



LUÍS GUILHERME STIVANIN SILVA

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE FATORES DE
REGENERAÇÃO/CRESCIMENTO EM ILHOTAS E TECIDO
ACINAR PANCREÁTICO DE CAMUNDONGOS NOD (NON-
OBESE DIABETIC) TRATADOS COM GANGLIOSÍDEOS**

**MODULATION OF REGENERATION/GROWTH FACTORS
EXPRESSION IN PANCREATIC EXOCRINE AND
ENDOCRINE TISSUE OF NOD (NON-OBESE DIABETIC)
MICE TREATED WITH GANGLIOSIDES**

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

LUÍS GUILHERME STIVANIN SILVA

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE FATORES DE REGENERAÇÃO/CRESCIMENTO
EM ILHOTAS E TECIDO ACINAR PANCREÁTICO DE CAMUNDONGOS NOD (NON-
OBESE DIABETIC) TRATADOS COM GANGLIOSÍDEOS**

**MODULATION OF REGENERATION/GROWTH FACTORS EXPRESSION IN
PANCREATIC EXOCRINE AND ENDOCRINE TISSUE OF NOD (NON-OBESE
DIABETIC) MICE TREATED WITH GANGLIOSIDES**

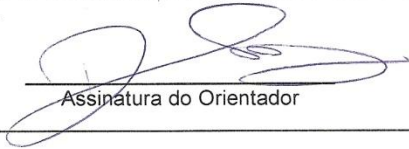
Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica.

Masters dissertation presented to the College of Medical Sciences of the State University of Campinas – UNICAMP to obtain the title of Master in Clinical Medicine

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Tutor: Associate Professor Ricardo de Lima Zollner

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO LUÍS GUILHERME STIVANIN SILVA E ORIENTADA PELO PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER.



Assinatura do Orientador

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Si38m Silva, Luís Guilherme Stivanin, 1985 -
Modulação da expressão de fatores de
regeneração/crescimento em ilhotas e tecido acinar
pancreático de camundongos NOD (non-obese diabetic)
tratados com gangliosídeos / Luís Guilherme Stivanin
Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2012.

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

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

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Modulation of regeneration/growth factors expression in pancreatic exocrine and endocrine tissue of NOD (non-obese diabetic) mice treated with gangliosides.

Palavras-chave em inglês:

Gangliosides

Diabetes Mellitus Type 1

NOD mice

Inflammation

Área de concentração: Ciências Básicas

Titulação: mestre em Clínica Médica

Banca examinadora:

Ricardo de Lima Zollner [Orientador]

Mário José Abdalla Saad

Patrícia de Oliveira Prada

Data da defesa: 13-07-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

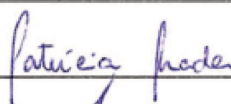
Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Luís Guilherme Stivanin Silva

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Membros:

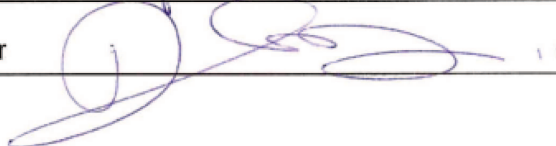
1. Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Prada



2. Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad



3. Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner



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

Data: 13/07/2012

Dedico

*A todos os portadores de
Diabetes Mellitus Tipo 1 e, em
especial, ao meu avô Waldir da
Silva.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner pela orientação, pelo incentivo e pela confiança em meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor doutor Mário José Abdalla Saad e à professora doutora Patrícia de Oliveira Prada por aceitarem compor a presente banca.

A todos os amigos e companheiros de trabalho do LIAE: Dona Margarida (Meg), Conceição, Talita, Natália, Cínthia, Nayara, Daniella, Denise, Nayara, Renata, Luiz Felipe, Karla, Giovanna e Camila. Agradeço a todos vocês pela ajuda, pela solicites, pelo carinho e pela amizade.

Ao Dr. José Gontijo pelo uso do laboratório.

A TRB Pharma, que gentilmente nos forneceu os gangliosídeos utilizados no presente estudo.

A FAPESP e ao CNPQ pelo financiamento desta pesquisa.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
1 – INTRODUÇÃO	15
1.1. Linhagem de camundongos NOD.....	16
1.2. Gangliosídeos	16
1.3. Regeneração de células β pancreáticas	18
1.4. Neoformação de ilhotas pancreáticas	19
1.5. Mecanismos celulares envolvidos na diferenciação de células β	20
1.6. Embriogênese do pâncreas e fatores de regeneração Ngn3, PDX-1 e GLP-1	22
2 – OBJETIVOS	25
2.1. Objetivos gerais	26
2.2. Objetivos específicos	26
3 – MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Animais	28
3.2. Extração de ilhotas pancreáticas	28
3.3. Avaliação histológica	30
3.4. Imunofenotipificação	31
3.5. Extração de RNA Total (TRNA).....	32
3.6. Avaliação quantitativa em reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real	32
3.7. Níveis Séricos de insulina	34
3.8. Técnica TUNEL para detecção de apoptose	34
3.9. Análise dos dados	35
4- RESULTADOS	36
4.1. Frequência cumulativa do diabetes	37
4.2. Níveis séricos de insulina e glicose	37

4.3.	Graus de infiltrado nas ilhotas pancreáticas	41
4.4.	Índice de infiltrado celular nas ilhotas pancreáticas	43
4.5.	Fenotipificação do infiltrado celular nas ilhotas pancreáticas	43
4.6.	Fenotipificação dos fatores de regeneração GLP-1; PDX1; Ngn3; IA1, além de Peptídeo C.....	46
4.7.	Expressão gênica de insulina e dos fatores de regeneração GLP-1; PDX1 e NGN3 em ilhotas pancreáticas empregando a técnica de RT-PCR one step em tempo real	60
4.8.	Fenotipificação celular endócrina pancreática por dupla marcação para avaliação de sobreposição com anticorpos anti-GLP-1 com anti-insulina, anti-glucagon e anti-somatostatina	60
4.9.	Análise <i>in situ</i> de apoptose pela técnica de túnel em ilhotas pancreáticas dos animais tratados	71
5-	DISCUSSÃO	74
6-	CONCLUSÕES	85
7-	CONSIDERAÇÕES GERAIS	87
8 -	REFERÊNCIAS	91

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	Dna Complementar
CEMIB	Centro de Bioterismo da Unicamp
DABCO	1,4Diazabicyclo(2,2,2)octano
DM1	Diabetes mellitus Tipo 1
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DUTP	Dexoxiuridina trifosfato biotinilada
FITC	Fluoresceína isotiocianato
GGs	Mistura de gangliosídeos
GM1 28s	Grupo GM1 com 28 semanas
GM1 32s	Grupo GM1 com 32 semanas
GGs 28s	Grupo GGs com 28 semanas
GGs 32s	Grupo GGs com 32 semanas
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GM1	Monossialotetraexosilgangliosídeo
GM1 DM	Grupo GM1 diabético
GM1 ND	Grupo GM1 não-diabético
HE	Hematoxilina-Eosina
IA-1	Insulinoma associated-1
ICA	Islet cell antigen
LIAE	Laboratório de imunologia e alergia experimental
NGF	Nerve growth factor
Ngn3	Neurogenin 3
NOD	Non-obese diabetic

PBS	Salina fosfatada tamponada
PDX-1	Pancreatic and duodenal homeobox-1
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	Reação de polimerase em cadeia em Tempo Real
Salina DB	Grupo Salina diabético
Salina ND	Grupo Salina não-diabético
TdT	Terminal Desoxinucleotidil transferase
TR	Texas Red
TrkA	Tyrosine receptor kinase A
TUNEL	Terminal Desoxinucleotidyl transferase dUTP nick-end labelling

RESUMO

Empregando as linhagens de camundongos NOD (non-obese diabetic) de desenvolvimento espontâneo do diabetes mellitus tipo 1 e BALB/c como linhagem controle, administrou-se exogenamente gangliosídeo GM1, mistura de gangliosídeos (GGs) (GM1 21%, GD1a 40%, GD1b 16%, GT1b 19%) e solução salina (0,9% NaCl) estéril da 4ª à 28ª semana de vida. Os efeitos da administração dos gangliosídeos sobre a frequência da manifestação do diabetes, índice de insulite, imunofenotipificação e atividade apoptótica de células presentes em ilhotas pancreáticas de NOD foram verificados por meio de análise glicêmica semanal, técnica colorimétrica com Eosina-Hematoxilina, imunofluorescência e TUNEL. A expressão gênica e os níveis séricos de insulina, além das expressões celular protéica e gênica dos fatores de regeneração GLP-1, PDX-1 e Ngn3 nos tecidos pancreáticos de BALB/c e NOD foram analisados por meio de ELISA, imunofluorescência e RT-PCR em tempo real. Após 28 semanas de tratamento, pôde-se verificar que os animais tratados com GM1 reduziram o diabetes de 70% observado nos animais controle salina, para 38%. Os animais tratados com GGs não apresentaram diabetes. O índice de insulite estava diminuído nos animais tratados com GM1 ($p=0.09$), GGs ($p=0.004$) e salina não-diabético (ND) ($p=0.02$) em relação ao grupo salina diabético (DM). O número de células apoptóticas nas ilhotas dos grupos NOD salina ND e NOD DM estava aumentado em relação aos grupos tratados com GM1 e GGs. Os níveis de insulina sérica estavam aumentados nos grupos BALB/c GGs ($p=0.01$) e BALB/c GM1 ($p=0.03$) em relação ao grupo BALB/c salina e nos grupos NOD GGs ($p=0.008$) e NOD salina ND ($p=0.01$) em relação ao grupo diabético. Por outro lado, os níveis de expressão gênica de insulina no grupo NOD GM1 ($p=0.02$) estavam aumentados em relação ao grupo salina. Quanto às expressões protéicas de GLP-1, PDX-1 e Ngn3, em ilhotas pancreáticas e tecido acinar, verificamos aumento no grupo NOD tratado com GGs. O conjunto dos resultados demonstra que os gangliosídeos diminuem a manifestação do diabetes espontâneo na linhagem NOD. Hipotetizamos que uma das propriedades dos gangliosídeos estudados é a de estimular a expressão de GLP-1, PDX-1 e Ngn3 em células do tecido acinar e em células da linhagem endócrina nas ilhotas pancreáticas dos animais tratados seja

NOD ou BALB/c. Desta forma abrem-se novas frentes de estudos das propriedades antiinflamatórias e possivelmente regenerativas dos gangliosídeos.

ABSTRACT

In the present study we evaluate the properties of GM1 and GGs (21% GM1, 40% GD1a 16% GD1b, 19%GT1b) in NOD (non-obese diabetic) mice and BALB/c as a control lineage. Animals of both lineages were treated with GM1, GGs or saline from 4th to the 28th weeks of life. The ganglioside-treated NOD mice demonstrated a decrease in insulitis compared with saline-treated mice: 70% of saline control animals, 38% of GM1 group and 0% of GGs group. GLP-1 gene expression was increased in GM1-treated BALB/c and in GGs-treated NOD groups in comparison to the saline groups. Insulin gene expression was increased only in the GM1-treated NOD group. Serum insulin levels were increased in ganglioside-treated BALB/c and NOD groups. In the islets, the cell co-labeling of Insulin/GLP1 and somatostatin/GLP1 was increased in NOD and BALB/c gangliosides-treated mice compared to saline-treated mice. PDX-1 and Ngn3 protein expression were increased in pancreatic islets and exocrine tissues of GGs treated NOD mice in comparison to the saline treated group. Results suggest that gangliosides have modulatory properties, decreasing the insulitis score, maintaining of insulin levels, increasing GLP-1 protein expression in β and δ pancreatic cells and retarding diabetes onset in NOD mice. Similarly to observation in neural tissue, the gangliosides studied could contribute to islets survival. We hypothesize that ganglioside play a role stimulating growth factor expression GLP-1, PDX-1 and Ngn3 in the cells from acinar tissue and islets cells.

1-Introdução

1.1. Linhagem de camundongos NOD

A natureza autoimune do processo de lesão do pâncreas endócrino no diabetes mellitus tipo 1 (DM1) 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 ativação de linfócitos auto-reativos indutores da destruição das células β pancreáticas. Este modelo tem fornecido subsídios importantes no entendimento de mecanismos imunes reguladores e para o desenvolvimento de novas terapias [1, 2]. No Brasil, a primeira colônia de camundongos NOD foi introduzida e implantada por Pavin & Zollner (1994) [3] e atualmente estabelecida no CEMIB da Universidade Estadual de Campinas. Estes animais, provenientes do Hospital Necker (Paris, INSERM U-25) pertenciam à linhagem que apresentava DM1 espontâneo em 55% das fêmeas e menos de 5% nos machos, ambos analisados com 25 semanas de idade. Atualmente a linhagem NOD-uni manifesta o diabetes entre 60-90% nas fêmeas e 0 e 50% nos machos. A expressão do DM1 espontânea neste modelo animal é caracterizada em dois períodos: o primeiro corresponde à insulite, caracterizada por infiltração progressiva nas ilhotas de Langerhans por células mononucleares (inicialmente linfócitos TCD4+ e, posteriormente, TCD8+). Este período se inicia ao redor da quarta semana de vida. O segundo período, posterior à insulite, é caracterizado pela destruição de células β pancreáticas produtoras de insulina [4].

As investigações de terapias para o DM1 baseadas na intervenção sobre o sistema imunológico revelam que estas podem ser estratégias promissoras para impedir a instalação ou evolução da doença. O estudo de substâncias com propriedades imunomodulatórias tem atraído o interesse de vários grupos de pesquisa e, dentre estas substâncias, destacamos os gangliosídeos [1, 5], foco de estudo do presente trabalho.

1.2. Gangliosídeos

Os gangliosídeos são componentes das membranas plasmáticas da maioria dos tipos celulares eucarióticos e estão dispostos em praticamente todos os tecidos do corpo. Os subtipos prevalentes no sistema nervoso, onde os gangliosídeos são mais abundantemente expressos, são: GM1, GD1a, GD1b e GT1b. Gangliosídeos são glicoesfingolipídeos formados por uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica. A porção hidrofóbica é constituída por ceramida, mergulhada no folheto externo da bicamada lipídica celular, e a porção hidrofílica, por sua vez, é formada por cadeia de carboidratos contendo uma ou mais moléculas de ácido N-acetilneuroamínico, também conhecido como ácido siálico (NANA) [5, 6]. Os gangliosídeos estão concentrados em microdomínios lipídicos na membrana plasmática, denominados lipid rafts, sendo encontrados também no meio intracelular [7, 8].

Em 1985, Nayak et al. [9] relataram que o antígeno alvo do anticorpo anti-citoplasma de células β das ilhotas pancreáticas (ICA) era um sialoglicoconjugado. Três anos depois, Colman et al. [10] verificaram bloqueio dose-dependente da ligação dos ICA a células β pancreáticas por uma fração de monogangliosídeo em secções de pâncreas humanos. Dotta et al. [11], ao analisarem pâncreas humanos e murinos (NOD e C57BL/10), notaram elevada expressão do gangliosídeo GM2-1 nas ilhotas pancreáticas e escassa expressão deste gangliosídeo no tecido exócrino dos pâncreas analisados. Observaram, ainda, redução da expressão dos gangliosídeos GM2-1 e GM3 nos camundongos NOD estudados, associando o avanço da idade dos animais e o início do diabetes à diminuição da expressão destes gangliosídeos. Por fim, os autores sugeriram participação do monosialogangliosídeo GM2-1 como antígeno alvo dos ICA. Em seu conjunto, essas observações estimularam o estudo da participação dos gangliosídeos como imunomoduladores e seu potencial na terapêutica dos distúrbios imunológicos [12]. Baseados nessa premissa, Wilbertz et al. [13] trataram camundongos NOD com gangliosídeos e verificaram diminuição na incidência do DM1 em camundongos fêmeas tratadas a partir da quarta semana de vida. Papaccio et al. [14], ao administrarem mistura de gangliosídeos (GM1, GD1a, GD1b e GT1b)

nesta mesma linhagem experimental, verificaram diminuição dos níveis glicêmicos e retardo na instalação do diabetes clínico nos animais tratados.

Encorajados por resultados obtidos, nosso grupo mantém estudos voltados para os mecanismos de atuação dos gangliosídeos na modulação da expressão do DM1 [15] e em outros modelos [16]. Além disso, finalizamos trabalho empregando mistura de gangliosídeos (GM1, GD1a, GD1b e GT1b) e não GM1 isolado em camundongos NOD, demonstrando que sua administração controla a expressão do diabetes em praticamente todos os animais estudados (manuscrito em revisão para publicação). Estes resultados mostram que a administração exógena de gangliosídeos a partir da 4ª semana de vida, em fêmeas NOD, apesar da insulite progressiva verificada no pâncreas endócrino, mantém os níveis glicêmicos destes animais.

A sobrevivência e as funções das células β dependem fortemente de nutrientes e de fatores de crescimento como a glicose e o NGF (fator de crescimento neural), respectivamente. Tratamento de camundongos NOD com GM1 (da 4ª à 28ª semana de vida) mostram que este gangliosídeo na dose diária de 100mg/kg é capaz de reduzir a incidência do diabetes, visto que 56% dos animais tratados manifestaram a doença, contrastando com os animais do grupo controle salina, cuja incidência de DM1 foi de 75% [15].

Em 2003, estudo com camundongos NOD fêmeas relatou presença de linfócitos T autoreativos para as proteínas GAD65 e S100 β encontradas tanto nas células de Schwann, que revestem as ilhotas pancreáticas, quanto nas células β produtoras de insulina [1]. Estes achados revelam similaridades entre células pancreáticas e neurônios, sugerindo que estes tipos celulares podem dividir os mesmos fatores de crescimento e diferenciação [2].

Em estudos prévios, Rosenbaum et al. [17] demonstraram que cultura de células β pancreáticas previamente isoladas de ratos Wistar, tratadas com NGF endógeno, aumenta a secreção de insulina e a atividade dos canais de Ca^{2+} . A ligação entre NGF e seu receptor de alta afinidade TrkA, presente nas células β , leva à despolarização intensa e aumento nas taxas de secreção de insulina. Em células neurais os efeitos tróficos de neurotrofinas podem ser reproduzidos pelo

gangliosídeo GM1 e, por esta razão, sugerem mecanismos de ação similares [18]. Em conjunto estes dados sugerem que um dos efeitos da administração exógena de GM1 possa ser mimetismo ou sinergismo com fatores neurotróficos afetando a sobrevivência neural/células de Schwann da ilhota por meio de mecanismo comum, isto é, por compartilhar vias de sinalização. Assim, ações rápidas e similares de GM1 e NGF tanto na preservação das células de Schwann que revestem as ilhotas quanto na regeneração e sobrevivência dos tipos celulares pancreáticos endócrinos podem contribuir na manutenção da homeostasia das ilhotas pancreáticas.

1.3. Regeneração de células β pancreáticas

Regeneração é definida como a habilidade de recuperar tecidos ou órgãos lesados. Embora comum nos invertebrados, a regeneração é limitada na maioria dos vertebrados sendo observado algum grau de regeneração na espécie humana. A origem de células progenitoras necessárias para o processo regenerativo varia entre os sistemas de renovação e entre as espécies. A regeneração da função no pâncreas endócrino tem sido documentada em pancreatectomia parcial, ligação ductal e em modelos experimentais [19].

A célula β pancreática é considerada peça chave para a manutenção da homeostasia glicêmica e sua perda é marca registrada do diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2. A correção da deficiência deste tipo celular é ponto crucial para a cura do diabetes tipo 1 quando a manifestação inflamatória autoimune é controlada por terapias que regulem a resposta imune. A regeneração de células β endógenas e a diferenciação de outros tipos celulares em células produtoras de insulina têm sido abordagens intensamente estudadas durante a última década. Contudo, apesar do progresso considerável na exploração de células tronco da ilhota e novas origens de células β , definindo fatores regulatórios de desenvolvimento celular e manipulação de células tronco embrionárias em células produtoras de insulina, obstáculos têm interferido na manutenção de célula β suprida [20, 21]. Assim, o entendimento dos mecanismos de desenvolvimento e reparo deste tipo celular é crucial para o estabelecimento de estratégias no tratamento de células

produtoras de insulina, no diabetes. Em adultos, a massa de células β é determinada pelo número de células progenitoras embrionárias num balanço dinâmico entre regeneração, neogênese e apoptose [22, 23]. O número de células β precursoras é estabelecido precocemente na vida embrionária e em circunstâncias de crescimento normal não há compensação pela perda por outras células [23]. Estes aspectos sugerem que o estabelecimento final da massa de células β é processo instrutivo dependente do número de precursores celulares. Contudo, fatores extrínsecos podem afetar o crescimento e diferenciação da célula β durante a gestação, crescimento e, com obesidade, ambos os conteúdos de insulina na célula β e o número de novas células aumentam. Na presença de insulite ocorre aumento da formação de células β em murinos [24], sugerindo aumento compensatório na massa deste tipo celular induzida por fatores extrínsecos.

1.4. Neoformação de ilhotas pancreáticas

No pâncreas embrionário [25] e no pâncreas neonatal há intensa formação de células β por meio de dois mecanismos [26]. O primeiro deles envolve a formação de “brotamentos celulares” que, localizados no epitélio de ductos, sintetizam insulina dentre outros hormônios pancreáticos. Estes migram pelo parênquima pancreático no tecido exócrino, onde se diferenciam em células endócrinas, formando novas ilhotas pancreáticas [19, 27]. Já no segundo mecanismo, descrito apenas durante o estágio fetal, as células β são originadas de um aglomerado de células proliferativas presentes próximas aos ductos [28].

Conforme descrito acima, as células β pancreáticas são detectadas primeiramente no interior ou adjacente ao epitélio do ducto primitivo, levantando a hipótese de as primeiras células β terem se originado de células progenitoras associadas aos ductos [29].

1.5. Mecanismos celulares envolvidos na diferenciação de células β

Alguns mecanismos envolvidos na diferenciação de tipos celulares são a neogênese e a transdiferenciação. A neogênese é o mecanismo pela qual um tipo celular é originado a partir de uma célula progenitora [30]. Estudos mostram que o pâncreas adulto de murinos pode gerar novas células β a partir de precursores presentes nos ductos pancreáticos [31-33]. A neogênese de células β a partir de ductos está envolvida na manutenção da massa deste tipo celular e contribui para a sua expansão em situações de necessidade de aumento de síntese de insulina em mamíferos adultos [27]. Fernandes et al. relatam existência de precursor intra-pancreático nos camundongos NOD. Este tipo celular é capaz de se diferenciar em células β em pâncreas que sofrem algum tipo de lesão [34]. Estudos descrevem, ainda, a existência de precursores celulares no interior das ilhotas [35, 36]. Estas evidências sugerem a possibilidade de ativação de neogênese de células produtoras de insulina a partir de precursores localizados no interior das próprias ilhotas pancreáticas.

Outro mecanismo envolvido no aumento da massa de células β é o processo de transdiferenciação. As células capazes de se transdiferenciar neste tipo celular são células da própria ilhota, do pâncreas exócrino e de ductos pancreáticos, além de tipos celulares extra-pancreáticos, como células do fígado [30].

Na transdiferenciação intra-pancreática, células endócrinas podem se transformar em células do ducto ou em células acinares [37, 38]. Outros estudos mostram que as células acinares, por sua vez, podem se transdiferenciar em células do ducto, ou ainda, em células β endócrinas por este mesmo mecanismo [39]. Células ovas do fígado podem migrar para o pâncreas, permanecendo próximas aos ductos pancreáticos, onde se transdiferenciam em células β endócrinas [40]. A incubação de células pancreáticas exócrinas com o hormônio GLP-1 promove a transdiferenciação destes tipos celulares em células α e β da linhagem pancreática endócrina [41, 42]. Outros estudos têm mostrado, ainda, que é possível transdiferenciar células α em células β em camundongos adultos [41, 43]. A neogênese de células endócrinas leva à formação de novas células α com

capacidade para se transdiferenciar, posteriormente, em células β produtoras de insulina. A indução a esta transdiferenciação pode representar grande avanço no controle do DM1, já que as células α parecem resistir ao ataque autoimune evidenciado nesta síndrome metabólica [31].

1.6. Embriogênese do pâncreas e fatores de regeneração Ngn3, PDX-1 e GLP-1

Tanto os componentes celulares intrínsecos (fatores de transcrição) quanto fatores extrínsecos (sinalização de fatores de crescimentos) têm sido apontados como moduladores de processos de formação e manutenção da massa de células β pancreáticas [44, 45]. Estudos realizados nas últimas décadas indicam função central para os fatores de transcrição no desenvolvimento embriogênico do pâncreas.

Durante a embriogênese deste órgão há a extensão de duas células do endoderma localizadas dorsal e ventralmente ao intestino primitivo, no chamado “período de transição primária” [46]. Após a formação ventral e dorsal do pâncreas há a evaginação do órgão em desenvolvimento pelo mesênquima, seguida do aumento da taxa de proliferação celular e consequente aumento da massa pancreática. Este é o chamado “período de transição secundária”, que culmina na união de ambas as regiões dando origem ao pâncreas maduro [33, 47, 48].

Já nos primeiros estágios do período embrionário, as células da endoderme expressam os fatores de transcrição PTF1a-p48 e PDX-1, responsáveis pela diferenciação destas em progenitores pancreáticos; na ausência destas proteínas, os progenitores tornar-se-ão células do epitélio intestinal ou células da linhagem hepática. Expressando os referidos fatores de transcrição, as células progenitoras poderão se diferenciar nas linhagens exócrina, endócrina, ou ainda em células do ducto pancreático. Assim, se a célula progenitora expressar o fator de transcrição PTF1a-p48, se tornará uma célula da linhagem exócrina. Caso expresse o fator de transcrição Hnf6/OC-1, se diferenciará numa célula do ducto pancreático. Por fim, se a célula progenitora expressar Ngn3, Isl1, NeuroD e INSM1, dará início ao

desenvolvimento de uma célula da linhagem endócrina; Ngn3 induz a expressão dos fatores de transcrição INSM1, que se liga ao gene Insulin, e NeuroD/β2. Na sequência, NeuroD/β2 pode ativar INSM1 mesmo na ausência de Ngn3. Todavia, INSM1 pode suprimir os genes Insulin, NeuroD/β2 e até mesmo a expressão dele próprio, ou seja, o INSM1 pode agir como um regulador negativo transitório no desenvolvimento da linhagem endócrina do pâncreas.

O fator de transcrição neurogenin3 (Neurogen3, Ngn3), membro da família de fatores de transcrição zinc-finger *basic helix-loop-helix* (bHLH), é crucial no desenvolvimento da linhagem endócrina pancreática. Sua principal função é ativar a transcrição de genes que, por sua vez, transcrevem outros importantes fatores de transcrição envolvidos na diferenciação das células progenitoras que darão origem a cada um dos tipos celulares da linhagem endócrina [48, 49].

O Ngn3 é expresso em domínios restritos do pâncreas em desenvolvimento. Durante a embriogênese deste órgão os níveis de Ngn3 permanecem baixos. Todavia, ao entrar na fase de transição secundária, a expressão deste fator de transcrição se torna detectável em E12, atingindo máxima expressão em E15.5 e declinando novamente a níveis indetectáveis até o nascimento. A expressão de Ngn3 em pâncreas juvenil e adulto permanece controversa [50]. Contudo, Wang et al. mostram que a deleção deste fator de transcrição em células β adultas ocasiona a redução da expressão dos genes responsáveis pela produção das proteínas MafA, Pax4, NeuroD1 e insulina, culminando em danos funcionais a este tipo celular [51].

Xu et al. relacionam o aumento da expressão de RNAm de Ngn3 em células do ducto pancreático com o aumento da massa de células β e consequente produção de insulina, sugerindo que grande parte da regeneração verificada no pâncreas ocorra por neogênese de células produtoras de insulina via Ngn3.

O PDX-1 (pancreatic and duodenal homeobox-1) é um fator de transcrição com importante função na manutenção do controle glicêmico [52]. Sua expressão é necessária na diferenciação inicial e crescimento das células precursoras do pâncreas em desenvolvimento. A expressão contínua de PDX-1 durante a transição secundária garante a continuidade da diferenciação e expansão do tecido acinar e das ilhotas [33]. A deleção ou inativação do seu gene, *Ip1f1*,

ocasiona a total agênese do pâncreas tanto em camundongos quanto em humanos. A alteração da expressão de PDX-1 em células maduras das ilhotas pode levar à tolerância à glicose e influenciar no desenvolvimento do Diabetes juvenil [53, 54]. Este fator de transcrição é expresso nas células β e δ do pâncreas endócrino adulto, sendo responsável pela regulação da expressão de insulina e somatostatina [55]. O PDX-1 atua, ainda, no controle de absorção de glicose, produção de insulina e homeostase glicêmica [56]. Nogushi et al. [57] observaram que PDX-1 possui importante função na neogênese de células β a partir de células dos ductos pancreáticos. O estudo mostrou, também, que culturas de ductos estimuladas com PDX-1 passaram a produzir insulina. Todas estas evidências sugerem que a expressão de PDX-1 em ductos possa ter efeito parácrino e que a partir da sua expressão se inicie o processo de diferenciação das células β do pâncreas. Koya et al. [58] relatam, ainda, transdiferenciação de células tronco e hepatócitos de camundongos da linhagem BALB/c, induzidos ao diabetes por streptozotocina, em células β produtoras de insulina por meio de administração exógena de PDX-1.

O hormônio gastrointestinal GLP-1 (glucagon-like peptide-1) é sintetizado como um produto proteolítico do proglucagon nas células L intestinais, sendo também sintetizado nas células α do pâncreas endócrino e em neurônios localizados em diversas regiões do cérebro (hipotálamo, hipófise, núcleo do trato solitário e núcleo reticular). Além de atuar no retardo da motilidade gastrointestinal [59], estudo com administração exógena de GLP-1 in vivo em ratos Wistar relata proliferação de ilhotas pancreáticas nos animais tratados pela indução à neogênese dos tipos celulares endócrinos pancreáticos [60]. Receptores para GLP-1 são encontrados nas células α , β e δ da linhagem endócrina pancreática atuando na regulação da secreção dos hormônios produzidos por estes tipos celulares (glucagon, insulina e somatostatina respectivamente) [61]. Existem duas formas biologicamente ativas de GLP-1: GLP-1 (7-37) e GLP-1 (7-36). Ambos os peptídeos são equipotentes, compartilham o mesmo receptor e possuem atividade biológica e tempo de meia-vida idênticos [62].

Em resumo, as informações obtidas até o momento empregando modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1, além de achados clínicos, sugerem que a destruição autoimune da célula β está associada ao aumento da sua regeneração. Desta forma, tornam-se lícitos estudos terapêuticos que visem à preservação da massa de células produtoras de insulina e controle do processo inflamatório.

2 - Objetivos

2.1 - Objetivos Gerais:

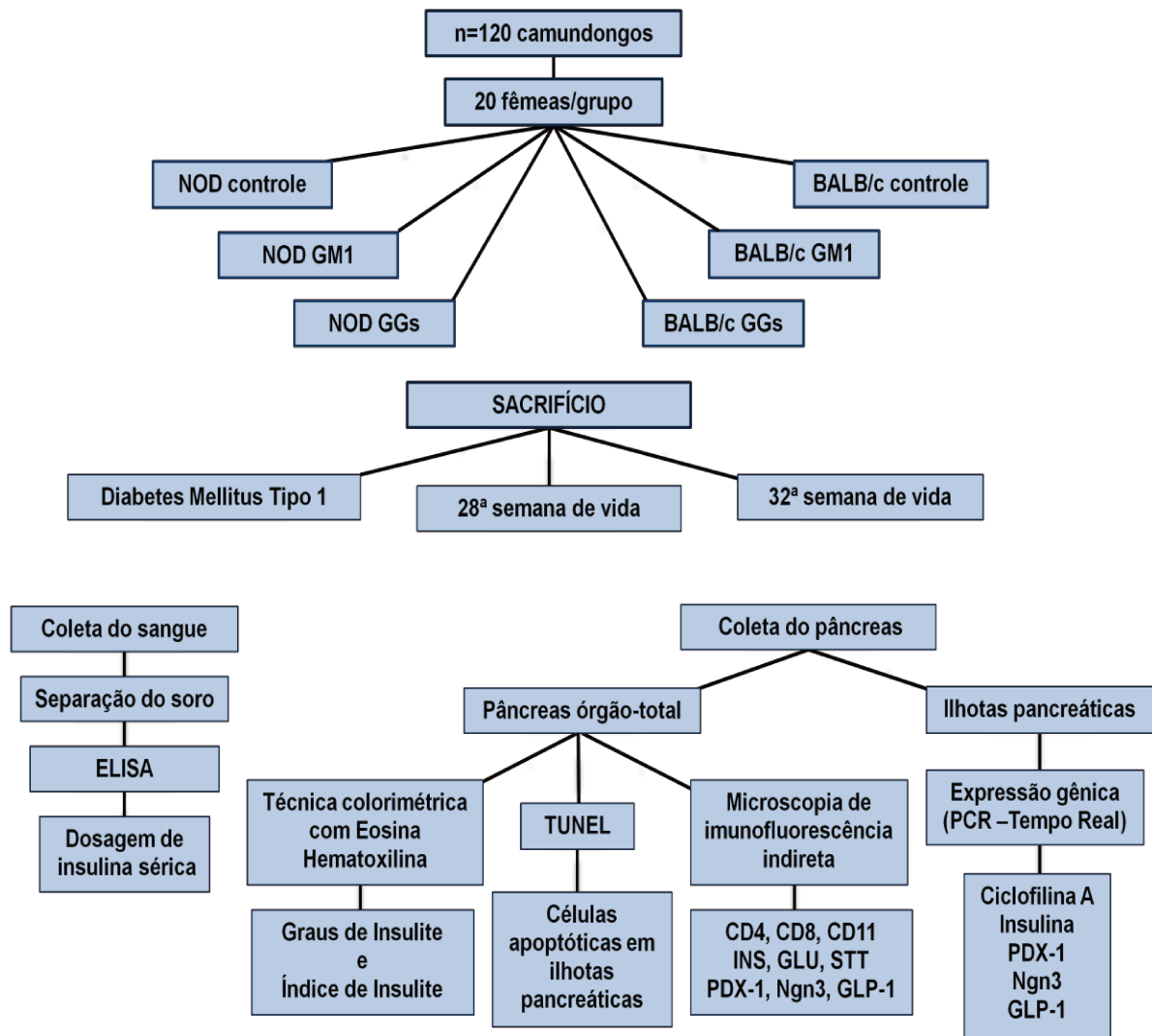
Verificar os efeitos da administração exógena de gangliosídeos sobre a incidência do diabetes mellitus tipo 1 e a presença de fatores de regeneração de ilhotas pancreáticas em camundongos NOD e BALB/c.

2.2 - Objetivos Específicos:

Estabelecer o perfil comparativo em ilhotas pancreáticas de animais tratados com gangliosídeos (GM1 e mistura de gangliosídeos) e controle salina com referência a:

1. Imunofenotipificação do infiltrado celular nas ilhotas pancreáticas
2. Classificação dos graus de insulite nos camundongos NOD
3. Imunofenotipificação celular dos fatores de regeneração/crescimento nas ilhotas e tecido acinar pancreáticos
4. Co-expressão de GLP-1 com insulina, glucagon e somatostatina
5. Expressão gênica e de fatores de crescimento GLP-1, PDX-1 e Ngn3
6. Apoptose nas ilhotas pancreáticas de camundongos NOD

3 – Material e Métodos



3.1. ANIMAIS

60 camundongos NOD fêmeas da linhagem NOD-uni (Non-Obese Diabetic) e 60 camundongos BALB/c adquiridos do CEMIB (Centro de Bioterismo da Unicamp) eram subdivididos em 20 animais/grupo. Os tratamentos com GM1 (100mg/kg/dia), GGs (mistura de gangliosídeos) (150mg/kg/dia) e solução salina (0,9%) eram administrados via intraperitoneal e os níveis glicêmicos analisados semanalmente sempre no mesmo dia e horário. O diabetes era estabelecido com dois valores glicêmicos semanais consecutivos ≥ 180 mg/dL. Os animais eram mantidos em condições SPF (sala e armários/estantes com sistema SPF individual) com água e ração estéreis *ad libitum*, no Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental, durante todo o protocolo que se estendeu da 4^a à 28^a semana de vida. Metade dos camundongos NOD dos grupos tratados com GM1 e GGs, que ao término do tratamento não desenvolveram a doença, eram mantidos sob as mesmas condições SPF até a 32^a semana de vida, com os tratamentos cessados, para verificação dos níveis glicêmicos e produção de insulina sérica. Por fim, o sacrifício era realizado no estabelecimento do diabetes, ao término do protocolo, na 28^a semana, ou ainda na 32^a semana de vida.

3.2. EXTRAÇÃO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS

As ilhotas eram isoladas seguindo-se a técnica descrita por Li et al. (2009) [63] com adaptações em nosso laboratório visando melhorar o rendimento, conforme descrição a seguir. Os animais anestesiados com cloridrato de xilazina (100-200mg/kg de peso) e cloridrato de ketamina (5-16mg/kg de peso) tiveram suas cavidades abdominais abertas e os pâncreas localizados. A região de ligação entre o ducto pancreático e o duodeno era isolada com auxílio de duas pinças de Kelly, posicionadas anterior e posterior à papila duodenal. Na outra extremidade, o ducto era posicionado com auxílio de pinça fina. Era injetado, por meio de seringa de 1 mL, collagenase V (2,5 mg/mL - Sigma) em solução de Hanks contendo 2,8 mM de glicose até intumescimento do pâncreas. A seguir, o órgão era removido e transferido para um frasco de vidro onde sofria

fragmentação suave com o auxílio de tesoura cirúrgica, sendo posteriormente encubado em banho térmico a 37°C durante 28 minutos. Neste período, sob banho térmico, o frasco era agitado manualmente 3 vezes para auxiliar na digestão do órgão. Em seguida, o conteúdo era transferido para um becker de vidro de 50 mL, sendo adicionada solução de Hanks até completar volume de 40 mL. A preparação era homogeneizada com auxílio de seringa de 20 mL. Após intervalo de 20 minutos, aspirava-se o sobrenadante vagarosamente por meio de seringa, repetindo-se este procedimento por 3 vezes com a finalidade de separação do tecido adiposo, colagenase e enzimas pancreáticas. Após o banho térmico, todo o procedimento era realizado sob gelo. O isolamento das ilhotas era realizado manualmente sob lupa, colocando-se 10 mL da suspensão de ilhotas em uma placa de Petri com fundo escuro. As ilhotas eram coletadas por aspiração, com auxílio de ponteira RNase *free* com barreira. Para a confirmação e teste de viabilidade, as ilhotas eram coradas com Ditizona (Sigma, St Louis, EUA) e identificadas por microscopia óptica em aumento de 100x. Após este procedimento, ilhotas eram transferidas para sistema de extração automatizada de RNA (Exiprep, Bioneer, Coreia).

3.3. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A avaliação histológica dos pâncreas objetiva a análise da morfologia das ilhotas pancreáticas e de seu eventual grau de insulite. Após o posicionamento do pâncreas no suporte do criostato de maneira a se obter a maior área possível de corte, era coletada uma série de 15 cortes consecutivos, com 5µm de espessura, depositados em lâminas histológicas previamente silanizadas (γ -Methacryl-Oxipropil-Methoxysilane, Sigma) segundo procedimento estabelecido em nosso laboratório [15, 64]. Era calculado também o índice de insulite, conforme Ladish et. al. [12], seguindo a fórmula abaixo:

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

Em que: I=Índice; números: 0, 1, 2, 3 e 4 = respectivos Graus de Insulite.

3.4. IMUNOFENOTIPIFICAÇÃO

INFILTRADO CELULAR - LINFÓCITOS CD4+ CD8+ E MACRÓFAGOS CD11+; CÉLULAS BETA e CÉLULAS NGN3, GLP-1, PDX-1 e IA1+

Para a especificação do infiltrado celular nas ilhotas pancreáticas era realizada imunofenotipificação empregando marcadores para linfócitos (CD4+ e CD8+), e macrófagos (CD11⁺) (anticorpos monoclonais eBioscience®, San Diego, CA, EUA) e secundários conjugados com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) ou Texas Red (TR), (Vector® Burlingame, CA, EUA) ou (Santa Cruz®, CA, EUA) em cortes histológicos congelados. A técnica empregada era de microscopia por imunofluorescência indireta. Para imunofenotipificação de células das ilhotas pancreáticas eram utilizados anticorpos insulino+, peptídeo C+ (anticorpos primários policlonais, Cell Signaling®, EUA), glucagon+ e somatostatina+. Para imunofenotipificação de células em tecido acinar e ilhotas pancreáticas marcadas com fatores de regeneração, eram utilizados anticorpos Ngn3+, GLP-1+, PDX-1+ e IA1+, (anticorpos policlonais primários Santa Cruz®, EUA e secundários conjugados com FITC ou Texas Red da Santa Cruz®). Eram capturadas imagens de 30 ilhotas pancreáticas por animal (n=5) de todos os grupos (NOD e BALB/c) estudados. Eram capturadas, ainda, 30 imagens de tecido acinar pancreático para cada animal analisado, sendo cada imagem relativa a uma diferente área do corte pancreático. Após os períodos de incubação com os respectivos anticorpos primários e conjugados, as lâminas eram montadas em glicerol/DABCO 2.5% (diazabicyclo(2,2,2)octano, Sigma) com objetivo de preservar a fluorescência (solução de montagem *anti-evanescente*). O equipamento de microscopia empregado era da Nikon, Eclipse 80i® e as imagens capturadas e processadas em Tempo Real pelo programa computacional NIS-ELEMENTS AR®, Nikon, Japão. Para a quantificação das células marcadas nas ilhotas e tecido acinar pancreático era empregado o programa computacional de uso livre ImageJ®/Fiji versão 1.64 (Instituto Nacional de Saúde, EUA).

3.5. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL (TRNA)

O RNA Total era extraído das ilhotas pancreáticas empregando o método de extração automatizada pelo Sistema ExiPrep16® (Bioneer, Coreia) e reagentes Exiprep 16 Plus, Cell Total RNA Kit (K-3335). O RNA total era estimado por intermédio de leitura em espectrofotômetro Picodrop 2.0 (Picodrop Ltd, Saffron Walden, UK) e sua integridade verificada por corrida em eletroforese em gel de formaldeído. RNA era considerado de boa qualidade com a relação das leituras 260/280 entre 1.6 e 2.0. Todas as amostras de RNA total eram armazenadas a -80° até o uso.

3.6. AVALIAÇÃO QUANTITATIVA EM REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL

O perfil de expressão gênica era estabelecido empregando o sistema de PCR em Tempo Real (Exicycler96®, Bioneer, Coreia). O sistema SensiMix No-Rox one-Step (Bioline, EUA) era empregado permitindo que ambos cDNA e PCR em Tempo Real fossem desenvolvidos em uma reação completa a partir do RNA total extraído. Primers específicos que reconheçam insulin 1; Ngn3; GLP-1, PDX-1 e ciclofilina A (Fermentas, Thermo, EUA) estão descritos na Tabela 1 (página 34). Os dados eram analisados pelo programa computacional Exicycler3® analyser, Bioneer, Coreia. As condições de reação eram estabelecidas para cada sequência de amplicons por perfil de ciclos. As eficiências eram determinadas pela curva de amplificação considerando-se número de cópias x CT. O *slope* da curva nestas condições era de -0.3, para eficiência de 98 a 100%. As análises das amplificações e suas comparações eram realizadas considerando-se a relação $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

O Método CT Comparativo usa fórmulas aritméticas para alcançar o resultado para quantificação relativa. É possível eliminar o uso de curvas padrões e usar o Método $\Delta\Delta Ct$ para quantificação relativa enquanto as eficiências de PCR entre o(s) alvo(s) e o(s) controle(s) endógeno(s) forem relativamente equivalentes [65-67].

a. Experimento de Validação para Cálculo de $\Delta\Delta CT$.

Para o cálculo $\Delta\Delta CT$ válido, a amostra no experimento de validação deve expressar ambos os genes alvo e o controle endógeno, com eficiência de amplificação aproximadamente igual. Para determinar se as reações de amplificação apresentam a mesma eficiência, era realizada curva de amplificação utilizando RNA em diluições seriadas 10x e análise realizadas empregando o software Exicycler™ 96 analysis.

b. Experimento de quantificação relativa de amostras.

As amostras eram amplificadas para o gene alvo e para o controle endógeno em triplicatas, utilizando-se a média como valor de Ct (desvio padrão <1), seguido de cálculo de ΔCt (Ct do controle endógeno – Ct do gene alvo). Para o cálculo da expressão do gene alvo, normalizado pelo controle endógeno (ciclofilina A) e relacionado aos animais sem tratamento, era utilizada a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (RQ). As amostras eram normalizadas para ciclofilina A, e o aumento calculado posteriormente pelo $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para determinação de significância o teste não paramétrico de Mann-Whitney era usado para comparar os valores de ΔCt (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

3.7. NÍVEIS SÉRICOS DE INSULINA

Com objetivo de monitorar os níveis de insulina sérica era empregado o método de ELISA, seguindo orientação do fabricante (Millipore®, Billerica, MA, EUA). As concentrações eram definidas por ng/mL.

Primer	Sense	Anti-sense	Produto pb
Insulina	5' AGT TAT CTC TGT CTT TGT CTT ACC 3'	5' TGC TAC GGA TGG ACT GTT 3'	124
GLP-1	5' GAA CTC CAA TAT GAA CTA CTG 3'	5' ATG ACA CGG ATG AAG ATA A 3'	87
NGN3	5' TTG AGA ATG GTA GCA CTA 3'	5' GAC GAA CAT CAT CTA TGG 3'	176
PDX-1	5' ATC TGC CTC TAG GAC TCT 3'	5' GTA TTG GAA CGC TCA AGT T 3'	95
Ciclofilina	5' TCT TTG GAC TCT TTG GAA A 3'	5' GAT GAC ACG ATG GAA CTT 3'	110

Tabela 1: *Primers* utilizados nos procedimentos de PCR-Tempo real com suas sequências descritas acima obedeciam à estratégia sense e anti-sense: Insulina; GLP1; Ngn3; PDX-1 e ciclofilina A (gene estrutural). **pb=** pares de bases

3.8. TÉCNICA TUNEL PARA DETECÇÃO DE APOPTOSE

A técnica TUNEL (Terminal Desoxinucleotidil 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 biotilada (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). Lâminas com secções de tecidos pancreáticos congelados dos grupos tratados com gangliosídeos e salina eram fixadas em paraformaldeído 4% por 20 minutos e em seguida lavadas em solução salina fosfatada tamponada (PBS pH 7,4) por 30 minutos. Os cortes eram incubados durante 2 minutos em solução permeabilizante (0,1% triton-x em 0,1%

de citrato de sódio) e 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 de marcação - mistura de nucleotídeos em tampão) eram adicionados a cada corte sendo incubados em câmara úmida a 37°C durante 60 minutos, protegidos contra luminosidade. Decorrido este tempo, as lâminas eram lavadas três vezes em PBS e finalmente montadas em glicerol. A contra coloração para identificação das células β pancreáticas e do infiltrado era realizada empregando coloração de Tricomio de Gomori. Os cortes, assim preparados, eram observados e suas imagens captadas por microscópio Nikon Eclipse 80i, empregando programa computacional NIS-ELEMENTS AR, Nikon.

3.9. ANÁLISE DOS DADOS

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados eram expressos como média $\pm$ desvio padrão e os dados submetidos à análise por teste *t-Student* ou, quando necessário, à análise de variância (ANOVA) entre grupos, seguido pelo teste *Post Hoc* para análise de contrastes. Eram considerados estatisticamente significativos $p < 0.05$ e fornecidos os valores probabilísticos obtidos. O programa computacional Prisma GraphPad versão 5 (La Jolla, CA, USA) era empregado para as análises.

4.1. FREQUÊNCIA CUMULATIVA DO DIABETES

Os animais submetidos ao tratamento com gangliosídeos (GM1 e GGs) eram acompanhados monitorizando-se a glicemia semanalmente, estabelecendo-se o nível glicêmico de 180 mg/dL (2 dias consecutivos) para o diagnóstico do diabetes. Podemos observar diminuição da incidência do DM1 no grupo tratado com GM1 e controle total da manifestação do diabetes nos animais tratados com GGs. Conforme mostrado na figura 1 (pág. 38), 70% dos camundongos NOD não-tratados (salina) ficaram diabéticos, ao passo que 38% dos animais tratados com GM1 (100mg/Kg/dia) manifestaram a doença. O grupo de animais tratados com mistura de gangliosídeos (GGs), composta por GM1 (21%), GD1a (40%), GD1b (16%) e GT1b (19%), com administração de 150mg/Kg/dia, obteve 100% de prevenção do diabetes. No período em que o tratamento foi interrompido, da 28^a semana à 32^a de vida, apenas um animal do grupo NOD GM1 se tornou diabético.

4.2. NÍVEIS SÉRICOS DE INSULINA E GLICOSE

As avaliações dos níveis de insulina sérica e dos valores glicêmicos eram realizadas com os animais em jejum de 6 horas antes das coletas. A figura 2 (pág. 39) representa graficamente média e desvio padrão dos valores obtidos. A figura 2A mostra aumento significativo (* $p < 0.0001$) para o valor glicêmico do grupo NOD DM em relação aos demais grupos. A tabela 2 (pág. 40) apresenta os valores glicêmicos relativos à média e desvio padrão de cada grupo estudado. Na figura 2B verificamos valores de insulina sérica aumentados nos grupos BALB/c GM1 ($p = 0.03$) e BALB/c GGs ($p = 0.01$) em relação ao grupo BALB/c salina. Verificamos também aumento da produção de insulina sérica nos grupos NOD salina ND ($p = 0.01$), NOD GGs 28s ($p = 0.008$), NOD GM1 32s ($p = 0.017$) e NOD GGs 32s ($p = 0.018$) em relação ao grupo NOD DM. Entre os grupos NOD tratados com gangliosídeos, NOD GGs 28s obteve maior produção de insulina que NOD GM1 28s ($p = 0.006$). A tabela 3 (pág. 40) apresenta os valores relativos à média e desvio padrão de cada grupo estudado.

Ainda com relação a estes resultados, não observamos casos de hipoglicemia nos animais tratados com gangliosídeos. O peso dos animais não-diabéticos (tratados com gangliosídeos e salina) não se alteraram. Já os pesos dos animais diabéticos estavam diminuídos em relação àqueles que não expressaram a doença (dados não mostrados).

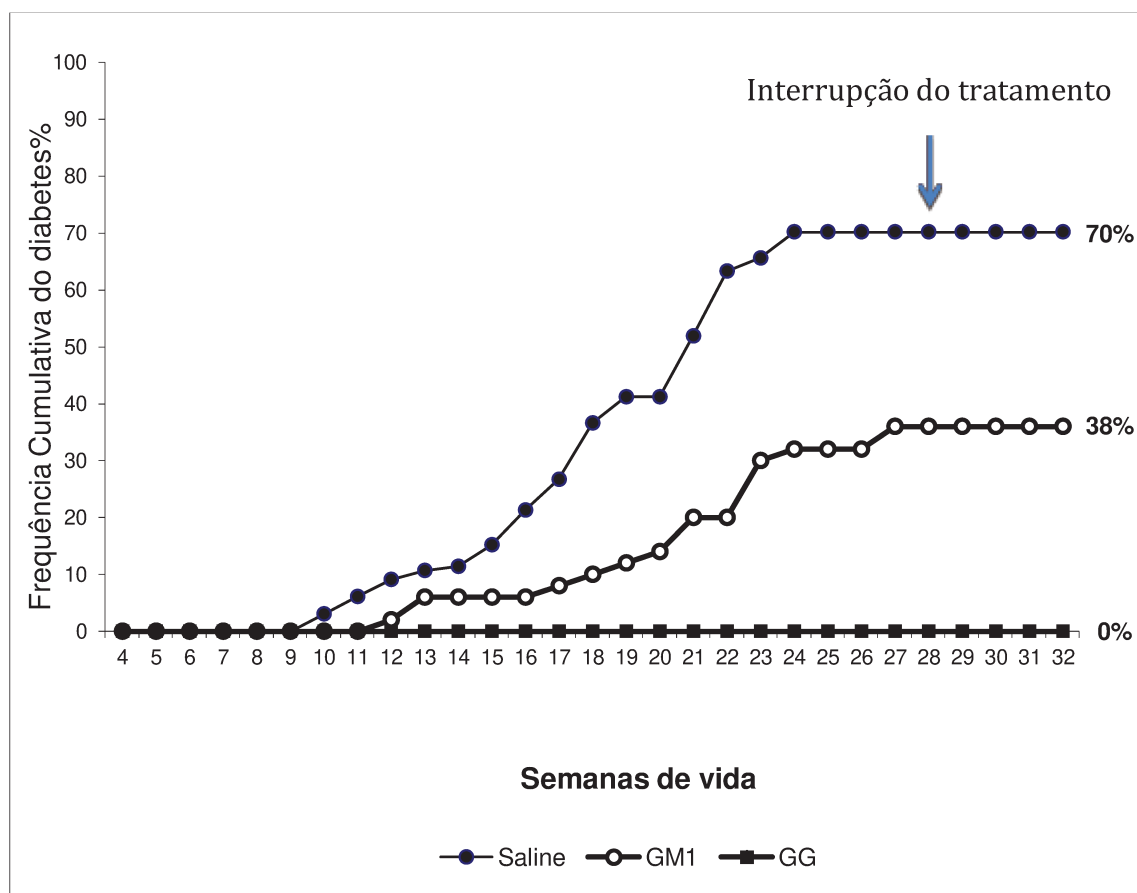


Figura 1: Frequência cumulativa do diabetes em animais NOD tratados ou não com gangliosídeos GM1 e GGs. A seta indica a interrupção do tratamento na 28^a semana e a continuação do monitoramento da expressão do diabetes até a 32^a semana. Diabetes: controle salina 70%, GM1 38%, GGs 0%. Número de animais estudados: 60.

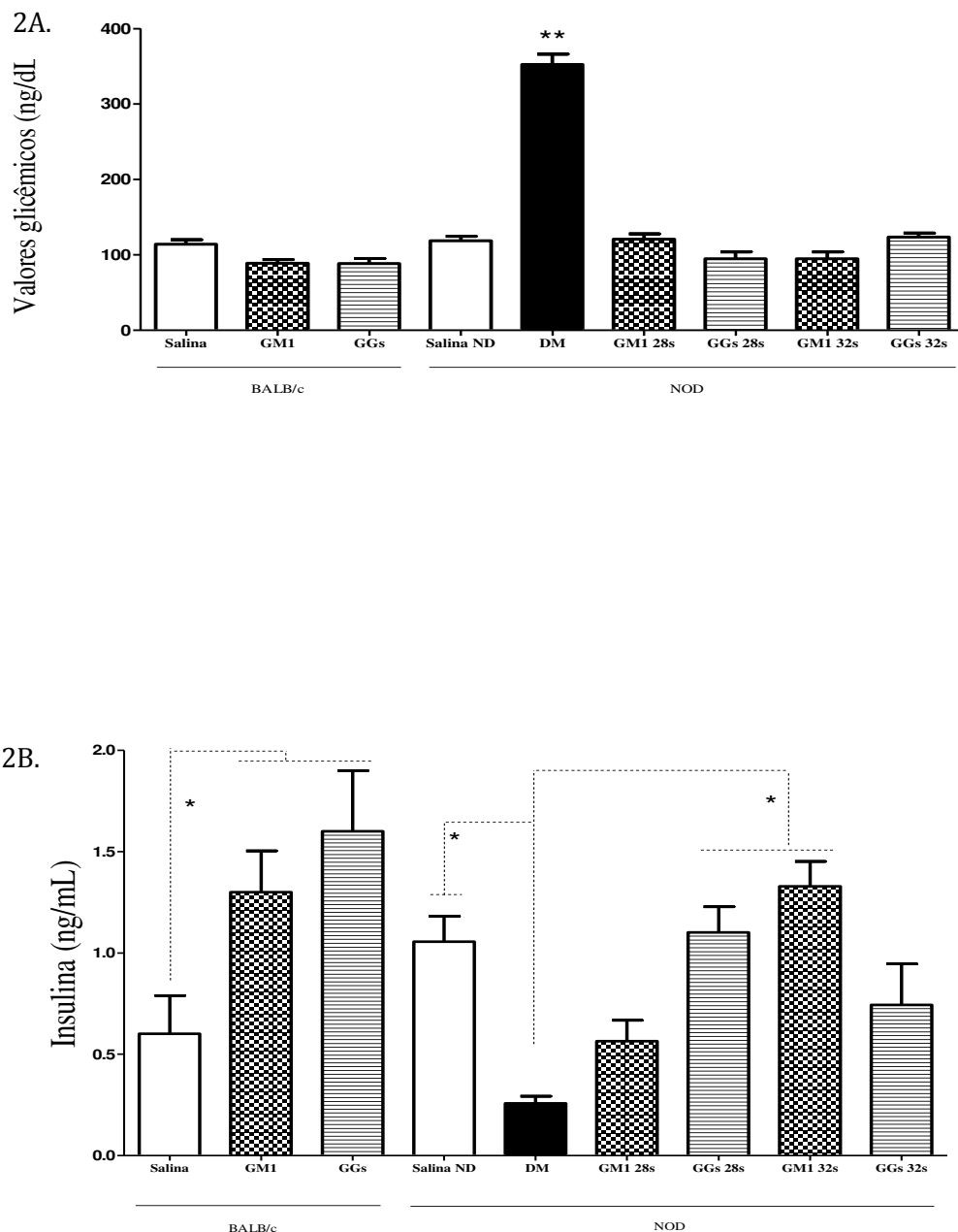


Figura 2A. Gráfico representativo dos valores glicêmicos verificados nos grupos estudados. (** $p < 0.0001$). Figura 2B. Gráfico representativo dos valores de insulina sérica nos grupos estudados (* $p < 0.05$). Avaliação pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn. Programa computacional GraphPad, versão 5 (La Jolla, CA, USA).

Tabela 2: Média e desvio padrão relativos aos valores glicêmicos verificados nas linhagens BALB/c e NOD (mg/dL)

	BALB/c Salina	BALB/c GM1	BALB/c GGs	NOD-Salina	NOD-DM	NOD-GM1	NOD-GGs
Média	114.3	88.8	88.3	118.7	352.2	120.7	94.7
SD	6.03	4.9	6.7	5.9	13.7	7.3	9.2

Tabela 3: Média e desvio padrão relativos aos níveis de insulina sérica verificados nas linhagens BALB/c e NOD (ng/mL)

	BALB/c Salina	BALB/c GM1	BALB/c GGs	NOD-Salina	NOD-DM	NOD-GM1	NOD-GGs
Média	0.6	1.3	1.6	1	0.25	0.56	1.1
SD	0.18	0.2	0.3	0.12	0.03	0.1	0.12

4.3. GRAUS DE INFILTRADO NAS ILHOTAS PANCREÁTICAS

A análise dos graus de insulite teve como base o estudo histológico do pâncreas endócrino, por meio da coloração convencional de hematoxilina-eosina (H.E). Os pâncreas avaliados apresentavam padrões histológicos compatíveis com o esperado para cortes de congelamento. As características de cada grupo experimental estão descritas abaixo, na Figura 3 (pág. 42) e resumidas na Figura 4 (pág. 44).

A quantificação do grau de infiltrado nas ilhotas de animais tratados com GGs, GM1 e salina foi determinada por meio do grau de infiltrado linfomononuclear (Figura 3). A análise morfológica seguida pela classificação das ilhotas revelou que nos animais não diabéticos e diabéticos tratados com gangliosídeos, a presença de ilhotas com infiltrado Grau 4 é menor quando comparada, respectivamente, aos animais não diabéticos e diabéticos dos grupos tratados com salina. Podemos observar maior número de ilhotas com grau 0 nos animais tratados com GM1. Verificamos também número de ilhotas G0 igual a 54% no grupo GGs. O grupo GM1 não diabético (ND), por sua vez, apresentou maioria de ilhotas de graus 0 e 1 (57% do total). Observamos equilíbrio na porcentagem de ilhotas G0, G2, G3 e G4 no grupo salina ND. No grupo GM1 diabético (DM), a soma das ilhotas de graus 2 e 3 correspondeu a 51% do total. Já no grupo diabético tratado com salina, as ilhotas G3 e G4 foram maioria, com soma igual a 53% do total. Estes resultados sugerem possível neoformação de ilhotas e/ou manutenção da sobrevida daquelas já existentes nos grupos tratados, além do maior potencial de ação imunomodulatória de GGs em comparação a GM1.

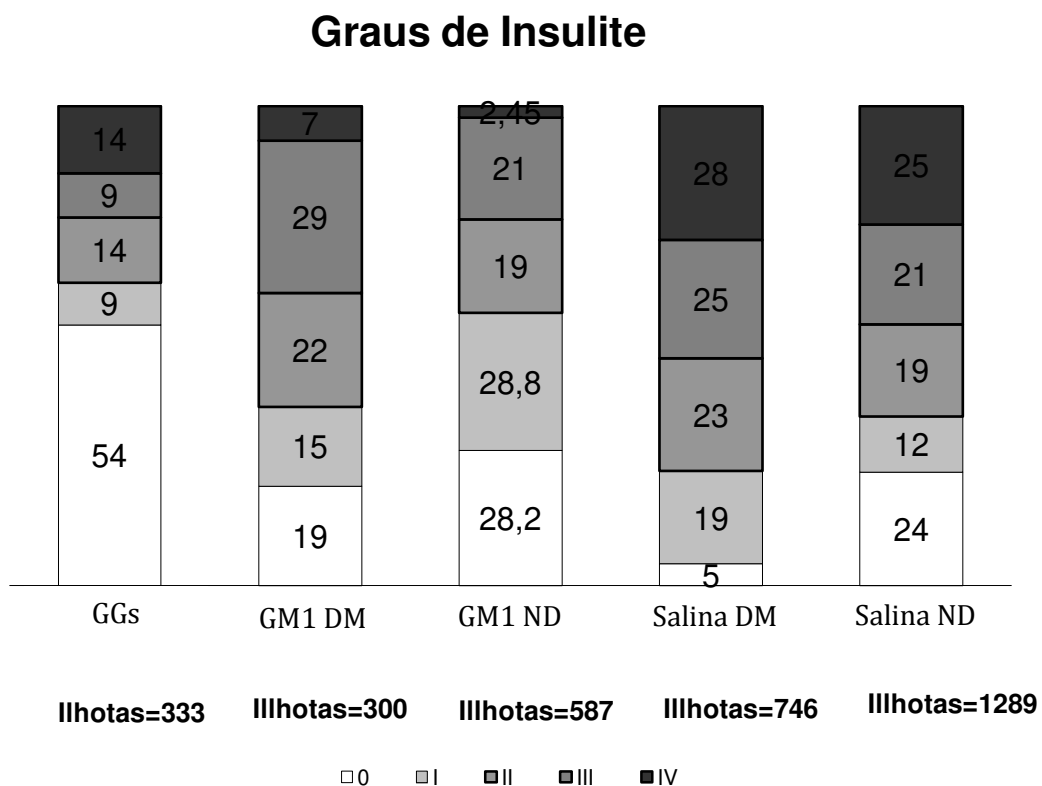


Figura 3: Grau de Insulite. A porcentagem de ilhotas com o grau de lesão e o número de ilhotas estudadas está apresentada em cada bloco e coluna representativa do grupo analisado.

4.4. ÍNDICE DE INFILTRADO NAS ILHOTAS PANCREÁTICAS

A partir da análise do índice de insulite [12, 15], verificamos diminuição do infiltrado de células da resposta imune nas ilhotas pancreáticas dos camundongos NOD GGs ($p=0.004$), NOD GM1 DM ($p=0.005$) e NOD GM1 ($p=0.009$) em comparação ao evidenciado no grupo NOD salina DM (Figura 4, pág. 44). Houve, ainda, diminuição significativa do infiltrado no grupo NOD salina NDM (não-diabético) em relação ao grupo NOD salina DM ($p=0.02$). Curiosamente, o grupo NOD GM1 DM não apresentou índice de infiltrado com diferença significativa em relação aos grupos não diabéticos tratados com gangliosídeos ou salina.

Ao compararmos os grupos diabéticos (DM) tratados com GM1 e salina, verificamos 19% de ilhotas de grau 0 para o grupo GM1 e apenas 5% de ilhotas com este grau de infiltrado no grupo salina. Por fim, podemos observar 28% de ilhotas de grau 4 no grupo salina DM, enquanto o grupo GM1 DM possui apenas 7% das ilhotas para este mesmo grau. A tabela 4 (pág. 44) apresenta os valores de média e desvio padrão referentes ao índice de insulite verificado em cada grupo estudado.

4.5. FENOTIPIFICAÇÃO DO INFILTRADO CELULAR NAS ILHOTAS PANCREÁTICAS

A figura 5 (pág. 45) mostra os tipos celulares presentes no infiltrado insular, evidenciando linfócitos CD4+, CD8+ e macrófagos (CD11+). As imagens, embora não quantificadas, demonstram diminuição da imunofenotipificação das células CD4+, CD8+ e CD11+ nos animais tratados com gangliosídeos GM1 e GGs em comparação aos àqueles tratados com salina (diabéticos e não-diabéticos). É possível estabelecer análise comparativa entre os graus de insulite e a imunofenotipificação do infiltrado nas ilhotas.

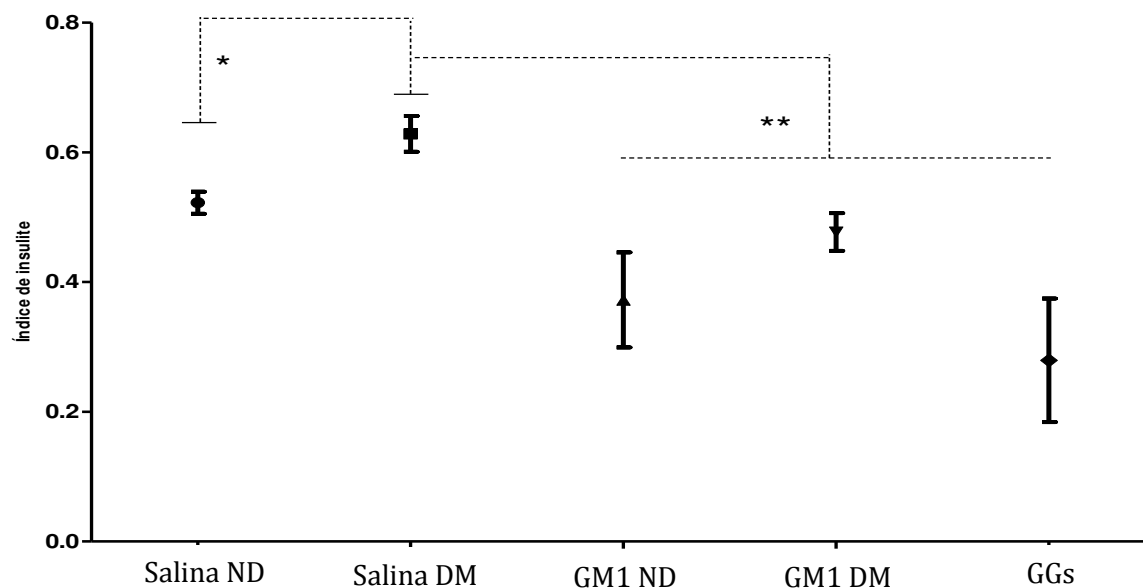


Figura 4: Índice do infiltrado nas ilhotas pancreáticas, conforme Ladisch et al. [12], e os respectivos grupos experimentais de camundongos NOD. No eixo vertical está representado o grau de lesão de 0 a 1. Avaliação pelo teste estatístico de Mann-Whitney com diferença estatística considerada (* $p=0.02$) e (** $p\leq 0.009$). Programa computacional GraphPad, versão 5 (La Jolla, CA, USA).

Tabela 4: Média e desvio padrão relativos ao índice de insulite verificado na linhagem NOD

	NOD-Salina	NOD-DM	NOD-GM1	NOD-GM1 DM	NOD-GGs
Média	0.52	0.628	0.37	0.47	0.32
SD	0.03	0.07	0.146	0.07	0.26

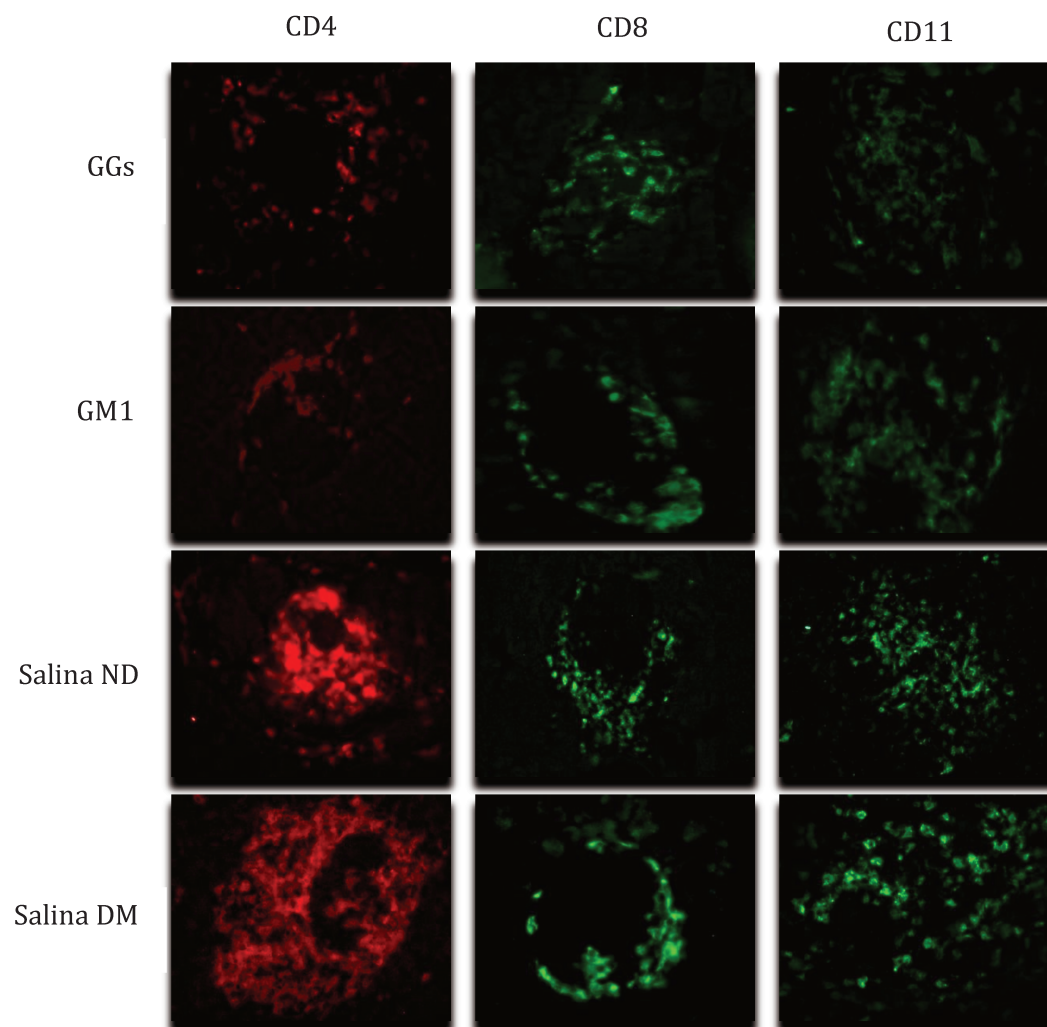


Figura 5: Imagens representativas da caracterização do infiltrado em ilhotas pancreáticas marcadas com anticorpo anti-CD4 (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:50) e revelado com anticorpo anti-cabra (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:300) conjugado com Texas Red (TR); anticorpo anti-CD8 (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:50) e revelado com anticorpo anti-rato (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:300) conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC); anticorpo anti-CD11 (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:50) e revelado com anticorpo anti-rato (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:300) conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC). Aumento de 400x.

4.6. FENOTIPIFICAÇÃO DOS FATORES DE REGENERAÇÃO GLP-1; PDX-1; Ngn3; IA1, ALÉM DE PEPTÍDEO C

Era empregada a técnica de microscopia de imunofluorescência indireta para quantificação de células marcadas com os fatores de regeneração GLP-1, PDX-1 e Ngn3 nas ilhotas pancreáticas e no tecido acinar dos camundongos das linhagens BALB/c e NOD tratados com salina (diabéticos e não-diabéticos), GM1 e GGs (n=5/grupo). Podemos observar comportamento similar com expressão aumentada dos fatores de regeneração GLP-1, PDX-1 e Ngn3 em espaço interlobular, tecido acinar e na periferia de ilhotas de Langerhans dos animais tratados com gangliosídeos em ambas as linhagens experimentais, sugerindo o trajeto das células neoformadas no tecido pancreático.

O gráfico relativo à expressão protéica de GLP-1 em ilhotas pancreáticas (Figura 9A, pág. 51) mostra aumento da expressão deste fator de regeneração no grupo NOD GGs em comparação aos grupos NOD salina ND ($p=0.046$), NOD DM ($p=0.005$) e NOD GM1 ($p=0.009$). Podemos observar expressão protéica de GLP-1 aumentada no grupo NOD GM1 em relação ao grupo NOD DM ($p=0.019$). Não houve diferença significativa entre os grupos da linhagem BALB/c. Os valores obtidos (média e desvio padrão) a partir da quantificação de células marcadas com anticorpo anti-GLP-1, nas ilhotas pancreáticas dos animais (n=5) de todos os grupos analisados, são apresentados na tabela 5 (pág. 52).

O gráfico relativo à expressão protéica de PDX-1 em ilhotas pancreáticas (Figura 9B, pág. 51) mostra maior expressão deste fator de regeneração no grupo BALB/c GGs em relação ao grupo BALB/c salina ($p=0.029$). Verificamos também aumento da expressão de PDX-1 no grupo BALB/c GM1 em relação ao grupo BALB/c salina ($p=0.006$). Na linhagem NOD, o grupo tratado com GGs obteve maior expressão para este fator de regeneração em relação ao grupo controle NOD salina ND ($p=0.018$). Por fim, a expressão protéica de PDX-1 estava aumentada no grupo NOD GM1 quando comparada aos grupos NOD salina ND ($p=0.01$) e NOD DM ($p=0.027$). Os valores obtidos (média e desvio padrão) a partir da quantificação de células marcadas com anticorpo anti-PDX-1, nas ilhotas

pancreáticas dos animais (n=5) de todos os grupos analisados são apresentados na tabela 6 (pág. 52).

O gráfico relativo à expressão protéica de Ngn3 em ilhotas pancreáticas (Figura 9C, pág. 51) mostra expressão aumentada deste fator de regeneração apenas no grupo NOD GGs em relação ao grupo NOD salina ND ($p=0.047$). Não houve diferença significativa entre os grupos da linhagem BALB/c. Os valores obtidos (média e desvio padrão) a partir da quantificação de células marcadas com anticorpo anti-Ngn3, nas ilhotas pancreáticas dos animais (n=5) de todos os grupos analisados, são apresentados na tabela 7 (pág. 52).

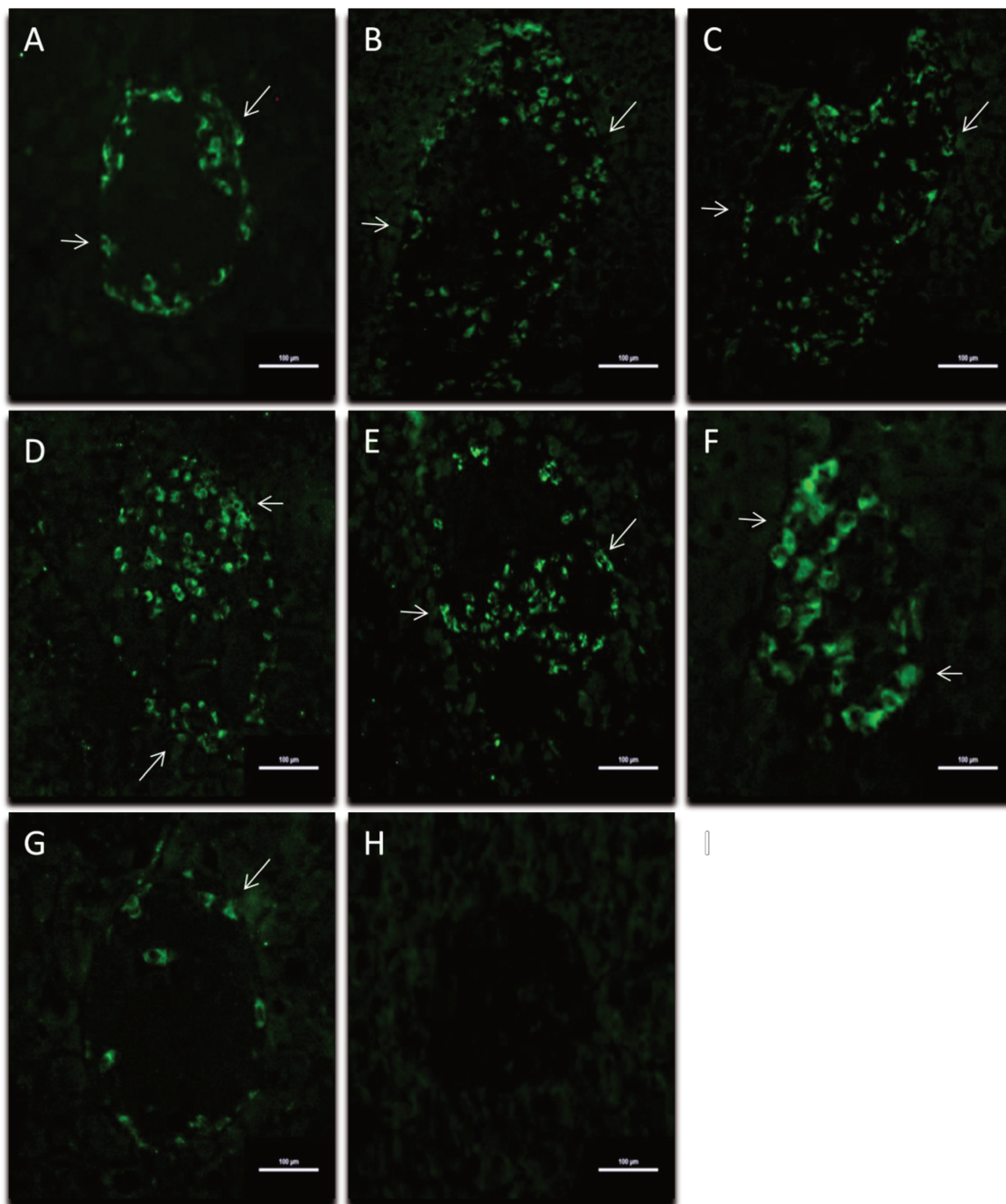


Figura 6: Prancha com imagens representativas de ilhotas pancreáticas marcadas com anticorpo anti-GLP-1 (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:100) e revelado com anticorpo anti-cabra (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:400) conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC). A) BALB/c Salina B) BALB/c GM1 C) BALB/c GGs D) NOD Salina E) NOD GM1 F) NOD GGs G) NOD DM1 H) Controle negativo. As setas indicam marcação de GLP-1 em células da linhagem endócrina pancreática. Barra de magnitude 10µm. Aumento de 200x.

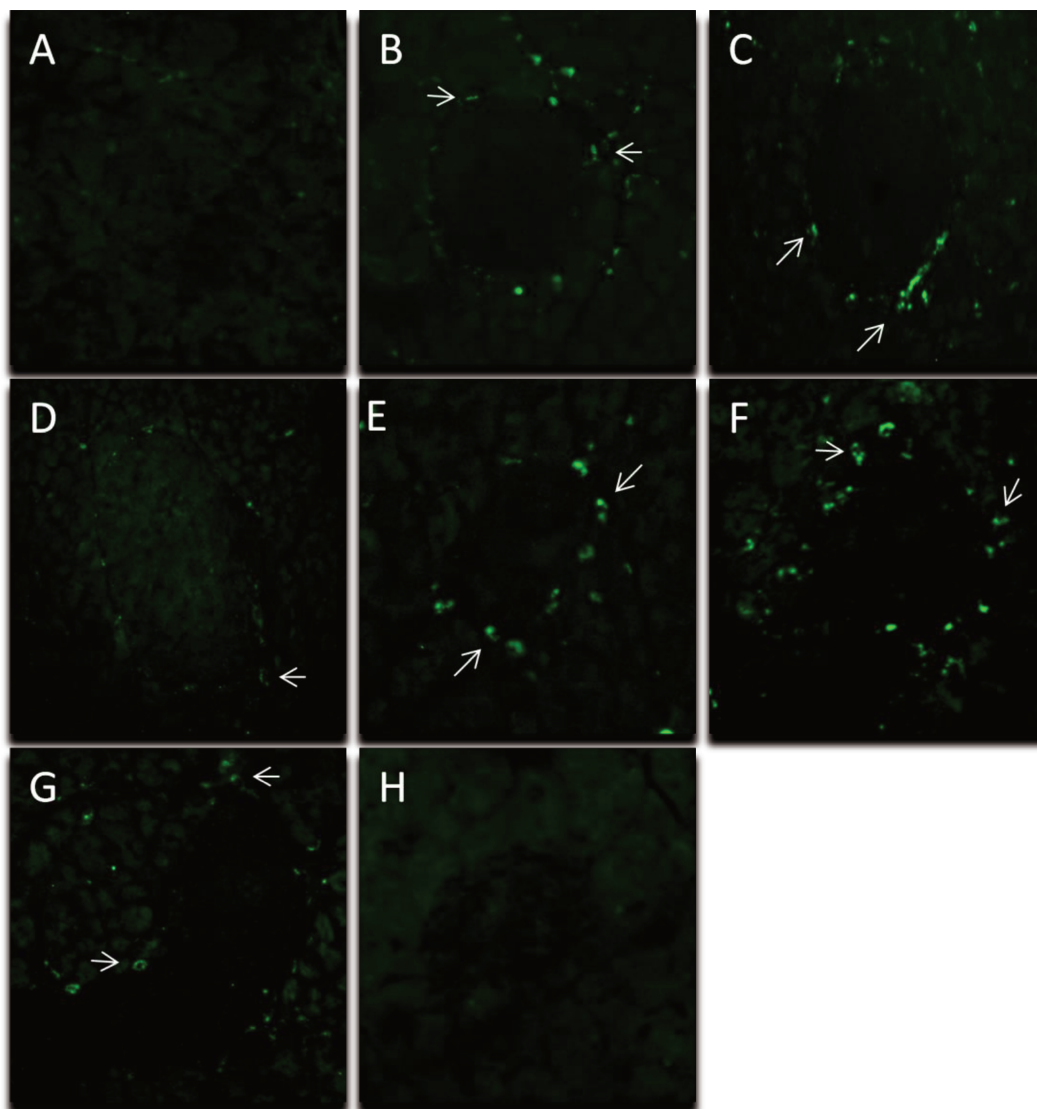


Figura 7: Prancha com imagens representativas de ilhotas pancreáticas marcadas com anticorpo anti-PDX-1 (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:100) e revelado com anticorpo anti-cabra (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:300) conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC). A) BALB/c Salina B) BALB/c GM1 C) BALB/c GGs D) NOD Salina E) NOD GM1 F) NOD GGs G) NOD DM1 H) Controle negativo. As setas indicam marcação de PDX-1 em células da linhagem endócrina pancreática. Barra de magnitude 10 μ m. Aumento de 200x.

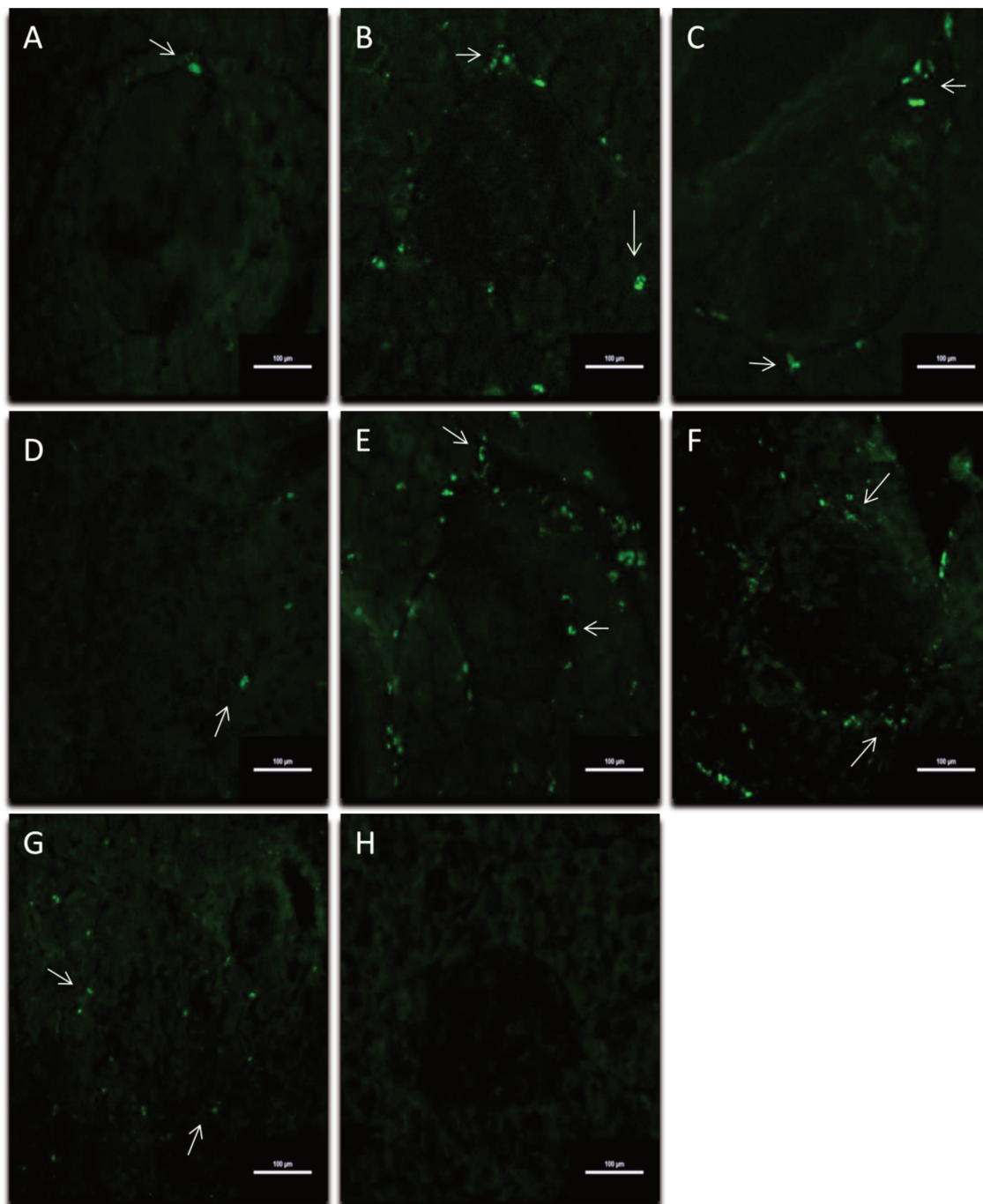


Figura 8: Prancha com imagens representativas de ilhotas pancreáticas marcadas com anticorpo anti-Ngn3 (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:50) e revelado com anticorpo anti-cabra (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:400) conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC). A) BALB/c Salina B) BALB/c GM1 C) BALB/c GGs D) NOD Salina E) NOD GM1 F) NOD GGs G) NOD DM1 H) Controle negativo. As setas indicam marcação de Ngn3 em células da linhagem endócrina pancreática. Barra de magnitude 10µm. Aumento de 200x.

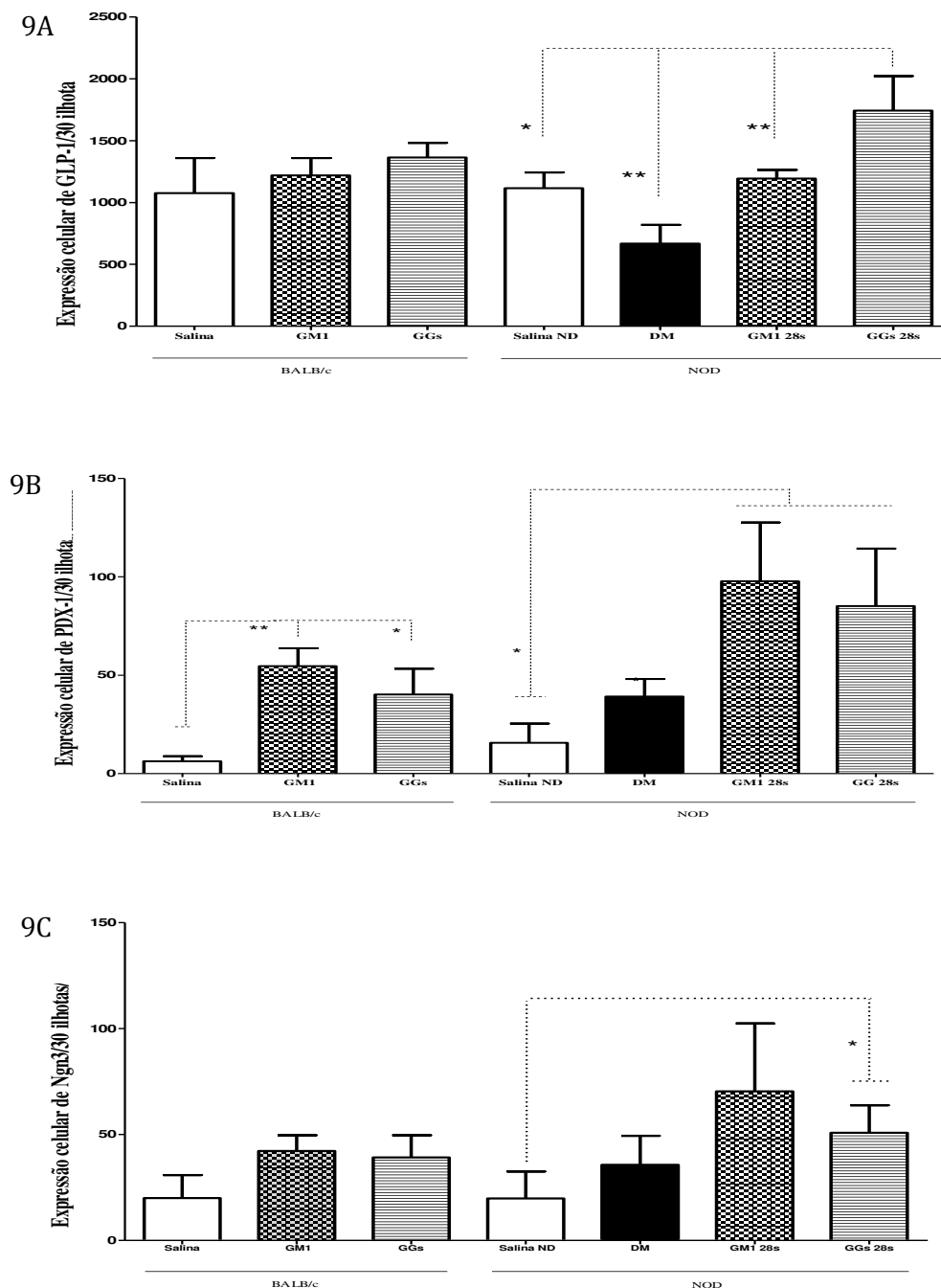


Figura 9. Gráficos representativos da imunomarcção celular com GLP-1 (9A); PDX-1 (9B) e Ngn3 (9C) em ilhotas pancreáticas de animais tratados com gangliosídeos e controles salina. Procedimento por microscopia de imunofluorescência indireta. Foram analisadas 30 ilhotas/animal, amostragem n=5. *p<0.05; **p<0.001, avaliados por teste estatístico de Mann-Whitney. Programa computacional Graph Pad, versão 5 (La Jolla, CA, USA).

Tabela 5: Média e desvio padrão (DP) relativos ao número de células marcadas com anticorpo anti-GLP-1 nas ilhotas pancreáticas

	BALB-Salina	BALB-GM1	BALB-GGs	NOD-Salina	NOD-DM	NOD-GM1	NOD-GGs
Média	1075	1219	1365	1115	668	1194	1743
DP	636	314	261	286	480	141	623

Tabela 6: Média e desvio padrão (DP) relativos ao número de células marcadas com anticorpo anti-PDX-1 nas ilhotas pancreáticas

	BALB-Salina	BALB-GM1	BALB-GGs	NOD-Salina	NOD-DM	NOD-GM1	NOD-GGs
Média	6.2	54.6	40.2	15.60	39.20	97.80	85.20
DP	2.6	9.2	13.08	9.8	8.9	29.8	29.2

Tabela 7: Média e desvio padrão (DP) relativos ao número de células marcadas com anticorpo anti-Ngn3 nas ilhotas pancreáticas

	BALB-Salina	BALB-GM1	BALB-GGs	NOD-Salina	NOD-DM	NOD-GM1	NOD-GGs
Média	20	42.2	39.2	19.8	35.6	70.4	50.8
DP	10.8	7.4	10.5	12.7	13.76	32.0	13.0

Os gráficos relativos à expressão de GLP-1 (Figura 13, pág. 57), PDX-1 (Figura 14, pág. 58) e Ngn3 (Figura 13, pág. 57) em tecido acinar pancreático mostram diferença significativa no número de células marcadas com estes fatores de regeneração entre animais tratados com gangliosídeos e tratados com salina em ambas as linhagens experimentais estudadas.

Verificamos aumento significativo do número de células marcadas com cada um destes três fatores de regeneração no tecido acinar pancreático do grupo BALB/c GM1 em relação aos grupos BALB/c salina e BALB/c GGs ($p<0.0001$). Ao compararmos o grupo NOD salina ND com o grupo NOD DM, verificamos aumento significativo de células marcadas com os três fatores de regeneração no grupo diabético: ($p=0.009$) para Ngn3, ($p=0.049$) para PDX-1 e ($p=0.136$) para GLP-1. Ao compararmos os grupos NOD salina ND e NOD DM com os grupos NOD tratados com gangliosídeos (tanto GM1 quanto GGs), verificamos aumento significativo ($p<0.0001$) da expressão dos três marcadores celulares nos grupos tratados com gangliosídeos. Por fim, houve aumento significativo da expressão de Ngn3 ($p=0.058$), PDX-1 ($p=0.0007$) e de GLP-1 ($p<0.0001$) no grupo NOD GM1 em comparação ao grupo tratado com GGs. As tabelas 8 (pág. 57), 9 (pág. 58) e 10 (pág. 59) apresentam, respectivamente, os valores (média e desvio padrão) obtidos a partir da quantificação de células marcadas com anticorpos anti-GLP-1, anti-PDX-1 e anti-Ngn3, no tecido acinar pancreático dos animais ($n=5$) de todos os grupos analisados.

A marcação com anticorpos anti-IA1 não mostrou expressão deste fator de transcrição pancreático tanto nas ilhotas quanto no tecido acinar pancreático em quaisquer grupos analisados. Já a análise qualitativa de Peptídeo C mostrou expressão deste hormônio pancreático em todos os subgrupos analisados, tanto na linhagem BALB/c quanto na linhagem NOD. As imagens mostraram expressão aparentemente equivalente de Peptídeo C no grupo NOD DM em relação aos demais grupos NOD não diabéticos, tratados com gangliosídeos ou salina (dados não mostrados). Os resultados são mostrados a seguir por meio de pranchas de imagens e gráficos representativos das análises quantitativas realizadas por meio de microscopia por imunofluorescência indireta.

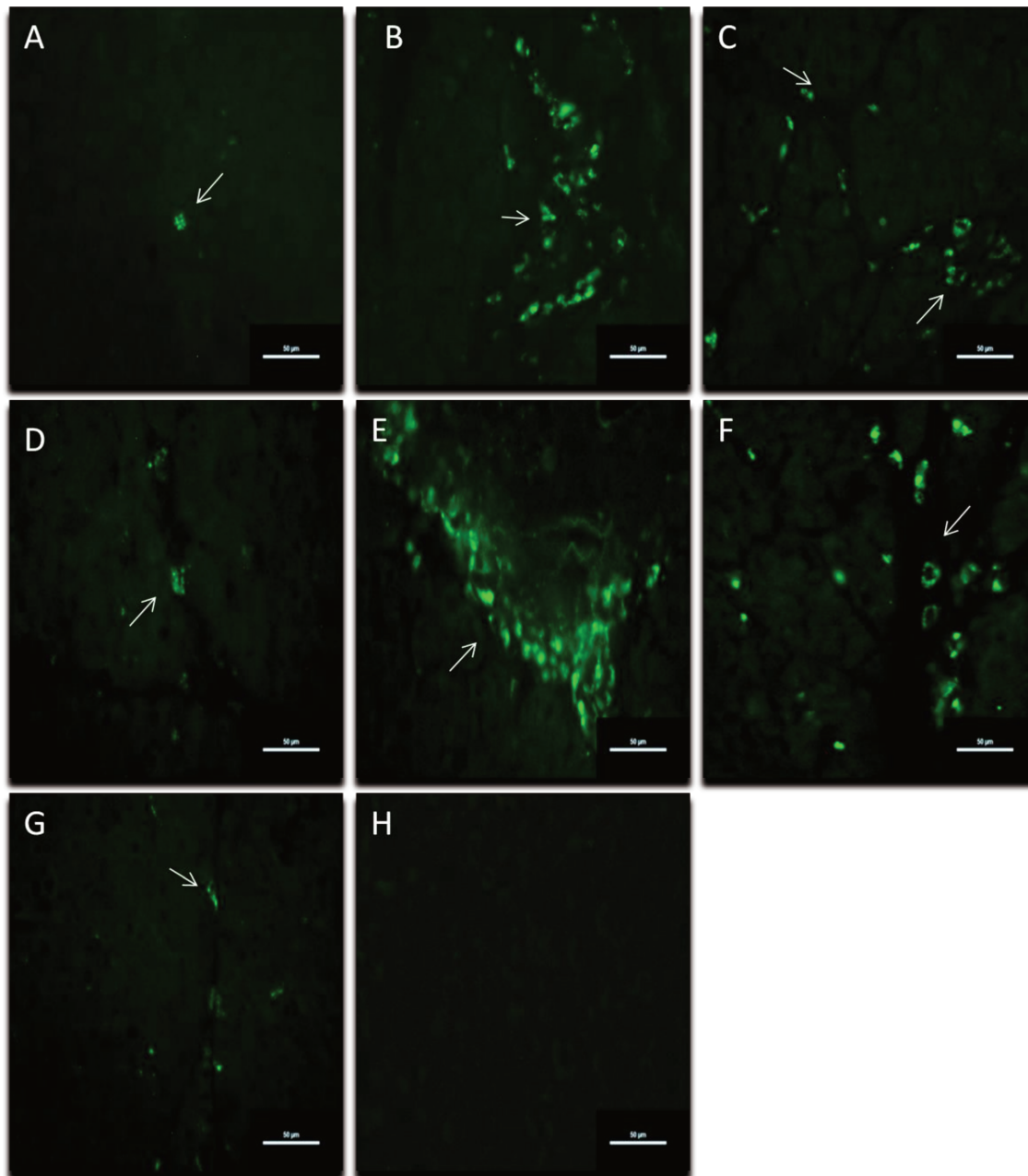


Figura 10: Prancha com imagens representativas de tecido acinar pancreático marcadas com anticorpo anti-GLP-1 (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:100) e revelado com anticorpo anti-cabra (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:400) conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC). A) BALB/c Salina B) BALB/c GM1 C) BALB/c GGs D) NOD Salina E) NOD GM1 F) NOD GGs G) NOD DM1 H) Controle negativo. As setas indicam marcação de GLP-1 em células da linhagem endócrina pancreática. Barra de magnitude 10µm. Aumento de 400x.

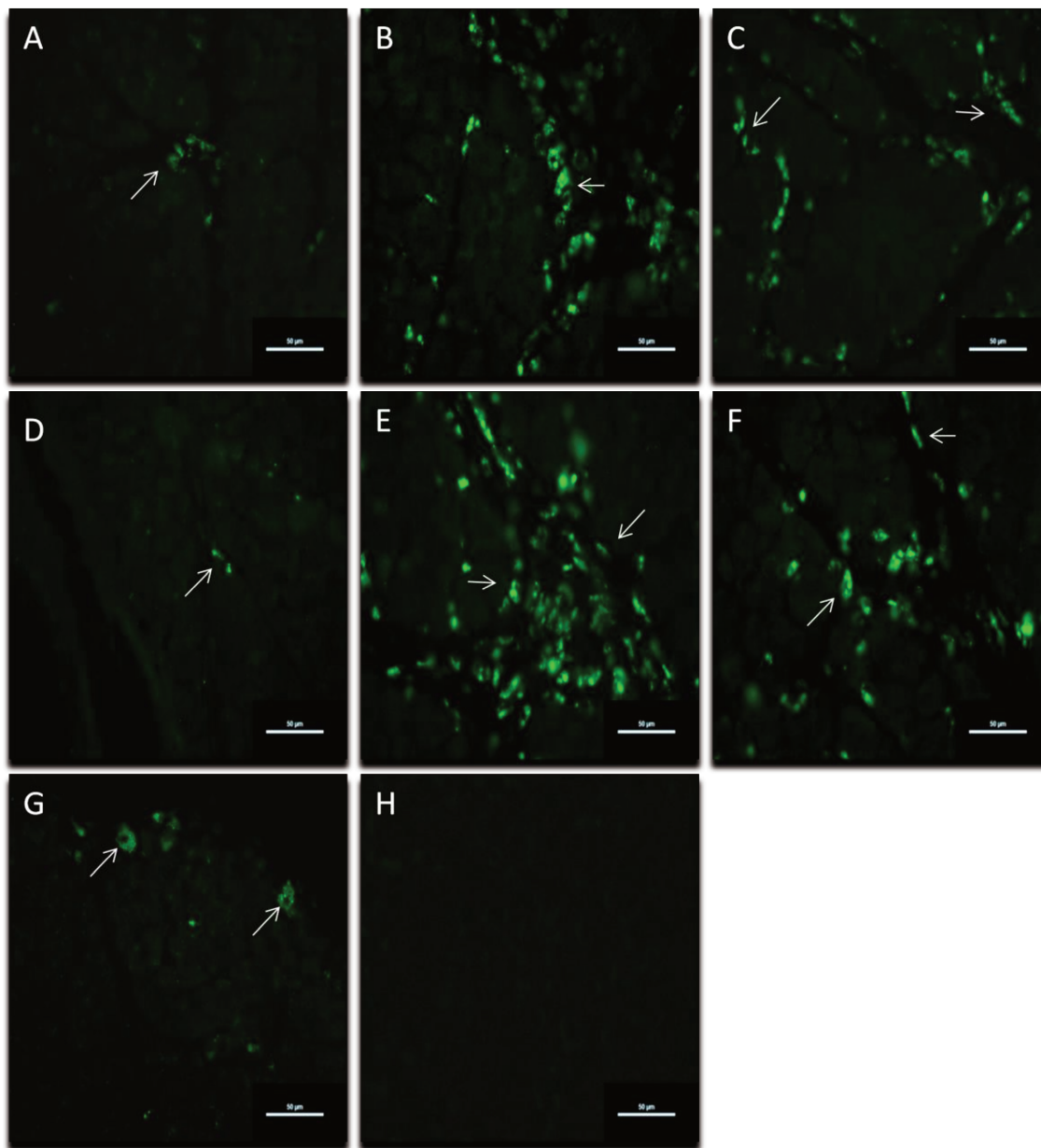


Figura 11: Prancha com imagens representativas de tecido acinar pancreático marcadas com anticorpo anti-PDX-1 (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:100) e revelado com anticorpo anti-cabra (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:300) conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC). A) BALB/c Salina B) BALB/c GM1 C) BALB/c GGs D) NOD Salina E) NOD GM1 F) NOD GGs G) NOD DM1 H) Controle negativo. As setas indicam marcação de PDX-1 em células da linhagem endócrina pancreática. Barra de magnitude 10µm. Aumento de 400x.

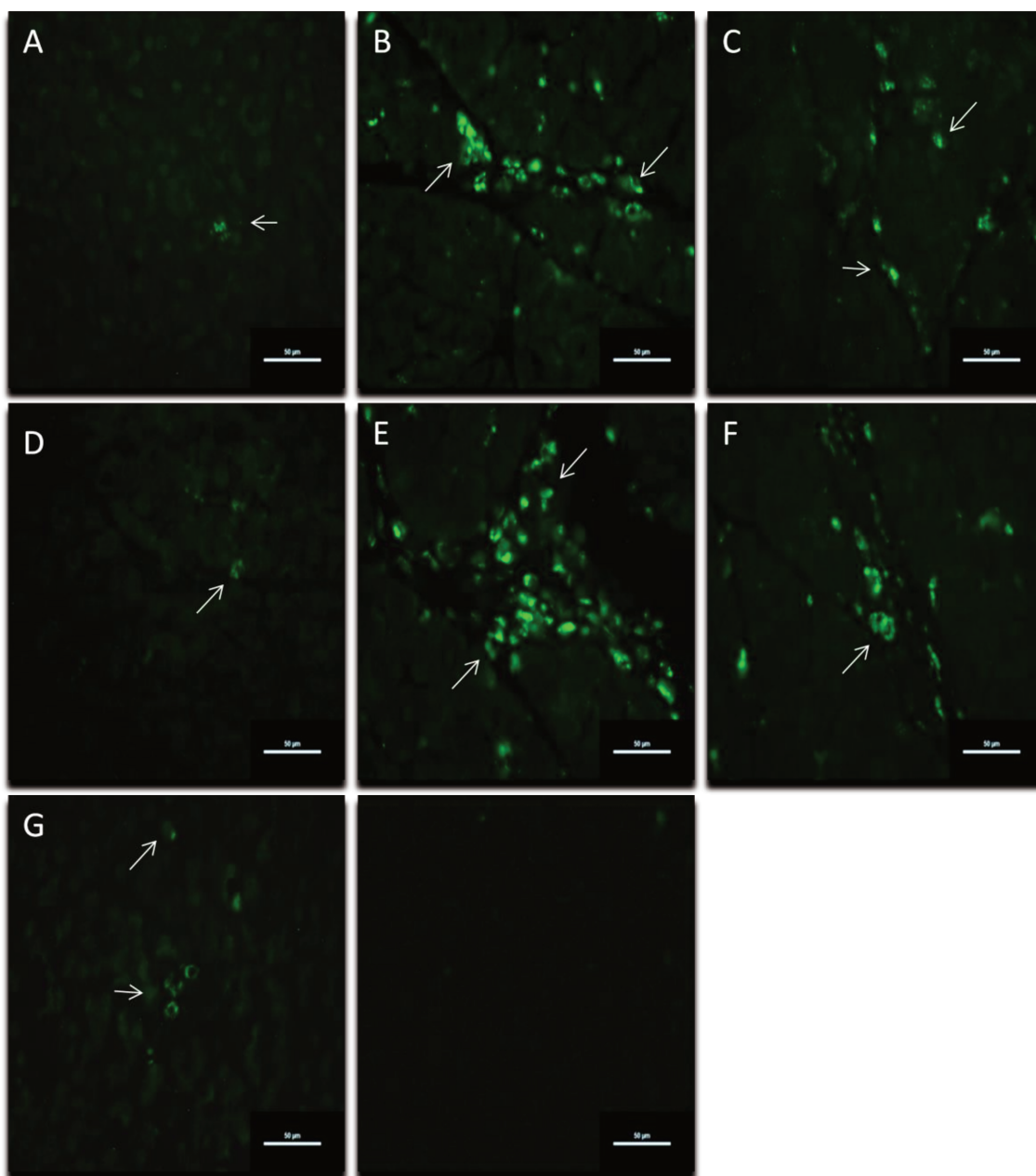


Figura 12: Prancha com imagens representativas de tecido acinar pancreático marcadas com anticorpo anti-Ngn3 (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:50) e revelado com anticorpo anti-cabra (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:400) conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC). A) BALB/c Salina B) BALB/c GM1 C) BALB/c GGs D) NOD Salina E) NOD GM1 F) NOD GGs G) NOD DM1 H) Controle negativo. As setas indicam marcação de Ngn3 em células da linhagem endócrina pancreática. Barra de magnitude 10µm. Aumento de 400x.

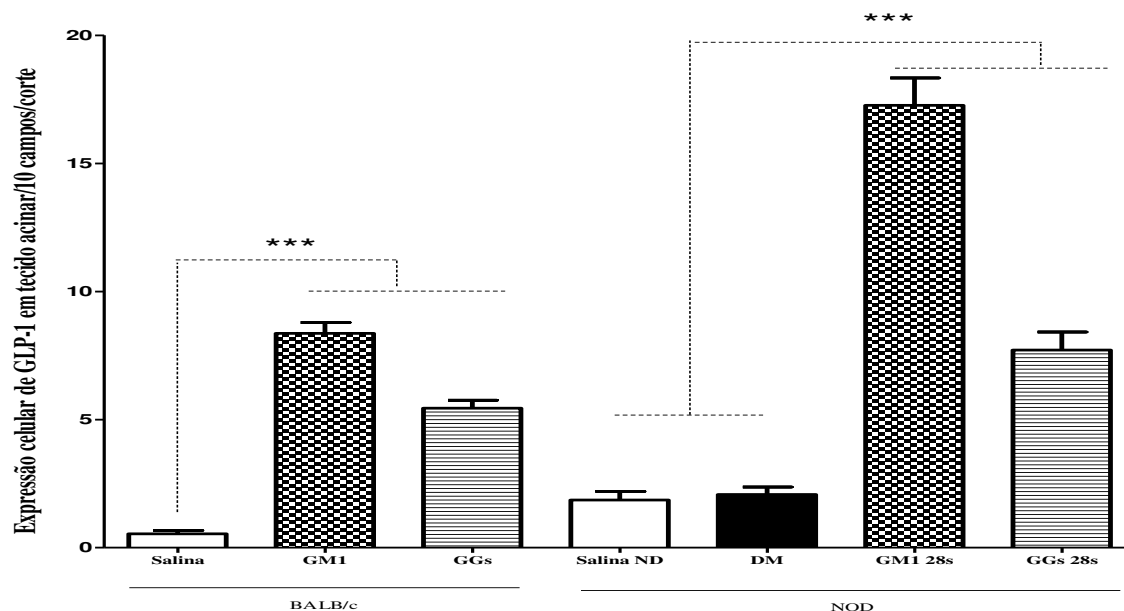


Figura 13. Gráfico representativo da imunomarcção celular em tecido acinar pancreático de animais tratados com gangliosídeos e controles salina com anti-GLP-1. Procedimento por microscopia de imunofluorescência indireta. Foram analisados 10 campos/3cortes/animal, amostragem n=5 animais. *** $p < 0.001$, avaliados por teste estatístico de Mann-Whitney. Programa computacional Graph Pad, versão 5 (La Jolla, CA, USA).

Tabela 8: Média e desvio padrão (DP) relativos ao número de células marcadas com anticorpo anti-GLP-1 em tecido acinar pancreático

	BALB-Salina	BALB-GM1	BALB-GGs	NOD-Salina	NOD-DM	NOD-GM1	NOD-GGs
Média	0.54	8.37	5.44	1.86	2.08	17.27	7.71
DP	0.13	0.42	0.31	0.33	0.29	1.06	0.70

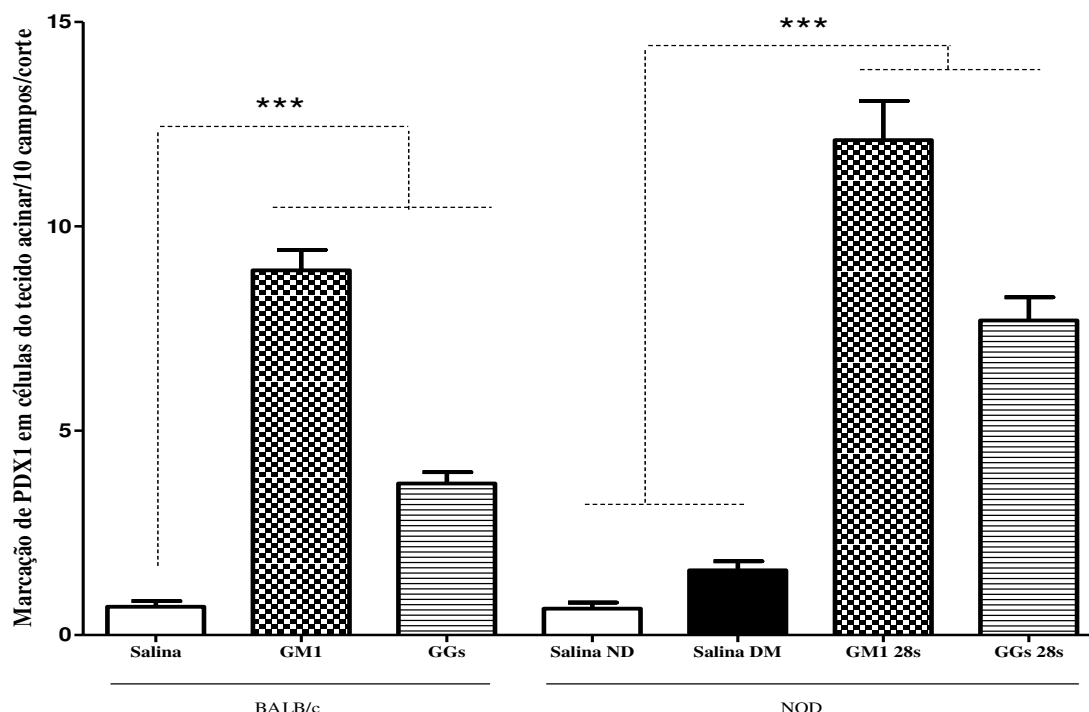


Figura 14. Gráfico representativo da imunomarcação celular em tecido acinar pancreático de animais tratados com gangliosídeos e controles salina com anti-PDX-1. Procedimento por microscopia de imunofluorescência indireta. Foram analisados 10 campos/3cortes/animal, amostragem n=5 animais. *** p<0.001, avaliados por teste estatístico de Mann-Whitney. Programa computacional Graph Pad, versão 5 (La Jolla, CA, USA).

Tabela 9: Média e desvio padrão (DP) relativos ao número de células marcadas com anticorpo anti-PDX-1 em tecido acinar pancreático

	BALB-Salina	BALB-GM1	BALB-GGs	NOD-Salina	NOD-DM	NOD-GM1	NOD-GGs
Média	0.7	8.9	3.7	0.65	1.58	12.11	7.7
DP	0.14	0.5	0.28	0.15	0.22	0.95	0.56

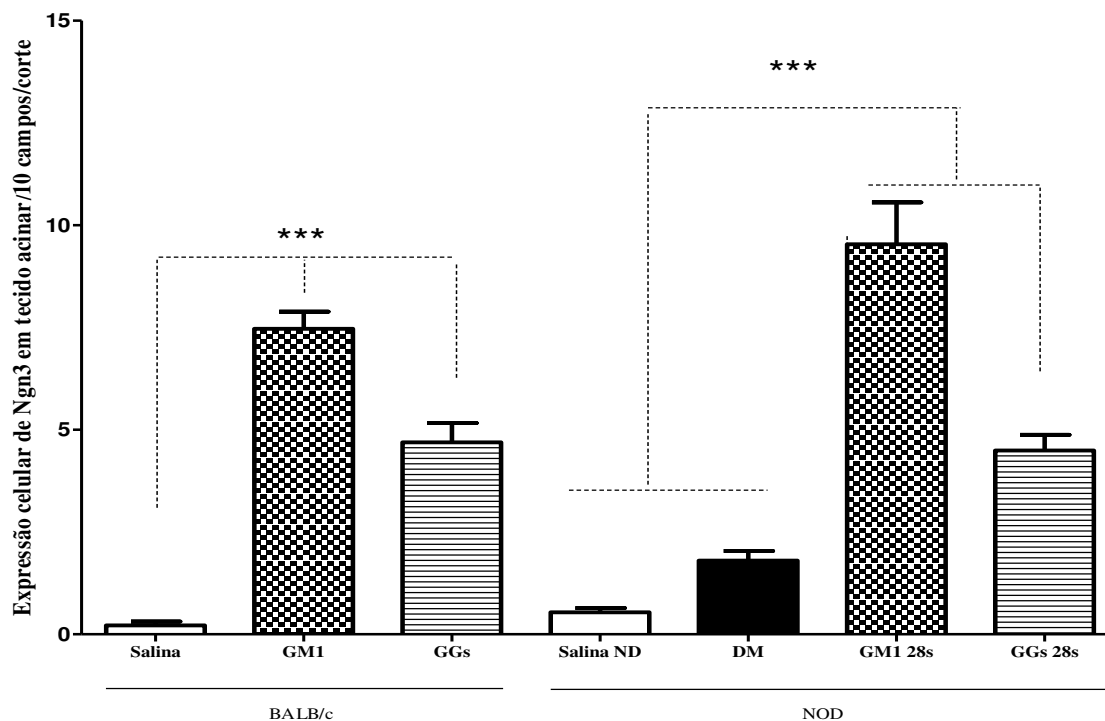


Figura 15. Gráfico representativo da imunomarcção celular em tecido acinar pancreático de animais tratados com gangliosídeos e controles salina com anti-Ngn3. Procedimento por microscopia de imunofluorescência indireta. Foram analisados 10 campos/3cortes/animal, amostragem n=5 animais. *** $p < 0.001$, avaliados por teste estatístico de Mann-Whitney. Programa computacional Graph Pad, versão 5 (La Jolla, CA, USA).

Tabela 10: Média e desvio padrão (DP) relativos ao número de células marcadas com anticorpo anti-Ngn3 em tecido acinar pancreático

	BALB-Salina	BALB-GM1	BALB-GGs	NOD-Salina	NOD-DM	NOD-GM1	NOD-GGs
Média	0.22	7.46	4.69	0.54	1.8	9.53	4.49
DP	0.09	0.42	0.47	0.10	0.23	1.05	0.38

4.7. EXPRESSÃO GÊNICA DE INSULINA E DOS FATORES DE REGENERAÇÃO GLP-1, PDX-1 e NGN3 EM ILHOTAS PANCREÁTICAS EMPREGANDO A TÉCNICA DE RT-PCR ONE STEP EM TEMPO REAL

A partir das extrações de RNA total empregando extração automática pelo sistema Exiprep® e RT-PCR em Tempo Real (Exicycler, Bioneer, Ko) e one step (Bioline, Ca, Inglaterra) as expressões gênicas foram determinadas. A expressão gênica de insulina estava aumentada no grupo NOD GM1 em relação ao grupo NOD salina ($p=0.028$) (Figura 16, pág. 61). Os valores referentes à média e desvio padrão da expressão gênica de insulina são apresentados na tabela 11 (pág. 61).

Verificamos aumento da expressão gênica de GLP-1 no grupo NOD GGs em relação ao grupo NOD GM1 ($p=0.0159$). Na linhagem BALB/c, a expressão gênica de GLP-1 estava aumentada no grupo tratado com GM1 em comparação aos grupos BALB/c salina ($p=0.028$) e BALB/c GGs ($p=0.057$). Não verificamos diferença significativa para a expressão gênica dos demais fatores de regeneração em ambas as linhagens animais estudadas. Curiosamente não observamos expressão de Ngn3 nas ilhotas dos camundongos BALB/c tratados com gangliosídeos. A Figura 17 (pág. 62) representa a expressão gênica de GLP-1, PDX-1 e Ngn3 (a partir de ilhotas isoladas dos camundongos BALB/c e NOD) e fenotificação celular. Os valores referentes à média e desvio padrão da expressão gênica de GLP-1, PDX-1 e Ngn3 podem ser observados nas tabelas 12, 13 e 14 (pág. 32).

4.8. FENOTIPIFICAÇÃO CELULAR ENDÓCRINA PANCREÁTICA POR DUPLA-MARCAÇÃO PARA AVALIAÇÃO DE SOBREPOSIÇÃO COM ANTICORPOS ANTI-GLP-1 COM ANTI-INSULINA, ANTI-GLUCAGON E ANTI-SOMATOSTATINA

Embora não quantificadas, as imagens mostram co-expressão de GLP-1 e somatostatina apenas nos grupos tratados com gangliosídeos (GM1 e GGs) em ambas as linhagens experimentais (Figuras 18 a 20, págs. 64 a 66). Houve aumento da co-expressão de GLP-1 e insulina nos camundongos NOD e BALB/c

tratados com gangliosídeos (GM1 e GGs) em comparação àqueles tratados com salina (Figuras 21 e 22, págs. 67 e 68). As imagens representativas da dupla-marcação de glucagon e GLP-1 mostram co-expressão em todos os subgrupos estudados (Figuras 23 e 24, págs. 69 e 70).

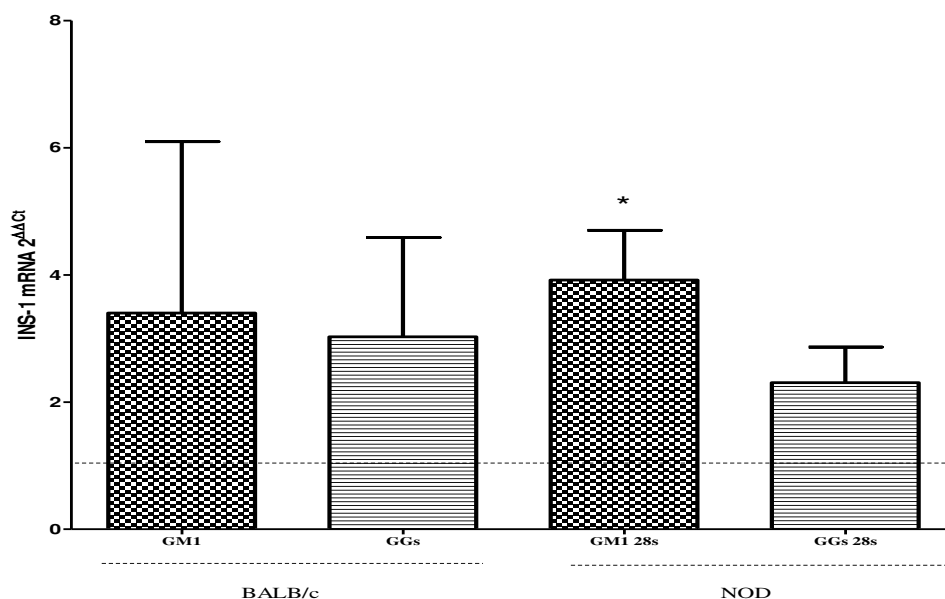


Figura 16. Gráfico relativo à expressão gênica de insulina nas ilhotas pancreáticas dos animais estudados. Notou-se aumento significativo da expressão gênica de insulina no grupo NOD tratado com GM1 em comparação ao grupo NOD salina ($p=0.028$). Análise estatística por teste estatístico de Mann-Whitney, $*p<0.05$ e $**p<0.001$. Programa computacional Graph Pad, versão 5 (La Jolla, CA, USA).

Tabela 11: Média e desvio padrão (DP) relativos à análise da expressão gênica de insulina em ilhotas pancreáticas de camundongos BALB/c e NOD

	BALB-Salina	BALB-GM1	BALB-GGs	NOD-Salina	NOD-GM1	NOD-GGs
Média	1	3.4	3.02	1	3.92	2.3
DP	0	2.69	1.55	0	0.78	0.56

Fenotipificação celular/ilhotas

Expressão gênica/ilhotas

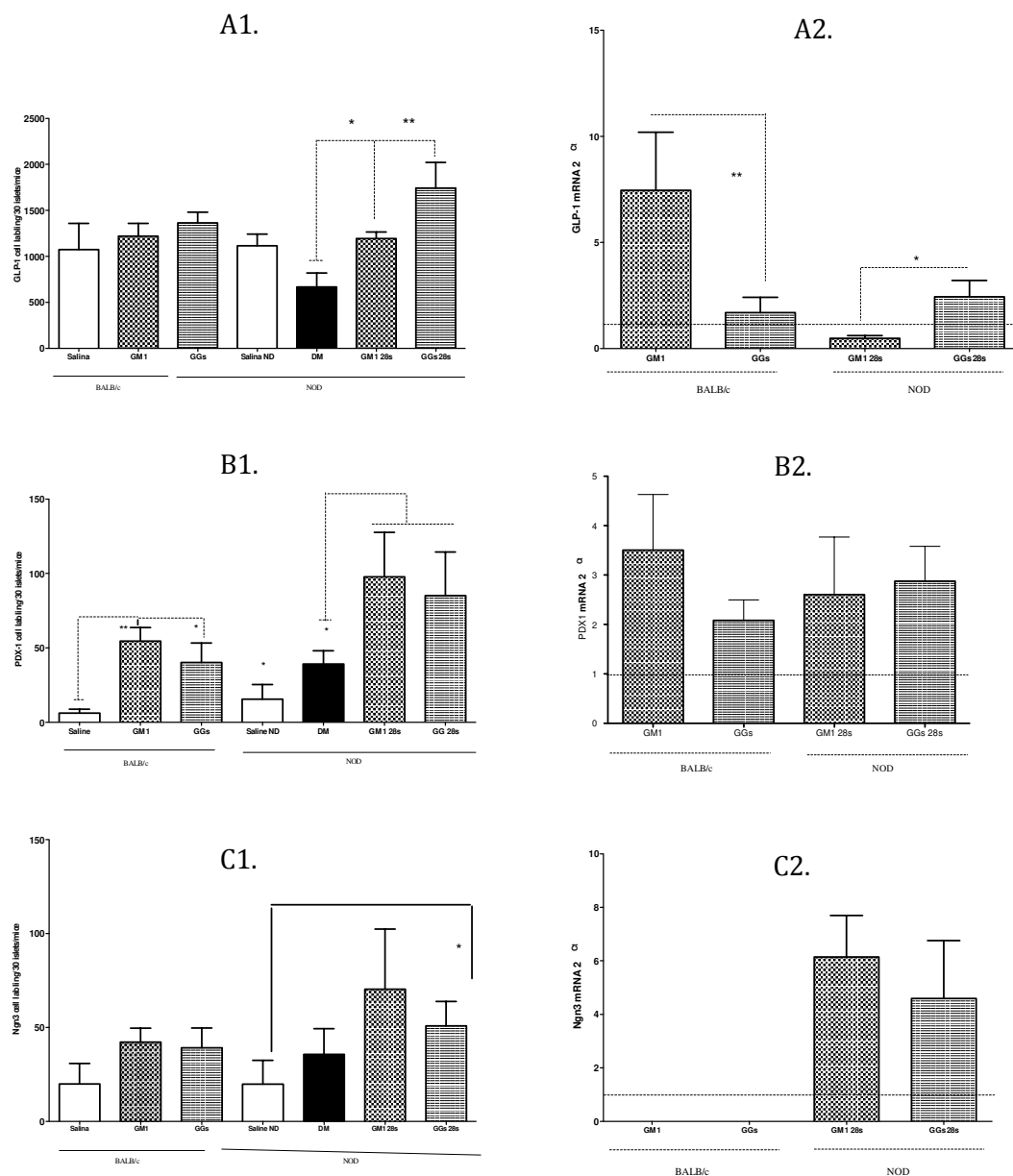


Figura 17. Prancha representativa da comparação entre fenotipificação celular e expressão gênica dos fatores de regeneração GLP-1 (A1 e A2) PDX-1 (B1 e B2) e Ngn3 (C1 e C2) em ilhotas pancreáticas * $p < 0.05$ e ** $p < 0.001$ analisados por teste estatístico de Mann-Whitney. Programa computacional Graph Pad, versão 5 (La Jolla, CA, USA).

Tabela 12: Média e desvio padrão (DP) relativos à análise da expressão gênica de GLP-1 em ilhotas pancreáticas de camundongos BALB/c e NOD

	BALB-Salina	BALB-GM1	BALB-GGs	NOD-Salina	NOD-GM1	NOD-GGs
Média	1	7.45	1.68	1	0.47	2.43
DP	0	2.73	0.72	0	0.13	0.77

Tabela 13: Média e desvio padrão (DP) relativos à análise da expressão gênica de PDX-1 em ilhotas pancreáticas de camundongos BALB/c e NOD

	BALB-Salina	BALB-GM1	BALB-GGs	NOD-Salina	NOD-GM1	NOD-GGs
Média	1	3.5	2.08	1	2.6	2.87
DP	0	1.12	0.4	0	1.16	0.7

Tabela 14: Média e desvio padrão (DP) relativos à análise da expressão gênica de Ngn3 em ilhotas pancreáticas de camundongos BALB/c e NOD

	BALB-Salina	BALB-GM1	BALB-GGs	NOD-Salina	NOD-GM1	NOD-GGs
Média	1	0	0	1	6.14	4.59
DP	0	0	0	0	1.55	2.16

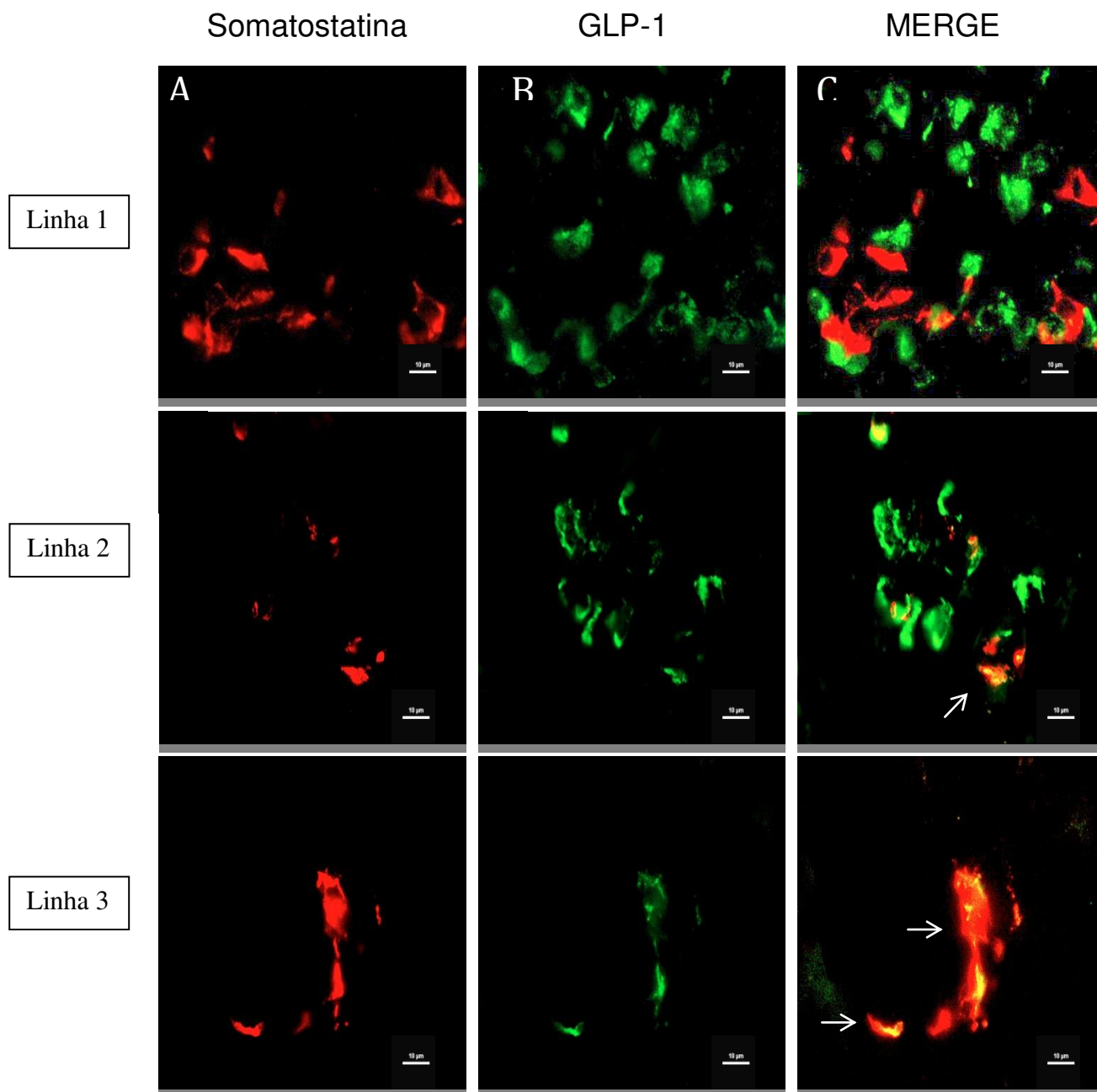


Figura 18. Co-localização de somatostatina (A), GLP-1 (B) e merge (C) realizada na mesma secção de tecido (ilhota) de animais controle BALB/c Linha 1 (salina), Linha 2 (GM1) e Linha 3 (GGs). As setas indicam sobreposição. Ilhotas pancreáticas marcadas com anticorpo anti-GLP-1 (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:100) e revelado com anticorpo anti-cabra (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:400) conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC); anticorpo anti-somatostatina (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:50) e revelado com anticorpo anti-coelho (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:500) conjugado com Texas Red (TR). Barra de magnitude 10µm. Aumento de 1000x.

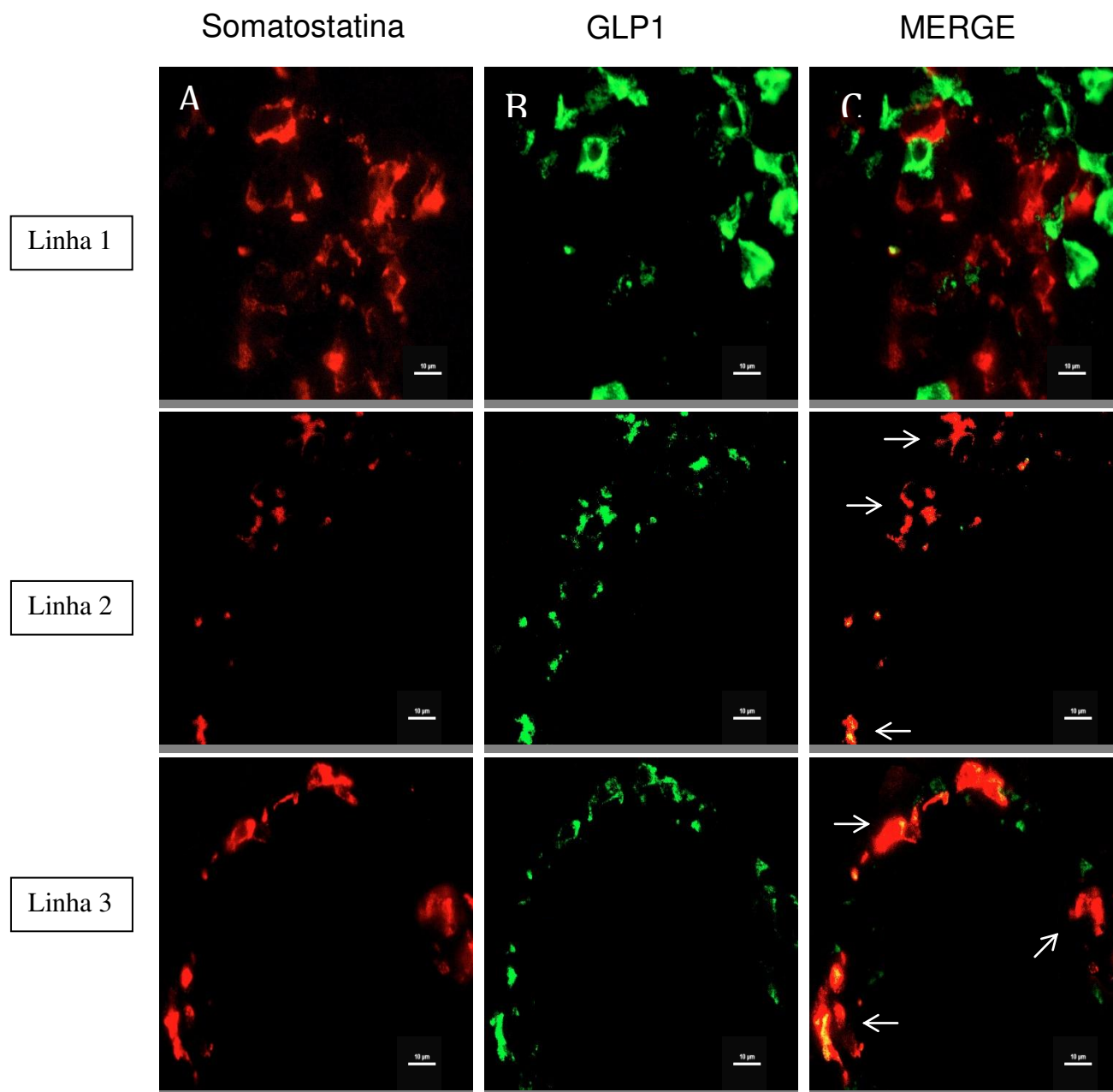


Figura 19. Co-localização de somatostatina (A), GLP-1 (B) e merge (C) realizada na mesma secção de tecido (ilhota) de animais NOD não-diabéticos: Linha 1 (salina), Linha 2 (GM1) e Linha 3 (GGs). As setas indicam sobreposição. Ilhotas pancreáticas marcadas com anticorpo anti-GLP-1 (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:100) e revelado com anticorpo anti-cabra (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:400) conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC); anticorpo anti-somatostatina (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:50) e revelado com anticorpo anti-coelho (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:500) conjugado com Texas Red (TR). Barra de magnitude 10µm. Aumento de 1000x.

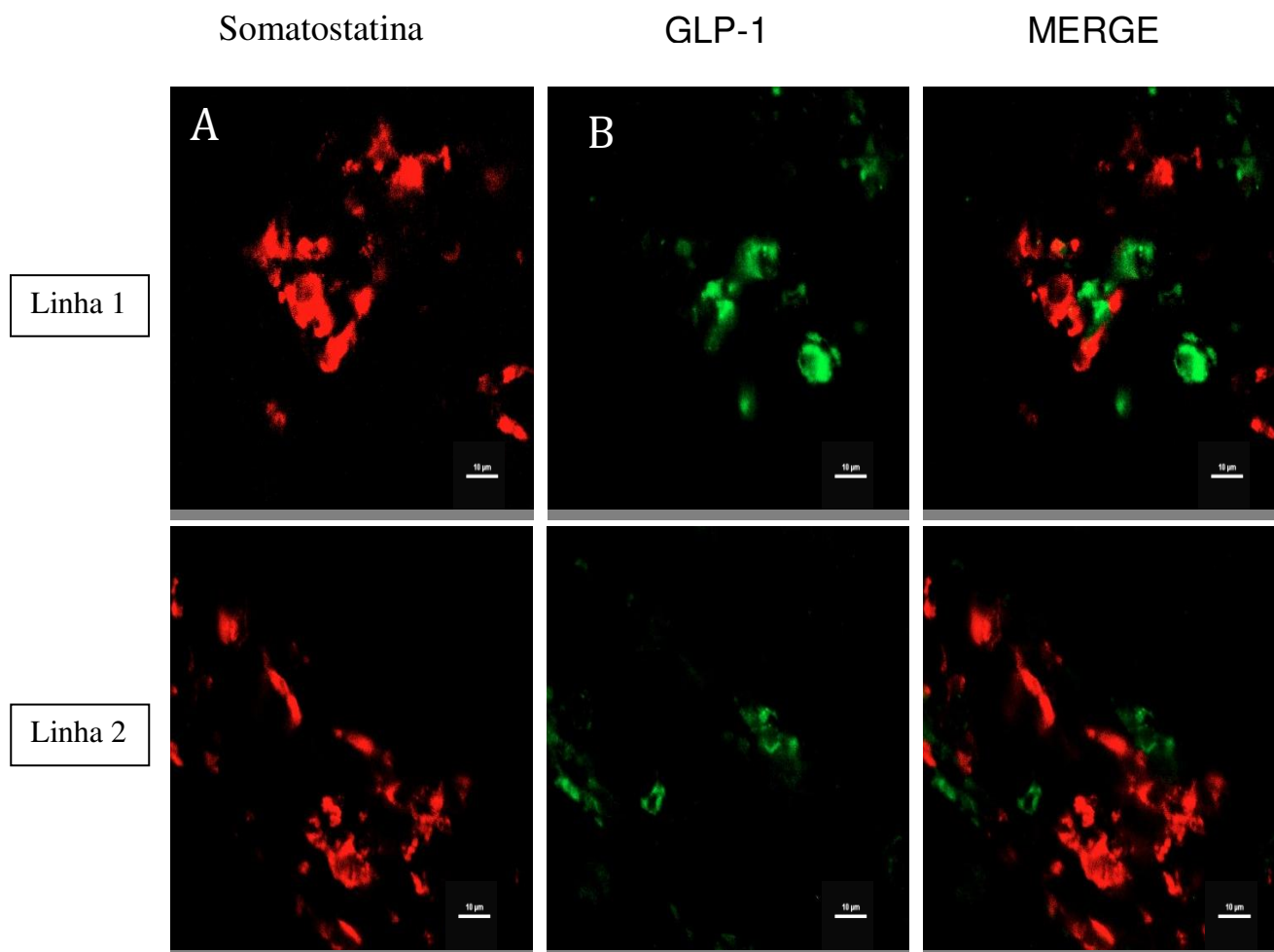


Figura 20. Co-localização de somatostatina (A), GLP-1 (B) e merge (C) realizada na mesma secção de tecido (ilhota) de animais NOD diabéticos: Linha 1 (salina), Linha 2 (GM1). As setas indicam sobreposição. Ilhotas pancreáticas marcadas com anticorpo anti-GLP-1 (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:100) e revelado com anticorpo anti-cabra (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:400) conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC); anticorpo anti-somatostatina (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:50) e revelado com anticorpo anti-coelho (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:500) conjugado com Texas Red (TR). Barra de magnitude 10μm. Aumento de 1000x.

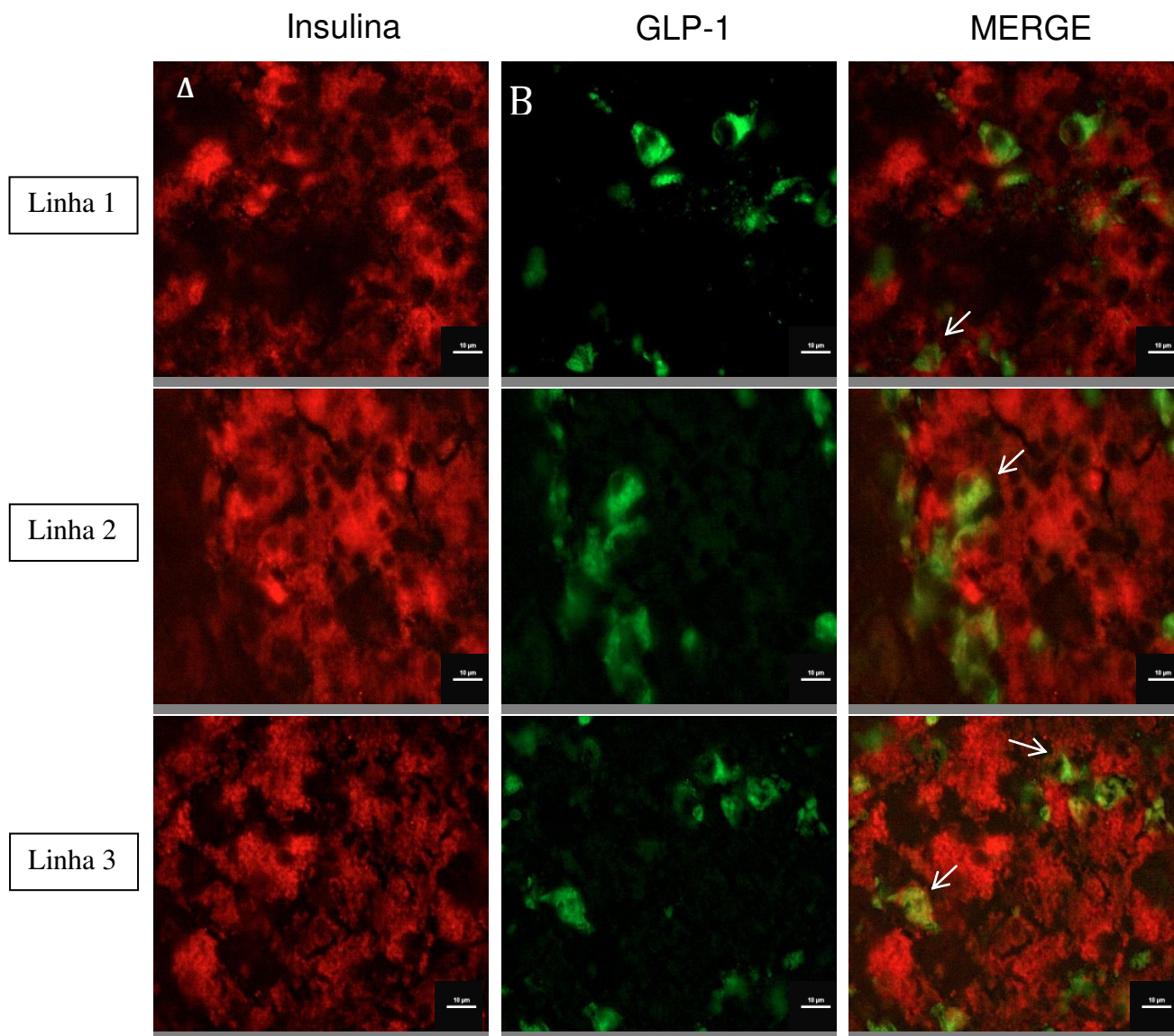


Figura 21. Co-localização de Insulina (A), GLP-1 (B) e merge (C) realizada na mesma secção de tecido (ilhota) de camundongos da linhagem BALB/c: Linha 1 (salina), Linha 2 (GM1), Linha 3 (GGs). As setas indicam sobreposição. Ilhotas pancreáticas eram marcadas com anticorpo anti-GLP-1 (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:100) e revelado com anticorpo anti-cabra (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:400) conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC); anticorpo anti-insulina (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:100) e revelado com anticorpo anti-coelho (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:150) conjugado com Texas Red (TR). Barra de magnitude 10µm. Aumento de 1000x.

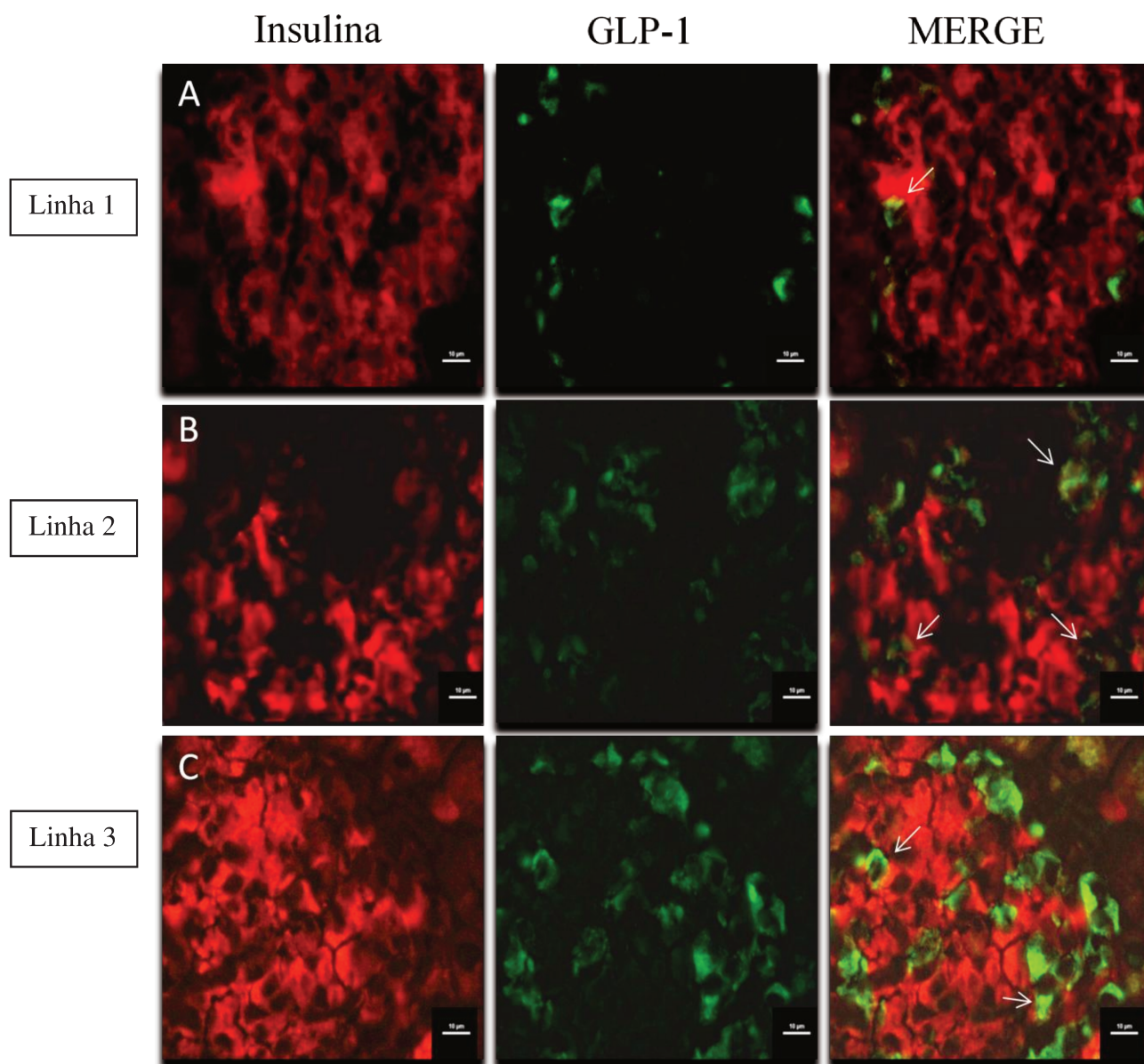


Figura 22. Co-localização de Insulina (A), GLP-1 (B) e merge (C) realizada na mesma secção de tecido (ilhota) de camundongos NOD não-diabéticos: Linha 1 (salina), Linha 2 (GM1), Linha 3 (GGs). As setas indicam sobreposição. Ilhotas pancreáticas eram marcadas com anticorpo anti-GLP-1 (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:100) e revelado com anticorpo anti-cabra (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:400) conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC); anticorpo anti-insulina (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:100) e revelado com anticorpo anti-coelho (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:150) conjugado com Texas Red (TR). Barra de magnitude 10µm. Aumento de 1000x.

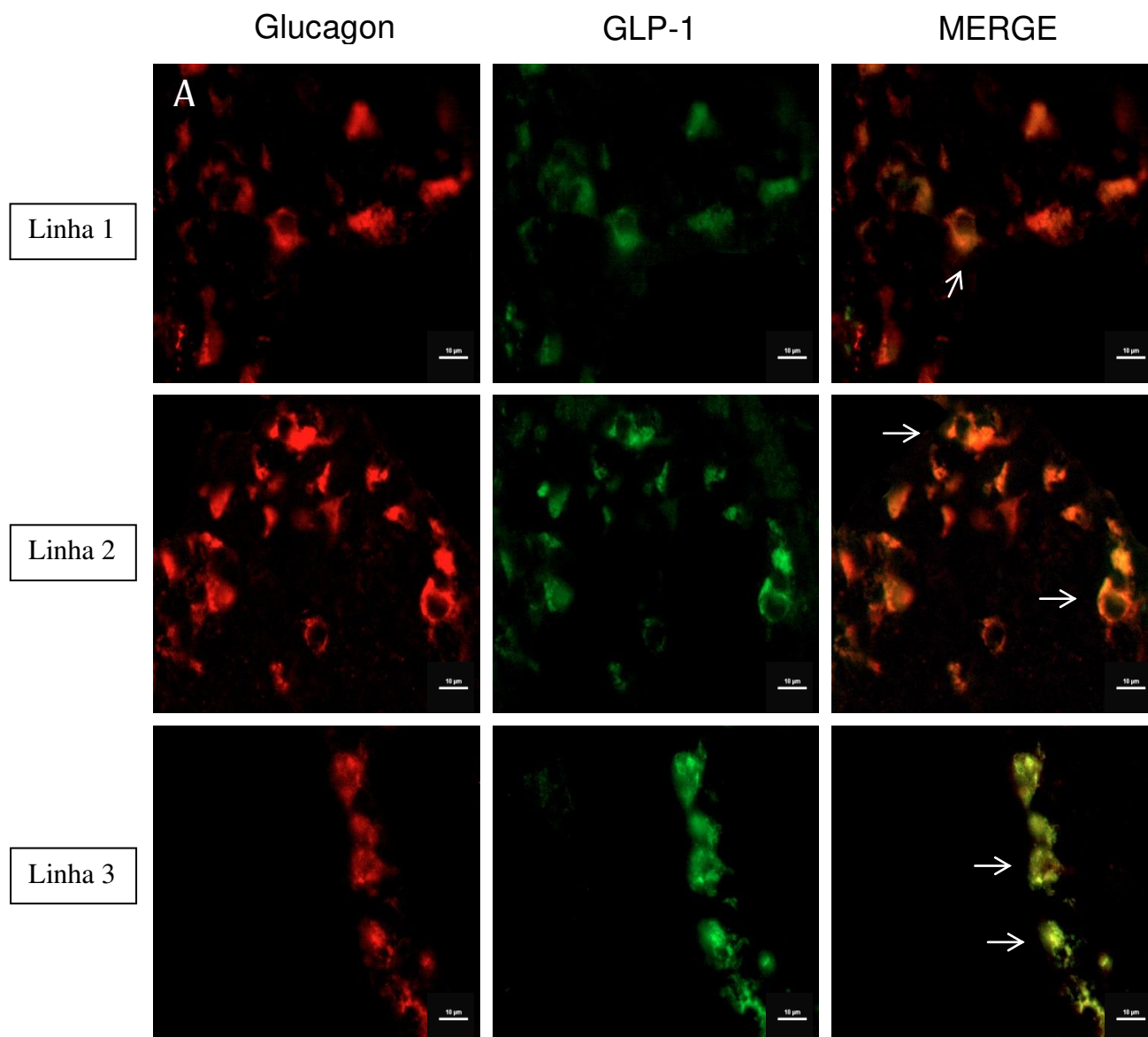


Figura 23. Co-localização de Glucagon (A), GLP-1 (B) and merge (C) realizada na mesma secção de tecido (ilhota) camundongos da linhagem BALB/c: Linha 1 (salina), Linha 2 (GM1), Linha 3 (GGs). As setas indicam sobreposição. Ilhotas marcadas com anticorpo anti-GLP-1 (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:100) e revelado com anticorpo anti-cabra (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:400) conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC); anticorpo anti-glucagon (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:100) e revelado com anticorpo anti-coelho (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:400) conjugado com Texas Red (TR). Barra de magnitude 10µm. Aumento de 1000x.

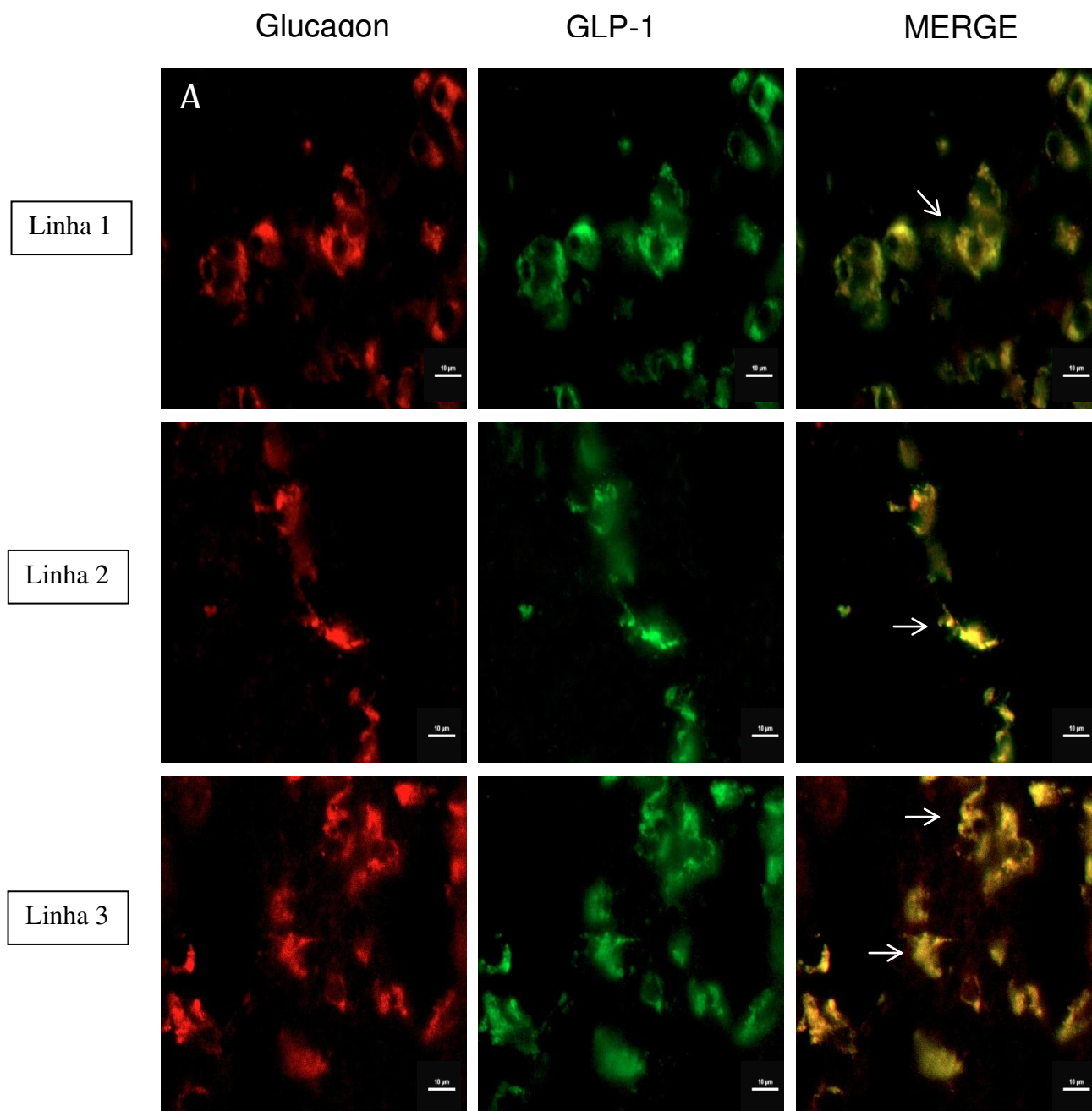


Figura 24. Co-localização de Glucagon (A), GLP-1 (B) and merge (C) realizada na mesma secção de tecido (ilhota) camundongos NOD não-diabéticos: Linha 1 (salina), Linha 2 (GM1) , Linha 3 (GGs). As setas indicam sobreposição. Ilhotas marcadas com anticorpo anti-GLP-1 (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:100) e revelado com anticorpo anti-cabra (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:400) conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC); anticorpo anti-glucagon (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:100) e revelado com anticorpo anti-coelho (Santa Cruz, CA, USA, na concentração 1:400) conjugado com Texas Red (TR). Barra de magnitude 10µm. Aumento de 1000x.

4.9. AVALIAÇÃO *IN SITU* DE APOPTOSE PELA TÉCNICA DE TUNEL EM ILHOTAS PANCREÁTICAS DOS ANIMAIS TRATADOS

Cortes provenientes de pâncreas dos camundongos NOD tratados com gangliosídeos (GGs ou GM1) e salina foram submetidos à técnica de Tunel com contra-coloração com tricromio de Gomori. As áreas assinaladas nas imagens (400x) representativas dos grupos NOD GGs, NOD salina ND e NOD DM (Figura 25, pág. 72) foram detalhadas em magnitude de 600x, assim como as imagens representativas do grupo NOD GM1 (Figura 26, pág. 73), para melhor visualização das células apoptóticas (Tunel+), conforme mostrado pelas setas. Verificamos número elevado de células Tunel+ nos grupos NOD salina ND e NOD DM. Comparando-se os animais tratados com GGs e GM1, o número de células apoptóticas nos animais tratados com GM1 é maior. As células com citoplasma claro e maior são as da linhagem endócrina pancreática. Já aquelas com fragmentação ou encolhimento nuclear caracterizam as células apoptóticas.

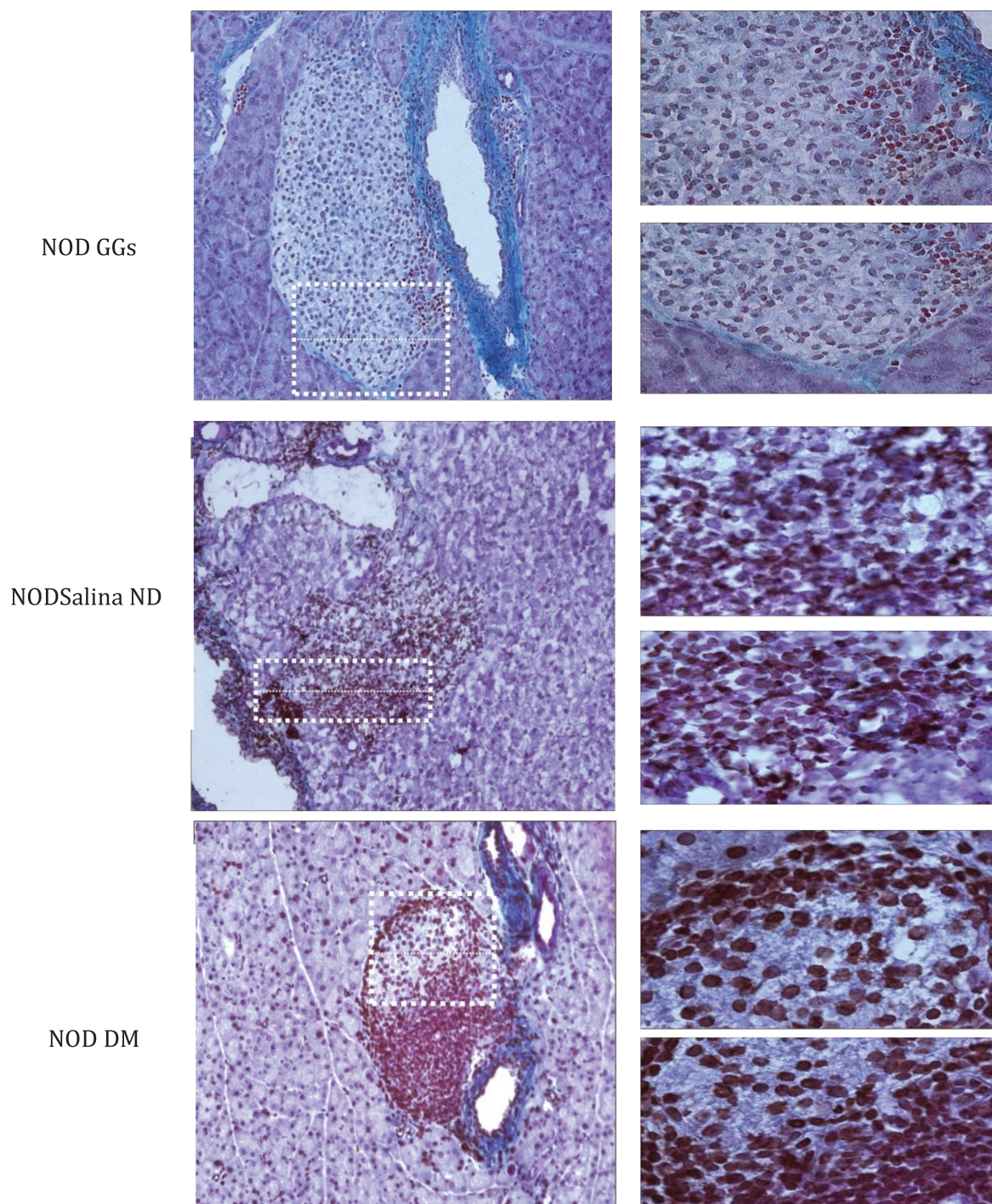


Figura 25. Imagens representativas de secção de tecidos pancreáticos de NOD tratados com salina ou gangliosideos (GGs). Avaliação da apoptose por técnica de Tunel com contra-coloração por Tricromio de Gomori. À direita está representado detalhe com magnitude 600x. As setas mostram as áreas com células apoptóticas (Tunel+). Os animais tratados com GGs mostram áreas com menor número de células Tunel+. As células com citoplasma claro são da linhagem endócrina.

NOD GM1

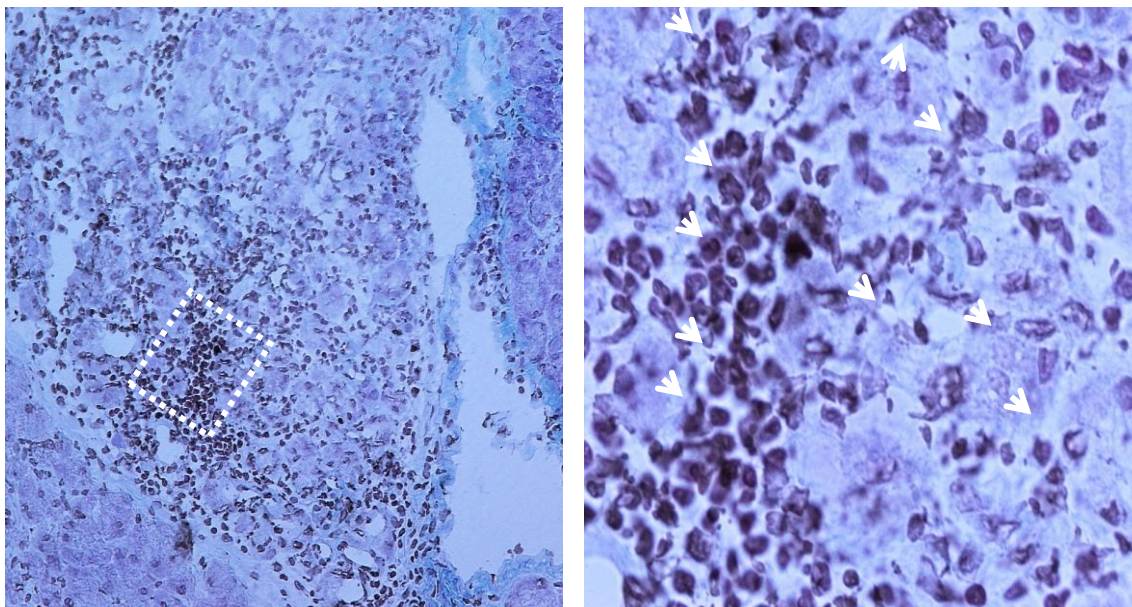


Figura 26. Imagens representativas de secção de tecidos pancreáticos de NOD tratados com GM1. Avaliação da apoptose por técnica de Tunel com contra-coloração por Tricromio de Gomori 400x. À direita está representado detalhe da área selecionada à esquerda, com magnitude 600x. As setas mostram as áreas com células apoptóticas (Tunel+). Os tipos celulares com citoplasma claro são da linhagem endócrina pancreática.

5 - Discussão

Os gangliosídeos atuam no controle da expressão do diabetes mellitus tipo 1 (DM1) de diferentes formas. O gangliosídeo GM1 é uma molécula pluripotente e está envolvida na inativação de linfócitos T por meio do mascaramento da molécula CD4, na inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, TNF- α e IFN- γ) e no estímulo à síntese de citocinas anti-inflamatórias e neurotrofinas (IL4 e NGF). Este gangliosídeo é utilizado também na restauração de funções neurológicas, podendo reproduzir ou potencializar ações neurotróficas [68, 69].

Wilbertz et al. [13] foram os primeiros a utilizar gangliosídeos no tratamento do DM1. Em seu trabalho, o grupo administrou 50mg/Kg/dia de mistura de gangliosídeos, similar à utilizada em nosso trabalho, no tratamento de camundongos NOD. Após 35 semanas de tratamento houve significativa redução da expressão do DM1, com aproximadamente 50% de instalação da doença [13]. O grupo afirma que, apesar da diminuição da incidência do diabetes, não houve diferença na frequência de perivasculite, (evento que precede a insulite) nos animais tratados em comparação aos controles. A diferença entre os resultados obtidos por Wilberz e pelo nosso grupo pode ser explicada pela diferença na dosagem de gangliosídeos utilizada nos tratamentos.

Papaccio et al. [14] administraram a mistura de gangliosídeo na mesma concentração utilizada em nosso trabalho (150mg/kg/dia); consideraram diabéticos os animais com glicemia igual ou superior a 11.05 mmol/L (equivalente a 200mg/dL). Nosso protocolo, por outro lado, considerou diabéticos os animais com glicemia igual ou superior a 10 mmol/L (valor equivalente a 180 mg/dL). Segundo Papaccio, houve controle da hiperglicemia nos animais tratados, havendo retardo da progressão do desarranjo da cito-arquitetura das ilhotas de Langerhans [14]. A classificação dos graus de insulite pelo referido autor, contudo, não é clara. Este assume como insulite de grau 0 as ilhotas sem infiltrado. Ilhotas de grau 1 são aquelas com “pouco” infiltrado, disposto de maneira “irregular”, com maior concentração periférica às ilhotas. Já o grau 2 corresponde às ilhotas com infiltração branda (inferior a 50%) na periferia e interior das ilhotas. Por fim, Papaccio assume que o grau 3 correspondente às ilhotas com insulite avançada, caracterizada por infiltrado superior a 50% da área total da ilhota [14]. Nosso

protocolo, por outro lado, é mais específico e rigoroso na caracterização dos infiltrados, sendo esta constituída por um total de 5 graus de insulite. O grau 0 é aquele cuja ilhota não apresenta infiltrado. Já o grau 1 apresenta infiltrado inferior a 25%. O grau 2 corresponde às ilhotas com infiltrado entre 25-80% de sua área total. As ilhotas com infiltrado superior a 80% da sua área total constituem o grau 3. Por fim, ilhotas completamente tomadas pelo infiltrado são consideradas como ilhotas de grau 4. Nosso protocolo assume que a insulite avançada é aquela referente aos graus 3 e 4. Papaccio [14] por outro lado, assume que infiltrado correspondente a 50% da ilhota já pode ser considerado como representativo de insulite avançada, o que para nós significa insulite moderada. Além disso, Papaccio não é claro na distinção dos infiltrados representativos de graus 1 e 2, já que ambos englobam ilhotas com infiltrado inferior a 50% da área total da ilhota [14].

Mais adiante, o autor não notou diferença significativa na insulite apresentada pelos grupos controle e tratados [14] ao contrário do que foi evidenciado em nosso trabalho, com os grupos GM1 (não-diabético) e GGs apresentando mais de 50% do total de ilhotas sendo G0 e G1, além de menor quantidade de ilhotas com insulite avançada (graus 3 e 4) em comparação aos demais grupos.

Nosso protocolo contou com 20 animais/grupo, tanto para tratados quanto para não-tratados. Papaccio, por sua vez, dividiu seu trabalho em dois grupos tratados com GGs e dois grupos controle (salina). Os grupos tratados, denominados “grupo 1” e “grupo 2”, contavam com apenas 12 animais cada. Já os grupos controle, ainda menores, contavam com apenas 5 animais cada [14]; estes números podem ser considerados insuficientes para estudos envolvendo camundongos da linhagem NOD já que, mesmo com a predisposição e desenvolvimento da autoimunidade, não são todos os animais que desenvolvem o diabetes [70]. Além de atuar na diminuição da insulite, os gangliosídeos exógenos parecem agir na diminuição da taxa de apoptose de células β pancreáticas. Green e Flavel relatam que, nos camundongos NOD, a apoptose deste tipo celular pancreático é induzida pela ação de linfócitos TCD4+ e TCD8+ [13]. Assim,

mecanismos envolvidos na inibição da proliferação de linfócitos T têm sido sugeridos; o mascaramento seguido de endocitose da molécula CD4 [71] bem como o bloqueio de sítios de ligação específicos através de ligação intercelular por meio de interação de sua cadeia glicídica com proteínas de membrana dos linfócitos, sugere que os gangliosídeos atuam, também, como receptores ou co-receptores celulares [72]. Testes *in vitro* mostram que os gangliosídeos inibem muitos passos da resposta imune celular, tais como o processamento de antígenos, sua apresentação, proliferação e função citotóxica [12]. Portanto, é possível sugerir alguma preservação funcional das células β pancreáticas, mesmo na presença de infiltrado, devido a estes mecanismos de ação antiinflamatória modulados pelos gangliosídeos exógenos. Em desacordo com Wilbertz [13], Papaccio afirma que o tratamento com gangliosídeos não é suficiente para reduzir a incidência do diabetes, uma vez que os grupos sacrificados 10 semanas depois de cessado o tratamento obtiveram praticamente a mesma incidência de DM1 encontrada nos animais controle da mesma idade [14]. Nossos resultados, porém, coincidem com os verificados por Wilbertz [13], reafirmando a redução *in vivo* da incidência do DM1 por meio da administração exógena de gangliosídeos.

Outros resultados obtidos em nosso estudo contrastam com resultados obtidos por Papaccio e Wilbertz. Estes resultados podem ser explicados pela diferença na dosagem utilizada no protocolo de Wilbertz (50mg/kg/dia) [13] em relação às dosagens utilizadas por Papaccio (12) e por nós (150mg/kg/dia). Além disso, o período de tratamento (11 semanas) a que os camundongos NOD foram submetidos, no estudo de Papaccio, se mostrou ineficaz para a total prevenção do diabetes, podendo ser considerado insuficiente. Já a extensão do tratamento, da 4^a à 28^a semana de vida, proposta em nosso protocolo, se mostrou mais eficaz alcançando 100% de prevenção da doença.

Papaccio, para manter vivos os animais diabéticos cujo tratamento já havia sido cessado, injetou doses diárias de insulina (Eli-Lilly, Sesto Fiorentino, Italy) [14]. Em nosso protocolo, animais cujo tratamento foi interrompido quatro semanas antes da data do sacrifício, apresentaram apenas 10% de incidência de DM1 no grupo GM1 e total prevenção da doença no grupo GGs, sem que fosse

administrada exogenamente substância alguma, demonstrando que a terapêutica com gangliosídeos interfere na progressão do diabetes na linhagem NOD.

São vários os possíveis mecanismos de atuação dos gangliosídeos no controle do DM1. Alguns estudos descrevem relação entre a administração exógena de gangliosídeos e o aumento do influxo de íons Ca^{2+} intracelular em diferentes linhagens celulares. Este potencial de ação também varia de acordo com a estrutura molecular dos gangliosídeos envolvida, diretamente, no contato com as células [6]. Gouy et al. [73] mostram que a administração exógena de GM1 está relacionada à elevação prolongada dos níveis de influxo de íons Ca^{2+} intracelulares e também ao aumento da fosforilação de tirosinas em linfócitos T Jurkat. Os autores afirmam que a estrutura química do GM1 responsável pelo desencadeamento destes eventos biológicos é o ácido siálico (NANA). Ao administrar exogenamente os gangliosídeos GM1, GD1a, GD1b e GT1b – os mesmos utilizados pelo nosso grupo no presente trabalho, Muthing et al. [6] verificaram que os quatro tipos moleculares foram capazes de estimular o influxo de íons Ca^{2+} em vesículas membranosas (retículo sarcoplasmático, túbulos T e sarcolema) presentes em células musculares extraídas de coelhos, concluindo que o potencial de ação dos gangliosídeos exógenos para o referido estímulo varia de acordo com a configuração molecular do ácido siálico, com o tamanho da molécula de oligossacarídeo e, finalmente, com o comprimento da cadeia de ceramida. O influxo de íons Ca^{2+} com consequente aumento na concentração deste íon, no interior celular, é responsável pelo desencadeamento de diferentes atividades biológicas dependendo do tipo celular analisado. Nas células β pancreáticas, por exemplo, o aumento no influxo de íons Ca^{2+} leva à exocitose de insulina [74]. Já nas células L intestinais, a elevação dos níveis intracelulares de íons Ca^{2+} leva à secreção do hormônio Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) [75]. A ligação de ácidos graxos a receptores de membrana celular resulta na elevação da concentração iônica de Ca^{2+} em células α e β pancreáticas, estimulando a secreção dos hormônios pancreáticos glucagon e insulina, respectivamente [76].

A ligação de cadeias curtas de ácidos graxos a receptores de membrana de células L intestinais pode elevar a taxa de secreção de GLP-1 por este mesmo mecanismo intracelular [75]. Ellitott et al. mostram, ainda, que tanto lipídeos quanto carboidratos podem estimular a secreção de GLP-1 [77].

Todas estas evidências, aliadas ao aumento da secreção sérica de insulina e da expressão protéica estática de GLP-1 nas ilhotas pancreáticas de NOD tratados com GGs, no presente trabalho, tornam possível sugerir que a manutenção da glicemia juntamente com a inibição da expressão do DM1 verificada no grupo NOD GGs seja, pelo menos em parte, resultado da atuação dos quatro tipos de gangliosídeos que compõem a mistura por nós administrada (GM1, GD1a, GD1b e GT1b) no estímulo à secreção de insulina e de GLP-1. Hipotetiza-se que esta ação seria efetuada pelo contato direto entre os gangliosídeos exógenos e os receptores de membrana das células-alvo, tanto pela porção ceramida quanto pela porção composta por carboidratos das moléculas dos gangliosídeos, resultando no aumento da concentração intracelular de íons Ca^{2+} .

Além do contato direto entre moléculas de gangliosídeos e os tipos celulares em que irão atuar, existe, ainda, outra maneira pela qual a administração exógena de gangliosídeos poderia induzir as células β pancreáticas e L intestinais à secreção de insulina e GLP-1, respectivamente. A liberação destes hormônios, induzida por gangliosídeos exógenos, poderia ser estimulada pelo principal neurotransmissor da inervação parassimpática periférica, a acetilcolina.

Ao extrair terminações nervosas pré-sinápticas de tecido cerebral de camundongos e posteriormente tratá-las com GM1 exógeno, Tanaka et al. observaram que estes gangliosídeos estimulam a liberação de acetilcolina pela modulação do influxo de íons Ca^{2+} nas membranas plasmáticas sinápticas [78]. Estudos mostram que GM1 exógeno aplicado intraperitonealmente pode prevenir ou reverter atrofia e morte de neurônios colinérgicos ocasionadas por lesões mecânicas [79, 80]. Florian et al. relatam reestabelecimento funcional de neurônios colinérgicos, com liberação de acetilcolina, no córtex cerebral de ratos induzidos a lesão cerebral seguida de tratamento com GM1 exógeno [81].

A secreção de insulina e GLP-1 pode ser modulada pela liberação de neurotransmissores provenientes de nervos autonômicos periféricos que se ligam a receptores muscarínicos colinérgicos presentes na membrana plasmática das células β pancreáticas e L intestinais [82, 83]. Kong et al. [84] relatam que a atividade insulínica da acetilcolina envolve aumento da concentração intracelular de íons Ca^{2+} seguido da exocitose de insulina.

Além do possível estímulo à secreção hormonal por células das linhagens endócrinas pancreática e intestinal, os gangliosídeos podem, ainda, atuar na proteção das ilhotas pancreáticas. Em 1984, Donev et al. [85] relatam que neurônios do sistema nervoso periférico, assim como células do pâncreas endócrino, estão em associação íntima com células de Schwann. No pâncreas encontram-se células de Schwann não-mielinizadas, que por sua vez circundam todas as ilhotas de Langerhans. Uma década depois, Clarke e Richardson mostraram que as células de Schwann apresentam papel importante na regeneração de neurônios danificados [86].

Nossa experiência prévia na utilização de gangliosídeos como componentes de modulação da inflamação mostrou que estas moléculas são capazes de aumentar a expressão da neurotrofina nerve growth factor (NGF) em células de Schwann não-mielinizadas, sugerindo propriedade protetora.

Winer et al. relatam resposta de camundongos da linhagem NOD a antígenos presentes nas células de Schwann, tanto nos neurônios quanto no pâncreas, tais como as proteínas S100 β , GAD65 e GFAP, sugerindo compartilhamento de fatores de crescimento e diferenciação entre estes tipos celulares [1].

Teitelman et al. demonstraram que em camundongos NOD adultos, com 8 semanas de vida, há expressão de NGF e de seu receptor de alta afinidade, TrkA, no pâncreas endócrino, exócrino e na periferia da ilhotas de Langerhans, nas células de Schwann. Segundo os autores, a expressão de NGF e TrkA aumentam de acordo com o índice de insulite do animal [87]. No entanto, estudos prévios do nosso grupo mostram que NOD com 28 semanas de vida tratados com salina não expressam NGF e TrkA. Animais tratados com GM1 da 4ª à 28ª semana de vida, por outro lado, expressam marcação para esta neurotrofina e seu receptor na

periferia das ilhotas pancreáticas [15], sugerindo ativação do receptor TrkA por meio do mimetismo da atividade trófica de NGF pelo gangliosídeo GM1 [88]. Estas evidências, aliadas à similaridade das marcações celulares evidenciadas na periferia das ilhotas pancreáticas dos animais tratados com gangliosídeos (obtidas a partir de anticorpos anti-NGF, anti-TrkA, anti-Ngn3 e anti-PDX-1) verificadas em nossos trabalhos, sugerem possível aumento da expressão de fatores de regeneração (Ngn3 e PDX-1) induzido pelo tratamento com gangliosídeos exógenos, em células de Schwann pancreáticas, indicando propriedade protetora das ilhotas pelos gangliosídeos.

No presente estudo, por meio de imagens capturadas por sistema de câmera acoplada ao microscópio de fluorescência, verificamos (nas linhagens NOD e BALB/c), aumento significativo ($p < 0.05$) da expressão protéica estática dos fatores de regeneração (Ngn3, PDX-1 e GLP-1) em células presentes no tecido acinar pancreático, no epitélio de ductos e adjacente aos tecidos conectivos destes, nos animais tratados com GM1 e GGs, quando comparados aos animais dos grupos controles (tratados com salina). Estas, por sua vez, parecem migrar do tecido exócrino para as ilhotas, seja pelo parênquima acinar ou pelos ductos pancreáticos.

Em estudo com cultura de células pancreáticas exócrinas da linhagem AR42j, Akinci et al. [89] introduziram genes PDX-1, Ngn3 e MafA por meio de vetor adenoviral, verificando transdiferenciação em células β produtoras de insulina. Rukstalis e Habener [90] relatam aumento do número de células endócrinas pancreáticas adjacentes e/ou intercaladas às células do ducto pancreático em condições de regeneração pancreática, o que caracteriza o processo de neogênese.

Ainda, Zhang et al. relatam diminuição de apoptose de células β em NOD pré-diabéticos tratados com o fator de regeneração GLP-1, cuja expressão protéica evidenciada no presente estudo se mostrou aumentada nos animais tratados com gangliosídeos exógenos em comparação aos diabéticos [91]. Alguns dos mecanismos de ação deste hormônio como fator de regeneração de células β envolvem a diminuição de apoptose deste tipo celular pancreático [92], regulação

do crescimento das ilhotas pancreáticas por neogênese de células produtoras de insulina (a partir de células progenitoras dos ductos pancreáticos) e por estímulo à replicação das células β pancreáticas [32, 91]. Resultados anteriores em processo de submissão sugerem, ainda, que os eventos apoptóticos nas ilhotas de animais tratados com gangliosídeos exógenos favoreçam apoptose de células linfomononucleares, e juntamente com o aumento da expressão de fatores de regeneração, contribua para o controle na expressão do diabetes. Em suma, podemos sugerir que os gangliosídeos, ao elevarem a expressão de Ngn3, PDX-1 e GLP-1, estejam atuando na sobrevivência das células β já existentes.

Estudo em ilhotas isoladas de camundongos administrados exogenamente com GLP-1 sugere que este hormônio estimula a secreção de insulina de maneira direta, por meio de exocitose hormonal pelas células β , e de maneira indireta, pela modulação da liberação de somatostatina. Os autores acreditam que, apesar da somatostatina estar vinculada à inibição da secreção de insulina, a ação de GLP-1 nas células δ pancreáticas poderia modular esta ação inibitória por meio de mecanismos intracelulares [61]. Ao estudar íleos porcinos perfundidos e isolados, Hansen et al. [59] relatam função regulatória de GLP-1 na secreção de somatostatina, sustentando a hipótese da participação indireta de GLP-1 no aumento da secreção de insulina a partir da regulação da secreção da somatostatina.

No presente trabalho, com o objetivo de co-localizar GLP-1 com as células da linhagem endócrino-pancreática α , β e δ , procedemos com a imunofenotipificação destes tipos celulares com dupla-marcação, empregando microscopia de imunofluorescência indireta com anticorpos anti-GLP-1 reativo para os subtipos (7-36 e 7-37), anti-glucagon, anti-insulina e anti-somatostatina. Os resultados verificados, na dupla-marcação entre GLP-1 e somatostatina, em camundongos BALB/c e NOD, revelam uma população de células δ pancreáticas marcada também com GLP-1 apenas nos grupos tratados com gangliosídeos (GM1 e GGs).

Os resultados observados pela dupla-marcação de GLP-1 e insulina sugerem aumento da co-expressão destes hormônios em células β pancreáticas nos camundongos de ambas as linhagens tratados com GM1 e GGs em

comparação aos grupos controles. Zhang et al., em 2007, descreveram relação entre administração exógena de GLP-1 e diminuição da incidência do DM1 em camundongos NOD [91].

A localização do receptor de GLP-1 em células δ e β já é bem descrita na literatura [61]. Apesar de alguns autores divergirem quanto à existência de receptores de GLP-1 nas células α pancreáticas, nossos resultados coincidem com aqueles verificados por Thyssen et al., evidenciando co-expressão de GLP-1 e glucagon em todos os subgrupos estudados [93]. Outros estudos consideram a possibilidade das células α pancreáticas constituírem uma fonte secretora de GLP-1 nas próprias ilhotas pancreáticas, sugerindo ação autócrina, parácrina e endócrina para este hormônio [61, 94]. Liu et al.[95] sugerem que a produção da proteína stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), por células β de animais induzidos ao diabetes pela administração de streptozotocina, tenha consequente efeito parácrino sobre as células α pancreáticas, resultando na produção de GLP-1 por este tipo celular [95].

Embora nossos resultados mostrem a fenotipicação de células estáticas marcadas e não a secreção hormonal dinâmica de somatostatina e glucagon, a diminuição da incidência de DM1 (nos camundongos NOD) e a manutenção da normoglicemia aliada ao aumento da secreção de insulina sérica nos grupos BALB/c tratados com gangliosídeos (linhagem controle não relacionado) e NOD tratados com mistura de gangliosídeos (em comparação ao grupo NOD diabético), sugerem que possíveis mecanismos de ação do tratamento com gangliosídeos envolvam liberação/síntese de GLP-1 e regulação da liberação de somatostatina induzida por este mesmo hormônio. Além disso, verificamos aumento significativo da expressão protéica de GLP-1 nas ilhotas pancreáticas dos grupos NOD GM1 e GGs com tratamento interrompido quando comparados ao grupo diabético (dados não mostrados).

Assim, nossos resultados sugerem relação entre o tratamento com gangliosídeos e o aumento da expressão de fatores de regeneração e inativação/diminuição de proliferação de células inflamatórias no pâncreas endócrino, contribuindo no controle glicêmico dos animais NOD tratados.

Por fim hipotetizamos que o aumento de células marcadas com Ngn3, PDX-1 e GLP-1 presentes na periferia das ilhotas de langerhans, nos ductos e em tecido acinar pancreático de camundongos BALB/c e NOD tratados com gangliosídeos tenham origem, pelo menos em parte, no intestino, com posterior migração e diferenciação em tipos celulares exócrinos e endócrinos pancreáticos.

Kirshgessner et al. [96] relatam projeção de neurônios entéricos para gânglios localizados no pâncreas endócrino e exócrino. Este estudo, com fetos de ratos da linhagem Sprague-Dawley, relata capacidade migratória *in vitro* de precursores celulares neurais do intestino para o pâncreas [96]. Além disso, outros estudos descrevem expressão de PDX-1 e Ngn3 tanto no pâncreas quanto no duodeno [50, 97-99], sustentando a hipótese de migração de precursores celulares do intestino para o pâncreas, com posterior diferenciação em células da linhagem pancreática. Contudo, estudos voltados para a origem destas células marcadas são necessários para melhor compreensão do envolvimento de gangliosídeos com fatores de regeneração observados no tecido pancreático dos animais tratados.

6 – Conclusões

A partir dos dados obtidos no presente estudo, podemos concluir que a administração exógena de gangliosídeo GM1 (100mg/kg/dia) e GGs (150/MG/kg/dia) está relacionada:

- À diminuição da incidência do Diabetes Mellitus Tipo 1 e à diminuição da insulite na linhagem de camundongos NOD
- Ao aumento da expressão gênica de insulina no grupo NOD GM1 e da expressão de insulina sérica nos grupos BALB/c e NOD tratados com gangliosídeos
- Ao aumento da expressão celular de GLP-1, PDX-1 e Ngn3 em ilhotas pancreáticas e tecido acinar pancreático de camundongos NOD e BALB/c
- Ao aumento da expressão gênica de GLP-1 nos grupos BALB/c GM1 e NOD GGs
- À marcação proteica de GLP-1 em células δ da linhagem endócrina pancreática
- Ao aumento da marcação proteica de GLP-1 em células β da linhagem endócrina pancreática

7 – Considerações Finais

Os trabalhos empregando gangliosídeos como agente modulatório no diabetes experimental começaram com Wilberz em 1988 [13]. Este grupo tratou camundongos NOD com mistura gangliosídeos (doses de 50 e 100mg/kg/dia/animal), a mesma empregada no presente trabalho e citada no projeto original e verificaram que a incidência do diabetes diminuiu significativamente nas fêmeas tratadas a partir da 4^a semana de vida e nos machos, embora o tratamento com gangliosídeo não tenha reduzido a ocorrência da perivasculite precursora da invasão das ilhotas de Langherans pelas células inflamatórias. Contudo, verificou que o tratamento com gangliosídeos parecia afetar a relação entre tecido endócrino/tecido exócrino, favorecendo o tecido endócrino (ilhotas pancreáticas).

Posteriormente, Papaccio e cols, 1993 modificaram o protocolo de Wilberz aumentando a dose de gangliosídeos para 150mg/kg/dia, focando principalmente nas alterações morfológicas do pâncreas nos animais tratados com gangliosídeos. Papaccio acompanhou os animais tratados até a 11^a e 21^a semana de vida e, apesar do controle glicêmico e da manifestação do diabetes, observou que mesmo com o retardo na desorganização progressiva na cito-arquitetura das células β das ilhotas pancreáticas observadas no NOD ao longo do tempo, não julgou que os gangliosídeos fossem efetivos suficientes na redução da incidência final do diabetes. Contudo, as modificações de acompanhamento entre nossos protocolos e resultados obtidos por nós, motivaram a continuidade de estudar as propriedades modulatórias dos gangliosídeos e nossos resultados têm mostrado que os gangliosídeos além de diminuir a incidência do diabetes possuem outras propriedades que merecem ser estudadas. As concentrações utilizadas por nós na preparação dos gangliosídeos baseou-se em estudos *in vitro* anteriormente realizados em nosso laboratório em artigo sob revisão para publicação e outro já publicado com referência aos efeitos dos gangliosídeos no modelo EAE (Monteiro de Castro G, Eduarda Zanin M, Ventura-Oliveira D, Aparecida Vilella C, Ashimine R, de Lima Zollner R. Th1 and Th2 cytokine immunomodulation by gangliosides in experimental autoimmune encephalomyelitis. Cytokine. 2004 May 21;26(4):155-

63). O método empregado foi MTT. - GM1 20mM (equivalente a 30mcg/mL); 60mM (equivalente a 92mcg/mL) e 100mM (equivalente a 100mcg/mL)

- GGs 50mM (equivalente a GM1 16.2mcg/mL; GD1a 36,75mcg/mL; GD1b 14,7mcg/mL; GT1b 20,2mcg/mL), 100mM (equivalente a GM1 32,4mcg/mL; GD1a 73,5mcg/mL; GD1b 29,4mcg/mL; GT1b 40,4mcg/mL) e 200 mM (equivalente a GM1 64,9mcg/mL; GD1a 147,0mcg/mL; GD1b 58,8mcg/mL; GT1b 80,9mcg/mL) na mistura de gangliosídeos como tratamento das culturas de células em estudo de proliferação.

Em nossos resultados acreditamos que o efeito da mistura seja mais eficiente no “controle” do diabetes (insulite, grau de lesão, etc) por provável efeito sinérgico entre gangliosídeos. Contudo, fica limitado o estudo *in vivo* em decorrência do custo elevado do protocolo experimental. A indústria Trb do Brasil nos forneceu a mistura de gangliosídeos e o GM1, por ser medicação em uso no mercado, mas que atualmente está indisponível pela mudança na origem de extração do material, isto é, anteriormente cérebro bovino e agora (em testes) origem porcina. Desta forma, muitos dos estudos adicionais planejados ficaram prejudicados pela indisponibilidade de material para os protocolos *in vivo* que duram 28 semanas de tratamento.

Concluindo, acreditamos que pudemos contribuir com mais informações quanto às propriedades pelas quais os gangliosídeos modulam a expressão do diabetes. A possível contribuição na liberação de GLP-1 é um dos elementos que merecem estudos adicionais, agora, do ponto de vista da cascata de sinalização. Já estamos padronizando os procedimentos para implementação dos resultados encontrados no presente trabalho. Além disso, mecanismos quanto à mobilização de Ca^{2+} devem ser implementados, pois é possível, a partir de dados de regeneração neural, que seja um dos modelos de ação dos gangliosídeos, embora este fator necessite de experimentos de consolidação da ideia.

Além disso, a hipótese de que o tratamento com gangliosídeo diminui a apoptose de células β pancreáticas e a coincidência de marcação Tunel+ nas áreas de infiltrado, nos leva a questionar a origem destas células marcadas.

Seriam estes tipos celulares marcados originários predominantemente do infiltrado inflamatório linfomononuclear presente no pâncreas endócrino? Infelizmente, as tentativas de dupla marcação com insulina e CD11/CD8 não foram bem sucedidas. Contudo, estamos padronizando protocolo com cortes em parafina na tentativa de obter melhor perfil de imunomarcação.

1. Winer, S., et al., *Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive*. Nat Med, 2003. **9**(2): p. 198-205.
2. Miao, G., et al., *In vitro and in vivo improvement of islet survival following treatment with nerve growth factor*. Transplantation, 2006. **81**(4): p. 519-24.
3. Pavin, E.J. and R.L. Zollner, *Implantação da linhagem NOD mice (camundongos diabéticos não obesos) no Brasil: contribuição deste modelo animal ao estudo do diabetes mellitus insulino-dependente e outras doença\ s autoimunes*. Arq Bras Endocrinol Metabol, 1994. **38**: p. 105-8.
4. Kikutani, H. and S. Makino, *The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains*. Adv Immunol, 1992. **51**: p. 285-322.
5. Xu, G., et al., *Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats*. Diabetes, 1999. **48**(12): p. 2270-6.
6. Muthing, J., U. Maurer, and S. Weber-Schurholz, *Glycosphingolipids of skeletal muscle: II. Modulation of Ca²(+)-flux in triad membranes by gangliosides*. Carbohydr Res, 1998. **307**(1-2): p. 147-57.
7. Bickel, P.E., *Lipid rafts and insulin signaling*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(1): p. E1-E10.
8. Ledeen, R. and G. Wu, *GM1 in the nuclear envelope regulates nuclear calcium through association with a nuclear sodium-calcium exchanger*. J Neurochem, 2007. **103 Suppl 1**: p. 126-34.
9. Nayak, R.C., et al., *"Cytoplasmic" islet cell antibodies. Evidence that the target antigen is a sialoglycoconjugate*. Diabetes, 1985. **34**(6): p. 617-9.
10. Colman, P.G., et al., *Binding of cytoplasmic islet cell antibodies is blocked by human pancreatic glycolipid extracts*. Diabetes, 1988. **37**(5): p. 645-52.
11. Dotta, F., et al., *GM2-1 pancreatic islet ganglioside: identification and characterization of a novel islet-specific molecule*. Diabetologia, 1995. **38**(9): p. 1117-21.
12. Ladisch, S., et al., *Modulation of the immune response by gangliosides. Inhibition of adherent monocyte accessory function in vitro*. J Clin Invest, 1984. **74**(6): p. 2074-81.
13. Wilberz, S., L. Herberg, and A.E. Renold, *Gangliosides in vivo reduce diabetes incidence in non-obese diabetic mice*. Diabetologia, 1988. **31**(11): p. 855-7.
14. Papaccio, G., G. Chieffi Baccari, and V. Mezzogiorno, *In vivo effect of gangliosides on non-obese diabetic mice*. Acta Anat (Basel), 1993. **147**(3): p. 168-73.
15. Vieira, K.P., et al., *Ganglioside GM1 effects on the expression of nerve growth factor (NGF), Trk-A receptor, proinflammatory cytokines and on autoimmune diabetes onset in non-obese diabetic (NOD) mice*. Cytokine, 2008. **42**(1): p. 92-104.
16. Monteiro de Castro, G., et al., *Th1 and Th2 cytokine immunomodulation by gangliosides in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Cytokine, 2004. **26**(4): p. 155-63.
17. Rosenbaum, T., M.C. Sanchez-Soto, and M. Hiriart, *Nerve growth factor increases insulin secretion and barium current in pancreatic beta-cells*. Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1755-62.
18. Ledeen, R.W., M.S. Cannella, and F.J. Roisen, *Neurobiology of gangliosides*. Clin Neuropharmacol, 1986. **9 Suppl 4**: p. 331-3.
19. Banerjee, M. and R.R. Bhonde, *Islet generation from intra islet precursor cells of diabetic pancreas: in vitro studies depicting in vivo differentiation*. JOP, 2003. **4**(4): p. 137-45.
20. Hao, E., et al., *Beta-cell differentiation from nonendocrine epithelial cells of the adult human pancreas*. Nat Med, 2006. **12**(3): p. 310-6.
21. Madsen, O.D., *Stem cells and diabetes treatment*. APMIS, 2005. **113**(11-12): p. 858-75.

22. Bonner-Weir, S. and G.C. Weir, *New sources of pancreatic beta-cells*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(7): p. 857-61.
23. Stanger, B.Z., A.J. Tanaka, and D.A. Melton, *Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 886-91.
24. Sherry, N.A., et al., *Effects of autoimmunity and immune therapy on beta-cell turnover in type 1 diabetes*. Diabetes, 2006. **55**(12): p. 3238-45.
25. Swenne, I. and U. Eriksson, *Diabetes in pregnancy: islet cell proliferation in the fetal rat pancreas*. Diabetologia, 1982. **23**(6): p. 525-8.
26. Bouwens, L., et al., *Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas*. Diabetes, 1994. **43**(11): p. 1279-83.
27. Bernard-Kargar, C. and A. Ktorza, *Endocrine pancreas plasticity under physiological and pathological conditions*. Diabetes, 2001. **50 Suppl 1**: p. S30-5.
28. Bouwens, L. and E. De Blay, *Islet morphogenesis and stem cell markers in rat pancreas*. J Histochem Cytochem, 1996. **44**(9): p. 947-51.
29. Meier, J.J., et al., *Beta-cell development and turnover during prenatal life in humans*. Eur J Endocrinol, 2010. **162**(3): p. 559-68.
30. Paris, M., et al., *Review: pancreatic beta-cell neogenesis revisited*. Exp Diabetesity Res, 2004. **5**(2): p. 111-21.
31. Gianani, R., *Beta cell regeneration in human pancreas*. Semin Immunopathol, 2011. **33**(1): p. 23-7.
32. Pictet, R.L., et al., *An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas*. Dev Biol, 1972. **29**(4): p. 436-67.
33. Slack, J.M., *Developmental biology of the pancreas*. Development, 1995. **121**(6): p. 1569-80.
34. Fernandes, A., et al., *Differentiation of new insulin-producing cells is induced by injury in adult pancreatic islets*. Endocrinology, 1997. **138**(4): p. 1750-62.
35. Guz, Y., I. Nasir, and G. Teitelman, *Regeneration of pancreatic beta cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes*. Endocrinology, 2001. **142**(11): p. 4956-68.
36. Pang, K., C. Mukonoweshuro, and G.G. Wong, *Beta cells arise from glucose transporter type 2 (Glut2)-expressing epithelial cells of the developing rat pancreas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(20): p. 9559-63.
37. Yuan, S., et al., *Transdifferentiation of human islets to pancreatic ductal cells in collagen matrix culture*. Differentiation, 1996. **61**(1): p. 67-75.
38. Hall, P.A. and N.R. Lemoine, *Rapid acinar to ductal transdifferentiation in cultured human exocrine pancreas*. J Pathol, 1992. **166**(2): p. 97-103.
39. Mashima, H., et al., *Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells*. J Clin Invest, 1996. **97**(7): p. 1647-54.
40. Yang, L., et al., *In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 8078-83.
41. Tourrel, C., et al., *Glucagon-like peptide-1 and exendin-4 stimulate beta-cell neogenesis in streptozotocin-treated newborn rats resulting in persistently improved glucose homeostasis at adult age*. Diabetes, 2001. **50**(7): p. 1562-70.
42. Zhou, J., et al., *Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin-producing cells*. Diabetes, 1999. **48**(12): p. 2358-66.
43. Chung, C.H., et al., *Pancreatic beta-cell neogenesis by direct conversion from mature alpha-cells*. Stem Cells, 2010. **28**(9): p. 1630-8.
44. Macfarlane, W.M., et al., *Missense mutations in the insulin promoter factor-1 gene predispose to type 2 diabetes*. J Clin Invest, 1999. **104**(9): p. R33-9.

45. Stoffers, D.A., et al., *Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1*. Nat Genet, 1997. **17**(2): p. 138-9.
46. Kim, S.K. and M. Hebrok, *Intercellular signals regulating pancreas development and function*. Genes Dev, 2001. **15**(2): p. 111-27.
47. Gannon, M., P.L. Herrera, and C.V. Wright, *Mosaic Cre-mediated recombination in pancreas using the pdx-1 enhancer/promoter*. Genesis, 2000. **26**(2): p. 143-4.
48. Gu, G., J. Dubauskaite, and D.A. Melton, *Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors*. Development, 2002. **129**(10): p. 2447-57.
49. Schwitzgebel, V.M., et al., *Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas*. Development, 2000. **127**(16): p. 3533-42.
50. Gradwohl, G., et al., *neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1607-11.
51. Wang, S., et al., *Sustained Neurog3 expression in hormone-expressing islet cells is required for endocrine maturation and function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(24): p. 9715-20.
52. Fujita, Y., et al., *Pax6 and Pdx1 are required for production of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in proglucagon-expressing L cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(3): p. E648-57.
53. Laybutt, D.R., et al., *Critical reduction in beta-cell mass results in two distinct outcomes over time. Adaptation with impaired glucose tolerance or decompensated diabetes*. J Biol Chem, 2003. **278**(5): p. 2997-3005.
54. Weir, G.C., et al., *Transcription factor abnormalities as a cause of beta cell dysfunction in diabetes: a hypothesis*. Acta Diabetol, 1997. **34**(3): p. 177-84.
55. Petersen, H.V., et al., *Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF1 acting through the CT boxes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10465-9.
56. Jonsson, J., et al., *Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice*. Nature, 1994. **371**(6498): p. 606-9.
57. Noguchi, H., et al., *PDX-1 protein containing its own antenapedia-like protein transduction domain can transduce pancreatic duct and islet cells*. Diabetes, 2003. **52**(7): p. 1732-7.
58. Koya, V., et al., *Reversal of streptozotocin-induced diabetes in mice by cellular transduction with recombinant pancreatic transcription factor pancreatic duodenal homeobox-1: a novel protein transduction domain-based therapy*. Diabetes, 2008. **57**(3): p. 757-69.
59. Hansen, L., et al., *Glucagon-like peptide-1 secretion is influenced by perfusate glucose concentration and by a feedback mechanism involving somatostatin in isolated perfused porcine ileum*. Regul Pept, 2004. **118**(1-2): p. 11-8.
60. Wang, Y., et al., *Glucagon-like peptide-1 can reverse the age-related decline in glucose tolerance in rats*. J Clin Invest, 1997. **99**(12): p. 2883-9.
61. Heller, R.S. and G.W. Aponte, *Intra-islet regulation of hormone secretion by glucagon-like peptide-1-(7--36) amide*. Am J Physiol, 1995. **269**(6 Pt 1): p. G852-60.
62. Gautier, J.F., S.P. Choukem, and J. Girard, *Physiology of incretins (GIP and GLP-1) and abnormalities in type 2 diabetes*. Diabetes Metab, 2008. **34 Suppl 2**: p. S65-72.
63. Li, D.S., et al., *A protocol for islet isolation from mouse pancreas*. Nat Protoc, 2009. **4**(11): p. 1649-52.
64. Ventura-Oliveira, D., et al., *Kinetics of TNF-alpha and IFN-gamma mRNA expression in islets and spleen of NOD mice*. Braz J Med Biol Res, 2002. **35**(11): p. 1347-55.

65. Pfaffl, M.W., et al., *Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations*. Biotechnol Lett, 2004. **26**(6): p. 509-15.
66. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle, *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(9): p. e36.
67. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
68. Merritt, W.D., J.M. Bailey, and D.H. Pluznik, *Inhibition of interleukin-2-dependent cytotoxic T-lymphocyte growth by gangliosides*. Cell Immunol, 1984. **89**(1): p. 1-10.
69. Grassi, F., et al., *Chemical residues of ganglioside molecules involved in interactions with lymphocyte surface targets leading to CD4 masking and inhibition of mitogenic proliferation*. Eur J Immunol, 1990. **20**(1): p. 145-50.
70. Bach, J.F. and D. Mathis, *The NOD mouse*. Res Immunol, 1997. **148**(5): p. 285-6.
71. Offner, H., G. Konat, and B.A. Sela, *Multi-sialo brain gangliosides are powerful stimulators of active E-rosetting lymphocytes from multiple sclerosis patients*. J Neurol Sci, 1981. **52**(2-3): p. 279-87.
72. Bergelson, L.D., *Serum gangliosides as endogenous immunomodulators*. Immunol Today, 1995. **16**(10): p. 483-6.
73. Gouy, H., P. Debre, and G. Bismuth, *Triggering of a sustained calcium response through a p56lck-dependent pathway by exogenous ganglioside GM1 in human T lymphocytes*. J Immunol, 1995. **155**(11): p. 5160-6.
74. MacDonald, P.E., J.W. Joseph, and P. Rorsman, *Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005. **360**(1464): p. 2211-25.
75. Tolhurst, G., et al., *Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2*. Diabetes, 2012. **61**(2): p. 364-71.
76. Olofsson, C.S., et al., *Palmitate increases L-type Ca²⁺ currents and the size of the readily releasable granule pool in mouse pancreatic beta-cells*. J Physiol, 2004. **557**(Pt 3): p. 935-48.
77. Elliott, R.M., et al., *Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns*. J Endocrinol, 1993. **138**(1): p. 159-66.
78. Tanaka, Y., et al., *Gangliosides enhance KCl-induced Ca²⁺ influx and acetylcholine release in brain synaptosomes*. Neuroreport, 1997. **8**(9-10): p. 2203-7.
79. Sofroniew, M.V., et al., *Retrograde changes in cholinergic neurons in the basal forebrain of the rat following cortical damage*. Brain Res, 1983. **289**(1-2): p. 370-4.
80. Sofroniew, M.V., et al., *Parenterally administered GM1 ganglioside prevents retrograde degeneration of cholinergic cells of the rat basal forebrain*. Brain Res, 1986. **398**(2): p. 393-6.
81. Florian, A., F. Casamenti, and G. Pepeu, *Recovery of cortical acetylcholine output after ganglioside treatment in rats with lesion of the nucleus basalis*. Neurosci Lett, 1987. **75**(3): p. 313-6.
82. Gautam, D., et al., *A critical role for beta cell M3 muscarinic acetylcholine receptors in regulating insulin release and blood glucose homeostasis in vivo*. Cell Metab, 2006. **3**(6): p. 449-61.
83. Deacon, C.F., *What do we know about the secretion and degradation of incretin hormones?* Regul Pept, 2005. **128**(2): p. 117-24.
84. Kong, K.C., et al., *M3-muscarinic receptor promotes insulin release via receptor phosphorylation/arrestin-dependent activation of protein kinase D1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(49): p. 21181-6.

85. Donev, S.R., *Ultrastructural evidence for the presence of a glial sheath investing the islets of Langerhans in the pancreas of mammals*. Cell Tissue Res, 1984. **237**(2): p. 343-8.
86. Clarke, D. and P. Richardson, *Peripheral nerve injury*. Curr Opin Neurol, 1994. **7**(5): p. 415-21.
87. Teitelman, G., et al., *Islet injury induces neurotrophin expression in pancreatic cells and reactive gliosis of peri-islet Schwann cells*. J Neurobiol, 1998. **34**(4): p. 304-18.
88. Jun, H.S., et al., *The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice*. J Exp Med, 1999. **189**(2): p. 347-58.
89. Akinci, E., et al., *Reprogramming of pancreatic exocrine cells towards a beta (beta) cell character using Pdx1, Ngn3 and MafA*. Biochem J, 2012. **442**(3): p. 539-50.
90. Rukstalis, J.M. and J.F. Habener, *Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration*. Islets, 2009. **1**(3): p. 177-84.
91. Zhang, J., et al., *Continuous stimulation of human glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in a mouse model (NOD) delays onset of autoimmune type 1 diabetes*. Diabetologia, 2007. **50**(9): p. 1900-9.
92. Li, Y., et al., *beta-Cell Pdx1 expression is essential for the glucoregulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1*. Diabetes, 2005. **54**(2): p. 482-91.
93. Thyssen, S., E. Arany, and D.J. Hill, *Ontogeny of regeneration of beta-cells in the neonatal rat after treatment with streptozotocin*. Endocrinology, 2006. **147**(5): p. 2346-56.
94. Nie, Y., et al., *Regulation of pancreatic PC1 and PC2 associated with increased glucagon-like peptide 1 in diabetic rats*. J Clin Invest, 2000. **105**(7): p. 955-65.
95. Liu, Z., et al., *Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4) axis activation induces intra-islet glucagon-like peptide-1 (GLP-1) production and enhances beta cell survival*. Diabetologia, 2011. **54**(8): p. 2067-76.
96. Kirchgessner, A.L., M.A. Adlersberg, and M.D. Gershon, *Colonization of the developing pancreas by neural precursors from the bowel*. Dev Dyn, 1992. **194**(2): p. 142-54.
97. Offield, M.F., et al., *PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum*. Development, 1996. **122**(3): p. 983-95.
98. Schonhoff, S.E., M. Giel-Moloney, and A.B. Leiter, *Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells*. Endocrinology, 2004. **145**(6): p. 2639-44.
99. Sommer, L., Q. Ma, and D.J. Anderson, *neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS*. Mol Cell Neurosci, 1996. **8**(4): p. 221-41.