-9.
- [3] Barker JM. Clinical review: Type 1 diabetes-associated autoimmunity: natural history, genetic associations, and screening. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Apr;91(4):1210-7.
- [4] Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med.* 1986 May 22;314(21):1360-8.
- [5] Kikutani H, Makino S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol.* 1992;51:285-322.
- [6] Liu E, Eisenbarth GS. Type 1A diabetes mellitus-associated autoimmunity. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2002 Jun;31(2):391-410, vii-viii.
- [7] Seissler J, Scherbaum WA. Are we ready to predict and prevent endocrine/organ specific autoimmune diseases? *Springer Semin Immunopathol.* 2002 Dec; 24(3):273-95.
- [8] Rossini AA. Immunopathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes Rev.* 1993;1:46-75.
- [9] Schwartz SL, Hanson C, Lucas C, Rosenblatt S, Rosenstock J, Whittier F, et al. Double-blind, placebo-controlled study of ramipril in diabetics with mild to moderate hypertension. *Clin Ther.* 1993 Jan-Feb;15(1):79-87.
- [10] Seissler J, Scherbaum WA. Autoimmune diagnostics in diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(2):133-7.
- [11] Bach JF, Mathis D. The NOD mouse. *Res Immunol.* 1997 Jun;148(5):285-6.

- [12] Ridgway WM. The non obese diabetic (NOD) mouse: a unique model for understanding the interaction between genetics and T cell responses. *Rev Endocr Metab Disord.* 2003 Sep;4(3):263-9.
- [13] Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:447-85.
- [14] Lafferty KJ. Immunobiology of autoimmune diabetes. *Res Immunol.* 1997 Jun;148(5):313-9.
- [15] Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet.* 1974 Nov 30;2(7892):1279-83.
- [16] Palmer JP, Cooney MK, Crossley JR, Hollander PH, Asplin CM. Antibodies to viruses and to pancreatic islets in nondiabetic and insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Care.* 1981 Sep-Oct;4(5):525-8.
- [17] Bottazzo GF, Genovese S, Bosi E, Dean BM, Christie MR, Bonifacio E. Novel considerations on the antibody/autoantigen system in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Ann Med.* 1991 Oct;23(4):453-61.
- [18] Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature.* 1990 Sep 13;347(6289):151-6.
- [19] Erlander MG, Tobin AJ. The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochem Res.* 1991 Mar;16(3):215-26.
- [20] Kim OS, Park EJ, Joe EH, Jou I. JAK-STAT signaling mediates gangliosides-induced inflammatory responses in brain microglial cells. *J Biol Chem.* 2002 Oct 25;277(43):40594-601.

- [21] Durinovic-Bello I, Hummel M, Ziegler AG. Cellular immune response to diverse islet cell antigens in IDDM. *Diabetes*. 1996 Jun;45(6):795-800.
- [22] Harrison LC, Chu SX, DeAizpurua HJ, Graham M, Honeyman MC, Colman PG. Islet-reactive T cells are a marker of preclinical insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest*. 1992 Apr;89(4):1161-5.
- [23] Keller RJ. Cellular immunity to human insulin in individuals at high risk for the development of type I diabetes mellitus. *J Autoimmun*. 1990 Jun;3(3):321-7.
- [24] Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev*. 1994 Aug;15(4):516-42.
- [25] Corbett JA, Sweetland MA, Wang JL, Lancaster JR, Jr., McDaniel ML. Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Mar 1;90(5):1731-5.
- [26] Eizirik DL, Flodstrom M, Karlens AE, Welsh N. The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 1996 Aug;39(8):875-90.
- [27] Pociot F, Ronningen KS, Bergholdt R, Lorenzen T, Johannesen J, Ye K, et al. Genetic susceptibility markers in Danish patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes--evidence for polygenicity in man. Danish Study Group of Diabetes in Childhood. *Autoimmunity*. 1994;19(3):169-78.
- [28] Aoki CA, Borchers AT, Ridgway WM, Keen CL, Ansari AA, Gershwin ME. NOD mice and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2005 Jul;4(6):373-9.
- [29] Atkinson MA. Mechanisms underlying the loss of self tolerance in NOD mice. *Res Immunol*. 1997 Jun;148(5):301-6.
- [30] Nepom GT, Erlich H. MHC class-II molecules and autoimmunity. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:493-525.



- [31] Bradley LM, Asensio VC, Schioetz LK, Harbertson J, Krahl T, Patstone G, et al. Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. *J Immunol*. 1999 Mar 1;162(5):2511-20.
- [32] Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord*. 2003 Sep;4(3):291-9.
- [33] Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Shi Y, Morgan AR, Bleackley RC. DNA fragmentation is an early event in cytokine-induced islet beta-cell destruction. *Diabetologia*. 1994 Aug;37(8):733-8.
- [34] Thomas FP, Trojaborg W, Nagy C, Santoro M, Sadiq SA, Latov N, et al. Experimental autoimmune neuropathy with anti-GM1 antibodies and immunoglobulin deposits at the nodes of Ranvier. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1991;82(5):378-83.
- [35] Sunami E, Kanazawa H, Hashizume H, Takeda M, Hatakeyama K, Ushiki T. Morphological characteristics of Schwann cells in the islets of Langerhans of the murine pancreas. *Arch Histol Cytol*. 2001 May;64(2):191-201.
- [36] Teitelman G, Guz Y, Ivkovic S, Ehrlich M. Islet injury induces neurotrophin expression in pancreatic cells and reactive gliosis of peri-islet Schwann cells. *J Neurobiol*. 1998 Mar;34(4):304-18.
- [37] Winer S, Tsui H, Lau A, Song A, Li X, Cheung RK, et al. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. *Nat Med*. 2003 Feb;9(2):198-205.
- [38] Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu*. 1980 Jan;29(1):1-13.
- [39] Pavin EJ, Zollner RL. Implantação da linhagem NOD mice (camundongos diabéticos não-obesos) no Brasil: contribuição deste modelo animal ao estudo do diabetes mellitus insulino-dependente e outras doenças autoimunes. *Arq Bras Endo Metabol*. 1994;38:105-8.

- [40] Bach JF. Immunotherapy of type 1 diabetes: lessons for other autoimmune diseases. *Arthritis Res.* 2002;4 Suppl 3:S3-15.
- [41] Wong FS, Janeway CA, Jr. The role of CD4 and CD8 T cells in type I diabetes in the NOD mouse. *Res Immunol.* 1997 Jun;148(5):327-32.
- [42] Shizuru JA, Taylor-Edwards C, Banks BA, Gregory AK, Fathman CG. Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes. *Science.* 1988 Apr 29;240(4852):659-62.
- [43] Bedossa P, Bendelac A, Bach JF, Carnaud C. Syngeneic T cell transfer of diabetes into NOD newborn mice: in situ studies of the autoimmune steps leading to insulin-producing cell destruction. *Eur J Immunol.* 1989 Oct;19(10):1947-51.
- [44] Nagata M, Santamaria P, Kawamura T, Utsugi T, Yoon JW. Evidence for the role of CD8+ cytotoxic T cells in the destruction of pancreatic beta-cells in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 1994 Feb 15;152(4):2042-50.
- [45] Wong FS, Visintin I, Wen L, Flavell RA, Janeway CA, Jr. CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *J Exp Med.* 1996 Jan 1;183(1):67-76.
- [46] Chervonsky AV, Wang Y, Wong FS, Visintin I, Flavell RA, Janeway CA, Jr., et al. The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell.* 1997 Apr 4;89(1):17-24.
- [47] Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia.* 2001 Dec;44(12):2115-33.
- [48] Ingelsson E, Saldeen J, Welsh N. Islet expression of perforin, Fas/Apo-1 and interleukin-1 converting enzyme (ICE) in non-obese diabetic (NOD) mice. *Immunol Lett.* 1998 Oct;63(3):125-9.
- [49] Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell.* 1996 May 3;85(3):291-7.

- [50] Miller SD, Shevach EM. Immunoregulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: editorial overview. *Res Immunol*. 1998 Nov-Dec;149(9):753-9.
- [51] Rohane PW, Shimada A, Kim DT, Edwards CT, Charlton B, Shultz LD, et al. Islet-infiltrating lymphocytes from prediabetic NOD mice rapidly transfer diabetes to NOD-scid/scid mice. *Diabetes*. 1995 May;44(5):550-4.
- [52] Hayward AR, Shreiber M. Neonatal injection of CD3 antibody into nonobese diabetic mice reduces the incidence of insulinitis and diabetes. *J Immunol*. 1989 Sep 1;143(5):1555-9.
- [53] Kay TW, Chaplin HL, Parker JL, Stephens LA, Thomas HE. CD4+ and CD8+ T lymphocytes: clarification of their pathogenic roles in diabetes in the NOD mouse. *Res Immunol*. 1997 Jun;148(5):320-7.
- [54] O'Reilly LA, Hutchings PR, Crocker PR, Simpson E, Lund T, Kioussis D, et al. Characterization of pancreatic islet cell infiltrates in NOD mice: effect of cell transfer and transgene expression. *Eur J Immunol*. 1991 May;21(5):1171-80.
- [55] Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev*. 1998 Jun;14(2):129-51.
- [56] Hill N, Sarvetnick N. Cytokines: promoters and dampeners of autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2002 Dec;14(6):791-7.
- [57] Kawamura T, Nagata M, Utsugi T, Yoon JW. Prevention of autoimmune type I diabetes by CD4+ suppressor T cells in superantigen-treated non-obese diabetic mice. *J Immunol*. 1993 Oct 15;151(8):4362-70.
- [58] Qin HY, Sadelain MW, Hitchon C, Lauzon J, Singh B. Complete Freund's adjuvant-induced T cells prevent the development and adoptive transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 1993 Mar 1;150(5):2072-80.

- [59] Hartemann-Heurtier A, Richard MF, Boitard C. Absence of significant Th2 response in diabetes-prone non-obese diabetic (NOD) mice. *Clin Exp Immunol*. 1999 May;116(2):225-30.
- [60] Ventura-Oliveira D, Vilella CA, Zanin ME, Castro GM, Moreira Filho DC, Zollner RL. Kinetics of TNF-alpha and IFN-gamma mRNA expression in islets and spleen of NOD mice. *Braz J Med Biol Res*. 2002 Nov;35(11):1347-55.
- [61] Gurlo T, Kawamura K, von Grafenstein H. Role of inflammatory infiltrate in activation and effector function of cloned islet reactive nonobese diabetic CD8+ T cells: involvement of a nitric oxide-dependent pathway. *J Immunol*. 1999 Dec 1;163(11):5770-80.
- [62] Iwahashi H, Hanafusa T, Eguchi Y, Nakajima H, Miyagawa J, Itoh N, et al. Cytokine-induced apoptotic cell death in a mouse pancreatic beta-cell line: inhibition by Bcl-2. *Diabetologia*. 1996 May;39(5):530-6.
- [63] Wachlin G, Augstein P, Schroder D, Kuttler B, Kloting I, Heinke P, et al. IL-1beta, IFN-gamma and TNF-alpha increase vulnerability of pancreatic beta cells to autoimmune destruction. *J Autoimmun*. 2003 Jun;20(4):303-12.
- [64] Thomas HE, Kay TW. Beta cell destruction in the development of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes Metab Res Rev*. 2000 Jul-Aug;16(4):251-61.
- [65] Muir A, Peck A, Clare-Salzler M, Song YH, Cornelius J, Luchetta R, et al. Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulitis characterized by diminished intraislet interferon-gamma transcription. *J Clin Invest*. 1995 Feb;95(2):628-34.
- [66] Toyoda H, Formby B, Magalong D, Redford A, Chan E, Takei S, et al. In situ islet cytokine gene expression during development of type I diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Immunol Lett*. 1994 Mar;39(3):283-8.

- [67] Hirai H, Kaino Y, Ito T, Kida K. Analysis of cytokine mRNA expression in pancreatic islets of nonobese diabetic mice. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2000 Jan;13(1):91-8.
- [68] Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Nerup J, Dinarello CA, Svenson M, Nielsen JH. Affinity-purified human interleukin I is cytotoxic to isolated islets of Langerhans. *Diabetologia.* 1986 Jan;29(1):63-7.
- [69] Yagi N, Yokono K, Amano K, Nagata M, Tsukamoto K, Hasegawa Y, et al. Expression of intercellular adhesion molecule 1 on pancreatic beta-cells accelerates beta-cell destruction by cytotoxic T-cells in murine autoimmune diabetes. *Diabetes.* 1995 Jul;44(7):744-52.
- [70] David-Watine B, Israel A, Kourilsky P. The regulation and expression of MHC class I genes. *Immunol Today.* 1990 Aug;11(8):286-92.
- [71] Thomas HE, Darwiche R, Corbett JA, Kay TW. Interleukin-1 plus gamma-interferon-induced pancreatic beta-cell dysfunction is mediated by beta-cell nitric oxide production. *Diabetes.* 2002 Feb;51(2):311-6.
- [72] Thomas HE, Darwiche R, Corbett JA, Kay TW. Evidence that beta cell death in the nonobese diabetic mouse is Fas independent. *J Immunol.* 1999 Aug 1;163(3):1562-9.
- [73] Levi-Montalcini R. Effects of mouse tumor transplantation on the nervous system. *Ann N Y Acad Sci.* 1952 Aug 8;55(2):330-44.
- [74] Hallbook F. Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr Opin Neurobiol.* 1999 Oct;9(5):616-21.
- [75] Friedman WJ, Greene LA. Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp Cell Res.* 1999 Nov 25;253(1):131-42.
- [76] Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci.* 1996;19:289-317.

- [77] Hempstead BL. The many faces of p75NTR. *Curr Opin Neurobiol.* 2002 Jun;12(3):260-7.
- [78] Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Gotz R, Barde YA. Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *Embo J.* 1992 Mar;11(3):917-22.
- [79] Bothwell M. p75NTR: a receptor after all. *Science.* 1996 Apr 26;272(5261):506-7.
- [80] Lee FS, Kim AH, Khursigara G, Chao MV. The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Curr Opin Neurobiol.* 2001 Jun;11(3):281-6.
- [81] Esposito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao MV, Kaplan DR, et al. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem.* 2001 Aug 31;276(35):32687-95.
- [82] Carter BD, Lewin GR. Neurotrophins live or let die: does p75NTR decide? *Neuron.* 1997 Feb;18(2):187-90.
- [83] Kendall SE, Goldhawk DE, Kubu C, Barker PA, Verdi JM. Expression analysis of a novel p75(NTR) signaling protein, which regulates cell cycle progression and apoptosis. *Mech Dev.* 2002 Sep;117(1-2):187-200.
- [84] Meldolesi J, Sciorati C, Clementi E. The p75 receptor: first insights into the transduction mechanisms leading to either cell death or survival. *Trends Pharmacol Sci.* 2000 Jul;21(7):242-3.
- [85] Miller FD, Kaplan DR. On Trk for retrograde signaling. *Neuron.* 2001 Dec 6;32(5):767-70.
- [86] Barbacid M. Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Sep 7;766:442-58.

- [87] Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:677-736.
- [88] Meakin SO, Shooter EM. The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci.* 1992 Sep;15(9):323-31.
- [89] Ip NY, Stitt TN, Tapley P, Klein R, Glass DJ, Fandl J, et al. Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the Trk receptors in neuronal and nonneuronal cells. *Neuron.* 1993 Feb;10(2):137-49.
- [90] Kaplan DR, Martin-Zanca D, Parada LF. Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature.* 1991 Mar 14;350(6314):158-60.
- [91] Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell.* 1991 Apr 5;65(1):189-97.
- [92] Ip NY, Ibanez CF, Nye SH, McClain J, Jones PF, Gies DR, et al. Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Apr 1;89(7):3060-4.
- [93] Lamballe F, Klein R, Barbacid M. trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell.* 1991 Sep 6;66(5):967-79.
- [94] van Kesteren RE, Fainzilber M, Hauser G, van Minnen J, Vreugdenhil E, Smit AB, et al. Early evolutionary origin of the neurotrophin receptor family. *Embo J.* 1998 May 1;17(9):2534-42.
- [95] Tessarollo L. Pleiotropic functions of neurotrophins in development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998 Jun;9(2):125-37.
- [96] Aloe L. Nerve growth factor and neuroimmune responses: basic and clinical observations. *Arch Physiol Biochem.* 2001 Oct;109(4):354-6.

- [97] Aloe L, Simone MD, Properzi F. Nerve growth factor: a neurotrophin with activity on cells of the immune system. *Microsc Res Tech*. 1999 May 15-Jun 1;45(4-5):285-91.
- [98] Otten U, Gadiant RA. Neurotrophins and cytokines--intermediaries between the immune and nervous systems. *Int J Dev Neurosci*. 1995 Jun-Jul;13(3-4):147-51.
- [99] Sariola H. The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. *Cell Mol Life Sci*. 2001 Jul;58(8):1061-6.
- [100] Levi-Montalcini R. The nerve growth factor: thirty-five years later. *Biosci Rep*. 1987 Sep;7(9):681-99.
- [101] Levi-Montalcini R, Angeletti PU. Second symposium on catecholamines. Modification of sympathetic function. Immunosympathectomy. *Pharmacol Rev*. 1966 Mar;18(1):619-28.
- [102] Thoenen H, Bandtlow C, Heumann R. The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: comparison with the periphery. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1987;109:145-78.
- [103] Aloe L, Skaper SD, Leon A, Levi-Montalcini R. Nerve growth factor and autoimmune diseases. *Autoimmunity*. 1994;19(2):141-50.
- [104] Bonini S, Lambiase A, Bonini S, Angelucci F, Magrini L, Manni L, et al. Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 1;93(20):10955-60.
- [105] Otten U, Ehrhard P, Peck R. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Dec;86(24):10059-63.
- [106] Boyle MD, Lawman MJ, Gee AP, Young M. Nerve growth factor: a chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes in vivo. *J Immunol*. 1985 Jan;134(1):564-8.



- [107] Kannan Y, Ushio H, Koyama H, Okada M, Oikawa M, Yoshihara T, et al. 2.5S nerve growth factor enhances survival, phagocytosis, and superoxide production of murine neutrophils. *Blood*. 1991 Mar 15;77(6):1320-5.
- [108] Ehrhard PB, Ganter U, Stalder A, Bauer J, Otten U. Expression of functional trk protooncogene in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jun 15;90(12):5423-7.
- [109] Horigome K, Pryor JC, Bullock ED, Johnson EM, Jr. Mediator release from mast cells by nerve growth factor. Neurotrophin specificity and receptor mediation. *J Biol Chem*. 1993 Jul 15;268(20):14881-7.
- [110] Kannan Y, Matsuda H, Ushio H, Kawamoto K, Shimada Y. Murine granulocyte-macrophage and mast cell colony formation promoted by nerve growth factor. *Int Arch Allergy Immunol*. 1993;102(4):362-7.
- [111] Kanaka-Gantenbein C, Tazi A, Czernichow P, Scharfmann R. In vivo presence of the high affinity nerve growth factor receptor Trk-A in the rat pancreas: differential localization during pancreatic development. *Endocrinology*. 1995 Feb;136(2):761-9.
- [112] Miralles F, Philippe P, Czernichow P, Scharfmann R. Expression of nerve growth factor and its high-affinity receptor Trk-A in the rat pancreas during embryonic and fetal life. *J Endocrinol*. 1998 Mar;156(3):431-9.
- [113] Polak M, Scharfmann R, Seilheimer B, Eisenbarth G, Dressler D, Verma IM, et al. Nerve growth factor induces neuron-like differentiation of an insulin-secreting pancreatic beta cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jun 15;90(12):5781-5.
- [114] Rosenbaum T, Vidaltamayo R, Sanchez-Soto MC, Zentella A, Hiriart M. Pancreatic beta cells synthesize and secrete nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 23;95(13):7784-8.
- [115] Vidaltamayo R, Sanchez-Soto MC, Hiriart M. Nerve growth factor increases sodium channel expression in pancreatic beta cells: implications for insulin secretion. *Faseb J*. 2002 Jun;16(8):891-2.

- [116] Rausa FM, Ye H, Lim L, Duncan SA, Costa RH. In situ hybridization with 33P-labeled RNA probes for determination of cellular expression patterns of liver transcription factors in mouse embryos. *Methods*. 1998 Sep;16(1):29-41.
- [117] Singh J, Adeghate E, Salido GM, Pariente JA, Yago MD, Juma LO. Interaction of islet hormones with cholecystokinin octapeptide-evoked secretory responses in the isolated pancreas of normal and diabetic rats. *Exp Physiol*. 1999 Mar;84(2):299-318.
- [118] Tettamanti G. Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. *Glycoconj J*. 2004;20(5):301-17.
- [119] Mocchetti I. Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Oct;62(19-20):2283-94.
- [120] Tettamanti G, Riboni L. Gangliosides turnover and neural cells function: a new perspective. *Prog Brain Res*. 1994;101:77-100.
- [121] Yu RK. Development regulation of ganglioside metabolism. *Prog Brain Res*. 1994;101:31-44.
- [122] Misasi R, Dionisi S, Farilla L, Carabba B, Lenti L, Di Mario U, et al. Gangliosides and autoimmune diabetes. *Diabetes Metab Rev*. 1997 Sep;13(3):163-79.
- [123] Yates AJ, Rampersaud A. Sphingolipids as receptor modulators. An overview. *Ann N Y Acad Sci*. 1998 Jun 19;845:57-71.
- [124] Merritt WD, Bailey JM, Pluznik DH. Inhibition of interleukin-2-dependent cytotoxic T-lymphocyte growth by gangliosides. *Cell Immunol*. 1984 Nov;89(1):1-10.
- [125] Offner H, Thieme T, Vandenbark AA. Gangliosides induce selective modulation of CD4 from helper T lymphocytes. *J Immunol*. 1987 Nov 15;139(10):3295-305.
- [126] Nayak RC, Omar MA, Rabizadeh A, Srikanta S, Eisenbarth GS. "Cytoplasmic" islet cell antibodies. Evidence that the target antigen is a sialoglycoconjugate. *Diabetes*. 1985 Jun;34(6):617-9.

- [127] Colman PG, Nayak RC, Campbell IL, Eisenbarth GS. Binding of cytoplasmic islet cell antibodies is blocked by human pancreatic glycolipid extracts. *Diabetes*. 1988 May;37(5):645-52.
- [128] Wilberz S, Herberg L, Renold AE. Gangliosides in vivo reduce diabetes incidence in non-obese diabetic mice. *Diabetologia*. 1988 Nov;31(11):855-7.
- [129] Dotta F, Colman PG, Lombardi D, Scharp DW, Andreani D, Pontieri GM, et al. Ganglioside expression in human pancreatic islets. *Diabetes*. 1989 Nov; 38(11):1478-83.
- [130] Dotta F, Tiberti C, Previti M, Anastasi E, Andreani D, Lenti L, et al. Rat pancreatic ganglioside expression: differences between a model of autoimmune islet B cell destruction and a normal strain. *Clin Immunol Immunopathol*. 1993 Feb;66(2):143-9.
- [131] Papaccio G, Chieffi Baccari G, Mezzogiorno V. In vivo effect of gangliosides on non-obese diabetic mice. *Acta Anat (Basel)*. 1993;147(3):168-73.
- [132] Dotta F, Falorni A, Tiberti C, Dionisi S, Anastasi E, Torresi P, et al. Autoantibodies to the GM2-1 islet ganglioside and to GAD-65 at type 1 diabetes onset. *J Autoimmun*. 1997 Dec;10(6):585-8.
- [133] Pitto M, Mutoh T, Kuriyama M, Ferraretto A, Palestini P, Masserini M. Influence of endogenous GM1 ganglioside on TrkB activity, in cultured neurons. *FEBS Lett*. 1998 Nov 13;439(1-2):93-6.
- [134] Rampersaud AA, Oblinger JL, Ponnappan RK, Burry RW, Yates AJ. Gangliosides and growth factor receptor regulation. *Biochem Soc Trans*. 1999 Aug;27(4):415-22.
- [135] Wang Y, Tsui Z, Yang F. Antagonistic effect of ganglioside GM1 and GM3 on the activity and conformation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *FEBS Lett*. 1999 Aug 20;457(1):144-8.
- [136] Wu G, Lu ZH, Ledeen RW. GM1 ganglioside modulates prostaglandin E1 stimulated adenylyl cyclase in neuro-2A cells. *Glycoconj J*. 1996 Apr;13(2):235-9.

- [137] Saggiaro D, Sorio C, Calderazzo F, Callegaro L, Panozzo M, Berton G, et al. Mechanism of action of the monosialoganglioside GM1 as a modulator of CD4 expression. Evidence that GM1-CD4 interaction triggers dissociation of p56lck from CD4, and CD4 internalization and degradation. *J Biol Chem.* 1993 Jan 15;268(2):1368-75.
- [138] Krifuks O, Bergelson LD, Schlesinger M. The down-modulation of CD4 induced by the GM1 ganglioside is regulated by phosphatases and kinases: evidence from enzyme inhibitors and anti-CD45 antibodies. *Cell Immunol.* 1998 Jul 10;187(1):45-51.
- [139] Maysinger D, Filipovic-Grcic J, Cuello AC. Effects of coencapsulated NGF and GM1 in rats with cortical lesions. *Neuroreport.* 1993 Jul;4(7):971-4.
- [140] Rabin SJ, Mocchetti I. GM1 ganglioside activates the high-affinity nerve growth factor receptor trkA. *J Neurochem.* 1995 Jul;65(1):347-54.
- [141] Rabin SJ, Bachis A, Mocchetti I. Gangliosides activate Trk receptors by inducing the release of neurotrophins. *J Biol Chem.* 2002 Dec 20;277(51):49466-72.
- [142] Ferrari G, Batistatou A, Greene LA. Gangliosides rescue neuronal cells from death after trophic factor deprivation. *J Neurosci.* 1993 May;13(5):1879-87.
- [143] Itoh N, Imagawa A, Hanafusa T, Waguri M, Yamamoto K, Iwahashi H, et al. Requirement of Fas for the development of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med.* 1997 Aug 18;186(4):613-8.
- [144] Jun HS, Yoon CS, Zbytniuk L, van Rooijen N, Yoon JW. The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med.* 1999 Jan 18;189(2):347-58.
- [145] Signore A, Pozzilli P, Gale EA, Andreani D, Beverley PC. The natural history of lymphocyte subsets infiltrating the pancreas of NOD mice. *Diabetologia.* 1989 May;32(5):282-9.

- [146] Leiter EH. The NOD mouse: a model for insulin-dependent diabetes mellitus. *Current Protocols in Immunology*. 1997;24:21-4.
- [147] Rodriguez PE, Cumar FA. Gangliosides noncovalently bound to DEAE-Sephadex: application to purification of anti-ganglioside antibodies. *Anal Biochem*. 1990 Jul;188(1):48-52.
- [148] Boschero AC, Delattre E, Santos ML. Inhibition of insulin release by the aminoglycoside antibiotic sisomycin. *Horm Metab Res*. 1981 Sep;13(9):531-2.
- [149] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.
- [150] Boechat LH, Vilella CA, Zollner RL. Effect of iodide on Fas, Fas-ligand and Bcl-w mRNA expression in thyroid of NOD mice pretreated with methimazole. *Braz J Med Biol Res*. 2002 Mar;35(3):289-95.
- [151] Yoon JW, Jun HS. Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Apr;928:200-11.
- [152] Mordes JP, Bortell R, Blankenhorn EP, Rossini AA, Greiner DL. Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity. *Har J*. 2004;45(3):278-91.
- [153] Monteiro de Castro G, Eduarda Zanin M, Ventura-Oliveira D, Aparecida Vilella C, Ashimine R, de Lima Zollner R. Th1 and Th2 cytokine immunomodulation by gangliosides in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cytokine*. 2004 May 21;26(4):155-63.
- [154] Repke H, Barber E, Ulbricht S, Buchner K, Hucho F, Kopp R, et al. Ganglioside-induced CD4 endocytosis occurs independent of serine phosphorylation and is accompanied by dissociation of P56lck. *J Immunol*. 1992 Oct 15;149(8):2585-91.
- [155] Grayson G, Ladisch S. Immunosuppression by human gangliosides. II. Carbohydrate structure and inhibition of human NK activity. *Cell Immunol*. 1992 Jan;139(1):18-29.

- [156] Dyatlovitskaya EV, Koroleva AB, Suskova VS, Rozynov BV, Bergelson LD. Influence of ganglioside GM3 and its breakdown products on lymphoblastic transformation and T-suppressor activity. *Eur J Biochem.* 1991 Aug 1;199(3):643-6.
- [157] Zhou J, Shao H, Cox NR, Baker HJ, Ewald SJ. Gangliosides enhance apoptosis of thymocytes. *Cell Immunol.* 1998 Feb 1;183(2):90-8.
- [158] Jansen A, Homo-Delarche F, Hooijkaas H, Leenen PJ, Dardenne M, Drexhage HA. Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes.* 1994 May;43(5):667-75.
- [159] Saravia F, Homo-Delarche F. Is innervation an early target in autoimmune diabetes? *Trends Immunol.* 2003 Nov;24(11):574-9.
- [160] Yoon JW, Jun HS, Santamaria P. Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Autoimmunity.* 1998;27(2):109-22.
- [161] Rosmalen JG, Leenen PJ, Pelegri C, Drexhage HA, Homo-Delarche F. Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 2002 Jul;13(5):209-14.
- [162] Stoffels K, Overbergh L, Giulietti A, Kasran A, Bouillon R, Gysemans C, et al. NOD macrophages produce high levels of inflammatory cytokines upon encounter of apoptotic or necrotic cells. *J Autoimmun.* 2004 Aug;23(1):9-15.
- [163] Miao G, Mace J, Kirby M, Hopper A, Peverini R, Chinnock R, et al. In vitro and in vivo improvement of islet survival following treatment with nerve growth factor. *Transplantation.* 2006 Feb 27;81(4):519-24.
- [164] Raile K, Klammt J, Laue S, Garten A, Bluher M, Kralisch S, et al. Glucose concentration and AMP-dependent kinase activation regulate expression of insulin receptor family members in rat islets and INS-1E beta cells. *Diabetologia.* 2005 Sep;48(9):1798-809.

- [165] Pierucci D, Cicconi S, Bonini P, Ferrelli F, Pastore D, Matteucci C, et al. NGF-withdrawal induces apoptosis in pancreatic beta cells in vitro. *Diabetologia*. 2001 Oct;44(10):1281-95.
- [166] Raile K, Klammt J, Garten A, Laue S, Bluher M, Kralisch S, et al. Glucose regulates expression of the nerve growth factor (NGF) receptors TrkA and p75NTR in rat islets and INS-1E beta-cells. *Regul Pept*. 2006 Jul 15;135(1-2):30-8.
- [167] Rosenbaum T, Castanares DT, Lopez-Vaides HE, Hiriart M. Nerve growth factor increases L-type calcium current in pancreatic beta cells in culture. *J Membr Biol*. 2002 Apr 1;186(3):177-84.
- [168] Kaufman DL. Murder mysteries in type 1 diabetes. *Nat Med*. 2003 Feb;9(2):161-2.
- [169] Mallei A, Rabin SJ, Mocchetti I. Autocrine regulation of nerve growth factor expression by Trk receptors. *J Neurochem*. 2004 Sep;90(5):1085-93.
- [170] Duchemin AM, Neff NH, Hadjiconstantinou M. GM1 increases the content and mRNA of NGF in the brain of aged rats. *Neuroreport*. 1997 Dec 1;8(17):3823-7.
- [171] Navarro-Tableros V, Sanchez-Soto MC, Garcia S, Hiriart M. Autocrine regulation of single pancreatic beta-cell survival. *Diabetes*. 2004 Aug;53(8):2018-23.