

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Conceição Aparecida Vilella

**ESTUDO DOS EFEITOS IMUNO MODULADORES
DE GANGLIOSÍDEOS NA INFLAMAÇÃO/EXPRESSÃO
DO DIABETES MELLITUS AUTOIMUNE EM
CAMUNDONGO NOD-Uni**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Campinas - 2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Conceição Aparecida Vilella

**ESTUDO DOS EFEITOS IMUNO MODULADORES
DE GANGLIOSÍDEOS NA INFLAMAÇÃO/EXPRESSÃO
DO DIABETES MELLITUS AUTOIMUNE EM
CAMUNDONGO NOD-Uni**

Tese apresentada ao curso
de pós-graduação em Clínica
Médica da Faculdade de Ciências
Médicas para obtenção do título
de Doutor, na área de Ciências
Básicas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

CAMPINAS – 2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

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

V711e Vilella, Conceição Aparecida
Estudo dos efeitos imuno moduladores de gangliosídeos na
inflamação/expressão do diabetes mellitus autoimune em camundongo
nod-uni. / Conceição Aparecida Vilella. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Ricardo de Lima Zollner
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Diabetes ^{mellitus} Tipo I. 2. Citocinas. 3. Gangliosídeos. 4. Apoptose.
5. Doenças auto-imunes. 6. Camundongos endogâmicos nod. I.
Zollner, Ricardo de Lima. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

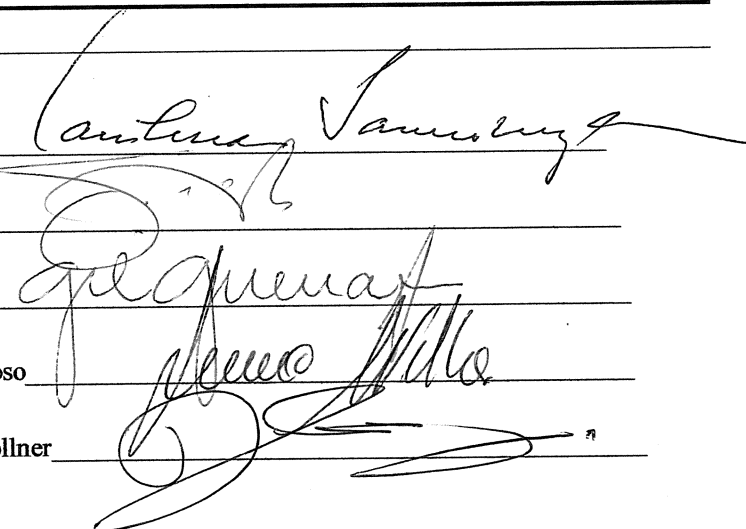
UNIDADE	BC
Nº CHAMADA:	7/UNICAMP
	V711e
/.	Ed.
COMBO BC/	72889
PROC.	16.145-07
☐ C	☒ D
PREÇO	24,00
DATA	05/06/07
SIB-ID	413074

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

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

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Paulina Sannonjya
2. Prof(a). Dr(a). Sérgio Atala Dib
3. Prof(a). Dr(a). Gil Guerra Júnior
4. Prof(a). Dr(a). Lício Augusto Velloso
5. Prof(a). Dr(a). Ricardo de Lima Zollner



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

↓
Data: 23/08/2005

5401207207

Para

*Meu marido Daniel, filhos Ariel e
Gabriel e pais Lazáro e Madalena,
minha querida família... alicerces de
amor.*

Agradecimento Especial

Ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner pela orientação

Agradecimento Especial

***Gláucia, Karla, Maira,
Meg. e Rika Sem vocês este
trabalho não existiria.***

Agradecimentos

Aos Profs.. Dra. Paulina Sannomyia, Dr. Sergio Atala Dib, Dr. Lício Augusto Velloso, Dr. Gil Guerra Junior. Por aceitarem compor a banca examinadora e pelas valiosas discussões e sugestões.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner (meu chefe) por permitir que esse trabalho acontecesse.

Aos ex aprimorados Rika, Gilvandro, Behânia, Marcelo, Julia, Karla ,Thiago e Fabíola pelo incentivo e colaboração.

A Bruna, Carina, Priscila, Rhubia, alunas de Pós-Graduação do Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental. pelo carinho e incentivo.

Ao Leonardo e Thiago pela ajuda no End Note.

A Ana Paula Perroud, por sua contagiante alegria de viver, amizade e incentivo.

A minha querida amiga Ivone pela cumplicidade do dia-a-dia e constante incentivo.

A Lucélia e Zezé pela amizade e paciência em me ouvir.

Aos Profs. Drs..Lício Velloso e Mário Abdala Saad pela orientação e uso das instalações de seu laboratório, onde realizamos inúmeros protocolos de “Imunoblotting”.

Ao Sr. Luís, técnico do laboratório de Fisiologia e Metabolismo. /FCM e aos alunos dos Profs. Lício Velloso e Mário Saad pelo empréstimo de materiais e ajuda nos procedimentos de “Immunoblotting”.

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

A Renata Maia, secretária da Comissão de Pós–Graduação/FCM, pela prontidão em ajudar nos momentos difíceis.

Ao Eduardo Odone ex secretário da Pós-Graduação/Departamento de Clínica Médica e a atual secretária, a simpática Cris... pela disposição e paciência.

A TRB PHARMA pela doação da mistura de gangliosídeos utilizada neste trabalho.

*“Para um apóstolo moderno, uma hora de estudo é
uma hora de oração” (São José Maria Escrivá).*

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner – Orientador
Departamento de Clínica Médica – FCM – UNICAMP

Profa. Dra. Paulina Sannomyia
Instituto do Coração – USP

Prof. Dr. Sergio Atala Dib
Departamento de Endocrinologia – UNIFESP

Prof.Dr. Lício Augusto Velloso
Departamento de Clínica Médica –FCM - UNICAMP

Prof. Dr. Gil Guerra Junior
Departamento de Pediatria - FCM – UNICAMP

Suplentes:

Prof. Dr. Julio Voltareli

Profa. Dra. Denise Engelbrecht Zantut-Wittmann

Departamento de Clínica Médica – Faculdade Ciências Médica – UNICAMP
Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, Área Básica da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

23-08-2005

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. O DIABETES MELLITUS	16
1.1. O DIABETES MELLITUS	16
1.2. MODELOS EXPERIMENTAIS DE DIABETES ESPONTÂNEO AUTOIMUNE	19
1.2.1 RATOS BIO-BREEDING (BB)	19
1.2.2. CAMUNDONGO NOD (DIABÉTICO NÃO OBESO)	20
1.3. IMUNORREGULAÇÃO, CITOCINAS E DESTRUIÇÃO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS	24
1.4 GANGLIOSÍDEOS	28
<i>1.4.1 GANGLIOSÍDEOS E SEU POTENCIAL IMUNOMODULADOR</i>	<i>30</i>
1.4.2 GANGLIOSÍDEOS E DIABETES AUTOIMUNE	31
1.5. APOPTOSE E A DESTRUIÇÃO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS	33
2. OBJETIVOS	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1. ANIMAIS	41
3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTOS (TABELA 1)	41
3.3. DIAGNÓSTICO DO DIABETES E SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS	44
3.4 DOSAGEM DE INSULINA	45
3.5. ANÁLISE MORFOLÓGICA	45
3.6. IMUNOISTOQUÍMICA	49
3.6.1. CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD11	49
3.7. ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO BAÇO:	52
3.8. ISOLAMENTO DE ILHOTAS	52
3.9 VIABILIDADE DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS RECÉM ISOLADAS	54
3.10. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL (RNAT)	54
3.11. ANÁLISE DO RNA TOTAL EXTRAÍDO	55
3.12. TRANSCRIÇÃO REVERSA DO RNA TOTAL EXTRAÍDO (cDNA)	56
3.13. AMPLIFICAÇÃO DE cDNA POR REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR)	56
3.14. ANÁLISE DOS PRODUTOS DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	59

3.15 ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DO RNA MENSAGEIRO	60
3.16 PREPARO DO EXTRATO DE BAÇO (AVALIAÇÃO DA VIA JAK – STAT)	60
3.17. IMUNOPRECIPITAÇÃO E IMMUNOBLOTTING	61
3.18. ANÁLISE DA EXPRESSÃO SÉRICA DE CITOCINA POR MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	62
3.19. ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
4. RESULTADOS	
4.1. EFEITO DO TRATAMENTO COM GANGLIOSÍDEOS SOBRE A MANIFESTAÇÃO DO DIABETES AUTOIMUNE ESPONTÂNEO	62
4.2. EFEITO DO TRATAMENTO COM GANGLIOSÍDEOS SOBRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO, ÍNDICE DE INFILTRADO NAS ILHOTAS PANCREÁTICAS E CONCENTRAÇÃO DE INSULINA PLASMÁTICA.	68
4.3. IMUNOISTOQUÍMICA	72
4.4. TUNEL	72
4.4. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE GANGLIOSÍDEOS SOBRE A EXPRESSÃO MOLECULAR DE CITOCINAS E COMPONENTES APOPTÓTICOS EM ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS E CÉLULAS ESPLÊNICAS	88
4.4.1 ILHOTAS	88
4.4.2. CÉLULAS ESPLÊNICAS:	95
4.5 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE GANGLIOSÍDEOS SOBRE A EXPRESSÃO SÉRICAS DE CITOCINAS ELISA	110
4.6. ATIVAÇÃO DA VIA JAK-STAT	116
5. DISCUSSÃO	118
CONCLUSÕES	130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
BB	Ratos “Bio Breeding”
BSA	Albumina sérica bovina
CD	Cluster designation
cDNA	DNA complementar
CLT	Linfócito T citotóxico
CEMIB	Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica
DM-1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM-2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Fas-L	Fas-ligante
GAD	“Glutamic acid decarboxylase” (descarboxilase do ácido glutâmico)
HE	Hematoxilina e eosina
IFN- γ	Interferon gama
IGF-I	Fator semelhante a insulina I
IL	Interleucina
ICA	“Islet cell antibodies” (anticorpos anti-ilhota pancreática)
Jak	Janus-quinase
IAA	“Insulin autoantibodies” (auto-anticorpos anti-insulina)
LIAE	Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental

MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NGF	Fator de crescimento nervoso
NO	Oxido nítrico
NOD	Diabético não obeso
NK	Células “natural killer”
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
PBS	Solução salina fosfatada tamponada
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
RNAT	Ácido ribonucléico total
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase após transcrição reversa
Stat	Signal transducers and activators of transcription
Th1	T auxiliar/T helper 1
Th2	T auxiliar/T helper 2
TGF- β	Transforming growth factor β
TUNEL	“Terminal Desoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick-End Labelling”
UA	Unidades Arbitrárias

RESUMO

No modelo experimental referente à linhagem de camundongos NOD (*non obese diabetic*) a manifestação do diabetes autoimune é espontâneo semelhante ao observado em humanos, o qual se desenvolve entre a 12^a e 24^a semana de vida com prevalência variável nas diversas colônias, entre 60-90% em fêmeas e 0-20% nos machos. Os estudos dos mecanismos autoimunes do diabetes sugerem o desequilíbrio entre as populações de linfócitos Th1 e Th2 com predomínio do fenótipo Th1 com mecanismos efetores que levam a apoptose da célula β produtora de insulina. Inúmeros trabalhos sugerem que a apoptose das células β esteja associada à manifestação do diabetes tanto em modelos experimentais como em humanos. Componentes apoptóticos como Fas/Fas-L, IL-1 β , IFN- γ e TNF- α tem sido associados aos mecanismos efetores da apoptose das ilhotas.

Gangliosídeos podem bloquear de forma seletiva a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α (Th1) inibindo desta forma, a proliferação de linfócitos T. Por outro lado, citocinas antiinflamatórias como IL-4 e TGF- β podem ter sua síntese estimulada por estes compostos.

No presente trabalho, investigamos o efeito do tratamento de gangliosídeos (G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} , G_{T1b}) sobre a incidência do diabetes mellitus e da insulite em camundongos NOD. Foram monitorados os níveis glicêmicos, os aspectos morfológicos (índice de infiltrado, imunoistoquímica para detecção de subpopulações de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e macrófagos-CD11), a expressão gênica de citocinas, moléculas apoptóticas e anti-apoptóticas e níveis séricos de citocinas IL-12, IL-4, TGF- β , TNF- α , IFN- γ .

Os resultados sugerem que a administração de gangliosídeos a partir da 4^a semana de vida do animal impede a manifestação do diabetes, modula o infiltrado inflamatório preservando células β , diminui a resposta Th1 em ilhotas e eleva os níveis séricos de citocinas antiinflamatórias como IL-4 e TGF- β , além de induzir a morte celular em linfócitos. Assim, o desenvolvimento de estudos adicionais dirigidos aos mecanismos de ação de gangliosídeos na manifestação do diabetes autoimune, é relevante e fundamental para estratégias de tratamentos mais efetivos.

ABSTRACT

The β cells destruction on diabetes type 1 autoimmune knowledge was derivative from NOD (diabetic non obese) mouse as experimental model, which have demonstrated great potential for drugs or immunotherapy's study. In this model, the diabetes manifestation occurs spontaneously like the observed in human, among 12^a-24^a week of life. The prevalence could be varied from 60-90% in females and 0-20% in males. The autoimmune mechanism study suggests the imbalance between Th1 and Th2 response with predominance Th1 phenotype (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ). Thus, it was necessary the study of the Th1 and Th2 cytokines related to autoimmunity of the diabetes in NOD mouse. Moreover, it believed that apoptosis of the β cells it was associated with the diabetes manifestation in both human and experimental models. In such studies Fas/Fas-L were related with IL-1 β , IFN- γ and TNF- α as effectors molecules of the cell death pancreatic islets.

Gangliosides can block, in a selective manner, the pro-inflammatory (Th1) cytokines production like IFN- γ and TNF- α and inhibit the T cells proliferation. However, these compounds can stimulate the synthesis of anti-inflammatory cytokines, like IL-4 and TGF- β .

In the present work, we analyze the effect of the gangliosides (G_{M1}, G_{D1a}, G_{D1b}, G_{T1b}) treatment on diabetes mellitus manifestation in NOD mice. The glucose levels, injury index, CD4, CD8 and CD11 immunohistochemical labeling, cytokines and apoptotic related molecules gene expression analyses and IL-12, IL-4, TGF- β , TNF- α and IFN- γ detection by immunoassay, were monitored.

Our results showed that the ganglioside treatment from 4th week of life prevents the onset of autoimmune diabetes, the inflammatory infiltrate installation. Th1 response can be suppresses by these compounds by the increase anti-inflammatory cytokines and the T cell apoptosis induction, besides the β cells preservation. Therefore take together these results reinforce the immunomodulatory action of gangliosides treatment on the diabetes mellitus manifestation.

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 e/ou ação da insulina (WHO 1999). Considerando-se as características etiológicas do diabetes mellitus e seus mecanismos desencadeantes, essa doença é classificada em quatro tipos: a) DM tipo 1 b) DM tipo 2; c) Outros tipos específicos de Diabetes, incluindo Diabetes secundário ou associado a outras patologias; d)DM gestacional. (The expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.2002).

O início do DM-1 autoimune é, na maior parte das vezes, agudo, acometendo mais freqüentemente crianças e adolescentes (EISENBARTH, 1986). Nessa doença é observada infiltração progressiva de células mononucleares nas ilhotas pancreáticas com destruição seletiva de células β produtoras de insulina, resultando na deficiência desse hormônio. Outras células pancreáticas do sistema endócrino, como as células α produtoras de glucagon ou células δ produtoras de somatostatina não são afetadas (KIKUTANI e MAKINO, 1992).

A origem autoimune do DM-1 foi sugerida por BOTTAZZO et al., (1974) e plenamente estabelecida. Os autores descrevem auto-anticorpos circulantes denominados anticorpos anti-célula da ilhota ou ICA (*"islet-cell antibodies"*). Os ICA são detectados precocemente antes da manifestação clínica do diabetes e são considerados marcadores imunológicos do DM-1 sem efeito patogênico direto (PALMER et al., 1981).

No DM-1 ocorre destruição seletiva das células β das ilhotas pancreáticas com presença de clones auto-reativos de linfócitos T, sugerindo que o processo inflamatório autoimune seria decorrente da perda da tolerância de linfócitos a determinados constituintes desta célula (ROSSINI et al., 1993; SCHWARTZ et al., 1993).

Estudos em humanos e modelos experimentais murinos sugerem que células T CD4⁺ do subtipo Th1 estão diretamente envolvidas no ataque a alvos da ilhota através da secreção de citocinas pró-inflamatórias com recrutamento de células T CD8⁺ citotóxicas. Por outro lado, a secreção de citocinas secretadas pelo subtipo Th-2 protege a instalação da doença (RUGGLES et al., 2004).

Até o momento, foram identificados diversos auto-antígenos na patogênese auto-imune do DM-1, incluindo: Insulina (IAA), descarboxilase ácido glutâmico (GAD⁶⁵ e GAD⁶⁷) presentes em 85-90% dos indivíduos com DM-1, proteína *tyrosine fosfatase-like* (ICA 512/IA-2) e proteína de choque térmico-60 (ATKINSON et al., 1992; DURINOVIC-BELLO et al., 1996; HARRISON et al., 1992; HONEYMAN et al., 1993; KELLER, 1990).

A proteína 65kD (GAD – descarboxilase ácido glutâmico) encontrada na membrana das células β é um dos principais marcadores do DM-1 humano. Esta enzima converte o ácido glutâmico em ácido γ -aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central. O GAD é expresso no sistema nervoso central e periférico, ilhotas pancreáticas, células epiteliais, do tubo de falópio e espermatozóides (BAEKESKOV et al., 1990; ERLANDER e TOBIN, 1991; KIM et al., 2002; LIEBERMAN e DILORENZO, 2003).

Antígenos diversos das células β são expressos no sistema neuroendócrino, reforçando a conexão autoimune entre ilhotas e sistema nervoso. As ilhotas de Langerhans são circundadas por células de Schwann, marcadas pela expressão de S100 β e GFAP (*glial fibrillary acidic-protein*) (SUNAMI et al., 2001) e demonstradas nos camundongos NOD por WINER et al., (2003). Estes autores verificaram que o acúmulo de células T nas ilhotas ocorre inicialmente nas células de Schwann que circunda as ilhotas. Com o avanço da insulite, aparentemente essas células de Schwann são destruídas.

O papel do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) na predisposição genética ao DM-1 está estabelecido com a associação dos genes I^A e I^E com a manifestação do diabetes. Esses genes estariam associados ao desenvolvimento do DM-1 por meio da expressão de mecanismos envolvidos na seleção positiva de clones de linfócitos 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) (ATKINSON, 1997; NEPOM e ERLICH, 1991).

Diversos autores propõem que fatores de agressão variados, como citocinas liberadas por linfócitos T considerados efetores moleculares e transdutores de sinais imunes atuem na destruição da célula β pancreática (CORBETT et al., 1993; EIZIRIK et al., 1996; EIZIRIK e MANDRUP-POULSEN, 2001; EIZIRIK et al., 1993; POCIOT et al., 1994). Tais proteínas mediarão o processo inflamatório local, alterando a função das células β e contribuindo para a destruição das ilhotas pancreáticas. Entretanto, por ser o

estudo da imunopatogênese do diabetes em humanos limitada, destacamos a importância da utilização de modelos animais geneticamente predispostos a essa doença, como os ratos da linhagem BB (Bio-Breeding) e os camundongos da linhagem NOD (diabético não obeso).

1.2. Modelos Experimentais de Diabetes Espontâneo autoimune

1.2.1 Ratos Bio-Breeding (BB)

O rato BB é reconhecido como modelo espontâneo de diabetes auto-imune descoberto no Canadá por NAKHOODA et al., (1977), sendo denominado inicialmente como BB/DP (*diabetes prone*). Esses animais desenvolvem DM espontâneo entre 8ª e 16ª semanas de vida. Não há dimorfismo sexual quanto a manifestação do diabetes, ocorrendo tanto em machos quanto em fêmeas e a incidência da doença varia nas diversas colônias estabelecidas no mundo, variando entre 40 a 70%. O estabelecimento clínico do diabetes mellitus nos ratos BB é precedido por período de pré-diabetes caracterizado por insulite, onde se verifica a presença de anticorpos séricos anti-ilhota pancreática. A infiltração de células inflamatórias nas ilhotas pancreáticas desses animais é constituída principalmente de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, podendo-se encontrar macrófagos e linfócitos B (SEEMAYER et al., 1982).

Além disso, esses animais desenvolvem outras doenças autoimunes, como tiroidite, e expressam níveis séricos elevados de auto-anticorpos órgão específicos como anti-tireoglobulina, anti-mucosa gástrica e anti-músculo liso (YALE e MARLISS, 1984).

1.2.2. Camundongo NOD (diabético não obeso)

A linhagem de camundongo NOD representa modelo experimental descrito por MAKINO et al., (1980), que desenvolve espontaneamente diabetes mellitus autoimune semelhante àquele observado em humanos. Essa linhagem foi desenvolvida no Japão, após o cruzamento de uma sub-linhagem CTS (propensa à catarata) com linhagem não consangüínea 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 ABURAHU como modelo animal para o DM-1 (MAKINO et al., 1980).

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 (POZZILLI et al., 1993). Fatores ambientais como dieta e exposição a vírus têm sido consideradas causas das diferenças nas incidências.

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

Diferente do modelo BB, o DM-1 clínico o NOD desenvolve-se espontaneamente entre a 16^a e 24^a semanas de vida, mais freqüentemente em fêmeas. polidipsia, poliúria, glicosúria elevada, hiperglicemia e deficiência de insulina são observadas nestes animais, acompanhados de rápida perda de peso (MAKINO et al., 1980). A remissão espontânea é rara e a morte dos animais diabéticos ocorre após 4 ou 8 semanas da manifestação da doença. A prevalência do diabetes varia nas diversas colônias, entre 5 a 90% nas fêmeas e 0 a 50% nos machos. Na colônia NOD/Uni estabelecida na Unicamp e mantida pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB) em condições livres de patógenos (SPF), apresenta prevalência de diabetes entre 60 a 90% nas fêmeas e 5 a 20% nos machos.

O diabetes clínico nesses animais é precedido por uma fase pré-diabética (insulite), caracterizada pela infiltração progressiva de células mononucleares (insulite) nas ilhotas pancreáticas (inicialmente linfócitos T CD4⁺ e posteriormente linfócitos T CD8⁺), que se inicia ao redor do primeiro mês de vida. A segunda fase é caracterizada pela destruição das células β produtoras de insulina e manifestação do diabetes (KIKUTANI e MAKINO, 1992).

A maioria das células mononucleares infiltradas no interior das ilhotas pancreáticas é representada por linfócitos T com fenótipo Th -1. Contudo, pode-se verificar, em menor extensão, a presença de linfócitos B, macrófagos e células natural Killer (NK) (KAY et al., 1997; WONG e JANEWAY, 1997). Embora a maioria das células infiltradas sejam linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺ também são observados.

Durante o desenvolvimento da doença no camundongo NOD células CD4⁺ e CD8⁺ exercem papel sinérgico, uma vez que o diabetes apenas se desenvolverá na presença de ambos os subtipos (WONG e JANEWAY, 1997). Portanto, linfócitos T CD4⁺ podem ter papel essencial, não somente no início da insulite, como também na progressão do diabetes. Foi verificada que sua eliminação através da utilização de anticorpos monoclonais anti-CD4⁺ suprime a insulite e, conseqüentemente, o aparecimento do diabetes no camundongo NOD (SHIZURU et al., 1988). Linfócitos CD4⁺ são predominantemente observados na fase precoce da infiltração (peri-insular), onde são requeridos nos processos de expansão clonal através da produção de IL-2 e, dessa forma, aumentado a ativação de linfócitos T CD8⁺ (WONG e JANEWAY, 1997). A proporção de células CD8⁺ no infiltrado de população T cresce substancialmente com o tempo na destruição das células produtoras de insulina (BEDOSSA et al., 1989). Entretanto, existem evidências do papel dos linfócitos T CD8⁺ na fase efetora final da patogênese do diabetes, independente da presença de linfócitos T CD4⁺ (NAGATA et al., 1994; WONG et al., 1996). Dentre os mecanismos de destruição das ilhotas pancreáticas está a capacidade dos linfócitos CD8⁺ exercerem função citotóxica através da liberação de grânulos de perforinas e granzimas, bem como indução de apoptose através da interação Fas/Fas-L (CHERVONSKY et al., 1997; EIZIRIK e MANDRUP-POULSEN, 2001; INGELSSON et al., 1998).

Tanto no camundongo NOD como em humanos, vários auto-antígenos foram estudados, mas somente o anticorpo anti-insulina (IAA) pode ser detectado com alta especificidade e sensibilidade em ambas as espécies (EISENBARTH e JASINSKI, 2004).

Os linfócitos T auto-reativos demonstram ter papel crucial no aparecimento do diabetes nesses animais (TISCH e MCDEVITT, 1996) 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 timectomia neonatal. Além disso, em camundongos NOD/nude (atímicos), verifica-se redução da incidência de insulite sem manifestação do diabetes. Complementando essas observações, trabalhos prévios relataram que a administração de imunossupressores com função direcionada preferencialmente para linfócitos T e administração de anticorpos anti-CD3⁺ (HAYWARD e SHREIBER, 1989) são capazes de suprimir a ocorrência do DM autoimune espontâneo (BACH, 1994; KAY et al., 1997; O'REILLY et al., 1991; WONG e JANEWAY, 1997).

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 (MILLER e SHEVACH, 1998; ROHANE et al., 1995; WONG e JANEWAY, 1997).

No conjunto, essas observações envolvendo a participação dos linfócitos T na insulite e na evolução do diabetes têm reforçado, direta ou indiretamente, a hipótese da etiologia autoimune. Contudo, apesar de experimentos envolvendo o camundongo NOD

fornecerem evidências do papel chave de substâncias mediadoras da destruição das células β produzidas por linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, a presença de mecanismos efetores finais apoptóticos pelos quais essas células são destruídas.

1.3. Imunorregulação, Citocinas e Destruição das Ilhotas Pancreáticas

A apresentação dos auto-antígenos específicos das células β pancreáticas pelos macrófagos e/ou células dendríticas para as linfócitos $CD4^+$ em associação com as moléculas de MHC de classe II é o primeiro passo para o desenvolvimento e manifestação da doença autoimune. Macrófagos ativados secretam IL-12 que, por sua vez, estimulam linfócitos T $CD4^+$ tipo Th1 a secretarem IL-2 e IFN- γ e, este último, ativa outros macrófagos residuais a liberarem IL-1 β , TNF- α e radicais livres tóxicos para as células β (YOON et al 1998)

A resposta imune é coordenada por linfócitos T auxiliares (Th-T Helper), cujas funções diferem de acordo com o estímulo antigênico e condições do compartimento onde ocorre a resposta. Desta forma, os linfócitos Th são subdivididos em Th1, caracterizados pela expressão local de citocinas específicas como IL-2, IFN- γ e TNF- α . e Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10). A resposta Th1, genericamente, manifesta-se nas doenças autoimunes mediando a inflamação através da resposta imune celular, representada por linfócitos T citotóxicos, “natural killer” e macrófagos. Por outro lado, o fenótipo Th2 direciona a resposta imune humoral liberando localmente citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (RABINOVITCH, 1998). No contexto dos possíveis mecanismos envolvidos nas desordens auto-imunes, o desequilíbrio entre as populações de linfócitos Th1 e Th2 com predominância do fenótipo Th1 parece ter substrato na fisiopatologia da quebra de tolerância e reações auto-imune que ocorrem na linhagem de camundongos NOD.

A hipótese na qual a destruição das células β 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 pela administração de super-antígenos incorporados a adjuvante completo de Freund (CFA). A transferência destes linfócitos para animais NOD com 2 semanas de vida evitou a ocorrência do diabetes, em virtude de provável desvio da resposta imune de Th1 para Th2, devido a ação do super-antígeno, com liberação de citocinas antiinflamatórias (IL-4, IL-10) (KAWAMURA et al., 1993; QIN et al., 1993). Postulou-se, 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 tanto em pacientes quanto nos camundongos NOD e ratos BB com DM-1, são marcados pelo predomínio de citocinas características da resposta Th1 (HARTEMANN-HEURTIER et al., 1999; RABINOVITCH, 1998; VENTURA-OLIVEIRA et al., 2002). Acredita-se que ocorra, ainda, o envolvimento direto de linfócitos com propriedades efetoras sobre as células β pancreáticas (células alvos) resultando na liberação de mediadores solúveis responsáveis pelo processo inflamatório local contribuindo para a destruição das ilhotas (BRADLEY et al., 1999; CAMPBELL et al., 1988; GURLO et al., 1999; PUKEL et al., 1988).

No campo experimental, diversos autores têm estudado os efeitos *in vitro* de citocinas como IL-1 β , TNF- α , TNF- β e IFN- γ utilizando ilhotas isoladas de modelos animais. Nas ilhotas pancreáticas recém isoladas, os efeitos dessas citocinas têm sido amplamente estudados, (RABINOVITCH, 1998; RABINOVITCH e SUAREZ-PINZON, 1998; RABINOVITCH et al., 1994) 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 β pancreáticas (IWAHASHI et al., 1996; RABINOVITCH, 1998; RABINOVITCH e SUAREZ-PINZON, 1998; RABINOVITCH et al., 1994). 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 pro-inflamatória, ou antiinflamatória (RABINOVITCH e SUAREZ-PINZON, 1998).

No camundongo NOD, a expressão de IFN- γ nas ilhotas foi relacionada com a insulite destrutiva (MUIR et al., 1995; RABINOVITCH et al., 1994; TOYODA et al., 1994; VENTURA-OLIVEIRA et al., 2002). Essa citocina, assim como TNF- β , tem sua 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 da secreção dessas citocinas pelas células do infiltrado inflamatório (HIRAI et al., 2000). Reforçando a importância de estudos experimentais *in vivo*, pode-se observar em experimentos de expressão transgênica de IFN- γ , em células β de camundongos normais, o papel citotóxico do IFN- γ associados a ocorrência da insulite

mediada por células imunes, destruição das ilhotas pancreáticas e manifestação do DM-1 (SARVETNICK et al., 1990).

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos citotóxicos das citocinas nas ilhotas pancreáticas, induzindo a liberação de óxido nítrico, precedendo a lesão do DNA e ocasionando a destruição de células beta (GURLO et al., 1999; RABINOVITCH, 1998; RABINOVITCH e SUAREZ-PINZON, 1998; RABINOVITCH et al., 1994; THOMAS et al., 2002). Sendo assim, pode-se sugerir que a destruição das células β ocorre por apoptose onde a fragmentação de DNA típica tem sido observada em ilhotas pancreáticas tratadas com a combinação de IL-1 β , TNF- α e IFN- γ (RABINOVITCH et al., 1994; SUAREZ-PINZON et al., 1999; THOMAS et al., 1999; YAMADA et al., 1996).

Baseando-se em experimentos com camundongos NOD, outros mediadores mostraram-se capazes de efetuar a destruição das células β , entre eles: conteúdos granulares das células T CD8⁺, 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 causar mudanças morfológicas características da apoptose através de sinalização de receptores que envolvem a ativação de proteases ou caspases (INGELSSON et al., 1998; THOMAS e KAY, 2000). Desta forma, de acordo com os dados experimentais expostos por esses autores, fica demonstrado que o controle da resposta imune é múltiplo e, provavelmente, depende da somatória de efeitos de várias citocinas que constituem compartimento propício para a destruição das ilhotas pancreáticas.

1.4 Gangliosídeos

Os gangliosídeos são glicoesfingolípides complexos, formados por cadeia de oligossacarídios, contendo pelo menos um açúcar ácido ligado a ceramida (esfingosina + acil CoA). Estes glicoesfingolípides que são ácidos hidrossolúveis componentes normais das membranas celulares. A cadeia oligossacarídica do gangliosídeo pode variar em composição, porém a seqüência básica compreende quatro sacarídeos. Vários resíduos de ácido siálico são ligados à cadeia de carboidrato, sendo que o resíduo siálico predominante é o ácido N - acetilneuramínico (NANA). A porção oligossacarídica dos gangliosídeos é muito complexa, contendo pelo menos um resíduo de ácido N - acetilneuramínico (ácido siálico), que se encontra ionizado em pH 7,0 e apresenta carga negativa.

Na molécula individual do gangliosídeo, o número e a posição dos resíduos de ácido siálico são variáveis o que deu origem ao método para classificá-los:

Monossialotetraexosilgangliosídeo contém uma unidade NANA (G_{M1})

Dissialotetraexosilgangliosídeo contém duas unidades NANA, ligadas em posições diferentes (G_{D1a} , G_{D1b}).

Trissialotetraexosilgangliosídeo apresenta três unidades NANA, ligadas em posições diferentes (G_{T1b}).

Tetralotetrexosilgangliosídeo apresenta quatro unidades NANA, ligada em posições diferentes (G_Q).

Quinze ou mais tipos de gangliosídeos estão presentes nas membranas plasmáticas das células de vertebrados. Encontram-se assimetricamente distribuídos, sendo a porção dos oligossacarídeos expostos na superfície de membrana e a porção de cerâmica inserida na camada de lipídio da membrana. Estão presentes em todos os tipos de células do sistema nervoso, entretanto com maior concentração nos neurônios, representando 10% da quantidade total de lipídios ligados nas membranas.

Embora os gangliosídeos sejam encontrados principalmente na membrana plasmática, também são intracelulares onde estão parcialmente ligados às organelas responsáveis pelo tráfego intracelular e metabolismo. Os carboidratos geralmente presentes nos gangliosídeos são: Glicose, Galactose, N acetilglicosamina ou N acetil galactosamina e, em poucas estruturas, frutose (LEDEEN e YU, 1982; TETTAMANTI e RIBONI, 1994).

Podem atuar na proteção das membranas contra condições drásticas (pH baixo e presença de enzimas que degradam as células), alteração da concentração dos íons de Ca^{++} na superfície da célula e participação no processo de reconhecimento celular (ALBERTS, 1994). Os gangliosídeos são considerados componentes importantes para diversos processos biológicos, participando da regulação, do reconhecimento e adesão intercelular, proliferação, morfogênese, diferenciação, neuritogênese, apoptose e transformação oncogênica. Como receptor e co-receptor de várias substâncias bioativas como hormônios e citocinas, atuam na tradução de sinais para o meio intracelular (MAHONEY e SCHNAAR, 1997).

Considerando os diferentes mecanismos pelos quais os gangliosídeos podem associar-se às células, a alteração de seu perfil em um determinado tipo celular poderia

resultar na modulação das propriedades de superfície, atividades enzimáticas e função de outros tipos celulares, os gangliosídeos podem ser considerados como um tipo de citocina (BERGELSON, 1995).

1.4.1 Gangliosídeos e seu Potencial Imunomodulador.

Gangliosídeos podem inibir tanto a proliferação quanto a atividade dos linfócitos T LADISCH et al., (1984); MERRITT et al., (1984); OFFNER et al., (1987) Particularmente, MERRITT et al., (1984) verificaram que gangliosídeos foram capazes de inibir a proliferação de linfócitos T citotóxicos dependente de interleucina 2 (IL-2) in vitro. OFFNER et al., (1987) mostraram que estas moléculas induzem alterações na orientação molecular de CD4 presente dos linfócitos Th atuando como moduladores do sistema imune. Evidências sugerem que estes compostos podem inibir a ativação e diferenciação de linfócitos T, a expressão da molécula de CD4 e a proliferação de linfócitos B e T, monócitos, macrófagos e células NK (CHU e SHAROM, 1995; DOZMOROV et al., 1997; OFFNER et al., 1987).

Além disso, estes compostos atuam como receptores e co-receptores para muitos agentes bioativos como citocinas, hormônios, toxinas e vírus. Estão envolvidos ainda, na diferenciação e reconhecimento celular, na interação entre células e na regulação do crescimento (BERGELSON, 1995).

Presentes em grandes quantidades nas células tumorais e no sistema nervoso central, gangliosídeos estão associados à imunossupressão observada nestes tecidos (MASSA, 1993; RAVINDRANATH et al., 2001).

Gangliosídeos podem bloquear de forma seletiva a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α e IL-2 (Th1) e, desta forma inibir a proliferação de

células T impedindo a entrada desta célula no ciclo celular. Por outro lado, citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e TGF- β podem ter sua síntese estimulada por estes compostos (IRANI et al., 1996).

A função de gangliosídeos na indução da apoptose não está totalmente esclarecida, contudo o acúmulo de gangliosídeos está associado a apoptose mediada por Fas e ceramidas pela associação gangliosídeo-mitocôndria, levando à ativação de caspases através da liberação de fatores apoptogênicos (DE MARIA et al., 1997; GARCIA-RUIZ et al., 2000).

1.4.2 Gangliosídeos e Diabetes Autoimune

A hipótese do envolvimento dos gangliosídeos no desenvolvimento do diabetes autoimune recebeu importante subsidio a partir de evidências que a natureza do antígeno alvo do anticorpo anti citoplasma das células de ilhota (ICA) corresponderia a um sialogliconjugado (NAYAK et al., 1985). Posteriormente, (COLMAN et al., 1988) verificaram que uma fração de monogangliosídeo extraído de pâncreas humano inibiu a ligação do ICA em cortes de pâncreas obtidos ao criostato e processados imunoistoquimicamente.

BRETZEL et al (1990) observaram que a adição de gangliosídeos (G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} , G_{T1b}) a culturas de ilhotas pancreáticas de ratos Lewis (RT1) destinadas ao transplante em ratos Bdl (RT1), reduziu significativamente o numero de células que expressam o Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe Ia (MHC Ia) sem alterar o número daquelas que expressam o MHC I. Além disso, a adição destes compostos às culturas prolongou o tempo de sobrevida das ilhotas transplantadas em

20% dos receptores. Essas observações reforçam a hipótese do papel modulador da atividade imunológica dos gangliosídeos e subsidiam a investigação de seu emprego na terapêutica dos distúrbios imunológicos LADISCH et al., (1984). Baseados nessa premissa WILBERZ et al., (1988) 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 nas fêmeas tratadas a partir da 4ª semana de vida e nos machos. Contudo, o tratamento com gangliosídeos não reduziu a ocorrência da perivascularite precursora da invasão das ilhotas de Langerhans pelas células inflamatórias.

PAPACCIO et al., (1993) mostraram que a administração contínua de gangliosídeos em camundongos NOD fêmeas, a partir da 5ª a 21ª semanas de vida reduziu o aumento gradual da glicemia, retardando assim a instalação do diabetes clínico. Contudo, curiosamente, estes autores relataram não terem encontrado diferença significativa entre os animais tratados e os animais controle quanto ao aparecimento da insulite e da sua progressão. Além disso, na opinião dos autores os dados obtidos neste trabalho não seriam suficientes para provar a eficácia da ação terapêutica dos gangliosídeos sobre a instalação e progresso do diabetes mellitus.

1.5. Apoptose e a Destruição das Ilhotas Pancreáticas

A destruição das células β pancreáticas no diabetes tipo 1 geralmente é aceita como sendo consequência de reações autoimunes nestas células disparada por fatores genéticos e ambientais. Acredita-se que esta destruição ocorra por morte celular programada apoptose (EIZIRIK e MANDRUP-POULSEN, 2001; MANDRUP-POULSEN, 2003).

Dentre os eventos que podem ser verificados na apoptose, ressaltamos as mudanças morfológicas, alterações bioquímicas e expressão de marcadores moleculares (GERSCHENSON e ROTELLO, 1992). A principal característica da apoptose é a retração celular, em virtude da condensação citoplasmática, compactação das organelas celulares, picnose nuclear e formação de massas de cromatina ao redor da membrana nuclear.

Durante o processo apoptótico ocorre a ativação de endonucleases, que clivam a cromatina, constituindo no padrão bioquímico mais característico deste processo. Na membrana plasmática das células apoptóticas encontram-se numerosas vesículas denominadas de corpos apoptóticos que contém fragmentos nucleares e organelas intactas que são rapidamente fagocitados pelas células vizinhas ou macrófagos, sem causar reações inflamatórias nas células vizinhas (GAVRIELI et al., 1992).

Nas células T, especificamente nos linfócitos $CD4^+$, a morte celular programada ou apoptose é consequência da interação de duas moléculas expressas na superfície de células ativadas, designadas Fas (APO-1/CD95) e Fas-L (CD95L). A interação Fas/Fas-L resulta em tradução de sinais citolíticos intracelulares levando a morte apoptótica (VAN PARIJS e ABBAS, 1996).

As principais vias moleculares/ efectoras da apoptose envolvem as moléculas Fas (APO-1/CD95) Fas-L (Fas-Ligante), Fator de Necrose Tumoral (TNF), Receptor do Fator de Necrose Tumoral TNF-R, Caspases e Bcl-2 (GRANVILLE et al., 1998).

O sistema TNF/TNF-R funciona basicamente da mesma maneira que o sistema Fas/Fas-L, ou seja, após a interação do ligante com seu receptor, ocorre no interior da célula, transformação bioquímica com ativação de diversas enzimas conduzindo a apoptose.

Vários trabalhos foram realizados na tentativa de estudar a influência do Fas na indução da apoptose no processo de insulite e destruição das ilhotas pancreáticas. SUAREZ-PINZON et al., (2000), verificaram a expressão de Fas associado a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IFN- γ) em ilhotas transplantadas. Contudo, em estudos adicionais, esses autores observaram que o aumento da expressão de Fas, na maioria das células β de camundongos NOD não estava associado à manifestação do diabetes. APOSTOLOU et al., (2003) reforçaram estes achados ao observarem que camundongos Fas deficiente desenvolvem diabetes autoimune.

1. 6 Citocinas e Fatores de Crescimento - TGF β , NGF e IGF-I

O Fator de transformação de crescimento (TGF β) é produzido por muitos tipos celulares, incluindo macrófagos e linfócitos ativados, e possuem receptores em vários tipos celulares. Em humanos, ocorre a expressão de pelo menos três formas de TGF β 1,2 e 3. São produtos de genes separados, entretanto todas as três formas ligam-se a cinco tipos de receptores de superfície celular de alta afinidade. Experimentos em camundongos *Knockout* indicam que as três formas de TGF β são essenciais para

confirmar seu papel imunorregulador. Esta citocina possui efeito anti-proliferativo em vários tipos celulares incluindo macrófagos, células endoteliais e linfócitos T e B. Além disso, suprime a produção da maioria das linfocinas e monoclinas e reduz a expressão celular de proteínas MHC classe II e receptores de IL-1 (STITES et al., 2000).

Em estudos de tolerância oral com insulina visando o retardo e/ou a prevenção do diabetes em camundongos NOD a expressão de citocinas inibitórias entre eles o TGF- β encontra-se aumentada, enquanto que a expressão das citocinas pró-inflamatórias estava diminuída. (ZANG et al., 1991).

Fatores de crescimento semelhante a insulina (IGF-I e IGF-II) estão implicados no crescimento e na diferenciação das fibras nervosas, e a presença de receptores para IGF foi demonstrada em neurônios, células de Schwann e gânglios. IGF I e II são reguladas por insulina e através do nível glicêmico. Assim, uma das conseqüências da diminuição de insulina é a redução no nível de IGF I (VINIK, 1999).

O Fator de Crescimento Neural (Nerve Growth Factor NGF) faz parte de uma família de fatores de crescimento chamados de neurotrofinas com amplo espectro de atividades como vasodilatação, motilidade intestinal e nocicepção. A diminuição da síntese de NGF no diabetes parece estar envolvida na patogênese da degeneração das fibras pequenas, que têm papel importante na sensação térmica e dolorosa (VINIK, 1999).

1.7 Janus-quinase (JAKs) - Transdutores de Sinais e Ativadores de Transcrição (STATs) para citocinas.

Avanço importante para o entendimento dos possíveis mecanismos da regulação de células pelas citocinas têm sido a identificação e caracterização das vias de sinalização como a via JAK-STAT (DARNELL et al., 1994; IHLE, 1996; TANIGUCHI et al., 1995). Esta via representa sistema rápido de sinalização membrana-núcleo e esclarece parcialmente a base para a especificidade dos sinais que são induzidos pelas diferentes citocinas.

Citocinas e fatores de crescimento ligam-se a receptores na superfície celular, ativando vias de sinalização de tradução, as Janus quinases (JAKs), e ativadores de transcrição STATs, promovendo respostas variadas, incluindo alterações na função celular, crescimento e diferenciação. Tais efeitos são mediados através da modulação da expressão dos genes alvo (LENARDO, 1997).

Nos mamíferos foram identificados 4 tipos de Jaks: Jak1, Jak2, Jak3 e Tyk2. A expressão destas proteínas está aumentada nas células NK e timócitos, com exceção da expressão da Jak3 que está limitada a algumas células, como: células hematopoiéticas, e as presentes na musculatura lisa, vascular e no endotélio (IHLE, 1996). As Jaks possuem dois domínios denominados pseudoquinase e quinase. Diversos segmentos homólogos foram reconhecidos entre as Jaks (JH) recebendo nomenclatura análoga aos domínios Src (SH) da família PTKs. Sete regiões JH (JH1-JH7) foram descritas, com exceção da região JH 1 ou domínio catalítico, as demais regiões são pouco conhecidas.

A sinalização do IFN α/β requer Jak 1 e Tyk 2, assim como IFN γ requer Jak 1, Jak 2 (DARNELL et al., 1994; MULLER et al., 1993; WATLING et al., 1993) e os hormônios de crescimento e eritropoietina ativam Jak2 (ARGETSINGER et al., 1993; DARNELL et al., 1994; MULLER et al., 1993; WITTHUHN et al., 1993), a IL-6 ativa Jak 1, Jak 2 e Tyk 2 (STAHL et al., 1994) e Jak 3 é ativada por citocinas cujo receptores contêm γc (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15).

As Stats são proteínas citoplasmáticas que formam dímeros intermoleculares após a fosforilação da tirosina com subsequente translocação ao núcleo onde ativam genes alvo (DARNELL et al., 1994). Nos mamíferos as 7 proteínas Stats conhecidas são: Stat 1, Stat 2, Stat 3, Stat 4, Stat 5a, Stat 5b e Stat 6 (FU, 1992; HOU et al., 1995; LIN et al., 1996; ZHONG et al., 1994). Contudo, hoje sabemos que Jaks e Stats medeiam respostas de ampla variedade de citocinas e fatores de crescimento. A tradução de sinal usada pela IL-12 via Jak-Stat é a melhor caracterizada. O tratamento de linfócitos T humanos com IL-12 induz a rápida tirosina fosforilação de dois membros da família Jak tirosina quinase, Jak2 e Tyk2, implicando estas quinases na imediata resposta bioquímica a IL-12 (BACON et al., 1995; ZOU et al., 1997). Além disso, evidências têm mostrado que IL-12 induz a fosforilação de Stat4 em linfócitos ativados. (BACON et al., 1995; CHO et al., 1996). Assim, o entendimento de sua produção e sinalização reveste-se de interesse para entendermos os mecanismos envolvidos na resposta imunes presente nas várias patologias.

2. OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Estudar os efeitos do tratamento da mistura de gangliosídeos (GM1, GD1a, GD 1b, GT1b)

Objetivos Específicos:

Avaliar:

1. Manifestação do diabetes em camundongos NOD tratados com mistura de gangliosídeos e seus respectivos controles.
2. Estadiamento do infiltrado celular (grau de lesão) na ilhota pancreática.
3. Incidência do diabetes e índice de infiltrado da ilhota pancreática.
4. Dinâmica da expressão gênica de componentes apoptóticos (Fas, Fas-ligante e Bclw) citocinas (IL1 β , IL-12, TNF α e IFN γ) e fatores de crescimento (IGF-1 e NGF) em ilhotas pancreáticas e células esplênicas.
5. Expressão de citocinas séricas IL4, IL12, TNF α , IFN γ e TGF β .
6. Ativação da via Jak-Stat

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Os camundongos utilizados neste estudo eram obtidos da colônia NOD proveniente do INSERM U-25, Hospital Necker (Paris, França), implantada e mantida pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB) a partir de 1994, em condições livres de patógenos específicos (SPF) (PAVIN e ZOLLNER, 1994).

A frequência cumulativa do DM-1 clínico espontâneo registrado na colônia NOD/Uni com 25 semanas de idade, se mantém ao redor de 85% entre as fêmeas e de 5 a 20% entre os machos, revelando-se similar à da colônia de origem. Protocolos utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2. Grupos Experimentais e Tratamentos

Camundongos NOD/Uni fêmeas provenientes do Cemib/Unicamp eram mantidos em condições livres de patógenos específicos com controle de luz, temperatura e umidade em biotério de experimentação no Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental (LIAE), recebendo água e ração padrão autoclavadas *ad libitum*. (tabela1 p 38)

Os grupos experimentais eram estabelecidos como a seguir:

Protocolo1: Avaliação escalonada - temporal

Tratamento diário com a mistura de gangliosídeos: G_{M1}(21%), G_{D1a}(40%), G_{D1b}(19%) (SINAXIAL[®], gentilmente fornecido pela TRB PHARMA) na dose de 150 mg/Kg i.p) e de salina: 0.9% estéril para estudo da expressão do diabetes, gênica e sérica de citocinas em ilhotas e células esplênicas e em soro respectivamente, dosagem de insulina no soro, estudo morfológico(fenotipificação, apoptose, insulina e glucagon). Ao final das 28 semanas de protocolo experimental, os animais eram sacrificados, ou quando apresentassem glicemia ≥ 250 mg/dL(13,9 mMol) em duas dosagens consecutivas (ITOH et al., 1997; JUN et al., 1999; VENTURA-OLIVEIRA et al., 2002).

Tabela 1. Grupos experimentais empregados, respectivos tratamentos e doses utilizadas, frequência da administração, via utilizada e sacrifício. O grupo 10 foi utilizado como controle da incidência do diabetes.

Grupos	Nº animais-idade	Tratamento/Dose	via	Tempo de estudo e sacrifício
1-GGS	10- 4 semanas	Gangliosídeos/150mg/kg/dia	i.p	08 semanas
2-GGS	10- 4 semanas	Gangliosídeos/150mg/kg/dia	i.p	12 semanas
3-GGS	10- 4 semanas	Gangliosídeos/150mg/kg/dia	i.p	16 semanas
4-GGS	10- 4 semanas	Gangliosídeos/150mg/kg/dia	i.p	20 semanas
5-GGS	10- 4 semanas	Gangliosídeos/150mg/kg/dia	i.p	28 semanas
6-Salina	10- 4 semanas	Salina 0,9%/dia/100µL/dia	i.p	8 semanas
7-Salina	10- 4 semanas	Salina 0,9%/dia/100µL/dia	i.p	12semanas
8-Salina	10- 4 semanas	Salina 0,9%/dia/100µL/dia	i.p	16 semanas
9-Salina	20- 4 semanas	Salina 0,9%/dia/100µL/dia	i.p	20 semanas
10-Salina	21- 4 semanas	Salina 0,9%/dia/100µL/dia	i.p	28 semanas

Protocolo 2: Avaliação da via de sinalização JAK-STAT

25 camundongos fêmeas da linhagem NOD eram mantidas nas mesmas condições sanitárias relatadas anteriormente sem nenhum tratamento até a idade de 8 semanas. Esses animais eram sacrificados para o estudo dos efeitos da mistura de gangliosídeos sob a via de sinalização JAK-STAT.

3.3. Diagnóstico do Diabetes e Sacrifício dos animais

A ocorrência do diabetes mellitus era monitorada em todos os animais a partir da sua retirada do CEMIB. As glicemias eram realizadas semanalmente em jejum 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 da hiperglicemia por dois dias consecutivos e através de glicosímetro com valores de glicemia ≥ 250 mg/dL (13,9 mMol) (estabelecido no Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental e em concordância com ITOH et al., 1997).

Os animais diagnosticados diabéticos, eram anestesiados com tiopental sódico 2,5% (Thiopentax®, Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA) (15 a 30mg/kg de peso corpóreo). O sangue periférico era coletado através de punção cardíaca e era transferido para tubo plástico de 1,5 ml (livre de RNase) para centrifugação e posterior separação de soro. Após este procedimento, realizava-se a remoção do pâncreas e ou das ilhotas juntamente com a retirada do baço, o qual era acondicionado em tubo de vidro estéril contendo solução tampão de Hank (Sigma, EUA).

O pâncreas era depositado em cápsulas contendo meio de inclusão O.C. T (Tissue Tek® Miles – EUA) e rapidamente congelados em nitrogênio líquido, sendo conservados em bio-freezer a - 80°C até processamento histológico para estudo morfológico e imunoistoquímico, empregando-se cortes obtidos em criostato (Leica, CM 1850 Alemanha).

3.4 Dosagem de Insulina

As concentrações de Insulina sérica eram obtidas através de dosagem pelo método de radioimunoensaio (SCOTT et al., 1981).

3.5. Análise Morfológica

A avaliação histológica dos pâncreas era realizada nos pâncreas de 05 animais de cada grupo, tratados e controles tinha como objetivo analisar os aspectos morfológicos das ilhotas e caracterização do grau de insulite.

Os pâncreas dos animais de cada grupo experimental eram transferidos e posicionados no suporte do criostato (Leica CM1850) de maneira a se obter a maior área possível de corte. Os espécimes eram coletados em série de quatorze cortes consecutivos de 5µm de espessura e depositados em lâminas histológicas previamente silanizadas (γ Methacryl-Oxipropil -Methoxysilane - Sigma St Louis, EUA).

Após a obtenção da primeira série, o pâncreas era desbastado 300µm e, a seguir, outra série de quatorze cortes era igualmente processada. Repetia-se este procedimento outras seis vezes obtendo-se os conjuntos de lâminas representados no esquema 1 (. p. 43).

As lâminas nº 1, 8, 15 e 22 - obtidas através de criocortes eram coradas pela técnica da hematoxilina e eosina e observadas em microscópio óptico (Axioscope, Zeiss, Darmstad-Germany), permitindo detectar a presença de infiltrado inflamatório em toda extensão do órgão. Os cortes nos quais se evidenciava a presença de infiltrado inflamatório eram classificados segundo o grau de insulite apresentado e o número total de ilhotas Langerhans contados. As lâminas subsequentes eram utilizadas para a caracterização linfocitária. Deste modo, para fenotipificação do infiltrado celular através da técnica de imunistoquímica (CD4⁺) eram utilizadas as lâminas nº.: 2, 9, 16 e 23, (CD8⁺) eram utilizadas as lâminas nº.: 3, 10, 17 e 24, (CD11) eram utilizadas as lâminas nº.: 4, 11, 18 e 25.

A classificação utilizada nas ilhotas pancreáticas, segundo o grau de insulite apresentado, era realizada seguindo adaptações aos critérios propostos por PAPACCIO et al., (1993); SIGNORE et al., (1989) e adaptado no LIAE VENTURA - OLIVEIRA et al., (2000)

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 de insulite, em três planos de cortes diferentes por órgão. Os resultados eram representados pela média e desvio padrão referente à relação do número de ilhotas de cada grau/total de ilhotas contadas por animal, para cada grupo experimental, e calculava-se o índice de lesão, segundo a fórmula (LEITER, 1997):

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

Índice = 1 destruição total da ilhota

0, 1, 2, 3 e 4 representa 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.

I									
	01 HE	02 CD4	03 CD8	04 CD11	05 TUN	06 INS	07 GLU	08 HE	09 CD4
1 ^a	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 ^a	●	●	●	●	●	●	●	●	●
3 ^a	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	10 CD8	11 CD11	12 TUN	13 INS	14 GLU				
1 ^a	●	●	●	●	●				
2 ^a	●	●	●	●	●				
3 ^a	●	●	●	●	●				
II									
	15 HE	16 CD4	17 CD8	18 CD11	19 TUN	20 INS	21 GLU	22 HE	23 CD4
1 ^a	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 ^a	●	●	●	●	●	●	●	●	●
3 ^a	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	24 CD8	25 CD11	26 TUN	27 INS	28 GLU				
1 ^a	●	●	●	●	●				
2 ^a	●	●	●	●	●				
3 ^a	●	●	●	●	●				

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

3.6. Imunoistoquímica

3.6.1., CD4⁺ e CD8⁺ CD11

Para a fenotipificação do infiltrado inflamatório nas ilhotas pancreáticas para linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e macrófagos, CD11. As lâminas selecionadas para (CD4⁺) eram de nº.: 2 9 16 e 23, (CD8⁺) eram utilizadas as lâminas nº.: 3, 10, 17 e 24, (CD11) eram utilizadas as lâminas nº.: 4 11 18 e 25 provenientes de cortes histológicos congelados.

A técnica empregada era de imunofluorescência indireta (Zeiss, Axioscop, Alemanha). O anticorpo secundário foi acoplado à biotina, permitindo a fixação de várias moléculas de estreptoavidina -FITC, a fim de se amplificar o sinal. As lâminas após previa fixação em acetona durante 10 minutos, eram lavadas uma vez em solução de salina fosfatada tamponada (PBS) e em seguida os cortes eram incubados em 2,5% albumina bovina fração V (BSA V GibcoBRL, EUA); 2% leite desnatado em pó e 8% SFB (soro fetal bovino HyClone – Utah, EUA) durante 45 min, para bloqueio de sítios inespecíficos. Aproximadamente 50µl do anticorpo primário anti-CD4(clone H 129.19), αCD8⁺(clone 53-6.7) e αCD11(clone M1/70) rato anti-camundongo – BD. (Biociciences Pharmigen - EUA diluição de 1/25), eram adicionados a cada corte e incubados por toda noite, a temperatura ambiente em câmara úmida, protegida de luminosidade. Em seguida, as lâminas eram lavadas seis vezes, durante 5 minutos, em tampão solução de PBS.

As lâminas eram então, tratadas novamente com solução bloqueio durante 45 min. Em seguida 50µl do anticorpo secundário, biotinilado (Anti-rato IgG, 10µg/mL, VECTOR Laboratories, Inc, EUA) era adicionado e incubado por duas horas

nas mesmas condições descritas anteriormente. As lâminas eram lavadas novamente em PBS seis vezes e montadas em glicerol. Os cortes de pâncreas, assim preparados, eram observados e as imagens capturadas em Sistema (KS 300-Zeiss, Alemanha)

3.6.2 Insulina e Glucagon

A técnica empregada era de imunofluorescência indireta. As lâminas 6, 13,20 e 27 para insulina e 7, 14, 21,28 dos grupos tratados com gangliosídeo salina e diabéticos para glucagon. Após prévia fixação em acetona durante 15 minutos eram lavadas três vezes em PBS e em seguida os cortes incubados em 2,5% albumina bovina fração V; (BSA V GibcoBRL, EUA); 2% leite desnatado em pó e 8% soro fetal bovino (SFB HyClone – Utah, EUA) durante 2 horas, para bloqueio de sítios inespecíficos. Aproximadamente 50µl do anticorpo primário anti-insulina (produzido em coelho) e anti-glucagon (produzido em coelho) (Rabbit polyclonal IgG – Santa Cruz Biotechnology) eram adicionados a cada corte com diluição 1:100 (2 µg/mL) e incubados por 1 hora em temperatura ambiente, em câmara úmida. Em seguida, as lâminas eram lavadas três vezes, durante 5 minutos, em PBS. Então, eram adicionados 50µl do anticorpo secundário (1,5 µg/mL) biotinilado com fluoresceína anti-coelho IgG, produzido em cabra, (Vector Laboratories Inc., Califórnia, EUA) e incubado por duas horas nas mesmas condições descritas anteriormente. Finalmente as lâminas foram lavadas em PBS e montadas em glicerol. Os cortes de pâncreas, assim preparados, eram observados e as imagens capturadas em fotomicroscópio (KS 300-Zeiss – Alemanha)

3.6.3 Detecção de Apoptose *in situ* - Técnica TUNEL

A técnica TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick-End Labelling) tem sido utilizada na detecção e quantificação de células apoptóticas. Este método baseia-se na ligação específica de desoxiuridina tri-fosfato biotinilada (dUTP) conjugada com fluoresceína ao terminal 3'-OH do DNA (sítios de quebra de DNA), catalisada pela enzima Terminal Desoxinucleotidil Transferase (TdT), com subsequente síntese de um heterodímero.

A reação de TUNEL era realizada segundo instruções do fabricante (*"In Situ Cell Death Detection Kit"*, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). As lâminas 5, 12, 19 e 26 dos grupos tratados com gangliosídeo salina e diabéticos eram fixadas em paraformaldeído 4% por 60 minutos a temperatura ambiente, em seguida lavadas em solução salina fosfatada tamponada por 30 min. Após a lavagem os cortes eram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena por 10 min a temperatura ambiente. Decorrido o tempo de bloqueio, os cortes eram submetidos à lavagem rápida com PBS e em seguida, incubados durante 2 min em solução permeabilizante (0,1% triton-x em 0,1% de citrato de sódio) mantidos sob gelo.

Após esta etapa, as lâminas eram lavadas novamente em PBS por 2 minutos e aproximadamente 50µL da reação TUNEL (solução de enzima - TdT; adicionada à solução label - mistura de nucleotídeos em tampão) eram adicionados à cada corte e incubados em câmara úmida a 37°C, por um tempo de 60 minutos, protegidos contra luminosidade.

Após incubação as lâminas eram então convertidas para peroxidase com 50µL de solução POD (anticorpo anti-peroxidase) por 30 min em câmara úmida a 37°C e

lavadas três vezes, em PBS. Em seguida os cortes eram cobertos com solução de 3,3'-Diaminobenzidina contendo 3% de H₂O₂, sendo a reação acompanhada ao microscópio óptico e bloqueada com água destilada. Era realizada então a contra coloração com hematoxilina de Harris, sendo os cortes desidratados em seqüência de álcoois e xilol para que se procedesse a montagem. A documentação era feita em fotomicroscópio (KS 300-Zeiss)

3.7. Isolamento de Células Mononucleares do Baço:

Sob anestesia de tiopental sódico 2,5% os animais tiveram seus baços removidos assepticamente e colocados em placa de Petri estéril, contendo solução salina de Hank (Sigma). Posteriormente, os baços foram cuidadosamente macerados utilizando-se peneiras estéreis (Sigma). A seguir, as células foram lavadas em solução salina de Hank (Sigma) e centrifugadas por 10 minutos, a 1500 rpm, processo este repetido por três vezes. As células do baço assim obtidas foram destinadas para análise de citocinas e extração de RNA total.

3.8. Isolamento de ilhotas

As ilhotas eram isoladas seguindo-se a técnica originalmente descrita por MOSKALEWSKI (1965), aplicada a pâncreas murino por LACY e KOSTIANOVSKY (1967), com algumas modificações introduzidas por BOSCHERO et al., 1981, e adaptações, quanto ao tempo de reação e concentração de collagenase, realizadas no nosso laboratório VENTURA-OLIVEIRA et al., (2002) visando melhorar o rendimento, conforme descrição a seguir.

Animais dos grupos tratados com gangliosídeos e salina ao completarem as idades estipuladas (8, 12, 16, 20 e 28 semanas de vida) eram anestesiados utilizando-se Thiopental sódico 3% (15 a 30mg/kg de peso corpóreo). As cavidades abdominal e torácica eram abertas e o pâncreas localizado. Após distensão e seu isolamento dos outros órgãos, o pâncreas eram infundido com solução de Hank contendo 2mg/ml de collagenase (Sigma.) através de seringa de 1ml até o 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 delicada. A suspensão era transferida para tubo de ensaio vedado com rolha e encubado em banho térmico a 37°C durante 15 minutos. Decorrido esse período e sob o banho térmico, o tubo era agitado manualmente por aproximadamente 1 minuto, (tempo este controlado de acordo com o turvejar do material, indicativo de digestão enzimática) e mantido por mais 1 minuto em banho térmico para finalizar a digestão do órgão. Em seguida, o conteúdo era transferido para um Becker de 100ml e adicionado Hank gelado até completar volume de 80ml. Após intervalo de 2 minutos, aspirava-se o sobrenadante com uma seringa de vidro de 20ml. Repetia-se este procedimento 3 vezes com a finalidade de separação do tecido adiposo, collagenase e enzimas pancreáticas.

O isolamento das ilhotas era realizado manualmente através de lupa, colocando-se por volta de 10ml 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 estirada e tratada com albumina (solução de Hank contendo 10mg/ml albumina). A seguir, eram transferidas para outra

placa de Petri com fundo escuro com Hank contendo 2,8 mM de glicose e 3mg/ml de albumina. A partir desta solução límpida realizava-se uma nova coleta.

As ilhotas coletadas eram transferidas para tubo plástico de 1,5 mL livre de Rnase, adicionando-se a seguir cerca de 400µl de solução preservadora de guanidina-sarcosil. Esta preparação era mantida em bio-freezer à -80°C até a sua utilização.

3.9 Viabilidade das Ilhotas Pancreáticas Recém Isoladas

As viabilidades das ilhotas isoladas eram estimadas pelo método de exclusão do corante azul de tripan. As ilhotas isoladas pela técnica de digestão com colagenase (descrito acima) eram agrupadas e transferidas para placa de Petri transparente e observadas através de lupa. Ilhotas que não absorveram o corante, permanecendo opacas eram consideradas viáveis e ilhotas que se apresentavam coradas indicando a absorção do corante pela célula devido ao rompimento da membrana celular eram consideradas ilhotas inviáveis.

3.10. 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 CHOMCZNSKI e SACCHI (1987) adaptado Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (LIAE) conforme descrição a seguir.

As células esplênicas e ilhotas 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. O volume adicional de extração guanidina

(GBL) dependia do número de células ou tamanho do tecido. Em geral, utilizava-se 10 volumes de solução e extração ao precipitado celular.

Para a separação das proteínas dos ácidos nucléicos 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 2 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, era adicionada 40µl de água ultrapura estéril preparada com Dietil Pirocarbamato (DEPC, Sigma) e armazenando à - 80°C.

3.11. *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 CA, 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.

3.12. 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,CT 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 RNA) 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 pelo Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (BOECHAT et al., 2002).

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

3.13. 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 (tabela 2 p.58), 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 MgCl₂ 50mM e 33.5µl de água ultra pura) e 1µl de óleo mineral. Em seguida os tubos contendo as misturas de cDNA eram transferidos 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 2: Os *primers* utilizados eram desenhados a partir de seqüência disponível em banco público (Genebank) As seqüências descritas acima obedeciam à estratégia sense e anti-sense:; TNF- α , INF- γ ; IL-12;IL1 β ,NGF,IGF,Fas,Fas-L e Bcl-w) e ciclofilina (gene estrutural). **pb**= pares de bases.

Primer	Sense	Anti-sense	Produto
TNF-α	5' CTTAGACTTTGCGGAGTCCG 3'	5' CCCTGTCACTGGACCTGACA 3'	254pb
INF-γ	5'AAGTGGCATAGATGTGGAAG 3'	5'CTGGACCTGTGGGTTGTTGA 3'	265pb
IL-1β	5"AGGCTCCGAGATGAACAA3'	5'AAGGCATTAGAAACAGTCC3'	450pb
IL-12₄₀	5'AGCTTTTGTGACAACCAATAAGAAC 3'	5' CAAACTCACAGAGATCTGCCTG 3'	297pb
NGF	5'TGAAGCCCACTGGACTAAA3'	5'ACCTCCTTGCCCTTGATG	372pb
IGF-I	5'GACTTCGGGAGACAACCTT3'	5'TCAGGCACTGGGAAATAC3'	428pb
Fas	5'GGCGATTTTGGGACTTTGTTTCCT 3"	5'GCACAGAAGGGAAGGAGTA3'	249pb
Fas-L	5'CTAGAGGGCCGGACCAAAGGAGACC3'	5'AGGTGGAAGAGCTGATACATTCTAATCCC3'	206pb
Bcl-w	5'GAGTTTGAGACCCGTTTCCGCCGCACCTTC3'	5'AGGTGGAAGAGCTGATACATTCTAATCCC3'	230pb
Ciclofilina	5' GACAGCAGAAAACCTTTCGTGC 3'	5' GGTTCCTGACTCACCGACC T 3'	276pb

3.14. Análise dos Produtos da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) por Eletroforese em Gel de Agarose

As amplificações 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 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, CA, EUA. 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/H₂O ultrapura) e adicionada de 2µl de brometo de etídio.

Preparo das amostras:

As amostras eram preparadas misturando 8µl de produto de PCR, 1,5 µl tampão de amostra de PCR GBX(glicerol, azul de bromofenol, xilenocianol e água ultrapura) 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.

3.15 Análise Semiquantitativa dos Produtos de PCR

A semi-quantificação 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.

3.16 Preparo do Extrato de baço (avaliação da via Jak – STAT)

Anestesiava-se o animal com solução de tiopental sódico 2,5% Thiopentax®, Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA) (15 a 30mg/kg por peso), abria-se a cavidade abdominal para exposição da veia cava inferior e aplicavam-se 50µl de insulina ((3,3nM), 100µl da mistura de gangliosídeos na concentração de 150 mg/kg em cada animal. Primeiramente foi realizado um “time course” para estipular o melhor tempo de ativação para cada tirosina quinase analisada. Assim, utilizou-se os tempos de 0, 90 segundos, 3, 10 e 15 minutos. Como controle de ativação utilizamos a insulina e o tempo de 3 min (SAAD et al., 1995) injetamos 50 µL de solução fisiológica 0,9% como tempo 0. Após esses tempos, os baços eram coletados e acondicionados em tubo de 1,5 ml contendo 800 µL de solução Tampão de extração para imunoprecipitado gelado (EDTA 10 mM, Trisma base 100mM, Pirofosfato de Na 10 mM, Fluoreto de Na 100mM, Ortovanadato de Na 10nM, PSMF 2mM (Phenyl metilsulfonil fluoride, Sigma) , Aprotinina 0,1 mg/ml (Trasyolol® - Bayer), H₂O deionizada) e processado com o auxílio do homogeneizador de tecidos (Polytron). A esse processado adicionava-se solução de

Triton 10% (10% do volume obtido), seguido de homogeneização e centrifugação a 12000 rpm / 4°C / 20 min. No sobrenadante realizava-se dosagem protéica através do Método de Biureto (Reativo de Biureto Protal: EDTA/ Cu 13 mmol/ L; NaOH 875 mmol/L) com diluição das amostras (1:20) e leitura em 540 nm em espectrofotômetro (U-2001 Spectrophotometer HITACHI, Japan).

3.17. Imunoprecipitação e Immunoblotting

As concentrações dos sobrenadantes eram ajustadas para 1mg de proteína e foram imunoprecipitados com anticorpos (diluição 1:10) de anti-Jak2 (sc 294), anti-Tyk2 (sc 169), anti-Stat3 (sc 482) e anti-Stat4 (sc 486) (Santa Cruz Technology, CA, EUA) durante 2 horas. O complexo de imunoprecipitado era coletado empregando-se proteína A-Sephadex (Amersham-Pharmacia Biotech, Suécia) e submetidos a 3 lavagens com solução de lavagem (Ortovanadato de Na 2 mM, Tris 100mM pH 7.4, EDTA 1mM, Triton 0,5% , H₂O deionizada). Adicionava-se a estes, tampão Laemmli contendo 100mmol/L de DTT (Dithiothreitol – Sigma) e aquecido em água fervente por 5 min. e submetidos a eletroforese em gel a 8% de poliacrilamida – SDS por 2 horas. Realizou-se a eletro-transferência de proteínas (immunoblotting) do gel para membrana de PVDF (BioRad, EUA) seguindo-se basicamente o método de TOWBIN et al, 1979 por mais 2 horas. Após as transferências, as membranas de PVDF, eram bloqueadas com solução basal (Tris 10 mM pH 7,4, NaCl 150mM, Tween 20), leite desnatado 0,2% durante 2 horas a temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C, incubadas com 5µg/mL anticorpo α-fosfotirosina (PY20 – sc-508, Santa Cruz Technology, CA, EUA), 20µg/mL IgG anti- mouse (Sigma) e 2 µCi/µg solução de proteína A-Iodo¹²⁵ (Amersham-Pharmacia Biotech, Suécia). A cada adição de anticorpo realizava-se 3 lavagens com

solução basal e o tempo para cada incubação era de 2 horas. As membranas eram envolvidas em filme plástico, após a secagem e expostas ao filme de raio-X e armazenadas em cassete a - 80°C durante 21 dias. A detecção das bandas era visualizada após revelação do filme, em sistema de documentação fotográfica NucleoVision (NucleoTech,) e submetidos à análise com *software* GelExpert (NucleoTech,)

3.18. Análise da expressão sérica de citocina por método imunoenzimático (ELISA)

Placas de polietileno de fundo chato eram adsorvidas com anticorpo de captura específico para as citocinas, TNF- α e TGF- β (BD Biosciences SD EUA) diluído 1:250 em tampão carbonato-bicarbonato pH 9.5 e para IFN- γ , IL-4 e IL-12 (R&D Systems Inc EUA) na concentração de 4 μ g/mL, diluído PBS pH 7.4 e incubadas overnight a 4°C. A seguir, as placas eram lavadas 3 vezes com 0,05% de Tween 20 (Merck Alemanha) em PBS. Para bloqueio dos sítios inespecíficos era utilizada solução de soro bovino fetal 1% em PBS, por 2 horas, em temperatura ambiente. As placas eram lavadas novamente por 3 vezes e, a seguir, amostras de 100 μ l de soros não diluídos foram adicionadas aos poços e incubadas por duas horas em temperatura ambiente. Após lavagem, eram adicionadas 100 μ L de anticorpo secundário conjugado com peroxidase diluído 1:10000 em PBS e soro fetal bovino 1% , para IFN- γ , IL-4 e IL-12, e, para TNF- α e TGF- β foram adicionados 100 μ L de anticorpo secundário biotinilado juntamente com avidina conjugada com peroxidase, diluído 1:250 em PBS e soro fetal bovino 1%. As placas eram, então, mantidas por duas horas em temperatura ambiente. Após lavagem,

a reação de cor foi produzida pela adição de tetrametilbenzidina (TMB BD OptEIA™), sendo bloqueada após 30 minutos, com H₂SO₄ 0,1M. Valores de absorbância em 450nm eram calculados pela subtração da densidade óptica obtida dos poços sem o antígeno (branco) contra uma curva realizada juntamente com o experimento. A leitura e os cálculos eram realizados através do sistema Spectra Max 190. Os gráficos eram construídos a partir de porcentagem de máxima concentração de citocinas.

3.19. Análise estatística

Os dados foram analisados usando teste ANOVA, Kruskal-Wallis não paramétrico com pós teste Dunn e teste ANOVA Mann-Whitney. Valores com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do Tratamento com Gangliosídeos Sobre a Manifestação do Diabetes Autoimune Espontâneo

Os efeitos de gangliosídeos na manifestação do diabetes mostraram que durante os períodos de experimentação, todos os animais tratados com a mistura de gangliosídeos (grupos 1, 2, 3, 4 e 5) não apresentaram diabetes nos tempos de sobrevivência analisados de 8, 12, 16, 20, e 28 semanas. A ausência do estado diabético foi confirmada pelo registro de glicemias menores que ≤ 250 mg/dL (13,9 mM) em todos esses animais. (Figura 1 p.61). Por outro lado, nos animais tratados com salina (grupo 10) verificou-se a ocorrência de glicemias maiores que ≥ 250 mg/dl (13,9 mM) em 71,4% dos animais (Figura 2 p.62).

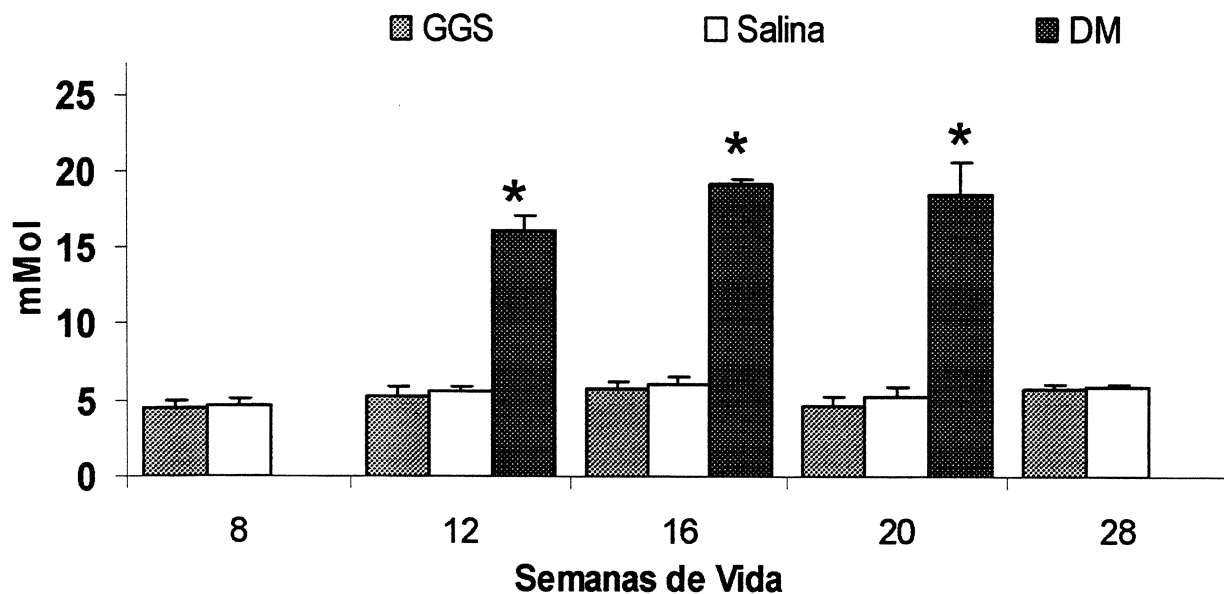


Figura 1. Gráfico representativo dos níveis glicêmicos de camundongos fêmeas NOD entre a 8ª e 28ª semanas de vida submetidos ao tratamento com gangliosídeos, salina e diabéticos. A ausência do estado diabético foi confirmada através de níveis de glicose sanguínea $\geq 250\text{mg/dl}$ (13,9 mM). As glicemias obtidas nos animais tratados com gangliosídeos apresentaram valores iguais ou inferiores aos animais que receberam salina. Os resultados estão expressos com média e desvio padrão (* $p < 0,05$ Mann-Whitney).

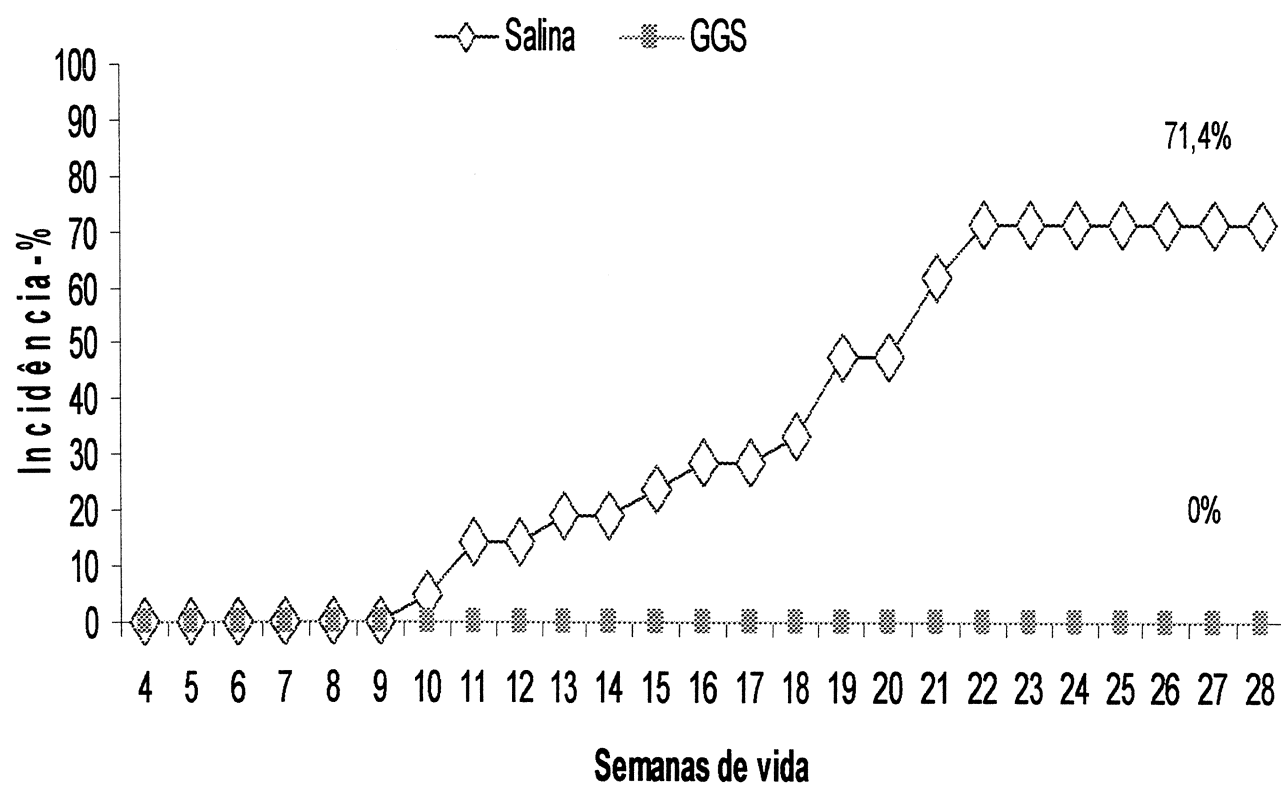


Figura 2. Incidência cumulativa do diabetes no camundongo NOD. Em todos os grupos tratados com gangliosídeos não foi observado ocorrência de diabetes tipo 1. Observe-se que nos animais do grupo salina (grupo 10) 71,4% ficaram diabéticos.

4.2. Efeito do tratamento com gangliosídeos sobre o processo inflamatório, índice de infiltrado nas ilhotas pancreáticas e concentração de insulina plasmática.

A quantificação do grau de infiltrado nas ilhotas dos camundongos tratados com gangliosídeos e salina com sobrevivência de 8, 12, 16, 20 e 28 semanas e diabéticos foi determinada através do grau de infiltrado linfomononuclear/Insulite (Figura 3 p 64). Na análise morfológica, a classificação das ilhotas revelou que nos animais tratados com gangliosídeos, a presença de ilhotas com infiltrado grau **III** e **IV** foi maior na 12^a. e 20^a. semana quando comparados com os animais que receberam salina. Na 28^a. pode-se observar marcante recuperação nos animais tratados com gangliosídeos com predomínio de ilhotas grau **0**.

Os menores índices de infiltrado foram observados em 8, 12 e 28 semanas nos animais tratados com gangliosídeos e 8, 12 e 16 semanas nos animais que receberam salina na 8^a, 12^a e 16^a semanas. (Figura 4 p. 65).

Na análise das concentrações séricas de insulina encontramos concentrações mais elevadas nos animais tratados com gangliosídeos e salina na 12^a e 16^a semanas. (Figura 5 p.66).

ESCORES

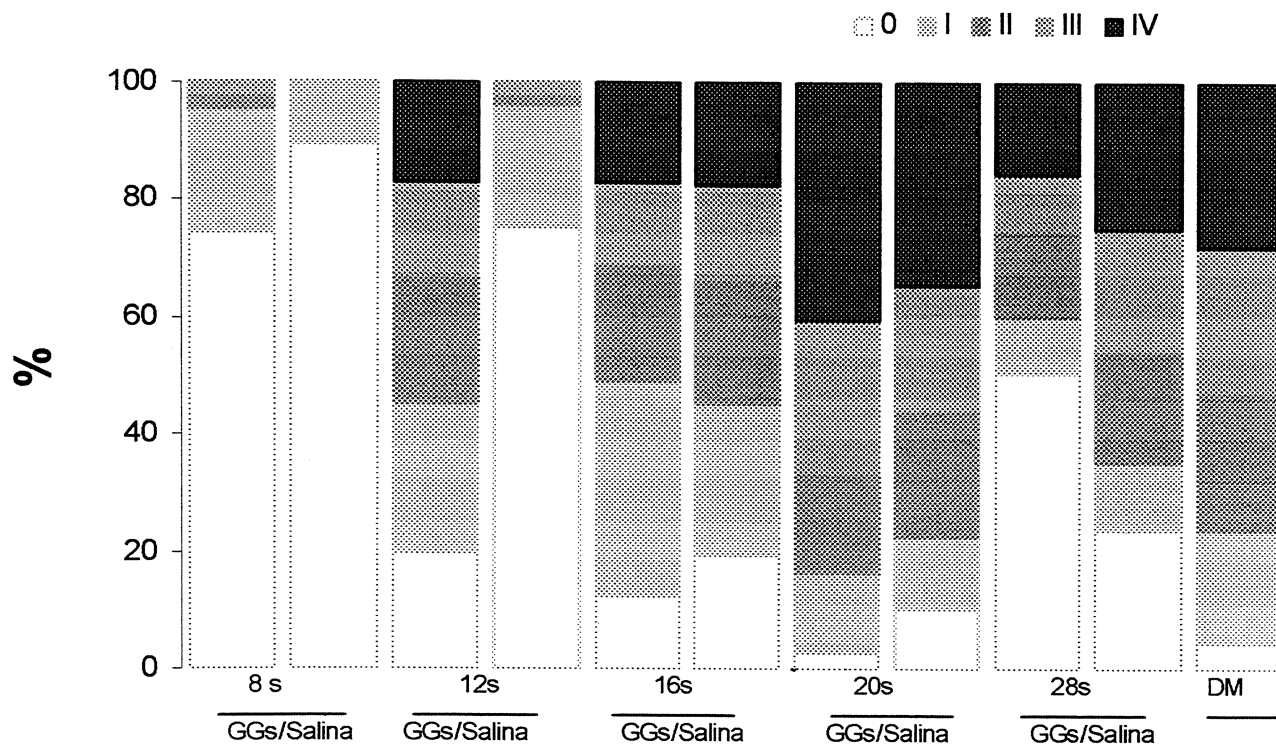


Figura 3. Gráfico representativo da Classificação das ilhotas de Langerhans segundo o grau de insulite A partir da 12^a. semana o comprometimento das ilhotas foi mas evidente nos animais tratados com gangliosídeo apresentando recuperação a 28^a. semana A insulite foi similiar entre os grupos na 16^a.

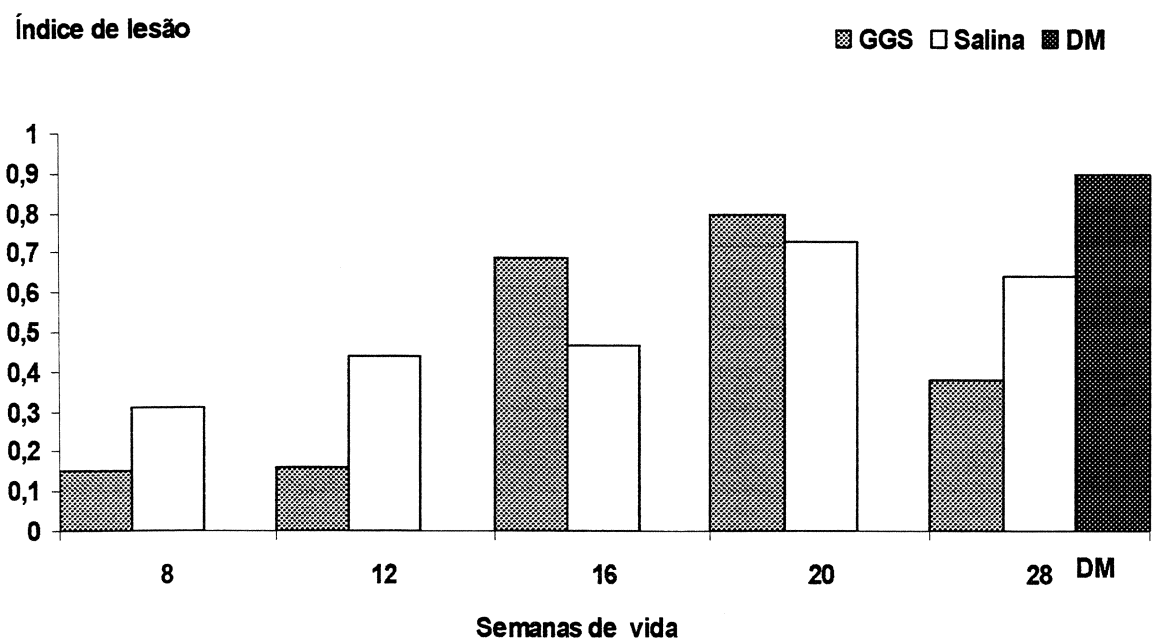


Figura 4. Índice de infiltrado celular em ilhotas de camundongos NOD tratados com gangliosídeos, salina e diabéticos. Os índices mais elevados foram observados nos grupos tratados com gangliosídeos e salina na 20ª semana e diabéticos.

Insulina

□ GGS □ Salina ■ DM

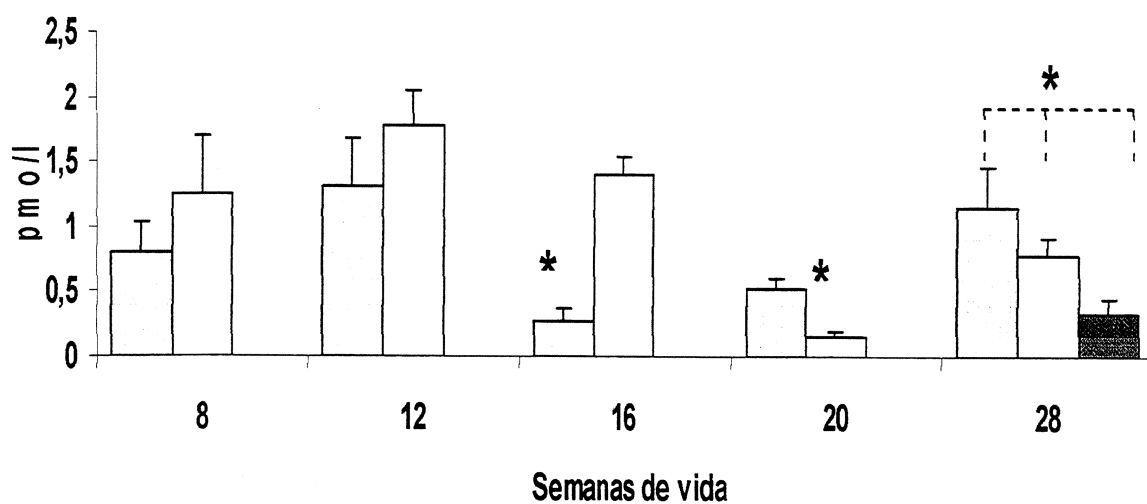


Figura 5. Concentração de insulina no soro. A concentração de insulina foi determinada por radioimunoensaio a partir dos soros provenientes dos animais tratados com gangliosídeos, salina e diabéticos. As menores concentrações de insulina foram observadas nos grupos tratados com gangliosídeos na 16ª e 20ª semanas, animais tratados com salina 20 semanas e animais diabéticos. As maiores concentrações de insulina foram observadas nos animais tratados com salina entre a 8ª. e 16ª. semana. Observou-se uma notável recuperação nos valores de insulina na 28ª. no grupo gangliosídeo. Os valores foram expressos em média e desvio padrão (* $p < 0,05$ – Kruskal-Wallis e Mann-Whitney)

4.3. Imunoistoquímica

A partir das fotomicrografias representativas da fenotipificação do infiltrado inflamatório no pâncreas dos animais tratados com gangliosídeo, salina e diabéticos por técnica de imunoistoquímica (imunofluorescência) para subpopulações de linfócitos T: CD4 (Prancha I) e CD8 (Prancha II); Macrófagos (Prancha III); Insulina (Prancha IV) e Glucagon (Prancha V). Diabéticos (Prancha VI).

4.4. TUNEL

Técnica utilizada para análise *in situ* de apoptose em pâncreas dos animais tratados com gangliosídeo, salina e diabéticos. Os animais tratados com gangliosídeos na 8ª e 28ª semanas exibem número de células apoptóticas maior que nas demais semanas estudadas tanto para gangliosídeos como salina. (TUNEL⁺) Os animais diabéticos exibem número de células apoptóticas (TUNEL⁺) substancialmente maior que os animais do grupo salina e gangliosídeos. (Prancha VII).

PRANCHAS

Prancha I Fotomicrografias de pâncreas submetidos à Imunoistoquímica para detecção de linfócitos TCD4⁺ em animais tratados com salina ou gangliosídeos a partir da 4ª semana até o sacrifício

- **Figura a e b** Nos animais sacrificados com 8 semanas tratados com gangliosídeos, observa-se maior número de células CD4⁺.
- **Figura c e d** Animais com 12 semanas. Os animais tratados com salina exibem maior número de linfócitos CD4⁺.
- **Figura e e f** Animais com 16 semanas. Os animais tratados com salina apresentam número substancialmente maior de linfócitos CD4⁺.
- **Figura g e h** Animais com 20 semanas. Verifica-se a redução da imunorreatividade tanto no grupo tratado com salina como no grupo tratado com gangliosídeos.
- **Figura i e j** Animais com 28 semanas. Nos animais dos 2 grupos experimentais a imunorreatividade foi semelhante. Ressaltando que embora haja processo inflamatório estes animais não manifestaram o DM-1

Aumento de 200 x. ou 400x.

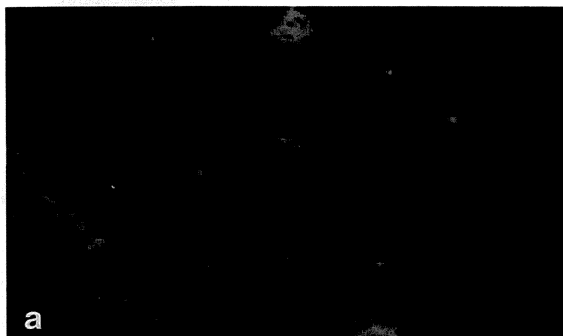
Prancha I

CD 4

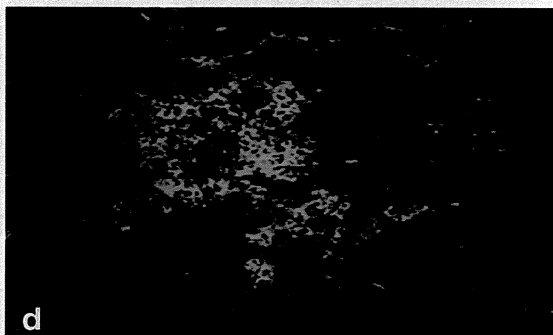
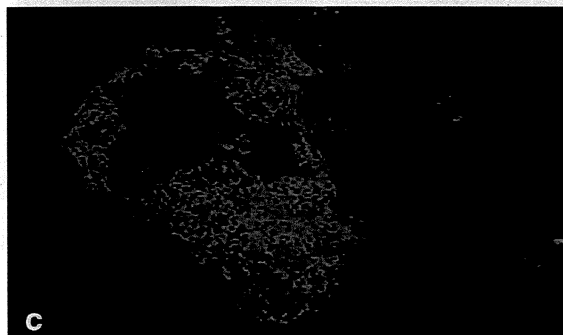
SALINA

GGGS

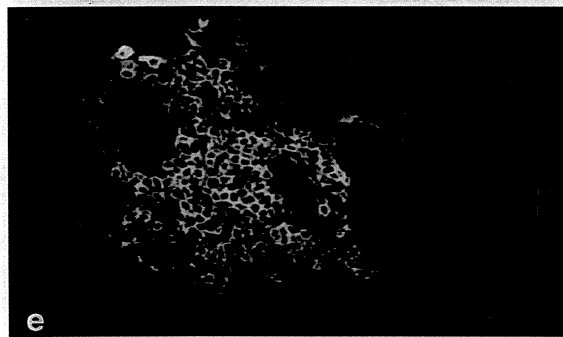
8 S



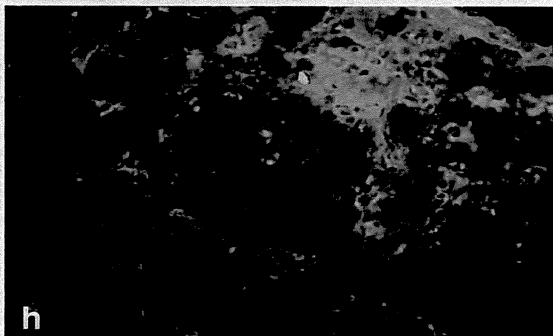
12 S



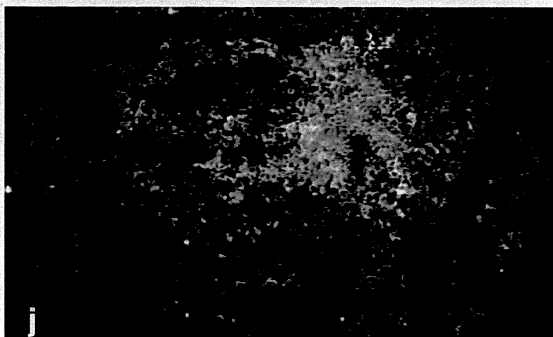
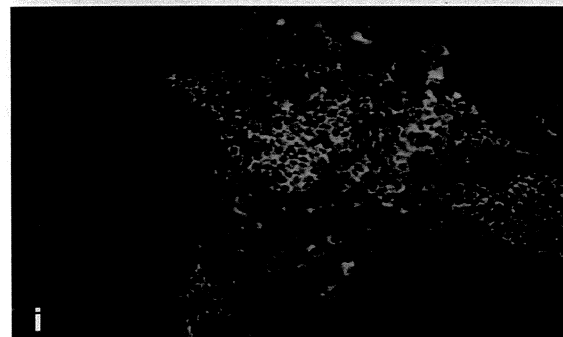
16 S



20 S



28 S



Prancha II - Fotomicrografias de pâncreas submetidos à Imunoistoquímica para localização de linfócitos TCD8⁺ em animais tratados com salina e gangliosídeos a partir da 4^a. semana de vida.

- **Figura a e b** Animais com 8 semanas. A detecção de linfócitos T CD8⁺ foi claramente maior em pâncreas de animais tratados com salina, ao contrário, os cortes obtidos de animais tratados com gangliosídeos a reatividade é fraca.
- **Figura c e d** Animais com 12 semanas. Observa-se padrão semelhante para marcação de CD8⁺, estendendo-se por toda ilhota de maneira uniforme, tanto para animais tratados com salina como nos animais tratados com gangliosídeos.
- **Figura e e f** Animais com 16 semanas. Estes cortes mantêm padrão semelhante ao observado na 12^a semana de vida em ambos os grupos experimentais.
- **Figura g e h** Animais com 20 semanas. Os cortes obtidos de animais tratados com salina exibem imunomarcção substancialmente maior em relação aos animais tratados com gangliosídeos, que exibem positividade dispersa por toda ilhota.
- **Figura i e j** Animais com 28 semanas. Os cortes obtidos de animais tratados com salina exibem imunorreatividade maior quando comparado com o grupo tratado com gangliosídeos

Aumento de 200 x. ou 400x.

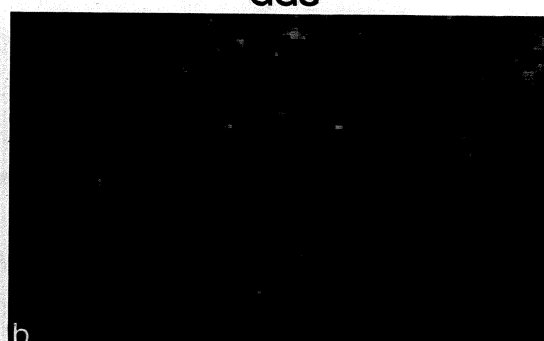
Prancha II

CD 8

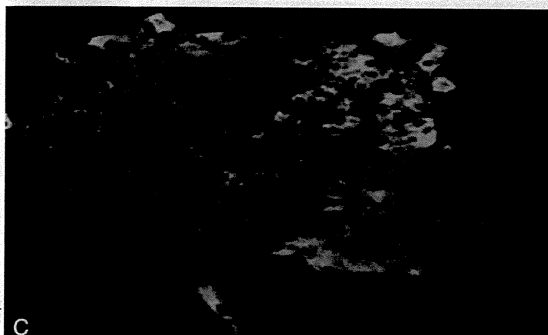
SALINA

GGG

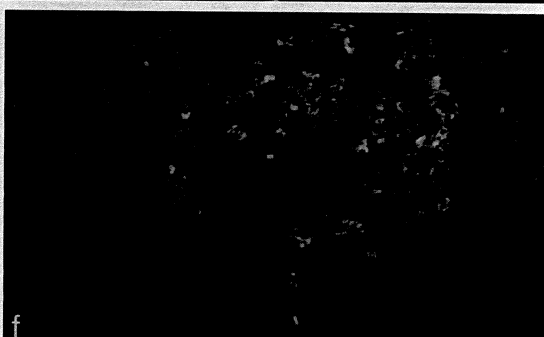
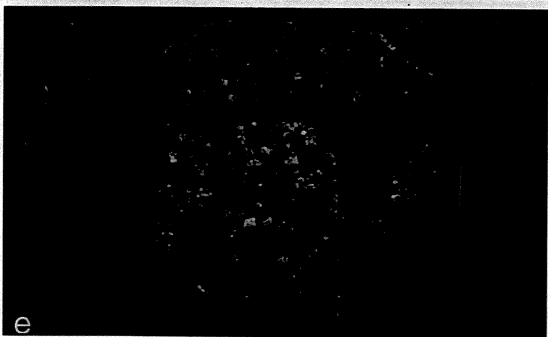
8 S



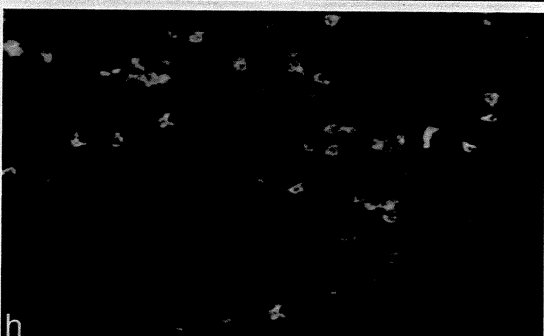
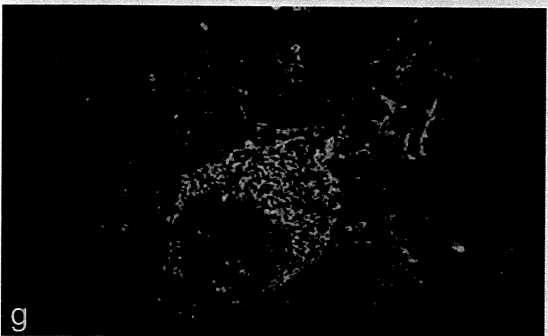
12 S



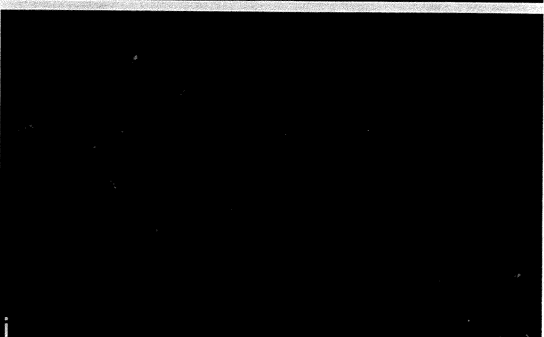
16 S



20 S



28 S



Prancha III. Fotomicrografias de ilhotas pancreáticas submetidas à Imunoistoquímica para detecção de macrófagos em animais tratados com salina e gangliosídeos.

- **Figura a e b** Animais sacrificados com 8 semanas A imunorreatividade encontra-se dispersa por toda área das ilhotas, tanto em animais tratados com salina como em animais tratados com gangliosídeos.
- **Figura c e d** Animais com 12 semanas. Os cortes de pâncreas obtidos de animais tratados com salina exibem maior positividade para CD11 que os animais tratados com gangliosídeos
- **Figura e e f** Animais com 16 semanas A localização de macrófagos ocorre principalmente na periferia das ilhotas de Langerhans.
- **Figura g e h** Animais com 20 semanas. Observa-se a manutenção do padrão de imunomarcção, ou seja, células CD11 circundando toda ilhota.
- **Figura i e j** Animais com 28 semanas. Nos animais tratados com salina a imunorreatividade se estende por toda ilhota, ao contrário, os animais tratados com gangliosídeos a marcação se restringe a periferia..

Aumento de 200 x. ou 400x.

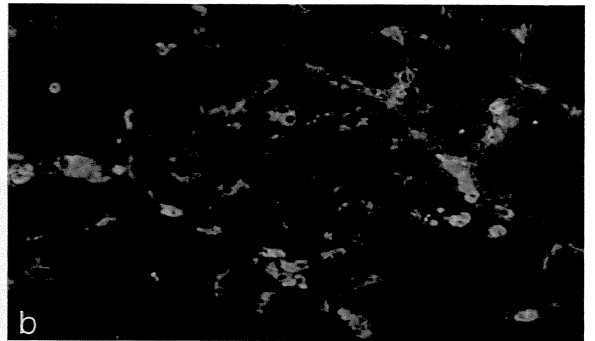
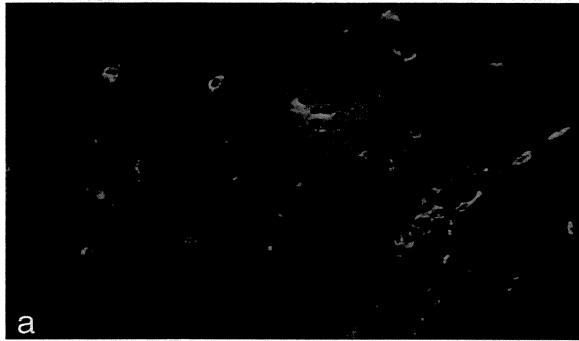
Prancha III

MACRÓFAGO-

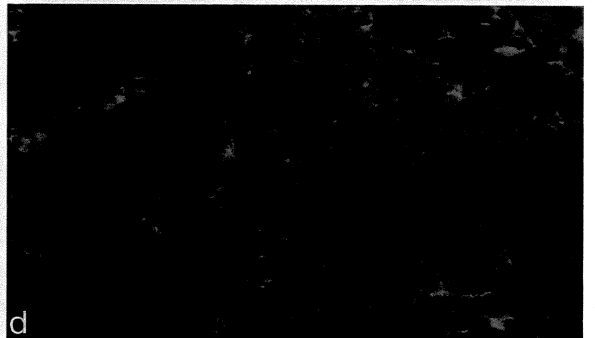
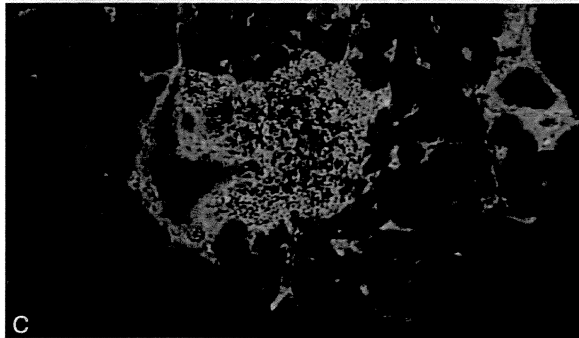
SALINA

GGs

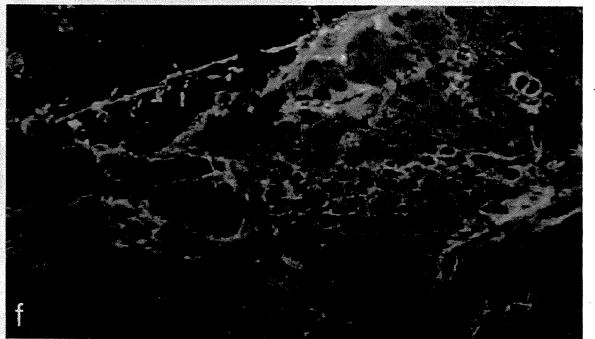
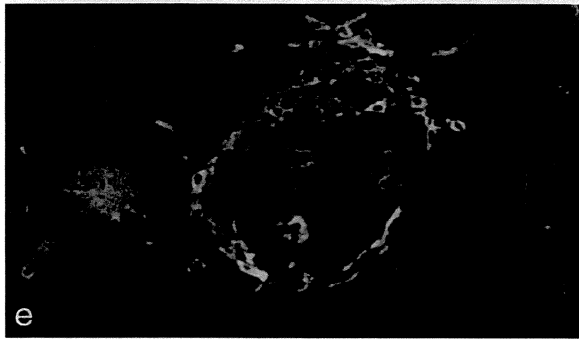
8 S



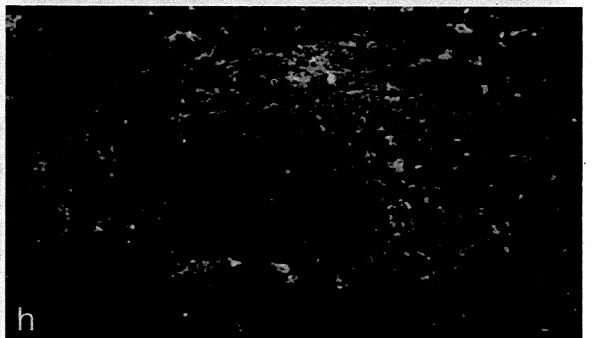
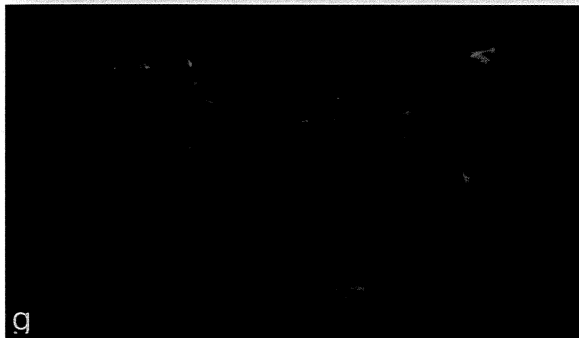
12 S



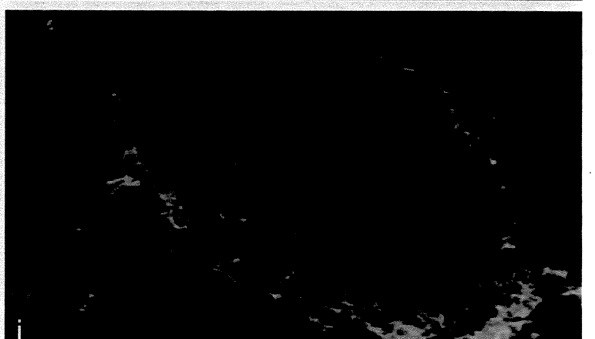
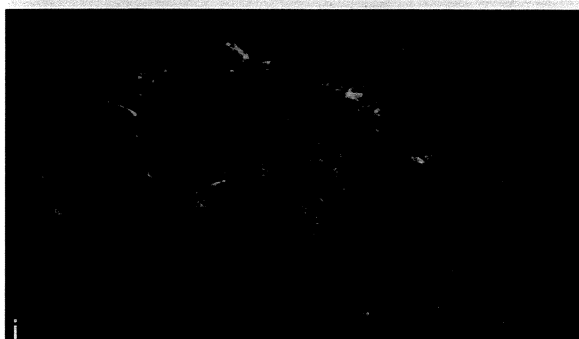
16 S



20 S



28 S



Prancha IV Fotomicrografias de ilhotas pancreáticas submetidas à Imunoistoquímica para detecção de insulina em animais tratados com salina e gangliosídeos.

- **Figura a e b** Animais sacrificados com 8 semanas. A detecção de insulina tanto nas ilhotas dos animais que receberam salina como para os animais tratados com gangliosídeos apresenta marcação semelhante.
- **Figura c e d** Animais sacrificados com 12 semanas. Os animais tratados com gangliosídeos exibem maior identificação de insulina que os animais tratados com salina.
- **Figura e e f** Animais sacrificados com 16 semanas. A presença de insulina nas ilhotas dos animais que receberam gangliosídeos mostrou-se maior que os animais tratados com salina .

Figura g e h Animais sacrificados com 20 semanas que receberam gangliosídeos e salina, apresentam fraca marcação para insulina. **Figura i e j** Animais sacrificados com 28 semanas. Os animais tratados com gangliosídeos e salina apresentam forte padrão de marcação para insulina Aumento de 200 x. ou 400.

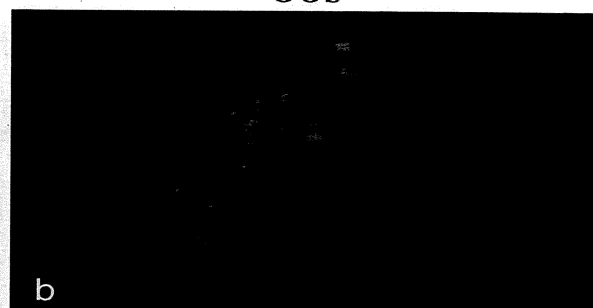
Prancha IV

INSULINA

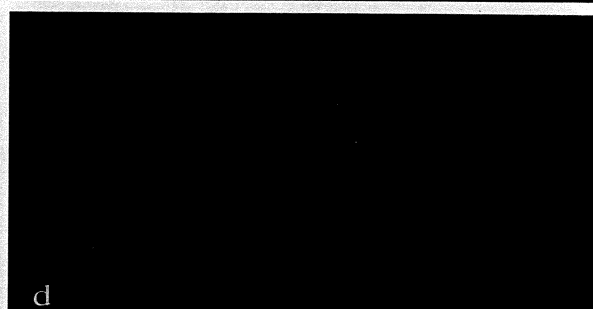
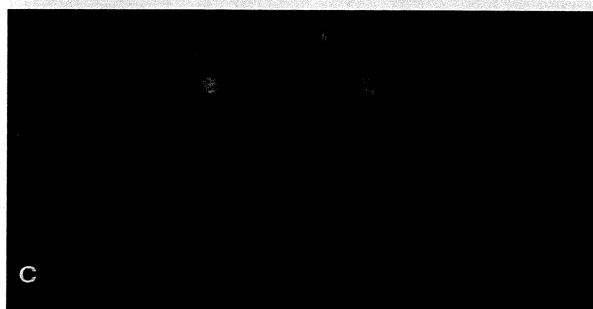
SALINA

GGs

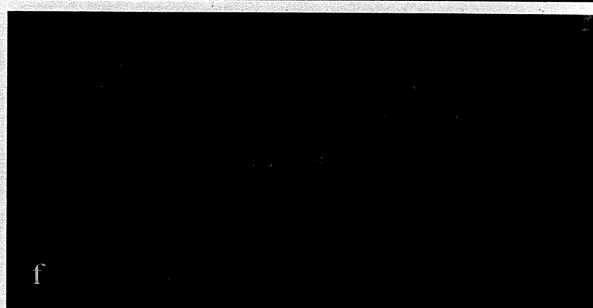
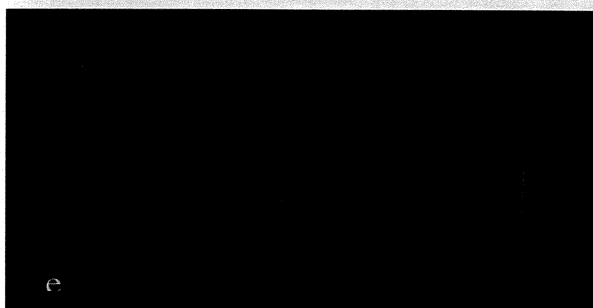
8 S



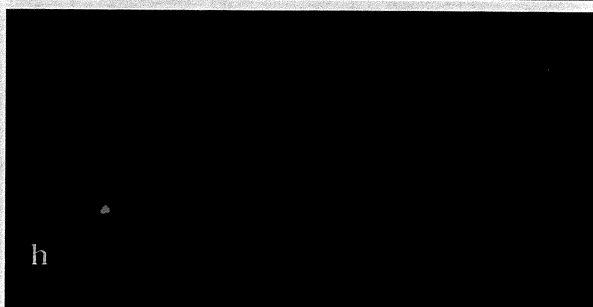
12 S



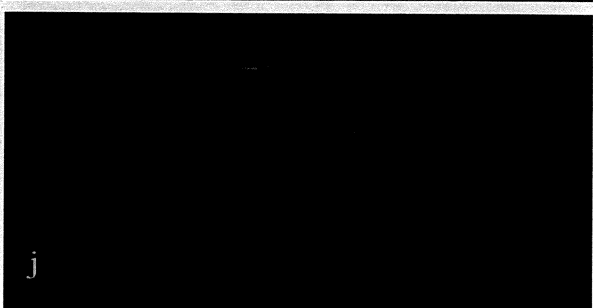
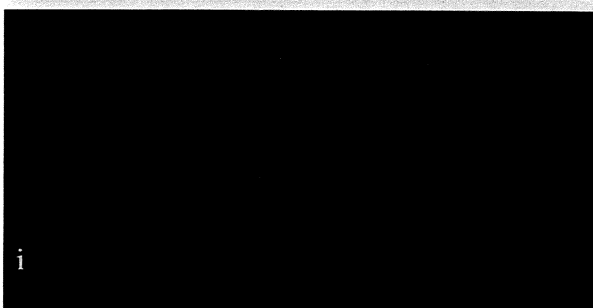
16 S



20 S



28 S



Prancha V Fotomicrografias corte de pâncreas submetidos à Imunoistoquímica para detecção de glucagon em animais tratados com salina e gangliosídeos.

- **Figura a e b** Animais sacrificados com 8 semanas Os animais que receberam salina apresentam imunorreatividade menor em relação aos animais que receberam gangliosídeos.
- **Figura c e d** Animais sacrificados com 12 semanas Os animais que receberam gangliosídeos. Apresentaram maior imunorreatividade em relação aos animais que receberam salina.
- **Figura e e f** Animais sacrificados com 16 semanas Os animais que receberam gangliosídeos. apresentam imunorreatividade maior em relação aos animais que receberam salina.
- **Figura g e h** Animais sacrificados com 20 semanas Os animais que receberam gangliosídeos apresentam imunorreatividade maior em relação aos animais que receberam salina.

Figura i e j Animais sacrificados com 28 semanas Os animais que receberam gangliosídeos apresentam menor imunorreatividade em relação aos animais que receberam salina

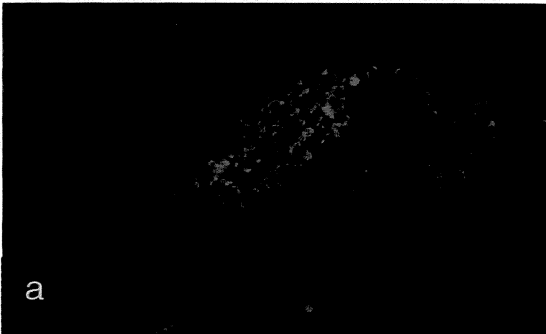
Aumento de 200 x. ou 400.

GLUCAGON

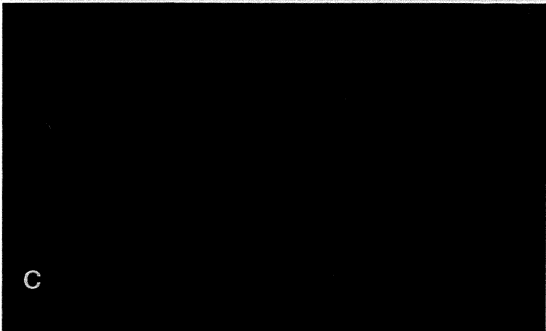
SALINA

GGG

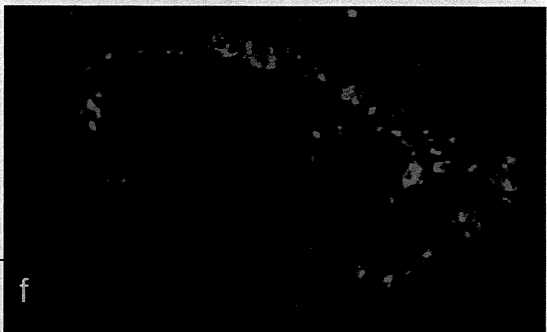
8s



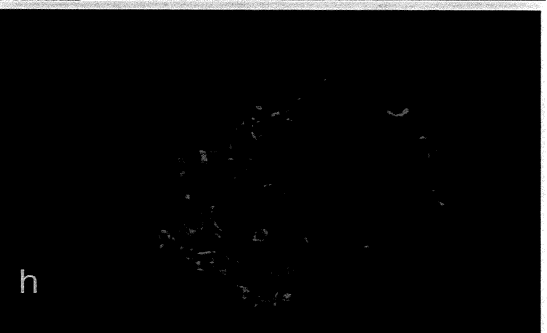
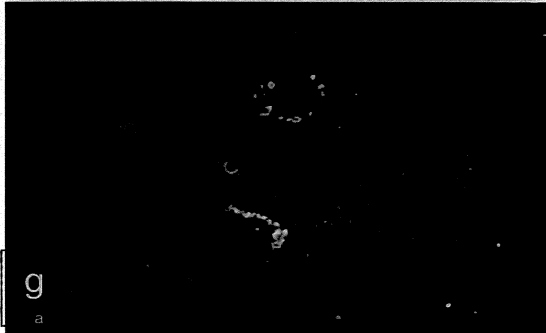
12s



16s



20s



28s



Prancha VI – Diabéticos- fotomicrografias obtidas de cortes de pâncreas de Camundongos NOD diabéticos.

- **Figura a** - A Imunoistoquímica para detecção de linfócitos T CD4⁺ mostra intensa reatividade, ocupando toda área da ilhota
- **Figura b** Imunoistoquímica para detecção de linfócitos T CD8⁺ mostra reatividade salpicada, ocupando toda área da ilhota
- **Figura c** Imunoistoquímica para detecção de linfócitos T CD11 mostra intensa reatividade, circundando toda área da ilhota.
- **Figura d** Imunoistoquímica para detecção de insulina mostra fraca reatividade,
- **Figura e** Imunoistoquímica para detecção de glucagon evidenciando forte reatividade, circundando toda área da ilhota.

Aumento de 200 x. ou 400.

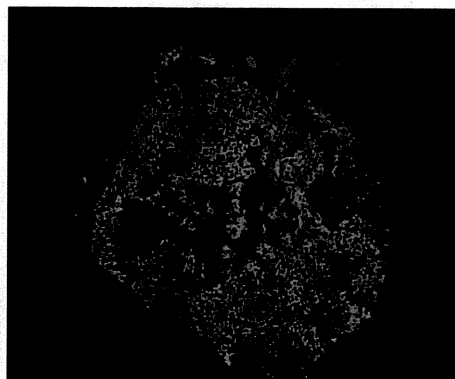
Prancha VI

DIABÉTICOS

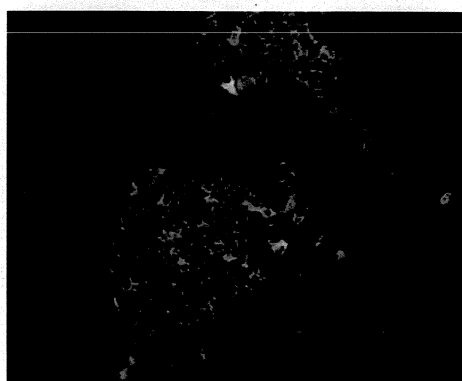
CD3



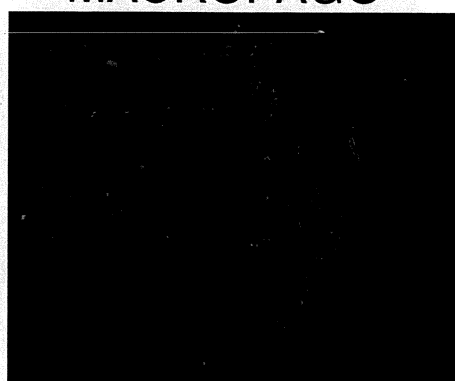
CD4



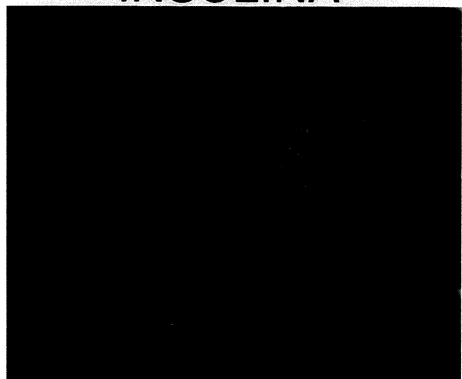
CD8



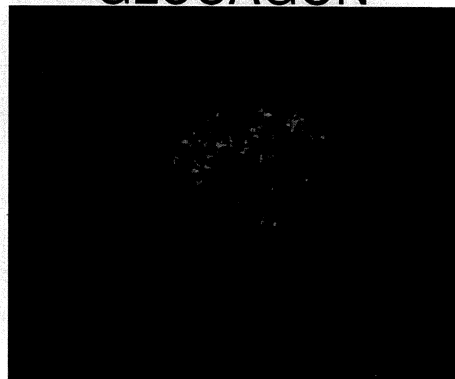
MACRÓFAGO



INSULINA



GLUCAGON

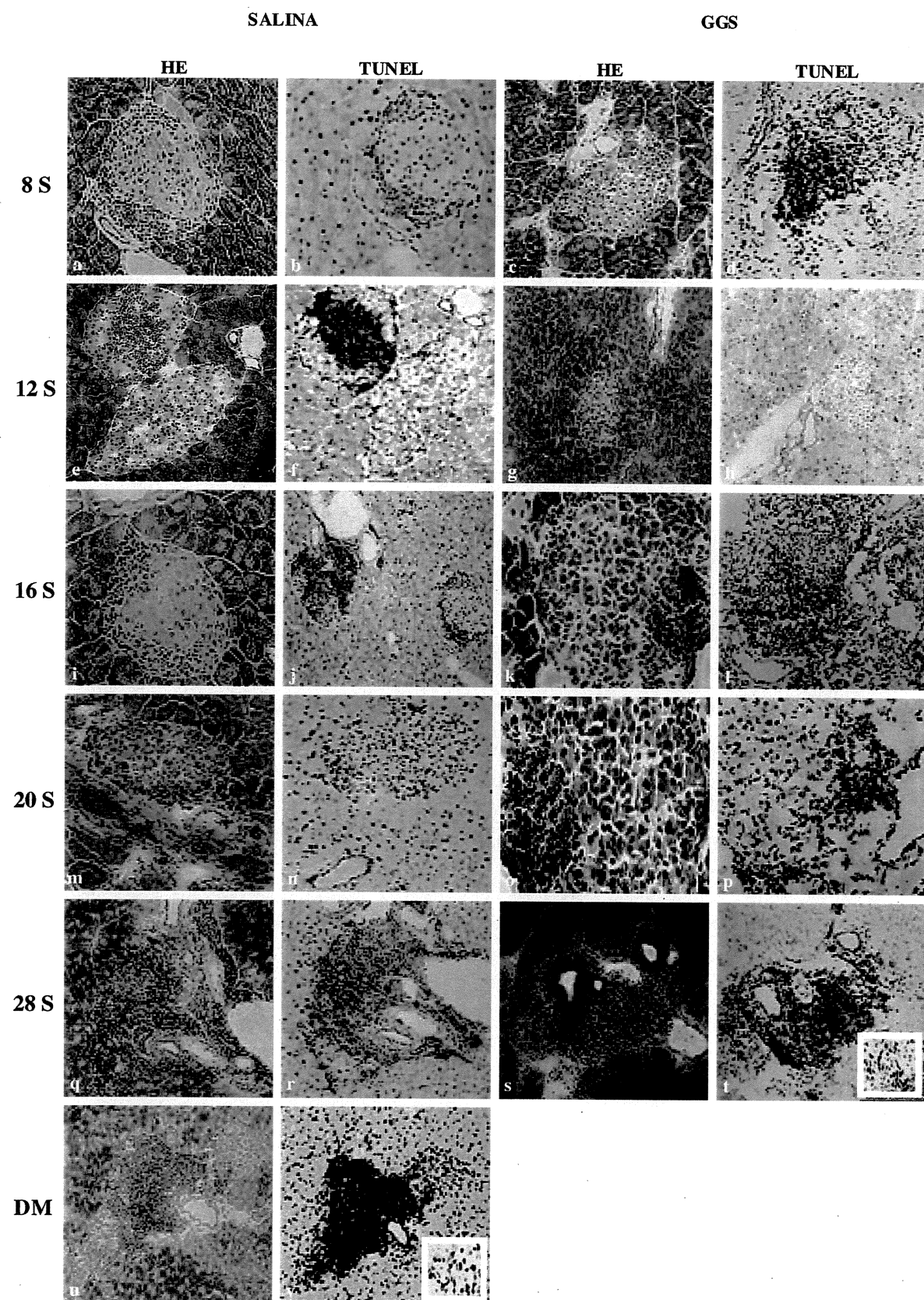


Prancha VII - Fotomicrografias de ilhotas pancreáticas submetidas à análise da apoptose *in situ* em pâncreas de animais tratados com salina e gangliosídeos e diabéticos.

- **Figura a, b, c, d animais** sacrificados com 8 semanas.
- **Figura e, f, g, h animais** sacrificados com 12 semanas.
- **Figura i, j, l, m animais** sacrificados com 16 semanas.
- **Figura n, o, p, q animais** sacrificados com 20 semanas.
- **Figura q r, s, t, animais** sacrificados com 28 semanas.
- **Figura u, v animais diabéticos.**

Aumento de 200 x. ou 40

Prancha VII



4.4. Efeitos da administração de gangliosídeos sobre a expressão molecular de citocinas e componentes apoptóticos em ilhotas pancreáticas isoladas e células esplênicas

Para avaliação do efeito do tratamento dos animais com gangliosídeos, salina e diabéticos, procedemos a detecção da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, inflamatórias e componentes apoptóticos em ilhotas pancreáticas e em células esplênicas isoladas. E cujos resultados estão apresentados a seguir.

4.4.1 Ilhotas

A expressão de *IL-1 β* , *IL-12*, *IFN- γ* , *TNF- α* , *NGF* e *IGF-I* de componentes apoptóticos *Fas* e *Fas-L* e pró apoptóticos *Bcl-w* foram avaliadas em diferentes níveis em ilhotas isoladas dos camundongos NOD tratados com gangliosídeos, salina e diabéticos a partir da 4^a. semana até as idades de 8, 12, 16, 20 e 28 semanas.. Os resultados estão representados (Tabela 3 p.78, Figuras-6-14 p.79-86)

	U.A.				
	8 sem	12 sem	16 sem	20 sem	28 sem
IL-1 β					
Gangliosídeos	26,699($\pm$ 5,8)	38,026($\pm$ 2,9)	21,682($\pm$ 4,5)	66,88($\pm$ 2,7)	5,924($\pm$ 2,2)
Salina	10,302($\pm$ 1,1)	139,212($\pm$ 9,1)	57,514($\pm$ 3,9)	41,886($\pm$ 5,2)	11,178($\pm$ 1,2)
Diabéticos					Não identificado
IL-12					
Gangliosídeos	42,47($\pm$ 2,4)	46,17($\pm$ 3, 2)	46,38($\pm$ 3,79)	32,24($\pm$ 1,77)	55,9($\pm$ 3)
Salina	120,98($\pm$ 8,3)	536($\pm$ 30)	122,78($\pm$ 8,77)	89,99($\pm$ 4,65)	30,19($\pm$ 2,7)
Diabéticos					175($\pm$ 10,6)
IFN-γ					
Gangliosídeos	14,26($\pm$ 2,8)	26,03 ($\pm$ 2,7)	17,81($\pm$ 1,3)	21,23(1,7 $\pm$)	Não identificado
Salina	14,67($\pm$ 2,6)	18,43($\pm$ 0,8)	46,17($\pm$ 2,2)	2,91($\pm$ 0,5)	4,83($\pm$ 0,6)
Diabéticos					Não identificado
TNF-α					
Gangliosídeos	45,33 ($\pm$ 3,6)	23,73($\pm$ 5)	5,77($\pm$ 2,7)	41,14 ($\pm$ 3,7)	35,45($\pm$ 2,5)
Salina	65,84 ($\pm$ 4, 2)	70,42($\pm$ 2,1)	181($\pm$ 21,7)	93,02($\pm$ 3,4)	17,75($\pm$ 2)
Diabéticos					Não identificado
NGF					
Gangliosídeos	61,85($\pm$ 2,7)	59,19 ($\pm$ 2,9)	56,10 ($\pm$ 2,8)	55,68($\pm$ 4,2)	84,27 ($\pm$ 3)
Salina		40,34($\pm$ 3,4)	24,08($\pm$ 2,5)	Não identificado	Não identificado
Diabéticos					0
IGF-I					
Gangliosídeos	55,00($\pm$ 2,4)	40,52($\pm$ 1,5)	61,53($\pm$ 0,78)	70,13($\pm$ 5)	51,38($\pm$ 9,7)
Salina	97,16($\pm$ 2,9)	165,54($\pm$ 9,5)	294,24($\pm$ 18,2)	104,92($\pm$ 4,3)	78,29($\pm$ 3,7)
Diabéticos					65,14($\pm$ 20,7)
Fas					
Gangliosídeos	9,96($\pm$ 0,5)	13,32($\pm$ 1,3)	15,21 ($\pm$ 0,5)	15,93($\pm$ 1)	Não identificado
Salina	7,76($\pm$ 0,7)	47,85($\pm$ 1,1)	141,6 ($\pm$ 3,4)	3,96($\pm$ 0,6)	28,52($\pm$ 2,5)
Diabéticos					Não identificado
Fas-L					
Gangliosídeos	18,42($\pm$ 2,5)	21,53($\pm$ 1,)	32,52 ($\pm$ 1,7)	62,49($\pm$ 3,4)	14,26($\pm$ 1,5)
Salina	53,56($\pm$ 3,7)	77($\pm$ 5,1)	272,48($\pm$ 15,8)	33,76($\pm$ 10,5)	29,38($\pm$ 3,01)
Diabéticos					368($\pm$ 29,5)
Bcl-w					
Gangliosídeos	48,31($\pm$ 1,6)	54,72 ($\pm$ 2,7)	128,04($\pm$ 3,2)	56,84($\pm$ 1,9)	73,1($\pm$ 1,89)
Salina	85,6($\pm$ 4,2)	146,94($\pm$ 4,57)	247,8($\pm$ 11,67)	72($\pm$ 8,9)	20,5($\pm$ 3,9)
Diabéticos					222,17($\pm$ 24,4)

Tabela 3. Dados da expressão de mRNA de ilhotas pancreáticas entre os animais tratados com gangliosídeos, salina e diabéticos representados através de média e desvio padrão. (*p<0,05 – Kruskal-Wallis e Mann-Whitney)

IL-1 β

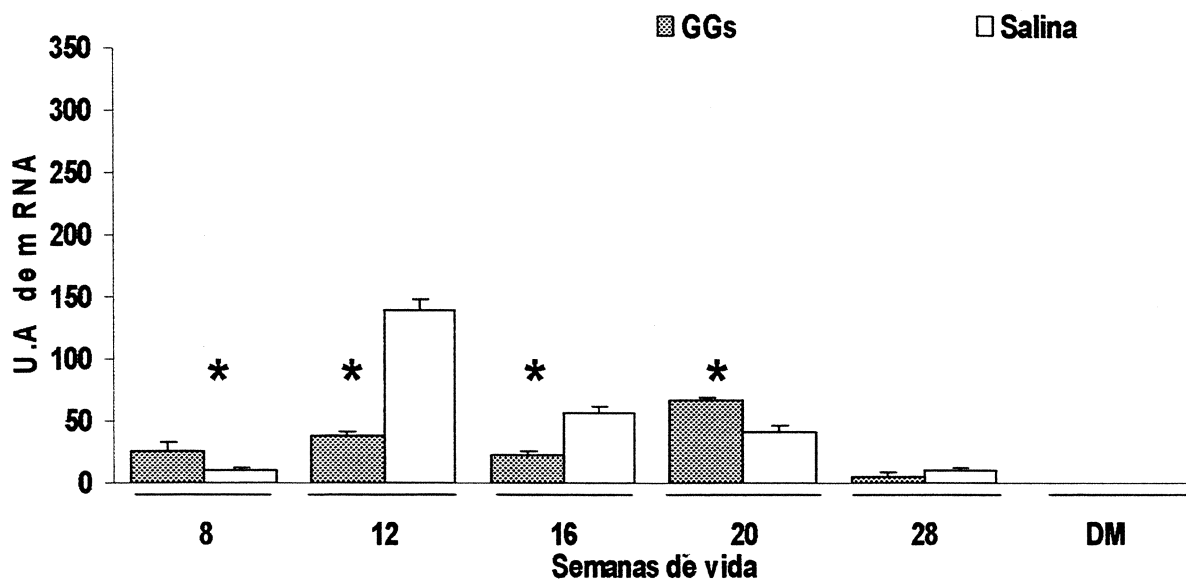


Figura 6. Detecção da expressão gênica de IL-1 β em ilhotas pancreáticas isoladas de animais tratados com gangliosídeos, salina e diabéticos nos tempos de 8, 12, 16, 20 e 28 semanas. A expressão de IL-1 β no grupo tratado com gangliosídeos foi baixa nos animais com 8 a 16 semanas, com ligeiro acréscimo na 20^a. Ao contrário, nos animais tratados com solução salina a expressão apresentou elevação na 12^a semana, reduzindo progressivamente. Na 28^a semana a expressão de IL-1 β foi baixa em ambos os grupos experimentais. Os animais diabéticos não expressaram IL-1 β . Os resultados estão expressos com média e desvio padrão (* $p < 0,05$ – Kruskal-Wallis e Mann-Whitney)

IL-12

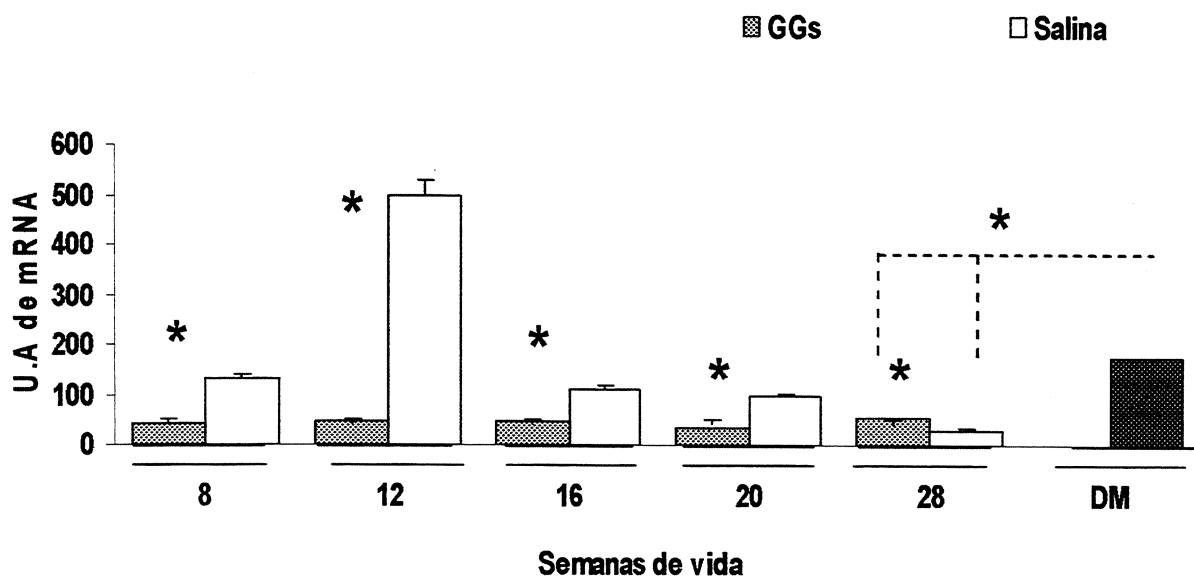


Figura 7. Análise do mRNA de IL-12 em ilhotas pancreáticas isoladas de animais tratados com gangliosídeos e salina, sacrificados com 8, 12, 16, 20 e 28 semanas de vida e diabéticos. Os níveis do IL-12 mRNA nos animais tratados com gangliosídeos foi baixa e constante por todo período experimental. Ao contrário, nos animais do grupo salina, a expressão estava elevada na 12^a semana, paralela a instalação do processo inflamatório, com níveis reduzidos na 16^a e 20^a semanas, com ligeira elevação na 28^a semana de vida. Os resultados estão expressos com média e desvio padrão (* p<0,05 – Kruskal-Wallis e Mann-Whitney)

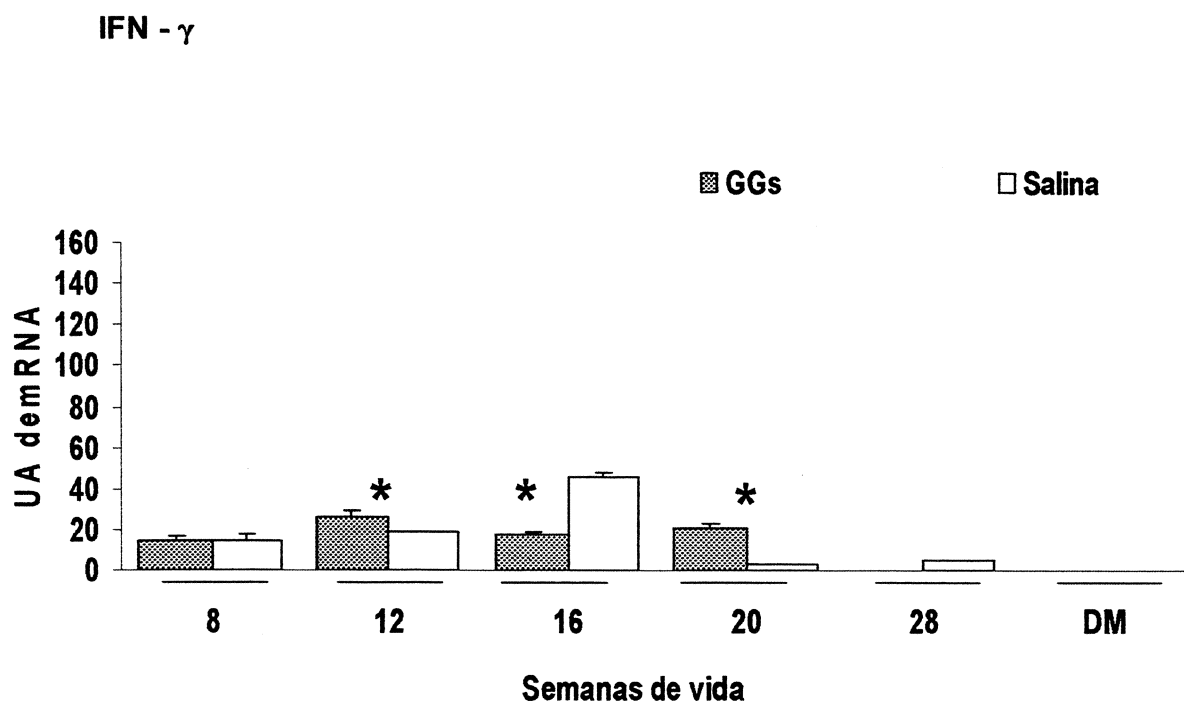


Figura 8. Detecção de mRNA de IFN γ em ilhotas pancreáticas isoladas de animais tratados com gangliosídeos e salina, sacrificados com 8, 12, 16, 20 e 28 semanas de vida e animais diabéticos. A expressão gênica de IFN γ nos animais tratados com gangliosídeos manteve-se constante por todo período experimental avaliado. Na 28ª semana, não houve expressão de IFN γ . Nos animais do grupo salina, a expressão estava elevada na 16ª semana, seguido por acentuado declínio após a 20ª semana de vida. Os animais diabéticos não expressaram IFN γ . Os resultados estão expressos com média e desvio padrão (* $p < 0,05$ – Kruskal-Wallis e Mann-Whitney)

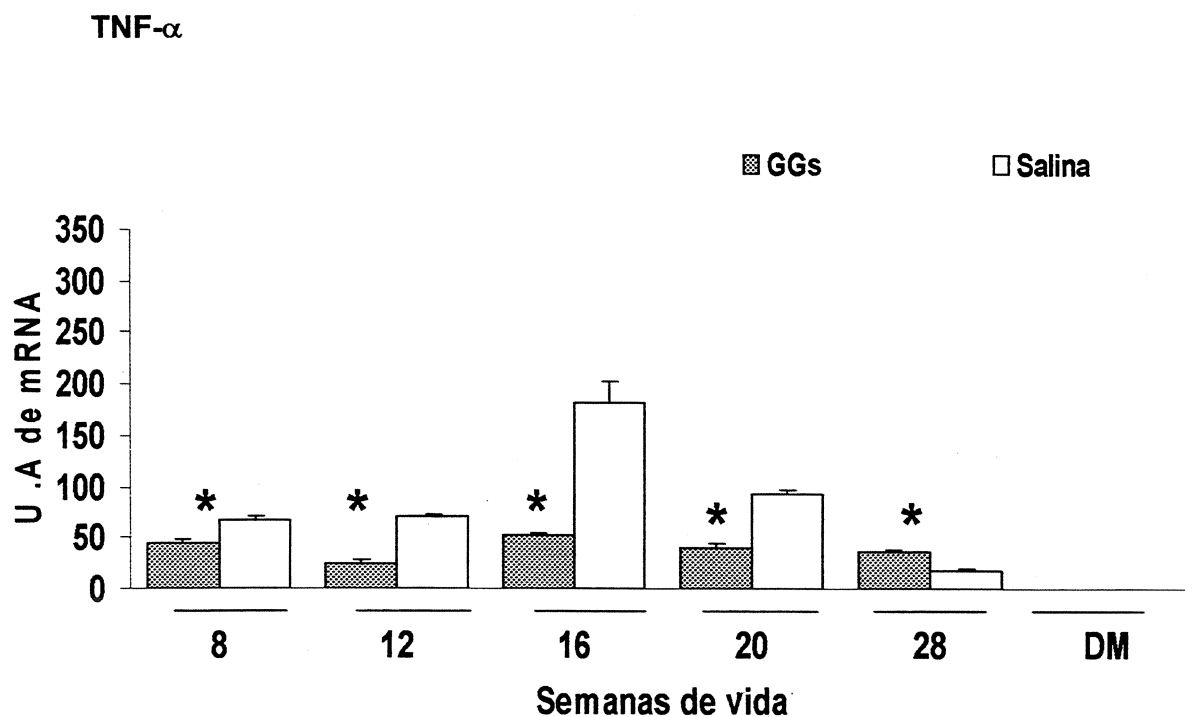


Figura 9. Detecção de mRNA de TNF- α em ilhotas pancreáticas isoladas de animais tratados com gangliosídeos e salina nos tempos de 8, 12, 16, 20 e 28 semanas e animais diabéticos. A expressão de níveis de TNF- α nos animais tratados com gangliosídeos permaneceu constante em todos os tempos estudados, mostrando inferior ao grupo salina exceto, na 28^a. Ao contrário, nos animais do grupo salina, a expressão estava elevada na 16^a semana, mantendo-se constante na 8^a, 12^a e 16^a semanas, porém, apresentando-se baixo na 28^a. Os animais diabéticos não expressaram TNF- α . Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (* $p < 0,05$ – Kruskal-Wallis e Mann-Whitney)

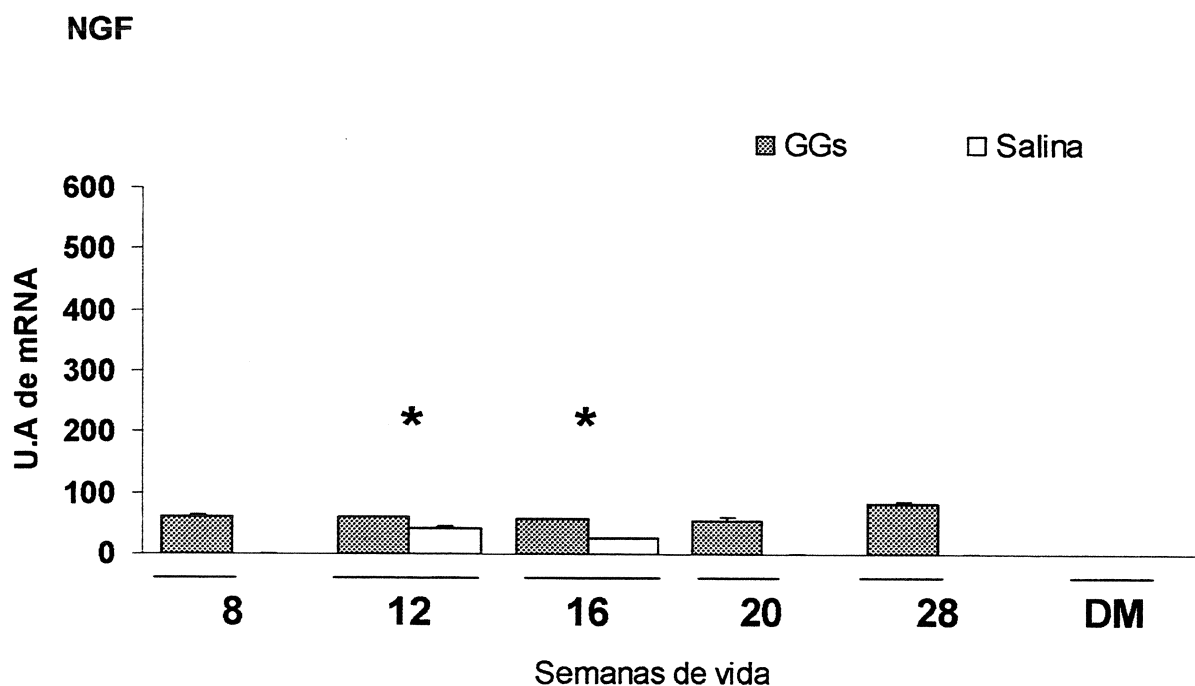


Figura 10. Detecção de mRNA de NGF em ilhotas pancreáticas isoladas de animais tratados com gangliosídeos e salina nos tempos de 8,12,16,20 e 28 semanas e animais diabéticos. A expressão de níveis de NGF nos animais tratados com gangliosídeos permaneceu constante em todos os tempos estudados. Os animais que receberam salina não expressaram NGF na 8ª, 20ª semana, apresentando baixa expressão na 12. e 16ª semana., porem com níveis sempre abaixo aos animais que receberam gangliosídeos Os animais diabéticos não expressaram NGF. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão(* $p < 0,05$ - Kruskal-Wallis e Mann-Whitney)

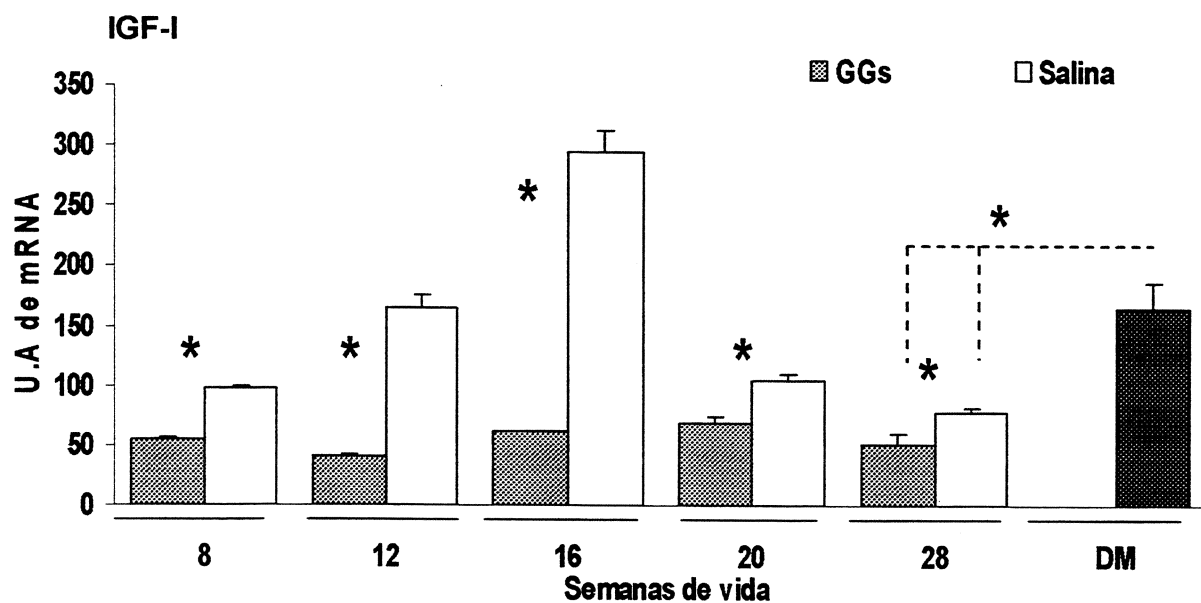


Figura 11. Detecção de mRNA de IGF-I em ilhotas pancreáticas isoladas de animais tratados com gangliosídeos e salina nos tempos de 8,12,16,20 e 28 semanas e animais diabéticos. A expressão de níveis de IGF-I nos animais tratados com gangliosídeos permaneceu constante em todos os tempos estudados. Ao contrario, os animais salina a expressão foi progressiva tendo expressão mais elevada na 16^a. semana Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão(* $p < 0,05$ - Kruskal-Wallis e Mann-Whitney)

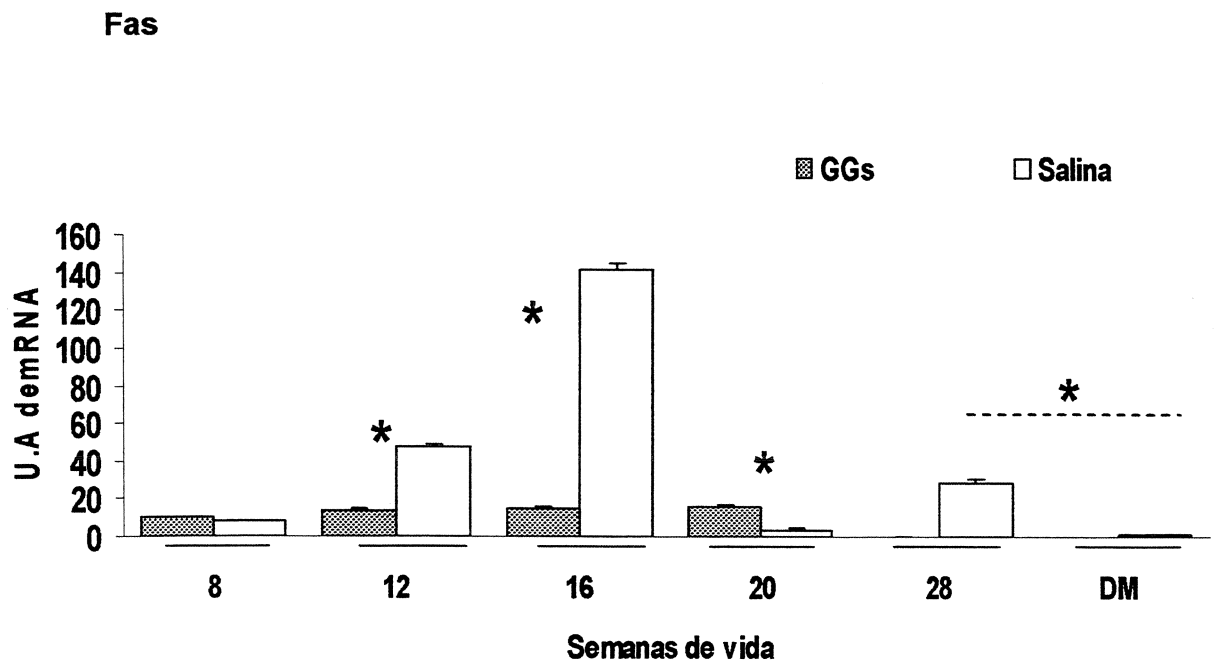


Figura 12 Componente apoptótico detectado em ilhotas pancreáticas isoladas através da expressão de mRNA de Fas em animais tratados com gangliosídeos e salina nos tempos de 8,12,16,20 e 28 semanas e animais diabéticos. Nos animais tratados com gangliosídeos a expressão de Fas foi constante até a 20^a. semana porem ausente na 28^a..Nos animais que receberam salina o aumento da expressão foi progressivo com elevada expressão na 16^a. semana.Os resultados estão expressos com média e desvio padrão (* $p < 0,05$ - Kruskal-Wallis e Mann-Whitney)

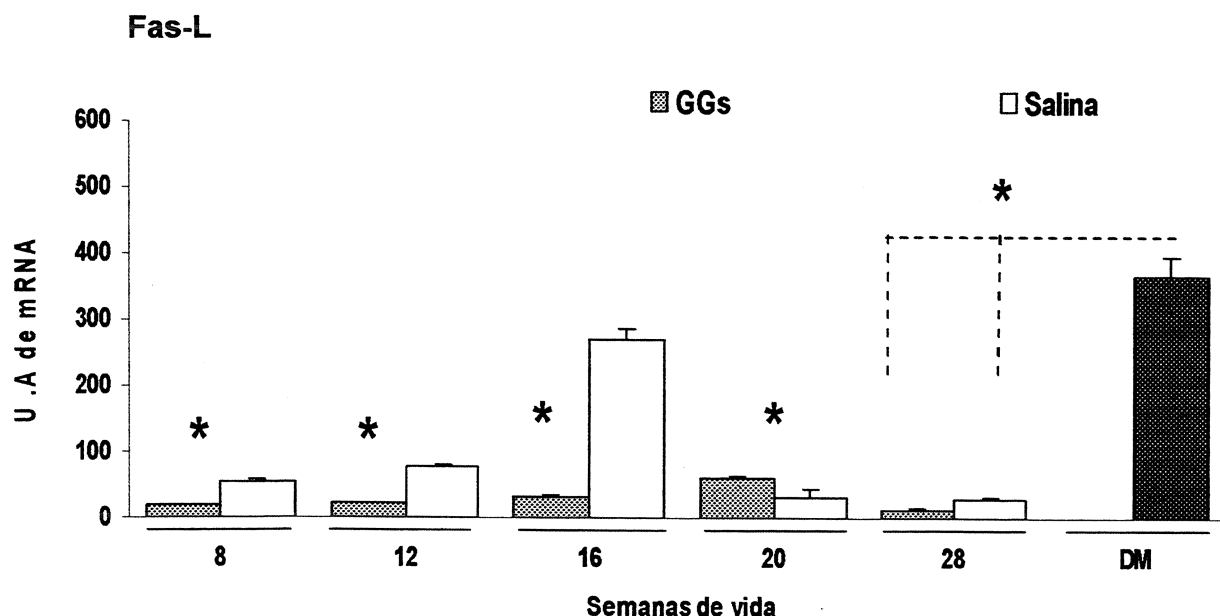


Figura13 Componente apoptótico detectados em ilhotas pancreáticas isoladas de animais tratados com gangliosídeos e salina nos tempos de 8, 12, 16, 20 e 28 semanas e animais diabéticos. A análise de mRNA de Fas-L- revelou-se constante até a 16ª. semana, apresentando ligeira elevação na 20ª. semana. Nos animais salina o aumento da expressão foi progressivo apresentando expressão máxima na 16ª. semana. Nos animais diabéticos, a expressão foi elevada comparando com os grupos estudados. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (* $p < 0,05$ - Kruskal-Wallis e Mann-Whitney)

Bcl-w

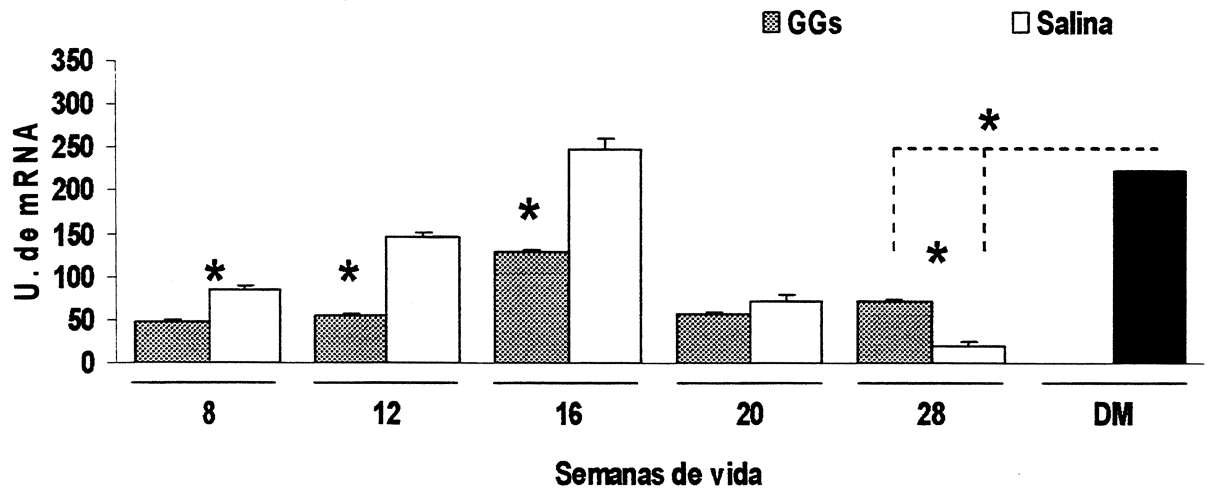


Figura14. Componente apoptótico detectados em ilhotas pancreáticas isoladas de animais tratados com gangliosídeos e salina nos tempos de 8, 12, 16, 20 e 28 semanas e animais diabéticos. A análise de mRNA de Bcl-w- nos animais tratados com gangliosídeos mostra expressão constante na 8ª. e 12ª. semana com ligeiro elevação na 20ª. semana retomando a níveis baixos na 28ª.. Nos animais salina o aumento da expressão foi progressivo apresentando máxima expressão na 16ª. semana. Nos animais diabéticos a expressão foi semelhante aos animais salina da 16ª. semana. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (* $p < 0,05$ - Kruskal-Wallis e Mann-Whitney)

4.4.2. Células Esplênicas:

A expressão de IL-1 β , IL-12, IFN- γ , TNF- α , NGF e IGF-I e componentes apoptóticos Fas e Fas-L e pró apoptóticos Bcl-w foram observados em diferentes níveis de expressão em células esplênicas isoladas dos animais tratados com gangliosídeos e salina a partir da 4ª. Semana nos tempos de 8, 12, 16, 20 e 28, e salina diabético. (Tabelas 4 p.89, Figuras 15-23 p.90-98)

	U.A.				
	8 sem	12 sem	16 sem	20 sem	28 sem
IL-1 β					
Gangliosídeos	2,28 ($\pm 0,5$)	2,73 ($\pm 0,6$)	2,03 ($\pm 0,6$)	1,90 ($\pm 0,5$)	1,43 ($\pm 0,7$)
Salina	12,24 ($\pm 1,1$)	8,50 ($\pm 1,7$)	86,2 (± 6)	95,40 ($\pm 2,7$)	1,59 ($\pm 0,7$)
Diabéticos					*25,32 ($\pm 2,69$)
IL-12					
Gangliosídeos	61,32 ($\pm 2,6$)	112,25 ($\pm 9,7$)	74,29 ($\pm 3,2$)	118,45 ($\pm 6,2$)	83,03 ($\pm 3,36$)
Salina	120,39 ($\pm 12,8$)	254,44 ($\pm 27,8$)	109,21 ($\pm 13,2$)	105,56 ($\pm 2,6$)	84,38 ($\pm 1,1$)
Diabéticos					138,31 ($\pm 6,8$)
IFN-γ					
Gangliosídeos	77,93 ($\pm 10,5$)	82,97 ($\pm 2,5$)	91,39 ($\pm 3,76$)	84,52 ($\pm 5,1$)	69,58 ($\pm 7,1$)
Salina	44,752 ($\pm 1,3$)	85,56 ($\pm 5,6$)	18,24 ($\pm 1,5$)	62,49 ($\pm 2,1$)	27,42 ($\pm 3,1$)
Diabéticos					15,650 ($\pm 1,4$)
TNF-α					
Gangliosídeos	76,75 ($\pm 9,20$)	82,42 ($\pm 1,56$)	93,35 ($\pm 1,45$)	84,76 ($\pm 2,73$)	68,92 ($\pm 7,2$)
Salina	38,49 ($\pm 6,53$)	212,52 ($\pm 23,47$)	208,59 ($\pm 14,82$)	103,36 ($\pm 3,72$)	90,67 ($\pm 3,4$)
Diabéticos					185,43 ($\pm 11,8$)
NFG					
Gangliosídeos	30,38 ($\pm 3,1$)	38,25 ($\pm 2,6$)	23,67 ($\pm 1,1$)	41,19 ($\pm 3,6$)	49,32 ($\pm 3,3$)
Salina	61,56 ($\pm 4,0$)	158,84 ($\pm 32,1$)	149,35 ($\pm 29,6$)	21,01 ($\pm 1,6$)	126,57 ($\pm 11,6$)
Diabéticos					130,5 ($\pm 12,1$)
IGF-I					
Gangliosídeos	49,19 ($\pm 2,0$)	75,41 ($\pm 4,1$)	50,63 ($\pm 1,8$)	96,41 ($\pm 15,6$)	110,14 ($\pm 4,1$)
Salina	32,76 ($\pm 2,7$)	263,57 ($\pm 21,11$)	109,64 ($\pm 11,1$)	0 ($\pm$)	51,95 ($\pm 5,0$)
Diabéticos					66,04 ($\pm 7,6$)
Fas					
Gangliosídeos	Não identificado	Não identificado	Não identificado	Não identificado	Não identifica
Salina	31,78 ($\pm 5,5$)	50,2 ($\pm 2,3$)	35,6 ($\pm 3,8$)	48,72 ($\pm 1,5$)	85 ($\pm 5,2$)
Diabéticos					43 ($\pm 4,4$)
Fas-L					
Gangliosídeos	30,38 (± 309)	38,25 ($\pm 2,56$)	23,67 ($\pm 1,09$)	41,19 ($\pm 3,64$)	49,32 ($\pm 3,3$)
Salina	61,56 ($\pm 3,95$)	158,84 ($\pm 32,06$)	149,35 ($\pm 29,59$)	21,01 ($\pm 1,58$)	126,57 ($\pm 11,6$)
Diabéticos					130,5 ($\pm 12,0$)
Bcl-w					
Gangliosídeos	30,38 ($\pm 3,1$)	38,25 ($\pm 2,6$)	23,67 ($\pm 1,1$)	41,19 ($\pm 3,6$)	49,32 ($\pm 3,2$)
Salina	61,56 ($\pm 4,0$)	158,84 ($\pm 32,1$)	149,35 ($\pm 29,6$)	21,01 ($\pm 1,6$)	126,57 ($\pm 11,6$)
Diabéticos					30,5 ($\pm 12,0$)

Tabela 4 – Dados da expressão de mRNA de células esplênicas entre os animais tratados com gangliosídeos, salina e diabéticos representados por meio de média e desvio padrão. (* $p < 0,05$ – Kruskal-Wallis e Mann-Whitney)

IL-1 β

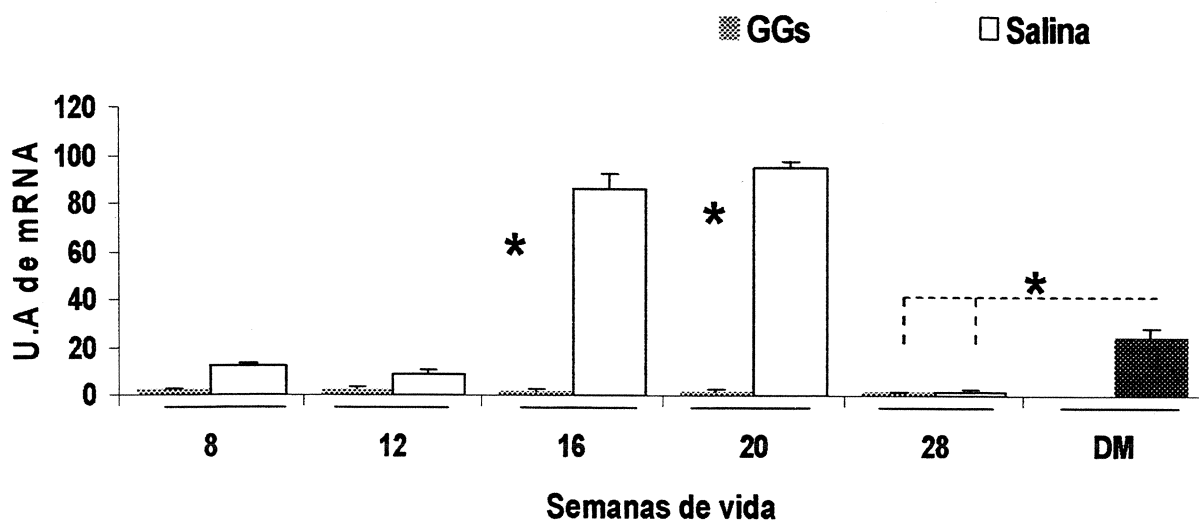


Figura15. Expressão gênica de IL-1- β em células esplênicas de animais tratados com gangliosídeos e salina nos tempos de 8, 12, 16, 20 e 28 semanas e animais diabéticos. A expressão de IL-1- β no grupo gangliosídeos foi baixa, manteve-se constante em todos os tempos estudados. Ao contrário, no grupo salina os níveis de expressão gênica estavam menores na 8^a, 12^a e 28^a porém elevadas na 16^a e 20^a semana. No grupo diabético os níveis de expressão de IL-1- β foram inferiores aos níveis apresentados pelo grupo salina. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (*p < 0,05 - Kruskal-Wallis e Mann-Whitney)

IL-12

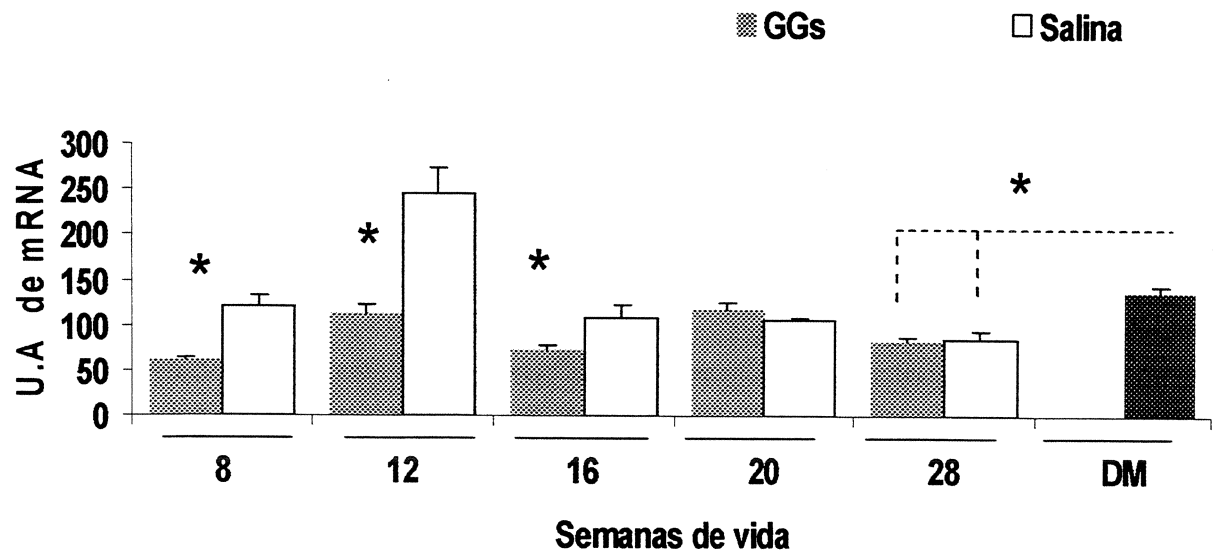


Figura 16 Detecção de citocinas em células esplênicas de animais tratados com gangliosídeos e salina nos tempos de 8, 12, 16, 20 e 28 semanas e animais diabéticos. A expressão de níveis de IL-12 no animais que receberam gangliosídeos apresentaram níveis mais elevado na 12^a e 20^a semanas. Nos animais salina a expressão estava mais elevada na 12^a, voltando aos níveis da 8^a semana na 16^a e 20^a, e 28^a. Nos animais diabéticos a expressão foi maior nos tempos estudados. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (* $p < 0,05$ - Kruskal-Wallis e Mann-Whitney)

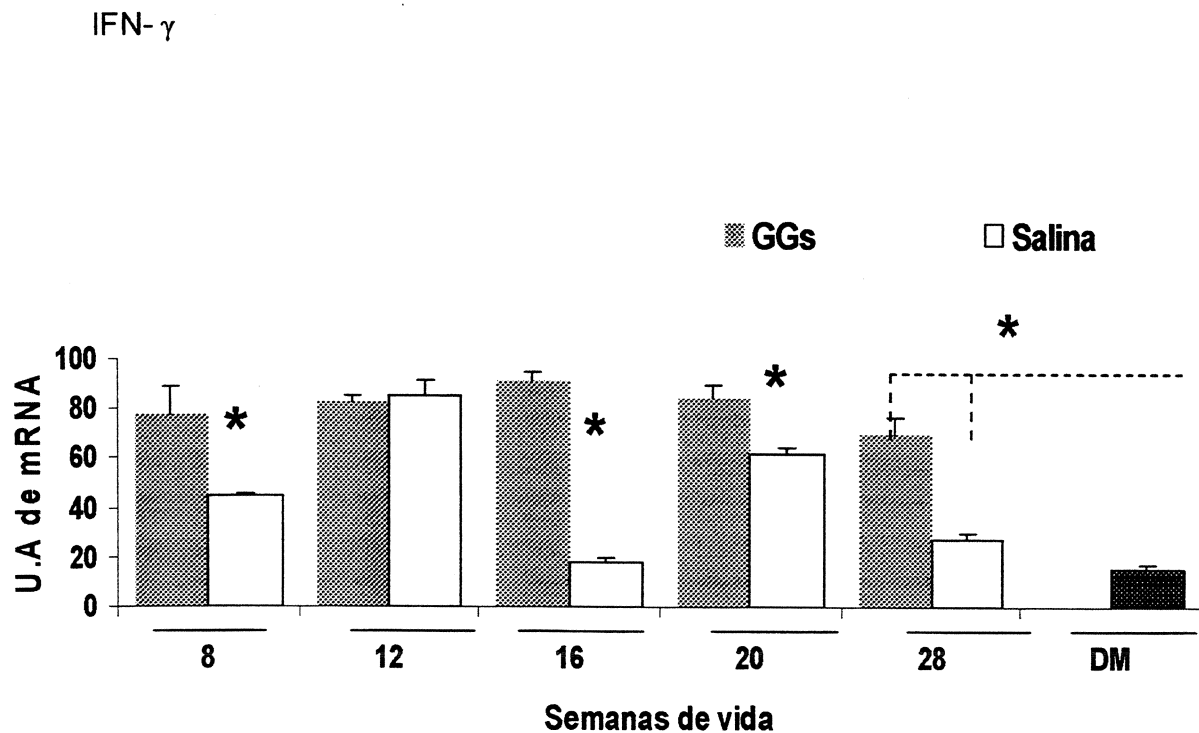


Figura 17. Detecção de mRNA de IFN- γ em células esplênicas de animais tratados com gangliosídeos e salina nos tempos de 8,12,16,20 e 28 semanas e animais diabéticos. A expressão de níveis de IFN- γ nos animais tratados com gangliosídeos manteve-se constante nos tempos estudados de 8, 12,16 e 20^asemanas na 28^a. Havendo uma ligeira queda na expressão na 28^a. Ao contrario, nos animais salina a expressão estava elevada na 12^a., baixa na 20^a. e 28^a. semana. Os animais diabéticos não expressaram IFN- γ . Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (* $p < 0,05$ - Kruskal-Wallis e Mann-Whitney)

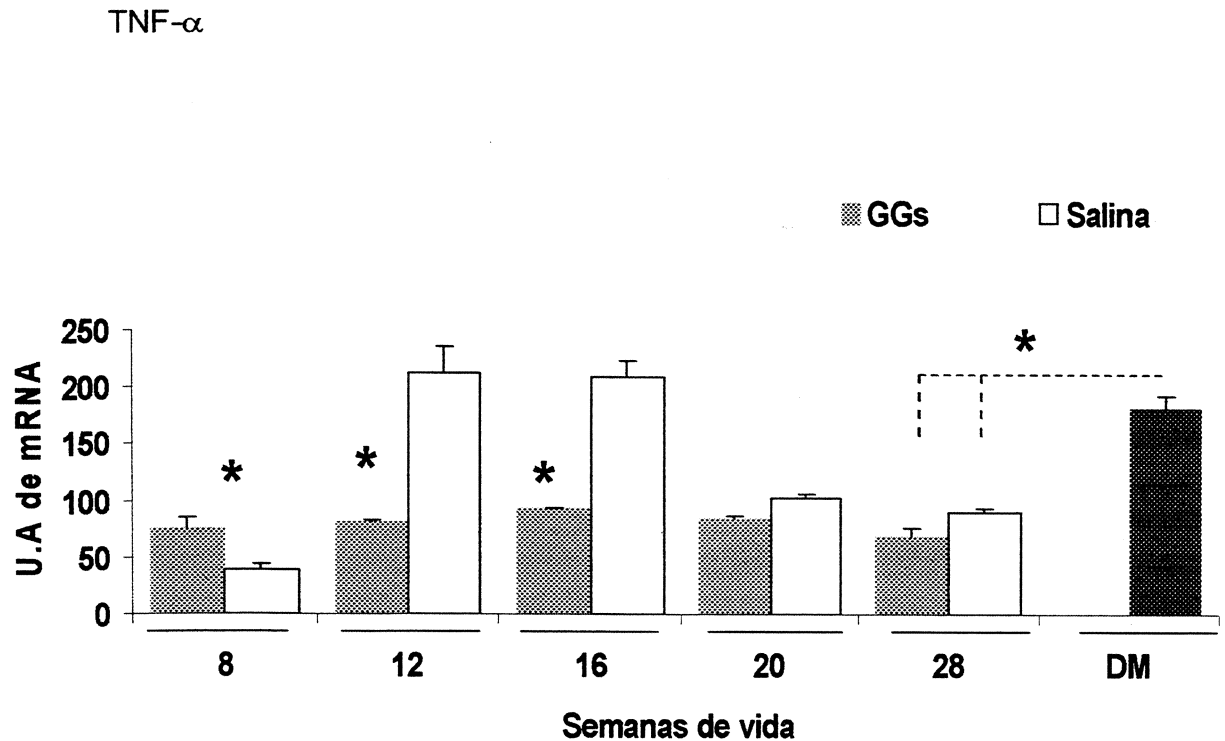


Figura 18. Expressão gênica de TNF- α em células esplênicas de animais tratados com gangliosídeos e salina nos tempos de 8, 12, 16, 20 e 28 semanas e animais diabéticos. A expressão de níveis TNF- α nos animais tratados com gangliosídeos manteve-se constante em todos os tempos estudados havendo uma ligeira queda na expressão na 28^a...Ao contrario,nos animais salina a expressão foi pequena na 8^a. , apresentando elevados na 12^a. e 16^a. e níveis iguais na 8^a. e 20^a. semana No grupo diabético os nível de expressão de TNF- α foi semelhante ao grupo salina na 12^a. e 16^a.. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (*p<0,05 - Kruskal-Wallis e Mann-Whitney)

Fas

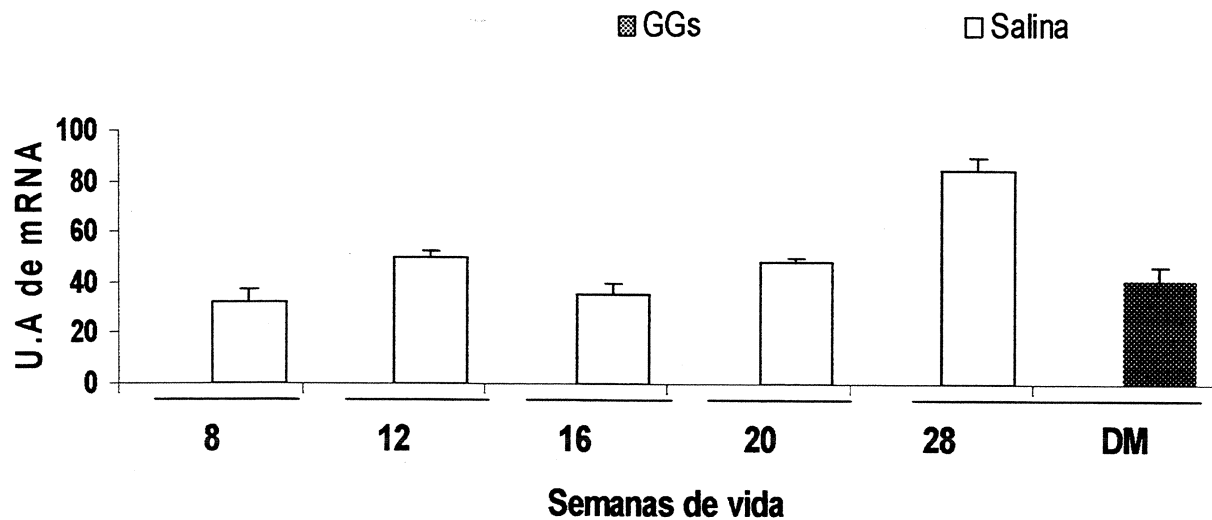


Figura 19. Componente apoptótico detectado em células esplênicas de animais tratados com gangliosídeos e salina nos tempos de 8, 12, 16, 20 e 28 semanas e animais diabéticos. A análise de mRNA de Fas mostra ausência de expressão nos animais tratados com gangliosídeos..Nos animais salina o aumento da expressão foi progressivo com o decorrer do estudo apresentando expressão elevada na 28^a.. Nos animais diabéticos a expressão foi significativa quando comparado com grupo salina Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (* $p < 0,05$ - Kruskal-Wallis e Mann-Whitney)

Fas-L

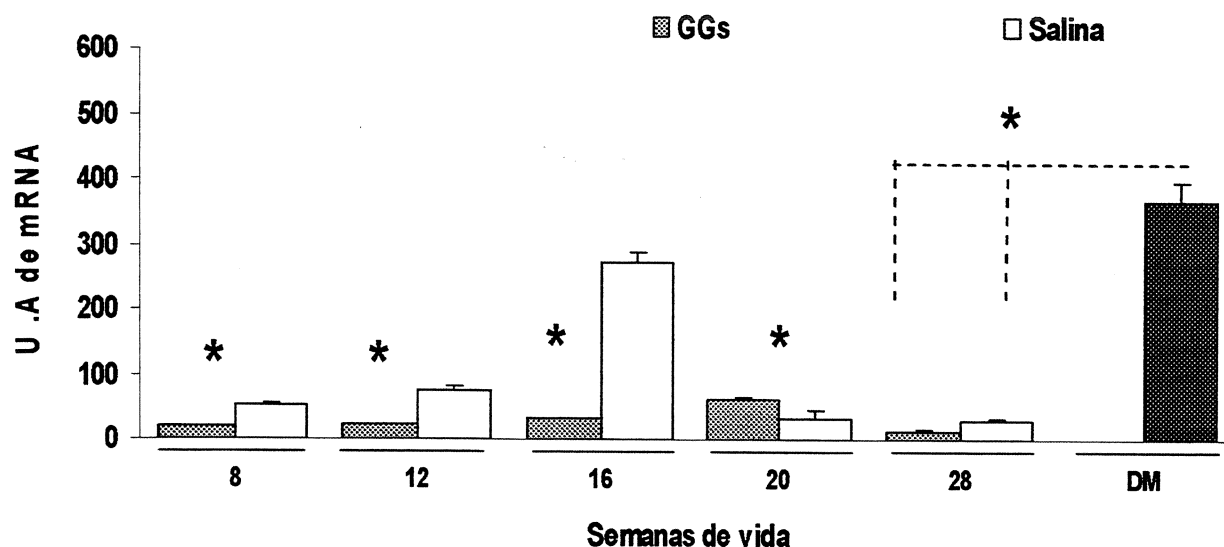


Figura 20. Componente apoptótico detectado em células esplênicas de animais tratados com gangliosídeos e salina nos tempos de 8, 12, 16, 20 e 28 semanas e animais diabéticos. A análise de mRNA de Fas-L nos grupos tratados com gangliosídeos permaneceu constante nos tempos estudados. No grupo salina o aumento da expressão foi progressiva da 8^a. para a 12^a. semana, baixa na 16^a., ausente na 20^a. e recuperação na 28^a.. No grupo diabéticos a expressão foi igual ao grupo salina 28 semanas, porém com diferença significativa quando comparados com grupos gangliosídeos. Na análise entre grupos nos tempos estudados encontramos diferenças significativas nos tempos 12, 16 e 28 semanas. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (* $p < 0,05$ - Kruskal-Wallis e Mann-Whitney)

Bcl-w

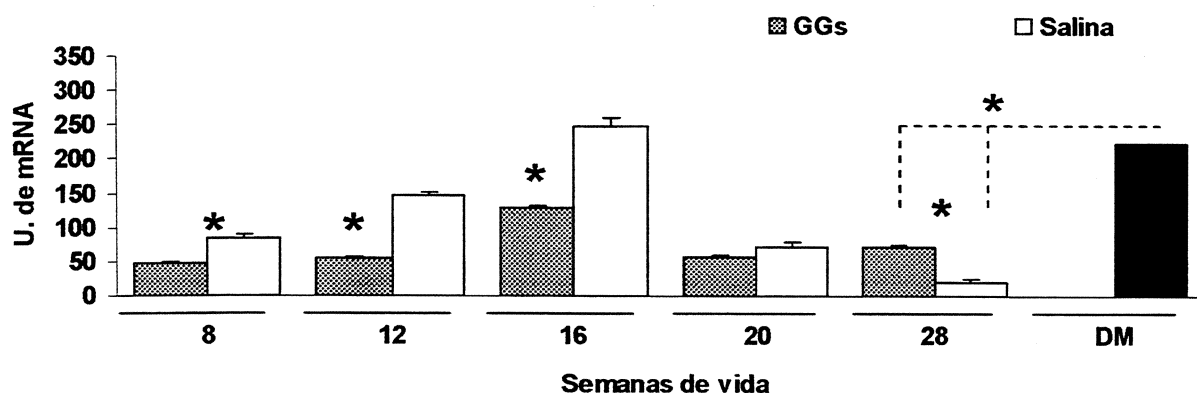


Figura 21 Componente pró-apoptótico detectado em células esplênicas de animais tratados com gangliosídeos e salina nos tempos de 8,12,16,20 e 28 semanas e animais diabéticos. A análise de mRNA de Bcl-w nos animais tratados com gangliosídeos apresentou um ligeiro aumento da 8^a. para 12^a., diminuição na 16^a., aumento na 20^a. e níveis baixos 28^a. semana..Nos animais salina a expressão foi progressiva da 8^a. para a 12^a. semana, com diminuição na 20 e 28^a..Nos animais diabéticos a expressão foi igual aos grupo gangliosídeo na 28 semanas ,porem com diferença significativa quando comparados com grupo salina. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (*p<0,05 - Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

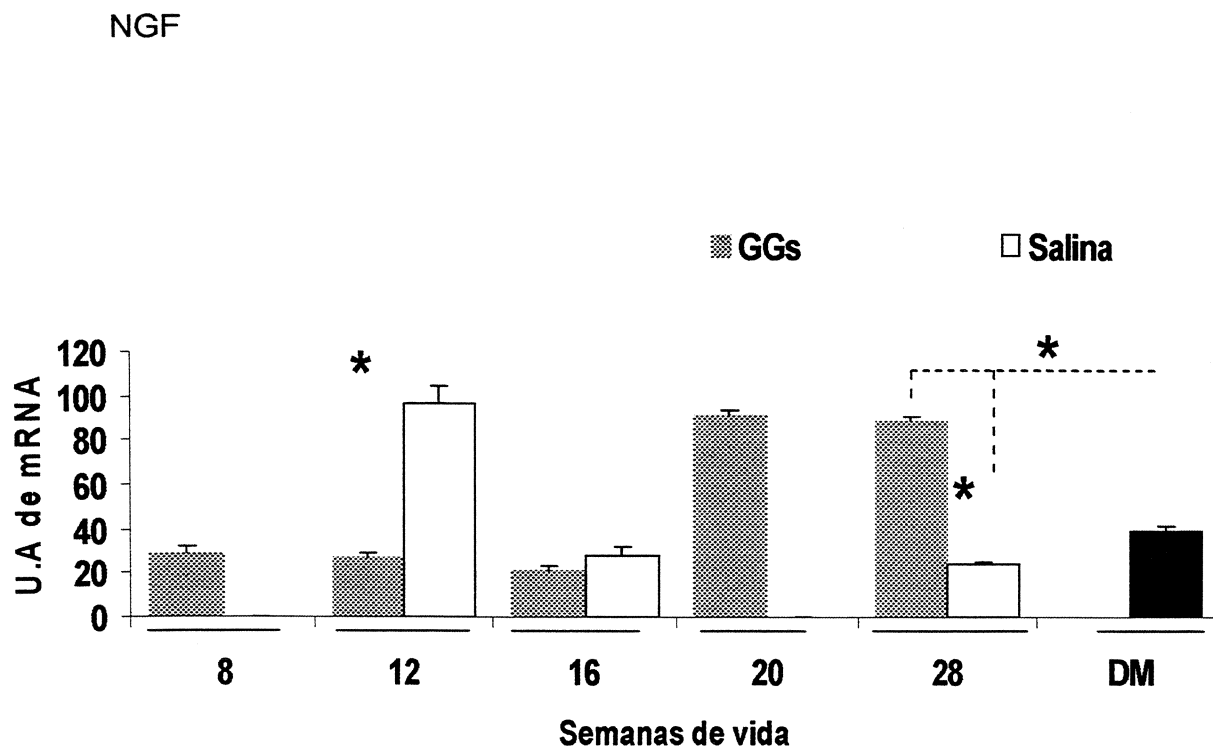


Figura -22. Expressão gênica de NGF em células esplênicas de animais tratados com gangliosídeos e salina nos tempos de 8, 12, 16, 20 e 28 semanas e animais diabéticos. A expressão de NGF nos animais tratados com gangliosídeos foi baixa e manteve-se constante nos tempos de 8, 12, 16 semanas. Atingindo níveis elevados de expressão na 20^{a.} e 28^{a.} semana. Ao contrário, nos animais salina não houve expressão na 8^{a.} e 20^{a.} porém com elevada expressão na 12^{a.} semana. No grupo diabético a expressão de NGF foi baixa tanto no grupo gangliosídeo como salina. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (* $p < 0,05$ - Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

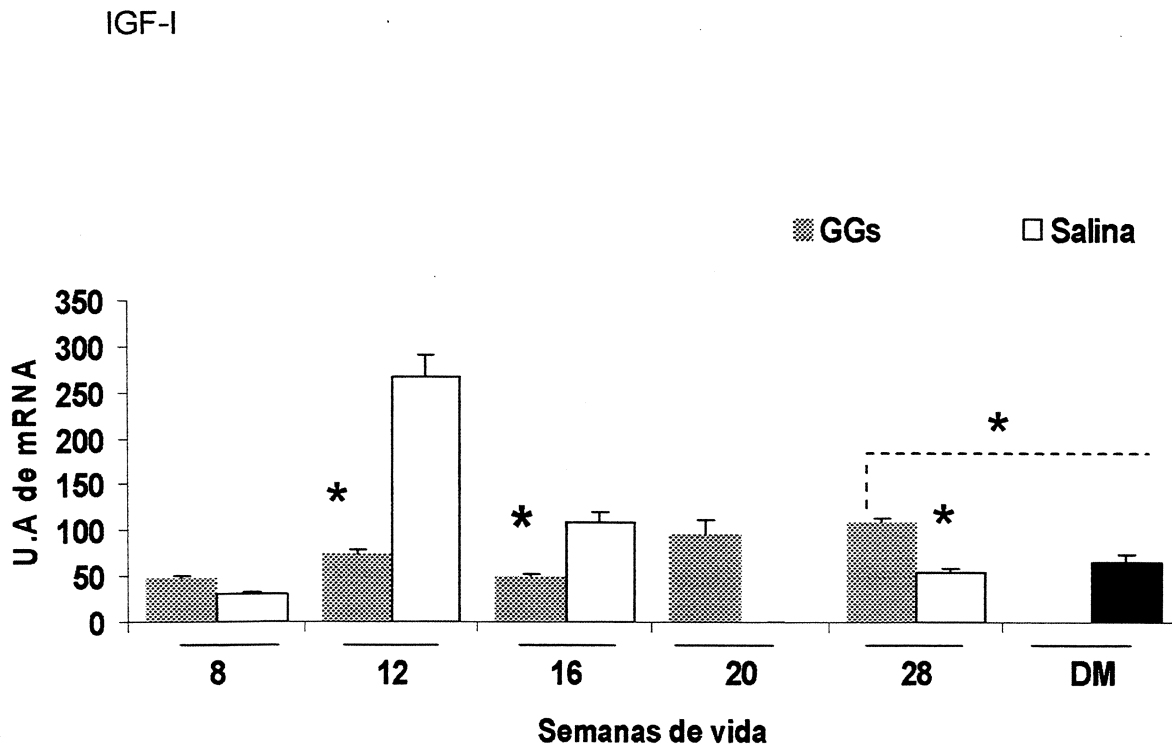


Figura -23. Expressão gênica de IGF-I em células esplênicas de animais tratados com gangliosídeos e salina nos tempos de 8,12,16,20 e 28 semanas e animais diabéticos. A expressão de IGF-I no grupo gangliosídeos foi baixa e manteve-se constante nos tempos de 8,12, 16 semanas..com expressão elevada na 20^a. e 28^a. semana No, grupo salina a expressão mais elevado foi na 12^a.. O grupo diabético teve baixa expressão. de IGF-I Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (*p<0,05 - Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

4.5 Efeitos da administração de gangliosídeos sobre a expressão Séricas de Citocinas - ELISA

As citocinas *TGFβ*, *IL-4*, *IL-12*, *IFN-γ*, *TNF-α*, foram dosadas nos soro de animais tratados com gangliosídeos e salina da 4^a. a 8^a, 4^a.a 16^a., 4^a. a 28^a. semana, e diabéticos. (Tabela 5 p.98 Figuras 24-28 p 99-103)

%	8 sem	16 sem	28 sem
TGF-β			
Gangliosídeos	68,02(±42,5)	423,07(±10,4)	753,3(±42,5)
Salina	34,01(±8,0)	59,52(±5,2)	59,52(±7,4)
Diabéticos			63,77(±1,29)
IL-4			
Gangliosídeos	104,9(±0,55)	201,5(±3,43)	476,4(±3,12)
Salina	81,3(±1,58)	54,1(±1,46)	93,1(±1,56)
Diabéticos			90,5(±1,29)
IL-12			
Gangliosídeos	115,8(±3,37)	410,6(±14,35)	221,7(±10,13)
Salina	69,16(±3,37)	118,3(±10,97)	96,15(±4,22)
Diabéticos			106,1(±8,44)
TNF-α			
Gangliosídeos	3,54(±0,88)	1,77(±0,44)	5,8(±0,35)
Salina	1,77(±0,44)	2,65(±0,55)	2,65(±0,35)
Diabéticos			1,77(±0,26)
IFN-γ			
Gangliosídeos	925,4(±21,58)	1241,15(±7,76)	958,08(±15,53)
Salina	697,4(±6,04)	846,3(±0,86)	830,7(±9,49)
Diabéticos			995,1(±11,22)

Tabela 5 Dados de concentração sérica de citocinas entre os animais tratados com gangliosídeos, salina e diabéticos.

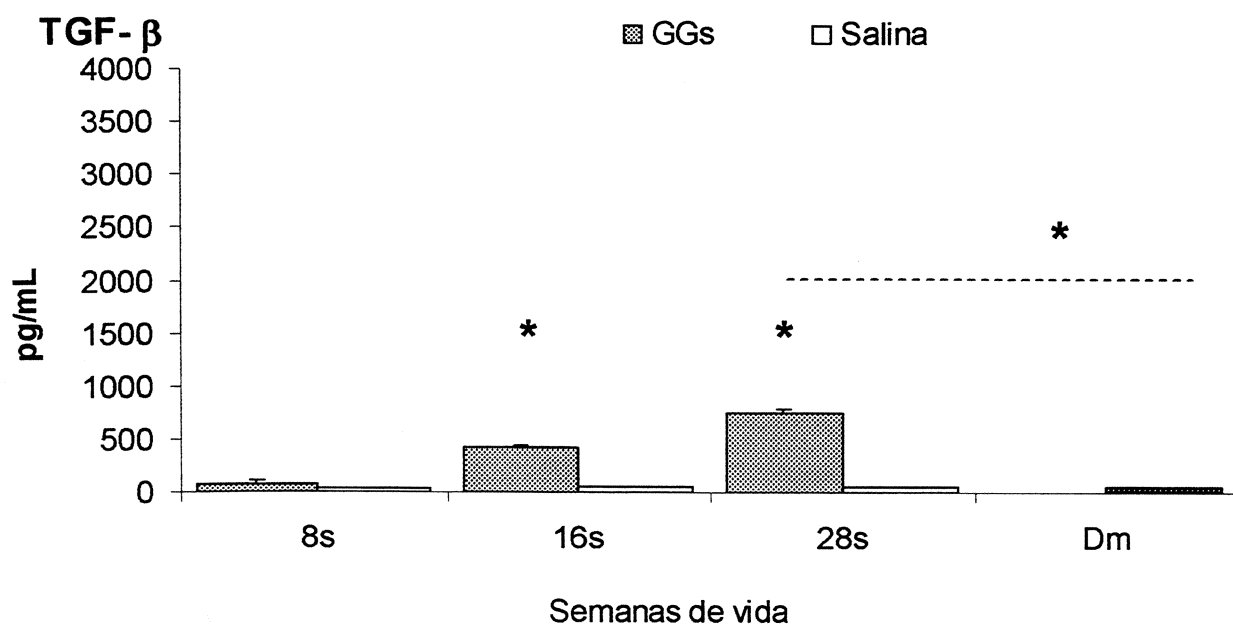


Figura 24 Dosagem sérica de TGF- β pelo método enzimático (ELISA) nos grupo gangliosídeos, salina 8,16 e 28 semanas e diabéticos. Na análise de TGF- β os animais que receberam gangliosídeos apresentaram aumento progressivo nos tempos estudados. No animais que receberam salina os valores permaneceram constantes. Nos animais diabéticos TGF- β comportou-se semelhante ao grupo salina. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (* $p < 0,05$ - Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

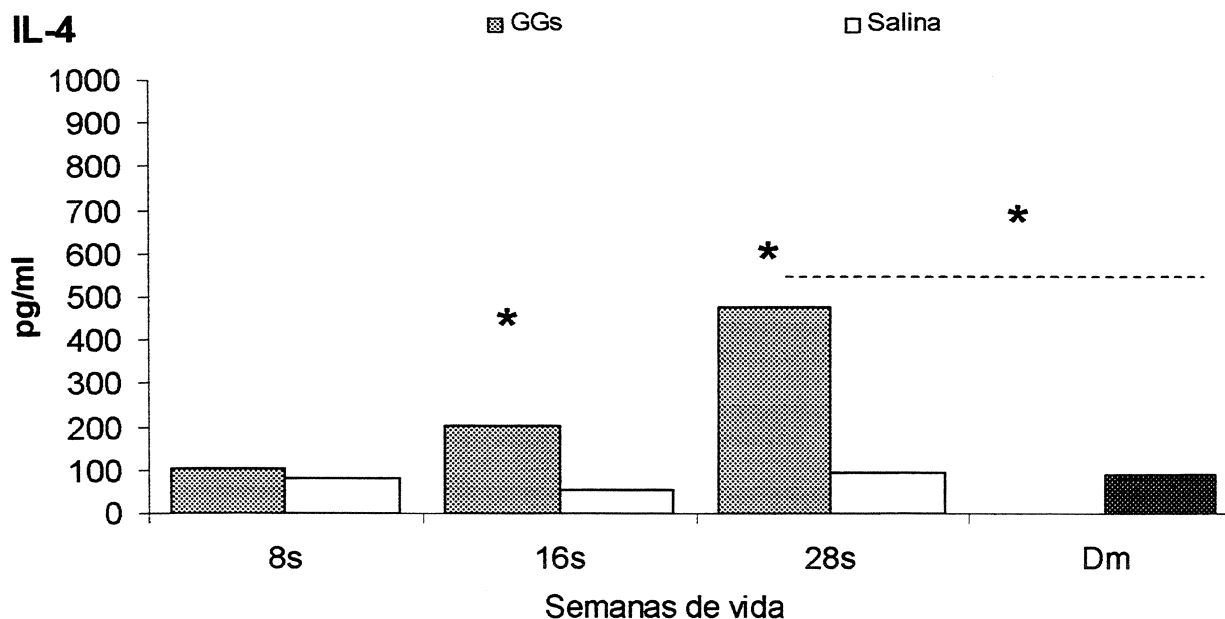


Figura 25 Dosagem sérica de IL-4 pelo método enzimático (ELISA) nos animais tratados com gangliosídeos e salina nos tempos de 8,16 e 28 semanas e diabéticos. A porcentagem de produção máxima de IL-4 foi observada nos animais tratados com gangliosídeos na 28^a semana. Nos animais que receberam salina os valores permaneceram constantes. Nos animais diabéticos a IL-4 comportou-se semelhante ao grupo salina. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (* $p < 0,05$ - Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

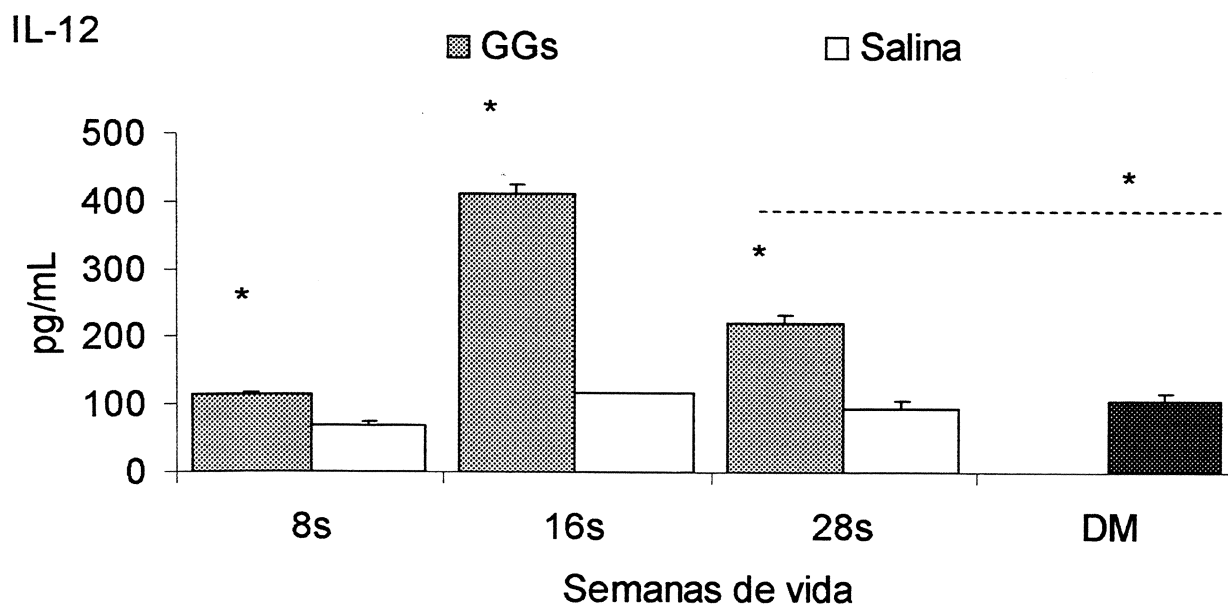


Figura o 26 Dosagem sérica de IL-12 pelo método enzimático (ELISA) nos animais tratados com gangliosídeos e salina nos tempos de 8,16 e 28 semanas e diabéticos. A análise de IL-12 nos animais tratados com gangliosídeos apresentaram aumento progressivo nos tempos de 8 e 16 semanas e ligeira queda na 28^a.. No animais que receberam salina os valores permaneceram constantes.. Nos animais diabéticos a IL-12 comportou-se semelhante ao grupo salina. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (* $p < 0,05$ - Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

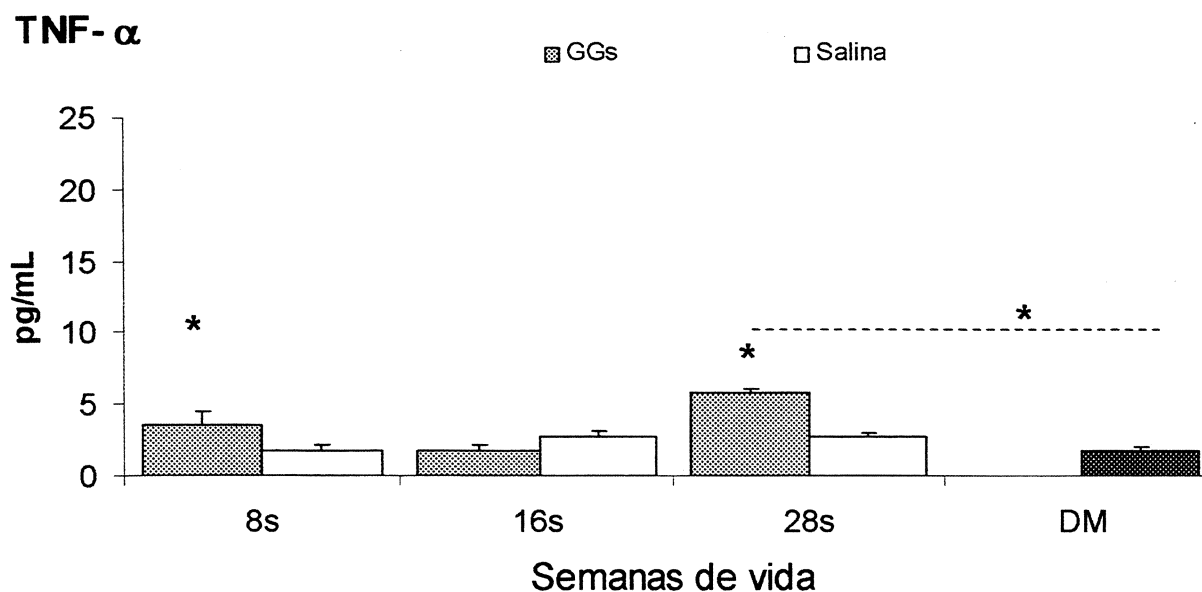


Figura 27 Dosagem sérica de TNF- α pelo método enzimático (ELISA) nos animais tratados com gangliosídeos e salina nos tempos de 8,16 e 28 semanas e diabéticos. Nos animais que receberam gangliosídeos a % máxima de produção de TNF- α foi elevada na 8ª. semana. Nos animais salina os valores permaneceram constantes. Nos animais diabéticos o TNF- α mostrou baixa concentração. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (* $p < 0,05$ - Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

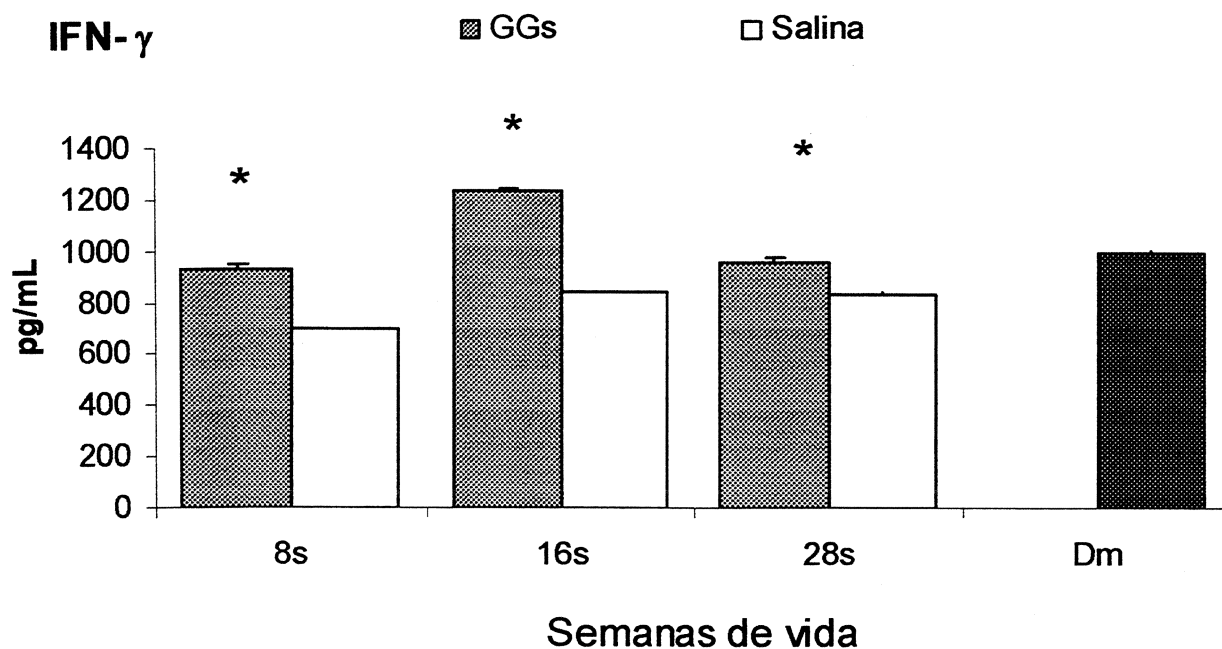


Figura 28 Dosagem sérica de IFN - γ pelo método enzimático (ELISA) nos animais tratados com gangliosídeos e salina nos tempos de 8,16 e 28 semanas e diabéticos. Quando analisamos IFN - γ por tempo de tratamento, o animais que receberam gangliosídeos apresentaram elevada concentração na 16^a.semana ..Nos animais que receberam salina os valores permaneceram constantes. Nos animais diabéticos o IFN - γ não mostrou diferença estatística quando comparado ao grupo salina. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (* $p < 0,05$ - Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

4.6. Ativação da Via Jak-Stat

Para determinar se a administração de gangliosídeos in vivo exerce efeitos nas proteínas Jak-Stat(Figura-1 p.114), os fatores envolvidos no sinal de transdução de citocina,e suas ativações foram determinadas por ensaio de fosforilação em células esplênicas de animais injetados com gangliosídeos. Os resultados sugerem que os efeitos de gangliosídeos foram específicos para TyK2 e o melhor tempo de ativação ficou em 3 minutos. (Figura 30 gráficos A,B e C p.105)

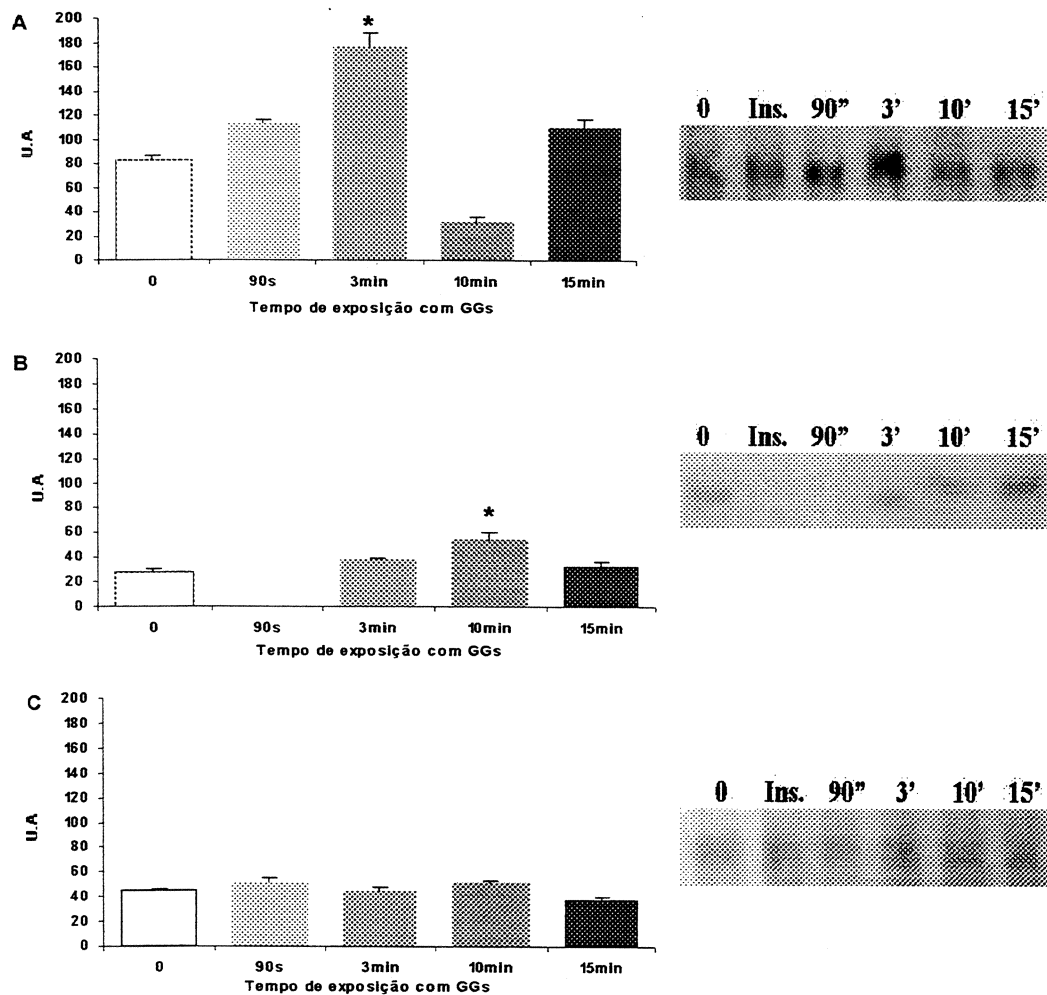


Figura 30-Gráficos A.B e C -Efeito do gangliosídeos na ativação de Tyk2(A), Jak2(B) e Stat3(C) no baço de camundongos NOD. Homogeneizado de baço obtido de fêmeas não diabéticas na 8ª de vida submetido à eletroforese em SDS-Page. Imunoprecipitado e “immunoblotting” realizado com anticorpo anti-fosfotirosina. Autoradiografia de 6 experimentos foram digitalizados. A intensidade das bandas foram expressas em unidades arbitrárias (UA), o gráfico representa médias $\pm$ desvio padrão. (* $p < 0,05$ – Kruskal-Wallis)

5. DISCUSSÃO

A natureza autoimune do processo de lesão do pâncreas endócrino no DM-1 tem estimulado a pesquisa dos possíveis fatores desencadeantes da doença. Grande parte do conhecimento da fisiopatologia está fundamentada em estudos realizados com camundongos da linhagem NOD, no qual ocorre a ativação de linfócitos auto-reativos indutores da destruição das células β pancreáticas. Este modelo tem fornecido subsídios importantes no entendimento de mecanismos imune reguladores e para o desenvolvimento de novas terapias (ADORINI et al., 2002; BACH, 1994)

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 ou evolução da doença. Assim, o estudo de substâncias com propriedades imunomodulatórias tem atraído o interesse de vários grupos de pesquisa (BACH, 2002) e entre estas substâncias, destacamos os gangliosídeos (PAPACCIO et al., 1993; WILBERZ et al., 1988), foco de estudo do presente trabalho.

Nossos resultados mostram que a administração da mistura de gangliosídeos: (G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} , G_{T1b}) na dose diária de 150 mg/Kg impede a manifestação do diabetes mellitus espontâneo em 100% dos animais tratados ,contrastando com os animais que receberam solução salina, cujo a incidência foi de 71,4%.

PAPACCIO et al. (1993), verificaram que a administração da mistura de gangliosídeos em camundongos NOD fêmeas da 5ª a 21ª semana de vida controlava a hiperglicemia, retardando a instalação do diabetes clínico. Neste trabalho, os autores não encontram diferença significativa no aparecimento e progressão da insulite entre os animais tratados e controles.

Nossos resultados estão coerentes com àqueles encontrados por Papaccio até a 20ª semana de vida. Contudo, estendendo o tratamento até as 28 semanas de vida, diferentemente destes autores, pudemos observar número de ilhotas residuais superiores aos não tratados, sugerindo alguma proteção ou fatores que contribuem para a regeneração das ilhotas pancreáticas. Este fato está sendo estudado por nosso grupo no laboratório de Imunologia. Além disso, tudo indica que o tempo de tratamento é fator preponderante na ação destes compostos sobre as células infiltradas na ilhota principalmente linfócitos T CD4⁺. Lembrando que a insulite no camundongo NOD instala-se a partir da 5ª semana de vida, coordenada por linfócitos T CD4⁺ (LAFFERTY, 1997). (DYATLOVISTKAYA e BELGENSON, 1987) sugerem que a ação inibitória dos gangliosídeos sobre a resposta imune está relacionada ao seu estado de ativação deste sistema.

Gangliosídeos podem se inserir na membrana plasmática de linfócitos, ligando-se às moléculas do CD4, ocasionando seu mascaramento e/ou endocitose. Acredita-se que seja em virtude da dissociação da proteinaquinase p56^{lck} localizada na porção citoplasmática da molécula CD4 dos linfócitos T CD4⁺ (BERGELSON, 1995; GAROFALO et al., 1998). Outra propriedade verificada dos gangliosídeos é a supressão da produção e ativação de linfócitos T citotóxicos, assim como a ativação de linfócitos Th1 e a citotoxicidade de células NK (BERGELSON, 1995).

O fenótipo das sub-populações de linfócitos T associados a insulite do DM-1 é de células T CD4⁺ e CD8⁺ (KIKUTANI e MAKINO, 1992). Estas células atuam sinergicamente na insulite e no desenvolvimento do diabetes, demonstrando haver aumento na proporção de células CD8⁺, macrófagos, linfócitos B e células NK no

infiltrado com o decorrer da destruição das células β e progressão da insulite (KAY et al., 1997; WONG e JANEWAY, 1997).

No presente trabalho, o monitoramento do tipo de células inflamatórias nas ilhotas, mostrou a presença de células T CD4⁺ particularmente na 8ª. semana do grupo tratado com gangliosídeos. Por outro lado, nas semanas subseqüentes verificamos diminuição das células CD4⁺, em comparação ao grupo salina.

Macrófagos, são consideradas células que participam ativamente do processo inflamatória da ilhota (STOFFELS et al., 2004). Neste contexto, pudemos verificar a presença de macrófagos por imunoistoquímica, principalmente nas semanas 12 e 16 no grupo salina, período crítico para a instalação do diabetes. No grupo de animais diabéticos a presença de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e macrófagos foi mais intensa .

A presença de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e macrófagos, confirmam o caráter de mediação dos mecanismos efetores da resposta inflamatória exercido por estas células, observadas nas ilhotas pancreáticas (KAY et al., 1997; WONG e JANEWAY, 1997). Nossos dados reforçaram a atuação de gangliosídeos entre a 21ª e 28ª, suprimindo a ação inflamatória dessas células, restabelecendo a citoarquitetura e a funcionalidade das células β pancreáticas, produtoras de insulina, como verificado pela presença de insulina sérica nos animais tratados com gangliosídeos.

A participação de citocinas do tipo 1, pró inflamatória como IL-1 β , IL12, IFN γ e TNF α na destruição das células β no DM-1 autoimune estão bem fundamentados (EIZIRIK e DARVILLE, 2001; HIRAI et al., 2000; VENTURA-OLIVEIRA et al., 2002).

Baseados nestas considerações, analisamos a expressão do mRNA de citocinas em ilhotas pancreáticas e células esplênicas nos animais tratados com gangliosídeos,

salina e em animais diabéticos aliados às dosagens imunoenzimáticas de IL-4, TGF β , IL-12 IFN γ e TNF α realizadas para averiguar os efeitos do gangliosídeos sobre citocinas séricas.

A análise da expressão de citocinas IL-1 β , IL12, IFN γ e TNF α em ilhotas pancreáticas os resultados demonstram que entre a 16^a. - 20^a. semana, fase por nós considerada decisiva para a instalação do DM-1, a expressão destas citocinas nos animais tratados com gangliosídeos está significativamente menor., que os níveis expressos nos animais tratados com salina e diabéticos. Esta diminuição sugere a participação do gangliosídeos na modulação de citocinas inflamatórias característica da resposta Th1.

A expressão gênica das citocinas pro inflamatórias, envolvidas na genese e instalação do processo inflamatório no DM-1 avaliadas em células esplênicas, mostra padrões relativamente uniformes destes RNAm nos animais tratados com gangliosídeos. Por outro lado, em animais que receberam salina, observa-se a ocorrência de alterações bruscas na expressão destas citocinas paralelamente á instalação do processo inflamatório. Assim a IL-12, citocina ativadora da resposta Th1, está elevada na 12^a semana, período que antecede á instalação do DM-1. Adicionalmente, os níveis de IL-1 β e TNF- α , estão mais elevados a partir da 12^a. semana de vida, sendo que em animais diabéticos, os níveis de TNF- α permanecem elevados.

Ao contrário dos resultados dos grupos experimentais salina e diabéticos, os efeitos imunomodulatório dos gangliosídeos provavelmente promovem expressão mais uniforme e estável destas citocinas. No momento da instalação do processo inflamatório

(12^a a 16^a semana de vida) os níveis de citocinas IL-1 β TNF- α e IL-12 , em geral encontram-se reduzidos nos animais tratados com gangliosídeos.

Os níveis séricos de IL-4 estavam elevados na 8^a e 28^a. semana de vida e de TGF- β estava elevados em todos os tempos estudado Estes resultados sugerem que os gangliosídeos possam atuar de forma específica sobre linfócitos auto-reativos ativados, modulando a transcrição dos genes de citocinas Th1, estimulando a produção de citocinas modulatórias Th2/Th3, como IL-4, IL-10 e TGF- β (BUGGINS et al., 2001; IRANI et al., 1996; MONTEIRO DE CASTRO et al., 2004).

A ação dos gangliosídeos sobre a expressão de citocinas Th1, acredita-se que seja através da supressão dos primeiros eventos na cascata de transdução de sinais, bloqueando a ação do Fator Nuclear- κ B (NF- κ B). O NF- κ B regula os genes envolvidos na resposta imunológica como IL2/IL-2R, TNF- α , MHC e IFN- γ . Quando inativo este fator é mantido no citoplasma ligado a uma proteína inibitória denominada I κ B, que se liga à região homóloga Rel no NF- κ B bloqueando o sinal de localização nuclear, evitando sua entrada no núcleo (WHITESIDE e ISRAEL, 1997).

Gangliosídeos inibem a fosforilação e degradação da I- κ B, proteína regulatória que liga-se ao NF- κ B, impedindo sua translocação para o núcleo, inibindo desta forma, a transcrição do RNAm de citocinas pró inflamatórias, e promovendo a interrupção do ciclo celular (BUGGINS et al., 2001; IRANI et al., 1996; KANDA, 1999; ZIEGLER-HEITBROCK et al., 1992).

Uma vez fosforilado, o I κ B sofre rápida poliubiquitinação e é degradado. Após sua liberação, o NF- κ B tem sua Sequência de Localização Nuclear na região de

homologia Rel exposta, possibilitando sua translocação para o núcleo, onde irá ligar-se ao DNA dando início à transcrição gênica (NG et al., 2002).

Estudos realizados com gangliosídeos de origem tumoral têm demonstrado que a degradação do I κ B não ocorre em alguns casos, o que sugere a degradação da forma ativa do NF- κ B no citoplasma antes de sua translocação para o núcleo por gangliosídeos (NG et al., 2002).

Além da ação de citocinas pró-inflamatórias, evidências apontam a morte celular por apoptose como um dos mecanismos no desenvolvimento do DM-1

Os estudos para detecção de apoptose *in situ* pela técnica do TUNEL, mostram o predomínio de células apoptóticas no grupo tratado com gangliosídeos, nos animais com 8 e 28 semanas de vida.

A primeira evidência que a interação Fas/Fas-L está envolvida na destruição terminal da célula β , deriva de estudos realizados em camundongos NOD homozigotos, mutantes *lpr* (mutação do gene Fas), o qual não desenvolve o diabetes, mesmo após transferência passiva de linfócitos de camundongos NOD diabéticos. Tal fato levou à hipótese de que a destruição das células β está relacionada com a sua capacidade de expressar Fas estimulada pelo processo inflamatório e o curso natural do diabetes (CHERVONSKY et al., 1997).

A molécula de Fas está expressa em linfócitos ativados e em algumas células, constituindo-se no principal receptor de membrana que transmite os sinais de morte, por outro lado, a molécula de Fas-L é expressa primariamente em linfócitos T ativados (KRAMMER, 2000).

Entretanto, outros autores têm demonstrado que a importância da interação Fas/Fas-L na instalação do diabetes é relativa, uma vez que o Fas é constitutivo na maioria dos tecidos e sua expressão pode aumentar na ocorrência do processo inflamatório. As ilhotas pancreáticas não são exceções, embora ilhotas normais de humanos e murinos possam induzir sua síntese *in vitro*, após incubação com citocinas, ou *in vivo*, após a infiltração de linfócitos. Estes autores concluem que a expressão de Fas e Fas-L na ilhota pancreática é dependente do estímulo fornecido pelo processo inflamatório. Portanto, a apoptose seria simplesmente consequência do processo de destruição iniciado por outros mecanismos como perforinas, receptores de TNF e óxido nítrico (ALLISON e STRASSER, 1998; THOMAS et al., 1999).

Os níveis elevados da proteína Fas-L e expressos constitutivamente nas células α podem refletir mecanismos intrínsecos de defesa da ilhota pancreática, protegendo células β e impedindo desta forma a ação de linfócitos. Sabe-se que os linfócitos auto-reativos expressam constitutivamente a molécula de Fas e a interação deste com a molécula de Fas-L presente na suposta célula-alvo poderia desencadear a morte linfocitária por apoptose (SIGNORE et al., 1998).

A participação do sistema Fas/Fas-L tem gerado discussões polêmicas no meio científico, sem que haja consenso sobre o papel destas moléculas (APOSTOLOU et al., 2003; MATHIS et al., 2001). Alguns estudos indicam que a patogênese do diabetes autoimune constitua processo multifatorial, com estágios distintos e o envolvimento de várias células efetoras diferentes. É provável que existam interações funcionais significativas entre as diversas vias inflamatórias como, por exemplo, a indução de Fas por citocinas. Talvez mecanismos e tipos celulares distintos predominem em diferentes

estágios da doença. Finalmente, é possível que diversas vias atuem em diferentes indivíduos influenciados por diferenças genótípicas ou expressão de auto-antígenos (SU et al., 2000).

O Bcl-w é um dos membros da família Bcl-2, a qual tem função reguladora na apoptose, impedindo a morte celular por diversos estímulos (GIBSON et al., 1996). Sua estrutura é amplamente conservada entre camundongos e humanos, estando expressa em vários tipos celulares (PRINT et al., 1998).

Nossos resultados mostram aumento na expressão de Bcl-w em animais do grupo salina e diabéticos, quando comparado com os animais do grupo tratado com gangliosídeos, nos quais os níveis permaneceram invariáveis durante todo período experimental. O aumento da expressão de Bcl-w é observado após diversos estímulos apoptóticos. Após sua síntese, o Bcl-w insere-se na membrana mitocondrial, onde, acredita-se que vários membros da família de proteínas Bcl-2, interagem umas com as outras. Acredita-se que, embora ocorram interações heterotípicas entre estas proteínas, cada membro da família é capaz de modular a atividade de outro membro, afetando, desta forma, a sensibilidade da célula à apoptose (BORNER, 2003; KAUFMANN et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2004).

O grupo tratado com salina exhibe níveis elevados do mRNA de Fas-L em relação ao grupo tratado com gangliosídeo, até a 16ª semana de vida. Os resultados obtidos nos animais diabéticos, sugerem que o Fas-L pode estar envolvido na lesão da ilhota, visto que esta molécula encontra-se significativamente aumentada nestes animais. Ao contrário, a expressão reduzida de Fas-L mRNA em ilhotas pancreáticas sugere que

não foram expostos, ou, tomaram-se resistentes, ao processo inflamatório e, desta forma, à indução da apoptose.

Outro importante mecanismo da morte celular no DM-1 está relacionado com citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β , IFN- γ e TNF- α , liberadas durante o ataque autoimune por linfócitos T autorreativos, disparando a cascata de sinalização de morte celular ou apoptose induzida por linfócitos T efetores, após interação de Fas/FasL e perforinas/granzimas (MANDRUP-POULSEN, 2003).

Na análise de células esplênicas, a expressão de Fas não foi detectada no grupo tratado com gangliosídeos, porém o grupo salina apresentou maior expressão na 28^a. e valores constantes nas demais semanas estudadas, incluindo o animal diabético. Quando avaliamos Fas-L, os valores encontrados foram sempre maiores no grupo salina e diabético. Para Bcl-w a maior expressão foi em 28 semanas para o grupo gangliosídeos e 12^a. para o grupo salina.

A susceptibilidade de linfócitos T a apoptose está relacionada ao seu estado de ativação. Como os dados da literatura sugerem, gangliosídeos podem bloquear a translocação do NF- κ B para o núcleo, tomando os linfócitos T mais susceptíveis à apoptose (KOLENKO et al., 1999).

Além da modulação de citocinas, gangliosídeos podem atuar diretamente na indução de apoptose. Após sua incorporação à membrana plasmática de timócitos adultos e fetais, verifica-se grande aumento na fragmentação de DNA, processo que pode ser revertido pelo uso de bloqueadores de endonucleases (ZHOU et al., 1998).

Outro mecanismo proposto para o efeito destes compostos no programa de morte celular é a ação direta sobre mitocôndrias, interagindo com o complexo III da

cadeia transportadora de elétrons, o que provocaria estresse oxidativo, induzindo a transição de permeabilidade e, conseqüentemente, a liberação de fatores apoptogênicos como citocromo *c* e do fator indutor de apoptose (AIF) e ativação de caspases (GARCIA-RUIZ et al., 2000; RIPPO et al., 2000).

A transição de permeabilidade envolve a abertura de um poro na membrana mitocondrial interna promovendo a difusão de moléculas maiores que 1500Da, perda do gradiente protônico, inativação da fosforilação oxidativa e fluxo de cálcio da mitocôndria para o citoplasma, intumescência e rompimento da membrana mitocondrial externa, liberação de fatores indutores da apoptose, que estimulam a fragmentação nuclear, e do citocromo *c*, que ativa a cascata de caspases que efetuam a etapa final da apoptose (MALISAN e TESTI, 2002).

Reforçando a hipótese da recuperação de massa insular e aumento da concentração de insulina, observou-se a expressão dos fatores de crescimento NGF e IGF-I. Nossos resultados confirmam a expressão de NGF em ilhotas no grupo tratado com gangliosídeos durante todo período experimental, contrapondo com a presença deste mRNA no grupo tratado com salina apenas na 12^a. e 16^a semanas de vida, e ausência nos animais diabéticos.

Em células esplênicas encontramos maior expressão gênica de NGF na 20^a e 28^a semana de vida no grupo tratado com gangliosídeos. Por outro lado, o grupo de animais tratado com salina apresenta expressão gênica na 12^a, 16^a e 20^a semana de vida. Os animais diabéticos expressam valores reduzidos de NGF.

Sabe-se que o NGF pode atuar como regulador autócrino de sobrevivência da célula β , preservando a biossíntese e secreção de insulina, além de inibir a apoptose (NAVARRO-TABLEROS et al., 2004; ROSENBAUM et al., 1998).

Quanto à expressão de IGF-I em ilhotas, os animais tratados com gangliosídeos exibem níveis constantes, porém menores que os animais tratados com salina. Os quais exibem níveis crescentes da 8ª a 16ª semana de vida, decaindo posteriormente a níveis próximos dos animais tratados com gangliosídeos. Em células esplênicas a expressão gênica manteve-se constante durante o período experimental nos animais tratados com gangliosídeos. A expressão de IGF-I em células esplênicas de animais tratados com salina e diabéticos, apresenta cinética semelhante àquela das ilhotas pancreáticas.

O IGF-I é um fator de crescimento com efeitos anti-apoptóticos em vários tipos celulares (GEORGE et al., 2002). Em ilhotas pancreáticas, este fator de crescimento pode suprimir a morte celular induzida pela IL-1 β , através da supressão da iNOS (HILL et al., 1999).

Com relação aos possíveis efeitos de gangliosídeos na ativação da Jak-Stat nossos resultados demonstraram a presença de dose-dependência no estímulo a de fosforilação de Tyk2 s. Em nossos experimentos não foi possível detectar a ativação da Stat4. Desta forma, o presente trabalho demonstrou efeitos modulatórios de gangliosídeos na ativação da Jak2 / Tyk2 o que pode constituir um fator adicional no controle da produção de citocinas pró-inflamatórias e a manifestação do diabetes no modelo do diabetes tipo 1 em camundongo NOD.

CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

1. A administração de gangliosídeos na dose de 150 mg/Kg/dia, a partir da 4ª semana de vida protege os animais da manifestação do DM -1 autoimune espontâneo
2. A análise imunoistoquímica e morfométrica reforçam a idéia da ação imunomodulatória dos gangliosídeos sobre o infiltrado inflamatório do DM-1
3. Diminuição na expressão gênica de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 β , IL-12, TNF α e IFN- γ) em ilhotas pancreáticas e células esplênicas
4. Diminuição na expressão gênica de componentes apoptóticos Fas, Fas-L e Bcl-w
5. Aumento na expressão gênica de NGF em ilhotas pancreáticas como provável fator de regeneração
6. Níveis inalterados de IGF-I
7. Aumento de Citocinas sérica (TGF β , IL-4) relacionadas com sobrevivência e indução de apoptose no DM-1
8. Ação dose dependente da mistura de gangliosídeos sobre a ativação dos fatores de transcrição (via Jak/Stat)
9. Aumento da fosforilação de Tyk2

Considerações finais

O conjunto dos resultados obtidos no presente trabalho fornecem subsídios adicionais ao entendimento da ação dos gangliosídeos sobre a modulação do processo inflamatório do diabetes espontâneo experimental. Além disso, abrem novas perspectivas de linhas de investigação de natureza clínico-experimental visando novas abordagens no tratamento do diabetes tipo 1

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADORINI, L.; GREGORI, S.; HARRISON, L. C. Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models. **Trends Mol Med**, 8(1): 31-8, 2002.
2. ALBERTS, B. E. A. **Molecular Biology of the Cell**. 3. New York & London: 1994. p. 482 - 84.
3. ALLISON, J.; STRASSER, A. Mechanisms of beta cell death in diabetes: a minor role for CD95. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95(23): 13818-22, 1998.
4. APOSTOLOU, I.; HAO, Z.; RAJEWSKY, K.; VON BOEHMER, H. Effective destruction of Fas-deficient insulin-producing beta cells in type 1 diabetes. **J Exp Med**, 198(7): 1103-6, 2003.
5. ARGETSINGER, L. S.; CAMPBELL, G. S.; YANG, X.; WITTHUHN, B. A.; SILVENNOINEN, O.; IHLE, J. N. et al. Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. **Cell**, 74(2): 237-44, 1993.
6. ATKINSON, M. A.; KAUFMAN, D. L.; CAMPBELL, L.; GIBBS, K. A.; SHAH, S. C.; BU, D. F. et al. Response of peripheral-blood mononuclear cells to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. **Lancet**, 339(8791): 458-9, 1992.
7. ATKINSON, M. A. Mechanisms underlying the loss of self tolerance in NOD mice. **Res Immunol**, 148(5): 301-6, 1997.
8. BACH, J. F. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. **Endocr Rev**, 15(4): 516-42, 1994.
9. BACON, C. M.; MCVICAR, D. W.; ORTALDO, J. R.; REES, R. C.; O'SHEA, J. J.; JOHNSTON, J. A. Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. **J Exp Med**, 181(1): 399-404, 1995.

10. BAEKKESKOV, S.; AANSTOOT, H. J.; 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**, 347(6289): 151-6, 1990.
11. BEDOSSA, P.; BENDELAC, A.; BACH, J. F.; 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**, 19(10): 1947-51, 1989.
12. BERGELSON, L. D. Serum gangliosides as endogenous immunomodulators. **Immunol Today**, 16(10): 483-6, 1995.
13. BOECHAT, L. H.; VILELLA, C. A.; ZOLLNER, R. L. 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**, 35(3): 289-95, 2002.
14. BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Mol Immunol**, 39(11): 615-47, 2003.
15. BOSCHERO, A. C.; DELATTRE, E.; SANTOS, M. L. Inhibition of insulin release by the aminoglycoside antibiotic sisomycin. **Horm Metab Res**, 13(9): 531-2, 1981.
16. BOTTAZZO, G. F.; FLORIN-CHRISTENSEN, A.; DONIACH, D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. **Lancet**, 2(7892): 1279-83, 1974.
17. BRADLEY, L. M.; ASENSIO, V. C.; SCHIOETZ, L. K.; 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**, 162(5): 2511-20, 1999.

18. BRETZEL, R. G.; FLESCHE, B. K.; WILLIG, J.; WOEHRLE, M.; FEDERLIN, K. Effects of ganglioside (Cronassial) treatment on MHC Ia antigen expression and allograft survival of pancreatic islets in diabetic rats. **Diabetologia**, 33(2): 112-4, 1990.
19. BUGGINS, A. G.; MILOJKOVIC, D.; ARNO, M. J.; LEA, N. C.; MUFTI, G. J.; THOMAS, N. S. et al. Microenvironment produced by acute myeloid leukemia cells prevents T cell activation and proliferation by inhibition of NF-kappaB, c-Myc, and pRb pathways. **J Immunol**, 167(10): 6021-30, 2001.
20. CAMPBELL, I. L.; ISCARO, A.; HARRISON, L. C. IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Cytotoxicity to murine islets of Langerhans. **J Immunol**, 141(7): 2325-9, 1988.
21. CHERVONSKY, A. V.; WANG, Y.; WONG, F. S.; VISINTIN, I.; FLAVELL, R. A.; JANEWAY, C. A., JR. et al. The role of Fas in autoimmune diabetes. **Cell**, 89(1): 17-24, 1997.
22. CHO, S. S.; BACON, C. M.; SUDARSHAN, C.; REES, R. C.; FINBLOOM, D.; PINE, R. et al. Activation of STAT4 by IL-12 and IFN-alpha: evidence for the involvement of ligand-induced tyrosine and serine phosphorylation. **J Immunol**, 157(11): 4781-9, 1996.
23. CHU, J. W.; SHAROM, F. J. Gangliosides interact with interleukin-4 and inhibit interleukin-4-stimulated helper T-cell proliferation. **Immunology**, 84(3): 396-403, 1995.

24. COLMAN, P. G.; NAYAK, R. C.; CAMPBELL, I. L.; EISENBARTH, G. S. Binding of cytoplasmic islet cell antibodies is blocked by human pancreatic glycolipid extracts. **Diabetes**, 37(5): 645-52, 1988.
25. CORBETT, J. A.; SWEETLAND, M. A.; WANG, J. L.; LANCASTER, J. R., JR.; MCDANIEL, M. L. Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90(5): 1731-5, 1993.
26. DARNELL, J. E., JR.; KERR, I. M.; STARK, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science**, 264(5164): 1415-21, 1994.
27. DE MARIA, R.; LENTI, L.; MALISAN, F.; D'AGOSTINO, F.; TOMASSINI, B.; ZEUNER, A. et al. Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. **Science**, 277(5332): 1652-5, 1997.
28. DOZMOROV, I. M.; PROKHAZOVA, A. L.; SVIRTSHEVSKAYA, E. V.; LUTSAN, N. I.; KOZIN, II; LEMENOVSKAYA, A. F. et al. Nanomolar concentrations of gangliosides stimulate primary humoral response. **Biochem Mol Biol Int**, 42(1): 57-63, 1997.
29. DURINOVIC-BELLO, I.; HUMMEL, M.; ZIEGLER, A. G. Cellular immune response to diverse islet cell antigens in IDDM. **Diabetes**, 45(6): 795-800, 1996.
30. DYATLOVISTKAYA, E. V.; BELGENSON, L. D. Glycosphingolipids and antitumor immunity. **Biochim Biophys Acta**, 907(125-143), 1987.
31. EISENBARTH, G. S. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. **N Engl J Med**, 314(21): 1360-8, 1986.

32. EISENBARTH, G. S.; JASINSKI, J. M. Disease prevention with islet autoantigens **Endocrinol Metab Clin North Am**, 33(1): 59-73, viii, 2004.
33. EIZIRIK, D. L.; SANDLER, S.; PALMER, J. P. Repair of pancreatic beta-cells. A relevant phenomenon in early IDDM? **Diabetes**, 42(10): 1383-91, 1993.
34. EIZIRIK, D. L.; FLODSTROM, M.; KARLSEN, A. E.; WELSH, N. The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells. **Diabetologia**, 39(8): 875-90, 1996.
35. EIZIRIK, D. L.; DARVILLE, M. I. beta-cell apoptosis and defense mechanisms: lessons from type 1 diabetes. **Diabetes**, 50 Suppl 1(S64-9, 2001.
36. EIZIRIK, D. L.; MANDRUP-POULSEN, T. A choice of death—the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. **Diabetologia**, 44(12): 2115-33, 2001.
37. ERLANDER, M. G.; TOBIN, A. J. The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. **Neurochem Res**, 16(3): 215-26, 1991.
38. FU, X. Y. A transcription factor with SH2 and SH3 domains is directly activated by an interferon alpha-induced cytoplasmic protein tyrosine kinase(s). **Cell**, 70(2): 323-35, 1992.
39. GARCIA-RUIZ, C.; COLELL, A.; PARIS, R.; FERNANDEZ-CHECA, J. C. Direct interaction of GD3 ganglioside with mitochondria generates reactive oxygen species followed by mitochondrial permeability transition, cytochrome c release, and caspase activation. **Faseb J**, 14(7): 847-58, 2000.
40. GAROFALO, T.; SORICE, M.; MISASI, R.; CINQUE, B.; GIAMMATTEO, M.; PONTIERI, G. M. et al. A novel mechanism of CD4 down-modulation induced by

monosialoganglioside GM3. Involvement of serine phosphorylation and protein kinase c delta translocation. **J Biol Chem**, 273(52): 35153-60, 1998.

41. GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol**, 119(3): 493-501, 1992.
42. GERSCHENSON, L. E.; ROTELLO, R. J. Apoptosis: a different type of cell death. **Faseb J**, 6(7): 2450-5, 1992.
43. GIBSON, L.; HOLMGREEN, S. P.; HUANG, D. C.; BERNARD, O.; COPELAND, N. G.; JENKINS, N. A. et al. bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. **Oncogene**, 13(4): 665-75, 1996.
44. GRANVILLE, D. J.; CARTHY, C. M.; HUNT, D. W.; MCMANUS, B. M. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. **Lab Invest**, 78(8): 893-913, 1998.
45. 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**, 163(11): 5770-80, 1999.
46. HARRISON, L. C.; CHU, S. X.; DEAIZPURUA, H. J.; GRAHAM, M.; HONEYMAN, M. C.; COLMAN, P. G. Islet-reactive T cells are a marker of preclinical insulin-dependent diabetes. **J Clin Invest**, 89(4): 1161-5, 1992.
47. HARTEMANN-HEURTIER, A.; RICHARD, M. F.; BOITARD, C. Absence of significant Th2 response in diabetes-prone non-obese diabetic (NOD) mice. **Clin Exp Immunol**, 116(2): 225-30, 1999.

48. HAYWARD, A. R.; SHREIBER, M. Neonatal injection of CD3 antibody into nonobese diabetic mice reduces the incidence of insulinitis and diabetes. **J Immunol**, 143(5): 1555-9, 1989.
49. HILL, D. J.; PETRIK, J.; ARANY, E.; MCDONALD, T. J.; DELOVITCH, T. L. Insulin-like growth factors prevent cytokine-mediated cell death in isolated islets of Langerhans from pre-diabetic non-obese diabetic mice. **J Endocrinol**, 161(1): 153-65, 1999.
50. HIRAI, H.; KAINO, Y.; ITO, T.; KIDA, K. Analysis of cytokine mRNA expression in pancreatic islets of nonobese diabetic mice. **J Pediatr Endocrinol Metab**, 13(1): 91-8, 2000.
51. HONEYMAN, M. C.; CRAM, D. S.; HARRISON, L. C. Glutamic acid decarboxylase 67-reactive T cells: a marker of insulin-dependent diabetes. **J Exp Med**, 177(2): 535-40, 1993.
52. HOU, J.; SCHINDLER, U.; HENZEL, W. J.; WONG, S. C.; MCKNIGHT, S. L. Identification and purification of human Stat proteins activated in response to interleukin-2. **Immunity**, 2(4): 321-9, 1995.
53. IHLE, J. N. STATs: signal transducers and activators of transcription. **Cell**, 84(3): 331-4, 1996.
54. 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**, 63(3): 125-9, 1998.
55. IRANI, D. N.; LIN, K. I.; GRIFFIN, D. E. Brain-derived gangliosides regulate the cytokine production and proliferation of activated T cells. **J Immunol**, 157(10): 4333-40, 1996.

56. 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**, 186(4): 613-8, 1997.
57. 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**, 39(5): 530-6, 1996.
58. JUN, H. S.; YOON, C. S.; ZBYTNUK, L.; VAN ROOIJEN, N.; YOON, J. W. The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. **J Exp Med**, 189(2): 347-58, 1999.
59. KANDA, N. Gangliosides GD1a and GM3 induce interleukin-10 production by human T cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 256(1): 41-4, 1999.
60. KAUFMANN, T.; SCHINZEL, A.; BORNER, C. Bcl-2 (cloning) with mitochondria. **Trends Cell Biol**, 14(1): 8-12, 2004.
61. KAWAMURA, T.; NAGATA, M.; UTSUGI, T.; YOON, J. W. Prevention of autoimmune type I diabetes by CD4⁺ suppressor T cells in superantigen-treated non-obese diabetic mice. **J Immunol**, 151(8): 4362-70, 1993.
62. KAY, T. W.; CHAPLIN, H. L.; PARKER, J. L.; STEPHENS, L. A.; THOMAS, H. E. CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes: clarification of their pathogenic roles in diabetes in the NOD mouse. **Res Immunol**, 148(5): 320-7, 1997.
63. KELLER, R. J. Cellular immunity to human insulin in individuals at high risk for the development of type I diabetes mellitus. **J Autoimmun**, 3(3): 321-7, 1990.

64. KIKUTANI, H.; MAKINO, S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. **Adv Immunol**, 51(285-322, 1992.
65. KIM, O. S.; PARK, E. J.; JOE, E. H.; JOU, I. JAK-STAT signaling mediates gangliosides-induced inflammatory responses in brain microglial cells. **J Biol Chem**, 277(43): 40594-601, 2002.
66. KOLENKO, V.; BLOOM, T.; RAYMAN, P.; BUKOWSKI, R.; HSI, E.; FINKE, J. Inhibition of NF-kappa B activity in human T lymphocytes induces caspase-dependent apoptosis without detectable activation of caspase-1 and -3. **J Immunol**, 163(2): 590-8, 1999.
67. KRAMMER, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**, 407(6805): 789-95, 2000.
68. LADISCH, S.; ULSH, L.; GILLARD, B.; WONG, C. Modulation of the immune response by gangliosides. Inhibition of adherent monocyte accessory function in vitro. **J Clin Invest**, 74(6): 2074-81, 1984.
69. LAFFERTY, K. J. Immunobiology of autoimmune diabetes. **Res Immunol**, 148(5): 313-9, 1997.
70. LEDEEN, R. W.; YU, R. K. Gangliosides: structure, isolation, and analysis. **Methods Enzymol**, 83(139-91, 1982.
71. LEITER, E. The NOD mouse: A model for insulin-dependent diabetes mellitus. **Current protocols in Immunology**, 15.9(24): 15.9.1 - 24, 1997.
72. LENARDO, M. J. The molecular regulation of lymphocyte apoptosis. **Semin Immunol**, 9(1): 1-5, 1997.

73. LIEBERMAN, S. M.; DILORENZO, T. P. A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes. **Tissue Antigens**, 62(5): 359-77, 2003.
74. LIN, J. X.; MIETZ, J.; MODI, W. S.; JOHN, S.; LEONARD, W. J. Cloning of human Stat5B. Reconstitution of interleukin-2-induced Stat5A and Stat5B DNA binding activity in COS-7 cells. **J Biol Chem**, 271(18): 10738-44, 1996.
75. MAHONEY, J. A.; SCHNAAR, R. L. Multivalent ganglioside and sphingosine conjugates modulate myelin protein kinases. **Biochim Biophys Acta**, 1328(1): 30-40, 1997.
76. MAKINO, S.; KUNIMOTO, K.; MURAOKA, Y.; MIZUSHIMA, Y.; KATAGIRI, K.; TOCHINO, Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. **Jikken Dobutsu**, 29(1): 1-13, 1980.
77. MALISAN, F.; TESTI, R. GD3 ganglioside and apoptosis. **Biochim Biophys Acta**, 1585(2-3): 179-87, 2002.
78. MANDRUP-POULSEN, T. Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. **Biochem Pharmacol**, 66(8): 1433-40, 2003.
79. MASSA, P. T. Specific suppression of major histocompatibility complex class I and class II genes in astrocytes by brain-enriched gangliosides. **J Exp Med**, 178(4): 1357-63, 1993.
80. MATHIS, D.; VENCE, L.; BENOIST, C. beta-Cell death during progression to diabetes. **Nature**, 414(6865): 792-8, 2001.
81. MERRITT, W. D.; BAILEY, J. M.; PLUZNIK, D. H. Inhibition of interleukin-2-dependent cytotoxic T-lymphocyte growth by gangliosides. **Cell Immunol**, 89(1): 1-10, 1984.

82. MILLER, S. D.; SHEVACH, E. M. Immunoregulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: editorial overview. **Res Immunol**, 149(9): 753-9, 1998.
83. 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**, 26(4): 155-63, 2004.
84. MUIR, A.; PECK, A.; CLARE-SALZLER, M.; SONG, Y. H.; CORNELIUS, J.; LUCHETTA, R. et al. Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulinitis characterized by diminished intraislet interferon-gamma transcription. **J Clin Invest**, 95(2): 628-34, 1995.
85. MULLER, M.; BRISCOE, J.; LAXTON, C.; GUSCHIN, D.; ZIEMIECKI, A.; SILVENNOINEN, O. et al. The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-alpha/beta and -gamma signal transduction. **Nature**, 366(6451): 129-35, 1993.
86. NAGATA, M.; SANTAMARIA, P.; KAWAMURA, T.; UTSUGI, T.; YOON, J. W. Evidence for the role of CD8+ cytotoxic T cells in the destruction of pancreatic beta-cells in nonobese diabetic mice. **J Immunol**, 152(4): 2042-50, 1994.
87. NAKHOODA, A. F.; LIKE, A. A.; CHAPPEL, C. I.; MURRAY, F. T.; MARLISS, E. B. The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. **Diabetes**, 26(2): 100-12, 1977.
88. NAVARRO-TABLEROS, V.; SANCHEZ-SOTO, M. C.; GARCIA, S.; HIRIART, M. Autocrine regulation of single pancreatic beta-cell survival. **Diabetes**, 53(8): 2018-23, 2004.

89. NAYAK, R. C.; OMAR, M. A.; RABIZADEH, A.; SRIKANTA, S.; EISENBARTH, G. S. "Cytoplasmic" islet cell antibodies. Evidence that the target antigen is a sialoglycoconjugate. **Diabetes**, 34(6): 617-9, 1985.
90. NEPOM, G. T.; ERLICH, H. MHC class-II molecules and autoimmunity. **Annu Rev Immunol**, 9(493-525, 1991.
91. NG, C. S.; NOVICK, A. C.; TANNENBAUM, C. S.; BUKOWSKI, R. M.; FINKE, J. H. Mechanisms of immune evasion by renal cell carcinoma: tumor-induced T-lymphocyte apoptosis and NFkappaB suppression. **Urology**, 59(1): 9-14, 2002.
92. OFFNER, H.; THIEME, T.; VANDENBARK, A. A. Gangliosides induce selective modulation of CD4 from helper T lymphocytes. **J Immunol**, 139(10): 3295-305, 1987.
93. O'REILLY, L. A.; HUTCHINGS, P. R.; CROCKER, P. R.; 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**, 21(5): 1171-80, 1991.
94. PALMER, J. P.; COONEY, M. K.; CROSSLEY, J. R.; HOLLANDER, P. H.; ASPLIN, C. M. Antibodies to viruses and to pancreatic islets in nondiabetic and insulin-dependent diabetic patients. **Diabetes Care**, 4(5): 525-8, 1981.
95. PAPACCIO, G.; CHIEFFI BACCARI, G.; MEZZOGIORNO, V. In vivo effect of gangliosides on non-obese diabetic mice. **Acta Anat (Basel)**, 147(3): 168-73, 1993.
96. PAVIN, E. J.; ZOLLNER, R. L. 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**, 38(105-108, 1994.

97. POCIOT, F.; RONNINGEN, K. S.; BERGHOLDT, R.; LORENZEN, T.; JOHANNESSEN, 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**, 19(3): 169-78, 1994.
98. POZZILLI, P.; SIGNORE, A.; WILLIAMS, A. J.; BEALES, P. E. NOD mouse colonies around the world--recent facts and figures. **Immunol Today**, 14(5): 193-6, 1993.
99. PRINT, C. G.; LOVELAND, K. L.; GIBSON, L.; MEEHAN, T.; STYLIANOU, A.; WREFORD, N. et al. Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95(21): 12424-31, 1998.
100. PUKEL, C.; BAQUERIZO, H.; RABINOVITCH, A. Destruction of rat islet cell monolayers by cytokines. Synergistic interactions of interferon-gamma, tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin 1. **Diabetes**, 37(1): 133-6, 1988.
101. QIN, H. Y.; SADELAIN, M. W.; 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**, 150(5): 2072-80, 1993.
102. RABINOVITCH, A.; SUAREZ-PINZON, W. L.; SHI, Y.; MORGAN, A. R.; BLEACKLEY, R. C. DNA fragmentation is an early event in cytokine-induced islet beta-cell destruction. **Diabetologia**, 37(8): 733-8, 1994.

103. RABINOVITCH, A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes Metab Rev**, 14(2): 129-51, 1998.
104. RABINOVITCH, A.; SUAREZ-PINZON, W. L. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. **Biochem Pharmacol**, 55(8): 1139-49, 1998.
105. RAVINDRANATH, M. H.; GONZALES, A.; SOH, D.; NISHIMOTO, K.; TAM, W. Y.; BILCHIK, A. et al. Interleukin-2 binds to ganglioside GD(1b). **Biochem Biophys Res Commun**, 283(2): 369-73, 2001.
106. RIPPO, M. R.; MALISAN, F.; RAVAGNAN, L.; TOMASSINI, B.; CONDO, I.; COSTANTINI, P. et al. GD3 ganglioside directly targets mitochondria in a bcl-2-controlled fashion. **Faseb J**, 14(13): 2047-54, 2000.
107. ROHANE, P. W.; SHIMADA, A.; KIM, D. T.; EDWARDS, C. T.; CHARLTON, B.; SHULTZ, L. D. et al. Islet-infiltrating lymphocytes from prediabetic NOD mice rapidly transfer diabetes to NOD-scid/scid mice. **Diabetes**, 44(5): 550-4, 1995.
108. ROSENBAUM, T.; VIDALTAMAYO, R.; SANCHEZ-SOTO, M. C.; ZENTELLA, A.; HIRIART, M. Pancreatic beta cells synthesize and secrete nerve growth factor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95(13): 7784-8, 1998.
109. ROSSINI, A. A.; GREINER, D. L.; FRIEDMAN, H. P.; MORDES, J. P. Immunopathogenesis of diabetes mellitus. **Diabetes Rev**, 1(46-75, 1993).
110. RUGGLES, J. A.; KELEMEN, D.; BARON, A. Emerging therapies: controlling glucose homeostasis, immunotherapy, islet transplantation, gene therapy, and islet cell neogenesis and regeneration. **Endocrinol Metab Clin North Am**, 33(1): 239-52, xii, 2004.

111. SAAD, M. J.; HARTMANN, L. G.; DE CARVALHO, D. S.; GALORO, C. A.; BRENELLI, S. L.; CARVALHO, C. R. Effect of glucagon on insulin receptor substrate-1 (IRS-1) phosphorylation and association with phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase). **FEBS Lett**, 370(1-2): 131-4, 1995.
112. SARVETNICK, N.; SHIZURU, J.; LIGGITT, D.; MARTIN, L.; MCINTYRE, B.; GREGORY, A. et al. Loss of pancreatic islet tolerance induced by beta-cell expression of interferon-gamma. **Nature**, 346(6287): 844-7, 1990.
113. SCHWARTZ, S. L.; 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**, 15(1): 79-87, 1993.
114. SCOTT, A. M.; ATWATER, I.; ROJAS, E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. **Diabetologia**, 21(5): 470-5, 1981.
115. SEEMAYER, T. A.; TANNENBAUM, G. S.; GOLDMAN, H.; COLLE, E. Dynamic time course studies of the spontaneously diabetic BB Wistar rat. III. Light-microscopic and ultrastructural observations of pancreatic islets of Langerhans. **Am J Pathol**, 106(2): 237-49, 1982.
116. SHIZURU, J. A.; TAYLOR-EDWARDS, C.; BANKS, B. A.; GREGORY, A. K.; FATHMAN, C. G. Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes. **Science**, 240(4852): 659-62, 1988.
117. SIGNORE, A.; POZZILLI, P.; GALE, E. A.; ANDREANI, D.; BEVERLEY, P. C. The natural history of lymphocyte subsets infiltrating the pancreas of NOD mice. **Diabetologia**, 32(5): 282-9, 1989.

118. SIGNORE, A.; ANNOVAZZI, A.; GRADINI, R.; LIDDI, R.; RUBERTI, G. Fas and Fas ligand-mediated apoptosis and its role in autoimmune diabetes. **Diabetes Metab Rev**, 14(3): 197-206, 1998.
119. STAHL, N.; BOULTON, T. G.; FARRUGGELLA, T.; IP, N. Y.; DAVIS, S.; WITTHUHN, B. A. et al. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. **Science**, 263(5143): 92-5, 1994.
120. STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARLOW, T. G. **Imunologia Médica**. 9. Rio de Janeiro: 2000. p. 113 - 30.
121. 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**, 23(1): 9-15, 2004.
122. SU, X.; HU, Q.; KRISTAN, J. M.; COSTA, C.; SHEN, Y.; GERO, D. et al. Significant role for Fas in the pathogenesis of autoimmune diabetes. **J Immunol**, 164(5): 2523-32, 2000.
123. SUAREZ-PINZON, W.; SORENSEN, O.; BLEACKLEY, R. C.; ELLIOTT, J. F.; RAJOTTE, R. V.; RABINOVITCH, A. Beta-cell destruction in NOD mice correlates with Fas (CD95) expression on beta-cells and proinflammatory cytokine expression in islets. **Diabetes**, 48(1): 21-8, 1999.
124. SUAREZ-PINZON, W. L.; POWER, R. F.; RABINOVITCH, A. Fas ligand-mediated mechanisms are involved in autoimmune destruction of islet beta cells in non-obese diabetic mice. **Diabetologia**, 43(9): 1149-56, 2000.
125. TAKAHASHI, A.; MASUDA, A.; SUN, M.; CENTONZE, V. E.; HERMAN, B. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial

caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pH_m). **Brain Res Bull**, 62(6): 497-504, 2004.

126. TANIGUCHI, S.; YANASE, T.; HAJI, M.; ISHIBASHI, K.; TAKAYANAGI, R.; NAWATA, H. The antiobesity effect of dehydroepiandrosterone in castrated or noncastrated obese Zucker male rats. **Obes Res**, 3 Suppl 5(639S-643S, 1995.
127. TETTAMANTI, G.; RIBONI, L. Gangliosides turnover and neural cells function: a new perspective. **Prog Brain Res**, 101(77-100, 1994.
128. THOMAS, H. E.; DARWICHE, R.; CORBETT, J. A.; KAY, T. W. Evidence that beta cell death in the nonobese diabetic mouse is Fas independent. **J Immunol**, 163(3): 1562-9, 1999.
129. THOMAS, H. E.; KAY, T. W. Beta cell destruction in the development of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. **Diabetes Metab Res Rev**, 16(4): 251-61, 2000.
130. THOMAS, H. E.; DARWICHE, R.; CORBETT, J. A.; KAY, T. W. Interleukin-1 plus gamma-interferon-induced pancreatic beta-cell dysfunction is mediated by beta-cell nitric oxide production. **Diabetes**, 51(2): 311-6, 2002.
131. TISCH, R.; MCDEVITT, H. Insulin-dependent diabetes mellitus. **Cell**, 85(3): 291-7, 1996.
132. 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**, 39(3): 283-8, 1994.
133. VAN PARIJS, L.; ABBAS, A. K. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. **Curr Opin Immunol**, 8(3): 355-61, 1996.

134. VENTURA-OLIVEIRA, D.; VILELLA, C. A.; ZANIN, M. E.; CASTRO, G. M.; MOREIRA FILHO, D. C.; ZOLLNER, R. L. Kinetics of TNF-alpha and IFN-gamma mRNA expression in islets and spleen of NOD mice. **Braz J Med Biol Res**, 35(11): 1347-55, 2002.
135. VINIK, A. I. Diabetic neuropathy: pathogenesis and therapy. **Am J Med**, 107(2B): 17S-26S, 1999.
136. WATLING, D.; GUSCHIN, D.; MULLER, M.; SILVENNOINEN, O.; WITTHUHN, B. A.; QUELLE, F. W. et al. Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway. **Nature**, 366(6451): 166-70, 1993.
137. WHITESIDE, S. T.; ISRAEL, A. I kappa B proteins: structure, function and regulation. **Semin Cancer Biol**, 8(2): 75-82, 1997.
138. WHO. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **World Health Organization**, 1-49, 1999.
139. WILBERZ, S.; HERBERG, L.; RENOLD, A. E. Gangliosides in vivo reduce diabetes incidence in non-obese diabetic mice. **Diabetologia**, 31(11): 855-7, 1988.
140. WINER, S.; TSUI, H.; LAU, A.; SONG, A.; LI, X.; CHEUNG, R. K. et al. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. **Nat Med**, 9(2): 198-205, 2003.
141. WITTHUHN, B. A.; QUELLE, F. W.; SILVENNOINEN, O.; YI, T.; TANG, B.; MIURA, O. et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine

phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. **Cell**, 74(2): 227-36, 1993.

142. WONG, F. S.; VISINTIN, I.; WEN, L.; FLAVELL, R. A.; JANEWAY, C. A., 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**, 183(1): 67-76, 1996.
143. WONG, F. S.; JANEWAY, C. A., JR. The role of CD4 and CD8 T cells in type I diabetes in the NOD mouse. **Res Immunol**, 148(5): 327-32, 1997.
144. YALE, J. F.; MARLISS, E. B. Altered immunity and diabetes in the BB rat. **Clin Exp Immunol**, 57(1): 1-11, 1984.
145. YAMADA, K.; TAKANE-GYOTOKU, N.; YUAN, X.; ICHIKAWA, F.; INADA, C.; NONAKA, K. Mouse islet cell lysis mediated by interleukin-1-induced Fas. **Diabetologia**, 39(11): 1306-12, 1996.
146. ZHONG, Z.; WEN, Z.; DARNELL, J. E., JR. Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 91(11): 4806-10, 1994.
147. ZHOU, J.; SHAO, H.; COX, N. R.; BAKER, H. J.; EWALD, S. J. Gangliosides enhance apoptosis of thymocytes. **Cell Immunol**, 183(2): 90-8, 1998.
148. ZIEGLER-HEITBROCK, H. W.; KAFFERLEIN, E.; HAAS, J. G.; MEYER, N.; STROBEL, M.; WEBER, C. et al. Gangliosides suppress tumor necrosis factor production in human monocytes. **J Immunol**, 148(6): 1753-8, 1992.

149. ZOU, J.; PRESKY, D. H.; WU, C. Y.; GUBLER, U. Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases. **J Biol Chem**, 272(9): 6073-7, 1997.

EXOGENOUS GANGLIOSIDES CAN SUPPRESS APOPTOSIS
OCCURRENCE AND APOPTOSIS REGULATOR MOLECULES
EXPRESSION IN DIABETES TYPE 1 IN NOD MICE.

Conceição Aparecida Vilella, Rika Ashimine, Maira Eduarda Zanin, Gláucia Monteiro de Castro, Ricardo de Lima Zollner*.

*Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental – Departamento de Clínica Médica – Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas – Unicamp.

Correspondence author:

Ricardo de Lima Zollner
Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental
Departamento de Clínica Médica – Faculdade de Ciências Médicas
Universidade Estadual de Campinas – Unicamp
PO BOX 6111 – Campinas/SP – 13081-970 – Brazil
E-mail: zollner@unicamp.br

RUNNING TITLE: Apoptosis suppression by gangliosides in type 1 diabetes

Key Words: apoptosis, type 1 diabetes mellitus, gangliosides, Fas, FasL, Bcl-w

Abstract

In the Non obese diabetic (Nod) mouse model of type 1 autoimmune diabetes (DM1), evidence suggests that pancreatic beta cell is mainly destroyed by apoptotic mechanisms. The inflammatory cells populations include macrophages and CD4+ T cell as the main cellular effectors, and CD8+ T lymphocyte the initiation cells of the beta-cells injury process. Furthermore, CD4+ mediated beta-cell death is predominantly dependent on apoptotic factors Fas/Fas and cytokines IFN-gamma and TNF-alpha. Additional factors as perforins, IL-1 beta, glucose levels, among others, contribute to energetic imbalance in beta-cell, playing a important role for beta-cell destruction. The aim of the present study was to verify the effects of the treatment with a mixture of gangliosides (GM1; GD1a; GD1b;GT1b) on the development of diabetes and islets injury in a time course schedule from 4th to 28th of life. We used a RT-PCR to assess Fas, Fas-ligand and Bcl-w, mRNA expression in islets and TUNEL assay to in situ apoptosis evaluation. Results suggest that gangliosides may interfere in the auto-destruction process, protecting beta cells population from the auto reactive T cell by cytokine and apoptotic factors modulation, decreasing the autoimmune response to pancreatic islets.

Introduction

In type 1 diabetes, autoimmune T cells cause destruction of pancreatic beta cells by a largely unknown mechanism, although there is a body of evidence suggesting that cell death can participate in this process. Previous studies have shown that beta cell destruction is delayed, but can occur in perforin-deficient non obese diabetic (NOD) mice; Fas⁻ deficient NOD mice do not develop diabetes and the use of Anti-Fas-L antibody prevents infiltration and destruction of syngeneic islet grafts in NOD mice by acting on FasL⁺ CD4 or CD8 T cells [1,2]. Fas has been show to be expressed by insulin-producing beta cells in mice [3]. Thus, the understanding of effectors type 1 diabetes has become an area of intense research due to the unequivocal evidence showing beta cell death in type 1 diabetes.

Apoptosis is a physiological event that occurs during embryogenesis, in the course of normal tissue turnover and deletion of autoreactive T cells, where unwanted cells are eliminated [4,5]. However, if the apoptosis is occurs out at the wrong time, crucial cells may be lost [6].

Gangliosides, sialic acid-containing glycosingolipidis, are found in the outer leaflet of the plasma membrane of all vertebrate cells and are thought to play functional roles in cellular interactions and the control of cell proliferation (7, 8]. In the immune system, these glycosingolipids have immunosuppressive properties, depending upon the structure, concentration of gangliosides and the nature of the target and effector cells [9].

The aim of the present work was to investigate the effects of gangliosides on type 1 diabetes in NOD mice. Our results suggest an immunomodulation by gangliosides,

since the ganglioside-treated animals did not present any signs of diabetes. Furthermore, the morphological insulitis index was significantly lower, as was the expression of apoptosis molecules, suggesting the occurrence of inflammatory islet cell death

MATERIAL AND METHODS

Animals

NOD/Uni female mice, aged 4 weeks obtained from CEMIB-UNICAMP, were maintained in our laboratory in a specific-pathogen-free animal facility until sacrifice on the 8th, 12th, 16th 20th and 28th weeks of life. The incidence of spontaneous type 1 diabetes in our colony was 60-80% in females. The animals received water and food *ad libitum* under 12h cycles of darkness and light. Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the general guidelines established by The Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and by international laws and policies.

Administration of gangliosides

The ganglioside-treated group received, from the 4th week of life, an intraperitoneal dose injection of 150mg/kg daily of a purified gangliosides mixture from bovine brain (21% GM1, 40% GD1a, 16% GD1b, and 19% GT1b; kindly gift by TRB-Pharma, Campinas-Brazil). Animals from the saline group received 0.9% saline solution at similar time intervals and were submitted to an identical manipulation each day.

Blood glucose measurements and diabetes diagnosis

Blood glucose was obtained from a tail vein using Prestige LX Smart System Test-strips (Home Diagnostic – Fort Lauderdale, FL, USA). Two consecutive readings of blood glucose levels $\geq 250\text{mg/dL}$ (13.9 nM) were considered as diagnostic of diabetes onset.

Tissue Specimens

The animals were sacrificed on the 8, 12, 16, 20 and, 28th weeks of life. The pancreas was removed for morphological classification of islet (insulitis) and insulitis index. The cryostat sections, with 5 micrometers thickness, were obtained in nine consecutive series with three sections on different slides, after disposal of ten sections among series. The histological sections were stained with hematoxylin and eosin and examined by light microscopy (Zeiss, Axioscop, Jena, Germany).

Insulitis Index

To establish the insulitis index, the pancreas was first classified by the insulitis grade, according to mononuclear cell infiltration: grade 0 – intact islet; 1 – peri- and intra-islet infiltration below 25% of islet area; 2 – intra-islet infiltration occupying 25-80% of the islet area; 3 – invasive insulitis, the mononuclear infiltrate occupying more than 80% of the islet area; 4 – destructive insulitis, the mononuclear infiltration occupying the total islet area substituting beta cells. After islet scoring, the following formula was applied:

$$I = \frac{(0 \times N0) + (1 \times N1) + (2 \times N2) + (3 \times N3) + (4 \times N4)}{4 \times (N0 + N1 + N2 + N3 + N4)}$$

$$4 \times (N0 + N1 + N2 + N3 + N4)$$

I = Index; N_0 ; N_1 ; N_2 ; N_3 ; N_4 = are the mean, number of islets scored in grades 0; 1; 2; 3; and 4, respectively. I = 1.0, signifies that all islets have essentially been destroyed [10].

Detection of *in situ* apoptosis by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling assay (TUNEL)

The samples, obtained from NOD mice sacrificed on the 8,12,16,20 and 28th weeks, were submitted to the TUNEL reaction carried out according to the manufacturer's recommendations (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany). Briefly, sections were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 minutes, and permeabilized for 2 minutes in a 0.1% Triton X-100, 0.1% sodium citrate solution. After blocking for endogenous peroxidase activity with 0.3% hydrogen peroxide/methanol, a TUNEL reaction mixture was applied for 60 minutes at 37°C. An anti-fluorescein peroxidase-conjugated antibody (POD) solution was used to detect the incorporation of dUTP, and slides were developed using 3,3' diaminobenzidine (DAB, 0.6 mg/ml, Sigma, St Louis, USA) in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 0.03% H_2O_2 . The sections were counterstained with Harris' haematoxylin and then treated for the saponification reaction with lithium carbonate. The slides were mounted with coverslips using Entelan (Merck, Darmstadt, Germany).

Islet isolation

The islet isolation was performed using the collagenase method, as previously described [11,12]. In brief, the after excised pancreas was minced and digested with collagenase V (Sigma) for 15 minutes, islets were isolated and collected under a dissection microscope with a micropipette. After isolation, the number and viability of islets were checked by Trypan blue exclusion; only islets with a viability of above 90% were used for the RT-PCR procedure.

RT-PCR analysis for Bcl-w, Fas and Fas-L gene expression

Total cellular RNA was isolated by a modified protocol of acid guanidium thiocyanate/phenol/chloroform extraction [13,14,12]. RNA was first reverse-transcribed into cDNA (Superscript[™] II – Gibco, USA). PCR amplification was performed in a total volume of 50 μ l, containing 2 μ l of the cDNA, 200ng of each primer, 500 μ M dNTP (Pharmacia Biotech – Piscataway-NJ, USA) and 1U Taq polymerase (Life Technologies, USA) in buffer supplied by the polymerase manufacturer. Optimum PCR conditions were 40 cycles (58°C for 45s, 72°C for 90s, 95°C for 45s). Sample contamination by genomic DNA was verified by submitting the RNA sample to PCR amplification, omitting the RT step. The PCR products were submitted to 1.5% agarose gels electrophoresis containing ethidium bromide and visualized by excitation by ultraviolet light and digitally recorded using the Nucleovision[®] system (NucleoTech, San Mateo, CA, USA). The molecular weights of the products and the band pixel area were calculated using the Gel Expert[®] Software (NucleoTech). The semi quantitative expression (SE) was calculated for each sample

using the following formula and expressed as arbitrary units (AU): $SE = \text{pixel area of the product to be analyzed} / \text{pixel area of cyclophilin} \times 100$.

Statistical analysis

Comparisons of results were analyzed using the Mann-Whitney Test, or Kruskal-Wallis (non-parametric ANOVA) to compare the three groups: saline, ganglioside and diabetic. Values of $p < 0.05$ were considered as indicative of significance.

RESULTS

Diabetes Incidence

The evaluation of diabetes manifestation showed an increase in hyperglycemia in the saline group from the 10th week of age, reaching incidence of the 72% around the 22nd week, as expected in the NOD/Uni colony. The group treated with gangliosides did not present diabetes manifestation during the experimental period (Figure 1).

Histological Analysis

We evaluated cell infiltration degree in the pancreatic islet using the insulitis score, and observed that the gangliosides-treated group exhibited a higher number of healthy islets than the control group, in support of the normal blood glucose levels results, suggesting the functional maintenance of the endocrine pancreas in these animals.

The insulitis index is the ratio between insulitis score and the total number of the Langerhans islets. Thus, values close to one are indicative of total destruction. The ganglioside group presented a lower index at the 8th and 12th weeks of treatment (0.15 and 0.16) than the saline group (0.31, 0.44). On the 16th and 20th weeks, the indexes for the ganglioside treated group were higher (0.69, 0.8) than those of the

saline group (0.47, 0.73). On the 28th week, the index was lower for ganglioside group (0.38) than the saline (0.64) and diabetic (0.9) groups (Figure 2).

Apoptosis

Previous diabetes type 1 studies have suggested that Langerhans islets destruction is related to the cellular death induced by the Fas/Fas-L system [15-17]. The T cells activate Fas-L expression on the cell surface and following interaction with the Fas receptor present in islet beta cell, the apoptosis program is triggered. Our results suggest that the islets are preserved in ganglioside treated animals, as shown by the index and insulinitis score. The *in situ* apoptosis analysis, in the pancreas by the TUNEL method demonstrated a higher number of apoptotic cells in the ganglioside group than in the control group, particularly the inflammatory infiltrate surrounding the Langerhans islets (Figure 3, panel). We next addressed the gene expression of molecules related to cell death: the anti-apoptotic Bcl family protein Bcl-w, and the death molecule Fas and its ligand, Fas-L. The Bcl-w mRNA kinetics in pancreas islets from animals of the saline-treated group presented a significant increase ($p < 0.05$) until the 16th week, after which these levels gradually fell until the 28th week, when the levels were minimal. In contrast, ganglioside groups showed a slight increase in Bcl-w gene expression only at the 16th week.

The comparison of the levels of Bcl-w mRNA in Langerhans islets of experimental groups shows a significant increase ($p < 0.05$) in saline-treated animals from 8th to 16th weeks of life. In the 20th week both ganglioside and saline groups demonstrated similar values. The Bcl-w mRNA expression in diabetic animals exhibited significantly higher levels than in both experimental groups (saline and ganglioside). The kinetics

of Bcl-w mRNA expression in the ganglioside-treated group, show unchangeable levels, with a slight increase on the 16th week of life. In contrast, in the saline-treated group, these levels show a progressive increase until the 20th week of life, when a reduction in these levels was observed until the 28th week of life (figure 4).

The Fas and Fas-L are the effector molecules of the cell death program. The saline-treated animals showed significantly ($p<0.05$) higher levels of Fas mRNA in pancreatic islets than ganglioside-treated animals, with the exception of the 20th week, where the levels of Fas in the ganglioside group were higher than in the saline group. However, the ganglioside-treated group revealed constant levels during the experiment. The Fas gene expression in islets from diabetic animals was negligible (Figure 5).

The Fas-L gene expression in pancreatic islets from the saline group was significantly ($p<0.05$) higher from the 8th to 16th weeks and decreased after the 20th week, in comparison to the ganglioside group. In contrast, Fas-L mRNA expression in the ganglioside-treated group presented unchanged levels from the 8th to 28th weeks (Figure 6).

Discussion

In the present study, we evaluated the effect of exogenous treatment with gangliosides on diabetes incidence and its relationship with the insulinitis index, insulin synthesis, the apoptosis regulatory molecules expression and the occurrence of *in situ* cell death. Our results show a DM1 peak incidence during the 22nd week of life (71.47%) in the saline-treated group. After this period, the majority of remaining healthy animals will not present the disease. In contrast, the animal group treated with exogenous gangliosides did not present high glucose levels and DM1, suggesting immunosuppressive/modulation properties of these compounds.

The immunomodulatory action of gangliosides has been demonstrated in autoimmune diseases, leading to mild or clinical signs suppression, this action is related with CD4 molecule internalization and pro-inflammatory suppression [18-20]. Papaccio et al.[21] demonstrated that daily administration of 150mg/Kg in NOD mice between the 5th-21st weeks of life can reduce glucose serum levels. However, in their protocols, the authors considered 200 mg/dL of blood glucose levels as a set point for diabetes diagnosis and the sacrifice was realized earlier during the 21st week, which may be considered a premature period for analysis of the effect of gangliosides on diabetes incidence and, therefore, on the overall effects of the inflammatory process.

During the different stages of diabetes, insulinitis progressively undergoes a qualitative change from a relatively benign infiltration to a harmful injury associated with beta cell apoptosis that results in hyperglycemia [22].

In the present study, the DM1 clinical manifestation was supported by the morphological insulinitis index. The diabetic animals exhibited an index of close to 1

(indicative of total islet injury) at the 16th and 20th weeks of life and did not survive until the 28th week of life. On the 20th week of life, all treated animals (saline or ganglioside treated groups) showed a similar injury index (0.8). However, in contrast to the saline group, sacrificed on the 28th week of life, the ganglioside-treated group exhibited a significant decrease in injury index. These results suggest two different situations: first, that the non diabetic animals from the saline group, sacrificed on the 28th week of life and presenting an insulinitis index of near to 0.6, are in the resistance range of the disease expression (approximately 30%). Secondly, for ganglioside-treated animals, the improvement in the insulinitis index suggests the participation of gangliosides in mechanisms of survival, maintaining function of islets and inhibiting the installation of the DM1. Moreover, our results demonstrate the progression of the insulinitis index in relation to the kinetics of apoptosis regulation molecules. Thus, our data suggest that there is a point in time between the 16th and 20th weeks that may be a “time of decision”, after which the animals will not develop the diabetes type 1.

The beta cells apoptosis occurrence is currently associated with beta cell destruction; however the onset events are difficult to demonstrate due to the rapid removal of cells [23]. The analyses of *in situ* cell death in pancreas from non diabetic animals in the saline group sacrificed on the 28th week of life demonstrates a low TUNEL⁺ cell number, a high number of these cells in diabetic animals, and a substantial high number of TUNEL⁺ cells for the ganglioside-treated group. This apparent discrepancy could suggest that these TUNEL⁺ cells migrated to the islets may be of mononuclear origin.

The islet injury seen may reflect the expression of apoptosis molecules. The Bcl-w gene expression was increased in animals from the saline group and diabetic animals, compared to the gangliosides treated group. In contrast, in animals treated with gangliosides, these levels are unchanged. The over expression of Bcl-w has been shown after several apoptotic stimuli. Following synthesis, endogenous and over expressed Bcl-w becomes inserted into the mitochondrial membrane where it is believed that various members of the Bcl-2 protein family can interact with one another. Thus, it has been hypothesized that, through such heterotypic interactions, each protein might be able to modulate the activity of its counter protein and thereby affect the overall cellular sensitivity to apoptosis [24-26].

The saline-treated group exhibited significantly higher levels of Fas-L mRNA than the ganglioside-treated group until the 16th week of life. The results obtained in diabetic animals support the idea that Fas-L may be involved in islet injury, since this molecule is significantly increased in these animals. The low expression of Fas-L mRNA in the pancreatic islets from ganglioside-treated animals suggests that these animals were not exposed, or became resistant, to the inflammatory factors or process, in turn inducing apoptosis.

Studies have suggested that an imbalance in Fas/Fas-L expression is related to disease manifestation via Fas-L/Fas⁺ cells induced beta cell death. There was an obvious positive correlation between the insulinitis score and the increase in Fas/FasL⁺ islet cells [27].

Fas expression may be observed in insulin-producing beta cells in the pancreas, in both humans and mice. However, its participation in autoimmune diabetes

development remains controversial [3]. Another important mechanism of cell death in type 1 diabetes is related to pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 beta, IFN-gamma and TNF-alpha, released during autoimmune attacks by autoreactive T cells, triggering cell death signaling cascades or apoptosis induced by T-cell effectors following Fas/FasL interaction and the perforin/granzyme [28]. These events may induce I-kappaB degradation and NF-kappaB translocation to the nucleus, where they may regulate 66 cytokine-induced genes [29-32].

Gangliosides may lead to NF-kappaB degradation, activating the mitochondrial pathway of apoptosis in T cells. In addition, gangliosides can induce mitochondrial permeability pore transition (MPPT) from T cell mitochondria, in turn activating caspases [33,34]. Furthermore, these compounds can initiate the suicide signal in T lymphocytes by inducing the caspase cascade, or possibly other proteases, which degrade free active NF-kappaB following cellular stimulation, down regulating the expression of the anti-apoptotic machinery necessary to prevent the caspase cascade from progressing towards cell death [35].

The autoimmune response in type 1 diabetes may be modulated by NF-kappaB nucleus translocation [36]. The *c-Rel*/NF-kappaB binding to the DNA sequence (the kappaB site located in the promoter regions of target genes) may regulate activation, cytokine secretion and differentiation of autoreactive immune cells and, consequently, promote and prevent the resolution of inflammatory lesions in the pancreatic islets [37]. Furthermore, the inflammatory response and cell survival genes can be modulated by NF-kappaB, preventing apoptosis by the Bcl-2 anti-apoptotic family

protein up regulation and cellular inhibitors of apoptosis (cIAPs) in activating T cells [38].

Previous results in our laboratory suggest that the treatment with ganglioside suppresses the pro-inflammatory cytokines IL-1 beta, IFN-gamma and TNF-alpha expression in the NOD mice model of type 1 diabetes mellitus (data not yet published). These observations agree with the cytokines profile in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a paradigm in multiple sclerosis. We observed a decrease in pro-inflammatory cytokines and an increase in anti-inflammatory cytokines, correlated with an *in vitro* reduction in spleen cell viability [39].

The suppression of pro-inflammatory cytokines by gangliosides take place on transcriptional level, preventing the generation of mRNA encoding, without altering the mRNA transcription of Th2/Th3 cytokines, and blocking the nuclear localization of NF-kappaB in T cells [40]. Type 1 diabetes is an assembly of many factors that contribute to pancreatic beta cell injury. Soluble molecules, such as pro-inflammatory cytokines released by infiltrative autoreactive T cells, participate in beta cell injury, which down regulates its metabolism with maintenance of insulin production. Nonetheless, this highly specialized cell has a particular apoptosis susceptibility, making its more sensitive to high levels of glucose, toxins and cytokines [41,28,29].

The present study suggests that the ganglioside may interfere in the auto-destruction process acting on both beta cells and effector T cells. Their action can protect the cell from cell death induction by inflammatory processes, particularly at dorsal root ganglion neurons, where gangliosides can rescue these cells from apoptosis.

Conversely, these compounds have a specific cell type effect, and can suppress the autoimmune response acting on the autoreactive T cell [42].

References

- [1] Apostolou I, Hao Z, Rajewsky K, von Boehmer H. Effective destruction of Fas-deficient insulin-producing beta cells in type 1 diabetes. *J Exp Med* 2003;198:1103-06.
- [2] Suarez-Pinzon WL, Power RF, Rabinovitch A. Fas ligand-mediated mechanisms are involved in autoimmune destruction of islet beta cells in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 2000;43:1149-56.
- [3] Savinov AY, Tcherepanov A, Green EA, Flavell RA, Chervonsky AV. Contribution of Fas to diabetes development. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:628-32.
- [4] Lincz L. Deciphering the apoptotic pathway: all roads leads to death. *Immunol Cell Biol* 1998;76:1-19.
- [5] Sgonc R and Gruber J. Apoptosis detection: an overview. *Exp Ger* 1998;33:525-33.
- [6] Otton R, Soriano FG, Verlengia R, Curi R. Diabetes induces apoptosis in lymphocytes. *J Endocrinol* 2004;182:145-56.
- [7] Hakamori S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10231-3.
- [8] Hakomori S, Igahashi Y. Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling. *J Biochem* 1995;118:1091-1103.
- [9] Bergelson LD. Serum gangliosides as endogenous immunomodulators. *Immunol Today* 1995;10:483-6.
- [10] Leiter, EH. The NOD mouse: a model for insulin-dependent Diabetes mellitus. *Current Protocols in Immunology* 1997;24:15.9.1-23.

- [11] Boschero AC, Delattre E, Santos ML. Inhibition of insulin release by the aminoglycoside antibiotic sisomycin. *Horm Metab Res* 1981;13(9):531-32.
- [12] Ventura-Oliveira D, Vilella CA, Zanin ME, Castro GM, Moreira Filho DC, Zollner RL. Kinetics of TNF-alpha and IFN-gamma mRNA expression in islet and spleen of NOD mice. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:1347-55.
- [13] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
- [14] 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;35(3):289-95.
- [15] Kreuwel HTC, Morgan DJ, Krah T, Ko A, Sarvetnick N, Sherman LA. Comparing the relative role of perforin/granzyme versus Fas/Fas ligand cytotoxic pathways in CD8⁺ T cell-mediated insulin-dependent Diabetes Mellitus. *J Immunol* 1999;163:4335-41.
- [16] Su X, Hu Q, Kristan JM, Costa C, Shen Y, Gero D, Matis LA, Wang Y. Significant role for fas in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *J Immunol* 2000;164:2523-32.
- [17] Kim S, Kim K, Hwang D, Lee TH, Kayagaki N, Yagita H, Lee M. Inhibition of autoimmune diabetes by Fas ligand: the paradox is solved. *J Immunol* 2000;164:2931-36.
- [18] Shimada K, Koh CS, Uemura KI, Yanagisawa N. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats by administration of gangliosides. *Cell Immunol* 1994;154:231-9.

- [19] Inoue A, Koh CS, Yahagisawa N, Taketomi T, Ishihara Y. Suppression of Theiller's murine encephalomyelitis virus induced demyelinating disease by administration of gangliosides. *J Neuroimmunol* 1996;64:45-53.
- [20] Sekigushi Y, Ichikawa M, Inoue A, Itoh M, Koh CS. Brain-derived gangliosides suppress the chronic relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis in NOD mice induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide. *J Neuroimmunol* 2001;116:196-205.
- [21] Papaccio G, Chieffi Baccari G, Mezzogiorno V. In vivo effect of gangliosides on Non-obese diabetic mice. *Acta Anat* 1993;147:168-73.
- [22] Vukkadapu SS, Belli JM, Ishii K, Jegga AG, Hutton JJ, Aronow BJ, Katz JD. Dynamic interaction between T cell-mediated beta-cell damage and beta-cell repair in the run up to autoimmune diabetes of the NOD mouse. *Physiol Geomics* 2005;21:201-11.
- [23] Augstein P, Elefanty AG, Allison J, Harrison LC. Apoptosis and beta-cell destruction in pancreatic islets of NOD mice with spontaneous and cyclophosphamide-accelerated diabetes. *Diabetologia* 1998;41:1381-88.
- [24] Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 2003;39:615-47.
- [25] Takahashi A, Masuda A, Sun M, Centonze VE, Herman B. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pH_m). *Brain Res Bull* 2003;62:497-504.
- [26] Kaufmann T, Schinzel A, Borner C. Bcl-w(edding) with mitochondria. *Trends Cell Biol* 2004;14:8-12.

- [27] Cao J, Wang H. Role of Fas-FasL in insulinitis in nonobese diabetic mouse. *Chin Med J* 2004;117:615-7.
- [28] Mandrup-Poulsen T. Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1433-40.
- [29] Silva D, Petrovsky N. Identification of key beta-cell gene signaling pathway involved in type 1 diabetes. *Ann NY Acad Sci* 2004;1037:203-07.
- [30] Lee M, Chang I, Kim S. Death effectors of beta-cell apoptosis in type 1 diabetes. *Mol Gen Metab* 2004;83:82-92.
- [31] Cardozo AK, Ortis F, Storling J, Feng YM, Rasschaert J, Tonnesen M, Van Eylen F, Mandrup-Poulsen T, Herchuelz A, Eizirik DL. Cytokines downregulate the sarcoendoplasmic reticulum pump Ca^{2+} ATPase 2b and deplete endoplasmic reticulum Ca^{2+} , leading to induction of endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2005;54(2):452-61.
- [32] Pappacio G, Graziano A, D'Aquino R, Valiante S, Naro F. A biphasic role of nuclear transcription factor (NF)- κ B in the islet beta-cell apoptosis induced by interleukin (IL)-1 β . *J Cell Physiol* 2005;204:124-130.
- [33] Thornton MV, Kudo D, Rayman P, Horton C, Molto L, Cathcart MK, et al. Degradation of NF- κ B in T cells by gangliosides expressed on renal cell carcinomas. *J Immunol* 2004;172:3480-90.
- [34] Kristal BS, Brown AM. Apoptogenic ganglioside GD3 directly induces the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 1999;274:23169-75.
- [35] Ng CS, Novick AC, Tannenbaum CS, Bukoski RM, Finke, JH. Mechanism of immune evasion by renal cell carcinoma: tumor-induced T-lymphocyte apoptosis and NF- κ B suppression. *Urology* 2002;59:9-14.

- [36] Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death – the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 2001;44:2115-33.
- [37] Lamhamedi-Cherradi S, Zheng S, Hilliard BA, Xu L, Sun J, Alsheadat S, et al. Transcriptional regulation of type I diabetes by NF-kappaB. *J Immunol* 2003;171:4886-92.
- [38] Sonenshein GE. Rel/NF-kappa B transcription factors and the control of apoptosis. *Semin Cancer Biol* 1997;8:113-9.
- [39] Monteiro de Castro G, Zanin ME, Ventura-Oliveira D, Vilella CA, Ashimine R, Zollner RL. Th1 and Th2 cytokine immunomodulation by gangliosides in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cytokine* 2004;26:155-63.
- [40] Irani DN, Lin K, Griffin DE. Brain-derived regulate the cytokine production and proliferation of activated T cells. *J Immunol* 1996;157:4333-40.
- [41] Kaiser N, Leibowitz G, Nesher R. Glucotoxicity and beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2003;16:5-22.
- [42] Ariga T, Jarvis WD, Yu RK. Role of sphingolipid-mediated cell death in neurodegenerative diseases. *J Lipid Res* 1998;39:1-16.

Legends

Figure 1. Cumulative frequency of Diabetes mellitus in NOD mice treated with gangliosides and saline. The manifestation of the disease begins approximately at 10th week of life in the animals from the saline-treated group. The incidence progressively increases until 22nd week. The percentage of 71.4% found to saline group reproduce the expectation frequency for the colony. The animals treated with gangliosídeos, however, did not manifest the disease.

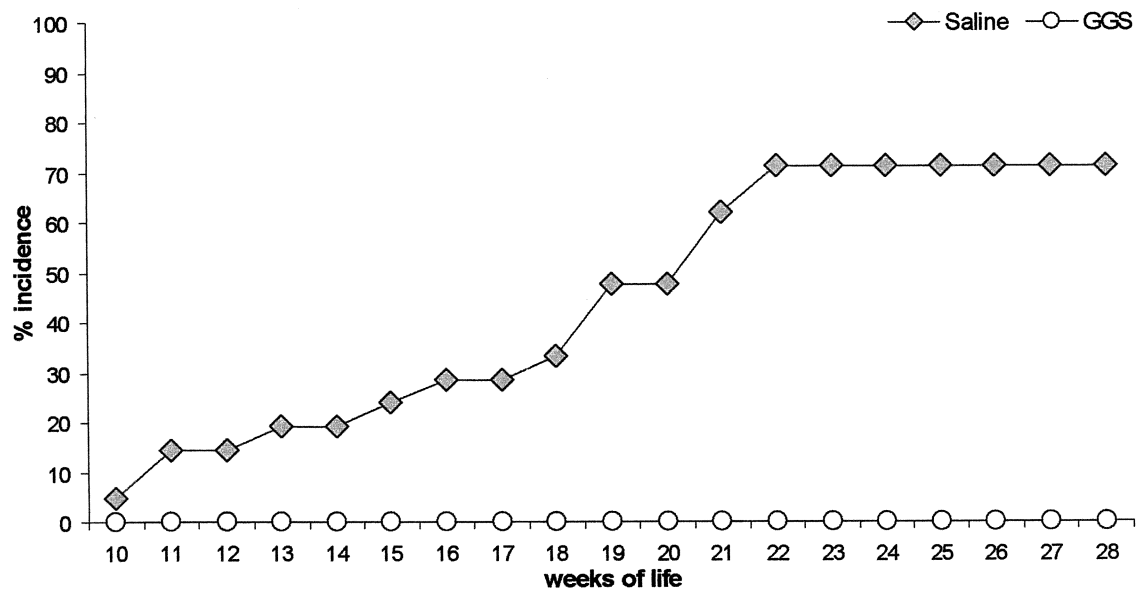


Figure 2 Insulinitis index. The indexes demonstrate that the gangliosides treated-animal present smaller index than animals from the control group during the analyzed period. However, from the 16th to 20th week of life, there is an increase in the insulinitis index for all animals, treated or not, exhibiting level near to those observed in the diabetic animals. However, at the 28th week of life, the gangliosides-treated animals exhibit index smaller than the animals from the saline and diabetic group.

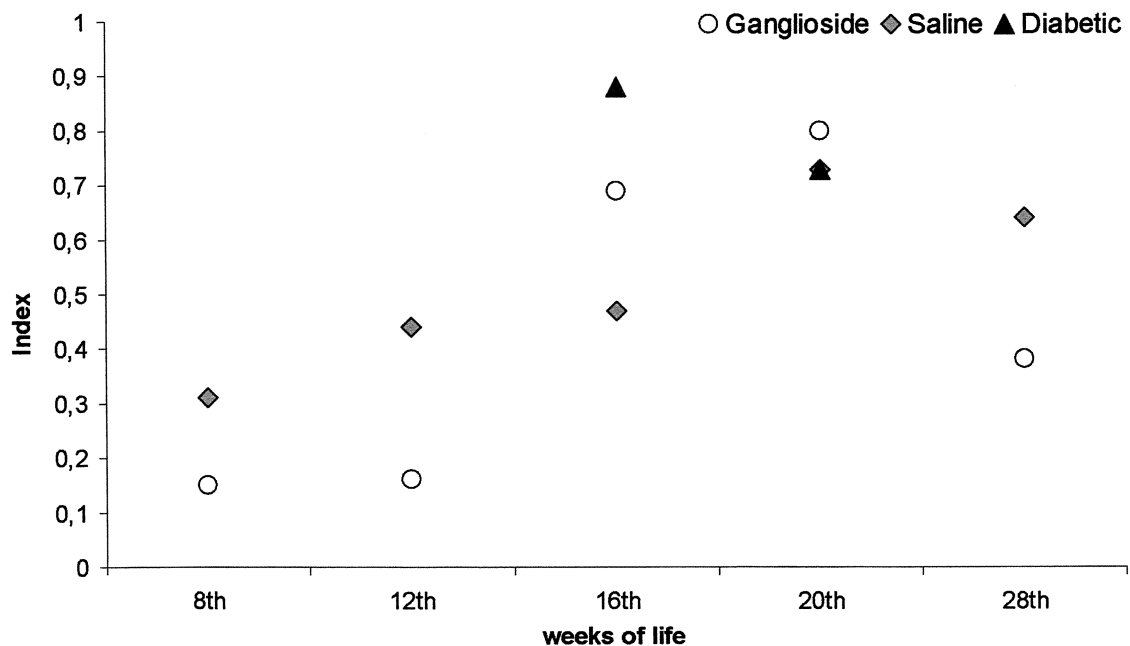


Figure 3. TUNEL : *In situ* Apoptosis Detection in pancreas.

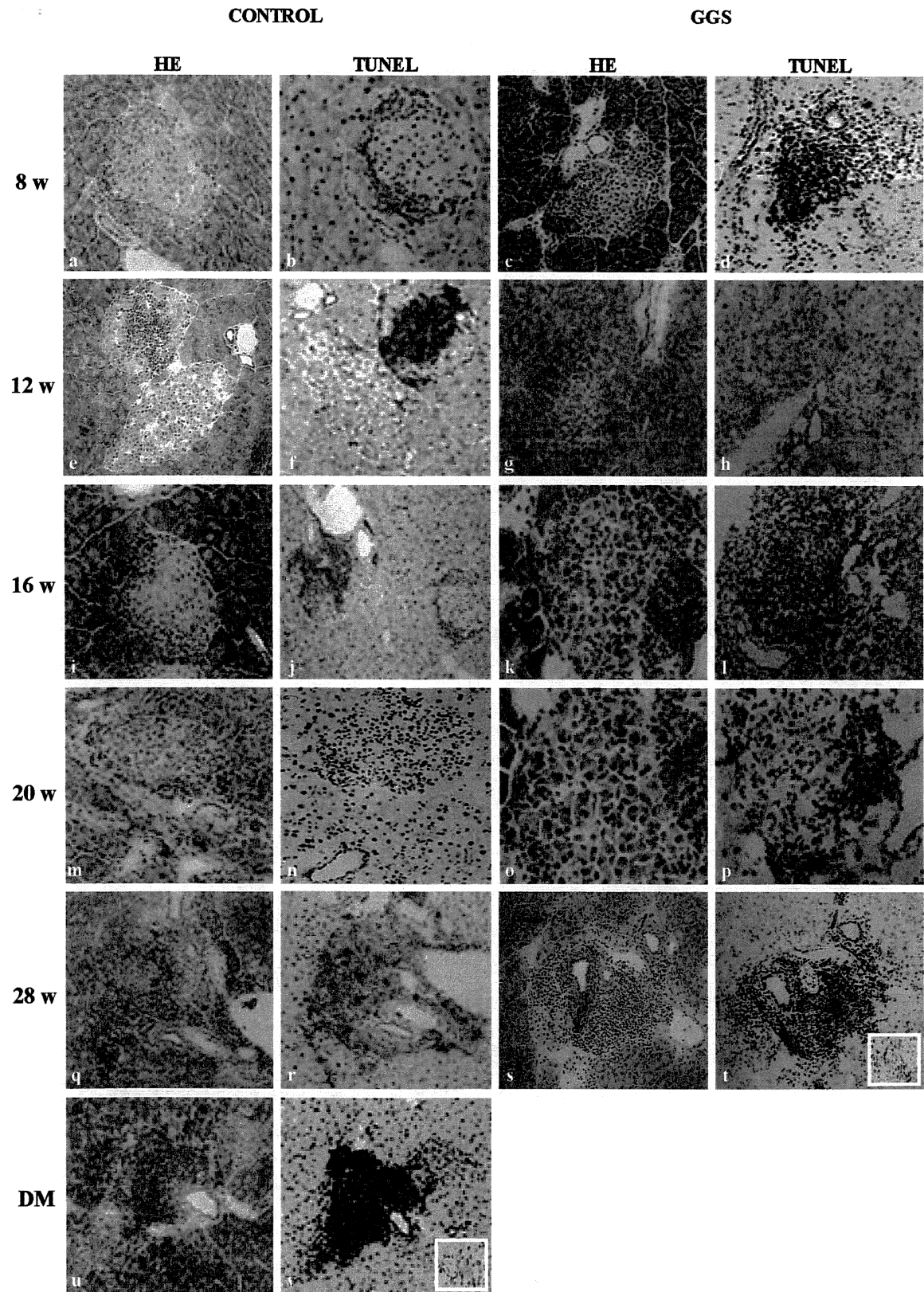


Figure 4. Expression of Bcl-w mRNA in pancreatic islets from animals treated with gangliosides or saline for 28 weeks. Islets were isolated from mice sacrificed after 28 weeks of saline or gangliosides treatment and from diabetic animals. The pattern of Bcl-w expression varies, but shows that its levels are significantly higher for diabetic animals than animals treated with gangliosides or saline-treated non-diabetics at 28th week. **AU**=arbitrary units, mRNA levels was normalized by cyclophilin mRNA level, quantified by digital image analyzer. Values are means $\pm$ SEM of three separate experiments using pancreatic islets from three different donors. Comparisons of results were analyzed using Kruskal-Wallis (non-parametric ANOVA). Values of $p \leq 0.05$ were considered as indicative of significance.

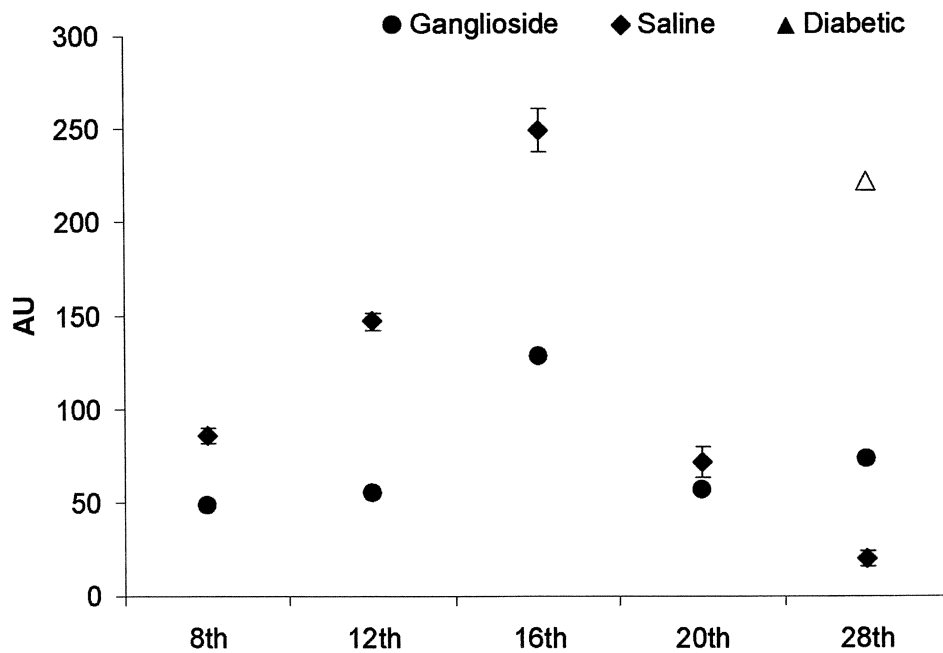


Figure 5. Expression of Fas mRNA in pancreatic islets from animals treated with gangliosides or saline for 28 weeks. Islets were isolated from mice sacrificed after 28 weeks of saline or gangliosides treatment and from diabetic animals. The pattern of Fas expression shows low and unchanged levels. In opposite, for saline group the levels are significantly increase at 12th, 16th and 28th week. **AU**=arbitrary units, mRNA levels was normalized by cyclophilin mRNA level, quantified by digital image analyzer. Values are means $\pm$ SEM of three separate experiments using pancreatic islets and spleen cells from three different donors. Comparisons of results were analyzed using Kruskal-Wallis (non-parametric ANOVA). Values of $p \leq 0.05$ were considered as indicative of significance.

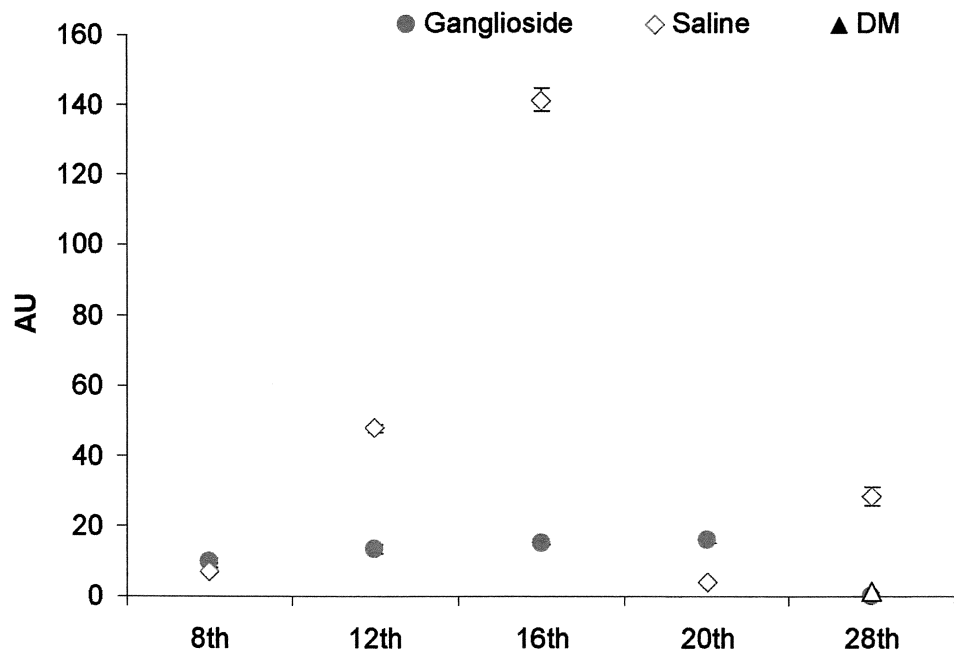


Figure 6. Expression of Fas-L mRNA in pancreatic islets from animals treated with gangliosides or saline for 28 weeks. Islets were isolated from mice sacrificed after 28 weeks of saline or gangliosides treatment and from diabetic animals. The pattern Fas-L expression for gangliosides group shows lower levels from 8th to 16th week th saline-group with slighter increase at 20th week. The diabetic animals show higher levels of Fas-L than both gangliosides and saline treated animals. **AU**=arbitrary units, mRNA levels was normalized by cyclophilin mRNA level , quantified by digital image analyzer. Values are means $\pm$ SEM of three separate experiments using pancreatic islets and spleen cells from three different donors. Comparisons of results were analyzed using Kruskal-Wallis (non-parametric ANOVA). Values of $p \leq 0.05$ were considered as indicative of significance.

