

THIAGO ROSSI

**Estudo do Efeito do Gangliosídeo GM1
sobre os Nervos Periféricos do Camundongo NOD
(Non Obese Diabetic)**

CAMPINAS

Unicamp

2007

THIAGO ROSSI

**Estudo do Efeito do Gangliosídeo GM1
sobre os Nervos Periféricos do Camundongo NOD
(Non Obese Diabetic)**

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

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER

CAMPINAS

Unicamp

2007

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

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

R735e Rossi, Thiago
Estudo do efeito do gangliosídeo GM1 sobre os nervos periféricos do camundongo NOD (Non Obese Diabetic) / Thiago Rossi. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

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

1. Camundongo NOD. 2. Neuropatias. 3. Gangliosídeos GM1. I. Zollner, Ricardo de Lima. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Effect of GM1 ganglioside in the sciatic nerves of the NOD mice (non obese diabetic)

Keywords: • Mice, Inbred NOD
• Neuropathy
• Gangliosídeo, GM1

Titulação: Mestre em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner
Prof. Dr. Lício Augusto Veloso
Profa. Dra. Gláucia Monteiro de Castro

Data da defesa: 31 -08 - 2007

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

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

Membros:

1. Prof(a). Dr(a) . Gláucia Monteiro de Castro _____

2. Prof(a). Dr(a). Lício Augusto Velloso _____

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



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

Data: 31/08/2007

DEDICO

A minha mãe guerreira, Carmem por todo seu carinho e perseverança sempre acreditando na realização deste trabalho desde o início, sem sua ajuda minha mãe, este trabalho seria apenas um sonho não realizado.

Meus irmãos Danilla e João Paulo e minha sobrinha Manuela fontes de amor e razões da minha vida.

Aos meus avós Albertino e Izabel Catharina por serem exemplos de honestidade e sabedoria durante toda minha vida

A meu Tio Dr. Camilo pelo incentivo e encorajamento para o ingresso na área de saúde.

Aos meu queridos Tio “Zézin Gomes” pelas longas conversas intelectuais e conselhos e Tia “Lena” por seu bom humor contagiante e principalmente por me abrigarem em sua casa durante 3 anos e meio como se fosse seu filho, com muito carinho até a realização deste trabalho. Sou muito grato a vocês!

A todos aqueles que acreditaram ou não em meu potencial: Muito obrigado!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner pelo incentivo, firmeza e confiança em meu trabalho desde o início.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Lício Augusto Veloso e a Prof Dr^a Gláucia Monteiro de Castro por fazerem parte da banca examinadora.

As Pessoas que fizeram ou fazem parte da equipe do LIAE: Bruna, Rhubia, Karla, Léo, Maira, Gláucia, Meg, Conceição, Mariana, Fernanda, Giovanna, Rika e Ana Paula, com vocês ao meu lado aprendi a trabalhar em equipe sempre em harmonia e bom humor. Amo todos vocês!

A Conceição pela ajuda técnica e pelo tratamento maternal aplicado a minha pessoa, sempre com incentivo e palavras de sabedoria e amor.

A Margarida “Meg” por toda sua dedicação com meus animais e principalmente por sua sinceridade durante esses anos e pelas suas palavras de amor e carinho

Ao Prof Dr Gentil pelo uso do setor de microscopia da nefrologia

Ao Prof Dr. Lício Augusto Veloso por permitir o uso do microscópio de fluorescência.

A Rika Ashimine pela paciência nos ensinamentos de Biologia Molecular.

Ao Thiago Zaqueu da UNIFESP, pelo fornecimento da técnica melhorada de coloração para Acetilcolinesterase segundo Gomori.

A Cristiane secretária do setor de pós-graduação pela paciência e amizade.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo

A TRB Pharma do Brasil pela doação do gangliosídeo GM1

	PÁG.
RESUMO	<i>xi</i>
ABSTRACT	<i>xiii</i>
1- INTRODUÇÃO	15
1.1- O diabetes mellitus	16
1.2- Camundongos NOD (NON OBESE DIABETIC)	17
1.3- Gangliosídeos	19
1.4- Gangliosídeos GM1	20
1.5- Anticorpos antigangliosídeos	21
1.6- Fator de crescimento neuronal (NGF)	22
1.7- Aspectos morfológicos dos nervos periférico	24
1.7.1- Fibras nervosas.....	24
1.7.2- Envoltórios conjuntivos e vascularização dos nervos.....	26
1.7.3- Compartimento sináptico.....	27
1.7.4- Enzima acetilcolinesterase.....	28
1.8- Neuropatias periféricas	29
1.8.1- Neuropatia diabética.....	29
1.8.2- Síndrome de Guilláin Barret.....	30
1.8.3- Síndrome de Miller Fisher.....	31
2- OBJETIVOS	32
3- MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1- Animais	35
3.2- Grupos experimentais e tratamento	35
3.3- Período de acompanhamento	36

3.4- Diagnóstico do diabetes e sacrifício dos animais.....	36
3.5- Preparação dos nervos para análises.....	37
3.6- Digestão protéica dos nervos.....	37
3.7- Extração do RNA total.....	37
3.8- Análise do RNA total extraído.....	38
3.9- Transcrição reversa do RNA total extraído.....	38
3.10- Amplificação do CDNA pela transcriptase reversa da reação de polimerase em cadeia.....	39
3.11- Análise dos produtos de reação e cadeia da polimerase (PCR) por eletroforese em gel de agarose.....	40
3.12- Análise semiquantitativa do RNA mensageiro.....	41
3.13- Imunofluorescência NGF.....	41
3.14- Imunofluorescência GM1.....	42
3.15- Coloração para acetilcolinesterase.....	42
3.16- Quantificação da atividade para acetilcolinesterase.....	43
3.17- Avaliação clínica para neuropatias periféricas.....	44
3.18- Formatação de texto.....	44
4- RESULTADOS.....	45
4.1- Efeito da administração do gangliosídeo GM1 sobre a expressão gênica do NGF nos nervos ciáticos do camundongo NOD e BALB/C.....	46
4.2- Efeito do tratamento com GM1 sobre atividade da enzima acetilcolinesterase.....	48
5- DISCUSSÃO.....	60
6- CONCLUSÕES.....	64
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AchE	Acetilcolinesterase
AChRs	Receptores de acetilcolina
APC	Células apresentadoras de antígeno
CD	Cluster designation
cDNA	Dna complementar
CEMIB	Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica
DEPC	Dietilpirocarbamato
DM-1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM-2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídio tri-fosfato
GM1	Monossialotetraexosilgangliosídeo
ICA	Islet cells antibodies
LIAE	Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental
NGF	Fator de crescimento neuronal - Nerve growth factor
NOD	Non obese diabetic/diabético não-obeso
PBS	Salina fosfatada tamponada
PK	Proteinase K
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RNAT	Ácido ribonucléico total

RT-PCR	Reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa
Balb-GM1	Grupo Balb/C tratado GM1
Balb-sal.	Grupo Balb/C tratado salina
CDB	Grupo controle diabético
CNDB	Grupo controle não diabético
TDB	Grupo tratado (GM1) diabético
TNDB	Grupo tratado (GM1) não diabético
SBF	Soro fetal bovino
SGB	Síndrome de Guillaín Barret
SPF	Specific Pathogen Free
TrkA	Tyrosine receptor kinase A
UA	Unidades arbitrárias

RESUMO

A linhagem de camundongos NOD (non obese diabetic) desenvolve espontaneamente diabetes mellitus tipo 1 (DM-1) com marcante similaridade ao observado em humanos, que se estabelece entre 12^a e 24^a semana de vida. Os gangliosídeos são glicoesfingolípídeos de membrana que contém ácido siálico em sua composição e estão presentes na maioria das células dos vertebrados sendo particularmente abundantes no sistema nervoso. Gangliosídeos exógenos são capazes de acelerar a regeneração de nervos periféricos danificados, porém tem sido relacionados com síndromes neuropáticas periféricas como a síndrome de Guilláin Barret onde os pacientes apresentam anticorpos anti-gangliosídeos especificamente contra o gangliosídeo GM1. Entretanto os mecanismos ainda permanecem controversos. Nossos resultados sugerem que administração de GM1 na dose de 100mg/kg/dia em camundongos NOD e Balb/C fêmeas a partir da 4^a semana de vida não é capaz de provocar neuropatia clínica e que animais diabéticos apresentaram maior imunoreatividade para GM1 nos nervos periféricos com presença de marcação para NGF somente em camundongos Balb/C. Os animais diabéticos tratados com GM1 demonstraram queda na atividade nervosa, em contraste os camundongos Balb/C tratados com GM1 apresentaram aumento significativo na atividade nervosa.

ABSTRACT



The strain of NOD mice (non obese diabetic) spontaneously develops diabetes mellitus type 1 (DM-1) similar to the observed in humans. In this model, the diabetes manifestation occurs between 12th and 24th weeks of life, with presence of pancreas-specific autoantibodies. The gangliosides are glycosphingolipids of membrane that contains sialic acid in their composition and are present in the majority of cells from vertebrates and are particularly abundant in the nervous system. Exogenous gangliosides are capable to increase regeneration in damaged peripheral nerves. However, the gangliosides are related with peripheral neuropathic syndromes as the syndrome of Guillain Barret in which the patients specifically present antibodies against gangliosides GM1, however these mechanisms still remain controversial. Our results suggest that administration of GM1 in the dose of 100mg/kg/day in female NOD and Balb/C mice at the 4th week of life is not capable to provoke clinical peripheral neuropathy and that diabetic animals present major immunoreactivity for GM1 in peripheral nerves with the presence of immunoreactivity to NGF only in Balb/C mice. Diabetic animals treated with GM1 showed lower nervous activity when compared to Balb/C mice, which presented significant increase.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Diabetes mellitus

O *diabetes mellitus* é definido como uma desordem metabólica de etiologia multifatorial caracterizada por hiperglicemia crônica, que afeta o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas [1], resultante do déficit de produção e/ou ação da insulina. Considerando-se as características etiológicas do *diabetes mellitus* e seus mecanismos desencadeantes, essa doença é classificada em dois tipos: diabetes tipo 1A: auto-imune e 1B: idiopático (DM-1), e tipo 2, (DM-2) [2].

O início do DM-1 auto-imune é na maior parte das vezes, agudo, acometendo mais freqüentemente crianças e adolescentes [3]. Nessa doença é observada infiltração mononuclear progressiva nas ilhotas pancreáticas com destruição seletiva de células β produtoras de insulina resultando na deficiência desse hormônio. Outras células pancreáticas do sistema endócrino, como as produtoras de glucagon (células α) ou somatostatina (células δ) não são afetadas. [4].

Diversas evidências apontam para a origem auto-imune do DM-1 [5]. Os autores descrevem auto-anticorpos circulantes, denominados anticorpos anti-célula da ilhota ou ICA (“islet-cell antibodies”). Os ICA são detectados precocemente antes da manifestação clínica do diabetes e são considerados marcadores imunológicos do DM-1 sem efeito patogênico direto [6].

Enfatizando-se o conceito do DM-1 ser classificada como doença auto-imune, com seletiva destruição das células β das ilhotas pancreáticas e presença de clones auto-reativos de linfócitos T, pode-se presumir que o processo auto-imune seria decorrente da perda de tolerância de linfócitos a determinados constituintes da célula [7, 8]. Entretanto, admite-se que outros mecanismos imunopatogênicos possam estar envolvidos, tornando seu entendimento complexo. Estudos do DM-1 auto-imune em modelos animais experimentais, fortalecem a hipótese da ocorrência de desequilíbrio entre sub-populações e células T efectoras [9, 10].

1.2- Camundongo NOD (*Non obese Diabetic*)

A linhagem de camundongo NOD representa modelo experimental descrito por MAKINO *et al.*, 1980, que desenvolve espontaneamente diabetes mellitus auto-imune semelhante aquele observado em humanos. Essa linhagem foi desenvolvida no Japão, após cruzamento de uma sub-linhagem CTS (propensa à catarata) com linhagem não consangüínea ICR. O primeiro relato de DM-1 espontâneo foi observado em apenas um camundongo fêmea e a partir de cruzamentos seletivos de sua prole, a linhagem NOD isogênica foi estabelecida em 1980 no laboratório Shionogi Aburahi como modelo animal para o DM-1 [11].

A colônia NOD/shi demonstrou prevalência de diabetes de 70-80% para fêmeas e 20% para os machos. Contudo, diferenças na manifestação do diabetes entre diversas colônias têm sido relatadas. A colônia NOD estabelecida e mantida no centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) em condições livres de patógenos (SPF), apresenta prevalência de diabetes entre 60-90% nas fêmeas e 5-20% nos machos. Fatores ambientais como dieta e exposição a vírus têm sido considerados como causa das diferenças de incidência. [4, 12]. No Brasil, a linhagem foi introduzida e implantada na Universidade Estadual de Campinas por Pavin & Zollner (1994) [13], a partir de colônias matrizes provenientes do laboratório INSERM U-25-Necker, Paris, França.

O DM-1 clínico neste modelo animal desenvolve-se espontaneamente entre a 16^a e 24^a semana de vida, mais freqüentemente em fêmeas. Polidipsia, poliúria, glicosúria elevada, hiperglicemia e deficiência de insulina são observados nestes animais, acompanhados de uma rápida perda de peso [11]. A remissão espontânea raramente é observada com óbito dos animais diabéticos entre 4^a e 8^a semanas depois da manifestação do diabetes, a menos que recebam terapia de reposição com insulina.

O diabetes clínico nesses animais é precedido por uma fase pré-diabética (insulite), caracterizada pela infiltração progressiva de células mononucleares nas ilhotas pancreáticas (inicialmente linfócitos T CD4⁺ e

posteriormente linfócitos T CD8+), que se inicia ao redor do primeiro mês de vida. A segunda fase é caracterizada pela destruição das células β produtoras de insulina e manifestação do diabetes [4].

A maioria das células mononucleares infiltradas no interior das ilhotas pancreáticas é representada por linfócitos T, subtipo Th-1. Contudo, pode-se verificar, em menor extensão, a presença de linfócitos B, macrófagos e células NK [14, 15]. Durante o desenvolvimento da doença no camundongo NOD células CD4+ e CD8+ exercem papel sinérgico, uma vez que o diabetes apenas se desenvolverá na presença de ambos subtipos [15]. Linfócitos CD4+ são predominantemente observados na fase precoce da infiltração (periinsular), onde são requeridos nos processos de expansão clonal através da produção de IL-2 e, dessa forma, aumentando a ativação dos linfócitos T CD8+ [15]. A proporção de células CD8+ no infiltrado de células T cresce substancialmente com o tempo de destruição das células produtoras de insulina [16]. Entretanto, existem evidências do papel dos linfócitos T CD8+ na fase efetora final da patogênese do diabetes, independente da presença de linfócitos T CD4+ [17, 18]. Dentre os mecanismos de destruição das ilhotas pancreáticas está a capacidade de realizar funções citotóxicas através da utilização de grânulos de perforinas e granzimas bem como indução de apoptose através da interação Fas/Fas-L [19-21].

Os linfócitos T auto-reativos têm papel crucial no aparecimento do diabetes nesses animais e a ineficiência de sua eliminação pode contribuir para a manifestação da doença. Assim observou-se que a prevenção do DM espontâneo no camundongo NOD pode ser obtida através da timectomia neonatal. Além disso, em camundongos NOD/nude (atímicos), verifica-se redução da incidência da insulite sem manifestação do diabetes. [22] Complementando essas observações, autores descreveram que a administração de imunossupressores com função direcionada preferencialmente para linfócitos T e administração de anticorpos anti-CD3+ [23] são capazes de suprimir a ocorrência do DM auto-imune espontâneo [9, 14, 15, 24].

No conjunto, essas observações relacionadas à participação dos linfócitos T tanto da insulite e, evolutivamente, do diabetes tem reforçado, direta ou indiretamente, a hipótese da etiologia auto-imune. Contudo, apesar de experimentos envolvendo o camundongo NOD fornecem evidências do papel chave de substâncias mediadoras da destruição das células β produzidas por linfócitos T CD4+ e CD8+, existem evidências da presença de mecanismos efetores finais apoptóticos pelos quais essas células são destruídas.

1.3- Gangliosídeos

Os gangliosídeos são glicoesfingolípídeos formados por uma porção hidrofóbica, de ácido graxo amido de esfingosina e uma cadeia hidrofílica de carboidratos, contendo uma ou mais moléculas de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico-NANA) o que lhes confere carga negativa. A cadeia oligossacarídica do gangliosídeo pode variar em composição, porém a seqüência básica compreende quatro sacarídeos em geral glicose, galactose, N-acetilgalactosamina e eventualmente frutose. Nestes compostos, a cadeia oligossacarídica contém pelo menos um açúcar ácido ligado a ceramida (esfingosina+acetil co-A). Embora sejam componentes normais das membranas plasmáticas celulares da maioria dos tipos celulares, são encontrados em maior concentração nas células do sistema nervoso [25, 26].

Os gangliosídeos localizam-se externamente a bicamada lipídica, sendo importante em diversos processos biológicos, participando da regulação, reconhecimento, adesão celular, proliferação, morfogênese, diferenciação, neuritogênese, apoptose e transformação oncogênica. Além disso, atuam como receptores e co-receptores de várias substâncias bioativas como hormônios e citocinas e na tradução de sinais para o meio intracelular [27].

Considerando os diferentes mecanismos pelos quais os gangliosídeos podem associar-se às células, a alteração de seu perfil em um determinado tipo de células pode resultar na modulação das propriedades de superfície, atividades

enzimáticas e função de outros tipos celulares, sendo considerados como um tipo de citocina [28].

Desde sua introdução em 1975, gangliosídeos extraídos do cérebro bovino e produzidos na forma de injetáveis, são prescritos na Itália, no tratamento de neuropatias periféricas [29]. Muitos trabalhos experimentais indicam que gangliosídeos endógenos e exógenos administrados tem importantes efeitos no sistema nervoso periférico. Tem sido demonstrado que (1) aumentam formação de junções neuromusculares; (2) estimula crescimento neuronal *in vivo* e *in vitro*; (3) promovem regeneração neuronal e reinervação em animais seguidos de lesões nervosas. Após administração de neurotoxina 6-OHDA, entre outros efeitos como: aumento da atividade das enzimas Na⁺, K⁺-ATPase, adenilciclase e fosfodiesterase [30-32]. Evidências demonstram importante relação neuroprotetora e promoção do reparo nervoso por acentuação do crescimento do nervo [33]. Mas em 1993, o uso clínico de gangliosídeos exógenos foi proibido em virtude de suposta relação com a síndrome de Guilláin Barret (SGB). Uma associação causal entre injeção de gangliosídeo exógeno e o aparecimento da SGB foram deduzidas. Mas a relação epidemiológica entre gangliosídeos exógeno e SGB ainda são controversas [29].

1.4- GM1

O gangliosídeo GM1, é um dos poucos sialoglicoconjugados na natureza resistente à sialidase, é uma molécula pluripotente capaz de modular as atividades de uma grande variedade de proteínas de membrana incluindo receptores, enzimas, canais iônicos e moléculas de adesão [34-37].

GM1, bem como alguns derivados de gangliosídeos, parecem ser efetivos na redução da expressão de CD4 na superfície de células T de diferentes espécies. Saggiaro *et al.*, (1993) [38] demonstraram que o GM1 mascara epítomos de CD4, reconhecidos por diferentes anticorpos monoclonais, localizados entre os dois domínios amino-terminais, o que induz a internalização da molécula CD4 em

um compartimento endocítico onde é eventualmente degradada. Krifuks *et al.* [39] por sua vez, demonstraram o envolvimento de proteínas quinases e fosfatases na modulação por gangliosídeos sobre a expressão das moléculas de CD4 dos linfócitos presentes no sangue periférico. Para tanto, trataram estes linfócitos com inibidores de proteínas quinases, e verificaram que houve uma inibição da imunossupressão de CD4 induzida por GM1.

Em cultura de células neuronais, GM1 induz uma variedade de respostas características da neurotrofina NGF (fator de crescimento neuronal). *In vivo*, há evidências que este gangliosídeo, assim como o NGF, previne a apoptose de neurônios colinérgicos após dano cortical [40]. Juntos estes dados sugerem que GM1 e outros gangliosídeos exercem atividade neurotrófica similar ao NGF e que o GM1 pode ser utilizado para restaurar funções neurológicas [41].

Aparentemente, GM1 mimetiza os efeitos do NGF através de interação com o receptor de alta afinidade para NGF, tirosina-quinase A (TrkA), e ativação subsequente de proteínas sinalizadoras específicas. O mecanismo exato utilizado pelo GM1 na estimulação de TrkA ainda não foi definido [42]. A ativação do TrkA é atribuída à formação de dímeros que resultam em trans- ou autofosforilação dos resíduos de tirosina, dessa maneira, alguns autores sugerem que o GM1 não deve se ligar diretamente ao receptor, mas sim auxiliar na formação de agregados de TrkA na membrana celular. Estes agregados catalisariam a formação de dímeros de TrkA, passo necessário para ativar a atividade tirosina quinase do receptor e, conseqüentemente, a transdução sinal [41]. Este tipo de interação e indução de fosforilação da tirosina por GM1 também explicaria a capacidade deste gangliosídeo em potencializar o efeito do NGF *in vitro* e *in vivo* [40, 43].

1.5- Anticorpos Anti-Gangliosídeos

Anticorpos anti-gangliosídeos foram encontrados primeiramente em 1988 em casos de síndrome de Guilláin Barret (SGB) [44]. Diversos estudos demonstram a presença dos anticorpos anti-gangliosídeos séricos não somente nos casos de Síndrome de Gulláin Barret (SGB), mas também no soro de

pacientes com diversas doenças como infecções por *Cytomegalovirus*, *Campylobacter jejuni*, *Haemophilus influenzae* [45, 46]. Além do soro, anticorpos antigangliosídeos foram encontrados depositados sobre a superfície axonal e em nodos de Ranvier dos nervos periféricos, [47]. Porém a relação dos gangliosídeos com síndromes neuropáticas periféricas é controversa [29].

Dentre as patologias relacionadas com altos títulos séricos dos anticorpos IgG e IgM anti-gangliosídeos, a síndrome de Guilláin Barret é a de maior relevância, no soro de pacientes portadores da síndrome, foram encontrados níveis significativos desses anticorpos, mas sem objetividade em afirmar que os anticorpos antigangliosídeos são responsáveis pelo surgimento das neuropatias [48, 49]. Embora se acredite que os gangliosídeos sejam imunogênicos, o mecanismo de indução da SGB e sua relação com anticorpos anti-gangliosídeos ainda não está estabelecido. Visto que estes anticorpos podem ser não específicos, sendo direcionados contra a parede lipossacarídica das bactérias, motivo pelo qual a relação patogênica destes com SGB têm sido questionadas [50, 51]. As reações de possível mimetismo molecular acontecem mais frequentemente em infecções com *Campylobacter jejuni* que apresentam estrutura lipossacarídica (LPS) semelhantes ao Ácido Neuramínico dos Gangliosídeos, sendo assim estes anticorpos fixariam na estrutura do nervo que apresenta na sua formação gangliosídeos [52-59]. Diferenças na estrutura LPS, determinam a especificidade da resposta do anticorpo e a relação das características clínicas dos pacientes [54]. Com a infecção, há destruição não somente do patógeno invasor, mas também ataque ao tecido do hospedeiro. Com isso, infecções podem também conduzir a ativação de células imunes auto-reativas por mecanismos antigênicos não específicos [55] e produção de anticorpos anti-gangliosídeos.

1.6- Fator de crescimento neuronal (NGF)

NGF, um dos fatores neurotróficos mais estudados, possui papel crucial na sobrevivência e desenvolvimento de neurônios cerebrais e periféricos [60-62]. Recentemente, no entanto, numerosos estudos revelam que NGF não age

somente em células dos sistemas nervoso periférico e central; também possui ação nos sistema imunológico e endócrino, sendo produzido e liberado por uma variedade de células [63-67]

Os efeitos biológicos do NGF em células imunoematopoiéticas são similares aos encontrados em células nervosas, sendo mediados tanto pelo receptor de baixa afinidade p75^{NTR} quanto por TrkA, receptor de alta afinidade [64, 68].

Sob condições normais, NGF está presente na corrente sanguínea de roedores e humanos. Numerosos estudos mostram que o nível circulante desta neurotrofina é afetado não somente em eventos de estresse e outras alterações neuroendócrinas, mas também por mudanças na idade, seguido por surtos neurológicos e durante doenças alérgicas e autoimunes [69, 70].

Diversos estudos mostraram que NGF induz a diferenciação e proliferação de linfócitos T e B [71], promove o crescimento, sobrevivência e propriedades funcionais de neutrófilos, como quimiotaxia, fagocitose e produção de superóxidos [72, 73], age como fator de sobrevivência para linfócitos B de memória, além de estar envolvido na proliferação e/ou diferenciação de diversas células hematopoiéticas, incluindo granulócitos, monócitos e mastócitos [74-76].

Foi demonstrado que células- β pancreáticas expressam receptores funcionais para NGF e, que esta neurotrofina exerce alguns efeitos sobre as mesmas. Particularmente, induz modificações morfológicas e fisiológicas, incluindo estimulação da corrente de sódio que aumenta a secreção de insulina devido a uma forte despolarização que aumenta a entrada de cálcio e excitose [77-81].

A expressão dos receptores de baixa e alta afinidade para NGF foi demonstrada em ilhotas de ratos no período fetal e em ratos adultos [82, 83]. A localização celular de NGF e TrkA é regulada conforme o desenvolvimento, sugerindo que este sistema possui papel importante no desenvolvimento da célula- β [80].

1.7- Aspectos morfológicos dos nervos periféricos

1.7.1- Fibras nervosas

Os nervos são formados essencialmente por fibras nervosas, que correspondem ao prolongamento dos axônios que se originam de neurônios localizados no neuroeixo ou no interior de gânglios sensitivos e viscerais. A partir de sua origem, no chamado cone de implantação do neurônio, os axônios caracterizam-se por conter neurofilamentos e microtúbulos, retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e vesículas. Ao longo do nervo, os axônios se encontram sempre associados às células de Schwann que forma ao redor dos mesmos uma bainha lipoprotéica, a bainha de mielina. Os axônios que apresentam esta bainha são denominados mielínicos e os demais amielínicos. Ao atingir o órgão alvo, o axônio dá origem a uma estrutura arborescente, denominada terminação axonal ou telodentro [84]

Os axônios mielínicos possuem, em geral, diâmetro maior que $1\mu\text{m}$ e as células de Schwann encontram-se dispostas seqüencialmente ao longo do mesmo. Cada uma delas forma ao redor do axônio a bainha de mielina a partir do enrolamento de sua membrana plasmática. O número de voltas determina a espessura da bainha de mielina, sendo essa proporcional ao calibre do axônio.

Durante este processo, contudo, pequenas porções do citoplasma das células de Schwann ficam aprisionadas entre os folhetos de membrana plasmática. Isto pode ser evidenciado em secções longitudinais de fibras mielínicas nas quais se observam pontuais dilatações na bainha de mielina denominadas de incisuras de Schmidt-Lantermann. Ao longo do axônio mielínico, as células de Schwann vizinhas estão separadas uma das outras por intervalos, denominados nodos de Ranvier, destituídos de mielina e parcialmente cobertos por digitações laterais do seu citoplasma [85, 86].

Os axônios amielínicos, por sua vez, apresentam uma relação diferente com as células de Schwann. Neste caso, projeções citoplasmáticas de uma célula de Schwann envolvem, total ou parcialmente entre 5 e 25 axônios, não havendo a

formação de bainha de mielina. Como resultado, estes axônios encontram-se individualmente situados no interior de sulcos ou canais formados pelas expansões das células de Schwann. Ao longo destes feixes de axônios amielínicos, os prolongamentos das células de Schwann vizinhas apresentam-se interdigitadas [86].

As células de Schwann são também responsáveis pela síntese e estruturação de uma membrana basal que reveste externamente tanto os conjuntos de fibras amielínicas quanto cada uma das fibras mielínicas. Esta membrana é contínua, não sendo interrompida nem nos nodos de Ranvier das fibras mielínicas. Ela é composta por colágeno (tipo IV e V), glicoproteínas e proteoglicanos. Quando observada ao microscópio eletrônico de transmissão, pode ser dividida em três camadas distintas: a primeira e a lâmina rara, que constitui-se numa região mais clara, possuindo de 20 a 30 nanômetros de espessura. A segunda é a lâmina densa (ou basal), localizada numa posição intermediária (entre a lâmina lúcida e a lâmina reticular). Possui uma espessura de 20 a 100 nanômetros, é elétron-densa e contém uma complexa malha de filamentos. A terceira é a lâmina reticular (ou rara interna), que igualmente a lâmina rara, apresenta-se elétron-lúcida ao microscópio eletrônico de transmissão. Sua espessura é variável, localizando-se entre a lâmina densa e o endoneuro [87]. A membrana basal parece constituir também uma importante barreira seletiva na troca de substâncias entre as fibras nervosas e o seu meio externo [88].

É importante mencionar que as relações morfofuncionais entre os axônios e as células de Schwann estabelecem já durante o desenvolvimento embrionário [89]. Na formação do próprio sistema nervoso periférico, os axônios emitidos pelos neurônios jovens em direção à periferia são acompanhados pelas células de Schwann que migram a partir da crista neural. Durante este processo migratório, contudo, elas ainda apresentam um aspecto ovóide e não possuem lâmina basal. Somente após sua associação com um ou mais axônios, eles se diferenciam e assumem seu característico aspecto fusiforme [90]. Embora ainda não se conheçam exatamente quais os sinais que desencadeiam a formação da

bainha de mielina, sabe-se que a indução depende do contato entre o axônio e a célula de Schwann [91-93].

1.7.2- Envoltórios conjuntivos e vascularização dos nervos

No interior dos nervos as fibras mielínicas e os conjuntos de fibras amielínicas encontram-se intimamente envolvidas por um tecido conjuntivo frouxo, denominado endoneuro. O endoneuro contém fibras de colágeno de tipo III, geralmente dispostas longitudinalmente em relação a fibra nervosa, alguns fibroblastos e eventuais mastócitos e macrófagos residentes [84, 94, 95].

A irrigação e drenagem sanguínea do endoneuro e das fibras nervosas são realizadas por uma rede de capilares cujas células encontram-se unidas por junções de oclusão. Esta característica estrutural confere a rede capilar endoneural o papel de barreira hemato-nervosa, responsável pelo controle seletivo da entrada e saída de substâncias no microambiente do nervo, contribuindo assim para sua homeostase.

Conjuntos de fibras mielínicas e amielínicas constituem no nervo pequenos feixes ou fascículos, que são delimitados externamente pelo perineuro. Esta estrutura é uma membrana conjuntiva formada por células achatadas, semelhantes a fibroblastos e de perfil fusiforme, colágeno e vasos sanguíneos. Ao microscópio eletrônico pode-se observar que as células perineurais achatadas são revestidas por uma membrana basal e estão dispostas em camadas concêntricas[86]. Entre as sucessivas camadas celulares encontra-se lona fibras de colágeno tipo I e tipo III [86]. Além disso, as células perineurais das camadas mais profundas exibem citoplasma levemente granuloso, algumas mitocôndrias e grupos de vesículas de diferentes tamanhos [84].

O estudo das características morfofuncionais do perineuro mostrou que esta bainha conjuntiva é extremamente importante na manutenção da homeostase do nervo. Em particular, as células perineurais estão unidas por junções de

oclusão o que dificulta a passagem de substâncias de alto peso molecular através do perineuro [84]. De fato, Oldfors & Johansson (1979) [88], ao estudarem as propriedades ligadas à permeabilidade do perineuro, em nervos ciáticos de ratos, observaram que este atua como uma barreira seletiva. Substâncias de alto peso molecular só conseguem difundir-se através do perineuro com muita lentidão por atividade pinocitótica, havendo consumo de energia.

Mais externamente, os diversos fascículos encontram-se reunidos por outro envoltório de tecido conjuntivo denominado epineuro. Ele é composto por células epineurais, vasos sanguíneos e fibras de colágeno tipo I. As células epineurais, assim como as perineurais, também apresentam um perfil fusiforme semelhante aos fibroblastos, porém não estão envolvidas por membrana basal. Estas células apresentam um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e são responsáveis pela produção das fibras de colágeno [86]. Elas se organizam em camadas concêntricas, separadas pelas fibras colágenas, as quais se dispõem longitudinalmente ao nervo, promovendo um reforço estrutural. Os vasos sanguíneos que nutrem os nervos periféricos penetram o epineuro e emitem vários ramos. Aqueles de menor calibre prosseguem seu curso, penetrando no perineuro e, a seguir no endoneuro. [84, 86, 94].

1.7.3- Sinapse

O espaço sináptico é situado entre as membranas pré e pós-sinápticas. O espaço é arbitrariamente dividido em fenda sináptica primária e fendas sinápticas secundárias. A fenda primária é limitada pelo axolema de um lado e, no lado oposto, por um plano tangencial imaginário que passa pelos ápices das dobras juncionais. A fenda primária é preenchida pela lâmina basal e faz comunicação com o espaço extracelular não juncional. As fendas secundárias são espaços entre as dobras juncionais e cada fenda secundária comunica-se com a fenda primária. A lâmina basal cobre as membranas pré e pós-sinápticas, tendo papel importante no desenvolvimento e na regeneração da junção neuromuscular (JNM)

e em especificar a arquitetura molecular e as propriedades fisiológicas de ambas as membranas. Assim, a lâmina basal sináptica contém fatores que guiam a regeneração do terminal nervoso mesmo a ausência da fibra muscular e induzem a regeneração das dobras juncionais e inserção dos receptores de acetilcolina (ACh) nas dobras, mesmo na ausência do terminal nervoso [96, 97]. Embora muitas moléculas da lâmina basal da JNM, como o colágeno tipo IV ($\alpha 1$ e $\alpha 2$), fibronectina e laminina B2 não se localizam exclusivamente na região sináptica [98], várias proteínas específicas estão presentes apenas na região sináptica, como: a enzima Acetilcolinesterase (AChE) [99].

1.7.4- Enzima acetilcolinesterase

Cada evento da transmissão neuromuscular deve ser rapidamente cessado para o músculo se preparar para o próximo potencial elétrico. A AChE é a enzima responsável por esta sinalização, hidrolisando a acetilcolina (ACh) rapidamente e permitindo aos receptores de acetilcolina (AChRs) tornarem-se receptivos novamente. As moléculas de AChE são sintetizadas no retículo endoplasmático. múltiplas formas de AChE são classificadas de acordo com suas subunidades. Essas formas podem ser separadas por cromatografia de gel ou por ultra centrifugação. De acordo com a estrutura, a AChE é classificadas em globular (G) e assimétrica (A). As formas globulares G1, G2 e G4 são monômeros, dímeros e tetrâmeros, respectivamente, de subunidades ativas enzimaticamente.

A forma assimétrica consiste de um a três tetrâmeros (G4) unidos à cauda de colágeno, que fixa subunidades a lamina basal. A cauda é uma hélice tripla envolvendo três cadeias polipeptídicas, ricas em prolina e glicina como é típico do colágeno. As formas assimétricas são designadas A4, A8 e A12, dependendo do número de subunidades catalíticas. Em todos os tecidos onde a forma da AchE é encontrada, a espécie mais encontrada é a A12, com quantidades pequenas de A8 e A4. Durante o desenvolvimento antes da fusão dos mioblastos, apenas a forma globular da AchE é expressa. Seguindo a formação

dos miofibrilos e início das atividades espontâneas do músculo, a forma assimétrica aparece [100]. A atividade muscular é um pré requisito para a biossíntese e/ou agrupamento da AChE assimétrica. Sob uma condição que bloqueie essa atividade, a AChE assimétrica desaparece, enquanto a forma globular é apenas levemente afetada [101, 102]. A inervação não é necessária para o aparecimento de nenhuma forma molecular; entretanto, pode exercer profunda influência na quantidade de AChE sintetizada, na abundância relativa de cada forma molecular e nos seus locais de acúmulo na superfície da célula muscular [100]. Quando um músculo é experimentalmente reinervado num local distante da Junção neuromuscular (JNM) original (inervação ectópica), uma nova sinapse se forma e a AChE acumula após aproximadamente uma semana. A forma assimétrica também acumula na JNM antiga, que não foi reinervada, mostrando que a presença do nervo não é necessária para o acúmulo da AChE na JNM, uma vez que a sinapse já tenha sido formada [103].

1.8- Neuropatias periféricas

Existem vários tipos de neuropatias como: polineuropatia simétrica, simples e múltipla mononeuropatia e radiculopatia. Além disso, a classificação depende da mistura de eventos patológicos e genéticos ou outras características etiológicas [104]. As neuropatias periféricas mais relevantes para esse estudo são: Neuropatia diabética, Síndrome de Guilláin Barre e Síndrome de Miller Fisher.

1.8.1- Neuropatias diabética

Neuropatia diabética pode apresentar diferentes manifestações clínicas e subclínicas dependendo da classe de fibras nervosas envolvidas. De acordo com a Convenção de San Antonio, os principais grupos de distúrbios neurológicos no diabetes Mellitus incluem: (1) Neuropatia subclínica, determinadas por anormalidades no eletrodiagnóstico e teste sensorial quantitativo, (2) Neuropatia

clínica difusa com síndromes simétrica sensorimotora e síndromes autonômicas (3) síndromes focais [105].

1.8.2.- Síndrome de Guilláin Barret

A síndrome de Guilláin Barret (SGB) é caracterizado pelo enfraquecimento rápido e simétrico dos membros, perda de reflexo dos tendões, ausência ou declínio dos sinais sensoriais e outras disfunções autonômicas [106]. SGB é considerada protótipo de uma doença pós infecciosa; dois terços dos pacientes referem antecedentes como doenças infecciosas agudas, mais comumente infecções do trato respiratório ou gastroenterites. O intervalo entre infecção prodrômica e o começo dos sintomas da SGB varia, entre 1 a 3 semanas [105]. A bactéria gram-negativa *Campylobacter jejuni*, principal causa de gastroenterites agudas em humanos, é o mais freqüente patógeno antecedente. Estudos epidemiológicos, que estabeleceram a relação entre SGB e infecção antecedente por *Campylobacter jejuni*, demonstraram que de quarto a um terço dos pacientes desenvolveram a síndrome depois da infecção.[107]. Até muito recentemente, o termo SGB foi usado como poliradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória aguda (PDIA), que tem características patológicas interessantes: infiltrado linfocítico precoce na raiz espinhal e nervos periféricos e a subsequente mediação dos macrófagos destruindo a mielina. A deposição de componentes do sistema complemento, incluindo complexos C3b e C5-9 (complexo de ataque a membrana) tem sido demonstrado em biópsia de pacientes com SGB [108]. A ativação do complemento tem um papel crucial na destruição axonal e comprometimento das células de Schwann [47]. Isto é geralmente visto como desordem auto-imune, desencadeada em muitos casos por uma infecção bacteriana ou viral. O alvo da resposta imune aberrante é a superfície da membrana da célula de Schwann ou da mielina, resultando em desmielinização inflamatória [109]. Visto que a bactéria *Campylobacter jejuni* detém de estruturas lipolissacarídicas semelhantes ao ácido neuramínico dos gangliosídeos (componentes da superfície dos nervos periféricos) [54-57], ocorre assim reação cruzada com os componentes

da bainha de mielina, ocasionando deposição de anticorpos na superfície miélnica com conseqüente ativação dos fatores do sistema complemento como descrito acima. Em suma, o conceito do mimetismo molecular é aplicado para tentar explicar as possíveis causas da SGB que, implica na divisão de epítomos homólogos entre LPS bacteriano e gangliosídeos componentes dos nervos periféricos [106, 110].

1.8.3- Síndrome de Miller Fischer

Síndrome de Miller Fischer (SMF) é uma doença incomum constituindo 5% dos casos de Síndrome de Guilláin Barret [111] e aparece relacionada estritamente a SGB. Arreflexia, fluido cérebro espinhal com dissociação albuminocitológica, atraso na condução eletromiográfica e muitas vezes uma apresentação pós-infecciosa caracterizam ambas as síndromes. Em contraste com SGB, contudo, pacientes com SMF usualmente não sofrem de deficiências nos músculos periféricos.

2- OBJETIVOS

Estudar os nervos ciáticos dos camundongos NOD e Balb/C tratados com gangliosídeo GM1 da 4ª a 28ª semana de vida e seus controles tratados com salina, analisando:

1. A expressão gênica do NGF nos nervos ciáticos
2. Imunofenotipificação dos nervos quanto a expressão de gangliosídeo GM1 e neurotrofina NGF
3. Atividade dos nervos através da enzima Acetilcolinesterase

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Animais

Os animais utilizados eram camundongos da linhagem NOD, implantada e mantida pelo centro de bioterismo da UNICAMP (CEMIB) desde 1994 em condições livre de patógenos. A freqüência do diabetes tipo 1 clínico espontâneo registrados na colônia NOD/uni do CEMIB a partir de sua implantação tem se mantido ao redor de 85% entre as fêmeas e de 18% entre os machos considerando a população dos animais com no máximo 25 semanas de idade, revelando-se similar a colônia de origem [13].

3.2- Grupos experimentais e tratamento

Cinquenta camundongos fêmeas sendo, 30 da linhagem NOD e 20 da linhagem Balb/C objetos de estudo provenientes do Cemib/Unicamp eram mantidos em condições livre de patógenos conhecidos com controle de luz, temperatura e umidade no Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental, recebendo água e ração padrão autoclavadas e oferecidos *ad libitum*.

Os grupos experimentais foram divididos em:

3.2.1- Grupo 1

Vinte camundongos NOD fêmeas eram subdivididos em dois grupos: 1) 10 animais eram submetidos ao tratamento com gangliosídeo GM1 (Monossialogangliosídeo sódico-Sygen®-TRB Pharma) na concentração 100mg/Kg e, 2) 10 animais eram submetidos ao tratamento com solução salina estéril (0,9%) para o monitoramento do diabetes, ambos no período de 28 semanas.

3.2.2- Controle

Vinte camundongos da linhagem Balb/C fêmeas onde, 1) 10 animais eram submetidos ao tratamento com gangliosídeo GM1 (Monossialogangliosídeo sódico-Sygen®-TRB Pharma) na concentração de 100mg/Kg e 2) 10 animais eram tratados com solução salina estéril (0,9%)

3.3- Período de acompanhamento

Os animais eram acompanhados a partir da 4^a semana de vida e monitorados até 28^a semana de vida (idade avançada) em tratamento com gangliosídeo GM1. Os animais que se apresentaram diabéticos (duas glicemias consecutivas maior ou igual a 250 mg/dL), eram sacrificados, assim como aqueles que completaram seu ciclo de tratamento (28 semanas).

3.4- Diagnóstico do diabetes e sacrifício dos animais

A ocorrência do diabetes mellitus era monitorada a partir da 10^a semana de vida. As glicemias eram monitoradas semanalmente, através do glicosímetro Prestige LX® (Home diagnostics, EUA) retirando-se amostra de sangue da veia caudal do animal. Os animais eram considerados diabéticos após duas leituras consecutivas e confirmação da glicemia através de glicosímetro com valores de glicemia superiores a 250mg/dL (13,8 mM) estabelecido no Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental [112] em concordância com [113]

Os animais que apresentaram diabetes, isto é, com valores de glicemia sangüínea maiores que 250 mg/dL e antes de completarem o tempo de 28 semanas, eram sacrificados com Tiopental sódico 2,5% (Thiopentax®, Cristália-produtos farmacêuticos LTDA) (15 a 30mg/Kg de peso corpóreo) e os nervos ciáticos das patas traseiras eram coletados por incisões na altura da coxa.

Os nervos eram transferidos para tubo plástico (RNAse free) de 1,5 mL contendo 200µL de guanidina sarcosyl, para extração de RNA total, os nervos da pata esquerda traseira inserido em meio de inclusão O.C.T (Tissue Tek® Miles-EUA) e rapidamente congelados em nitrogênio líquido. A seguir, ambas as amostras eram conservadas em bio-freezer a -80° C até o processamento.

3.5- Preparação dos nervos para análises

Os nervos ciáticos eram transferidos e posicionados no suporte do criostato para a obtenção de cortes transversais. Os cortes eram coletados em série de três secções de 10µm, com intervalos de 200µm, depositados em lâminas histológicas previamente silanizadas (γ -Metacryl-Oxipropil-Methoxysilane – Sigma St Louis, EUA).

3.6- Digestão protéica dos nervos ciáticos

Os nervos ciáticos extraídos para análises em técnicas de Biologia Molecular eram digeridos pela enzima Proteinase K (Proteinase K-Sigma® Molecular Biology) na concentração de 200µg/mL para a remoção das nucleases e redução da degradação do DNA, digerindo as proteínas nucleares. As amostras eram incubadas em tubo de ensaio contendo 200µg da enzima em 1 mL de Tampão de diluição (Tris 0,05M, 6,057g; NaCl, 0,5M, 2g; EDTA 0,005M, 1,86g; SDS 0,5g em 1000 mL de H₂O ultra pura q.s.p) e incubadas durante toda noite.

3.7- Extração do RNA total (RNAT)

As amostras de RNAT eram extraídas dos nervos ciáticos dos camundongos tratados e não tratados através do método de extração pelo reagente Trizol® (Trizol ® reagent-GibcoBRL, EUA).

Separaram-se as amostras de nervo em duas alíquotas, contendo 600µL para cada tubo de 2mL. A seguir, acrescentou-se 400µL do reagente Trizol® na amostra (para separação das proteínas dos ácidos nucleicos) completando-se o volume total de 1mL. As amostras eram homogeneizadas com hastes de aço inox estéreis por aproximadamente 1 minuto ou até a total homogeneização.

Para separação das proteínas dos ácidos nucleicos adicionava-se 300µL da solução Clorofórmio: Álcool Isoamílico (25:24:1), homogeneizando-se a amostra com o auxílio do vórtex seguido de centrifugação em velocidade de 14.000 rpm pelo tempo de 5 minutos a uma temperatura de 4° C

A seguir, era coletado o sobrenadante da amostra e separado em Tubo Eppendorf® estéril RNase Free e adicionado etanol ao sobrenadante em quantidade três vezes maior ao volume total extraído, em seguida, adicionou-se Acetato de Sódio, na quantidade de 10% ao volume do sobrenadante mais volume do Etanol (Volume Total). O produto final era armazenado em Freezer -80° C.

3.8- Análise do RNA total extraído

A qualidade do RNA total extraído era analisada através da relação entre suas leituras em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 nM e 280 nM. Considerando-se adequadas as amostras com relação entre 1.6 e 1.8. Para a quantificação do RNA total aplicava-se a fórmula: $(OD_{260}/0,025) \times \text{diluição de leitura}/1000 = \text{RNA } \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

3.9- Transcrição reversa do RNA total extraído (cDNA)

Para a análise do cDNA, eram padronizados 5µg de RNA total de amostras de nervo ciático para a realização do RT-PCR final. Assim, o volume de RNA total adicionado para a transcrição reversa foi calculado para a obtenção de

5µg/50µL de reação. Adicionou-se à amostra 0,5 µL de Oligo d (pt) e água ultra pura em quantidade suficiente para 28µL. Os tubos eram aquecidos com as respectivas amostras em termocicladora (GeneAmp® 9700, Perkin Ellmer, EUA) por 10 minutos a 65° C e resfriou-se para 4° C por 5 minutos.

Para a ligação complementar dos primers ao RNA, adicionou-se 21µL de solução mãe (10µL de tampão Super RT, 1µL de dNTP mix 0,5mM, 5µL de DTT 0,1M, 1µL de RNAsin) incubando-se por 2 minutos a 42° C. Após adição de 1µL de enzima Super Trascriptase reversa (200U), a reação processava-se em termocicladora programada para: 42° C por 50 minutos, 70° C por 15 minutos e resfriamento da amostra até 4° C adaptado no Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (LIAE) [114]. Após a última etapa as amostras eram armazenadas a -20° C como DNA complementar (cDNA).

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

3.10- Amplificação do cDNA pela transcriptase reversa da reação de polimerase em cadeia (RT-PCR)

O procedimento padrão de PCR era realizado adicionando-se ao tubo 2µL de amostra de cDNA, adicionou-se 100ng de primer 5' sense, 100ng de primer anti-sense 3, 2µL de cDNA, 45µL de solução mãe (5µL de tampão Taq polimerase – *thermus aquaticus* DNA polimerase gene (GibcoBRL, EUA); 5µL de dNTP mix 5nM, 1,5µL de MgCl₂ 50nM e 33,5µL de água ultra pura) e 1µL de óleo mineral.

Tabela 1- Primers empregados nos procedimentos de RT-PCR semi-quantitativo para expressão gênica de NGF e Ciclofilina (gene estrutural)

Primer	Sense (5' – 3')	Anti-sense (5' – 3')	Produto
NGF	TGAAGCCCACTGGACTAAA	ACCTCCTTGCCCTTGATG	372 pb
Ciclofilina	GACAGCAGAAAACCTTTCGTGC	GGTTCTGACTCACCGACC T	276 pb

Em seguida, os tubos eram transferidos para termocicladora nas seguintes condições programadas: Desnaturação a 94^o C por 2 minutos, 80^o C por 5 minutos para amplificação de 1µL de enzima taq polimerase, Pareamento 58^o C por 45 segundos. Extensão dos primers a 72^o C por 90 segundos. Desnaturação dos primers a 95^o C por 45 segundos, 40 ciclos, extensão final 72^o C por 10 minutos, temperatura de espera 4^o C. Os produtos das PCR eram armazenados a -20^o C.

3.11- Análise dos produtos da reação e cadeia de polimerase (PCR) por eletroforese em gel de agarose.

As amplificações dos cDNA através dos primers específicos para citocinas eram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% e revelados com brometo de etídio, através da excitação em UV e documentadas fotograficamente em sistema de documentação fotográfica ImageQuant® (GE technologies, EUA).

A intensidade das bandas era analisada por captação da imagem dos géis e submetidos à análise com o software ImageQuant TL (Amersham Biosciences, EUA). Todas as amostras eram submetidas a dois novos procedimentos de PCR, objetivando excluir falsos negativos resultantes de erros de procedimento.

Preparo de 50 mL de gel de Agarose 1,5%:

Agarose 1,5% era preparada em tampão TBE (Ácido Bórico/Tris/EDTA/H₂O ultra pura) e adicionado 2µL de brometo de etídio.

Preparo da amostras.

As amostras eram preparadas misturando 8µL de cDNA e tampão GBX (tampão de amostra de PCR) e 5,5µL de água ultra pura. Utilizava-se como tampão de corrida eletroforética Tampão TBE adicionado de 2µL de brometo de etídio. O padrão de DNA (DNA marker X174 RF Hae III Fragments Gibco) era aplicado em todas as eletroforeses. As condições de eletroforese eram: 45 minutos a 70 volts, 150 mA.

3.12- Análise semiquantitativa do RNA mensageiro

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

Expressão semiquantitativa (Unidades arbitrárias)=(área de pixel do RNA mensageiro a ser avaliado/área de pixel da ciclofilina)x100.

3.13- Imunofluorescência - NGF

Para detecção de NGF empregava-se a técnica de imunofluorescência indireta. Após 15 minutos de fixação em acetona gelada, as lâminas eram lavadas três vezes em PBS e, em seguida bloqueadas com 2% leite desnatado em pó e 8% SFB (HyClone – Utah, EUA) em PBS durante toda a noite, a Temperatura

Ambiente, em câmara úmida. Novas lavagens eram realizadas e, aproximadamente 30 µl do anticorpo primário anti-NGF e anti TrkA (produzidos em coelho) (Santa Cruz Biotechnology, EUA) eram adicionados a cada corte (diluição 1:50). As lâminas foram então incubadas por toda a noite nas mesmas condições descritas anteriormente. Em seguida, adicionava-se 30µl/corte do anticorpo secundário conjugado com FITC IgG anti-coelho (Vector Laboratories Inc., Califórnia, EUA), na concentração de 10 µg/ml, mantendo-se por 2 horas ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas eram lavadas uma vez e montadas em glicerol, sendo observadas em fotomicroscópio Leica DM 4500B e as imagens captadas através do software Leica FW4000.

3.14. Imunofluorescência - GM1

Para observação dos sítios de ligação do Gangliosídeo GM1, empregava-se a técnica de imunofluorescência indireta. Após 1 minuto de fixação em acetona gelada, as lâminas eram lavadas três vezes em PBS e, em seguida bloqueadas com 2% leite desnatado em pó em PBS durante toda a noite, a 4°C, em câmara úmida. Novas lavagens eram realizadas e, aproximadamente 30 µl do anticorpo primário anti-GM1 (obtidos de pacientes com diabetes tipo1) eram adicionados a cada corte (diluição 1:10). As lâminas eram então incubadas por toda a noite nas mesmas condições descritas anteriormente. Na manhã seguinte, adicionava-se 30µl/corte do anticorpo secundário conjugado com Texas Red® IgG anti-camundongo (Vector Laboratories Inc., Califórnia, EUA), na concentração de 5 µg/ml, mantendo-se por 2 horas ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas eram lavadas uma vez e montadas em glicerol, sendo observadas em fotomicroscópio Leica DM 4500B e as imagens captadas através do software Leica FW4000.

3.15- Coloração para acetilcolinesterase (AChE)

Para a detecção da enzima AchE empregava-se a técnica de coloração para Acetilcolinesterase [115].

As laminas com os cortes eram lavadas em três banhos com solução de NaSO₄ saturado e em seguida pré incubadas em NaSO₄ saturado mais ISO-OMPA (Tetraisopropyl-pyrophosphoramide, SIGMA-ALDRICH Inc EUA) em Temperatura Ambiente por 30 minutos e incubadas por 1 hora em solução incubadora por 1 minuto e 15 segundos. Em seguida foram lavadas em H₂O destilada e logo após a coloração era intensificada com banho de Nitrato de Prata 10% por 1 minuto, logo, eram Lavadas com Tiosulfato de sódio 5% durante 1 minuto. Em seguida eram lavadas em H₂O destilada e Contracoradas com Hematoxilina durante 50 segundos. As lâminas eram então desidratadas em banhos rápidos em álcool 70%, 96% e 100% e diafanizadas rapidamente em seqüências de três cubas em Xilol. Eram fechadas em meio de inclusão rápido para microscopia (ENTELLAN®-Mikroskopie-Merk-KgaA, Darmstadt,Alemanha)..

3.16- Quantificação da atividade para enzima AchE

Para quantificação das áreas ativas para AchE era realizado o cálculo da área total do corte (pixels²), por meio do fotomicroscópio Leica DM 4500B as imagens captadas através do software Leica FW4000 com e contagem dos locais que apresentaram coloração característica de atividade. Os locais que apresentaram atividade para AchE foram salientados com pontos vermelhos por meio do software ImageJ® (Crimson v1.1.1-Apache Software License, Version 1.1). O numero total de áreas que apresentaram reatividade era dividido pela área total do corte, onde obteve-se o número de locais ativos por pixel de todos animais submetidos ao tratamento com GM1 ou salina. Os números obtidos eram separados em gupos de animais diabéticos e não diabéticos tratados com GM1 ou salina (n=5) com obtenção de média que foi expressa em gráficos (figura II).

3.17- Avaliação clínica para neuropatias periféricas

Os animais submetidos ao tratamento com gangliosídeo GM1 no período de 28 semanas eram cuidadosamente observados quanto aos parâmetros: agilidade, tração motora e corrida pela gaiola (reflexo de fuga). A agilidade do animal era observada no momento da contenção para injeção, a tração motora era observada quando os animais agarravam-se as gaiolas ou mesmo na mão do operador e a corrida era observada no momento da abertura da gaiola e manipulação dos animais logo após, receberem a injeção eram separados para uma gaiola vazia onde eram observados novamente.

3.18- Formatação do texto

Para a formatação do texto no que se refere às citações e bibliografia, empregava-se o programa computacional EndNote 9 (Copyright© 2006 The Thomson Corporation. EUA, licenciado para o Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental) e o formato Vancouver, segundo as normas da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp.

4- RESULTADOS

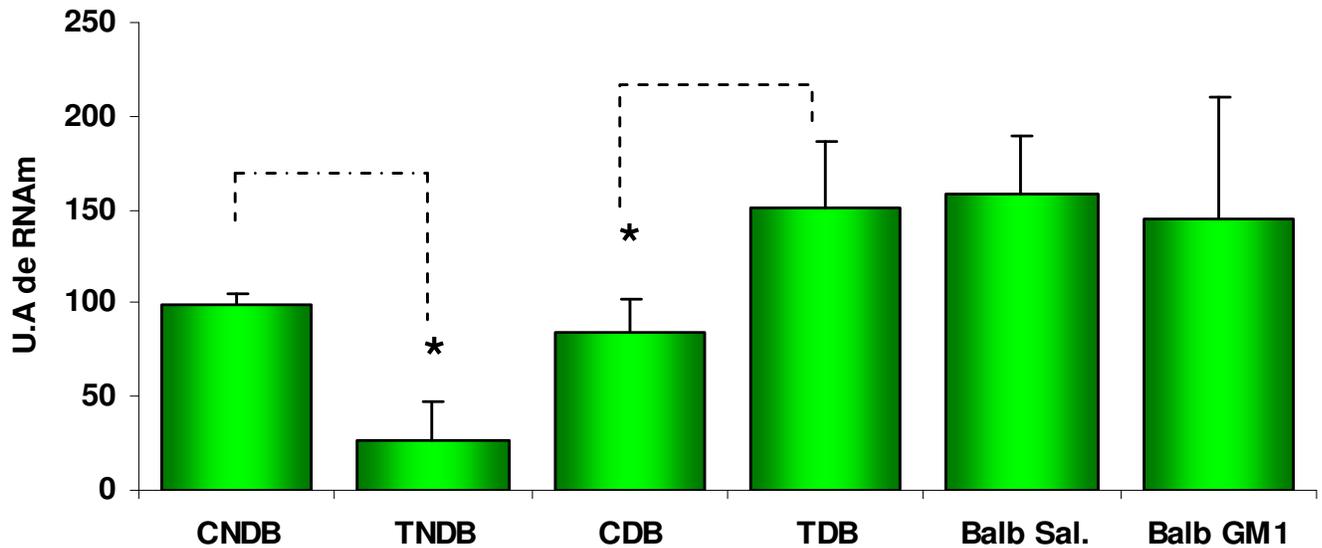
4.1- Efeitos da administração do gangliosídeo GM1 sobre a expressão gênica do NGF nos nervos ciático do camundongo NOD e Balb/C

Para a avaliação do efeito do tratamento com o gangliosídeo GM1 sobre a expressão do NGF, realizou-se a detecção de expressão do NGF no nervo ciático.

A expressão gênica do NGF foi avaliada em camundongos NOD e Balb/C tratados com o gangliosídeo GM1 ou salina.

Nos animais não diabéticos tratados com GM1 (Figura 1) (TNDB) a expressão de RNAm de NGF (26,7 U.A de RNAm) estava significativamente diminuída em relação aos animais tratados com salina (99,7 U.A de RNAm) (CNDB) ($p=0.0079$), o grupo TNDB apresentou menor expressão de NGF, quando comparados com grupos NOD e Balb/C. Já o grupo de camundongos diabéticos tratados (TDB) apresentou aumento significativo da expressão de RNAm de NGF (150,3 U.A RNAm) em relação aos animais controle diabéticos salina (84,9 U.A de RNAm) ($p=0.0079$). Os camundongos Balb/C tratados com GM1 (Balb GM1) não apresentaram diferença na expressão de NGF (145,1 U.A de RNAm) em relação aos Balb/C tratados com salina (158,2 U.A de RNAm) ($p=0.6905$). Quando comparamos os grupos da linhagem NOD (diabéticos e não diabéticos tratados com GM1 ou salina) com os camundongos Balb/C tratados com GM1 ou salina não observa-se diferença significativa, com a indicativa de menor expressão de NGF para os camundongos NOD. Estes resultados podem sugerir que o GM1 e/ou diabetes podem influenciar na expressão do NGF.

Expressão de NGF



Grupos Experimentais

Figura 1- Detecção de RNAm para NGF em nervos ciáticos de camundongos NOD não diabéticos tratados com salina (CNDB), tratados com GM1 não diabéticos (TNDB), tratados com salina diabéticos (CDB), tratados com GM1 diabéticos (TDB). Camundongos Balb/C tratados com salina (Balb-sal.) e tratados com GM1 (Balb-GM1) (n=5 para todos animais). Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p < 0,05 – Mann-Whitney).

4.2- Efeito do tratamento com GM1 sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)

A quantificação da atividade para a enzima AChE no nervo ciático dos camundongos tratados com GM1 ou salina foi determinada por meio da contagem das áreas reativas para AChE por meio do software ImageJ® (Crimson v1.1.1-Apache Software License, Version 1.1) para obtenção de áreas ativas/pixel.

Os camundongos NOD diabéticos tratados com GM1 (TDB n=5) (Figura II) não demonstrou diferenças significativas (0,00350 áreas ativas/pixel) na reatividade de AChE quando comparados aos camundongos NOD diabéticos tratados com salina (CDB n=5) (0,00278 áreas ativas/pixel) demonstrando que a AChE não sofreu alterações nesse grupo ($p=0.2222$) (TDB e CDB), camundongos NOD não diabéticos tratados com GM1 (TNDB n=5) (0,00422 áreas ativas/pixel) também não apresentaram diferenças quando comparados aos camundongos não diabéticos tratados com salina (CNDB n=5) (0,00395 áreas ativas/pixel) ($p=0.4206$). Quando os grupos de camundongos NOD diabéticos e não diabéticos tratados com GM1 ou salina são comparados entre si (CDB TDB X CNDB-TNDB) nota-se uma diferença significativa entre animais diabéticos tratados com GM1 ou salina (CDB-0,00278 áreas de ativas/pixel e TDB-0,00350 áreas ativas/pixel) quando comparados ao grupo de camundongos não diabéticos tratados com GM1 ou salina (CNDB-0,00395 áreas ativas/pixel e TNDB-0,00422 áreas ativas/pixel). Estes resultados sugerem que os animais diabéticos tratados ou não com GM1 sofrem alterações na atividade da AChE localizada no nervo ciático.

Já os camundongos Balb/C apresentaram diferenças significativas quando o grupo de camundongos Balb/C tratados com GM1 (Balb-GM1 0,00398 áreas ativas/pixel) foi comparado ao grupo de camundongos tratados com salina (Balb-sal. 0,00224 áreas de ativas/pixel) ($p=0.0079$). Estes resultados sugerem que o GM1 pode influenciar na expressão de AChE, localizada no nervo ciático dos camundongos Balb/C tratados com GM1.

Quando ambos os grupos (NOD e Balb/C) são comparados nota-se que somente o camundongo Balb/C tratado com GM1 foi capaz de sofrer alterações significantes (relativo aumento de atividades/pixel) em relação aos seus controles tratados com salina (figura 2).

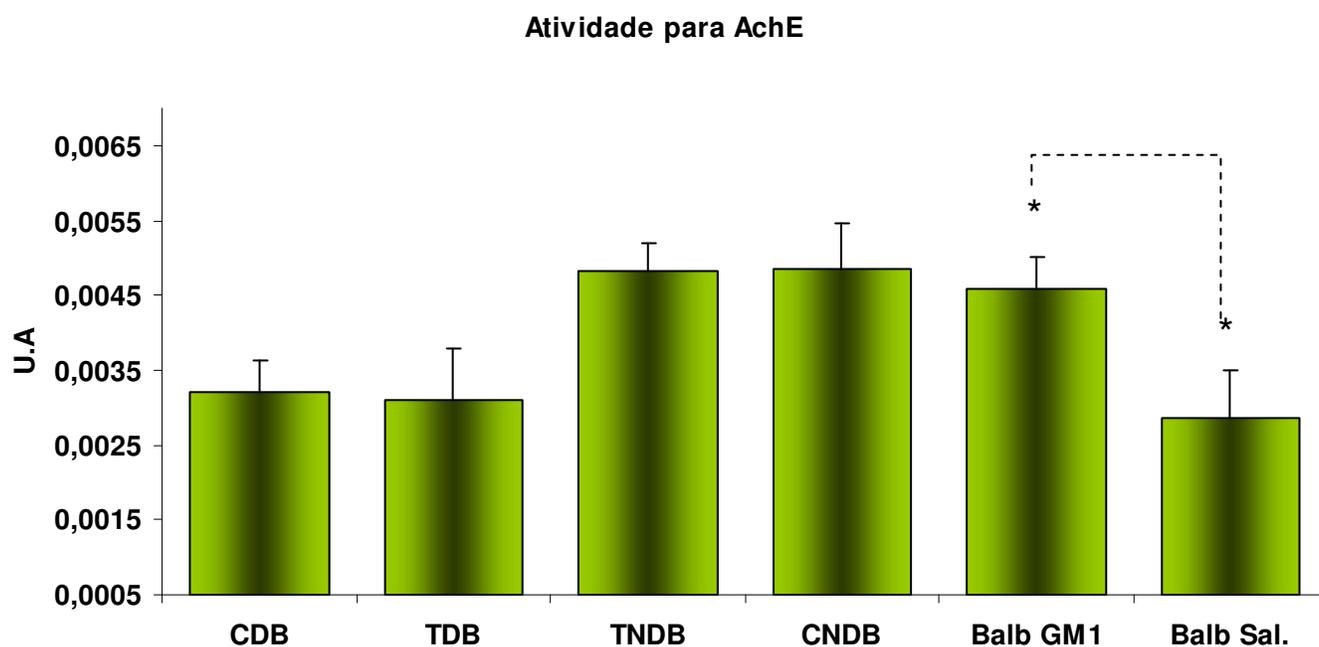


Figura 2- Gráfico representativo da quantificação das áreas com atividade para enzima acetilcolinesterase (AChE) no nervo ciático do camundongo NOD [115], demonstrando os números de atividade/pixel para a enzima. Camundongos NOD tratados com GM1 (TDB e TNDB) (n=5) ou salina (CDB e CNDB) (n=5) e camundongos Balb/C tratados com GM1 (Balb GM1) ou salina (Balb sal.) (n=5). Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05 – Mann-Withney). U.A (Unidades Arbitrárias) números de reações por pixel.

Prancha I

Demonstração da atividade para a enzima Acetilcolinesterase (AChE) em nervos ciático do camundongos NOD não diabéticos e diabéticos tratados GM1 ou salina. Áreas em marrom indicadas pelas setas indicam coloração característica de atividade para AChE Os locais de atividade foram realçados em vermelho com o software ImageJ® 1.32 (Crimson v1.1.1-Apache Software License, Version 1.1) para a obtenção de média de atividade/pixel (n=5).

Controle salina não diabético (CNDB): A e B

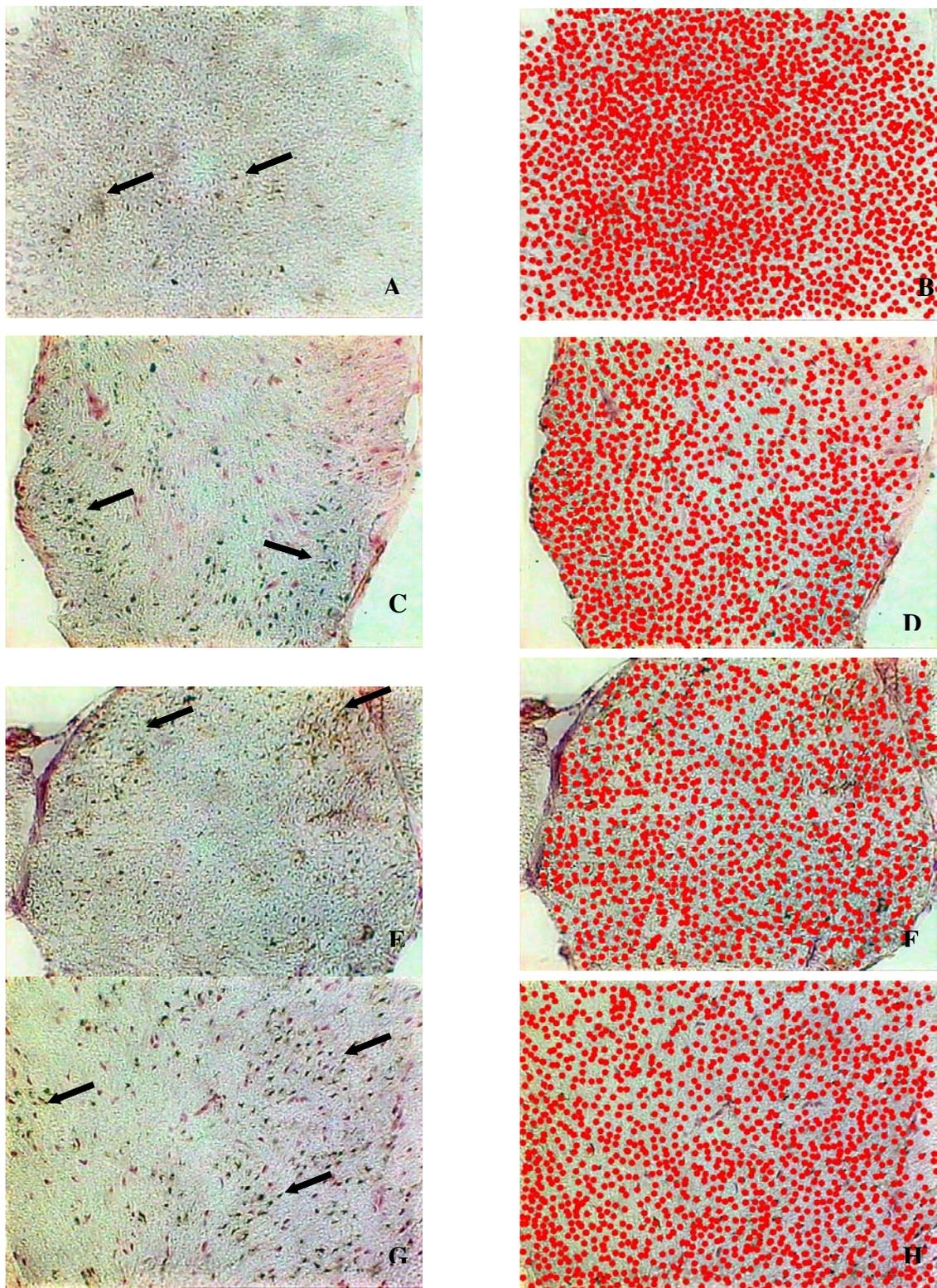
Tratado GM1-não diabético (TNDB): C e D

Tratado GM1- diabético (TDB): E e F

Controle salina- diabético (CDB): G e H

Aumento 400x

Prancha I- Demonstração da atividade para enzima Acetilcolinesterase (AChE) nos nervos ciáticos do camundongos NOD não diabéticos e diabéticos tratados com GM1 ou salina



Prancha II

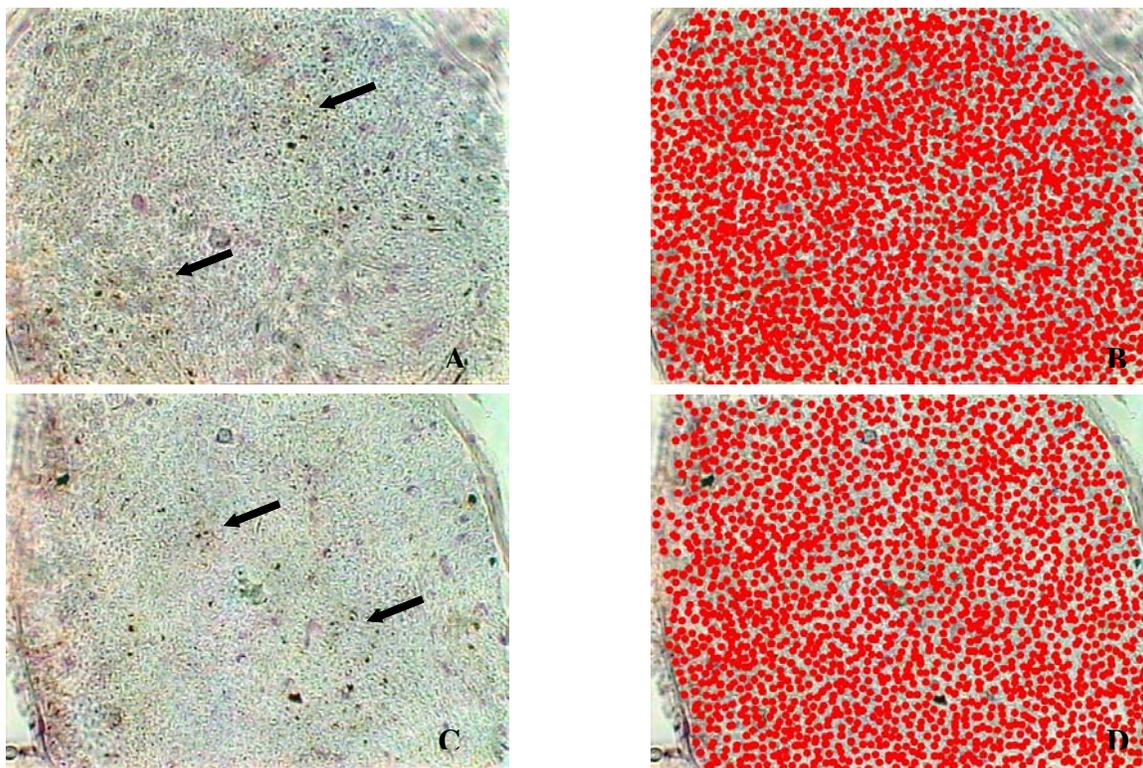
Demonstração da atividade para a enzima Acetilcolinesterase (AChE) nos nervos ciático do camundongos Balb/C tratados GM1 ou salina. Áreas em marrom indicadas pelas setas representam atividade para AChE bem visível. Todos os locais de atividade visível para AChE foi realçado em vermelho com o software ImageJ® 1.32 (Crimson v1.1.1-Apache Software License, Version 1.1) para a obtenção de média de áreas de atividade/pixel.

Balb/C tratado GM1 (Balb GM1): A e B (n=5)

Balb/C salina (Balb sal.): C e D (n=5)

Aumento 400x

Prancha II- Demonstração da atividade para enzima Acetilcolinesterase (AChE) nos nervos ciático do camundongos Balb/C tratados com GM1 ou salina



Aumento 400x

4.3- Imunofluorescência

A imunofluorescência para detecção de GM1 do nervo ciático do camundongo NOD demonstrou maior marcação nos camundongos NOD diabéticos (Prancha III – figuras E e G) tratados com GM1 ou salina. Foi observada marcação de GM1 em menor grau nos camundongos NOD não diabéticos tratados com GM1 (Prancha III – figura C), os camundongos NOD não diabéticos tratados com salina apresentaram menor marcação de GM1 (Prancha III – figura A). No grupo dos camundongos Balb/C tratado com GM1 (Prancha IV – figura A) observou-se maior marcação para o GM1 em relação aos animais tratados com salina do mesmo grupo (Prancha IV – figura C), quando comparados aos animais diabéticos (Prancha III – figuras A, C, E e G) eles apresentam menor marcação para o GM1

Observa-se maior marcação de NGF no grupo Balb/C tratados com GM1 ou salina (Prancha IV – figuras B e D), sendo que o grupo Balb/C tratado com GM1 (Prancha IV – figura B) apresentou maior marcação de NGF, porém não significativa quando comparados aos Balb/C tratados com salina. Com relação ao grupo NOD tratados diabéticos e não diabéticos (Prancha II – figura B, D, F e H), não foram observados marcações para NGF.

Prancha III

Imunofluorescência dos nervos ciático para a detecção de GM1 e NGF em camundongos NOD não diabéticos e diabéticos tratados com GM1 ou salina (n=5).

Controle salina não diabético (CNDB):

(A) Seta indica GM1 localizado na região periférica do corte com baixa intensidade

(B) NGF não marcado.

Tratado GM1-não diabético (TNDB):

(C) Seta indicando GM1 apresentando maior marcação.

(D) NGF não marcado.

Tratado GM1- diabético (TDB):

(E) GM1 distribuído por todo corte com marcação substancialmente maior (seta) que todos os grupos GM1.

(F) NGF não marcado.

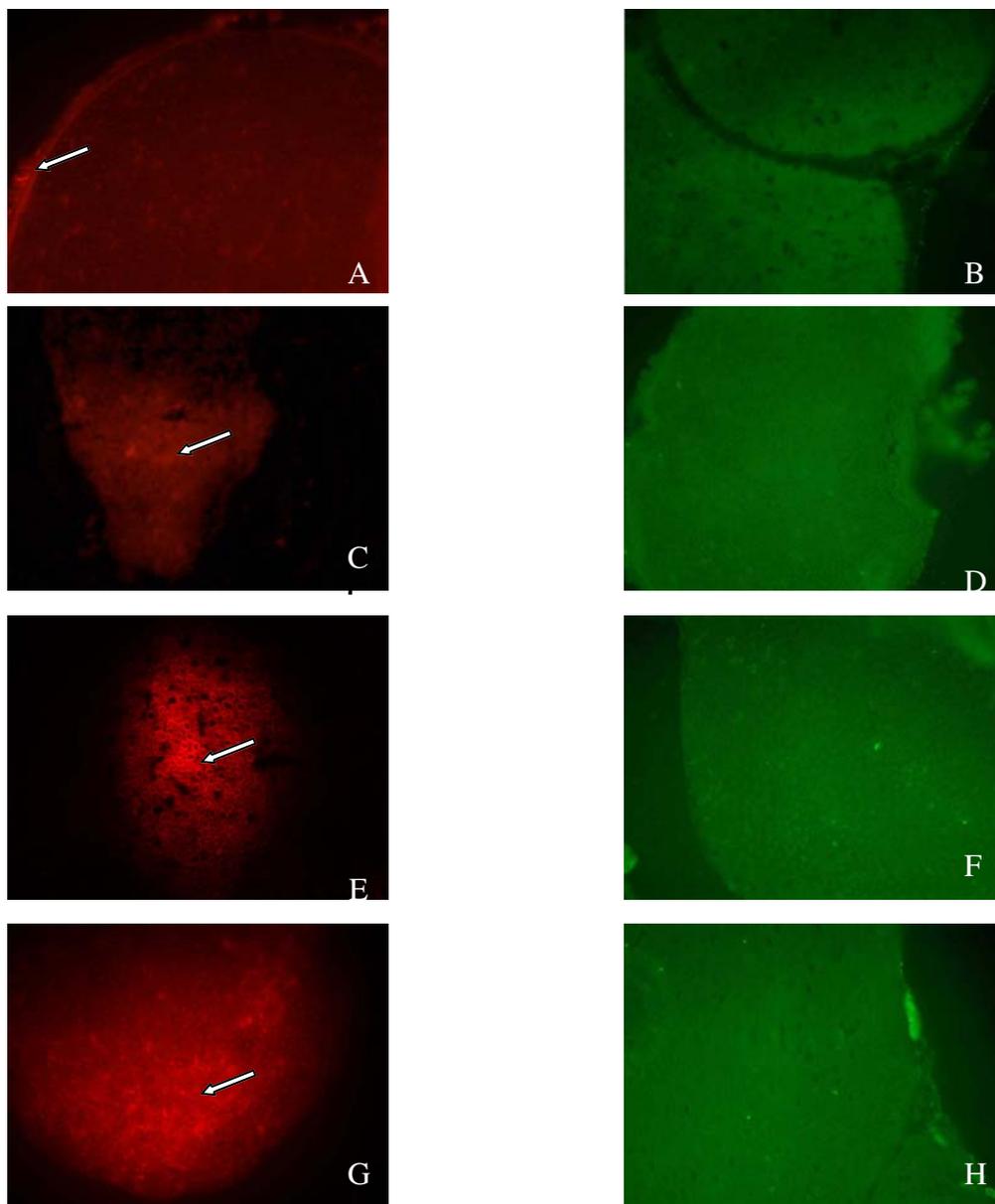
Controle salina- diabético (CDB):

(G) Marcação para GM1 principalmente na região central do corte.

(H) NGF não marcado.

Aumento 400x

Prancha III- Imunofluorescência para detecção de GM1 e NGF nos nervos ciático do camundongos NOD



Aumento 400x

Prancha IV

Imunofluorescência dos nervos ciático para a detecção de GM1 e NGF em camundongos Balb/C tratados com GM1 ou salina.

Balb/C tratado GM1 (Balb GM1):

(A) Marcação para GM1 distribuída na região superior do corte (Setas).

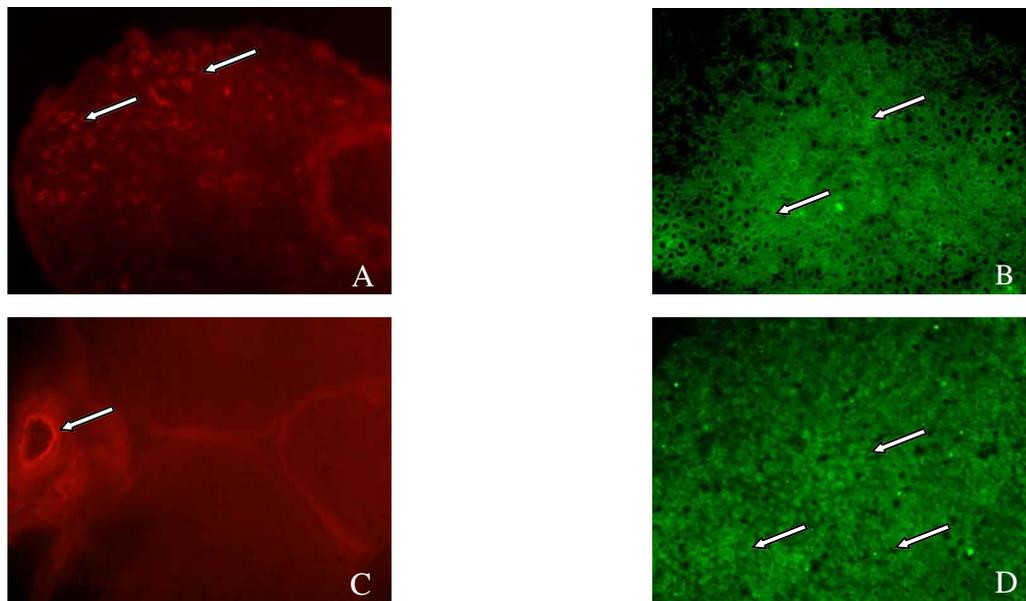
(B) NGF marcado com um padrão de marcação maior que seu controle salina.

Balb/C salina (Balb sal.):

(C) Observa-se marcação para GM1 no perímetro de um vaso sanguíneo (Seta) indicando área de marcação para gangliosídeo endógeno, porém na área de interesse do nervo, não foi encontrado nenhum tipo de marcação.

(D) Setas indicam que o NGF apresentou marcação distribuída por todo o corte, porém marcados em menor intensidade que os Balb/C tratados com GM1, quando comparados com o grupo NOD salina diabéticos e não diabéticos, apresentou maior marcação.

Prancha IV- Imunofluorescência para detecção de GM1 e NGF nos nervos ciático do camundongos Balb/C tratados com GM1 ou salina



Aumento 400x

4.4- Avaliação clínica para neuropatias periféricas

A avaliação clínica dos animais tratados ou não com gangliosídeos GM1 (NOD e Balb/C) não apresentou diferenças clínicas entre eles quanto à agilidade, tração motora e corrida. Os animais tratados com gangliosídeo GM1 apresentaram uma agilidade compatível com os animais tratados com salina. Para o exame da tração motora nenhum dos animais tratados apresentou declínio da força motora quando solicitado seu agarramento a algum objeto quando comparados ao grupo salina. A corrida mostrou-se compatível com os animais salina, sendo que nenhum dos animais apresentou sinais de debilidade na corrida. Em suma, não foram encontrados sinais clínicos de neuropatia periférica nos animais NOD e Balb/C tratados com GM1.

Os testes quantitativos para obtenção de força e sensibilidade ao calor não foram realizados por serem considerados métodos que causam estresse ao animal, que no caso dos camundongos NOD, pode afetar nos índices de incidência do diabetes, atrapalhando assim a obtenção de resultados sobre a relação do GM1 com a incidência do diabetes nesta linhagem de camundongos.

5- DISCUSSÃO

Estudos utilizando os gangliosídeos em modelos experimentais [116] ou adicionados em cultura de células de Schwann [117] mostraram propriedades importantes dos gangliosídeos como neuro-regeneração bem como propriedades imunomodulatórias [32], porém em tratamento com gangliosídeos exógenos demonstrou-se o surgimento de anticorpos anti-gangliosídeos [118] especialmente contra o gangliosídeo GM1, o qual tem sido associado a Síndrome de Guilláin Barret (SGB) [46], porém sem dados conclusivos [29].

Recentemente modelo de Síndrome Guilláin Barret (SGB) foi estabelecido em coelhos usando inoculação com mistura de gangliosídeos bovino (GM1 21%, GD1a 40%, GD1b 16%, GT1b 19%) e GM1 purificado [119] injetados por via subcutânea e intraperitoneal, ambos emulsionados em adjuvante completo de Freund e hemocianina. Na inoculação com a mistura de gangliosídeos, todos os animais injetados desenvolveram paralisia flácida dos membros com começo agudo.

Ao contrário dos resultados obtidos por Yuki (2001) [119], verificamos no presente trabalho que os camundongos NOD e Balb/C tratados com GM1, não apresentaram qualquer indício clínico de neuropatia periférica. Provavelmente, as diferenças entre os protocolos experimentais e as espécies de animais possam contribuir para as diferenças encontradas. Em nosso estudo, o GM1 não foi incorporado ao adjuvante ou qualquer outra substância, apenas o gangliosídeo. Nos estudos de Yuki (2001), como crítica observada não foram apresentados grupos controles salina ou injeção com o adjuvante, para isentar este último de possíveis alterações em sinergismo ao GM1.

A avaliação da atividade do nervo periférico por meio da atividade da enzima acetilcolinesterase [115], mostrou aumento da atividade principalmente nos animais NOD não diabéticos tratados com GM1 e salina. Estes resultados estão em concordância com os obtidos por Persson-Sjögren e cols (2005) [120] que observaram a atividade da AchE em ilhotas pancreáticas, concluindo que em animais diabéticos a atividade para a acetilcolinesterase estava diminuída nas ilhotas dos animais diabéticos, devido a um declínio na atividade nervosa nas

ilhas pancreáticas. Nossos resultados mostraram que os camundongos Balb/C tratados com GM1 apresentaram atividade aumentada para AchE quando comparados ao grupo salina da mesma idade (28 semanas), sugerindo que o GM1 seja fator associado ao aumento da atividade nervosa, aqui demonstrada pela atividade AchE no nervo, por mecanismos que precisam ser melhor elucidados.

Mallei e cols. (2004) [121], expuseram células NIH-3T3 ao GM1 e verificaram aumento na expressão de receptores TrKA e seu respectivo ligante NGF e GM1. Estes autores verificaram que o GM1 aumentou de maneira tempo-dependente a expressão gênica e os níveis protéicos de NGF. Outros autores demonstraram que o GM1 aumenta os níveis de RNAm de NGF *in vivo*, em cérebro de ratos, indicando que os efeitos deste gangliosídeo não ocorrem somente em linhagens celulares *in vitro* [122]. Baseando-se nestas considerações, pudemos constatar o aumento da expressão gênica de NGF nos animais tratados, diabéticos quando comparados com animais do grupo salina. Analisando os resultados encontrados nos NOD não diabéticos tratados com GM1 observa-se uma diminuição nos índices de expressão do NGF quando comparados com o seu grupo salina. O grupo dos NOD não diabéticos tratados com GM1 apresentou os menores índices do grupo NOD e Balb/C. Por outro lado, a expressão aumentada de NGF nos animais tratados e diabéticos possa decorrer da administração exógena precoce do GM1 favorecendo ao aumento de mRNA de NGF e liberação do produto transcrito em resposta as alterações inflamatórias do nervo nestes animais. Desta forma, estes resultados sugerem que o tratamento precoce com GM1 é fator auxiliar na expressão do NGF. Contudo, a diminuição da expressão do NGF nos animais tratados com GM1 e não diabéticos estão em concordância aos encontrados por Nishi e cols. (2004) e Mallei e cols (2004) que verificaram que, dependendo da concentração de GM1 administrado [123] e o tempo de exposição [121], pode haver uma diminuição da liberação de NGF endógeno.

Farooqui e cols. (1997) demonstraram que GM1 é capaz de ativar TrkA, sugerindo que este gangliosídeo mimetiza a atividade trófica do NGF [124]. Além disso, exercem atividade trófica por induzir rápida liberação de neurotrofinas em

células neuronais e não neuronais que ativam seus respectivos receptores. Entretanto, os mecanismos utilizados pelo GM1 permanecem desconhecidos. [42]. Sabendo-se que animais diabéticos apresentam expressão elevada de TrkA em células do pâncreas [120] analisamos a expressão de GM1 em cortes histológicos de nervo ciático e verificamos que os animais diabéticos em nosso estudo apresentaram marcação mais intensa de GM1, possivelmente em consequência da resposta a fatores regenerativos frente ao processo diabético ou mesmo pela interação do GM1 com os dímeros de TrkA, ocasionando aumento destes receptores na membrana celular com relativo aumento de RNAm para NGF.

Os resultados obtidos na atividade da enzima AchE e no estudo imunistoquímico da expressão de NGF, sugerem relação entre a atividade nervosa e esta neurotrofina. Esta associação foi evidenciada em estudo realizado por Greene & Rukenstein (1981) que verificaram em cultura de células PC12 a relação entre AchE e NGF, demonstrando que NGF adicionado as culturas de células PC12 aumenta a atividade da enzima AchE. De maneira semelhante a estes resultados a atividade para enzima AchE apresentou-se superior nos Balb/C tratados com GM1 que curiosamente apresentaram maior expressão de RNAm para o NGF e maior marcação no estudo imunistoquímico para NGF.

O conjunto dos resultados obtidos no presente trabalho fornece informações adicionais para o entendimento da ação do gangliosídeo GM1 sobre o sistema nervoso periférico, contribuindo com novos dados para o entendimento da relação do gangliosídeo GM1 com síndromes neuropáticas periféricas, que no presente momento ainda permanecem controversas. Estudos adicionais serão necessários para o entendimento geral dos efeitos da administração de GM1 nas doenças inflamatórias degenerativas.

6- CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que a administração de GM1 em camundongos NOD:

1. Foi capaz de diminuir significativamente a expressão de NGF no grupo tratados com GM1 e não diabéticos
2. Aumenta a expressão de NGF em camundongos NOD tratados com GM1 e diabéticos
3. Nos estudos imunoistoquímicos para NGF, houve marcação apenas para os animais Balb/C tratados com GM1 e salina.
4. Aumenta a expressão de GM1 nos animais diabéticos tratados.
5. Não foi capaz de provocar diferenças significativas na atividade do nervo dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com GM1 quando comparados aos seus respectivos grupos salina.
6. Aumentar a atividade da acetilcolinesterase nos camundongos Balb/C tratados GM1, sugerindo um aumento da atividade nervosa nesta linhagem de camundongos.
7. Os animais tratados com Gangliosídeo GM1 (NOD e Balb/C) não apresentaram sinais clínicos de neuropatia periférica

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Organization WH. Part I: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva, World Health Organization. World Health Organization. 1999:1-49.
- [2] Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998 Jul;15(7): 539-53.
- [3] Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *The New England journal of medicine.* 1986 May 22;314(21):1360-8.
- [4] Kikutani H, Makino S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol.* 1992;51:285-322.
- [5] Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet.* 1974 Nov 30;2(7892):1279-83.
- [6] Palmer JP, Cooney MK, Crossley JR, Hollander PH, Asplin CM. Antibodies to viruses and to pancreatic islets in nondiabetic and insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes care.* 1981 Sep-Oct;4(5):525-8.
- [7] Rossini AA, Greiner DL, Friedman HP, J.P. M. Immunopathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes Rev.* 1993;1:46-75.
- [8] Schwartz RH. Immunological tolerance. IN: Paul, W.E. *Fundamental immunology.* New York. Raven Press. 1993:677-731.
- [9] Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocrine Rev.* 1994;15:516-42.
- [10] Bach JF, Mathis D. The NOD mouse. *Research in immunology.* 1997 Jun;148(5):285-6.
- [11] Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu.* 1980 Jan;29(1):1-13.

- [12] Bach JF. Immunotherapy of type 1 diabetes: lessons for other autoimmune diseases. *Arthritis research*. 2002;4 Suppl 3:S3-15.
- [13] Pavin EJ, Zollner RL. Implantação da linhagem “NOD mice” (camundongos diabéticos não obeso) no Brasil: contribuição deste modelo animal ao estudo do diabetes Mellitus insulino-dependente e outras doenças autoimune. *Arq Bras Endo Metabol*. 1994;38:105-8.
- [14] Kay TW, Chaplin HL, Parker JL, Stephens LA, Thomas HE. CD4+ and CD8+ T lymphocytes: clarification of their pathogenic roles in diabetes in the NOD mouse. *Research in immunology*. 1997 Jun;148(5):320-7.
- [15] Wong FS, Janeway CA, Jr. The role of CD4 and CD8 T cells in type I diabetes in the NOD mouse. *Research in immunology*. 1997 Jun;148(5):327-32.
- [16] Bedossa P, Bendelac A, Bach JF, Carnaud C. Syngeneic T cell transfer of diabetes into NOD newborn mice: in situ studies of the autoimmune steps leading to insulin-producing cell destruction. *European journal of immunology*. 1989 Oct;19(10):1947-51.
- [17] Nagata M, Santamaria P, Kawamura T, Utsugi T, Yoon JW. Evidence for the role of CD8+ cytotoxic T cells in the destruction of pancreatic beta-cells in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 1994 Feb 15;152(4):2042-50.
- [18] Wong FS, Visintin I, Wen L, Flavell RA, Janeway CA, Jr. CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *The Journal of experimental medicine*. 1996 Jan 1;183(1):67-76.
- [19] Chervonsky AV, Wang Y, Wong FS, Visintin I, Flavell RA, Janeway CA, Jr., et al. The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell*. 1997 Apr 4;89(1):17-24.
- [20] Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia*. 2001 Dec;44(12):2115-33.
- [21] Ingelsson E, Saldeen J, Welsh N. Islet expression of perforin, Fas/Apo-1 and interleukin-1 converting enzyme (ICE) in non-obese diabetic (NOD) mice. *Immunol Lett*. 1998 Oct;63(3):125-9.

- [22] Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell*. 1996 May 3;85(3):291-7.
- [23] Hayward AR, Shreiber M. Neonatal injection of CD3 antibody into nonobese diabetic mice reduces the incidence of insulinitis and diabetes. *J Immunol*. 1989 Sep 1;143(5):1555-9.
- [24] O'Reilly LA, Hutchings PR, Crocker PR, Simpson E, Lund T, Kioussis D, et al. Characterization of pancreatic islet cell infiltrates in NOD mice: effect of cell transfer and transgene expression. *European journal of immunology*. 1991 May;21(5):1171-80.
- [25] Ledeen RW, Yu RK. Gangliosides: structure, isolation, and analysis. *Methods Enzymol*. 1982;83:139-91.
- [26] Tettamanti G, Riboni L. Gangliosides turnover and neural cells function: a new perspective. *Prog Brain Res*. 1994;101:77-100.
- [27] Mahoney JA, Schnaar RL. Multivalent ganglioside and sphingosine conjugates modulate myelin protein kinases. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Aug 14;1328(1):30-40.
- [28] Bergelson LD. Serum gangliosides as endogenous immunomodulators. *Immunology today*. 1995 Oct;16(10):483-6.
- [29] Govoni V, Granieri E, Tola MR, Paolino E, Casetta I, Fainardi E, et al. Exogenous gangliosides and Guillain-Barre syndrome. An observational study in the local health district of Ferrara, Italy. *Brain*. 1997 Jul;120 (Pt 7):1123-30.
- [30] Gorio A, Janigro D, DiGregorio F, Jonsson G. Gangliosides as reagents that promote synaptic plasticity and recovery of functions. in Cotman C (ed): *Synaptic Plasticity* Guilford Press. 1985:507-39.
- [31] Ledeen RW, Yu RK, Rapport MM. *Ganglioside Structure, Function, & Biomedical Potential*. Plenum Press. 1984.

- [32] 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.
- [33] Roisen FJ, Bartfeld H, Nagele R, Yorke G. Ganglioside stimulation of axonal sprouting in vitro. *Science (New York, NY)*. 1981 Oct 30;214(4520):577-8.
- [34] Pitto M, Mutoh T, Kuriyama M, Ferraretto A, Palestini P, Masserini M. Influence of endogenous GM1 ganglioside on TrkB activity, in cultured neurons. *FEBS letters*. 1998 Nov 13;439(1-2):93-6.
- [35] Rampersaud AA, Oblinger JL, Ponnappan RK, Burry RW, Yates AJ. Gangliosides and growth factor receptor regulation. *Biochemical Society transactions*. 1999 Aug;27(4):415-22.
- [36] Wang Y, Tsui Z, Yang F. Antagonistic effect of ganglioside GM1 and GM3 on the activity and conformation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *FEBS letters*. 1999 Aug 20;457(1):144-8.
- [37] Wu G, Lu ZH, Ledeen RW. GM1 ganglioside modulates prostaglandin E1 stimulated adenylyl cyclase in neuro-2A cells. *Glycoconjugate journal*. 1996 Apr;13(2):235-9.
- [38] Saggiaro D, Sorio C, Calderazzo F, Callegaro L, Panozzo M, Berton G, et al. Mechanism of action of the monosialoganglioside GM1 as a modulator of CD4 expression. Evidence that GM1-CD4 interaction triggers dissociation of p56lck from CD4, and CD4 internalization and degradation. *The Journal of biological chemistry*. 1993 Jan 15;268(2):1368-75.
- [39] Krifuks O, Bergelson LD, Schlesinger M. The down-modulation of CD4 induced by the GM1 ganglioside is regulated by phosphatases and kinases: evidence from enzyme inhibitors and anti-CD45 antibodies. *Cellular immunology*. 1998 Jul 10;187(1):45-51.
- [40] Maysinger D, Filipovic-Grcic J, Cuello AC. Effects of coencapsulated NGF and GM1 in rats with cortical lesions. *Neuroreport*. 1993 Jul;4(7):971-4.

- [41] Rabin SJ, Mocchetti I. GM1 ganglioside activates the high-affinity nerve growth factor receptor trkA. *Journal of neurochemistry*. 1995 Jul;65(1):347-54.
- [42] Rabin SJ, Bachis A, Mocchetti I. Gangliosides activate Trk receptors by inducing the release of neurotrophins. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Dec 20;277(51):49466-72.
- [43] Ferrari G, Batistatou A, Greene LA. Gangliosides rescue neuronal cells from death after trophic factor deprivation. *J Neurosci*. 1993 May;13(5):1879-87.
- [44] Ilyas AA, Willison HJ, Quarles RH, Jungalwala FB, Cornblath DR, Trapp BD, et al. Serum antibodies to gangliosides in Guillain-Barre syndrome. *Annals of neurology*. 1988 May;23(5):440-7.
- [45] Khalili-Shirazi A, Gregson N, Gray I, Rees J, Winer J, Hughes R. Antiganglioside antibodies in Guillain-Barre syndrome after a recent cytomegalovirus infection. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1999 Mar;66(3):376-9.
- [46] Koga M, Yuki N, Hirata K, Morimatsu M, Mori M, Kuwabara S. Anti-GM1 antibody IgG subclass: a clinical recovery predictor in Guillain-Barre syndrome. *Neurology*. 2003 May 13;60(9):1514-8.
- [47] Hughes RA. Peripheral neuropathy. *Bmj*. 2002 Feb 23;324(7335):466-9.
- [48] Kornberg AJ. Anti-GM1 ganglioside antibodies: their role in the diagnosis and pathogenesis of immune-mediated motor neuropathies. *J Clin Neurosci*. 2000 May;7(3):191-4.
- [49] McCombe PA, Wilson R, Prentice RL. Results of testing for anti-GM1 antibodies. *J Clin Neurosci*. 2000 May;7(3):209-12.
- [50] Mizutamari RK, Wiegandt H, Nores GA. Characterization of anti-ganglioside antibodies present in normal human plasma. *Journal of neuroimmunology*. 1994 Mar;50(2):215-20.

- [51] Weller M, Stevens A, Sommer N, Dichgans J, Kappler B, Wietholter H. Ganglioside antibodies: a lack of diagnostic specificity and clinical utility? *J Neurol*. 1992 Oct;239(8):455-9.
- [52] Ang CW, De Klerk MA, Endtz HP, Jacobs BC, Laman JD, van der Meche FG, et al. Guillain-Barre syndrome- and Miller Fisher syndrome-associated *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides induce anti-GM1 and anti-GQ1b Antibodies in rabbits. *Infection and immunity*. 2001 Apr;69(4):2462-9.
- [53] Ang CW, Jacobs BC, Laman JD. The Guillain-Barre syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends in immunology*. 2004 Feb;25(2):61-6.
- [54] Ang CW, Laman JD, Willison HJ, Wagner ER, Endtz HP, De Klerk MA, et al. Structure of *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides determines antiganglioside specificity and clinical features of Guillain-Barre and Miller Fisher patients. *Infection and immunity*. 2002 Mar;70(3):1202-8.
- [55] Aspinall GO, Fujimoto S, McDonald AG, Pang H, Kurjanczyk LA, Penner JL. Lipopolysaccharides from *Campylobacter jejuni* associated with Guillain-Barre syndrome patients mimic human gangliosides in structure. *Infection and immunity*. 1994 May;62(5):2122-5.
- [56] Aspinall GO, McDonald AG, Pang H, Kurjanczyk LA, Penner JL. Lipopolysaccharide of *Campylobacter coli* serotype O:30. Fractionation and structure of liberated core oligosaccharide. *The Journal of biological chemistry*. 1993 Mar 25;268(9):6263-8.
- [57] Aspinall GO, McDonald AG, Raju TS, Pang H, Mills SD, Kurjanczyk LA, et al. Serological diversity and chemical structures of *Campylobacter jejuni* low-molecular-weight lipopolysaccharides. *Journal of bacteriology*. 1992 Feb;174(4):1324-32.
- [58] Prendergast MM, Lastovica AJ, Moran AP. Lipopolysaccharides from *Campylobacter jejuni* O:41 strains associated with Guillain-Barre syndrome exhibit mimicry of GM1 ganglioside. *Infection and immunity*. 1998 Aug;66(8):3649-55.

- [59] Prendergast MM, Willison HJ, Moran AP. Human monoclonal immunoglobulin M antibodies to ganglioside GM1 show diverse cross-reactivities with lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* strains associated with Guillain-Barre syndrome. *Infection and immunity*. 1999 Jul;67(7):3698-701.
- [60] Levi-Montalcini R. The nerve growth factor: thirty-five years later. *Biosci Rep*. 1987 Sep;7(9):681-99.
- [61] Levi-Montalcini R, Angeletti PU. Second symposium on catecholamines. Modification of sympathetic function. Immunosympathectomy. *Pharmacol Rev*. 1966 Mar;18(1):619-28.
- [62] Thoenen H, Bandtlow C, Heumann R. The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: comparison with the periphery. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1987;109:145-78.
- [63] Aloe L. Nerve growth factor and neuroimmune responses: basic and clinical observations. *Arch Physiol Biochem*. 2001 Oct;109(4):354-6.
- [64] Aloe L, Simone MD, Properzi F. Nerve growth factor: a neurotrophin with activity on cells of the immune system. *Microsc Res Tech*. 1999 May 15-Jun 1;45(4-5):285-91.
- [65] Otten U, Gadiant RA. Neurotrophins and cytokines--intermediaries between the immune and nervous systems. *Int J Dev Neurosci*. 1995 Jun-Jul;13(3-4):147-51.
- [66] Sariola H. The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. *Cell Mol Life Sci*. 2001 Jul;58(8):1061-6.
- [67] Tessarollo L. Pleiotropic functions of neurotrophins in development. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1998 Jun;9(2):125-37.
- [68] Meakin SO, Shooter EM. The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci*. 1992 Sep;15(9):323-31.
- [69] Aloe L, Skaper SD, Leon A, Levi-Montalcini R. Nerve growth factor and autoimmune diseases. *Autoimmunity*. 1994;19(2):141-50.

- [70] Bonini S, Lambiase A, Bonini S, Angelucci F, Magrini L, Manni L, et al. Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 1;93(20):10955-60.
- [71] Otten U, Ehrhard P, Peck R. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Dec;86(24):10059-63.
- [72] Boyle MD, Lawman MJ, Gee AP, Young M. Nerve growth factor: a chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes in vivo. *J Immunol*. 1985 Jan;134(1):564-8.
- [73] Kannan Y, Ushio H, Koyama H, Okada M, Oikawa M, Yoshihara T, et al. 2.5S nerve growth factor enhances survival, phagocytosis, and superoxide production of murine neutrophils. *Blood*. 1991 Mar 15;77(6):1320-5.
- [74] Ehrhard PB, Ganter U, Stalder A, Bauer J, Otten U. Expression of functional trk protooncogene in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jun 15;90(12):5423-7.
- [75] Horigome K, Pryor JC, Bullock ED, Johnson EM, Jr. Mediator release from mast cells by nerve growth factor. Neurotrophin specificity and receptor mediation. *J Biol Chem*. 1993 Jul 15;268(20):14881-7.
- [76] Kannan Y, Matsuda H, Ushio H, Kawamoto K, Shimada Y. Murine granulocyte-macrophage and mast cell colony formation promoted by nerve growth factor. *Int Arch Allergy Immunol*. 1993;102(4):362-7.
- [77] Kanaka-Gantenbein C, Tazi A, Czernichow P, Scharfmann R. In vivo presence of the high affinity nerve growth factor receptor Trk-A in the rat pancreas: differential localization during pancreatic development. *Endocrinology*. 1995 Feb;136(2):761-9.
- [78] Miralles F, Philippe P, Czernichow P, Scharfmann R. Expression of nerve growth factor and its high-affinity receptor Trk-A in the rat pancreas during embryonic and fetal life. *J Endocrinol*. 1998 Mar;156(3):431-9.

- [79] Polak M, Scharfmann R, Seilheimer B, Eisenbarth G, Dressler D, Verma IM, et al. Nerve growth factor induces neuron-like differentiation of an insulin-secreting pancreatic beta cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jun 15;90(12):5781-5.
- [80] Rosenbaum T, Vidaltamayo R, Sanchez-Soto MC, Zentella A, Hiriart M. Pancreatic beta cells synthesize and secrete nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 23;95(13):7784-8.
- [81] Vidaltamayo R, Sanchez-Soto MC, Hiriart M. Nerve growth factor increases sodium channel expression in pancreatic beta cells: implications for insulin secretion. *Faseb J*. 2002 Jun;16(8):891-2.
- [82] Rausa FM, Ye H, Lim L, Duncan SA, Costa RH. In situ hybridization with ³³P-labeled RNA probes for determination of cellular expression patterns of liver transcription factors in mouse embryos. *Methods*. 1998 Sep;16(1):29-41.
- [83] Singh J, Adeghate E, Salido GM, Pariente JA, Yago MD, Juma LO. Interaction of islet hormones with cholecystokinin octapeptide-evoked secretory responses in the isolated pancreas of normal and diabetic rats. *Exp Physiol*. 1999 Mar;84(2):299-318.
- [84] Carpenter MB. Human Neuroanatomy. *Rev Interamericana* 7^a ed. 1988:700.
- [85] Landon DN, Hall S. The myelinated nerve fiber. IN: The peripheral nerve. Landon, DN, ed. 1976:105.
- [86] Peters A, Palay S, Webster HD. The fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells. ed Philadelphia, Saunders. 1976:406-9.
- [87] Martin JR, Webster HD. Mitotic Schwann cells in developing nerve: their changes in shape, fine structure, and axon relationships. *Developmental biology*. 1973 Jun;32(2):417-31.
- [88] Oldfors A, Johansson BR. Barriers and transport properties of the perineurium. *Acta Neurophatol (Berl)*. 1979;47:139-43.
- [89] Le Douarin NM. The neural crest. Cambridge University Press. 1982.

- [90] Webster H, Favilla JT. Development of peripheral nerve fibre. In: *Pepripheral neuropathy* Dick, PJ, Thomas, PK, Lambert, EH, Bunge, RP Philadelphia Saunders. 1984:329-59.
- [91] Aguayo AJ, Ahiwell M, Trecarten J, Perkins S, Bray GM. Abnormal myelinization in transplanted Trembler mouse Schwann cells. *Nature (London)*. 1977;265:73-83.
- [92] Gupta SK, Pringle J, Poduslo JF, Mezei C. Induction of myelin genes during peripheral nerve remyelination requires a continuous signal from the ingrowing axon. *Journal of neuroscience research*. 1993 Jan;34(1):14-23.
- [93] Lemke G, Chao M. Axons regulate Schwann cell expression of the major myelin and NGF receptor genes. *Development (Cambridge, England)*. 1988 Mar;102(3):499-504.
- [94] Junqueira LC, Montes GS, Krisztan RM. The collagen of the vertebrate peripheral nervous system. *Cell and tissue research*. 1979 Nov;202(3):453-60.
- [95] Monaco S, Gehrman J, Raivich G, Kreutzberg GW. MHC-positive, ramified macrophages in the normal and injured rat peripheral nervous system. *Journal of neurocytology*. 1992 Sep;21(9):623-34.
- [96] Burden SJ, Sargent PB, McMahan UJ. Acetylcholine receptors in regenerating muscle accumulate at original synaptic sites in the absence of the nerve. *The Journal of cell biology*. 1979 Aug;82(2):412-25.
- [97] McMahan UJ, Slater CR. The influence of basal lamina on the accumulation of acetylcholine receptors at synaptic sites in regenerating muscle. *The Journal of cell biology*. 1984 Apr;98(4):1453-73.
- [98] Sanes JR, Engvall E, Butkowski R, Hunter DD. Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. *The Journal of cell biology*. 1990 Oct;111(4):1685-99.
- [99] Sanes JR, Hall ZW. Antibodies that bind specifically to synaptic sites on muscle fiber basal lamina. *The Journal of cell biology*. 1979 Nov;83(2 Pt 1):357-70.

- [100] Rotundo RL, Fambrough DM. Function and molecular structure of acetylcholinesterase. In: Engel, AG and Armstrong, CF Myology USA: McGraw-Hill. 1994;1:607-23.
- [101] Fernandez-Valle C, Rotundo RL. Regulation of acetylcholinesterase synthesis and assembly by muscle activity. Effects of tetrodotoxin. The Journal of biological chemistry. 1989 Aug 25;264(24):14043-9.
- [102] Rubin LL, Schuetze SM, Weill CL, Fischbach GD. Regulation of acetylcholinesterase appearance at neuromuscular junctions in vitro. Nature. 1980 Jan 17;283(5744):264-7.
- [103] Weinberg CB, Hall ZW. Junctional form of acetylcholinesterase restored at nerve-free endplates. Developmental biology. 1979 Feb;68(2):631-5.
- [104] Martyn CN, Hughes RA. Epidemiology of peripheral neuropathy. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry. 1997 Apr;62(4):310-8.
- [105] Winer JB, Hughes RA, Osmond C. A prospective study of acute idiopathic neuropathy. I. Clinical features and their prognostic value. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry. 1988 May;51(5):605-12.
- [106] Hahn AF. Guillain-Barre syndrome. Lancet. 1998 Aug 22;352(9128):635-41.
- [107] McKhann GM, Cornblath DR, Griffin JW, Ho TW, Li CY, Jiang Z, et al. Acute motor axonal neuropathy: a frequent cause of acute flaccid paralysis in China. Annals of neurology. 1993 Apr;33(4):333-42.
- [108] Hafer-Macko CE, Sheikh KA, Li CY, Ho TW, Cornblath DR, McKhann GM, et al. Immune attack on the Schwann cell surface in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. Annals of neurology. 1996 May;39(5):625-35.
- [109] Honavar M, Tharakan JK, Hughes RA, Leibowitz S, Winer JB. A clinicopathological study of the Guillain-Barre syndrome. Nine cases and literature review. Brain. 1991 Jun;114 (Pt 3):1245-69.

- [110] Behar SM, Porcelli SA. Mechanisms of autoimmune disease induction. The role of the immune response to microbial pathogens. *Arthritis and rheumatism*. 1995 Apr;38(4):458-76.
- [111] Ropper AH. The Guillain-Barre syndrome. *The New England journal of medicine*. 1992 Apr 23;326(17):1130-6.
- [112] Ventura-Oliveira D, Vilella CA, Zanin ME, Castro GM, Moreira Filho DC, Zollner RL. Kinetics of TNF-alpha and IFN-gamma mRNA expression in islets and spleen of NOD mice. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* [et al. 2002 Nov;35(11):1347-55.
- [113] Itoh N, Tsujimoto Y, Nagata S. Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J Immunol*. 1993 Jul 15;151(2):621-7.
- [114] Boechat LH, Vilella CA, Zollner RL. Effect of iodide on Fas, Fas-ligand and Bcl-w mRNA expression in thyroid of NOD mice pretreated with methimazole. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* [et al. 2002 Mar;35(3):289-95.
- [115] Gomori G. [Microscopic Histochemistry-Principles and Praticce..]. University of Chicago Press. 1952.
- [116] Mengs U, Stotzem CD. Ganglioside treatment and nerve regeneration: a morphological study after nerve crush in rats. *European journal of pharmacology*. 1987 Oct 27;142(3):419-24.
- [117] Sobue G, Taki T, Yasuda T, Mitsuma T. Gangliosides modulate Schwann cell proliferation and morphology. *Brain research*. 1988 Dec 6;474(2):287-95.
- [118] Odaka M, Yuki N, Nobile-Orazio E, Carpo M, Hirata K. Antibodies to GM1(NeuGc) in Guillain-Barre syndrome after ganglioside therapy. *Journal of the neurological sciences*. 2000 Apr 15;175(2):96-106.

- [119] Yuki N, Yamada M, Koga M, Odaka M, Susuki K, Tagawa Y, et al. Animal model of axonal Guillain-Barre syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside. *Annals of neurology*. 2001 Jun;49(6):712-20.
- [120] Persson-Sjogren S, Holmberg D, Forsgren S. Remodeling of the innervation of pancreatic islets accompanies insulitis preceding onset of diabetes in the NOD mouse. *Journal of neuroimmunology*. 2005 Jan;158(1-2):128-37.
- [121] Mallei A, Rabin SJ, Mocchetti I. Autocrine regulation of nerve growth factor expression by Trk receptors. *Journal of neurochemistry*. 2004 Sep;90(5):1085-93.
- [122] Duchemin AM, Neff NH, Hadjiconstantinou M. GM1 increases the content and mRNA of NGF in the brain of aged rats. *Neuroreport*. 1997 Dec 1;8(17):3823-7.
- [123] Nishio M, Fukumoto S, Furukawa K, Ichimura A, Miyazaki H, Kusunoki S, et al. Overexpressed GM1 suppresses nerve growth factor (NGF) signals by modulating the intracellular localization of NGF receptors and membrane fluidity in PC12 cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Aug 6;279(32):33368-78.
- [124] Farooqui T, Franklin T, Pearl DK, Yates AJ. Ganglioside GM1 enhances induction by nerve growth factor of a putative dimer of TrkA. *Journal of neurochemistry*. 1997 Jun;68(6):2348-55.