PRISCILA PEREZ DOMINGOS

COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DO GANGLIOSÍDEO GM1 E DO FATOR DE CRESCIMENTO NEURAL (NGF) SOBRE A EXPRESSÃO DE RECEPTOR DE ALTA AFINIDADE PARA NGF, TrkA E INSULINA EM ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS DE CAMUNDONGOS NOD (diabético não obeso)

CAMPINAS Unicamp 2008

i

PRISCILA PEREZ DOMINGOS

COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DO GANGLIOSÍDEO GM1 E DO FATOR DE CRESCIMENTO NEURAL (NGF) SOBRE A EXPRESSÃO DE RECEPTOR DE ALTA AFINIDADE PARA NGF, TrkA E INSULINA EM ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS DE CAMUNDONGOS NOD (diabético não obeso)

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

CAMPINAS Unicamp 2008

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

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

		Domingos, Priscila Perez
	D713c	Comparação dos efeitos do gangliosídeo GM1 e do fator de crescimento neural (NGF) sobre a expressão de receptor de alta afinidade para NGF, TrKA e insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos NOD / Priscila Perez Domingos. Campinas, SP: [s.n.], 2008.
		Orientador: Ricardo de Lima Zollner Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
		 Diabetes Mellitus tipo 1. 2. Citocinas. 3. Gangliosidose GM1. Ilhotas pancreáticas. 5. Fator de Crescimento Neural. 6. Receptor de trkA. 7. Camundongos NOD. I. Zollner, Ricardo de Lima. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Comparison of the effect of ganglioside GM1 and the Nerve Growth Factor (NGF) on the expression of receiver of high affinity for NGF, TrkA and Insulin in isolated pancreatic islets of NOD mice (non obese diabetic)

Keywords: • Diabetes Mellitus, Type 1

- Cytokines
- Gangliosidosis, GM1
- Islets of Langerhans
- NGF
- TrkA Receptor
- NOD Mice

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

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Profa. Dra. Gláucia Monteiro de Castro

Profa. Dra. Paulina Sannomiya

Profa. Dra. Denise Engelbrecht Zantut-Wittmann

Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad

Data da defesa: 29-02 - 2008

Banca Examinadora da TESE DE DOUTORADO

Orientador(a): PROF.(a) DR. (a) RICARDO DE LIMA ZOLLNER

Mei	mbros:	\cap	
	1 D (Y-)	the hold lip	
	1. Prof(a)	. Dr(a). Glaucia Monteiro de Castro	
:	2. Prof(a)	Dr(a). Paulina Sannomiya Cafe tura Cambry	
1	3. Prof(a)	. Dr(a). Mário José Abdalla Saad	
4	4. Prof(a)	Dr(a). Denise Engelbrecht Zantut-Wittmann	
1	5. Prof(a)	. Dr(a). Ricardo de Lima Zollner	

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

Data: 29/02/2008

Aos meus pais Jesus e Regina, sem eles eu nada seria.

> Aos meus irmãos Cristiane e Heriston e Ana Claudia e sobrinhos Felipe, Gustavo, Bruno e Tiago.

Minha querida família, meu maior tesouro, que sempre acreditaram na capacidade de realização de um sonho.

Agradecimento Especial

Ao

Professor Dr. Ricardo de Lima Zollner, "Ricardo", o meu muito obrigada, pela orientação segura e sincera, pela convivência harmoniosa na qual pude expor minhas idéias, pelos constantes incentivos nos momentos difíceis do doutorado e por, principalmente, ter confiado em mim.

Aos amigos do LIAE

Conceição, Margarida (Meg), Karla, Giovanna, Mariana, Fernanda, Natália, Bruna, Rika, Bruna Gontijo, Carina, Rhubia, Ana Paula, Gláucia, Maira, Leonardo, Fabíola, Thiago, Ivone; que no decorrer de todos estes anos de aprendizado, cada um com seu jeito de ser, deixaram registrado a simples e indispensável referência de amizade. À Deus, por iluminar sempre o meu caminho e minhas decisões.

A minha querida amiga Graziela Lago dos Reis pela enorme boa vontade, pelo apoio e sugestões na correção do manuscrito.

A Renata Maia, Cristiane e Roberto CPG/FCM pelo carinho, paciência e apoio.

Ao professor Dr. Lício Augusto Velloso e toda sua equipe pelo uso do microscópio de fluorescência em seu laboratório.

Ao professor Dr. Mário José Abdalla Saad e sua equipe pela acolhida durante os experimentos.

Aos colegas do laboratório de Nefrologia; Patrícia e Sohemis pelo apoio e amizade em todos estes anos.

Ao CEMIB/Unicamp pelo cuidado, dedicação e carinho com nossos animais.

A todos os funcionários e amigos que contribuíram direta ou indiretamente para a obtenção deste trabalho.

A TRB Pharma pelo fornecimento do gangliosídeo GM1 utilizado em nossos experimentos.

Ao CAPES pelo apoio financeiro à pesquisa.

A todos os meus AMIGOS de Poços de Caldas e de Campinas pela paciência, compreensão, apoio, carinho e admiração.

A vocês todos que fazem parte da minha estória; o meu muito obrigada!

xiii

O estudo e o trabalho que é feito com dedicação, amor e incentivo de muitos amigos é mais que sagrado!

	Pág.
RESUMO	xxvii
ABSTRACT	xxi
1- INTRODUÇÃO	
Diabetes Mellitus	37
A linhagem de camundongos NOD (Non Obese Diabetic)	38
Citocinas	40
Gangliosídeos	43
Gangliosídeos e seu potencial imunomodulador	44
Neurotrofinas	46
Gangliosídeo GM1	49
2- OBJETIVOS	53
3- MATERIAL E MÉTODOS	57
Animais	60
Diagnóstico e acompanhamento do diabetes mellitus	60
Grupos experimentais, sacrifício e coleta de órgãos dos animais	60
Isolamento de ilhotas pancreáticas	61
Estaurosporina	61
Cultura de ilhotas pancreáticas	61
Extração de RNA TOTAL (RNAT)	63
Transcrição reversa do RNA TOTAL extraído (CDNA)	64
Amplificação de CDNA por reação de polimerase em cadeia (PCR)	64
Análise dos produtos (PCR) por eletroforese em gel de agarose	65

ELISA - Citocinas	65
IL-12, IFN-γ e IL-1β	65
TNF-α	66
Insulina	67
Imunofluorescência	68
TRKA E NGF	68
Isolamento de anticorpos específicos Anti-GM1	68
Identificação dos soros	69
Imunofluorescência - GM1	70
Análise estatística	71
Formatação do texto	71
4- RESULTADOS	73
Efeito do peso e da glicemia em NOD não diabéticos e pré-diabéticos	75
Avaliação da expressão gênica de ilhotas pancreáticas	77
Avaliação do tratamento sobre a expressão gênica de NGF	78
Avaliação do tratamento sobre a expressão gênica de TRKA	82
Avaliação do tratamento sobre a expressão gênica de Pró-Insulina-1	86
Avaliação da concentração das citocinas em sobrenadante de ilhotas	
pancreáticas	89
Avaliação do tratamento sobre A Concentração da Citocina IL-1β	90
Avaliação do tratamento sobre A Concentração da Citocina IL-12	94
Avaliação do tratamento sobre A Concentração da Citocina IFN-γ	98
Avaliação do tratamento sobre A Concentração da Citocina TNF-α	102
Avaliação do tratamento sobre A Concentração de Insulina	106
Imunofenotipificação	109
5- DISCUSSÃO	123
6- CONCLUSÃO	133
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

- APC Células apresentadoras de antígeno
- **BB** Ratos "Bio Breeding"
- **BDNF** Fator neurotrófico derivado do cérebro (Brain derived neurotrophic factor)
- **BSA** Albumina sérica bovina
- **CD** Cluster designation
- cDNA DNA complementar
- **CEMIB** Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica
- **CFA** Adjuvante completo de Freund
- CLT Linfócito T citotóxico
- CYC Ciclofilina (Cyclophilin)
- **DEPC** Dietilpirocarbonato
- **DM-1** *Diabetes mellitus* tipo 1
- **DM-2** *Diabetes mellitus* tipo 2
- **DNA** Ácido desoxiribonucleico
- dNTP Desoxiribonucleotídeo tri-fosfato
- Fas-L Fas-ligante
- GABA Ácido aminobutírico gama
- GAD Glutamato descarboxilase
- **GFAP** Proteína acídica glial fibrilar (Glial fibrilary acidic protein)
- GM1 Monossialotetraexosilgangliosídeo

ICA	Anticorpos anti-ilhota (Islet cells antibodies)
IFN-γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina-1
IgG	Imunoglobulina G
LIAE	Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
NGF	Fator de crescimento neural (Nerve growth factor)
NK	Linfócito Naturalmente Citotóxico (Natural killer)
ND	Não diabético
NOD	Diabético não obeso (Non Obese Diabetic)
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4/5	Neurotrofina 4/5
PBS	Salina fosfatada tamponada
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PD	Pré-diabético
РТК	Proteína quinase
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RNAT	Ácido ribonucléico total
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa

- Stat Fator de transcrição (Signal transducers and activators of transcription)
- **SBF** Soro fetal bovino
- **SPF** Livre de patógeno específico (Specific pathogen free)
- **TGF-** β Fator de transformação de crescimento β (Transforming growth factor β)
- Th Linfócito T auxiliar (T helper lymphocyte)
- Th1 Linfócito T auxiliar-1 (T helper-1 lymphocyte)
- Th2 Linfócito T auxiliar-2 (T helper -2 lymphocyte)
- **TNF-** α Fator de necrose tumoral- α
- **TNF-R** Receptor de fator de necrose tumoral
- TrkA Receptor de Tirosina quinase A
- TrkB Receptor de Tirosina quinase B
- TrkC Receptor de Tirosina quinase C
- UA Unidades Arbitrárias

RESUMO

O camundongo não obeso diabético (NOD) é caracterizado por desenvolver naturalmente diabetes mellitus tipo 1 (DM-1) com similaridade ao diabetes mellitus tipo 1 em humanos. A manifestação espontânea do diabetes neste modelo animal é caracterizado por infiltração progressiva das ilhotas de Langerhans por células mononucleares linfócitos T (CD4+ e CD8+) e destruição das células β pancreáticas produtoras de insulina. O fator de crescimento neural (NGF) e algumas citocinas estão associados a regeneração neural, além de atuarem sobre células do sistema imune. Em adição a estes efeitos, NGF age na liberação de insulina pelas células betas das ilhotas pancreáticas, tornando-se foco de interesse com relação as suas propriedades moduladoras no processo inflamatório na ilhota pancreática. O gangliosídeo GM1 liga-se ao receptor de alta afinidade (TrkA) do NGF-B, mimetizando seus efeitos. No presente trabalho, avaliamos a ação modulatória de GM1 e NGF em cultura de ilhotas pancreáticas, provenientes de camundongos NOD. Foram avaliados por meio de RT-PCR a expressão gênica de NGF-β, TrkA e insulina e, por ensaio imunoenzimático, a concentração de citocinas IL-1 β , IL-12, TNF- α , INF- γ e insulina. Nossos resultados sugerem ação moduladora similar entre GM1 e NGF sobre as ilhotas de NOD não diabéticos e pré-diabéticos. NGF e GM1 aumentam a expressão gênica de NGF e TrkA e diminuem a expressão gênica de insulina em NOD não diabéticos e pré-diabéticos. Além disso, aumentam a liberação de insulina e diminui a de citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-12, TNF- α , IFN- γ que caracterizam a resposta Th1.

ABSTRACT

The non-obese diabetic mice (NOD) lineage is characterized by developing type 1 diabetes mellitus (DM-1) naturally, bearing a similarity to DM-1 in human beings. The spontaneous manifestation of diabetes is characterized by gradual infiltration in pancreatic islets by mononuclear cells lymphocytes T (CD4+ and CD8+) and destruction of the β -cells producers of insulin. One consequence of this effect, is the release of neurotrophins trying modulate the insulin release by the β cells of pancreatic islets. Thus, the neurotrophins have been the focus of interest in the modulation of the inflammatory process in the pancreatic islets. The ganglioside GM1 binds to the high affinity receptor (TrkA) of the NGF- β , enhancing its effect. In the present work, we evaluate the immune modulation properties of GM1 and NGF in culture of pancreatic islets from NOD mice. The gene expression of NGF- β , TrkA and insulin for immune enzymatic assay, the concentration of cytokines IL-1 β , IL-12, TNF- α , IFN- γ and insulin were evaluated by RT-PCR and ELISA. Our results suggest similar modulation action between GM1 and NGF on islets of NOD non-diabetic and pre-diabetic. GM1 and NGF action increases the gene expression of NGF and TrkA and the decrease of insulin in mice NOD non-diabetic and pre-diabetic. Moreover, GM1 and NGF increase the insulin release and decrease inflammatory cytokines that characterize the Th1 reply.

1- INTRODUÇÃO

Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus é definido como uma doença metabólica de múltipla etiologia 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: autoimune e 1B: idiopático (DM-1), e tipo 2 (DM-2) [2].

O início do DM-1 autoimune 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 autoimune do DM-1 [5]. Os autores descrevem autoanticorpos circulantes, denominados anticorpos anticélula 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 autoimune, com seletiva destruição das células β das ilhotas pancreáticas e presença de clones autoreativos de linfócitos T, pode-se presumir que o processo autoimune seria decorrente de deficiência de linfócitos a determinados constituintes da célula. Entretanto, admite-se que outros mecanismos imunopatogênicos possam estar envolvidos, tornando seu entendimento complexo. Estudos do DM-1 autoimune em modelos animais experimentais, fortalecem a hipótese da ocorrência de desequilíbrio entre sub-populações e células T efetoras [7, 8].

DM-2 é a forma mais comum de diabetes e é caracterizada por alteração na ação e secreção de insulina, com uma maior contribuição para resistência a insulina. Esta forma de diabetes é freqüente em jovens e adultos, com predisposição genética, a maioria dos pacientes são obesos, com níveis de insulina e de glicose no sangue aumentados, assim a secreção de insulina é insuficiente para compensar a resistência à insulina. O risco de desenvolver DM-2 aumenta com a idade; obesidade, pré-disposição genética e pouca atividade física são as causas mais freqüentes desta doença[1]

A Linhagem de Camundongos NOD (Non Obese Diabetic)

A linhagem de camundongos NOD representa modelo experimental descrito por Makino *et al.* (1980) [9] que desenvolve espontaneamente diabetes mellitus tipo 1 (DM-1) semelhante àquele observado em humanos. A linhagem de camundongos NOD inicialmente desenvolvida no Japão foi estabelecida em diversos centros de pesquisa do mundo [10], após o cruzamento de uma sublinhagem 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 [9].

A colônia NOD/Shi demonstrou prevalência de diabetes entre 70-80% para fêmeas e 20% para machos. O DM-1 clínico desenvolve-se entre a 16^a e 24^a semanas de vida, mais freqüentemente nas fêmeas. A prevalência da doença varia nas diversas colônias, situando-se entre 50 e 90% nas fêmeas e 0 e 20% nos machos [10]. No Brasil, a primeira colônia de camundongos NOD foi introduzida e implantada por Pavin & Zollner (1994) [11] na Universidade Estadual de Campinas. Estes animais, provenientes do Hospital Necker (Paris, INSERM U-25-Necker) pertenciam à linhagem que apresentava DM-1 espontâneo em 55% das fêmeas e menos de 5% dos machos, ambos analisados com 25 semanas de idade. A colônia NOD estabelecida e mantida no centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) em condições livres de patógenos (SPF), apresenta prevalência de diabetes entre 70-90% nas fêmeas e de até 15% nos machos. Fatores ambientais como dieta e exposição a vírus têm sido considerados como causa das diferenças de incidência.

A infiltração progressiva de células inflamatórias nas ilhotas pancreáticas inicia-se com cerca de um mês de vida, sendo esta fase considerada como pré-diabética. No período pré-clínico podemos verificar a presença sérica de anticorpos anti-ilhota

pancreática e anti-insulina endógena; além de alterações metabólicas como a deterioração da fase rápida de secreção insulínica [12]. Os camundongos NOD apresentam outras manifestações autoimunes como sialite [13], anemia hemolítica [14], paratiroidite [15] e tiroidite [16, 17].

A manifestação espontânea do DM-1 neste modelo animal é caracterizada por dois períodos: o primeiro por infiltração progressiva das ilhotas de Langerhans por células mononucleares (inicialmente linfócitos T CD4+, e posteriormente linfócitos T CD8+), ou insulite, que se inicia ao redor da quarta semana de vida; a segunda é caracterizada pela destruição das células β produtoras de insulina e manifestação do diabetes [4]. Os linfócitos T demonstram ter papel crucial no aparecimento do diabetes [18], onde a ineficiência de eliminação de linfócitos reativos pode contribuir para o aparecimento das doenças autoimunes [19]. Importante mecanismo envolvido na regulação do repertório de células T é a morte por apoptose [19-21], a qual se caracteriza por série ordenada de eventos que ocorrem ao longo do tempo.

Além de linfócitos T subtipo Th1, que correspondem a maioria das células mononucleares infiltradas no interior das ilhotas pancreáticas; linfócitos B, macrófagos e células NK (natural killer) também estão presentes [22]. Embora a maioria das células infiltradas sejam linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ são também observados [22].

No camundongo NOD, durante o desenvolvimento da doença, linfócitos CD4+ e CD8+ exercem papel sinérgico, uma vez que o diabetes apenas se desenvolverá na presença de ambos os subtipos [22]. Portanto, linfócitos T CD4+ têm papel essencial, não somente no início da insulite, como também na progressão do diabetes, uma vez que sua eliminação através da utilização de anticorpos monoclonais anti-CD4+ pode suprimir a insulite e, consequentemente, o aparecimento do diabetes no camundongo NOD. Linfócitos CD4+ são predominantemente observados na fase precoce da infiltração (perinsular), onde são requeridos nos processos de expansão clonal por meio da produção de IL-2 e, dessa forma, aumentando a ativação de linfócitos T CD8+ [22]. A proporção de linfócitos CD8+ no infiltrado de população T cresce substancialmente com o tempo na destruição das células produtoras de insulina [23]. Entretanto, existem evidências do papel dos linfócitos linfócitos T CD4+ [24, 25]. Dentre os mecanismos de destruição das ilhotas pancreáticas está a capacidade dos linfócitos CD8+ realizarem funções citotóxicas através da utilização de grânulos de perfurinas e granzimas bem como indução de apoptose através da interação Fas/Fas-L [26-28].

No camundongo NOD e em humanos, vários autoantígenos foram estudados, mas somente o anticorpo anti-insulina (IAA) pode ser detectado com alta especificidade e sensibilidade em ambas as espécies [3]. Os linfócitos T autoreativos demonstram ter papel crucial no aparecimento do diabetes nesses animais [18] e a ineficiência de sua eliminação pode contribuir para a manifestação da doença. Assim, observou-se que a prevenção do DM espontâneo no camundongo NOD pode ser obtida através da timectomia neonatal. Além disso, em camundongos NOD/nude (atímicos), verifica-se redução da incidência de insulite sem manifestação do diabetes. Complementando essas observações, trabalhos prévios descreveram que a administração de imunossupressores com função direcionada preferencialmente para linfócitos T e administração de anticorpos anti-CD3+ [29] são capazes de suprimir a ocorrência do DM autoimune espontâneo [22, 30, 31].

Muitos estudos têm demonstrado que o DM-1 pode ser induzido através da transferência de células recém isoladas de baço de camundongos NOD diabéticos para camundongos NODs jovens não diabéticos, NODs irradiados e camundongos NOD-SCID, os quais não desenvolvem diabetes [22].

No conjunto, essas observações envolvendo a participação do linfócito T na insulite e na evolução do diabetes, têm reforçado direta ou indiretamente, a hipótese da etiologia autoimune. Contudo, apesar de experimentos envolvendo o camundongo NOD fornecerem evidências do papel chave de substâncias mediadoras da destruição das células β produzidas por linfócitos T CD4+ e CD8+, há presença de mecanismos efetores finais apoptóticos pelos quais essas células são destruídas.

Citocinas

A apresentação dos autoantígenos específicos das células β pancreáticas pelos macrófagos, e/ou células dendríticas, para os linfócitos T CD4+ em associação às moléculas de MHC de classe II é o primeiro passo para o desenvolvimento de auto-

imunidade no DM-1. Os macrófagos ativados secretam IL-12 que estimulam linfócitos T CD4+ tipo Th1 a secretarem IL-12 e IFN- γ . O IFN- γ , por sua vez, ativa outros macrófagos residuais a liberarem IL-1 β , TNF- α e radicais livres tóxicos para as células β [32].

A resposta imune é coordenada por linfócitos T auxiliares (Th-T *helper*) cujas funções diferem de acordo com o estímulo antigênico e condições do micro ambiente, no qual ocorre a resposta. Desta forma, os linfócitos Th são subdivididos nos fenótipos de resposta Th1, caracterizados pela expressão local de citocinas específicas como IL-2, IFN- γ e TNF- α . A resposta Th1, genericamente, manifesta-se nas doenças autoimunes mediando a inflamação através da resposta imune celular, representada pelos linfócitos T citotóxicos, "NK" e macrófagos. Por outro lado, o fenótipo Th-2 direciona resposta imune humoral com liberação local de citocinas do tipo IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 [32]. No contexto dos possíveis mecanismos envolvidos nas desordens autoimunes, o desequilíbrio entre as populações de células Th1 e Th2 com predominância do fenótipo Th1 parece ter substrato na fisiopatologia da quebra de tolerância e reações autoimune que ocorrem na linhagem de camundongos NOD.

O padrão de resposta observado em pacientes com DM-1, bem como camundongos NOD e ratos BB, são marcados pelo predomínio de citocinas características de resposta Th1 [32, 33]. Acredita-se ainda, que ocorra o envolvimento direto das células linfocitárias, designadas células efetoras, sobre as células β pancreáticas designadas células alvos, resultando na liberação de mediadores solúveis responsáveis pelo processo inflamatório local, contribuindo para a destruição das ilhotas [34].

No campo experimental, diversos autores têm estudado os efeitos *in vitro* de citocinas como IL-1 β , TNF- α , TNF- β e IFN- γ utilizando ilhotas isoladas de modelos animais. Nas ilhotas pancreáticas recém isoladas, os efeitos dessas citocinas têm sido amplamente estudados [32, 35] mostrando que são capazes de, isoladamente, inibir a liberação de insulina pelas ilhotas pancreáticas e, combinadas, de induzir a fragmentação do DNA e destruição das células β pancreáticas [32, 35, 36]. A simples presença da citocina na lesão da insulite não identifica seu papel na patogênese do DM-1, uma vez que esta pode ter função pró-inflamatória, ou mesmo antiinflamatória regulando, desta maneira, o processo inflamatório [32].

No camundongo NOD, a expressão de IFN- γ nas células infiltradas das ilhotas foi relacionada com a insulite destrutiva [35, 37]. Essa citocina, assim como TGF- β , estão aumentadas de forma consistente com o envelhecimento dos camundongos NOD sugerindo que a destruição da ilhota e a manifestação do DM-1 associam-se com o aumento da produção pelas células do infiltrado inflamatório [38].

O fator de transformação de crescimento β (TGF- β) é produzido por muitos tipos celulares, incluindo macrófagos e linfócitos ativados e possuem receptores em vários tipos celulares. Em humanos ocorre a expressão de pelo menos três formas de TGF- β 1, 2 e 3. São produtos de genes separados, entretanto, todas as três formas ligam-se a cinco tipos de receptores de superfície celular de alta afinidade. Experimentos em camundongos deficiente no gene (*knockout para TGF-\beta*) indicam que as três formas de TGF- β sâo essenciais para confirmar seu papel imunorregulador. Esta citocina possui efeito antiproliferativo em vários tipos celulares incluindo macrófagos, células endoteliais e linfócitos T e B. Além disso, suprime a produção da maioria das linfocinas e monocinas e reduz a expressão celular de proteínas MHC classe II e receptores de IL-1 [39]. Em estudos de tolerância oral com insulina visando o retardo e/ou a prevenção do diabetes em camundongos NOD a expressão de citocinas inibitórias, entre eles o TGF- β está aumentada, enquanto que a expressão das citocinas pró-inflamatórias estava diminuída [39].

Como referido anteriormente, uma variedade de mecanismos tem sido proposta para explicar os efeitos citotóxicos das citocinas nas ilhotas pancreáticas, os quais incluem a formação de óxido nítrico que é mediador citotóxico da ação dessas citocinas por induzir a lise das células das ilhotas precedendo a lesão do DNA e ocasionando a sua destruição [32, 35]. Sendo assim, pode-se sugerir que a destruição das células β ocorre por apoptose onde a fragmentação de DNA típica tem sido observada em ilhotas pancreáticas tratadas com a combinação de IL-1, TNF- α e IFN- γ [35].

Desta forma, de acordo com os dados experimentais expostos por esses autores, fica demonstrado que o controle da resposta imune é múltiplo e, provavelmente, depende da somatória de efeitos de várias citocinas que constituem um microambiente propício para a destruição das ilhotas pancreáticas.

Gangliosídeos

Os gangliosideos são glicoesfingolipídeos complexos, formados por cadeias de oligossacarídeos, contendo pelo menos um açúcar ácido ligado a ceramida (esfingosina + acil CoA). Estes glicoesfingolípides são moléculas anfipáticas componentes normais das membranas celulares. 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. Vários resíduos de ácido siálico são ligados à cadeia de carboidrato, sendo que o resíduo siálico predominante é o ácido N-acetilneuramínico, ácido siálico (NANA), que se encontra ionizado em pH 7,0 e apresenta carga negativa [40].

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

- -Monossialotetraexosilgangliosídeo contém duas unidades NANA, ligadas em posições diferentes (GD1a, GD1b).
- **-Trissialotetraexosilgangliosídeo** apresenta três unidades NANA, ligadas em posições diferentes (GT1b).
- **-Tetralotetraexosilgangliosídeo** apresenta quatro unidades NANA, ligada em posições diferentes (GQ).

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

Embora os gangliosídeos sejam encontrados principalmente na membrana plasmática, também tem localização intracelular onde estão parcialmente ligados às organelas responsáveis pelo tráfego intracelular e metabolismo. Os carboidratos geralmente presentes nos gangliosídeos são: Glicose, Galactose, N-acetilglicosamina ou N-acetl galactosamina e, em poucas estruturas, frutose [41, 42].

Atuam na proteção das membranas contra condições drásticas (pH baixo e presença de enzimas que degradam as células), alteração da concentração dos íons de Ca++ na superfície da célula e participação no processo de reconhecimento celular. Os gangliosídeos são considerados componentes importantes para diversos processos biológicos, participando da regulação, do reconhecimento e adesão intercelular, proliferação, morfogênese, diferenciação, neurogênese, apoptose e transformação oncogênica. Como receptor e co-receptor de várias substâncias bioativas como hormônios e citocinas, atuam na tradução de sinais para o meio intracelular [43].

Considerando os diferentes mecanismos pelos quais os gangliosídeos podem se associar às células, a alteração de seu perfil em um determinado tipo celular poderia resultar na modulação das propriedades de superfície, atividades enzimáticas e função de outros tipos celulares, os gangliosídeos podem ser considerados como um tipo de citocina [44].

Gangliosideos e seu potencial imunomodulador

Os gangliosídeos são glicoesfingolipídeos associados ao ácido siálico presentes na membrana plasmática de todas as células animais. Embora seu papel ainda não seja muito bem, conhecido, os gangliosídeos parecem desempenhar papel importante nas interações intercelulares [42]. Além disso, diversas condições patológicas, tais como câncer e esclerose múltipla, apresentam níveis séricos dos gangliosídeos significativamente aumentados [45].

Diversos autores, além de nossa própria experiência (comunicação pessoal), têm constatado a propriedade inibitória dos gangliosídeos sobre a proliferação e a atividade dos linfócitos T [45-47]. Particularmente, Merrit *et al.*,1984 [47] verificaram que os gangliosídeos foram capazes de inibir a proliferação de linfócitos T citotóxicos dependente de interleucina-2 *in vitro*. Offner *et al* (1987) [45], por sua vez mostraram que estas

moléculas induzem alterações na orientação molecular de CD4 presente dos linfócitos Th. Além disso, estes compostos atuam como receptores e co-receptores para muitos agentes bioativos como citocinas, hormônios, toxinas e vírus. Estão envolvidos ainda, na diferenciação e reconhecimento celular, na interação entre células e na regulação do crescimento [44].

Presentes em grandes quantidades nas células tumorais e no sistema nervoso, gangliosídeos estão associados à imunossupressão, observada nestes tecidos [48, 49]. Os gangliosídeos podem bloquear de forma seletiva a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN-y, TNF- α e IL-2 (Th1) e, desta forma inibir a proliferação de células T impedindo a entrada desta célula no ciclo celular. Citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e TGF- β podem ter sua síntese estimulada por estes compostos [50]. Bretzel *et al.*, (1990) [51] observaram que em ilhotas pancreáticas de ratos Lewis (RT1) isoladas e colocadas em cultura adicionadas de gangliosídeos e transplantadas em ratos BdII (RT1), apresentavam redução significativa do número de células que expressavam o Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe Ia (MHC Ia) sem alteração do número daquelas com expressão de MHC I. O tratamento prolongou o tempo de sobrevida das ilhotas transplantadas em 20% dos receptores.

A hipótese da modulação dos gangliosídeos no desenvolvimento do DM-1 recebeu subsídio importante com as evidências da natureza sialoglicoconjugado do antígeno alvo do anticorpo anticitoplasma da célula β das ilhotas pancreáticas (ICA) [52]. Embora, Colman *et al.* (1988) [53] verificaram que uma fração de monogangliosídeo extraído de pâncreas humano inibiu a ligação do ICA às células β em cortes de pâncreas, processados através de imunohistoquímica.

Ao analisarem o padrão de distribuição dos gangliosídeos no pâncreas humano, Dotta *et al* (1989) [54], verificaram que o gangliosídeo GM2-1 está expresso intensamente nas ilhotas pancreáticas analisadas em cortes de tecido pancreático humano e pouco abundante no restante do órgão. Posteriormente, Dotta *et al* (1992) [55] demonstraram, a partir de estudo comparativo entre a expressão de gangliosídeos em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD e camundongos C57BL/10 a expressão aumentada do gangliosídeo GM2-1 nas ilhotas daqueles animais. Além disso, observaram que a redução da quantidade dos gangliosídeos GM2-1 e GM3 estava associada tanto com o avanço da idade quanto com o início do diabetes nestes animais. Estes achados foram interpretados como evidência da participação do monosialogangliosídeo GM2-1 como antígeno alvo dos ICA.

Neurotrofinas

O Fator de Crescimento Neural (Nerve Growth Factor – NGF) faz parte de uma família de fatores de crescimento chamados de neurotrofinas com amplo espectro de atividades como a vasodilatação, motilidade intestinal e nocicepção. A diminuição da síntese de NGF no diabetes parece estar envolvida na patogênese da degeneração das fibras pequenas, que tem papel importante na sensação térmica e dolorosa [56].

O NGF foi o primeiro fator de crescimento descoberto a pelo menos 4 décadas, pertence a família de neurotrofinas que desempenham papel na diferenciação e sobrevivência de populações neuronais. NGF tem a capacidade de estimular uma variedade de células inflamatórias, podendo ser produzido por uma variedade de tipos de células estruturais e inflamatórias como neurônios, células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos, linfócitos B e T, eosinófilos, basófilos, monócitos/macrófagos e mastócitos [57]. É produzido por células de glândulas salivares, próstata e principalmente células do sistema nervoso. Promovem o crescimento, sobrevivência e propriedades funcionais das neurotrofinas como quimiotaxia, fagocitose e produção de superóxido, agindo como um fator de sobrevivência autócrina de memória para linfócitos B [58-60].

Estudos sobre células linfóides maduras revelaram que NGF exerce uma ação dose-dependente entre linfócitos B e T [61], o qual promove diferenciação de células B secretando imunoglobulina e induzindo a expressão de receptores de alta afinidade para IL-2 sobre células mononucleares sanguíneas humanas [62, 63]. Evidências adicionais têm como hipótese a relação entre NGF e células do sistema imune em que níveis alterados na concentração desta neurotrofina, associados com a síntese de citocinas, são característicos em doenças autoimune, como o diabetes mellitus [64, 65]. Estudos têm demonstrado que os níveis de circulação de NGF são afetados não apenas pela desregulação homeostática, mas pela idade, insulite e durante doenças alérgicas e autoimunes [66, 67].

A função e sobrevivência de células β pancreáticas geralmente dependem de nutrientes como a glicose e fatores de crescimento peptídico como o NGF, insulina e fator de crescimento semelhante a insulina -1 (IGF-1). A interação destes nutrientes e fatores de crescimento orienta sistemas de sinalização que promovem crescimento e proliferação das células β . Glicose é um dos estímulos para proliferação de células β , em que a sua concentração regula a expressão de mRNA de proteínas como receptores de fator de crescimento que são importantes para o desenvolvimento, inibição da apoptose e diferenciação de células β da ilhota pancreática [68].

Vidaltamayo *et al*, 2002 [69, 70], demonstraram que o tratamento de células β das ilhotas pancreáticas com NGF exerce efeitos tróficos em diferentes níveis fisiológicos, tanto no aumento de expressão de canais de Na+ e insulina, quanto na modulação póstradução, como observado com o fluxo de Ca⁺⁺. A exposição das ilhotas ao NGF- β leva a despolarização intensa e aumento nas taxas de secreção de insulina. A via de sinalização do receptor de insulina e receptor tirosina quinase (TrkA) tem sido demonstrado para promover proliferação e sobrevivência de neurônios e ilhotas pancreáticas [71]. A incubação de NGF em cultura de células de ilhotas inibiu a apoptose, a qual foi induzida por uma baixa concentração de glicose [57, 72].

Foi demonstrado que o NGF é produzido por fibroblastos, mastócitos e linfócitos [64]. Esta neurotrofina sintetiza e expressa também uma afinidade entre seus receptores NGFR (p75) e TrkA, demonstrando que a síntese e/ou utilização do NGF é regulada por mecanismos autócrinos e parácrinos [73]. NGF secretado pelas células β da ilhota pancreática é um regulador autócrino que preserva a biossíntese e a secreção de insulina. Estas observações talvez contribuam para um melhor entendimento da fisiopatologia do diabetes, no qual níveis séricos de insulina e NGF estão diminuídos [74].

Ilhotas pancreáticas expressam receptores funcionais de NGF que, ativadas pela neurotrofina, induzem modificações morfológicas e fisiológicas em células β pancreáticas, incluindo secreção de insulina [75]. A expressão de receptores de alta afinidade de NGF foi

demonstrado em ilhotas de ratos durante o período de vida fetal e adulta [76]. Esses efeitos funcionais nas células β pancreáticas são mediados pela ligação do NGF com receptores TrkA [77]. O crescimento celular é regulado pelo NGF e TrkA, sugerindo que este sistema tem um importante papel no desenvolvimento de células β [75]. Estes componentes ligamse a dois tipos de receptores: p75^{NGFR} que são sítios para todas neurotrofinas e TrkA, receptor tirosina quinase com ligação ao NGF. Existem dois receptores homólogos ao TrkA denominados TrkB, com ligação para BDNF (Fator neurotrófico derivado do cérebro), NT3 (Neurotrofina 3) e NT4 (Neurotrofina 4) e TrkC, com ligação especifica para NT3. Os receptores de neurotrofinas TrkB e TrkC são expressos em algumas linhas de células β , mas suas funções fisiológicas em células β , não estão bem esclarecidas [76, 78].

O primeiro passo na sinalização do NGF, essencial à promoção da sobrevivência neuronal envolve a interação com TrKA, um receptor tirosina quinase que sofre rápida ativação e autofosforilação em resposta à ligação do NGF [79]. A ativação da proteína tirosina quinase do receptor TrK é necessária para iniciar a via de transdução do sinal pelo qual o NGF impede a morte celular por apoptose.

Estudos, *in vitro*, indicaram que a síntese de NGF estão associados ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, particularmente interleucina-1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) [80]. Macrófagos têm papel importante na regulação da síntese de NGF, provavelmente através da ativação de IL-1 β . NGF é produzido por fibroblastos e linfócitos, estas células não apenas sintetizam NGF e TrkA, como expressam baixa afinidade por NGFR (p75), o qual é um receptor do fator de necrose tumoral (TNF) membro da família das citocinas [81]. Células β sintetizam NGF que por sua vez, ativa a via de sinalização do receptor de TrkA e p75^{NTR}, que representa um importante papel no diabetes mellitus tipo 1 e 2 [71].

O NGF age sobre a produção de IL-1 β nas células, a qual é desencadeada por atividade fagocítica e expressam receptores de alta afinidade para esta neurotrofina, sugerindo um papel ativador de células imune no processo de inflamação [82]. Estudos adicionais revelaram que a sinalização do NGF via receptor tirosina quinase A (TrkA) ativa TGF- β por meio dos receptores serina/treonina quinases, o qual inicia múltiplas vias de sinalização, a mais importante é a via Ras/Raf-MAPK [83, 84]. Aparentemente, GM1 mimetiza os efeitos do NGF por meio da interação com o receptor de alta afinidade para NGF, TrkA e ativação subseqüente de proteínas sinalizadoras específicas. O mecanismo exato utilizado pelo GM1 na estimulação de TrkA ainda não foi definido [85]. 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, consequentemente, a transdução do sinal [78]. Este tipo de interação e indução de fosforilação da tirosina por GM1 também explicaria a habilidade deste gangliosídeo em potencializar o efeito do NGF *in vitro* e *in vivo* [86, 87].

Rabin & Mocchetti, 1995 [78]; Rabin, Bachis & Mocchetti, 2002 [85], em estudos *in vitro*, empregando linhagem de fibroblasto NIH-3T3 que expressam diferentes receptores para neurotrofilinas (TrkA, TrkB, TrkC), estudaram a sua interação com ganglíosideo GM1 e demonstraram que este ganglíosideo ativa TrkA e TrkB e mais intensamente TrkC, através da liberação de neurotrofinas.

Gangliosídeo - 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 [88-91].

GM1, bem como alguns derivados de gangliosídeos, parece ser efetivo na redução da expressão de CD4 na superfície de células T de diferentes espécies. SAGGIORO *et al.*, (1993) [92] demonstraram que o GM1 mascara epítopos 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.*,1993 [93] 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 células neuronais em cultura, GM1 induz uma variedade de respostas características da neurotrofina NGF. In vivo, há evidências que este gangliosídeo, assim como o NGF, previne a apoptose de neurônios colinérgicos após dano cortical [87]. 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 [78].

Considerações a respeito do mecanismo de ação do GM1 administrado exogenamente, sugerem atuação na reprodução ou potencialização das ações dos fatores neurotróficos, destacando-se a prevenção da morte neuronal por apoptose. Estes efeitos reiteram a possibilidade de que o GM1 e os fatores neurotróficos possam afetar a sobrevivência neuronal através de um mecanismo comum, isto é, por compartilhar uma via de transdução.

A primeira demonstração de potencialização foi obtida com a linhagem celular de feocromocitoma de rato, PC12 (Ferrari et al.,1993 e 1995) [86, 94], na qual o GM1 potencializou o efeito do fator de crescimento neural (NGF). Batistatou & Greene,1991 [95] demonstraram que, GM1, assim como o NGF, promove a sobrevivência a longo prazo e previne a morte das células PC12. O gangliosídeo também inibe a fragmentação apoptótica do DNA que poderia ocorrer em tais condições. As ações rápidas e similares do GM1 e NGF de impedir a morte neuronal por apoptose levam a questionar se os dois agentes poderiam atuar, em alguns pontos, através de um mecanismo comum.

As observações reforçam a hipótese da participação dos ganglíosideos como imunomoduladores e fornecido suporte a investigação para empregá-los na terapêutica dos distúrbios imunológicos [46, 96]. Baseados nessa premissa Wilberz *et al* (1988) [97] trataram camundongos NOD com gangliosídeos objetivando o estudo e seu efeito sobre a incidência do diabetes mellitus nestes animais. Estes autores verificaram que a incidência da doença diminuiu significativamente nas fêmeas tratadas a partir da 4^a semana de vida e nos machos, embora o tratamento com gangliosídeo não tenha reduzido a ocorrência da perivasculite precursora da invasão das ilhotas de Langerhans pelas células inflamatórias.

Papaccio *et al*, (1993) [98, 99], estudando os efeitos da administração de mistura de gangliosídeos (GM1, GD1a, GD1b3, GT1b) no diabetes dos camundongos NOD tratadas a partir da 5^{a} até a 21^{a} semana de vida, verificaram diminuição nos níveis de glicemia retardando, assim, a instalação do diabetes clínico. Adicionalmente, constataram que este tratamento com gangliosídeos retarda a progressiva desorganização da cito-arquitetura das células β das ilhotas pancreáticas. Contudo, curiosamente, estes autores relataram não terem encontrado diferença significativa entre os animais tratados e os animais controle quanto ao aparecimento da insulite e da sua progressão. Alem disso, na opinião dos autores, os dados obtidos neste trabalho não seria suficientes para provar a eficácia da terapêutica dos gangliosídeos sobre a instalação e progresso do diabetes mellitus.

Por outro lado, nosso grupo vem obtendo resultados encorajadores que justificam a continuidade dos estudos dos prováveis mecanismos que envolvem propriedades modulatórias dos gangliosídeos não apenas na expressão do DM-1 (comunicação pessoal) como em outros modelos (Monteiro de Castro *et al*, 2004) [100]. Resultados preliminares obtidos em nosso laboratório têm mostrado que a administração de gangliosídeos (GM1, GD1a, GD1b3, GT1b) a partir da 4ª semana de vida em fêmeas NOD, apesar, da insulite progressiva do pâncreas endócrino, o animal permanece estável quanto a sua glicemia [100].



Figura 1- Vias de sinalização do NGF e GM1, através do receptor TrkA.

2- OBJETIVOS
Objetivo Geral

Avaliar se a ação imunomodulatória do gangliosídeo GM1 é similar ao de NGF em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos NOD não diabéticos e pré-diabéticos.

Objetivos específicos

Analisar:

- 1- A expressão gênica de NGF-β, seu receptor TrkA e pró-insulina-1 nas ilhotas pancreáticas isoladas, provenientes de camundongos NOD fêmeas de 4 semanas não diabéticas (glicemias entre 80 e 100mg/dL ou 5,52 mM); pré-diabéticas, à partir de 10 semanas de vida, (definidos como glicemia entre 100 e 150 mg/dL ou 8,28 mM), submetidas a cultura celular e tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e 100ug de NGF.
- 2- A concentração das citocinas IL-1β, IL-12, TNFα, IFN-γ e insulina em sobrenadantes de culturas de ilhotas pancreáticas isoladas, provenientes de camundongos NOD fêmeas de 4 semanas não diabéticas (glicemias entre 80 e 100mg/dL); pré-diabéticas, à partir de 10 semanas de vida, (definidos como glicemia entre 100 e 150 mg/dL), submetidas a cultura celular e tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e 100ug de NGF.
- 3- Imunofenotipificação (TrkA; NGF-β e GM1) das ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos NOD não diabéticos e pré-diabéticos, submetidas a cultura celular e tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e 100ug de NGF.

3- MATERIAL E MÉTODOS

Fluxograma do Protocolo Experimental



Animais

Os camundongos da linhagem NOD-UNI (Non Obese Diabetic) fêmeas eram adquiridos do CEMIB (Centro de Bioterismo da Unicamp) e mantidos em condições SPF de ambiente e alimentação.

Diagnóstico e acompanhamento do diabetes mellitus

Os camundongos NOD fêmea não diabéticos de 4 semanas de vida (glicemia entre 80 e 100 mg/dL ou 5,52mM) e pré-diabéticos, à partir de 12 semanas de vida (glicemia entre 100 e 150 mg/dL ou 8,28mM), tiveram glicosúrias avaliadas semanalmente (Glicofita, Lilly®), sendo o diagnóstico de diabetes mellitus estabelecido em duas glicosúrias positivas em dias consecutivos. Tal diagnóstico era confirmado pela determinação de glicemia (250 mg/dL ou 13,8mM) através de glicosímetro Prestige LX® (Home diagnostics, EUA).

Grupos experimentais, sacrifício e coleta de órgãos dos animais

- -Grupo1: Animais NOD fêmea não diabéticos com 4 semanas de vida e glicemia entre 80 e 100 mg/dL eram utilizados para extração de ilhotas pancreáticas. Fase em que a ilhota tem o mínimo de infiltrado e seguramente com glicemias normais para a linhagem.
- -Grupo2: Animais NOD fêmea pré-diabéticos com idades entre 12 a 18 semanas de vida, definidos por duas glicemias consecutivas, entre 100 e 150 mg/dL tiveram suas ilhotas pancreáticas extraídas.

Ao sacrifício, os animais eram anestesiados pela infusão intraperitoneal de 10 µl de solução de tiopental sódico a 10% para permitir punção intracardíaca objetivando a coleta e isolamento de ilhotas pancreáticas.

Isolamento de ilhotas pancreáticas

As ilhotas eram isoladas seguindo-se a técnica originalmente descrita por Moskalewski 1965, aplicada a pâncreas de murino por Lacy & Kostianovsky 1967, com algumas modificações introduzidas por Boschero, Delattre & Santos 1980 [101] e adaptações em nosso laboratório [33]. As ilhotas pancreáticas eram isoladas e separadas do tecido acinar pela digestão enzimática de solução de Hanks contendo colagenase 2mg/ml (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA.). O isolamento das ilhotas era realizado "manualmente" por aspiração do sedimento, com auxílio de pipeta Pasteur estirada, através de microscópico estereoscópico em solução de Hanks contendo 10mg/ml albumina em uma placa de Petri com fundo preto. As ilhotas eram coletadas e transferidas para outra placa de Petri com fundo preto contendo Hanks suplementado com 2,8mM de glicose e 3mg/ml de albumina. A partir desta solução "limpa" procedeu-se a uma nova coleta. Após teste de viabilidade celular através do método de exclusão de corante azul de Tripan (consideradas acima de 90% de viabilidade) as ilhotas eram transferidas para os procedimentos de cultura celular.

Estaurosporina (Inibidor de Tirosina Quinase)

As ilhotas coletadas após incubadas por 23h em meio de cultura, portanto, 1h antes de serem tratadas com NGF e/ou GM1 eram bloqueadas com 200nM de Estaurosporina (TOCRIS - USA) diluída em DMSO protegidas de luz. A estaurosporina era colocada em todos os poços da placa (incluindo o controle); após 1h de bloqueio as ilhotas (não os controles) eram então tratadas e após os tempos de tratamento as ilhotas eram levadas para os procedimentos de expressão gênica, ELISA e Imunofluorescência.

Cultura de ilhotas pancreáticas

As ilhotas pancreáticas obtidas após procedimento de extração eram cultivadas por 24 horas em meio RPMI-1640 (Invitrogen, EUA) contendo 8.0 mM de glicose e suplementado com 5% de soro bovino fetal (Heyclone,EUA), 200 unidades/ml de penicilina G, 200 µg/ml estreptomicina e 0,5 µg/ml de anfotericina B para recuperação. Após este período, as culturas eram tratadas conforme protocolo a seguir:

- -Grupo 1: 10 ilhotas pancreáticas extraídas de camundongos NOD (não diabéticos) de 4 a 6 semanas de vida, após teste de viabilidade por exclusão de corante (azul de Tripan) eram adicionadas as placas de culturas de 12 poços. Após 24 horas de cultura, cada um dos pocos contendo as ilhotas eram adicionados 25 uM e 60 μ M de GM1 (Monossialogangliosídeo sódico-Sygen®-TRB Pharma) individualmente, isto é, cada poco conterá ilhotas recebendo diferente tratamento de gangliosídeo e/ou 100ug de NGF (Chemicon - USA). A cultura controle era realizada apenas com meio de cultura na ausência dos gangliosídeos e NGF. Os tempos (estabelecidos previamente) para coleta de material após tratamento eram: 60 minutos, 90 minutos, 3 horas e 6 horas. Estes procedimentos eram realizados em triplicata.
- -Grupo 2: O Mesmo procedimento do grupo 1. Contudo, de ilhotas pancreáticas provenientes de animais considerados pré-diabéticos, entre a 12^ª e 18^ª semana de vida, (150mg/dL) de glicemia, com tempo de tratamento de 60 minutos, 90 minutos, 3 horas e 6 horas

-Grupo 3: 10 ilhotas pancreáticas extraídas de camundongos NOD (não diabéticos) de 4 a 6 semanas de vida, após teste de viabilidade por exclusão de corante (azul de Tripan) eram adicionadas as placas de culturas de 12 poços. Após 23 horas de cultura, cada um dos poços contendo as ilhotas eram bloqueadas com 100ug estaurosporina (TOCRIS -EUA) e após 1(uma)hora eram adicionados 25uM e 60 µM de GM1 (Monossialogangliosídeo sódico-Sygen®-TRB Pharma) individualmente, isto é, cada poco conterá ilhotas recebendo diferente tratamento de gangliosídeo e/ou 100ug de NGF (Chemicon - EUA). A cultura controle era realizada apenas com meio de cultura na ausência dos gangliosídeos e NGF. Os tempos (estabelecidos previamente) para coleta de material após tratamento eram: 60 minutos, 90 minutos, 3 horas e 6 horas. Estes procedimentos eram realizados em triplicata.

Estes protocolos disponibilizaram de material para ensaios de expressão gênica, para análise de ciclofilina, NGF-B, receptor TrkA e pró-insulina-1, ELISA e Imunofluorescência.

Extração de RNA TOTAL (TRNA) e avaliação semi-quantitativa de MRNA através de RT-PCR

Extração de RNA TOTAL (TRNA)

O RNA era extraído das culturas de ilhotas pancreáticas através do método do guanidina-tiocianato; [33, 102] e transcritos para DNA (cDNA). Eram utilizados para os procedimentos de extração de RNA total. Em resumo, o equivalente a 10 ilhotas (aproximadamente 1.8×10^4 células) eram transferidas para frascos plásticos de 1.5 ml (RNAse free) contendo solução de guanidina-tiocianato (Fluka), 2-mercaptoetanol (Sigma), citrato de sódio 25 mM, pH 7,0 (tampão de lise) e submetidas a homogeneizador de células. Após "liberação" do conteúdo celular, este homogeneizado era submetido à separação dos ácidos nucléicos das proteínas contaminantes por agitação em vórtex do lisado com igual volume de fenol-clorofórmio-isoamyl álcool (25-24-1) para formar uma emulsão e centrifugados a 10.000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. O nível aquoso superior era recuperado e a extração repetida com fenol-clorofórmio-isoamil álcool conforme necessário, até que não houvesse mais evidências de proteínas na interface. Com o objetivo de remover o fenol das preparações algumas extrações com clorofórmio-isoamil álcool (24:1) eram necessárias. O RNA da camada aquosa era precipitado overnight a -20° C pela adição de 2 volumes de etanol contendo 0,3M de acetato de sódio. O precipitado era novamente "limpo" e precipitado com 1 volume de isopropanol. O RNA era recuperado por centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos a 4º C. O precipitado de RNA era seco e novamente suspenso em 40 µl de água tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC). A integridade do RNA era verificada por corrida em eletroforese em gel de formaldeído e quantificada por leitura da densidade óptica a 260 e 280 nm em espectofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Device, Ca, EUA). O RNA era considerado de boa qualidade com a relação das leituras 260/280 entre 1,6 e 1,8. Todas as amostras de RNA total eram armazenadas a - 80° até o uso.

Transcrição Reversa do RNA total Extraído (cDNA)

cDNA eram sintetizados em volumes de reação de 25 µl de volumes contendo lug de RNA celular aquecidos a 65° C por 15 minutos e resfriados em gelo, 100 ng de oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., EUA), 0,5 mM dNTP (Pharmacia). Inibidores de Rnase em concentração final de 1 U/ul, Tris HCl 25 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, DTT 2,0 mM, MgCl₂ 5,0 mM mais 20,5 U de enzima transcriptase reversa. Após 60 minutos a 42° C seguidos por 30 minutos a 52° C, as amostras eram aquecidas a 95° C por 5 minutos e então rapidamente resfriadas em gelo e armazenadas a -20° C até o uso. Os cDNA eram co-amplificados com primers específicos para as citocinas estudadas e ciclofilina como controle interno de reação (house-keeping gene) realizada em tampão de PCR 1 X (Tris HCl 20 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM) suplementado com 50 mM dNTPs, 0,25 mM para cada primer 5'- e 3'específico, e 1,2 unidades de taq polimerase (termus aquaticus) em volume de reação de 50 µl. A mistura era coberta com 50 µl de óleo mineral (Sigma) e amplificada por "hotstart" a 94° C por 2 minutos e 38 ciclos seqüenciais a 60° C por 45 segundos, 72° C por 90 segundos, 95° C por 45 segundos em termociclador Peltier (Perkin Elmer 9700, EUA). Todos os reagentes PCR usados na reação eram testados para possíveis contaminações em reação prévia de 40 ciclos sem cDNA.

Amplificação de cDNA por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

Primers utilizados sense e anti-sense:

-NGF-β, receptor TrkA, pró-isulina e Ciclofilina (gen estrutural - *house keeping gene*) (Invitrogen - EUA) como expressão e controle do preparo de RNA total, transcrição reversa e PCR:

Tabela 1- Primers empregados nos procedimentos de RT-PCR semi-quantitativo paraexpressão gênica de NGF, TrkA, pró-insulina e Ciclofilina (gene estrutural)

Primer	Sense (5' – 3')	Anti-sense (5' – 3')	Produto
Ciclofilina	GACAGCAGAAAACTTTCGTGC	GGTTCTGACTCACCGACC T	276 pb
NGF	TGAAGCCCACTGGACTAAA	ACCTCCTTGCCCTTGATG	372 pb
TrkA	GGGGCTAACTCTGGTCAAT	AGGGTGTAGTTCCCG	345 pb
Pró-insulina-1	CCATCAGCAAGCTCATTGTTT	GCGGGACCTGGGTGTGTAGAAGAA	193 pb

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

As co-amplificações dos cDNA, utilizando-se os primers específicos para as citocinas relevantes, eram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% e revelados com brometo de etídio, através de excitação em UV e documentado através da captação das imagens dos géis através do sistema ImageQuant, GE Life Sciences, EUA. As intensidades das bandas eram analisadas com software ImageQuant® (GE technologies, EUA).

Para a semi-quantificação, as áreas de pixel determinadas pela intensidade de cada banda eram comparadas com as da ciclofilina. Os valores eram normalizados e transformados em Unidades arbitrárias (pixel index) através da seguinte fórmula:

Unidades arbitrárias = (pixel das citocinas / pixel da ciclofilina do respectivo grupo) x 100.

Determinação da concentração de citocinas no sobrenadante de cultura de ilhotas por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA)

IL-12, IFN-γ, IL-1β

As placas eram adsorvidas com anticorpo de captura específico para as citocinas IL-12, IFN- γ , IL-1 β e TGF- β (CytoSetTM – Biosource, EUA) na concentração de 1,25 μ g/ml, diluído em solução tampão carbonato-bicarbonato (p.H. 9.4) e incubadas por

18 horas em temperatura de 4°C. A seguir, as placas eram lavadas por 3 ciclos rápidos com solução salina e 0,1% de Tween 20 (Merck - Alemanha). Para bloqueio dos sítios inespecíficos utilizava-se solução de soro albumina bovina 1% em PBS (p.H. 7,4) (tampão de ensaio), por 2 horas em temperatura ambiente. Novamente as placas eram lavadas por 3 ciclos rápidos e 100 µl de amostras de sobrenadante de cultura de ilhotas tratadas com GM1 e/ou NGF diluídos 1:2 em tampão de ensaio era adicionado, e eram mantidas em câmara úmida por 90 minutos em temperatura ambiente, com exceção de IL-1β, incubada a 37°C. Após o processo de lavagem, era adicionado 100 µl de anticorpo de detecção biotinilado diluído 0,125 µg/ml em tampão de ensaio suplementado com 5% de soro bovino fetal para IL-12 e IFN-y, e a concentração utilizada era de 0,05 μg/ml para IL-1β, sendo que as placas permaneciam em câmara úmida por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida as lavagens, era adicionada solução de estreptavidina/peroxidase, na concentração de 0,3 µg/ml diluído em tampão de ensaio e então, mantidas por 45 minutos em temperatura ambiente protegida de luminosidade. Posterior às lavagens, a reação de cor era produzida pela adição de tetrametilbenzidina (TMB OptEIATM BD - Biosciences), sendo bloqueada após 30 minutos com H₂SO₄ 1N. Os valores de absorbância eram obtidos após leitura em 450nm utilizando espectrofotômetro Spectra Max 190 (Medical Device, EUA) e os cálculos eram realizados através do software SOFT MAX-PRO 3.0. Para cada experimento, era utilizada curva de referência, para determinação da concentração de citocina.

TNF-α

As placas eram adsorvidas com 100µl de anticorpo de captura específico para TNF- α (CytoSetTM – Biosource, EUA) na concentração de 1,25µg/ml, diluído em solução tampão carbonato-bicarbonato (p.H. 9.4) e incubadas por 18 horas a 4°C. A seguir, a solução de adsorção era aspirada e, para bloqueio dos sítios inespecíficos adicionava-se 300 µl de solução de soro albumina bovina 1% em PBS (p.H. 7,4) (tampão de ensaio), por 2 horas em temperatura ambiente. A seguir, as placas eram aspiradas e 100 µl de amostras de sobrenadante de cultura de ilhotas tratadas com GM1 e/ou NGF diluídos

1:2 em tampão de ensaio eram adicionados, e imediatamente, adicionava-se 50 μ l do anticorpo de detecção biotinilado na concentração de 0,05 μ g/ml em tampão de ensaio, sendo mantidas em câmara úmida por 2 horas em temperatura ambiente. Após 4 ciclos rápidos de lavagem com solução salina e 0,1% de Tween 20 (Merck-Alemanha), eram adicionados 100 μ l de anticorpo solução de estreptavidina/peroxidase, na concentração de 0,15 μ g/ml diluído em tampão de ensaio e então, as placas eram mantidas por 30 minutos em temperatura ambiente protegida de luminosidade. Posterior às lavagens, a reação de cor foi produzida pela adição de tetrametilbenzidina (TMB OptEIATM BD - Biosciences), sendo bloqueada após 20 minutos com H₂SO₄ 1N. Os valores de absorbância eram obtidos após leitura em 450nm utilizando espectrofotômetro Spectra Max 190 (Medical Device, EUA) e os cálculos eram realizados através do software SOFT MAX-PRO 3.0. Era utilizada curva de referência, para determinação da concentração da citocina em estudo.

Insulina

Este ELISA, tipo sanduíche era realizado conforme as instruções do fabricante (LINCO RESEARCH – Rat/mouse insulin Elisa kit, EUA). Após 3 lavagens com 300ul de 50nM Tris-salina com tween20 (TBS), eram adicionados 20ul das amostras de sobrenadante de cultura de ilhotas tratadas com GM1 e/ou NGF diluídas 1:1000 em PBS 0,05M com 1% de BSA (tampão de ensaio) e 80ul do anticorpo de detecção biotinilado anti-insulina, seguido por incubação de 2 horas. A seguir as placas eram lavadas 3 vezes e 100ul da solução de estreptoavidina conjugada a peroxidase eram adicionados. Após 30 minutos de incubação, as placas eram lavadas 6 vezes e a seguir, 100ul do substrato cromógeno (Tetrametilbenzidina) eram adicionados e mantidos por 15 minutos protegidos da luz. Em seguida, a reação era bloqueada com 100ul de HCL 0,3M. As leituras de absorbância eram obtidas em 450nm utilizando espectrofotômetro Spectramax 190 e os resultados calculados através do software Pro 3.0 a partir de curva de referência (0,2 – 10 ng/ml de insulina) realizada juntamente com o experimento.

Imunofluorescência

TrkA e NGF

A técnica empregada era de imunofluorescência indireta. As ilhotas coletadas após incubadas por 24H em meio de cultura e tratadas com GM1 e/ou NGF, eram lavadas três vezes em PBS (solução de salina fosfatada tamponada) e em seguida eram incubadas em 2,5% BSA V (albumina bovina fração V; GibcoBRL, EUA); 2% leite desnatado em pó e 8% SBF (soro fetal bovino HyClone - Utah, EUA) durante 20 minutos, para bloqueio de inespecíficos. Aproximadamente 50µl do anticorpo primário anti-NGF sítios (NGF_R p75 H-72), anti-TrkA (Santa Cruz Biotechnology, EUA) eram adicionados a cada poço da placa de cultura (diluição 1:100) e incubados por 60minutos, em temperatura ambiente, em câmara úmida, protegida contra luminosidade. Em seguida, as lâminas eram lavadas três vezes com PBS e 50µl do anticorpo secundário (5 µg/mL) conjugado com FITC anti-coelho IgG para NGF e TrkA (Vector Laboratories Inc., Califórnia, EUA). As ilhotas eram lavadas três vezes em PBS e montadas em lâminas, sendo observadas em microscópio Leica DM 4500B (Alemanha) e as imagens captadas através do software Leica FW4000.

As intensidades das bandas eram analisadas com o programa de computador Image G. As áreas de pixel eram determinadas pela intensidade de cada marcação e comparadas com as do controle. Os valores eram dados em unidades arbitrárias $(x10^6)$.

Isolamento de anticorpos específicos anti-GM1

Os soros utilizados para purificação de anticorpos anti-GM1 eram obtidos soros de pacientes diabéticos tipo1. Para a identificação de anticorpos anti-GM1, era utilizada a técnica de Elisa, a partir de protocolo preliminarmente padronizado no LIAE.

ELISA - Anticorpos anti-GM1

Placas de polietileno de fundo chato com 96 poços eram adsorvidas com 100 µl de GM1 na concentração de 50 µg/ml solubilizado em metanol e incubadas 16 horas à 4°C para evaporação do solvente. Após secagem completa, as placas eram lavadas 3 vezes com 0,05% de Tween 20 em PBS. Para bloqueio dos sítios inespecíficos era utilizada uma solução de leite em pó desnatado 3% em PBS pH 7,4; por 2 horas, em temperatura ambiente. As placas eram lavadas novamente por 3 vezes e, a seguir amostras de soro previamente diluídas 1:100 em PBS foram adicionadas aos poços e incubadas overnight em temperatura ambiente. Após lavagem, eram adicionados 100 μ l de anticorpo conjugado com peroxidase anti-IgG humana cadeia μ ou γ específico diluído 1:5000 em PBS e mantido por 90 minutos em temperatura ambiente. A placa era, então, lavada por 5 vezes, e a reação de cor, produzida pela adição de tetrametilbenzidina (TMB OptEIATM BD - Biosciences, EUA), durante 30 minutos, protegida de luminosidade, sendo bloqueada com H₂SO₄ 1N. Os valores de absorbância eram obtidos após leitura em 450nm utilizando espectrofotômetro Spectra Max 190 (Medical device, EUA). Os títulos dos anticorpos anti-GM1 eram tabelados, e as médias e os desvios padrão para cada grupo eram calculados e estabelecidos em Unidades Arbitrárias (UA)

Identificação dos soros

A partir das unidades arbitrárias, 3 intervalos para agrupar os soros contendo anticorpos anti-GM1 eram estabelecidos. O limite inferior das faixas estabelecidas (A) era calculado à partir da média mais 2 desvios padrão das unidades arbitrárias de anticorpo anti-GM1 obtidas à partir de soro de pacientes diabéticos tipo 1, indivíduos sadios controles, sendo então, estabelecidas as faixas intermediária (B) a elevada (C).

A- 0,2-0,4

B- 0,401- 0,6

C->0,6

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

Separação dos anticorpos anti-GM1 por meio de DEAE-sephadex A-25.

Para isolar os anticorpos anti-GM1 era utilizada resina de cromatografia DEAE-Sephadex A-25 [103]. Adicionava-se 50mg de DEAE- Sephadex A-25 sem tratamento adicional a 70 mg de GM1, mantendo-se a suspensão sob agitação magnética suave, durante 2 horas e meia, em temperatura ambiente. Após este período, eram realizadas 3 lavagens com 1ml de metanol-água 1:1 e outras 3 lavagens com solução de lavagem, contendo 0,1M Tris-HCL, 0,1M NaCl, 0,01M EDTA, pH 7.3. A suspensão era mantida durante a noite à 4° C. No dia seguinte, eram adicionadas as alíquotas dos 10 soros selecionados (faixa de concentração C) diluídos 1:100 (v/v) em volume final de 500 µl de Tris, adicionando-se a seguir 100 µl do DEAE- GM1 e 2400 µl de Tris, completando 3ml. Esta preparação era submetida à agitação magnética suave durante 60 minutos e à centrifugação por 5 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante era excluído e o pellet, lavado 2 vezes com 1 ml de solução de lavagem. Era então feita a eluição dos anticorpos anti-GM1, adicionando ao pellet 1ml de glicina-HCl 0,2M, pH 2,8. Após 3 minutos de agitação suave, procedia-se a centrifugação como descrito anteriormente. O sobrenadante era imediatamente neutralizado com NaOH 0,1N e o título dos anticorpos estimado por meio de leitura espectrofotométrica em 280 nm em relação ao coeficiente de extinção da IgG ($\Sigma^{1\%}_{280}$)=13.6.

Imunofluorescência - GM1

Para observação dos sítios de ligação do gangliosídeo GM1, empregava-se a técnica de imunofluorescência indireta. As ilhotas coletadas após incubadas por 24H em meio de cultura e tratadas com GM1 e/ou NGF, eram lavadas três vezes em PBS (solução de salina fosfatada tamponada) e em seguida foram incubadas em 2,5% BSA V (albumina bovina fração V; GibcoBRL, EUA); 2% leite desnatado em pó e 8% SFB (soro fetal bovino HyClone – Utah, EUA) durante 20 minutos, para bloqueio de sítios inespecíficos. aproximadamente 50 µl do anticorpo primário anti-GM1 ((provenientes de soros de pacientes diabéticos tipo 1)) eram adicionados a cada poço da placa de cultura (diluição 1:100) e incubados por 60minutos, em temperatura ambiente, em câmara úmida, protegida contra luminosidade. Em seguida, as lâminas eram lavadas três vezes com PBS e

 50μ l do anticorpo secundário conjugado com Texas Red[®] IgG anti-camundongo (Vector Laboratories Inc., Califórnia, EUA), na concentração de 5 µg/ml, mantendo-se por 45 minutos 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.

As intensidades das bandas eram analisadas com o programa de computador Image G. As áreas de pixel eram determinadas pela intensidade de cada marcação e comparadas com as do controle. Os valores eram dados em unidades arbitrárias $(x10^6)$.

Análise estatística

Os dados eram analisados com média e desvio padrão, usando o teste ANOVA, teste Mann-Whitney (teste não paramétrico) e valores com *p<0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

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

Efeito do peso e da glicemia em relação aos grupos de animais NOD não diabéticos e grupos de animais NOD pré-diabéticos

O efeito do peso de camundongos NOD não diabéticos e pré-diabéticos foi proporcional nos dois grupos em semanas de vida e em relação a glicemia destes animais, mesmo tendo a glicemia aumentada no caso de animais pré-diabéticos, o peso permaneceu constante neste grupo. O efeito da glicemia de camundongos não diabéticos de 4 a 6 semanas de vida apresentaram valores abaixo de 100mg/dL, em comparação ao grupo de animais NOD pré-diabéticos de 10 a 12 semanas de vida, o qual observou-se aumento de valores, acima de 100mg/dL. Os animais NOD com glicemia acima de 100mg/dL até 150mg/dL foram usados como grupos pré-diabéticos, após completarem 150mg/dL, pois observamos que na próxima verificação de glicemia os animais apresentavam glicemias acima de 250mg/dL, já considerados diabéticos e fora do grupo de pesquisa.





Figura 2- Gráficos representativos dos pesos dos grupos de animais (n=6 para cada grupo). Os valores dos pesos de NOD não diabéticos com os pesos de NOD pré-diabéticos foram proporcionais em cada grupo e os valores dos pesos de NOD não diabéticos foi proporcional, comparados com os valores dos pesos de NOD pré-diabéticos.

Glicemias:



Figura 2a- Gráficos representando níveis glicêmicos dos grupos de animais (n=6 para cada grupo). A glicemia obtidas nos grupos de animais não diabéticos apresentaram valores abaixo de 100mg/dL, enquanto que a glicemia obtidas nos grupos de animais pré-diabéticos apresentaram valores acima de 100mg/dL

Avaliação da expressão gênica em ilhotas pancreáticas

Para avaliarmos o efeito do tratamento com o gangliosídeo GM1 e do tratamento com NGF em ilhotas isoladas de camundongos NOD não diabéticos de 4 semanas de vida (glicemias entre 80 de 100mg/dL); pré-diabéticos a partir de 12 semanas de vida (glicemias entre 100 e 150mg/dL) e de culturas de ilhotas pancreáticas de camundongos NOD não diabéticos, incubadas com estaurosporina (incluindo os controles) 1(uma) hora antes de receberem os tratamentos com GM1 e NGF, procedemos a detecção da expressão gênica (mRNA) de NGF, TrkA e pró-insulina-1, pelo método de PCR. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão (* p<0,05 – Mann-Whitney) e apresentados a seguir:

Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05 – Mann-Whitney).

Avaliação do tratamento com o gangliosídeo GM1 25uM, GM1 60uM e NGF sobre a expressão gênica de NGF em ilhotas isoladas de camundongos NOD

- Figura 3- Gráficos representativos da expressão gênica de NGF em ilhotas pancreáticas de NOD não diabéticos (n=6 para cada grupo), tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF. Observou-se aumento da expressão de NGF no período de 90 minutos em culturas tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF, enquanto que em 3 horas houve aumento da expressão de NGF em culturas tratadas com GM1 25uM e NGF.
- Figura 3a- Gráficos representativos da expressão gênica de NGF em ilhotas pancreáticas de NOD pré-diabéticos (n=5 para cada grupo), tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF. Observou-se que não houve diferença significativa na expressão de NGF em ilhotas tratadas com GM1 25uM; em culturas tratadas com GM1 60uM os níveis de NGF estavam aumentados em 90 minutos de tratamento; enquanto que em culturas tratadas com NGF houve aumento da expressão no período de 60 minutos.
- Figura 3b- Gráficos representativos da expressão gênica de NGF em ilhotas pancreáticas de NOD não diabéticos com adição de estaurosporina em cultura (n=5 para cada grupo), tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF. Observou-se aumento da expressão de NGF à partir de 30minutos em culturas tratadas com GM1 60uM; em culturas tratadas com GM1 25uM e NGF não houve diferença significativa da expressão de NGF.

Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05 - Mann-Whitney).







Figura 3a





Tratamento	Controle	60 min	Controle	90 min	Controle	3Horas	Controle	6Horas
GM1 25uM	70 <u>+</u> 14	74 <u>+</u> 9	74 <u>+</u> 24	131 <u>+</u> 7*	71 <u>+</u> 20	167 <u>+</u> 11*	73 <u>+</u> 20	103 <u>+</u> 7
Pré-Diabético	61 <u>+</u> 11	66 <u>+</u> 7	63 <u>+</u> 17	82 <u>+</u> 5	62 <u>+</u> 18	75 <u>+</u> 5	61 <u>+</u> 16	76 <u>+</u> 8
GM1 60uM	70 <u>+</u> 14	67 <u>+</u> 4	74 <u>+</u> 24	127 <u>+</u> 13*	71 <u>+</u> 20	69 <u>+</u> 5	73 <u>+</u> 20	47 <u>+</u> 6
Pré-Diabético	61 <u>+</u> 11	62 <u>+</u> 2	63 <u>+</u> 17	257 <u>+</u> 8*	62 <u>+</u> 18	110 <u>+</u> 9	61 <u>+</u> 16	58 <u>+</u> 4
NGF	70 <u>+</u> 14	67 <u>+</u> 1	74 <u>+</u> 24	127 <u>+</u> 2*	71 <u>+</u> 20	162 <u>+</u> 2*	73 <u>+</u> 20	104 <u>+</u> 3
Pré-Diabético	61 <u>+</u> 11	156 <u>+</u> 2*	63 <u>+</u> 17	97 <u>+</u> 3	62 <u>+</u> 18	92 <u>+</u> 3	61 <u>+</u> 16	95 <u>+</u> 3
<u>Estaurosporina</u>	Controle	30 min	Controle	60 min	Controle	90 min	Controle	3Horas
GM1 25uM	71 <u>+</u> 26	75 <u>+</u> 2	71 <u>+</u> 24	66 <u>+</u> 7	68 <u>+</u> 20	53 <u>+</u> 6	68 <u>+</u> 20	42 <u>+</u> 3
GM1 60uM	71 <u>+</u> 26	191 <u>+</u> 4*	71 <u>+</u> 24	150 <u>+</u> 6*	68 <u>+</u> 20	326 <u>+</u> 4*	68 <u>+</u> 20	170 <u>+</u> 6*
NGF	71 <u>+</u> 26	122 <u>+</u> 5	71 <u>+</u> 24	98 <u>+</u> 10	68 <u>+</u> 20	45 <u>+</u> 3	68 <u>+</u> 20	66 <u>+</u> 5

Tabela 2- Dados da expressão gênica de NGF em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos NOD. Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05 – Mann-Whitney)</p>

Avaliação do tratamento com o gangliosídeo GM1 25uM, GM1 60uM e NGF sobre a expressão gênica de TrkA em ilhotas isoladas de camundongos NOD

- Figura 4- Gráficos representativos da expressão gênica de TrkA em ilhotas pancreáticas de NOD não diabéticos (n=6 para cada grupo), tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF. Observou-se diminuição da expressão nos períodos de 90 minutos e 6 horas e aumento em 3 horas em culturas tratadas com GM1 25uM e em culturas tratadas com GM1 60uM e NGF a expressão de TrkA estava diminuída à partir de 60 minutos de tratamento.
- Figura 4a- Gráficos representativos da expressão gênica de TrkA em ilhotas pancreáticas de NOD pré-diabéticos (n=5 para cada grupo). Observou-se que em culturas tratadas com GM1 25uM não houve diferença significativa na expressão de TrkA; houve aumento da expressão no período de 60 minutos e diminuição da expressão no período de 6 horas em culturas tratadas com GM1 60uM, enquanto que em culturas tratadas com NGF pode-se observar aumento na expressão de TrkA à partir de 90 minutos de tratamento em relação ao controle.
- Figura 4b- Gráficos representativos da expressão gênica de TrkA em ilhotas pancreáticas de NOD não diabéticos com adição de estaurosporina em cultura (n=5 para cada grupo).Observou-se diminuição na expressão de TrkA no período de 30 e 90 minutos e 3 horas em culturas tratadas com GM1 25uM; em culturas tratadas com GM1 60uM ocorreu aumento da expressão em 30 minutos, enquanto que o tratamento com NGF promoveu diminuição significativa na expressão à partir de 90 minutos de tratamento.

Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05 – Mann-Whitney).











Tratamento	Controle	60 min	Controle	90 min	Controle	3Horas	Controle	6Horas
11000000	controle		controne	<i>,</i> , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	001101010	U IIUI US	00111010	01101105
GM1 25uM	70 <u>+</u> 14	107 <u>+</u> 5	74 <u>+</u> 24	48 <u>+</u> 2*	71 <u>+</u> 20	123 <u>+</u> 8*	73 <u>+</u> 20	32 <u>+</u> 9*
Pré-Diabético	61 <u>+</u> 11	39 <u>+</u> 2	63 <u>+</u> 17	32 <u>+</u> 5	62 <u>+</u> 18	73 <u>+</u> 1	61 <u>+</u> 16	56 <u>+</u> 3
GM1 60uM	70 <u>+</u> 14	7 <u>+</u> 2*	74 <u>+</u> 24	6 <u>+</u> 1*	71 <u>+</u> 20	11 <u>+</u> 1*	73 <u>+</u> 20	37 <u>+</u> 6*
Pré-Diabético	61 <u>+</u> 11	119 <u>+</u> 4*	63 <u>+</u> 17	59 <u>+</u> 4	62 <u>+</u> 18	47 <u>+</u> 7	61 <u>+</u> 16	22 <u>+</u> 2*
NGF	70 <u>+</u> 14	38 <u>+</u> 3	74 <u>+</u> 24	41 <u>+</u> 1*	71 <u>+</u> 2 0	65 <u>+</u> 3	73 <u>+</u> 20	77 <u>+</u> 3
Pré-Diabético	61 <u>+</u> 11	45 <u>+</u> 4	63 <u>+</u> 17	109 <u>+</u> 5*	62 <u>+</u> 18	120 <u>+</u> 4*	61 <u>+</u> 16	106 <u>+</u> 4*
<u>Estaurosporina</u>	Controle	30 min	Controle	60 min	Controle	90 min	Controle	3Horas
GM1 25uM	71 <u>+</u> 26	29 <u>+</u> 5*	71 <u>+</u> 24	49 <u>+</u> 3	68 <u>+</u> 20	36 <u>+</u> 1*	68 <u>+</u> 20	17 <u>+</u> 1*
GM1 60uM	71 <u>+</u> 26	180 <u>+</u> 7*	71 <u>+</u> 24	67 <u>+</u> 5	68 <u>+</u> 20	68 <u>+</u> 5	68 <u>+</u> 20	44 <u>+</u> 8
NGF	71 <u>+</u> 26	61 <u>+</u> 4	71 <u>+</u> 24	52 <u>+</u> 3	68 <u>+</u> 20	20 <u>+</u> 4*	68 <u>+</u> 20	23 <u>+</u> 2*

Tabela 3- Dados da expressão gênica de TrkA em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos NOD. Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05 – Mann-Whitney)</p>

Avaliação do tratamento com o gangliosídeo GM1 25uM, GM1 60uM e NGF sobre a expressão gênica de pró-insulina-1 em ilhotas isoladas de camundongos NOD

- Figura 5- Gráficos representativos da expressão gênica de pró-insulina-1 em ilhotas pancreáticas de NOD não diabéticos (n=6 para cada grupo), tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF. Observou-se diminuição significativa da expressão de pró-insulina-1 à partir de 60 minutos em culturas tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF.
- **Figura 5a-** Gráficos representativos da expressão gênica de pró-insulina-1 em ilhotas pancreáticas de NOD pré-diabéticos (n=5 para cada grupo). Observou-se aumento da expressão de pró-insulina-1 no período de 60 minutos e 6 horas em culturas tratadas com GM1 25uM, em culturas tratadas com GM1 60uM houve diminuição na expressão no período de 3 horas; enquanto que em culturas tratadas com NGF houve diminuição na expressão de pró-insulina no período de 90 minutos.
- Figura 5b- Gráficos representativos da expressão gênica de pró-insulina-1 em ilhotas pancreáticas de NOD não diabéticos com adição de estaurosporina em cultura (n=5 para cada grupo). Observou-se diminuição da expressão de pró-insulina à partir de 30 minutos em culturas tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF.

Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05 – Mann-Whitney).











Figura 5b

Tabela 4- Dados da expressão gênica de pró-insulina-1 em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos NOD. Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05 – Mann-Whitney)</p>

<u>Tratamento</u>	Controle	60 min	Controle	90 min	Controle	3Horas	Controle	6Horas
GM1 25uM	70 <u>+</u> 14	44 <u>+</u> 1*	74 <u>+</u> 24	52 <u>+</u> 5*	71 <u>+</u> 20	43 <u>+</u> 3*	73 <u>+</u> 20	20 <u>+</u> 5*
Pré-Diabético	61 <u>+</u> 11	130 <u>+</u> 1*	63 <u>+</u> 17	51 <u>+</u> 5	62 <u>+</u> 18	74 <u>+</u> 1	61 <u>+</u> 16	99 <u>+</u> 2*
GM1 60uM	70 <u>+</u> 14	36 <u>+</u> 2*	74 <u>+</u> 24	8 <u>+</u> 2*	71 <u>+</u> 20	29 <u>+</u> 2*	73 <u>+</u> 20	8 <u>+</u> 2*
Pré-Diabético	61 <u>+</u> 11	23 <u>+</u> 1*	63 <u>+</u> 17	35 <u>+</u> 1	62 <u>+</u> 18	12 <u>+</u> 2*	61 <u>+</u> 16	42 <u>+</u> 3
NGF	70 <u>+</u> 14	16 <u>+</u> 2*	74 <u>+</u> 24	22 <u>+</u> 2*	71 <u>+</u> 20	27 <u>+</u> 2*	73 <u>+</u> 20	15 <u>+</u> 2*
Pré-Diabético	61 <u>+</u> 11	39 <u>+</u> 1	63 <u>+</u> 17	17 <u>+</u> 2*	62 <u>+</u> 18	48 <u>+</u> 2	61 <u>+</u> 16	72 <u>+</u> 2
<u>Estaurosporina</u>	Controle	30 min	Controle	60 min	Controle	90 min	Controle	3Horas
GM1 25uM	71 <u>+</u> 26	8 <u>+</u> 2*	71 <u>+</u> 24	24 <u>+</u> 1*	68 <u>+</u> 20	20 <u>+</u> 2*	68 <u>+</u> 20	15 <u>+</u> 1*
GM1 60uM	71 <u>+</u> 26	17 <u>+</u> 2*	71 <u>+</u> 24	17 <u>+</u> 2*	68 <u>+</u> 20	6 <u>+</u> 2*	68 <u>+</u> 20	32 <u>+</u> 2*
NGF	71 <u>+</u> 26	12 <u>+</u> 2*	71 <u>+</u> 24	17 <u>+</u> 2*	68 <u>+</u> 20	43 <u>+</u> 2*	68 <u>+</u> 20	18 <u>+</u> 3*

Avaliação da concentração das citocinas em sobrenadante de ilhotas pancreáticas em cultura

Para avaliarmos o efeito do tratamento com o gangliosídeo GM1 e do tratamento com NGF em sobrenadante de ilhotas isoladas em cultura de NOD não diabéticos de 4 a 6 semanas de vida, com glicemias entre 80 e 100mg/dL; pré-diabéticos com idades à partir de 12 semanas de vida e com glicemias entre 100 e 150 mg/dL e de sobrenadantes de ilhotas pancreáticas em cultura de camundongo NOD não diabético, incubadas com estaurosporina (incluindo os controles) 1(uma) hora antes de serem tratadas com NGF e GM1, procedemos a quantificação das citocinas IL-1 β , IL-12, INF- γ , TNF- α e insulina, pelo método enzimático (ELISA). Os resultados estão expressos com média e desvio padrão (* p<0,05 – Mann-Whitney) e apresentados a seguir:

Avaliação do tratamento com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF sobre a concentração da citocina IL-1β em sobrenadante de ilhotas pancreáticas em cultura de camundongos NOD

- Figura 6- Gráficos representativos da concentração da citocina IL-1β em sobrenadante de ilhotas pancreáticas de NOD não diabéticos em cultura (n=4 para cada grupo), tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF. Observou-se aumento da concentração de IL-1β no período de 90 minutos em culturas tratadas com GM1 25uM e GM1 60uM, enquanto que em culturas tratadas com NGF não houve diferença significativa na concentração de IL-1β.
- Figura 6a- Gráficos representativos da concentração da citocina IL-1β em sobrenadante de ilhotas pancreáticas de NOD pré-diabéticos em cultura (n=4 para cada grupo). Observou-se aumento da concentração de IL-1β no período de 6 horas em culturas tratadas com GM1 25uM. Em culturas tratadas com GM1 60uM houve aumento da concentração no período de 3H e 6H de tratamento, enquanto que em culturas tratadas com NGF não houve diferença significativa na concentração de IL-1β.
- Figura 6b- Gráficos representativos da concentração da citocina IL-1β em sobrenadante de ilhotas pancreáticas de NOD não diabéticos, com adição de estaurosporina em cultura (n=4 para cada grupo). Nas culturas tratadas com NGF, observou-se aumento na concentração de IL-1β no período de 90 minutos de tratamento, enquanto que em culturas tratadas com GM1 25uM e GM1 60uM não houve diferença significativa da concentração entre os períodos tratados.

Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05 - Mann-Whitney).







Figura 6a



Figura 6b

Tabela 5- Dados da expressão da citocina IL-1β em sobrenadante de ilhotas pancreáticas de camundongos NOD em cultura. Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05 – Mann-Whitney).</p>

Tratamento	Controle	60 min	Controle	90 min	Controle	3Horas	Controle	6Horas
GM1 25uM	21 <u>+</u> 5	33 <u>+</u> 2	22 <u>+</u> 5	85 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	25 <u>+</u> 0,5	22 <u>+</u> 5	24 <u>+</u> 2
Pré-Diabético	24 <u>+</u> 5	25 <u>+</u> 0,5	22 <u>+</u> 5	18 <u>+</u> 0,5	23 <u>+</u> 5	25 <u>+</u> 0,5	21 <u>+</u> 5	39 <u>+</u> 1*
GM1 60uM	21 <u>+</u> 5	24 <u>+</u> 3	22 <u>+</u> 5	44 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	23 <u>+</u> 1	22 <u>+</u> 5	31 <u>+</u> 2
Pré-Diabético	24 <u>+</u> 5	15 <u>+</u> 1	22 <u>+</u> 5	13 <u>+</u> 1	23 <u>+</u> 5	52 <u>+</u> 6*	21 <u>+</u> 5	32 <u>+</u> 1*
NGF	21 <u>+</u> 5	31 <u>+</u> 1	22 <u>+</u> 5	21 <u>+</u> 1	22 <u>+</u> 5	27 <u>+</u> 3	22 <u>+</u> 5	25 <u>+</u> 3
Pré-Diabético	24 <u>+</u> 5	15 <u>+</u> 1	22 <u>+</u> 5	15 <u>+</u> 1	23 <u>+</u> 5	15 <u>+</u> 1	21 <u>+</u> 5	17 <u>+</u> 1
<u>Estaurosporina</u>	Controle	30 min	Controle	60 min	Controle	90 min	Controle	3Horas
GM1 25uM	18 <u>+</u> 5	23 <u>+</u> 2	17 <u>+</u> 5	23 <u>+</u> 3	16 <u>+</u> 5	16 <u>+</u> 0,5	17 <u>+</u> 4	23 <u>+</u> 3
GM1 60uM	18 <u>+</u> 5	25 <u>+</u> 1	17 <u>+</u> 5	24 <u>+</u> 1	16 <u>+</u> 5	14 <u>+</u> 1	17 <u>+</u> 4	24 <u>+</u> 1
NGF	18 <u>+</u> 5	23 <u>+</u> 2	17 <u>+</u> 5	23 <u>+</u> 4	16 <u>+</u> 5	37 <u>+</u> 2*	17 <u>+</u> 4	22 <u>+</u> 1

Avaliação do tratamento com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF sobre a concentração da citocina IL-12 em sobrenadante de ilhotas pancreáticas de camundongos NOD em cultura

- Figura 7- Gráficos representativos da concentração da citocina IL-12 em sobrenadante de ilhotas pancreáticas de NOD não diabéticos em cultura (n=4 para cada grupo), tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF. Observou-se diminuição significativa da concentração de IL-12 à partir de 60 minutos em culturas tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF.
- Figura 7a- Gráficos representativos da concentração da citocina IL-12 em sobrenadante de ilhotas pancreáticas de NOD pré-diabéticos (n=4 para cada grupo), tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF. Observou-se diminuição significativa da concentração de IL-12 à partir de 60 minutos em culturas tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF.
- Figura 7b- Gráficos representativos da concentração da citocina IL-12 em sobrenadante de ilhotas pancreáticas de NOD não diabéticos, com adição de estaurosporina em cultura (n=4 para cada grupo), tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF. Observou-se diminuição significativa da concentração de IL-12 à partir de 60 minutos em culturas tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF.

Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05 – Mann-Whitney).









Tabela 6- Dados da concentração da citocina IL-12 em sobrenadante de ilhotas pancreáticas de camundongos NOD em cultura. Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05 – Mann-Whitney).</p>

Tratamento	Controle	60 min	Controle	90 min	Controle	3Horas	Controle	6Horas
GM1 25uM	21 <u>+</u> 5	9 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	15 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	8 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	6 <u>+</u> 1*
Pré-Diabético	24 <u>+</u> 5	11 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	11 <u>+</u> 0,5*	23 <u>+</u> 5	7,5 <u>+</u> 1*	21 <u>+</u> 5	13 <u>+</u> 1*
GM1 60uM	21 <u>+</u> 5	6 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	14 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	6 <u>+</u> 2*	22 <u>+</u> 5	7 <u>+</u> 3*
Pré-Diabético	24 <u>+</u> 5	2 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	1 <u>+</u> 0,5*	23 <u>+</u> 5	7,5 <u>+</u> 1	21 <u>+</u> 5	8 <u>+</u> 1*
NGF	21 <u>+</u> 5	11 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	13 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	10 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	9 <u>+</u> 1*
Pré-Diabético	24 <u>+</u> 5	7 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	1,6 <u>+</u> 0,1*	23 <u>+</u> 5	3,4 <u>+</u> 0,1*	21 <u>+</u> 5	4 <u>+</u> 0,5*
<u>Estaurosporina</u>	Controle	30 min	Controle	60 min	Controle	90 min	Controle	3Horas
GM1 25uM	18 <u>+</u> 5	6,5 <u>+</u> 0,5*	17 <u>+</u> 5	7 <u>+</u> 1*	16 <u>+</u> 5	7 <u>+</u> 0,5*	17 <u>+</u> 4	6,4 <u>+</u> 0,5*
GM1 60uM	18 <u>+</u> 5	9 <u>+</u> 0,5*	17 <u>+</u> 5	7 <u>+</u> 0,5*	16 <u>+</u> 5	2,2 <u>+</u> 0,5*	17 <u>+</u> 4	7 <u>+</u> 0,5*
NGF	18 <u>+</u> 5	6 <u>+</u> 1*	17 <u>+</u> 5	6 <u>+</u> 1*	16 <u>+</u> 5	5 <u>+</u> 0,5*	17 <u>+</u> 4	6 <u>+</u> 1*

Avaliação do tratamento com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF sobre a concentração da citocina IFN-γ em sobrenadantes de ilhotas pancreáticas em cultura de camundongos NOD

- Figura 8- Gráficos representativos da concentração da citocina IFN-γ em sobrenadante de ilhotas pancreáticas de NOD não diabéticos em cultura (n=4 para cada grupo), tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF. Não houve diferença significativa em relação ao controle na concentração de IFN-γ à partir de 60 minutos em culturas tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF.
- Figura 8a- Gráficos representativos da concentração da citocina IFN-γ em sobrenadante de ilhotas pancreáticas de NOD pré-diabéticos em cultura (n=4 para cada grupo), tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF. Observou-se aumento da concentração de IFN-γ à partir de 60 minutos em culturas tratadas com GM1 25uM; enquanto que em culturas tratadas com GM1 60uM e NGF não houve diferença significativa na concentração de IFN-γ entre os períodos de tratamento em relação ao controle.
- Figura 8b- Gráficos representativos da concentração da citocina IFN-γ em sobrenadante de ilhotas pancreáticas de NOD não diabéticos, com adição de estaurosporina em cultura (n=4 para cada grupo), tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF. Observou-se aumento da concentração da citocina IFN-γ no período de 90 minutos em culturas tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF.

Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05 - Mann-Whitney).







Figura 8a


Tabela 7- Dados da expressão da citocina IFN-γ em sobrenadantes de ilhotas pancreáticas de camundongos NOD em cultura. Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05 – Mann-Whitney).</p>

Tratamento	Controle	60 min	Controle	90 min	Controle	3Horas	Controle	6Horas
GM1 25uM	21 <u>+</u> 5	19 <u>+</u> 1	22 <u>+</u> 5	10 <u>+</u> 1	22 <u>+</u> 5	19 <u>+</u> 2	22 <u>+</u> 5	17 <u>+</u> 1
Pré-Diabético	24 <u>+</u> 5	76 <u>+</u> 4*	22 <u>+</u> 5	70 <u>+</u> 6*	23 <u>+</u> 5	122 <u>+</u> 6*	21 <u>+</u> 5	208 <u>+</u> 2*
GM1 60uM	21 <u>+</u> 5	15 <u>+</u> 1	22 <u>+</u> 5	9 <u>+</u> 1	22 <u>+</u> 5	16 <u>+</u> 1	22 <u>+</u> 5	21 <u>+</u> 1
Pré-Diabético	24 <u>+</u> 5	56 <u>+</u> 2	22 <u>+</u> 5	24 <u>+</u> 1	23 <u>+</u> 5	46 <u>+</u> 1	21 <u>+</u> 5	37 <u>+</u> 2
NGF	21 <u>+</u> 5	20 <u>+</u> 2	22 <u>+</u> 5	15 <u>+</u> 1	22 <u>+</u> 5	20 <u>+</u> 1	22 <u>+</u> 5	17 <u>+</u> 2
Pré-Diabético	24 <u>+</u> 5	44 <u>+</u> 2	22 <u>+</u> 5	64 <u>+</u> 2	23 <u>+</u> 5	58 <u>+</u> 1	21 <u>+</u> 5	59 <u>+</u> 2
<u>Estaurosporina</u>	Controle	30 min	Controle	60 min	Controle	90 min	Controle	3Horas
GM1 25uM	18 <u>+</u> 5	14 <u>+</u> 1	17 <u>+</u> 5	17 <u>+</u> 1	16 <u>+</u> 5	58 <u>+</u> 1*	17 <u>+</u> 4	15 <u>+</u> 2
GM1 60uM	18 <u>+</u> 5	16 <u>+</u> 1	17 <u>+</u> 5	16 <u>+</u> 1	16 <u>+</u> 5	43 <u>+</u> 1*	17 <u>+</u> 4	14 <u>+</u> 2
NGF	18 <u>+</u> 5	14 <u>+</u> 1	17 <u>+</u> 5	15 <u>+</u> 1	16 <u>+</u> 5	34 <u>+</u> 1*	17 <u>+</u> 4	15 <u>+</u> 1

Avaliação do tratamento com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF sobre a concentração da citocina TNF-α em sobrenadante de ilhotas de camundongos NOD em cultura

- Figura 9- Gráficos representativos da concentração da citocina TNF-α em sobrenadante de ilhotas pancreáticas de NOD não diabéticos em cultura (n=4 para cada grupo). Observou-se diminuição da concentração de TNF-α à partir de 60 minutos em culturas tratadas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF.
- Figura 9a- Gráficos representativos da concentração da citocina TNF-α em sobrenadante de ilhotas pancreáticas de NOD pré-diabéticos em cultura (n=4 para cada grupo). Observou-se aumento da concentração de TNF-α nos períodos de 90 minutos e 6 horas e diminuição em 3 horas em culturas tratadas com GM1 25uM; diminuição da concentração de TNF-α à partir de 60 minutos em culturas tratadas com GM1 60uM e NGF.
- Figura 9b- Gráficos representativos da concentração da citocina TNF-α em sobrenadante de ilhotas pancreáticas de NOD não diabéticos, com adição de estaurosporina em cultura (n=4 para cada grupo). Observou-se diminuição da concentração da citocina TNF-α à partir de 30 minutos em culturas tratadas com GM1 25uM; em culturas tratadas com GM1 60uM e NGF houve diminuição da concentração da citocina TNF-α no período de 30 e 60 minutos e 3 horas e aumento da concentração em 90 minutos de tratamento em relação ao controle.

Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05 – Mann-Whitney).





Figura 9a



Tabela 8- Dados da concentração da citocina TNF-α em sobrenadante de ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos NOD em cultura. Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05 – Mann-Whitney).</p>

Tratamento	Controle	60 min	Controle	90 min	Controle	3Horas	Controle	6Horas
GM1 25uM	21 <u>+</u> 5	12 <u>+</u> 0,5*	22 <u>+</u> 5	8 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	8 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	8 <u>+</u> 2*
Pré-Diabético	24 <u>+</u> 5	33 <u>+</u> 2	22 <u>+</u> 5	36 <u>+</u> 3*	23 <u>+</u> 5	14 <u>+</u> 2*	21 <u>+</u> 5	37 <u>+</u> 1*
GM1 60uM	21 <u>+</u> 5	5 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	4 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	8 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	11 <u>+</u> 1*
Pré-Diabético	24 <u>+</u> 5	8 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	7 <u>+</u> 1*	23 <u>+</u> 5	8 <u>+</u> 1*	21 <u>+</u> 5	10 <u>+</u> 3*
NGF	21 <u>+</u> 5	9 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	7 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	6 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	11 <u>+</u> 2*
Pré-Diabético	24 <u>+</u> 5	14 <u>+</u> 1*	22 <u>+</u> 5	13 <u>+</u> 1*	23 <u>+</u> 5	12 <u>+</u> 1*	21 <u>+</u> 5	14 <u>+</u> 1*
<u>Estaurosporina</u>	Controle	30 min	Controle	60 min	Controle	90 min	Controle	3Horas
GM1 25uM	18 <u>+</u> 5	4 <u>+</u> 1*	17 <u>+</u> 5	5 <u>+</u> 1*	16 <u>+</u> 5	12 <u>+</u> 2	17 <u>+</u> 4	3 <u>+</u> 1*
GM1 60uM	18 <u>+</u> 5	15 <u>+</u> 2	17 <u>+</u> 5	9 <u>+</u> 1*	16 <u>+</u> 5	34 <u>+</u> 2*	17 <u>+</u> 4	7 <u>+</u> 2*
NGF	18 <u>+</u> 5	14 <u>+</u> 2	17 <u>+</u> 5	5 <u>+</u> 1*	16 <u>+</u> 5	34 <u>+</u> 2*	17 <u>+</u> 4	14 <u>+</u> 1

Avaliação do tratamento com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF sobre a concentração de insulina em sobrenadante de ilhotas isoladas de camundongos NOD em cultura

- Figura 10- Gráficos representativos da concentração de insulina em sobrenadante de ilhotas pancreáticas de NOD não diabéticos em cultura (n=4 para cada grupo). Observou-se aumento da concentração de insulina no período de 3 e 6 horas em culturas tratadas com GM1 25uM, em culturas tratadas com GM1 60uM houve aumento da concentração de insulina nos períodos de 60 minutos, 90 minutos e 3horas; enquanto que em culturas tratadas com NGF não houve diferença significativa na concentração de insulina entre os períodos de tratamento.
- Figura 10a- Gráficos representativos da concentração de insulina em sobrenadante de ilhotas pancreáticas de NOD pré-diabéticos em cultura (n=4 para cada grupo). Observou-se aumento da concentração de TNF-α nos períodos de 3 horas e 6 horas em culturas tratadas com GM1 60uM, enquanto que em culturas tratadas com GM1 25uM e NGF não houve diferença significativa na concentração de insulina entre os períodos de tratamento.
- Figura 10b- Gráficos representativos da concentração de insulina em sobrenadante de ilhotas pancreáticas de NOD não diabéticos, com adição de estaurosporina em cultura (n=4 para cada grupo). Observou-se maior aumento da concentração de insulina no período de 90 minutos em culturas tratadas com GM1 25uM e NGF, enquanto que em culturas tratadas com GM1 60uM não houve diferença significativa da concentração de insulina entre os períodos de tratamento.

Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05 - Mann-Whitney).







Figura 10a



Figura 10b

Tabela 9- Dados da concentração de insulina em sobrenadante de ilhotas pancreáticas de camundongos NOD em cultura. Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05 – Mann-Whitney).</p>

<u>Tratamento</u>	Controle	60 min	Controle	90 min	Controle	3Horas	Controle	6Horas
GM1 25uM	21 <u>+</u> 5	45 <u>+</u> 9	22 <u>+</u> 5	35 <u>+</u> 5	22 <u>+</u> 5	204 <u>+</u> 24*	22 <u>+</u> 5	70 <u>+</u> 13*
Pré-Diabético	24 <u>+</u> 5	11 <u>+</u> 1	22 <u>+</u> 5	12 <u>+</u> 0,5	23 <u>+</u> 5	28 <u>+</u> 2,5	21 <u>+</u> 5	13 <u>+</u> 2
GM1 60uM	21 <u>+</u> 5	80 <u>+</u> 6*	22 <u>+</u> 5	128 <u>+</u> 26*	22 <u>+</u> 5	70 <u>+</u> 18*	22 <u>+</u> 5	24 <u>+</u> 3
Pré-Diabético	24 <u>+</u> 5	25 <u>+</u> 3	22 <u>+</u> 5	16,5 <u>+</u> 1,5	23 <u>+</u> 5	87 <u>+</u> 10*	21 <u>+</u> 5	74 <u>+</u> 5*
NGF	21 <u>+</u> 5	27 <u>+</u> 9	22 <u>+</u> 5	20 <u>+</u> 2	22 <u>+</u> 5	19 <u>+</u> 5	22 <u>+</u> 5	28 <u>+</u> 2
Pré-Diabético	24 <u>+</u> 5	15 <u>+</u> 4	22 <u>+</u> 5	14 <u>+</u> 1	23 <u>+</u> 5	25 <u>+</u> 2	21 <u>+</u> 5	17 <u>+</u> 4
<u>Estaurosporina</u>	Controle	30 min	Controle	60 min	Controle	90 min	Controle	3Horas
GM1 25uM	18 <u>+</u> 5	48 <u>+</u> 3	17 <u>+</u> 5	24 <u>+</u> 4	16 <u>+</u> 5	127 <u>+</u> 19*	17 <u>+</u> 4	37 <u>+</u> 3
GM1 60uM	18 <u>+</u> 5	16 <u>+</u> 1	17 <u>+</u> 5	13 <u>+</u> 2	16 <u>+</u> 5	32 <u>+</u> 6	17 <u>+</u> 4	36 <u>+</u> 7
NGF	18 <u>+</u> 5	26 <u>+</u> 6	17 <u>+</u> 5	23 <u>+</u> 2	16 <u>+</u> 5	89 <u>+</u> 9*	17 <u>+</u> 4	25 <u>+</u> 5

Imunofenotipificação

Fotomicrografias representativas das ilhotas pancreáticas controle e tratadas com NGF, GM1 25uM e GM1 60uM de camundongos NOD não diabéticos e pré-diabéticos, marcadas com anticorpos NGF-β, GM1 e TrkA. Aumento de 200x para cada fotomicrografia.

Prancha I- A imunofluorescência de ilhotas pancreáticas de camundongos NOD não diabéticos tratadas com NGF, demonstrou maior intensidade da marcação com NGF em 90 minutos e 6 horas de tratamento; maior intensidade da marcação com GM1 em 90 minutos de tratamento e maior intensidade na marcação com TrkA em 60 minutos e 3 horas de tratamento. Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05), com n=4 para cada marcação, incluindo o controle. Os valores estão em Unidades Arbitrárias $(x10^6)$.

Tratado NGF





Prancha II- Ilhotas pancreáticas de camundongos NOD não diabéticos tratadas com GM1 25uM, demonstrou maior intensidade na marcação com GM1 em 90 minutos e na intensidade de marcação com NGF e TrkA não houve diferença significativa em comparação com o controle em todos os tempos de tratamento. Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05), com n=4 para cada marcação, incluindo o controle. Os valores estão em Unidades Arbitrárias (x10⁶).

Tratado GM1 25uM





Prancha III- Ilhotas pancreáticas de camundongos NOD não diabéticos tratadas com GM1 60uM, demonstrou maior intensidade da marcação com NGF em 60 minutos de tratamento comparado ao controle; maior intensidade da marcação com GM1 à partir de 90 minutos de tratamento e maior intensidade na marcação com TrkA `a partir de 90 minutos de tratamento. Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05), com n=4 para cada marcação, incluindo o controle. Os valores estão em Unidades Arbitrárias (x10⁶).

Tratado GM1 60uM





Prancha IV- Na imunofluorescência de ilhotas pancreáticas de camundongos NOD pré-diabéticos tratadas com NGF, mostrou que em todos os tempos de tratamento apresentaram intensidade de marcação com NGF e TrkA menores que o controle; enquanto que na intensidade de marcação com GM1 foi maior em 60 minutos de tratamento. Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05), com n=4 para cada marcação, incluindo o controle. Os valores estão em Unidades Arbitrárias (x10⁶).

PD Tratado NGF





Prancha V- Ilhotas pancreáticas de camundongos NOD pré-diabéticos tratadas com GM1 25uM, mostrou intensidade de marcação com NGF em todos os tempos de tratamento menores que o controle; na marcação com GM1 houve maior intensidade em 6 horas de tratamento e na marcação com TrkA maior intensidade em 3 horas de tratamento. Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05), com n=4 para cada marcação, incluindo o controle. Os valores estão em Unidades Arbitrárias (x10⁶).

PD Tratado GM1 25uM





Prancha VI- Ilhotas pancreáticas de camundongos NOD pré-diabéticos tratadas com GM1 60uM, mostrou que todos os tempos de tratamento apresentaram intensidade de marcação com NGF, GM1 e TrkA menores que o controle. Os resultados estão expressos por média e desvio padrão (*p<0,05), com n=4 para cada marcação, incluindo o controle. Os valores estão em Unidades Arbitrárias (x10⁶).

PD Tratado GM1 60uM





tempos de tratamento

5- DISCUSSÃO

Estudos anteriores demonstraram que o gangliosídeo GM1 exerce atividade neurotrófica similar ao NGF extracelular induzindo intracelularmente autofosforilação de tirosina quinases, principalmente TrkA (Rabin e Mochetti.,1995 [78]. Fatores de crescimento como insulina e fator de crescimento neuronal (NGF) ligam-se ao receptor tirosina quinase [104]. A presença do (TrkA) receptor de alta afinidade para NGF tem sido descrito em células de insulinoma, bem como em células β . A síntese e secreção de NGF pelas células β em resposta ao aumento da concentração de glicose extracelular é exercida por NGF no pâncreas [105].

Diabetes mellitus é uma doença de origem autoimune, que em humanos é um processo dependente de insulina; com células imunes infiltrativas nas ilhotas de Langerhans, como insulite, levando a destruição de células β [106].

O tratamento com 100ug de NGF e gangliosídeo GM1 nas concentrações de 25uM e 60uM em ilhotas pancreáticas de camundongos fêmeas NOD não diabéticos com idades de 4 a 6 semanas de vida e NOD pré-diabéticos com glicemia acima de 100 mg/dL, teve como objetivo avaliar a ação imunomodulatória do gangliosídeo GM1 e da neurotrofina NGF sobre a evolução do DM-1, analisando a expressão gênica de NGF, tirosina quinase A (TrkA) e pró-insulina-1, bem como a concentração de citocinas moduladoras e imunofenotipificação destas ilhotas marcadas com NGF, TrkA e GM1. Em nossos estudos analisamos se a imunomodulação de GM1 em ilhotas pancreáticas é similar a de NGF e se estes ativam similarmente a ativação de TrkA.

Em nossos estudos o peso dos camundongos NOD fêmea não variou conforme a evolução da idade e nem com o aumento de glicemia por volta de 150mg/dL, considerados pré-diabéticos. Estes valores de glicemia são apresentados por animais com idade de 10 a 14 semanas de vida e nesta fase há uma progressão da insulite nas ilhotas pancreáticas. No camundongo NOD a insulite inicia na 4^a semana de vida com progressão de células inflamatórias e infiltrativas levando à destruição das células β nas ilhotas pancreáticas [4, 98, 99, 107]. Camundongos NOD diabéticos, com glicemias acima de 200 mg/dL, possuem um número reduzido de ilhotas pancreáticas, média de 1(uma) ilhota pancreática por animal devido a insulite, portanto não foi possível realizar este estudo com este grupo de animais, as ilhotas não eram suficientes para serem analisadas na cultura.

A atividade ATPse pelos canais de sódio, potássio e cálcio regulam a secreção de insulina; principalmente quando cálcio é bloqueado, o qual inibe a secreção de insulina em células β . A secreção de insulina em células β pancreáticas são mediados pela ativação do receptor TrkA pelo NGF. Células β são precurssoras de ilhotas pancreáticas e se comportam como os neurônios, expressando moléculas específicas como tirosina hidroxilase ou dopamina β -hidroxilase estas células são eletricamente excitáveis como os neurônios, envolvendo despolarização celular. Uma das maiores descobertas de estudos envolvendo crescimento de células β em condições de cultura *in vitro* é a possibilidade de analisar os fatores de crescimento como NGF [57].

llhotas pancreáticas de camundongos NOD não diabéticos, evidenciaram maior expressão gênica de NGF em 90 minutos com o tratamento de GM1 25uM, GM1 60uM e NGF, na expressão gênica de TrkA em 3 horas de tratamento com GM1 25uM; enquanto que na expressão gênica de pró-insulina-1 é menor em todos os tempos de tratamento com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF; portanto GM1 comportou-se semelhante ao tratamento com NGF em cultura de ilhotas pancreáticas de NOD não diabéticos.

Insulite é um processo inflamatório e infiltrativo com destruição de células β de ilhotas pancreáticas. Camundongos pré-diabéticos apresentam alto índice de secreção de insulina em suas ilhotas pancreáticas [108]. Estudos mostraram que a infiltração de células mononucleares quando expressas pelo DNA nas ilhotas pancreáticas de camundongos, diminuem a liberação de insulina [109]. Isoformas de pró-insulina-1 são expressas em células β nas ilhotas pancreáticas; enquanto a pró-insulina-2 é expressa no timo [110, 111]. Em nossos estudos utilizamos a pró-insulina-1, pois foi relevante nos estudos de variação de insulina em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD.

Observamos que a expressão gênica de NGF no tratamento de cultura de ilhotas pancreáticas em camundongos NOD pré-diabéticos com GM1 60uM foi maior em 90 minutos de tratamento e com o tratamento de NGF a expressão gênica foi maior em

60 minutos, entretanto na expressão gênica de TrkA ilhotas pancreáticas tratadas com GM1 60uM foi maior em 60 minutos, enquanto que com o tratamento de NGF a expressão gênica de TrkA foi maior à partir de 90 minutos; enquanto que na expressão gênica de pró-insulina-1 é maior em 60 minutos e 6 horas de tratamento com GM1 25uM. GM1 60 uM comportou-se semelhante ao tratamento com NGF em cultura de ilhotas pancreáticas de NOD pré-diabéticos.

Ações biológicas de NGF são mediados por meio de dois tipos específicos de receptores com afinidades distintas: o receptor de neurotrofina p75 de baixa afinidade e pelo receptor tirosina quinase TrkA de alta afinidade [112]. NGF secretado pelas células β é também um regulador de sobrevivência e preservador da biossíntese e secreção de insulina. Análises de subpopulações funcionais de células β que sobreviveram devido ao NGF, demonstraram que subpopulações desaparecem quando a via de NGF é bloqueada [72].

Estaurosporina é um inibidor específico capaz de induzir *per se* um evento de apoptose da célula; é um inibidor preferencial de tirosina quinase que apresentam sinais de citotoxidade em concentrações acima de 70uM e abaixo de 50uM tem efeito de protetor quando associado ao gangliosídeo GM1 [93, 113]. Como a inibição pela estaurosporina é tardia, em nossos estudos decidimos antecipar os tempos de bloqueio em 30 minutos diferentemente dos tempos de tratamento do protocolo de 24horas com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF, que foram à partir de 60 minutos.

Observamos que ilhotas pancreáticas de NOD não diabéticos, adicionadas de estaurosporina em cultura na expressão gênica de NGF foi maior com o tratamento de GM1 60uM à partir de 30 minutos e na expressão gênica de TrkA na concentração de GM1 60uM foi maior no tempo de 30 minutos, oposto aos tratamentos com GM1 25uM e NGF. A expressão gênica de pró-insulina-1 se comportou menor com relação ao controle em todos os tempos de tratamento com GM125uM, GM1 60uM e NGF. A estaurosporina não inibiu a expressão gênica de NGF e TrkA no tratamento com GM1 60uM, sugerindo que pode haver um desacoplamento pela dose ou atuar em outras vias, como a ceramida (esfingosina quinase) em resposta a estaurosporina [113].

As diferenças encontradas na expressão gênica entre as concentrações de GM1 reforçam a hipótese de que as propriedades modulatórias dos gangliosídeos são tempo e dose dependentes.

A participação de citocinas IL-1 β , IL-12, IFN- γ e TNF- α no processo de lesão e destruição de células β no modelo experimental de DM-1 autoimune estão bem fundamentados [27, 33, 38]. Baseados nestas considerações, analisamos a concentração de citocinas em sobrenadantes de cultura de ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos NOD não diabéticos e pré-diabéticos, através de dosagens imunoenzimáticas (ELISA) realizadas para averiguar os efeitos de GM1 e NGF sobre as citocinas.

Estudos em NOD [106, 114] sugerem que a resposta autoimune é mediada por células T-helper (Th1). Interleucina 12 age como um fator de diferenciação sobre as células T $CD4^+$, promovendo sua especialização em IFN- γ produzindo células com resposta Th1, com importante papel sobre as células β no diabetes mellitus. Experimentos *in vitro* tem demonstrado que IL-12 pode agir com IL-2 na proliferação de células natural killer (NK) e linfocinas ativadas por células killer e células T [106]. IL-12 estimula a produção de IFN- γ e TNF- α por células T e NK e redução de IL-4 mediados pelo IFN- γ [115, 116].

IL-1 β , IFN- γ e TNF- α contribuem para o estágio inicial de destruição autoimune de células β pancreáticas. IL-1 β é responsável pela ativação de macrófagos residentes dentro das ilhotas e possui ação citotóxica na estimulação da produção de óxido nítrico (NO) dando início à apoptose [114]. Macrófagos e linfócitos T são as primeiras células que aparecem durante o desenvolvimento de diabetes autoimune em ilhotas pancreáticas. Tem sido sugerido a liberação de citocinas pelos monócitos e macrófagos incluindo IL-1 β , IL-12 e TNF- α e estes podem estar presentes nas células β [117, 118].

Estudos em pâncreas com insulite [117, 118] sobre a expressão gênica de citocinas de NOD e ratos BB, tem demonstrado aumento de IL-1 e TNF- α em células monocítica/macrófago infiltrando a ilhota. IL-1 β e TNF- α tem um efeito citotóxico sobre as células β das ilhotas inibindo a secreção de insulina *in vitro*, enquanto que IL-12 tem um importante papel imunoregulatório na iniciação do processo autoimune pelos linfócitos T helper 1 (Th1) incluindo produção IFN- γ e TNF- α [117, 118]. O IFN- γ é produzido não

apenas pelas células Th1 CD4+,mas por CD8+ (células citotóxicas T e células NK). Assim, citocinas tipo 1 (IL-12, IL-2, TNF- β e IFN- γ) primeiramente estimulam células mediadoras de imunidade e IFN- α e TNF- α são citocinas pró-inflamatórias [32, 119].

A lesão causada pela insulite destroem as células β quando as citocinas tipo 1 (IFN- γ , IL-2 e TNF- β) produzidas por leucócitos infiltrados na ilhota provocam um desequilíbrio sobre as citocinas tipo 2 (IL-4 e IL-10) [32, 118, 120]. Citocinas como IFN- γ , IL-1, TNF- α e TNF- β são citotóxicas para ilhotas pancreáticas *in vitro*, estas citocinas individualmente inibem a síntese de secreção de insulina e em conjunto levam a destruição das células β [121].

Observamos que a concentração da citocina IL-1 β foi maior no tratamento com GM1 25uM e GM1 60uM em 90 minutos de tratamento em culturas de ilhotas pancreáticas de camundongos NOD não diabéticos e em 3 e 6 horas em culturas de ilhotas pancreáticas de NOD pré-diabéticos.

A principal função da IL-1, semelhante ao TNF é mediar a resposta inflamatória do hospedeiro na imunidade inata. A produção de IL-1 pelos fagócitos mononucleares pode ser desencadeada por citocinas derivadas de macrófagos como no caso o TNF ou pelo contato com as células CD4⁺. Estudos sugerem que a resposta autoimune direcionada contra células β da ilhota de Langerhans é mediada por linfócitos Th1 responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias na fase efetora da insulite no camundongo NOD [34, 38]. Uma variedade de citocinas é encontrada na lesão pancreática deste modelo experimental correlacionando com a insulite destrutiva e com a expressão de citocinas pró-inflamatórias Th1 (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e IL-12). Por outro lado, citocinas Th3 (TGF- β) podem regular o processo inflamatório autoimune. [100, 122, 123].

Níveis diminuídos de IL-12 em nossos resultados, sugerem participação do NGF e de GM1 na modulação das citocinas inflamatórias caracterizando a resposta Th1 em camundongos não diabéticos e pré-diabéticos.

Observamos que a concentração de IFN- γ foi maior à partir de 60 minutos com o tratamento de GM1 25uM em sobrenadantes de ilhotas de NOD pré-diabéticos e em 90 minutos com o tratamento de GM1 25uM, GM1 60uM e NGF em sobrenadantes de ilhotas pancreáticas de camundongos NOD não diabéticos adicionados de estaurosporina em cultura. A mais importante citocina produzida pelas células Th1 é o IFN- γ . A principal função efetora das células Th1 é a defesa contra as infecções mediadas pelos fagócitos; é produzido pelas células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas e pelas células NK. IFN- γ sintetiza TNF- α e IL-1 que são moléculas efetoras em camundongos. IL-12 é importante na fase inicial da resposta Th1, pois induz IFN- γ [100, 122, 123].

Observamos que a concentração de TNF- α foi maior à partir de 60 minutos com o tratamento de GM1 25uM em sobrenadantes de ilhotas de NOD pré-diabéticos e em 90 minutos com o tratamento de GM1 60uM e NGF em sobrenadantes de ilhotas pancreáticas de camundongos NOD não diabéticos adicionados de estaurosporina em cultura.

Considerando a análise da expressão de citocinas IL-1 β , IL-12, IFN- γ e TNF- α em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD não diabéticos e pré-diabéticos, os resultados apresentados demonstraram que a expressão destas citocinas no grupo de tratamento com NGF eram semelhantes ao grupo de tratamento com GM1. Na concentração das citocinas IFN- γ e TNF- α houve maior expressão de GM1 25uM em camundongos pré-diabéticos.

Desde a descoberta do camundongo NOD estão sendo estudados quais são os tipos de células infiltrativas nas ilhotas pancreáticas e a suscetibilidade dos genes que levam ao diabetes mellitus [124]. A baixa liberação de insulina observada durante o desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2 tem sido associado com a intolerância a glicose. Estudos verificaram que este processo ocorre quando há insulite, envolvendo as células β em ilhotas pancreáticas de diabéticos [109].

Observamos que a concentração de insulina em sobrenadantes de ilhotas pancreáticas aumentou nos tratamentos com GM1 25uM e GM1 60uM em camundongos NOD não diabéticos, em NOD pré-diabéticos a concentração de insulina aumentou no tratamento com GM1 60uM e aumentou nos tratamentos com GM1 25uM e NGF em ilhotas pancreáticas adicionadas de estaurosporina em cultura em NOD não diabéticos. Portanto, ilhotas tratadas com GM1 aumentam a liberação de insulina.

Tratamentos de células β com NGF ou dbcAMP (dibutil AMP cíclico) induzem ao aumento nos níveis de mRNA de TrkA. Níveis mais elevados de mRNA de TrkA foram observados quando as células foram tratadas com NGF junto com dbcAMP. O aumento na expressão de mRNA de TrkA dbc AMP em células tratadas sugere que um maior número de receptores de membrana para NGF esteja presentes nestas células. Isto poderia explicar que mais células sensíveis a ação do NGF tem interação entre os receptores de NGF. Prolongadas exposições ao NGF induziu um aumento de mRNA de TrkA em células PC12 e em neurônios colinérgicos, onde NGF tem um papel crítico na expressão do gene de TrkA. Estes estudos demonstraram que o aumento da afinidade para o NGF talvez expressa mais células sensitivas a ação do NGF (Rosenbaum et al.,1998) [104].

A função e sobrevivência das células β dependem fortemente de nutrientes e de fatores de crescimento, como glicose e NGF, respectivamente. A interação desses nutrientes e fatores de crescimento promove o crescimento e manutenção destas células por meio de mecanismos ainda não elucidados [125]. A sinalização de NGF via TrkA, seu receptor de alta afinidade, possui um importante papel na proliferação e sobrevivência de células β [57, 71, 126]. Sabe-se que em células neuronais, os efeitos de neurotrofinas podem ser reproduzidos pelo gangliosídeo GM1, embora as neurotrofinas sejam farmacologicamente mais potentes. As propriedades neuroprotetoras do GM1 são semelhantes às neurotrofinas e por esta razão, seus mecanismos de ação são similares [127].

Neste contexto, nos ensaios de imunofluorescência, verificamos que ilhotas pancreáticas de camundongos NOD não diabéticos e pré-diabéticos tratados com GM1 25uM, GM1 60uM e NGF expressam marcação para NGF, GM1 e TrkA de maneira semelhante ao tempo de expressão gênica observados neste trabalho.

Mallei et al., 2004 [128] expuseram células NIH-3T3 que expressam receptores de TrkA a seu respectivo ligante NGF e a GM1, conhecido por ativar este receptor. A síntese de NGF foi então determinada em nível gênico e protéico. Estes autores verificaram que o GM1 aumentou de maneira tempo-dependente a expressão gênica e os níveis protéicos de NGF. Interessantemente, outros autores demonstraram que GM1 também aumenta os níveis de RNAm de NGF *in vivo*, em cérebro de ratos, indicando que os efeitos deste gangliosíideo não ocorrem somente em linhagens celulares *in vitro* [129].

A similaridade entre os resultados da imunofenotipificação com a expressão gênica de ilhotas pancreáticas tratadas com GM1 25uM e GM1 60uM em camundongos não diabéticos e pré-diabéticos nos leva a observar que GM1 é tempo e dose dependente na expressão de receptores em cultura de ilhotas pancreáticas.

Nossos resultados demonstraram que a ação de GM1 em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD não diabéticos e pré-diabéticos, é semelhante a de NGF e estes ativam similarmente a expressão gênica de NGF, seu receptor TrkA e insulina e a modulação das citocinas inflamatórias, caracterizando a resposta Th1, sugerindo a liberação da insulina de maneira a proteger as células β nos processos inflamatórios e infiltrativos que ocorrem nas ilhotas pancreáticas.

6- CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- Em ilhotas pancreáticas isoladas em cultura de camundongos NOD não diabéticos:
 - GM1 e NGF diminuem a expressão gênica de pró-insulina-1;
 - A estaurosporina não inibiu a expressão gênica de NGF e TrkA no tratamento com GM1 60uM.
- Em ilhotas pancreáticas isoladas em cultura de camundongos NOD pré-diabéticos:
 - GM1 aumenta a concentração das citocinas IL-1β, IFN-γ e TNF-α em sobrenadantes de ilhotas isoladas.
- Em ilhotas pancreáticas isoladas em cultura de camundongos NOD não diabéticos e pré-diabéticos:
 - 1- Nossos resultados reforçam que a ação de GM1 é semelhante ao de NGF;
 - 2- NGF e GM1 aumentam a expressão gênica de NGF e seu receptor de alta afinidade (TrkA);
 - GM1 aumentam a concentração de IL-1β e diminuem a concentração da citocina inflamatória IL-12 em sobrenadantes de ilhotas isoladas;
 - 4- Quando tratadas com GM1, a liberação de insulina aumenta;
 - 5- Ação de GM1 é tempo e dose dependente na expressão gênica de NGF, TrkA e pró-insulina-1 e na ação das citocinas inflamatórias e insulina em cultura de ilhotas pancreáticas.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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] Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. Endocrine Rev. 1994;15:516-42.
- [8] Bach JF, Mathis D. The NOD mouse. Research in immunology. 1997 Jun;148(5):285-6.
- [9] 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.
- [10] Pozzilli P SA, Williams AJ, Beales PE. NOD mouse colonies around the world-recent facts and figures. Immunol Today. 1993 May;14((5)):193-6.
- [11] Pavin EJ ZR. Implantação da linhagem NOD mice (camundongos diabéticos não-obesos) no Brasil: contribuição deste modelo animal ao estudo do diabetes mellitus insulino-dependente e outras doenças autoimunes. Arq Bras Endo Metabol. 1994;38:105-8.

- [12] Tochino Y. The NOD mouse as a model of type I diabetes. Crit Rev Immunol. 1987;8(1):49-81.
- [13] Makino S KK, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Abstract Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. Jikken Dobutsu. 1980 Jan;29((1)):1-13.
- [14] Baxter AG, Mandel TE. Hemolytic anemia in non-obese diabetic mice. Eur J Immunol. 1991 Sep;21(9):2051-5.
- [15] Krug J WA, Beales PE, Doniach I, Gale EA, Pozzilli P. Parathyroiditis in the non-obese diabetic mouse--a new finding. J Endocrinol. 1991 Nov;131((2)):193-6.
- [16] Bernard NF, Ertug F, Margolese H. High incidence of thyroiditis and anti-thyroid autoantibodies in NOD mice. Diabetes. 1992 Jan;41(1):40-6.
- [17] Damotte D, Colomb E, Cailleau C, Brousse N, Charreire J, Carnaud C. Analysis of susceptibility of NOD mice to spontaneous and experimentally induced thyroiditis. Eur J Immunol. 1997 Nov;27(11):2854-62.
- [18] Tisch R MH. Insulin-dependent diabetes mellitus. Cell. 1996 May 3;85((3)):291-7.
- [19] Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed cell death in immunity. Annu Rev Immunol. 1992;10:267-93.
- [20] Lenardo MJ. The molecular regulation of lymphocyte apoptosis. Semin Immunol. 1997 Feb;9(1):1-5.
- [21] Wong FS JCJ. Abstract Insulin-dependent diabetes mellitus and its animal models. Curr Opin Immunol. 1999 Dec;11((6)):643-7. Review.
- [22] Wong FS, Janeway CA, Jr. The role of CD4 and CD8 T cells in type I diabetes in the NOD mouse. Res Immunol. 1997 Jun;148(5):327-32.
- [23] Bedossa P, Bendelac A, Bach JF, Carnaud C. Syngeneic T cell transfer of diabetes into NOD newborn mice: in situ studies of the autoimmune steps leading to insulin-producing cell destruction. Eur J Immunol. 1989 Oct;19(10):1947-51.

- [24] Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell. 1997 Feb 7;88(3):355-65.
- [25] Wong FS, Visintin I, Wen L, Flavell RA, Janeway CA, Jr. CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. J Exp Med. 1996 Jan 1;183(1):67-76.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] Hayward AR, Shreiber M. Neonatal injection of CD3 antibody into nonobese diabetic mice reduces the incidence of insulitis and diabetes. J Immunol. 1989 Sep 1;143(5):1555-9.
- [30] Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. Endocr Rev. 1994 Aug;15(4):516-42.
- [31] O'Reilly LA, Hutchings PR, Crocker PR, Simpson E, Lund T, Kioussis D, et al. Characterization of pancreatic islet cell infiltrates in NOD mice: effect of cell transfer and transgene expression. Eur J Immunol. 1991 May;21(5):1171-80.
- [32] Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes Metab Rev. 1998 Jun;14(2):129-51.
- [33] Ventura-Oliveira D VC, Zanin ME, Castro GM, Moreira Filho DC, Zollner RL. Kinetics of TNF-alpha and IFN-gamma mRNA expression in islets and spleen of NOD mice. Braz J Med Biol Res. 2002 Nov;35((11)):1347-55.

- [34] Bradley LM, Asensio VC, Schioetz LK, Harbertson J, Krahl T, Patstone G, et al. Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. J Immunol. 1999 Mar 1;162(5):2511-20.
- [35] Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Shi Y, Morgan AR, Bleackley RC. DNA fragmentation is an early event in cytokine-induced islet beta-cell destruction. Diabetologia. 1994 Aug;37(8):733-8.
- [36] Iwahashi H, Hanafusa T, Eguchi Y, Nakajima H, Miyagawa J, Itoh N, et al. Cytokine-induced apoptotic cell death in a mouse pancreatic beta-cell line: inhibition by Bcl-2. Diabetologia. 1996 May;39(5):530-6.
- [37] Toyoda H, Formby B, Magalong D, Redford A, Chan E, Takei S, et al. In situ islet cytokine gene expression during development of type I diabetes in the non-obese diabetic mouse. Immunol Lett. 1994 Mar;39(3):283-8.
- [38] Hirai H, Kaino Y, Ito T, Kida K. Analysis of cytokine mRNA expression in pancreatic islets of nonobese diabetic mice. J Pediatr Endocrinol Metab. 2000 Jan;13(1):91-8.
- [39] Stites DP TA, Parslow TG. Imunologia Médica. 9 ed. Rio de Janeiro 2000.
- [40] Svennerholm L. Ganglioside metabolism In: Comprehensive Biochemistry. Elsevier, Amsterdam. 1970;18:201-27.
- [41] Ledeen RW, Yu RK. Gangliosides: structure, isolation, and analysis. Methods Enzymol. 1982;83:139-91.
- [42] Tettamanti G, Riboni L. Gangliosides turnover and neural cells function: a new perspective. Prog Brain Res. 1994;101:77-100.
- [43] Mahoney JA, Schnaar RL. Multivalent ganglioside and sphingosine conjugates modulate myelin protein kinases. Biochim Biophys Acta. 1997 Aug 14;1328(1):30-40.
- [44] Bergelson LD. Serum gangliosides as endogenous immunomodulators. Immunol Today. 1995 Oct;16(10):483-6.

- [45] Offner H, Thieme T, Vandenbark AA. Gangliosides induce selective modulation of CD4 from helper T lymphocytes. J Immunol. 1987 Nov 15;139(10):3295-305.
- [46] Ladisch S, Ulsh L, Gillard B, Wong C. Modulation of the immune response by gangliosides. Inhibition of adherent monocyte accessory function in vitro. J Clin Invest. 1984 Dec;74(6):2074-81.
- [47] Merritt WD, Bailey JM, Pluznik DH. Inhibition of interleukin-2-dependent cytotoxic T-lymphocyte growth by gangliosides. Cell Immunol. 1984 Nov;89(1):1-10.
- [48] Massa PT. Specific suppression of major histocompatibility complex class I and class
 II genes in astrocytes by brain-enriched gangliosides. J Exp Med. 1993
 Oct 1;178(4):1357-63.
- [49] Ravindranath MH, Gonzales A, Soh D, Nishimoto K, Tam WY, Bilchik A, et al. Interleukin-2 binds to ganglioside GD(1b). Biochem Biophys Res Commun. 2001 May 4;283(2):369-73.
- [50] Irani DN, Lin KI, Griffin DE. Brain-derived gangliosides regulate the cytokine production and proliferation of activated T cells. J Immunol. 1996 Nov 15;157(10):4333-40.
- [51] Bretzel RG FB, Willig J, Woehrle M, Federlin K. Effects of ganglioside (Cronassial) treatment on MHC Ia antigen expression and allograft survival of pancreatic islets in diabetic rats. Diabetologia. 1990 Feb;33.((2)):112-4.
- [52] Nayak RC OM, Rabizadeh A, Srikanta S, Eisenbarth GS. Abstract "Cytoplasmic" islet cell antibodies. Evidence that the target antigen is a sialoglycoconjugate. Diabetes. 1985 Jun;34((6)):617-9.
- [53] Colman PG, Nayak RC, Campbell IL, Eisenbarth GS. Binding of cytoplasmic islet cell antibodies is blocked by human pancreatic glycolipid extracts. Diabetes. 1988 May;37(5):645-52.
- [54] Dotta F, Colman PG, Lombardi D, Scharp DW, Andreani D, Pontieri GM, et al. Ganglioside expression in human pancreatic islets. Diabetes. 1989 Nov;38(11):1478-83.
- [55] Dotta F, Peterson LB, Previti M, Metzger J, Tiberti C, Anastasi E, et al. Pancreatic islet ganglioside expression in nonobese diabetic mice: comparison with C57BL/10 mice and changes after autoimmune beta-cell destruction. Endocrinology. 1992 Jan;130(1):37-42.
- [56] Vinik A. Diabetic neuropathy: pathogenesis and therapy. Am JMed. 1999;107((2B)):17S-26S.
- [57] Pierucci D, Cicconi S, Bonini P, Ferrelli F, Pastore D, Matteucci C, et al. NGF-withdrawal induces apoptosis in pancreatic beta cells in vitro. Diabetologia. 2001 Oct;44(10):1281-95.
- [58] 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.
- [59] Gee AP, Boyle MD, Munger KL, Lawman MJ, Young M. Nerve growth factor: stimulation of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983 Dec;80(23):7215-8.
- [60] 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.
- [61] 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.
- [62] Brodie C, Gelfand EW. Functional nerve growth factor receptors on human B lymphocytes. Interaction with IL-2. J Immunol. 1992 Jun 1;148(11):3492-7.
- [63] Thorpe LW, Werrbach-Perez K, Perez-Polo JR. Effects of nerve growth factor on the expression of interleukin-2 receptors on cultured human lymphocytes. Ann N Y Acad Sci. 1987;496:310-1.

- [64] Aloe L, Bracci-Laudiero L, Bonini S, Manni L. The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases. Allergy. 1997 Sep;52(9):883-94.
- [65] Aloe L, Tuveri MA, Carcassi U, Levi-Montalcini R. Nerve growth factor in the synovial fluid of patients with chronic arthritis. Arthritis Rheum. 1992 Mar;35(3):351-5.
- [66] Aloe L, Moroni R, Mollinari C, Tirassa P. Schistosoma mansoni infection enhances the levels of NGF in the liver and hypothalamus of mice. Neuroreport. 1994 May 9;5(9):1030-2.
- [67] Aloe L, Skaper SD, Leon A, Levi-Montalcini R. Nerve growth factor and autoimmune diseases. Autoimmunity. 1994;19(2):141-50.
- [68] Raile K, Berthold A, Banning U, Horn F, Pfeiffer G, Kiess W. IGFs, basic FGF, and glucose modulate proliferation and apoptosis induced by IFNgamma but not by IL-1beta in rat INS-1E beta-cells. Horm Metab Res. 2003 Jul;35(7):407-14.
- [69] 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.
- [70] Vidaltamayo R S-SM, Hiriart M. Abstract Nerve growth factor increases sodium channel expression in pancreatic beta cells: implications for insulin secretion. FASEB J. 2002 Jun;16((8)):891-2.
- [71] Raile K, Klammt J, Garten A, Laue S, Bluher M, Kralisch S, et al. Glucose regulates expression of the nerve growth factor (NGF) receptors TrkA and p75NTR in rat islets and INS-1E beta-cells. Regul Pept. 2006 Jul 15;135(1-2):30-8.
- [72] Navarro-Tableros V, Sanchez-Soto MC, Garcia S, Hiriart M. Autocrine regulation of single pancreatic beta-cell survival. Diabetes. 2004 Aug;53(8):2018-23.

- [73] Lambiase A, Bracci-Laudiero L, Bonini S, Bonini S, Starace G, D'Elios MM, et al. Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. J Allergy Clin Immunol. 1997 Sep;100(3):408-14.
- [74] Vidaltamayo R, Mery CM, Angeles-Angeles A, Robles-Diaz G, Hiriart M. Expression of nerve growth factor in human pancreatic beta cells. Growth Factors. 2003 Sep-Dec;21(3-4):103-7.
- [75] Bibel M, Barde YA. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. Genes Dev. 2000 Dec 1;14(23):2919-37.
- [76] Tazi A, Czernichow P, Scharfmann R. Similarities and discrepancies in the signaling pathway for nerve growth factor in an insulin producing cell line and a neural crest-derived cell line. J Neuroendocrinol. 1995 Jan;7(1):29-36.
- [77] Polak M SR, Seilheimer B, Eisenbarth G, Dressler D, Verma IM, Potter H. 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.
- [78] Rabin SJ, Mocchetti I. GM1 ganglioside activates the high-affinity nerve growth factor receptor trkA. Journal of neurochemistry. 1995 Jul;65(1):347-54.
- [79] Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. Cell. 1991 Apr 5;65(1):189-97.
- [80] Friedman WJ, Greene LA. Neurotrophin signaling via Trks and p75. Exp Cell Res. 1999 Nov 25;253(1):131-42.
- [81] Dechant G, Barde YA. Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. Curr Opin Neurobiol. 1997 Jun;7(3):413-8.
- [82] 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.

- [83] Hehmke B, Kohnert KD, Odselius R. The use of a new dextran gradient medium for rapid isolation of functionally intact neonatal rat pancreatic islets. Diabetes Res. 1986 Jan;3(1):13-6.
- [84] Krowczynska AM, Coutts M, Makrides S, Brawerman G. The mouse homologue of the human acidic ribosomal phosphoprotein PO: a highly conserved polypeptide that is under translational control. Nucleic Acids Res. 1989 Aug 11;17(15):6408.
- [85] 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.
- [86] Ferrari G, Batistatou A, Greene LA. Gangliosides rescue neuronal cells from death after trophic factor deprivation. J Neurosci. 1993 May;13(5):1879-87.
- [87] 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.
- [88] 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.
- [89] 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.
- [90] 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.
- [91] 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.
- [92] Saggioro D, Sorio C, Calderazzo F, Callegaro L, Panozzo M, Berton G, et al. Mechanism of action of the monosialoganglioside GM1 as a modulator of CD4 expression. Evidence that GM1-CD4 interaction triggers dissociation of p56lck from CD4, and CD4 internalization and degradation. J Biol Chem. 1993 Jan 15;268(2):1368-75.

- [93] Krifuks O, Bergelson LD, Schlesinger M. The down-modulation of CD4 induced by the GM1 ganglioside is regulated by phosphatases and kinases: evidence from enzyme inhibitors and anti-CD45 antibodies. Cell Immunol. 1998 Jul 10;187(1):45-51.
- [94] Ferrari G, Anderson BL, Stephens RM, Kaplan DR, Greene LA. Prevention of apoptotic neuronal death by GM1 ganglioside. Involvement of Trk neurotrophin receptors. J Biol Chem. 1995 Feb 17;270(7):3074-80.
- [95] Batistatou A, Greene LA. Aurintricarboxylic acid rescues PC12 cells and sympathetic neurons from cell death caused by nerve growth factor deprivation: correlation with suppression of endonuclease activity. J Cell Biol. 1991 Oct;115(2):461-71.
- [96] Ladisch S UL, Gillard B, Wong C. Free in PMC Modulation of the immune response by gangliosides. Inhibition of adherent monocyte accessory function in vitro. J Clin Invest. 1984 Dec;74((6)):2074-81.
- [97] Wilberz S HL, Renold AE. Gangliosides in vivo reduce diabetes incidence in non-obese diabetic mice. Diabetologia. 1988 Nov;31((11)):855-7.
- [98] Papaccio G, Chieffi Baccari G, Mezzogiorno V. In vivo effect of gangliosides on non-obese diabetic mice. Acta Anat (Basel). 1993;147(3):168-73.
- [99] Papaccio G CBG, Mezzogiorno V. Abstract In vivo effect of gangliosides on non-obese diabetic mice. Acta Anat (Basel). 1993;147((3)):168-73.
- [100] 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.
- [101] Boschero AC, Delattre E, Santos ML. Inhibition of insulin release by the aminoglycoside antibiotic sisomycin. Horm Metab Res. 1981 Sep;13(9):531-2.
- [102] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987 Apr;162(1):156-9.

- [103] Rodriguez PE, Cumar FA. Gangliosides noncovalently bound to DEAE-Sephadex: application to purification of anti-ganglioside antibodies. Anal Biochem. 1990 Jul;188(1):48-52.
- [104] 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.
- [105] Scharfmann R, Tazi A, Polak M, Kanaka C, Czernichow P. Expression of functional nerve growth factor receptors in pancreatic beta-cell lines and fetal rat islets in primary culture. Diabetes. 1993 Dec;42(12):1829-36.
- [106] Sternesjo J, Sandler S. Effects of interleukin-12 in vitro on pancreatic islets isolated from normal rodents and from non-obese diabetic mice. The Journal of endocrinology. 1998 Jul;158(1):69-75.
- [107] Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. Annu Rev Immunol. 2005;23:447-85.
- [108] Winer S, Tsui H, Lau A, Song A, Li X, Cheung RK, et al. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. Nat Med. 2003 Feb;9(2):198-205.
- [109] Lin JM, Sternesjo J, Sandler S, Bergsten P. Preserved pulsatile insulin release from prediabetic mouse islets. Endocrinology. 1999 Sep;140(9):3999-4004.
- [110] Chatenoud SYaL. Proinsulin: a unique autoantigen triggering autoimmune diabetes. The Journal of Clinical Investigation. 2006;116(Number 12):3108-10.
- [111] Dubois-Lafforgue D. Proinsulin 2 Knockout NOD Mice. Diabetes. 2002;51(Supplement 3):S489-S93.
- [112] Stempelj M, Ferjan I. Signaling pathway in nerve growth factor induced histamine release from rat mast cells. Inflamm Res. 2005 Aug;54(8):344-9.

- [113] Cavallini L, Venerando R, Miotto G, Alexandre A. Ganglioside GM1 protection from apoptosis of rat heart fibroblasts. Arch Biochem Biophys. 1999 Oct 15;370(2):156-62.
- [114] Hill DJ, Petrik J, Arany E, McDonald TJ, Delovitch TL. Insulin-like growth factors prevent cytokine-mediated cell death in isolated islets of Langerhans from pre-diabetic non-obese diabetic mice. The Journal of endocrinology. 1999 Apr;161(1):153-65.
- [115] Kalinski P, Hilkens CM, Snijders A, Snijdewint FG, Kapsenberg ML. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. J Immunol. 1997 Jul 1;159(1):28-35.
- [116] Wang KaR, J. Blood.95(10pp):3183-90.
- [117] Kretowski A, Mysliwiec J, Szelachowska M, Kinalski M, Kinalska I. Nicotinamide inhibits enhanced in vitro production of interleukin-12 and tumour necrosis factor-alpha in peripheral whole blood of people at high risk of developing type 1 diabetes and people with newly diagnosed type 1 diabetes. Diabetes research and clinical practice. 2000 Feb;47(2):81-6.
- [118] Rabinovitch A. Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? Diabetes. 1994 May;43(5):613-21.
- [119] Kolb H. Benign versus destructive insulitis. Diabetes Metab Rev. 1997 Sep;13(3):139-46.
- [120] Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. Immunol Today. 1995 Jan;16(1):34-8.
- [121] Mandrup-Poulsen T, Helqvist S, Wogensen LD, Molvig J, Pociot F, Johannesen J, et al. Cytokine and free radicals as effector molecules in the destruction of pancreatic beta cells. Current topics in microbiology and immunology. 1990;164:169-93.

- [122] Kawamura T, Nagata M, Utsugi T, Yoon JW. Prevention of autoimmune type I diabetes by CD4+ suppressor T cells in superantigen-treated non-obese diabetic mice. J Immunol. 1993 Oct 15;151(8):4362-70.
- [123] Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus. Rev Endocr Metab Disord. 2003 Sep;4(3):291-9.
- [124] Strandell E, Eizirik DL, Sandler S. Reversal of beta-cell suppression in vitro in pancreatic islets isolated from nonobese diabetic mice during the phase preceding insulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Invest. 1990 Jun;85(6):1944-50.
- [125] Raile K, Klammt J, Laue S, Garten A, Bluher M, Kralisch S, et al. Glucose concentration and AMP-dependent kinase activation regulate expression of insulin receptor family members in rat islets and INS-1E beta cells. Diabetologia. 2005 Sep;48(9):1798-809.
- [126] Rosenbaum T, Castanares DT, Lopez-Valdes HE, Hiriart M. Nerve growth factor increases L-type calcium current in pancreatic beta cells in culture. J Membr Biol. 2002 Apr 1;186(3):177-84.
- [127] Mocchetti I. Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins. Cell Mol Life Sci. 2005 Oct;62(19-20):2283-94.
- [128] Mallei A, Rabin SJ, Mocchetti I. Autocrine regulation of nerve growth factor expression by Trk receptors. J Neurochem. 2004 Sep;90(5):1085-93.
- [129] 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.