

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Danielle Ventura de Oliveira

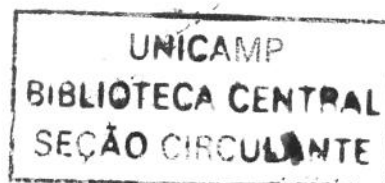
***Estudo temporal da expressão gênica de Fas,
Fas-ligante, Bcl-w e citocinas Th1 em ilhotas
pancreáticas, sangue e baço de camundongo
NOD (diabético não obeso)***

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de Ciências Básicas, da Farmacêutica DANIELLE VENTURA DE OLIVEIRA.

Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner
Orientador

Campinas

2002



200331853

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Danielle Ventura de Oliveira

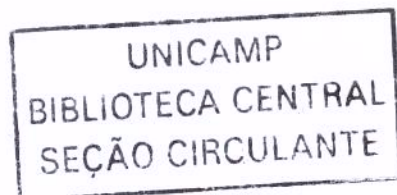
***Estudo temporal da Expressão gênica de Fas,
Fas-ligante, Bcl-w e citocinas Th1 em ilhotas
pancreáticas, sangue e baço de camundongo
NOD (diabético não obeso)***

Dissertação apresentada ao Curso de pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Clínica Médica na área de Ciências básicas.

Orientador: Prof.Dr.Ricardo de Lima Zollner

Campinas

2002



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

OL4e

Oliveira, Danielle Ventura de

Estudo temporal da expressão gênica de Fas, Fas-ligante, Bcl-w e citocinas Th1 em ilhotas pancreáticas, sangue e baço de camundongo NOD (diabético não obeso). / Danielle Ventura de Oliveira. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Ricardo de Lima Zollner

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Diabetes. 2. Apoptose. 3. Autoimune. I. Ricardo de Lima Zollner. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

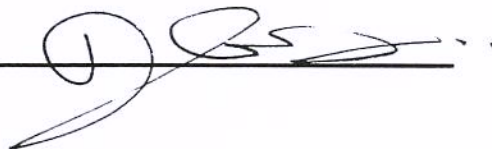
UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	OL4e
V	EX
TOMBO BC/	56017
PROC.	161124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	09/20/03
Nº CPD	

CM00190368-1

bibid 303191

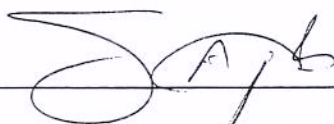
Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

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

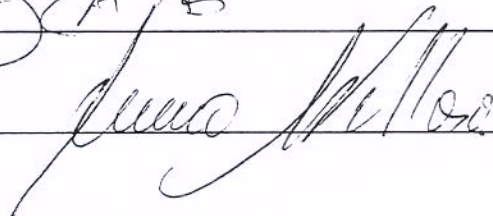


Membros:

1. Professor Doutor Sérgio Dib



2. Professor Doutor Lício Augusto Velloso

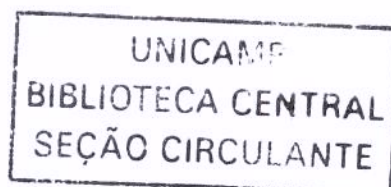


Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 23/08/02

*"Tenho saudade de ti minha mãe
Pois muito cedo partiste.
Não cheguei a conhecer a mulher
Que habitava em teu ser.
Conheci a mãe na faina na lida
Na árdua luta da vida.
Mãe que cantava e contava
Da saudade que consigo trazia.
Mãe que ria e sofria ...
A mulher passou despercebida.
Não tive tempo de te conhecer
Agradecer por todo aquele cansaço
Dizer do meu amor por ti
Te dar um fraterno e doce abraço.
Partiste deixaste histórias e cantigas
Que ficaram vivas em minhas saudades.
Te celebro neste poema mãe querida
Com meu coração repleto de ternura.
E guardo com amor a outra imagem
Da mulher que eu não conheci."*

Carmen Pimentel



Para

Papai Célio, Vera, Deia e Gu

Agradecimento Especial

Ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Pela orientação, iniciação na pesquisa, pelas conversas sempre engrandecedoras, por me ensinar a enfrentar os obstáculos com seu otimismo. Aprendi a conhecer o seu valor e respeitá-lo.

Agradecimentos

Aos Profs. Dr. Sérgio Atala Dib, Lício Augusto Velloso, Everardo Magalhães Carneiro, Luís Henrique Barbosa Boechat pela aceitação de compor a presente banca, pelos comentários e sugestões proferidas.

A Conceição Aparecida Villela, pela grande amizade em todos esses anos de convivência, onde descobri a mulher de garra sempre pronta a me apoiar em todos os momentos difíceis. Por ter me apresentado e ensinado a importância do NOD, por sua grande ajuda no estudo morfológico, incentivo e apoio em todas as fases da realização deste trabalho.

A minha querida Meguinha, por toda ajuda com os animais, pelas palavras de encorajamento e o imenso carinho oferecido. Pelo exemplo de força, humanidade e fé.

A Maira Eduarda Zanin, pelo companheirismo nestes cinco anos (mais cinco de faculdade) de convivência, pela invejável paciência, colaboração e o mais importante de tudo, obrigada por se tornar minha grande e eterna amiga!!!! Com dez anos de convivência, acho que não posso mais lhe dar “alta”, só lembrando: Fato 1: A bolsa que não vinha... Fato 2: Corrida ao LPC junto com Paula. Fato 3: Algumas pintas que felizmente não eram... Fato 4: O episódio do criostato contaminado e todo desdobramento (Maaiiraaaa, vamos comiiigo pegar o resultado?), Fato 5: De repente... um representante!!!, Fato N: Várias consultas médicas que eu sempre desconfiei que TINHA alguma coisa... Fato 6: a recente epopéia da tese. E além de tudo, ainda tem sua disposição e dedicação com minhas maravilhosas pranchas!!!!!!obrigada!!!

A Gláucia Monteiro de Castro minha querida "gramurosa", por se tornar minha grande amiga e Dinda!!!!, companheira em todos os momentos difíceis e alegres (fotos no confocal, na Nefro, no IB, pranchas, dosagens de glicemia ao som do CD glicemia!!!

tabelas...Lembra da FESBE de 2000 ??? e do Carliiiiito, chama a polícia!!!!). E finalmente, minha profunda gratidão por toda dedicação e carinho na conclusão deste trabalho, pela sua enorme paciência, bom humor, sugestões e discussões para o aprimoramento deste. Foram várias, mais várias, madrugadas, lembra???(o vigia....).

Ao Luiz Henrique Boechat, querido amigo, pelo seu eterno bom humor (mesmo quando tudo desmoronava), por todo apoio e carinho dedicado, pela prontidão na leitura da tese e por suas valiosas sugestões.

A Ana Paula Perroud, pela amizade, paciência com minhas diversas falsas "patologias", por todas palavras de incentivo e pelo seu humor único.

A Rika, por sua amizade, disponibilidade em qualquer situação, solidariedade, enfim por tudo!

A minha querida família que "aguentou aquela barra", com tolerância, respeito e muito incentivo para a conclusão deste trabalho. Pelas infindáveis noites de preocupação e sem sono à espera da chegada da Unicamp, do final da tese, do final do estresse e a volta ao normal. Em especial, à Déia por separar meu pijama, arrumar minha cama....e me agüentar com meu estado ansioso natural de ser.

A minha tia Neca, pela ajuda na correção ortográfica desta tese, por todo seu carinho e preocupação.

A minha querida Vó Lurdes, que mesmo distante do mundo científico torceu pela realização deste.

A minha prima-irmã Érika, pela preocupação pela data da defesa, palavras de incentivo, carinho e apoio dedicado.

A todas minhas amigas de longos anos que me agüentaram quando eu estava pra lá de mal humorada.....desculpem!!!

Aos aprimorandos do Laboratório de Imunologia, Leticia, Ingrid, Gil, Rika, Marcelo, Bethânia e Júlia. Mesmo que breve colaboram para a realização deste.

Aos docentes da Disciplina de Nefrologia, da UNICAMP, por permitirem uso no aparelho de captação de imagens.

Aos Profs. Drs. Antonio Carlos Boschero e Everardo Magalhães Carneiro do Departamento de Fisiologia/IB, UNICAMP, pelo uso das instalações de seu laboratório, onde tive meu primeiro contato com a técnica de isolamento de ilhotas pancreáticas.

Ao Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada do Departamento de Histologia e Embriologia/IB pelo uso e disponibilização do microscópio.

A Profa. Dra. Maria Júlia Marques pelo treinamento e disponibilização do microscópio confocal a laser.

Ao Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini pelo uso de seu fotomicroscópio.

A empresa Paulo's pela doação das fitas de glicemia.

Aos animais, meu enorme respeito e agradecimento por permitirem o desenvolvimento científico deste trabalho.

A FAPESP pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	19
RESUMO	21
ABSTRACT	22
INTRODUÇÃO	23
1. O DIABETES MELLITUS	25
2. MODELOS EXPERIMENTAIS DE DIABETES AUTO-IMUNE ESPONTÂNEO	29
2.1 RATOS BB	29
2.2 CAMUNDONGO NOD (DIABÉTICO NÃO OBESO)	30
3. IMUNOREGULAÇÃO, CITOCINAS E DESTRUÇÃO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS	34
4. APOPTOSE E A DESTRUÇÃO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS	37
OBJETIVOS	45
MATERIAL E MÉTODOS	49
1. ANIMAIS	51
2. GRUPOS EXPERIMENTAIS	52
2.1. CAMUNDONGOS NOD	53
2.2. CAMUNDONGOS CBA/J	53
3. DIAGNÓSTICO DO DIABETES	56
4. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS	56
5. ANÁLISE MORFOLÓGICA	57
6. ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS	61
7. VIABILIDADE DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS RECÉM ISOLADAS	62
8. IMUNOISTOQUÍMICA	63
9. REAÇÃO DE FEULGEN PARA DETECÇÃO DE APOPTOSE	64
10. TÉCNICA TUNEL PARA DETECÇÃO DE APOPTOSE	65
11. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL (RNAT)	66
12. ANÁLISE DO RNA TOTAL EXTRAÍDO	67
13. TRANSCRIÇÃO REVERSA DO RNA TOTAL EXTRAÍDO (cDNA)	68
14. AMPLIFICAÇÃO DE cDNA POR REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR)	69

15. ANÁLISE DOS PRODUTOS DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	71
16. ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DO RNA MENSAGEIRO	72
17. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	72
<u>RESULTADOS</u>	<u>73</u>
1. ANÁLISE MORFOLÓGICA: PERFIL E EVOLUÇÃO DA INSULITE	75
2. DESENVOLVIMENTO DA INSULITE IDADE-DEPENDENTE EM CAMUNDONGOS NOD FÊMEAS	76
3. VIABILIDADE DE ILHOTAS PANCREÁTICAS RECÉM ISOLADAS	86
4. REAÇÃO DE FEULGEN	86
5. TÉCNICA TUNEL	87
6. RT-PCR SEMI-QUANTITATIVO	99
6.1. EXPRESSÃO DE GENE ESTRUTURAL (CICLOFILINA) NAS AMOSTRAS DE MRNA	99
6.2. EXPRESSÃO MOLECULAR DE CITOCINAS E COMPONENTES EM CAMUNDONGOS NOD NÃO DIABÉTICOS E CBA/J.	99
6.2.1. Ilhotas Isoladas	99
6.2.2. Pâncreas	104
6.2.3. Sangue Periférico	108
6.2.4. Baço	112
6.3. EXPRESSÃO MOLECULAR DE CITOCINAS E COMPONENTES DE APOPTOSE EM SANGUE PERIFÉRICO, BAÇO E PÂNCREAS DE CAMUNDONGOS NOD DIABÉTICOS.	116
6.3.1. Células sangüíneas periféricas	116
6.3.2. Baço	117
6.3.3. Pâncreas	119
<u>DISCUSSÃO</u>	<u>121</u>
<u>CONCLUSÕES</u>	<u>143</u>
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>147</u>

ABREVIATURAS

Ad	Grupo NOD - diabéticos
APC	Célula apresentadora de antígeno
BB	Ratos “Bio Breeding”
Bc	Grupo controle – CBA/j
Bn	Grupo NOD – não diabéticos
BSA	Albumina sérica bovina
CLT	Linfócito T citotóxico
cDNA	DNA complementar
DM-1	Diabetes Mellitus tipo 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Fas-L	Fas-ligante
GAD	“Glutamic acid decarboxylase” (descarboxilase do ácido glutâmico)
HE	Hematoxilina e eosina
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
ICA	“Islet cell antibodies” (anticorpos anti-ilhota pancreática)
IAA	“Insulin autoantibodies” (auto-anticorpos anti-insulina)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NOD:	Diabético não obeso
NK	Células “natural killer”
PBS	Solução salina fosfatada tamponada
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
RNAT	Ácido ribonucleico total
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase após transcrição reversa
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TCR	Receptor de linfócitos T
Th	Linfócito T auxiliar
Th1	Linfócito T auxiliar fenótipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar fenótipo 2
TUNEL	“Terminal Desoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick-End Labelling”
UA	Unidades Arbitrárias

RESUMO

O diabetes mellitus do tipo 1 resulta da destruição autoimune das células β da ilhota pancreática. O camundongo NOD desenvolve o diabetes tipo 1 espontaneamente sendo utilizado como modelo para a expressão auto-imune dessa doença em humanos. O processo inflamatório das ilhotas pancreáticas (insulite), que precede a destruição das células β , tem início por volta da 4ª semana de vida tanto em machos quanto em fêmeas. Nestes animais a incidência do diabetes é predominante em fêmeas (com início ao redor da 15ª semana) variando entre 60-90% e 10-20% em machos até 30 semanas de vida. A infiltração das ilhotas pancreáticas por células do sistema imune, seguida pela perda das células β produtoras de insulina é o aspecto histológico característico do diabetes tipo 1. Este pode envolver o contato entre células efectoras (linfócitos T CD4+ e CD8+) e células-alvo (ilhota) resultando na liberação de mediadores solúveis. Citocinas produzidas pelas células ativadas no infiltrado inflamatório são os prováveis agentes da perda de função e destruição das células da ilhota e do diabetes. Linfócitos Th1 produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IFN- γ TNF- α contribuindo para patogênese do diabetes tipo I. Além disso, a apoptose das células β tem sido associada com a manifestação do diabetes tanto em modelos experimentais como em humanos. Vários estudos implicam Fas, Fas-L, perforinas e TNF- α como efetores da morte por apoptose das ilhotas. No presente trabalho analisamos a expressão gênica de citocinas e componentes apoptóticos em ilhotas isoladas, pâncreas, sangue periférico e baço de camundongos NOD não diabéticos com idades entre 2-28 semanas de vida e diabéticos. Camundongos da linhagem CBA/j foram usados como controle. A detecção de apoptose *in situ* foi realizada pelas técnicas de Feulgen e TUNEL, morfometria para análise dos graus de insulite e imunoistoquímica para identificação do infiltrado inflamatório. Os resultados confirmam a presença de citocinas pró-inflamatórias em ilhotas isoladas por todo período de vida do animal. Estes dados foram correlacionados com a presença de apoptose (detectada pelas técnicas de Feulgen e TUNEL), análise da extensão da insulite e fenotipagem do infiltrado com o avanço do processo inflamatório e envelhecimento do animal. Além disso, o aumento da expressão de Fas, Fas-L e Bcl-w nos animais com intenso processo inflamatório sugere a apoptose como ocorrência de mecanismos efetores que, associada à expressão de citocinas pró-inflamatórias, correlacionam-se com o avanço dos estágios do processo inflamatório na ilhota pancreática no camundongo NOD.

ABSTRACT

Type 1 diabetes results from specific autoimmune destruction of beta cells in pancreatic islets. Non obese diabetic (NOD) mice develop type 1 diabetes spontaneously and is used as animal model for human insulin dependent diabetes mellitus. Inflammation of pancreatic islet (insulitis) that precedes beta cell destruction begins at about 4 weeks of age in both female and male NOD mice. However, there is a remarkable gender disparity in the cumulative incidence of diabetes: 60-90% of females and only 10-20% of males by 30 weeks of age. Diabetes-prone female NOD mice develop diabetes from as early 15 weeks of age. Infiltration of pancreatic islet by immune/inflammatory cells (insulitis), followed by loss of the insulin producing beta cells is the histological feature of type 1 diabetes. This may involve direct contacts between infiltrating monocytic/lymphocytic cells (effectors), including CD4⁺ and CD8⁺ T cells and islet beta cells (targets) and/or may result from the release of soluble mediators from effector cells. Cytokines produced by infiltrating activated cells are candidate mediators of impaired function and destruction of islet beta cells. Th1 cells produce interleukin 2 (IL-2), interferon γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor α (TNF- α) contributing to the pathogenesis of type 1 diabetes. Moreover, β -cell apoptosis has been associated with diabetes onset in both animals models and recently diagnosed diabetic patients. Several apoptotic pathways have been implicated in islet destruction, including Fas, perforins, and TNF- α . Many studies have alternatively considered Fas-ligand (Fas-L), perforins, or TNF- α as effectors of apoptotic islet cell death. Therefore, we analyzed by reverse transcriptase reaction (RT-PCR) whether the gene expression of these cytokines and apoptotic components is detectable in pancreatic islets of NOD mice aging 2 to 28 weeks (prediabetic), using isolated islet of CBA/j as a non related animal control. Our results confirm the presence of TNF- α and IFN- γ message in NOD islets at the very early stage of inflammation correlating the enhancement of their expression with destructive insulitis. Furthermore, Fas, Fas-L and Bcl-w genes in islets of NOD mice were detectable at 2 weeks of age and enhance of their gene expression was associated with increase of islet infiltrating cells. On the other hand, these apoptotic components were expressed at low levels in islet of CBA/j. These results suggest that expression of mRNA for Fas, Fas-L and Bcl-w correlates with the stages of the islet inflammation in NOD mice.

INTRODUÇÃO

1. O Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus é definido como desordem metabólica de múltipla etiologia caracterizada por hiperglicemia crônica, que afeta o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999), envolvendo a produção e/ou ação da insulina. Vários processos patogênicos estão envolvidos no desenvolvimento do diabetes, incluindo a destruição das células β pancreáticas com conseqüente deficiência de insulina e outros processos que resultam na resistência à ação deste hormônio (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999). Considerando-se as características etiológicas do diabetes mellitus e seus mecanismos desencadeantes, essa doença é classificada em dois tipos: diabetes tipo 1A: auto-imune e 1B: idiopático (DM-1), e tipo 2, (DM-2) (ALBERTI & ZIMMET, 1998).

O início do DM-1 auto-imune é na maior parte das vezes, agudo, acometendo mais freqüentemente crianças e adolescentes (EISENBARTH, *et al.*, 1986). 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 (KIKUTANI & MAKINO, 1992).

Diversas evidências apontam para a origem auto-imune do DM-1 (BOTTAZZO *et al.*, 1994). Os autores descrevem auto-anticorpos 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 (PALMER *et al.*, 1981).

Enfatizando-se o conceito do DM-1 ser classificada como doença auto-imune e evidenciando-se a destruição seletiva das células β das ilhotas de pancreáticas pela presença de clones auto-reativos de linfócitos T, pode-se presumir que o processo auto-imune seria decorrente da perda da tolerância de linfócitos a determinados constituintes desta célula (ROSSINI *et al.*, 1993; SCHWARTZ, 1993). Entretanto, admite-se que outros mecanismos imunopatogênicos possam estar envolvidos, tornando seu entendimento complexo. Estudos do DM-1 auto-imune em modelos animais experimentais, fortalecem a hipótese da ocorrência de desequilíbrio entre sub-populações de células T efectoras (BACH, 1994 e 1997).

A perda da tolerância imunológica no DM-1 tem sido amplamente estudada em modelos experimentais murinos, cogitando-se a existência de anormalidades da tolerância central tímica e periférica. Assim, em decorrência da falha no bloqueio, anergia e supressão periférica da reatividade anti-células β , ocorrem respostas que são direcionadas, coordenadas por linfócitos T CD4 + e direcionadas a constituintes da células β , que são processados e expostos por células apresentadoras de antígenos (APC), favorecendo deste modo a manifestação do DM-1 (LAFFERTY, 1997).

Vários auto-antígenos constituintes da célula β foram descritos com auxílio de auto-anticorpos circulantes. Esses antígenos são conhecidos como marcadores da destruição imune e, podem ser identificados em estágios precoces do DM-1 quando a

hiperglicemia diabética em jejum é inicialmente detectada. Os principais auto-antígenos do DM-1 são GAD 65, GAD 67 (“Glutamic acid decarboxylase”) e insulina, os quais estão presentes em 85-90% dos indivíduos com DM-1 (KELLER, 1990; HARRISON *et al.*, 1992; ATKINSON *et al.*, 1992; HONEYMAN *et al.*, 1993; DURINOVICH-BELLÓ *et al.*, 1996).

Por outro lado, considera-se que a expressão de peptídeos imunogênicos na célula β , induzidos por toxinas e infecções virais, poderiam aumentar a suscetibilidade a reações auto-imunes (BACH, 1994). Além disso, a predisposição genética do indivíduo para a destruição auto-imune, juntamente com fatores ambientais, parece favorecer o desencadeamento dos mecanismos de auto-imunidade.

O papel do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) na predisposição genética ao DM-1 está estabelecida com a associação de genes I-A e I-E com a manifestação dessa doença. Esses genes influem no desenvolvimento do DM-1 através da seleção positiva de clones auto-reativos no timo (presença de alelos de suscetibilidade); pela ausência de seleção negativa no timo (falta de alelos protetores para delir clones auto-reativos) e, ainda pela ausência de anergia periférica de clones auto-reativos (gradiente de afinidade do MHC com o complexo peptídio/TCR e ausência de linfócitos T supressores restritos ao MHC) (NEPOM & ERLICH, 1991; ATKINSON, 1997).

Diversos autores propõem que variados fatores de agressão, como citocinas liberadas pelos linfócitos T, atuem na destruição da célula β pancreática (CORBETT *et al.*, 1993; EIZIRIK *et al.*, 1993; POCIOT *et al.*, 1994; EIZIRIK *et al.*, 1996). Tais

moléculas mediarão o processo inflamatório local, alterando a função das células β e contribuindo para a destruição das ilhotas pancreáticas. Embora os mecanismos de destruição das ilhotas mediados por citocinas não estejam ainda bem caracterizados, trabalhos recentes têm evidenciado que os efeitos citotóxicos dessas moléculas sobre as ilhotas pancreáticas induzem a apoptose das células β (IWAHASHI *et al.*, 1996; RABINOVITCH *et al.*, 1998; THOMAS *et al.*, 1999).

Finalizando, é importante destacar que grande parte das informações que sustentam a hipótese da participação dos linfócitos T na imunopatogênese do DM-1 decorre de investigação de modelos animais geneticamente predispostos a essa doença, como os ratos da linhagem BB (Bio-Breeding) e os camundongos da linhagem NOD (diabético não obeso).

2. Modelos Experimentais de Diabetes auto-imune Espontâneo

2.1 Ratos BB

O rato Bio-Breeding (BB) é um modelo espontâneo de diabetes auto-imune que foi descoberto no Canadá por NAKHOODA *et al* em 1977, sendo denominado inicialmente como BB/DP (diabetes pronos). Esses animais desenvolvem DM espontâneo entre 8^a e 16^a semanas de vida. A frequência de manifestação ocorre tanto em machos quanto em fêmeas e a incidência da doença varia nas diversas colônias estabelecidas no mundo, ocorrendo por volta de 40 a 70% nesses animais.

O estabelecimento clínico do diabetes mellitus nos ratos BB é precedido por um período de pré-diabetes, caracterizado por insulite, onde se verifica a presença de anticorpos séricos anti-ilhota pancreática, similarmente ao que ocorre nos camundongos NOD. A infiltração de células inflamatórias nas ilhotas pancreáticas desses animais é constituída principalmente de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, podendo-se encontrar também macrófagos e linfócitos B (SEEMAYER *et al.*, 1982).

Além disso, esses animais desenvolvem outras doenças auto-imunes, como tiroidite, e expressam níveis séricos elevados de auto-anticorpos órgão específicos como anti-tireoglobulina, anti-mucosa gástrica e antimúsculo liso (YALE & MARLISS, 1982).

2.2 Camundongo NOD (*diabético não obeso*)

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

A colônia NOD/Shi demonstrou prevalência de diabetes entre 70-80% para fêmeas e 20% para machos. Contudo, diferenças na manifestação do diabetes entre diversas colônias têm sido relatadas (POZZILLI *et al.*, 1989). Fatores ambientais como dieta e exposição a vírus têm sido considerados como causa das diferenças de incidência.

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

O DM-1 clínico neste modelo animal desenvolve-se espontaneamente entre a 16^a e 24^a semana de vida, mais freqüentemente em fêmeas. Polidipsia, poliúria, glicosúria elevada, hiperglicemia e deficiência de insulina são observados nestes animais, acompanhados de uma rápida perda de peso (MAKINO *et al.*, 1980). A remissão espontânea raramente é observada com óbito dos animais diabéticos entre 4 e 8 semanas

depois da manifestação do diabetes, a menos que recebam terapia de reposição com insulina. A prevalência da doença varia nas diversas colônias, entre 5 e 90% nas fêmeas e 0 e 50% nos machos. A colônia NOD estabelecida no centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB) tem mantido, em condições livres de patógenos, prevalência de diabetes entre 60%-90% nas fêmeas e 5%-10% nos machos.

O diabetes clínico nesses animais é, como no homem, precedido por uma fase pré-diabética (insulite), caracterizada pela infiltração progressiva de células mononucleares nas ilhotas pancreáticas (inicialmente linfócitos T CD4⁺ e posteriormente linfócitos T CD8⁺), que se inicia ao redor do primeiro mês de vida. A segunda fase é caracterizada pela destruição das células β produtoras de insulina e manifestação do diabetes (KIKUTANI & MAKINO, 1992).

A maioria das células mononucleares infiltradas no interior das ilhotas pancreáticas é representada por linfócitos T, sub-tipo Th-1. Contudo, pode-se verificar, em menor extensão, a presença de linfócitos B, macrófagos e células NK (KAY *et al.*, 1997; WONG *et al.*, 1997). Embora a maioria das células infiltradas sejam linfócitos T CD4⁺, poucos linfócitos T CD8⁺ também são observados. Nesses animais, a infiltração de células mononucleares é observada nas glândulas submandibulares, lacrimais e tiróide tanto em fêmeas como em machos, por volta de 9 semanas de idade (KIKUTANI & MAKINO, 1992).

Durante o decurso da doença no camundongo NOD células CD4⁺ e CD8⁺ exercem papel sinérgico, uma vez que o diabetes apenas se desenvolverá na presença de

ambos subtipos (WONG, 1997). Portanto, linfócitos T CD4⁺ podem ter papel essencial, não somente no início da insulite, como também na progressão do diabetes, uma vez que sua eliminação através da utilização de anticorpos monoclonais anti-CD4⁺ pode suprimir a insulite e, conseqüentemente, o aparecimento do diabetes no camundongo NOD (SHIZURU *et al.*, 1988). Linfócitos CD4⁺ são predominantemente observados na fase precoce da infiltração (periinsular), onde são requeridos para os processos de expansão clonal através da produção de IL-2, aumentado assim, a ativação de linfócitos T CD8⁺ (WONG *et al.*, 1997). A proporção de células CD8⁺ no infiltrado de células T é substancialmente aumentada com o tempo de destruição das células produtoras de insulina (BEDOSSA *et al.*, 1989). Esse fato pode ser explicado pelo sinergismo de ambas as células favorecendo a manifestação do diabetes, sugerindo que linfócitos T CD4⁺ podem estar envolvidos no início da insulite e no recrutamento de linfócitos T CD8⁺ (KIKUTANI & MAKINO, 1992).

Por outro lado, existem evidências do papel dos linfócitos T CD8⁺ na fase efetora final da patogênese do diabetes, independente da presença de linfócitos T CD4⁺ (NAGATA *et al.*, 1994) (WONG *et al.*, 1996). Dentre os mecanismos de destruição das ilhotas pancreáticas pelos de linfócitos T CD8⁺ estão a capacidade de realizar funções citotóxicas através da utilização de grânulos de perforinas e granzimas bem como indução de apoptose através da interação Fas/Fas-L (CHERVONSKY *et al.*, 1997; INGELSSON *et al.*, 1998, EIZIRIK & MANDRUP-POULSEN, 2001).

Os linfócitos T auto-reativos demonstram ter papel crucial no aparecimento do diabetes nesses animais (TISCH & McDEVITT, 1996) e a ineficiência de sua eliminação pode contribuir para a manifestação da doença. Assim, observou-se que a prevenção do DM espontâneo no camundongo NOD pode ser obtida através da timectomia neonatal. Além disso, em camundongos NOD/nude (atímicos), verifica-se redução da incidência de insulite sem manifestação do diabetes. Complementando essas observações, autores descreveram que a administração de imunossupressores com função direcionada preferencialmente para linfócitos T e administração de anticorpos anti-CD3+ (HAYWARD & SCHREIBER, 1989) são capazes de suprimir a ocorrência do DM auto-imune espontâneo (O' REILLY *et al.*, 1991; BACH, 1994; KAY *et al.*, 1997; WONG *et al.*, 1997).

Muitos estudos têm demonstrado que o DM-1 pode ser induzido através da transferência de células recém isoladas de baço de camundongos NOD diabéticos para camundongos NOD jovens não diabéticos, camundongos NOD irradiados e camundongos NOD-SCID, os quais não desenvolvem diabetes (MILLER *et al.*, 1988; ROHANE *et al.*, 1995; WONG & JANEWAY 1997).

No conjunto, essas observações têm reforçado a hipótese de que direta ou indiretamente tanto a insulite como o diabetes são de etiologia auto-imune e dependente de linfócitos T. 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⁺, existem evidências da presença de mecanismos efetores finais apoptóticos pelos quais essas células são destruídas.

3. Imunoregulação, Citocinas e Destruição das ilhotas pancreáticas

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 auto-imunes mediando a inflamação através da resposta imune celular, representada pelos linfócitos T citotóxicos, “natural killer” 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, IL-10 (RABINOVITCH, 1998). No contexto dos possíveis mecanismos envolvidos nas desordens auto-imunes, 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 auto-imune que ocorrem na linhagem de camundongos NOD.

O conceito que a destruição das células β ocorre quando há predomínio de citocinas do tipo Th-1 sobre Th-2 foi obtido através da transferência de linfócitos CD4⁺ obtidos de camundongos NOD tratados pela administração de superantígenos incorporados a adjuvante completo de Freund-CFA. A transferência adotiva destes linfócitos para animais NOD evitou a ocorrência do diabetes, em virtude de provável desvio da resposta imune de Th1 para Th2, devido a ação do superantígeno, com

liberação de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10) (KAWAMURA *et al.*, 1993; QIN *et al.*, 1993). Postulou-se, então que os mecanismos deste tipo de proteção envolveriam ação seletiva sobre certas sub-populações linfocitárias T CD4+, desviando a resposta imune de padrão Th1 para Th2 com ampliação da resposta humoral, modulando a resposta celular no sentido de retorno a homeostasia imune.

O padrão de resposta observado em pacientes com DM-1 bem como camundongos NOD e ratos BB são marcados pelo predomínio de citocinas características da resposta Th1 (RABINOVITCH, 1998; HARTEMANN *et al.*, 1999). Acredita-se que haja 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 (CAMPBELL *et al.* 1988; PUKEL *et al.* 1988; BRADLEY *et al.*, 1999; GURLO *et al.*, 1999).

No campo experimental, diversos autores têm estudado os efeitos *in vitro* de citocinas como IL-1, TNF- α , TNF- β e IFN- γ utilizando ilhotas isoladas de modelos animais. Nas ilhotas pancreáticas recém isoladas, os efeitos dessas citocinas têm sido amplamente estudados (RABINOVITCH *et al.*, 1994 e 1998, RABINOVITCH & SUAREZ-PINZON, 1998) mostrando que são capazes de, isoladamente, inibir a liberação de insulina pelas ilhotas pancreáticas e, combinadas, de induzir a fragmentação do DNA e destruição das células β pancreáticas (IWAHASHI *et al.*, 1996; RABINOVITCH *et al.*, 1994 e 1998, RABINOVITCH, A., SUAREZ-PINZON, 1988). Contudo, estudos *in vitro* possivelmente não representem a magnitude da fisiopatologia da lesão pancreática que ocorre *in vivo*. A

simples presença da citocina na lesão da insulite não identifica seu papel na patogênese do DM-1, uma vez que esta pode ter função pro-inflamatória, ou mesmo antiinflamatória regulando, desta maneira, o processo inflamatório (RABINOVITCH & SUAREZ-PINZON, 1998).

No camundongo NOD, a expressão de IFN- γ nas células infiltradas das ilhotas foi relacionada com a insulite destrutiva (TOYODA *et al.*, 1994; RABINOVITCH *et al.*, 1994; MUIR *et al.*, 1995). Essa citocina, assim como TNF- β , tem suas expressões 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 (HIRAI *et al.*, 2000). Reforçando ainda a importância da realização de estudos *in vivo*, pode-se observar em experimentos de expressão transgênica de IFN- γ em células β de camundongos normais o papel citotóxico do IFN- γ nas células β , e esses dados demonstraram a ocorrência da insulite mediada por células imunes, destruição das ilhotas pancreáticas e manifestação do DM-1 (SARVETNICK *et al.*, 1990).

Como referido anteriormente, a 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 (RABINOVITCH *et al.*, 1994 e 1998, RABINOVITCH & SUAREZ-PINZON. 1998; GURLO *et al.*, 1999; THOMAS *et al.*, 2002). Sendo assim, pode-se sugerir que a

destruição das células β ocorre por apoptose onde a fragmentação de DNA típica tem sido observada em ilhotas pancreáticas tratadas com a combinação de IL-1, TNF- α e IFN- γ (RABINOVITCH *et al.*, 1994 YAMADA *et al.*, 1996; SUAREZ-PINZON *et al.*, 1999; THOMAS *et al.*, 1999).

Baseando-se em experimentos que envolvem o camundongo NOD, outros mediadores também são capazes de efetuar a destruição das células β . Dentre os mediadores envolvidos nessa destruição incluem-se: conteúdos granulares das células T CD8+, como perforinas e granzimas, moléculas de superfície como Fas, Fas-L, TNF-R e outros membros da família TNF, reconhecidos por induzir a fragmentação do DNA e mudanças morfológicas características da apoptose através de sinalização de receptores que envolvem a ativação de proteases ou caspases (INGELSSON *et al.*, 1998; THOMAS & KAY, 2000).

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

4. Apoptose e a Destruição das Ilhotas Pancreáticas

Diversos autores têm sugerido a apoptose como um dos mecanismos efetores da lesão da ilhota pancreática (EIZIRIK & MANDRUP-POULSEN, 2001). Paralelamente, as respostas imunes são diretamente controladas por mecanismos apoptóticos envolvidos

na regulação do repertório de células T (VIGNAUX & GOLSTEIN, 1994; LENARDO M.J, 1997; SCAFFIDI *et al.*, 1999).

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

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

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

O sistema Fas/Fas-L está envolvido nesse processo, chamado morte celular induzida pela ativação, a qual está relacionada com expressão CD95-CD95L em linfócitos

ativados, sugerindo que a deleção clonal periférica é o principal mecanismo responsável para manutenção da tolerância e prevenção dos processos auto-imunes (VIGAUX & GOLSTEIN, 1994; GIORDANO *et al.*, 1995).

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

A molécula Fas (Apo-1/CD95) é uma proteína transmembrana expressa constitutivamente em algumas células e tecidos que atua como receptor para a molécula Fas-L, proteína de superfície, que pode estar expressa em alguns tecidos linfóides e não-linfóides (GRANVILLE *et al.*, 1998). A ligação de Fas-L à molécula Fas resulta na sinalização intracitoplasmática da célula "receptora", onde ocorrem diversas alterações moleculares que resultam na de apoptose dessa célula. Essas moléculas são responsáveis pela deleção de células auto-reativas do sistema imune e pela atividade citolítica dos linfócitos T CD8⁺ (NAGATA, 1997).

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

Considerando as diferentes vias pelas quais os linfócitos podem destruir as ilhotas pancreáticas, verificou-se que diversos mecanismos provavelmente contribuem para morte das células β .

A interleucina-1 β , por exemplo, parecer induzir apoptose em ilhotas através da liberação de radicais livres, como o óxido nítrico, efetivando a ativação intra-celular da cascata de morte celular programada (LIU *et al.*, 2000). Esta citocina pode, também, ativar moléculas sinalizadoras da morte celular como Fas e TNFR (NAGATA, 1997).

A citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8+, uma das principais formas de destruição das ilhotas pancreáticas, efetua-se através de apoptose induzida por mediadores como perforinas, óxido nítrico, Fas-L, e TNF (KAGI *et al.*, 1997).

Estes mediadores citotóxicos são indutores da fragmentação do DNA e de mudanças morfológicas características da apoptose. Após a ativação de caspases (“cyteinyll aspartate-specific proteinases”), iniciam uma série de clivagens auto-catalíticas utilizando como substrato proteínas envolvidas na homeostase e sobrevivência celular, provocando apoptose (GRANVILLE *et al.*, 1998; INGELSSON *et al.*, 1998).

A hipótese do envolvimento da interação via Fas/Fas-L no desenvolvimento do diabetes auto-imune recebeu importante subsídio através das evidências apresentadas por YAMADA *et al.* (1996); CHERVONSKY *et al.* (1997) e ITOH *et al.* (1997).

YAMADA e colaboradores (1996) realizaram estudo de indução da expressão de Fas em ilhotas pancreáticas de camundongos da linhagem Balb/c utilizando a citocina IL-

1 β . Os resultados deste trabalho forneceram as primeiras evidências de que as células da ilhota pancreática expressam Fas quando expostas a citocinas.

CHERVONSKY *et al.* 1997 e ITOH *et al.*, 1997 estudaram a expressão de Fas em modelo variante do camundongo NOD com deficiência de Fas (camundongo MRL-*lpr/lpr*), o qual não desenvolve diabetes e apresenta resistência a transferência adotiva. Concluíram, que a expressão de Fas pelas células β era necessário para sua destruição durante o curso do processo da insulite. No conjunto, essas observações reforçam a hipótese de que a interação Fas/Fas-L desempenha papel importante no processo de destruição das ilhotas pancreáticas e tem dado suporte a novas investigações do envolvimento deste sistema no DM-1.

Frente a esses dados, vários trabalhos foram realizados na tentativa de evidenciar a influência Fas na indução da apoptose no processo de insulite e destruição das ilhotas pancreáticas. SUAREZ-PINZON *et al.*, 2000, verificaram a expressão de Fas associado a expressão de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 α , TNF- α e IFN- γ) em ilhotas transplantadas. Contudo, em estudos adicionais esses autores observaram que o aumento da expressão de Fas na maioria das células β das ilhotas pancreáticas de camundongo NOD não estavam associados à manifestação do diabetes. Por sua vez, THOMAS *et al.* (1999) mostraram a expressão de Fas apenas em pequeno número de células β , sugerindo que a destruição é parcialmente mediada por esta molécula.

Dentro deste contexto, ALLISON *et al.* (1998); KIM *et al.* (1999) publicaram resultados que contrariam estudos anteriores e demonstram que a interação Fas/Fas-L não

se relaciona com o desenvolvimento do diabetes auto-imune do camundongo NOD e demonstram que Fas-L não é a molécula efetora na morte das células β e do diabetes auto-imune.

Considerando as divergências expostas e na tentativa de resolver a questão que envolve o papel do Fas mediando a apoptose no diabetes auto-imune, KIM *et al.* (2000) conduziram suas pesquisas baseando-se na hipótese de que a resistência para se transferir o diabetes no camundongo NOD-*lpr/lpr* deve-se a anormalidades (T CD4⁺/CD8⁻) dos linfócitos e não na supressão de Fas neste modelo. Assim, esses autores concluíram que Fas-L não é a molécula efetora na destruição das células β e que os camundongos NOD-*lpr/lpr* são resistentes a transferência do diabetes em virtude da expressão constitutiva de Fas-L em seus linfócitos anormais, exercendo assim, citotoxicidade em linfócitos diabetogênicos.

Por outro lado, a possibilidade de que anormalidades fenotípicas do camundongo NOD-*lpr/lpr* podem vir a complicar a interpretação de resultados foi rejeitada por SU *et al.* (2000) através de seus experimentos com camundongos depletados geneticamente de Fas e Fas-L, onde os experimentos foram capazes de prevenir o diabetes.

Posteriormente, SUAREZ-PINZON *et al.* (2000) verificaram em ilhotas enxertadas em camundongos NOD diabéticos, a diminuição da destruição auto-imune através da neutralização do Fas-L pela administração de anticorpos monoclonais. Deste modo, os achados acima são corroborados pela observação de que o mecanismo mediado pela interação Fas/Fas-L está envolvido na destruição auto-imune das células β .

Apesar de resultados contraditórios envolvendo o papel patogênico do sistema Fas/Fas-L no diabetes auto-imune, e ainda a persistência de dúvidas relativas à participação direta das moléculas Fas e Fas-L no processo de indução de apoptose no diabetes auto-imune, utilizando camundongos NOD geneticamente manipulados ou não, todos estes estudos são suficientes para sugerir o possível envolvimento deste sistema na evolução e instalação da doença.

OBJETIVOS

1. Caracterizar morfológicamente os graus de insulite em camundongos da linhagem NOD pré-diabéticos e diabéticos.
2. Verificar a dinâmica da expressão gênica de componentes de apoptose (Fas, Fas-Ligante e Bcl-w) e de citocinas pró-inflamatórias (IL-2; TNF- α INF- γ), em ilhotas pancreáticas, células sanguíneas periféricas, baços e pâncreas de camundongos NOD-Uni com 2, 4, 8, 14 e 28 semanas de vida e diabéticos.
3. Associar a dinâmica da expressão de Fas, Fas-Ligante e Bcl-w e citocinas pró-inflamatórias (IL-2; TNF- α INF- γ) em ilhotas pancreáticas com a instalação e desenvolvimento do DM-1.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Os camundongos utilizados neste estudo eram obtidos da colônia NOD proveniente do INSERM U-25, Hospital Necker (Paris, França), implantada e mantida pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB) desde 1994, em condições livres de patógenos. A frequência do DM-1 clínico espontâneo registrado na colônia de camundongos da NOD-Uni do CEMIB a partir da sua implantação, tem se mantido ao redor de 60% entre as fêmeas e de 5% entre os machos, considerando-se a população dos animais com no máximo 25 semanas de idade, revelando-se similar à da colônia de origem (PAVIN & ZOLLNER, 1994).

Eram empregados 84 camundongos NOD fêmeas e 79 CBA/j fêmeas, retiradas do CEMIB com 2 e 4 semanas de idade. A partir de seu recebimento, os animais eram mantidos no biotério do Laboratório de Imunologia Clínica DCM/FCM/UNICAMP sob condições sanitárias livres de patógenos conhecidos, com controle de luz e temperatura, recebendo ração e água *ad libitum*. Os animais eram sacrificados ao completarem 2, 4, 8, 14 e 28 semanas de vida, de acordo com o protocolo estabelecido para cada grupo experimental, ou quando apresentassem glicosúria positiva por duas dosagens consecutivas e glicemia acima de 300 mg/dl (ITOH *et al.*, 1997; JUN *et al.*, 1999).

2. Grupos Experimentais

Para a análise morfológica do pâncreas e o estudo da expressão de mRNA de citocinas, Fas, Fas-L e Bcl-w em ilhotas pancreáticas, os animais eram divididos em dois grupos A e B, sendo o grupo A destinado à remoção do pâncreas e o grupo B destinado ao isolamento de ilhotas pancreáticas (Tabela 1).

Animais do grupo A

Os animais do grupo A, eram divididos em três grupos: An, Ac e Ad.

Grupo An: camundongos da linhagem NOD com o tempo de sobrevivência de 2, 4, 8, 14 e 28 semanas de vida, não diabéticos (Tabela 1, p.55).

Grupo Ac: camundongos da linhagem CBA/j, os quais não desenvolvem o diabetes, eram utilizados como controle do grupo An (NOD). Esses animais eram mantidos no mesmo tempo de sobrevivência do grupo An (2, 4, 8, 14 e 28 semanas de vida).

Grupo Ad: camundongos da linhagem NOD diabéticos (Tabela 1, p.55).

Animais do grupo B

Os animais do grupo B eram divididos nos grupos Bn e Bc.

Grupo Bn: camundongos da linhagem NOD, sacrificados com 2, 4, 8, 14 e 28 semanas de vida, tinham suas ilhotas pancreáticas isoladas.

Grupo Bc: camundongos da linhagem CBA/j, utilizados como controle do grupo Bn (NOD), mantidos no mesmo tempo de sobrevivência deste (2, 4, 8, 14 e 28 semanas de vida - Tabela 1, p.55).

2.1. Camundongos NOD

Para o estudo dos camundongos NOD com 4, 8, 14 semanas de vida eram empregados 42 fêmeas divididas em 3 grupos experimentais de 14 fêmeas cada um. Cada um dos 3 grupos era subdividido em dois grupos, A e B, compostos de 7 animais cada.

No estudo dos animais com 2 semanas de vidas eram empregados 21 camundongos NOD fêmeas divididas em dois grupos, A e B, compostos de 7 e 14 animais cada.

Para o estudo da manifestação do diabetes, eram empregados 21 camundongos NOD fêmeas mantidos até completarem 28 semanas de idade. Os sacrifícios ocorreram quando os animais apresentaram glicemias iguais ou superiores a 300mg/dl (17mM/L) ou quando completaram 28 semanas de vida. Os animais que manifestaram o diabetes eram transferidos para o grupo denominado **Ad** e animais que completaram 28 semanas mas não manifestaram diabetes eram subdivididos também em mais dois grupos, A e B compostos de 6 e 5 animais cada (Tabela 1, p.55).

2.2. Camundongos CBA/j

Para o estudo dos camundongos CBA/j (grupos Ac e Bc) com 4, 8, 14 e 28 semanas de vida eram empregados 56 fêmeas divididas em 4 grupos experimentais de 14 fêmeas cada um. Os 4 grupos eram subdivididos em dois grupos, A e B, compostos de 7 animais cada.

Para o estudo dos animais com 2 semanas de vidas eram empregados 23 camundongos CBA/j fêmeas divididas em dois grupos, A e B, compostos de 7 e 16 animais cada (Tabela 1, p.55).

Grupos	A	B	Tempo de Sacrifício
	An 2 n=7	Bn 2 n=14	2 semanas
	An 4 n=7	Bn 4 n=7	4 semanas
	An 8 n=7	Bn 8 n=7	8 semanas
	An 14 n=7	Bn 14 n=7	14 semanas
	An 28 n=6	Bn 28 n=5	28 semanas
	Ac 2 n=7	Bc 2 n=16	2 semanas
	Ac 4 n=7	Bc 4 n=7	4 semanas
	Ac 8 n=7	Bc 8 n=7	8 semanas
	Ac 14 n=7	Bc 14 n=7	14 semanas
	Ac 28 n=7	Bc 28 n=7	28 semanas
	Ad n= 10	-*-	Diabéticos

Tabela 1. Resumo dos grupos experimentais empregados e respectivos tempos de sacrifícios. Grupo A estudos histopatológicos do pâncreas (morfometria, imunoistoquímica, Feulgen, TUNEL). Grupo B estudos realizados em ilhotas isoladas (PCR de citocinas Th1 e componentes apoptóticos). An=NOD; Bn=NOD; Ac=CBA/j; Bc=CBA/j e Ad=NOD diabéticos.

3. Diagnóstico do Diabetes

A ocorrência do diabetes mellitus era monitorada em todos os animais a partir da sua retirada do CEMIB. Diariamente, entre 9 e 10 horas da manhã, era verificada a ocorrência de glicosúria empregando-se o teste da glicofita (Glicofita, Lilly). As glicemias eram monitoradas semanalmente em jejum através de glicosímetro Prestige LX® (Home Diagnostic, Inc. EUA) retirando-se amostra de sangue da veia caudal do animal. Os animais eram considerados diabéticos após constatação de glicosúria por dois dias consecutivos e confirmação da glicemia através de glicosímetro com valores de glicemia igual ou superior a 300 mg/dl (estabelecido no Laboratório de Imunologia Clínica e em concordância com ITOH *et al*, (1997).

4. Sacrifício dos Animais

Os animais, ao completarem as idades estipuladas (2, 4, 8, 14 e 28 semanas de vida), eram anestesiados com Pentobarbital sódico 3% (15 a 30mg/kg de peso corpóreo) e o sangue periférico coletado através de punção cardíaca. A seguir, o sangue era transferido para tubo plástico de 1,5 ml (livre de *RNAse*) contendo 20µl de EDTA e 300µl de 4M de tiocianato de guanidina e sarcosil 0,5% (ambos Gibco BRL, Life Technologies, EUA) para cada 200µl de sangue. Após este procedimento, realizava-se a remoção do pâncreas ou isolamento de ilhotas juntamente com a retirada do baço, o qual era armazenado em 500µl solução de lise conservadora de guanidina-sarcosyl.

Os animais que se apresentaram diabéticos antes de completado o tempo de sobrevida máxima (28 semanas de vida) eram sacrificados para remoção do pâncreas. Este órgão era depositado em cápsulas contendo meio de inclusão O.C.T (Tissue Tek Miles – EUA) e rapidamente congelados em nitrogênio líquido. A seguir eram conservados em “bio-freezer” a - 80°C até processamento histológico. Após este procedimento os pâncreas eram submetidos a criocortes para estudo morfológico, imunoistoquímica e técnica TUNEL, empregando-se cortes obtidos em criostato. O restante de tecido pancreático era conservado em guanidina-sarcosyl para futura extração de RNAT. O mesmo procedimento era empregado com todos os animais do grupo An e Ac ao final de cada período experimental previamente estipulado.

5. Análise Morfológica

A avaliação morfológica das ilhotas e caracterização do grau de insulite foi realizada nos pâncreas provenientes dos animais dos grupos: An 2 semanas (n=7), An 4 semanas (n=6), An 8 semanas (n=6), An 14 semanas (n=7), An 28 semanas (n=6), Ac - 2, 4, 8, 14 semanas (n=5), Ac 28 semanas (n=7); Ad (n=10).

Os pâncreas eram transferidos e posicionados no suporte do criostato (Leica, CM1850) de maneira a se obter a maior área possível de corte. Os cortes eram coletados em série de nove cortes consecutivos de 5µm de espessura e depositados em lâminas histológicas previamente silanizadas (γ Methacryl-Oxipropil-Methoxysilane - Sigma St Louis, EUA). Após a obtenção da primeira série de cortes, o pâncreas era desbastado 300µm e, a seguir, outra série de nove cortes era igualmente processada. Repetia-se este

procedimento outras seis vezes obtendo-se os conjuntos de lâminas representados no esquema 1 p.60.

As lâminas nº: 1, 4, 7, 10, 13 e 16 - grupos An, Ac, Ad obtidas através de criocortes eram corados pela técnica da hematoxilina e eosina, observadas em microscópio óptico (Axioscope, Zeiss, Darmstad-Germany), permitindo detectar a presença de infiltrado inflamatório em toda extensão do órgão. Os cortes nos quais se evidenciava a presença de infiltrado inflamatório eram classificados segundo o grau de insulite apresentado e o número total de ilhotas Langerhans contados. As lâminas subsequentes eram utilizadas para a caracterização linfocitária. Deste modo, para fenotipificação do infiltrado celular através da técnica de imunoistoquímica (CD3+) eram utilizadas as lâminas nº: 2, 5, 8, 11, 14 e 17 e para a técnica de Feulgen e TUNEL eram selecionadas as lâminas nº: 3, 6, 9, 12, 15.

A classificação utilizada nas ilhotas pancreáticas, segundo o grau de insulite apresentado, era realizada seguindo adaptações e atribuindo-lhes pelos critérios propostos por SIGNORE *et al.* (1989) e PAPACCIO, BACCARI & MEZZOGIORNO (1993).

0 = ilhota normal, na ausência de infiltrado.

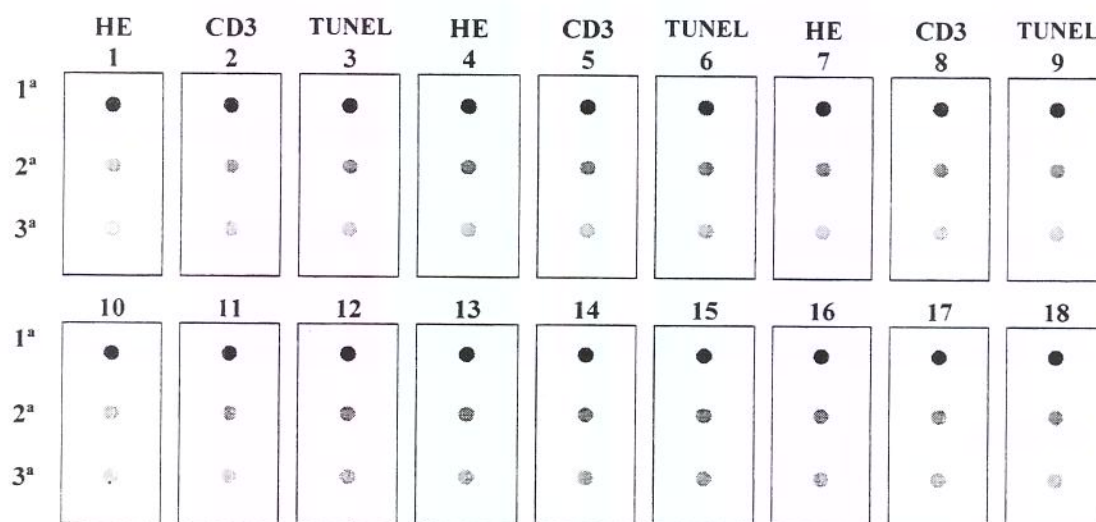
1 = peri-insulite, presença < 25% de infiltrado ao redor e no interior da ilhota.

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

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

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

As ilhotas eram contadas e classificadas por grau, em três planos de cortes diferentes por órgão. Os resultados eram representados pela média e desvio padrão referente relação número de ilhotas de cada grau/total de ilhotas contadas por animal, para cada grupo experimental.



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

6. 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, com adaptações quanto ao tempo de reação e concentração de collagenase, realizadas em nosso laboratório visando melhorar rendimento e viabilidade, conforme descrição a seguir.

Após anestesia, foi realizada abertura da cavidade abdominal e exposição do pâncreas. Após distensão e isolamento dos outros órgãos, o pâncreas era infundido com solução de Hanks, contendo 2mg/ml de collagenase (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA.) através de seringa de 1ml até o seu intumescimento. A seguir, o órgão era removido e transferido para uma placa de Petri onde sofria fragmentação suave com o auxílio de tesoura cirúrgica. A suspensão era transferida para tubo de ensaio vedado com rolha e encubado em banho térmico a 37°C durante 15 minutos. Decorrido esse período e sob o banho térmico, o tubo era agitado manualmente por aproximadamente 1 minuto, (tempo este controlado de acordo com a turgidez do material, indicativo de digestão enzimática) e mantido por mais 1 minuto em banho térmico para finalizar a digestão do órgão. Em seguida, o conteúdo era transferido para becker de 100ml, sendo adicionado solução de Hanks gelado até completar volume de 80ml. Após intervalo de 2 minutos, aspirava-se o sobrenadante com uma seringa de vidro de 20ml. Repetia-se este

procedimento 3 vezes com a finalidade de separação do tecido adiposo, collagenase e enzimas pancreáticas.

Para o isolamento de ilhotas pancreáticas dos animais com 2 semanas de vida, utilizava-se metade da concentração de collagenase por pâncreas com tempo de incubação reduzido para 10 minutos.

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

As ilhotas coletadas eram transferidas para tubo plástico, livre de RNA. Adicionava-se a seguir cerca de 300µl de solução preservadora de guanidina-sarcosil e mantinha em bio-freezer à -80°C até a sua utilização.

7. Viabilidade das Ilhotas Pancreáticas Recém Isoladas

A viabilidade das ilhotas recém isoladas era estimada pelo método de exclusão do corante azul de tripan.

As ilhotas isoladas pela técnica de digestão com collagenase (descrito acima) eram agrupadas e transferidas para placa de Petri transparente onde se realizava a adição do

corante de azul de tripan, em seguida as ilhotas pancreáticas eram observadas através de lupa.

Ilhotas que não absorveram o corante, permanecendo opacas, eram consideradas viáveis. As ilhotas que se apresentavam coradas em azul, indicando a absorção do corante, eram consideradas inviáveis e descartadas dos próximos procedimentos.

8. Imunoistoquímica

Para a especificação do infiltrado inflamatório nas ilhotas pancreáticas realizava-se a fenotipificação do infiltrado para linfócitos T expressando marcadores CD3+ (linfócitos T). As lâminas selecionadas eram de nº: 2, 5, 8, 11, 14 e 17 provenientes de cortes histológicos congelados.

A técnica empregada era de imunofluorescência indireta. O anticorpo secundário foi acoplado à biotina, permitindo a fixação de várias moléculas de estreptoavidina-FITC, a fim de se amplificar o sinal. As lâminas após previa fixação em acetona durante 10 minutos, eram lavadas uma vez em PBS (solução de salina fosfatada tamponada) e em seguida os cortes eram incubados em 2,5% BSA V (albumina bovina fração V; GibcoBRL, EUA); 2%; leite desnatado em pó e 8% SFB (soro fetal bovino HyClone – Utah, EUA) durante 45 min, para bloqueio de sítios inespecíficos. Aproximadamente 80µl do anticorpo primário anti CD3 (M-20 produzido em cabra, 1:100 – Santa Cruz Biotech.Califórnia, EUA), eram adicionados a cada corte e incubados por toda noite, a

8°C, em câmara úmida, protegida contra luminosidade. Em seguida, as lâminas eram lavadas seis vezes, durante 5 minutos, em tampão PBS.

As lâminas eram então, tratadas novamente com solução bloqueio durante 45 min. Em seguida 80µl do anticorpo secundário, biotinilado (Anti-cabra IgG, 1:200 Santa Cruz Biotech.Califórnia, EUA) era adicionado e incubado por duas horas nas mesmas condições descritas anteriormente. As lâminas eram lavadas novamente em PBS seis vezes e finalmente, 80µl de estreptoavidina-FITC (Sigma, St. Louis EUA) eram adicionados e os cortes incubados por duas horas, sempre nas mesmas condições.

As lâminas eram lavadas em PBS seis vezes e montadas em glicerol. Os cortes de pâncreas, assim preparados, eram observados e fotografados em fotomicroscópio (Olympus – modelo 1X50 – Japan).

9. Reação de Feulgen para Detecção de Apoptose

A reação nuclear de Feulgen para detecção específica de DNA *in situ* foi desenvolvida por Feulgen e modificada por VIDAL e MELLO, 1978. Esta técnica baseia-se no tratamento químico, ou seja, hidrólise com HCl, a fim de produzir grupos aldeídicos livres na estrutura principal do DNA, que ao reagir com reativo de Schiff restabelece o grupo cromofórico. A reação era realizada nos cortes de pâncreas congelados com seqüência de lâminas nº: 3, 6, 9, 12, 15 e 18 de camundongos NOD e CBA/j para detecção preliminar de células apoptóticas.

A reação de Feulgen envolve duas etapas: hidrólise ácida seguida da exposição do material hidrolisado ao reativo de Schiff.

Após fixação das lâminas com Solução de Carnoy (Ácido Acético/Etanol 1:3) durante 5 minutos, o material era submetido à Hidrólise Ácida com Ácido Clorídrico 4N à temperatura ambiente por 80 minutos, quando as Purinas do DNA eram removidas, formando-se uma molécula de “DNA apurínico”, expondo as funções aldeído no carbono 1 da desoxirribose. Em seguida, as lâminas eram tratadas com reativo de Schiff à temperatura ambiente por 40 minutos, quando o grupamento aldeído do DNA apurínico reagia com o leucoderivado do reativo de Schiff, em presença de ácido sulfídrico em excesso, fornecido durante as lavagens com água sulfurosa, restabelecendo-se, dessa forma, o grupamento cromofórico.

Finalmente, as lâminas eram submetidas a desidratação em série crescente de álcoois, diafanizadas com xilol e montadas com entelecan (Merck, Alemanha) para posterior observação em microscópio de luz (Zeiss, Axioscop)

10. Técnica TUNEL para Detecção de Apoptose

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

A reação de TUNEL era realizada segundo instruções do fabricante (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). As lâminas eram fixadas em paraformaldeído 4% por 20 minutos, em seguida lavadas em solução salina fosfatada tamponada (PBS pH 7,4) por um tempo de 30min, os cortes eram então, incubados durante 2 min em solução permeabilizante (0,1% triton-x em 0,1% de citrato de sódio) e mantidos sob gelo.

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

Decorrido este tempo, as lâminas eram então lavadas três vezes, em PBS e finalmente montadas em glicerol. Os cortes, assim preparados, eram observados e suas imagens captadas por microscópio confocal de varredura a laser (Bio-Rad-MCR 1024-CA-EUA)

11. Extração de RNA Total (RNAT)

As amostras de RNA total eram extraídas de células do sangue periférico (PBMC), ilhotas pancreáticas, baço e pâncreas, através do método de Guanidina Tiocianato - Fenol - Clorofórmio (CHOMCZNSKI, P & SACCHI, N, 1987) adaptado no nosso laboratório conforme descrição a seguir.

As ilhotas pancreáticas, células provenientes de sangue periférico, baço e pâncreas eram respectivamente agrupadas e homogeneizadas em solução de extração de RNA, 4M guanidina tiocianato contendo 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, EUA) e 0,5% sarcosil pH 7,0. O volume do tampão de extração guanidina (GBL) dependia do número de células ou tamanho do tecido. Em geral, utilizava-se 10 volumes de GBL ao precipitado celular.

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

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

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

12. Análise do RNA Total Extraído

A qualidade do RNA total extraído era analisada através da relação entre suas leituras em espectrofotômetro (Spectramax 190, molecular Devices, EUA) nos

comprimentos de onda de 260nm e 280nm. Eram consideradas adequadas as amostras com relação entre 1.6 e 1.8.

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

13. Transcrição Reversa do RNA total Extraído (cDNA)

A síntese do cDNA era realizada a partir de 5µg de RNA total. Para a realização PCR de transcrição reversa (RT-PCR), adicionava-se à amostra 0,5µl de Oligo d(pt) e água ultra pura em quantidade suficiente para 31µl. Aquecia-se os tubos com as respectivas amostras em termocicladora (GeneAmp® 9700, Perkin Ellmer, EUA) por 10 minutos a 65°C e resfriava-se para 4°C por 5 minutos.

Para permitir a ligação complementar dos *primers* ao RNA, adicionava-se 18µl de solução de reação (10µl de tampão Super RT, 2µl de dNTP mix 0,5mM, 5µl de DTT 0,1M e 1µl de RNAsin) seguido da incubação por 2 minutos a 42°C. Após adição de 1µl de enzima Super Transcriptase reversa (500U), a reação processava-se em termocicladora programada para as condições abaixo:

42°C por 50 minutos

70°C por 15 minutos

Resfriamento da amostra até 4°C.

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

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

O procedimento padrão de PCR era realizado adicionando-se ao tubo de reação, 2µl de amostra de cDNA, 100ng de primer 5' sense, 100ng de primer 3' anti-sense, 45µl de solução de reação (5µl de tampão Taq polimerase - *Thermus aquaticus* DNA polimerase gene GibcoBRL, EUA; 2µl de dNTP mix 5mM, 1,5µl de MgCl₂ 50mM e 35.5µl de água ultra pura) e 20µl de óleo mineral. Em seguida os tubos contendo as misturas de cDNA eram transferidas para termocicladora programada para as seguintes condições:

1. Desnaturação a 94°C por 2 minutos
2. 80°C por 5 minutos para aplicação de 1µl da enzima Taq polimerase
3. Pareamento 58°C por 45 segundos
4. Extensão dos *primers* a 72°C por 90 segundos
5. Desnaturação dos *primers* a 95°C por 45 segundos
6. 40 ciclos
7. Extensão final 72°C por 10 minutos
8. Temperatura de espera 4°C

Os produtos dos PCR eram armazenados a -20°C.

Primer	Sense	Anti-sense	Produto
IL-2	5' CCTGAGCAGGATGGAGAATTACAG 3'	5' CTTATGTGTTGTAAGCAGGAGGTAC 3'	366pb
TNF- α	5' CTTAGACTTTGCGGAGTCCG 3'	5' CCCTGTCACTGGACCTGACA 3'	254pb
INF- γ	5' CGCTACACACTGCATCTTGG 3'	5' GGCTGGATTCCGGGCAACA 3'	428pb
Fas	5' TGCCTCTGGTGCTTGCTGG 3'	5' CTTGTCCATGTACTCCTTCCCTTCTGTGC 3'	249pb
Fas-L	5' CTAGAGGGCCGGACCAAAGGAGACC 3'	5' AGGTGGAAGAGCTGATACATTCTAATCCC 3'	206pb
Bcl-w	5' GAGTTTGAGACCCGTTTCCGCCGCACC TTC 3'	5' CCACCATCCAATCCTGCACTTGTCACCA 3'	230pb
Insulina	5' GCTATAATCAGAGACATC 3'	5' GTTGCAGTAGTTCTCCAGCTG 3'	257pb
Ciclofilina	5' GACAGCAGAAAACCTTCGTGC 3'	5' GGTCTGACTACCGACC T 3'	276pb

pb= pares de bases

Tabela 2: Os *primers* utilizados com suas seqüências descritas abaixo obedeciam à estratégia sense e anti-sense: IL-2; TNF- α , INF- γ ; Fas; Fas-Ligante; Bcl-w; Insulina (controle interno de células β) e ciclofilina (gene estrutural).

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

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

Preparo de 50ml de gel de Agarose 1.5%:

Agarose 1,5% era preparada em tampão TBE (Ácido Bórico/Tris/EDTA/H₂O ultrapura) e adicionada de 2µl de brometo de etídio.

Preparo das amostras:

As amostras eram preparadas misturando 8µl de cDNA e Tampão GBX (tampão de amostra de PCR) e 5,5µl de água ultrapura. Utilizava-se como tampão de corrida eletroforética Tampão TBE adicionado de 2µl de brometo de etídio. O padrão de DNA (DNA marker ox174 RF Hae III Fragments GibcoBRL, EUA) era aplicado em todas as eletroforeses. As condições de eletroforese eram: 45 minutos a 70 voltes, 150mA.

16. Análise Semiquantitativa do RNA mensageiro

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

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

A expressão gênica de insulina foi utilizada como controle para verificação da presença de células β .

17. Avaliação estatística

Os resultados semi-quantitativos da expressão de componentes apoptóticos e citocinas são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Entretanto, na comparação dos grupos diabéticos com grupos não diabéticos de 28 semanas (NOD e CBA/j) foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney Exato (Wilcoxon).

Para avaliação estatística dos resultados quantitativos correspondentes à contagem do número total de ilhotas pancreáticas, classificação quanto ao grau de insulite e sua comparação em cada grupo, foi realizada primeiramente análise da variância (ANOVA) com transformação Rank. Quando a diferença apresentou-se significativa, assumindo significância ≤ 0.05 , foi utilizado o teste Tukey para identificar os grupos diferentes.

RESULTADOS

1. Análise Morfológica: Perfil e Evolução da Insulite

O estadiamento dos graus de insulite teve como base o estudo histológico do pâncreas endócrino, através da coloração de hematoxilina-eosina (HE).

Os pâncreas avaliados apresentavam padrões histológicos compatíveis com o esperado para cortes de congelação. Deste modo, foi efetuada a contagem do número de ilhotas, assim como sua classificação segundo grau de insulite (descrito em Materiais e Métodos).

A contagem do número total de ilhotas mostrou que nos animais do grupo An de 2 semanas e Ad (diabéticos) os números médios de ilhotas diferem estatisticamente, correspondendo a 212 ± 45 ($p < 0.05$, $n=7$) e 96 ± 32 ($p < 0.05$, $n=10$) ilhotas por animal, respectivamente. Por sua vez, nos animais do grupo An 8 semanas e Ad o número médio de ilhotas por animal também foi estatisticamente diferente, correspondendo a 188 ± 36 ($p < 0.05$, $n=6$) e 96 ± 32 ($p < 0.05$, $n=10$). Similarmente observado nos grupos An 14 semanas e Ad, onde o número médio foi de 202 ± 57 ($p < 0.05$, $n=7$) e 96 ± 32 ($p < 0.05$, $n=10$) nos animais diabéticos. Entretanto, deve ser notado que estes resultados evidenciaram tendência de redução do número de ilhotas nos animais diabéticos quando comparados aos demais animais não diabéticos (Figura 1, p.79).

2. Desenvolvimento da insulite idade-dependente em camundongos NOD fêmeas

A infiltração das ilhotas pancreáticas por linfócitos T em camundongos NOD fêmeas foi progressivo entre as idades de 4 a 28 semanas de vida para ambos animais pré-diabéticos e diabéticos.

Seis grupos de camundongos NOD fêmeas foram estudados: camundongos NOD pré-diabéticos com 2, 4, 8, 14 e 28 semanas de vida e camundongos NOD diabéticos. A análise morfológica mostrou que nos animais do grupo An, o pâncreas apresentava ilhotas normais e com diferentes graus de insulite, contrastando com o observado nos animais do grupo Ac (CBA/j), onde a insulite estava totalmente ausente.

A análise morfológica revelou que nos grupos An com 2, 4 e 8 semanas de vida predominaram ilhotas normais e com peri-insulite, ao contrário do que se observou nos grupos An 14, 28 semanas de vida e diabéticos, nos quais foram mais freqüentes as ilhotas com insulite invasiva e destrutiva (Figura 2, p.81; Prancha I, p.83).

O aumento do processo inflamatório foi igualmente observado nos animais diabéticos, entretanto, a progressão da insulite para os estádios mais avançados foi acompanhada da diminuição do número de ilhotas contadas por pâncreas, com substituição das células constitutivas das ilhotas por infiltrados inflamatórios (Prancha II c, p.85) assim, poucas ilhotas puderam ser encontradas nos cortes histológicos dos pâncreas desses animais. Esses achados histológicos são consistentes com o estágio

diabético presente nesses animais, caracterizando a mudança do estágio pré para o diabetes. (Figuras 1 e 2, pp.79,81).

Desta forma, a comparação em relação ao grau de insulite (fixando o grau de insulite e comparando as idades), demonstrou que nos grupos An 2 (212 ± 45), 4 (143 ± 37) e 8 (141 ± 50) o número de ilhotas com grau 0 é significativamente superior em relação os animais dos grupos An 14 (39 ± 32), 28 (15 ± 16) e diabéticos (5 ± 3) (Figura 2, p.81 - $p < 0.05$).

O número de ilhotas com grau 1 nos grupos An 14 semanas foi de 52 ± 9 ($p < 0.05$, $n=7$), ao passo que nos grupos An 4 (17 ± 9 , $p < 0.05$, $n=6$), An 28 (18 ± 8 $p < 0.05$, $n=7$) e diabéticos (20 ± 11 $p < 0.05$, $n=10$) significativamente inferiores (Figura 2, p.81).

A análise das ilhotas com grau 2 demonstrou que os animais do grupo An 8 (4 ± 5 $p < 0.05$, $n=6$) apresentaram número significativamente inferior em relação aos animais do grupo An 14, 28 e diabéticos, correspondendo a 44 ± 26 ($p < 0.05$, $n=7$), 32 ± 14 ($p < 0.05$, $n=7$) e 22 ± 12 ($p < 0.05$, $n=10$) ilhotas por animal, respectivamente (Figura 2, p.81).

As ilhotas classificadas com grau 3 demonstrou-se significativamente inferior no grupo An 8 (3 ± 4 $p < 0.05$, $n=6$) em relação aos grupos An 14, 28 e diabéticos, correspondendo a 32 ± 15 ($p < 0.05$, $n=7$), 31 ± 17 ($p < 0.05$, $n=7$) e 21 ± 11 ($p < 0.05$, $n=10$) ilhotas por animal, respectivamente (Figura 2, p.81).

Por fim, as ilhotas apresentado grau 4 nos grupos An 14, 28 semanas e diabéticos não diferiram estatisticamente, correspondendo a 35 ± 16 ($p < 0.05$, $n=7$), 51 ± 25 ($p < 0.05$,

n=7) e 27 ± 12 ($p < 0.05$, n=10) ilhotas com o grau de insulite destrutiva por animal, respectivamente. Contudo, deve-se evidenciar que o diferencial nesses grupos de animais com idades avançadas, são os demais graus de insulite (Figura 2, p.81).

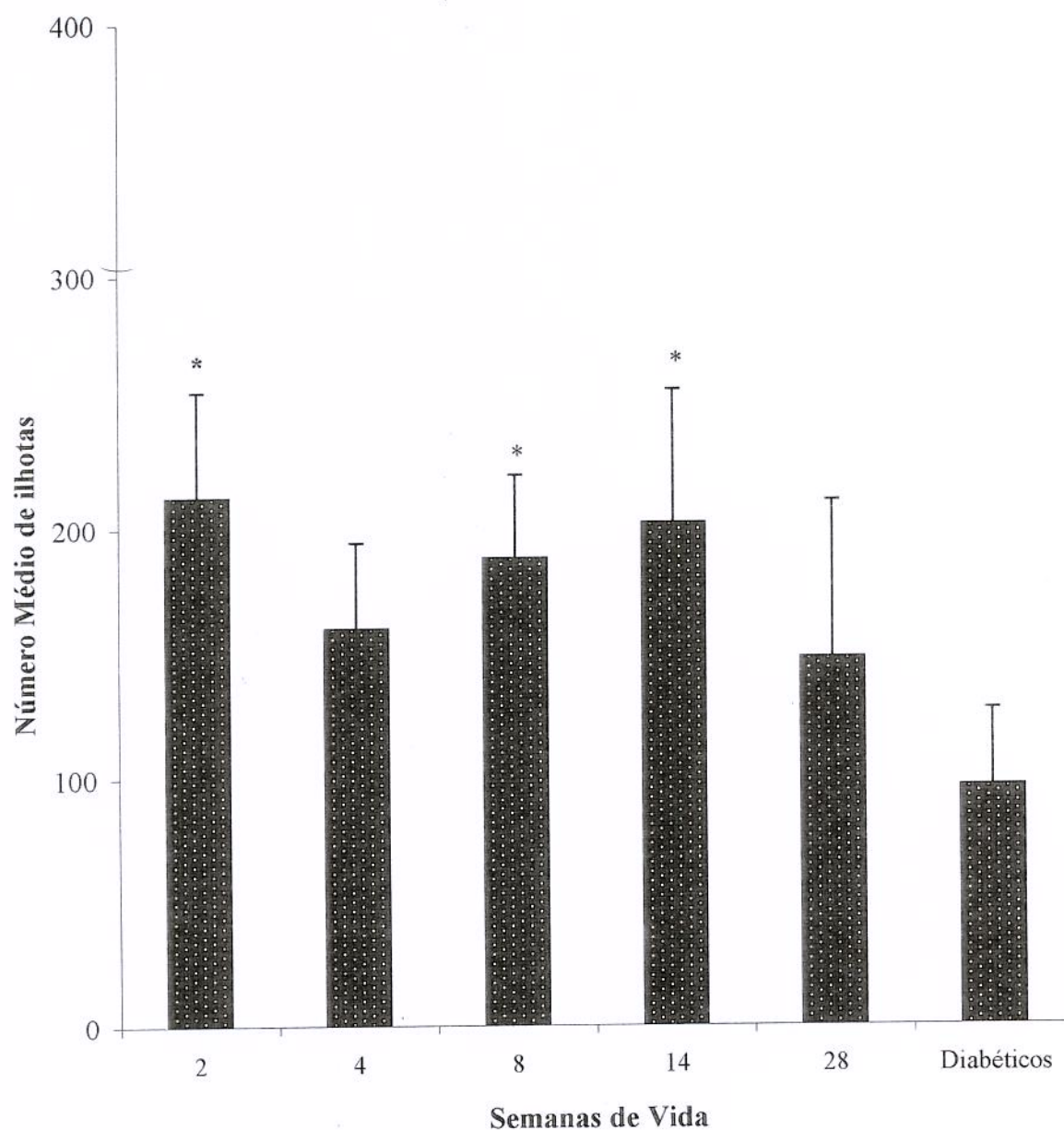


Figura 1. Gráfico representativo do número total de ilhotas pancreáticas de camundongos NOD (Grupos An e Ad). A significância estatística foi demonstrada entre os grupos An com 2, 8 e 14 semanas de vida quando comparados com animais diabéticos (* $p < 0.05$ - ANOVA).

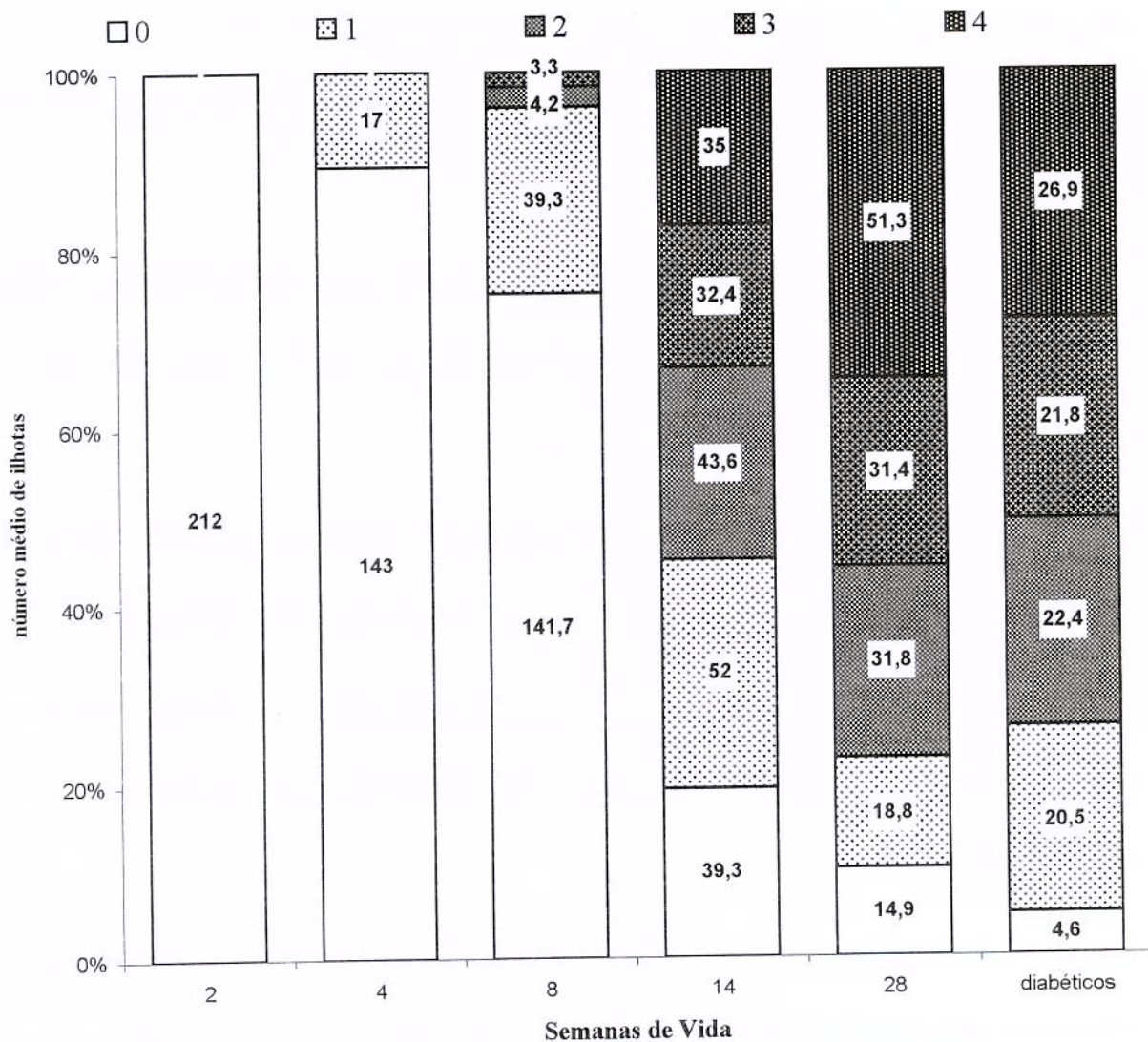


Figura 2. Representação gráfica da classificação das ilhotas pancreáticas segundo o grau de insulite em camundongos NOD. Grau 0 apresentaram-se significativamente inferiores nos animais com 14, 28 semanas e diabéticos em comparação aos animais com 2, 4, e 8 semanas. Grau 1 foram significativamente inferiores nos grupos com 4, 28 semanas e diabéticos em relação aos animais de 14 semanas. Grau 2, os valores foram significativamente inferiores nos animais com 8 semanas em relação aos grupos com 14, 28 semanas e diabéticos. Grau 3, os valores foram significativamente inferiores nos animais com 8 semanas em relação aos animais de 14, 28 semanas e diabéticos.

0= normal; 1= peri-insulite; 2= moderada; 3= invasiva >80% e 4= destrutiva.

PRANCHA I. Fotomicrografias de cortes histológicos de pâncreas destacando ilhotas pancreáticas de camundongos NOD demonstrando os diferentes graus de insulite

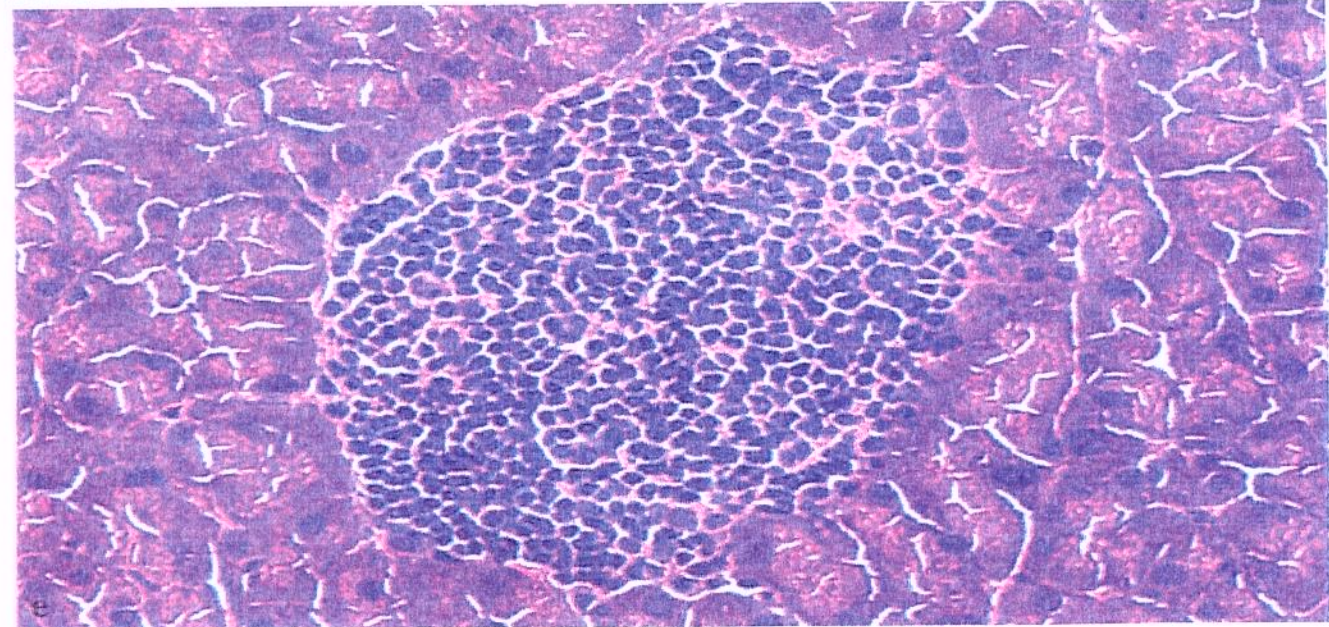
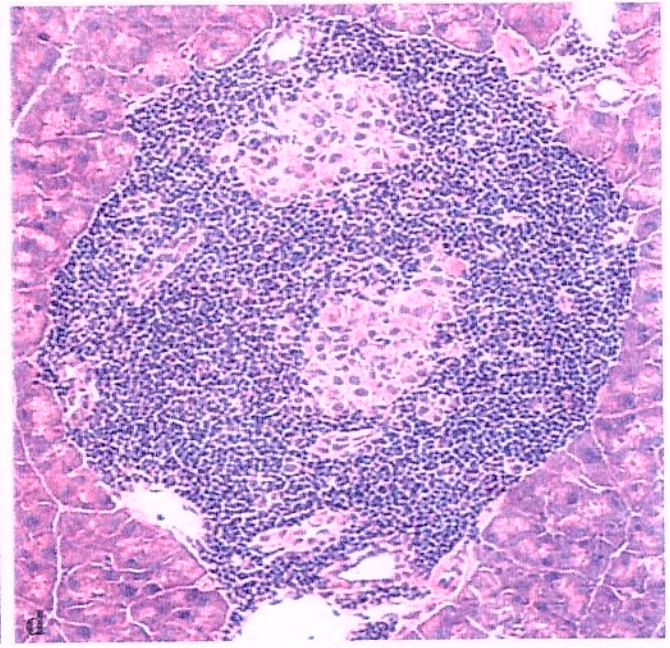
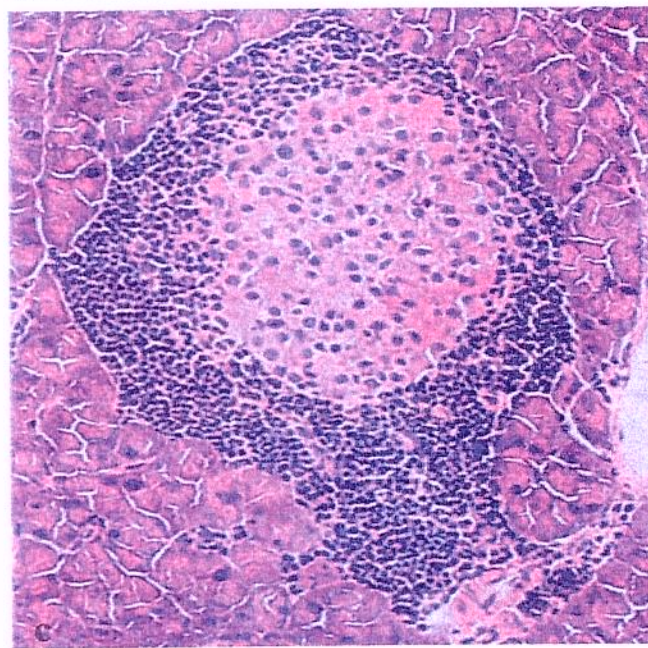
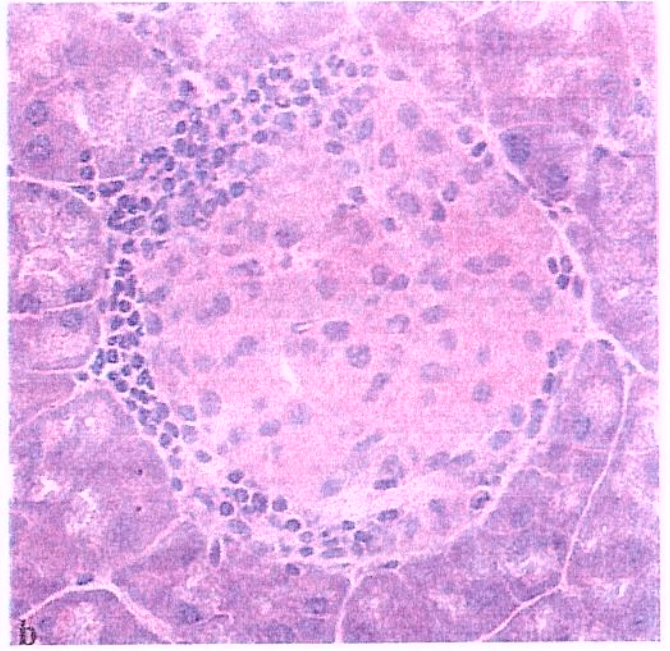
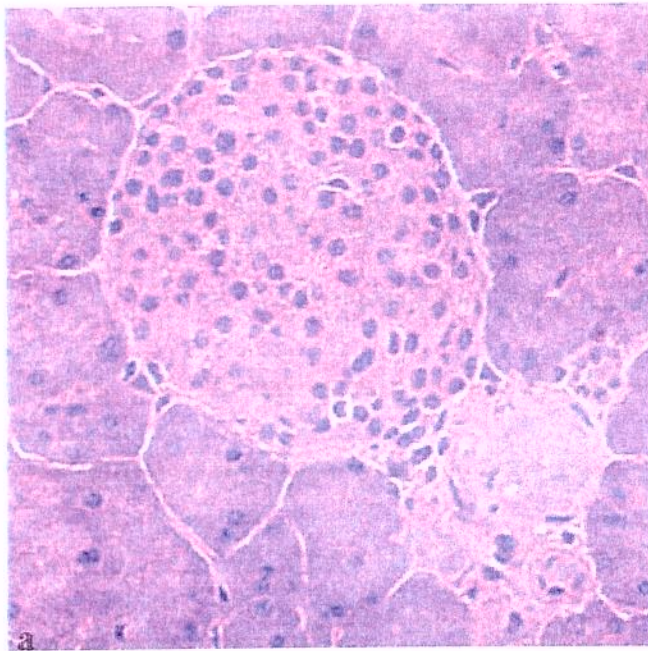
Figura a) Fotomicrografia de ilhota pancreática de aspecto morfológico normal (Grau 0). A ilhota apresenta-se com sua estrutura íntegra, com ausência de infiltrados inflamatórios. HE. Aumento 200x.

Figura b) Fotomicrografia de ilhota pancreática com peri-insulite (Grau 1). Presença menor de 25% de infiltrado circundado a ilhota. HE. Aumento 200x.

Figura c) Fotomicrografia de ilhota pancreática apresentando insulite moderada (Grau 2). Área entre 25-80 % da ilhota invadida pelo infiltrado inflamatório. HE. Aumento 200x.

Figura d) Fotomicrografia de ilhota pancreática apresentando insulite invasiva (Grau 3). Observa-se área maior que 80 % da ilhota invadida pelo infiltrado inflamatório ocupando extensiva a ilhota. HE. Aumento 100x.

Figura e) Fotomicrografia de ilhota pancreática apresentando insulite destrutiva (Grau 4). Infiltrado inflamatório ocupando totalmente a ilhota. HE. Aumento 200x.



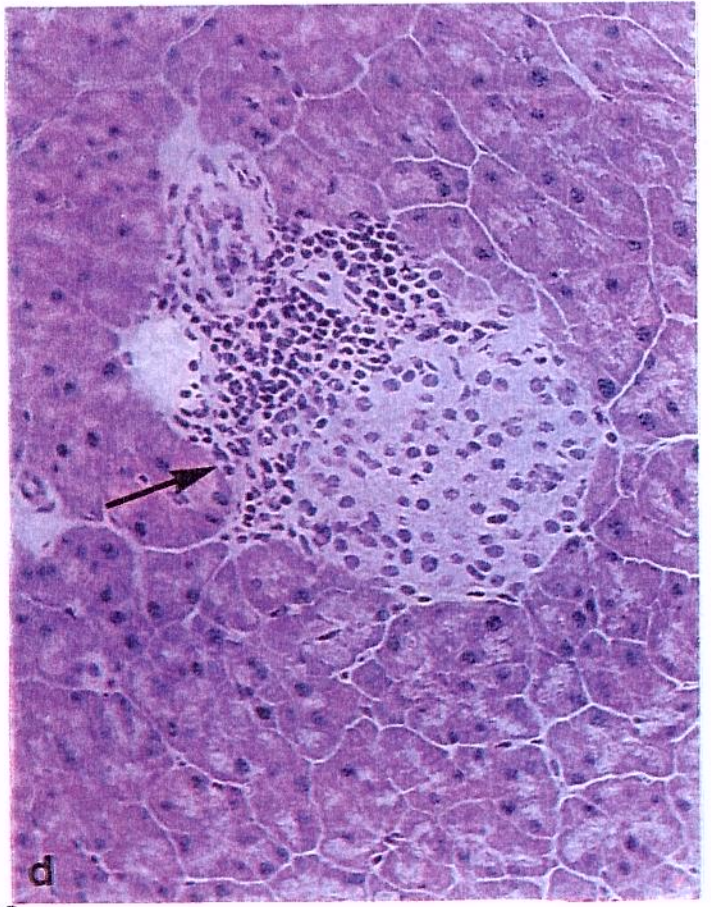
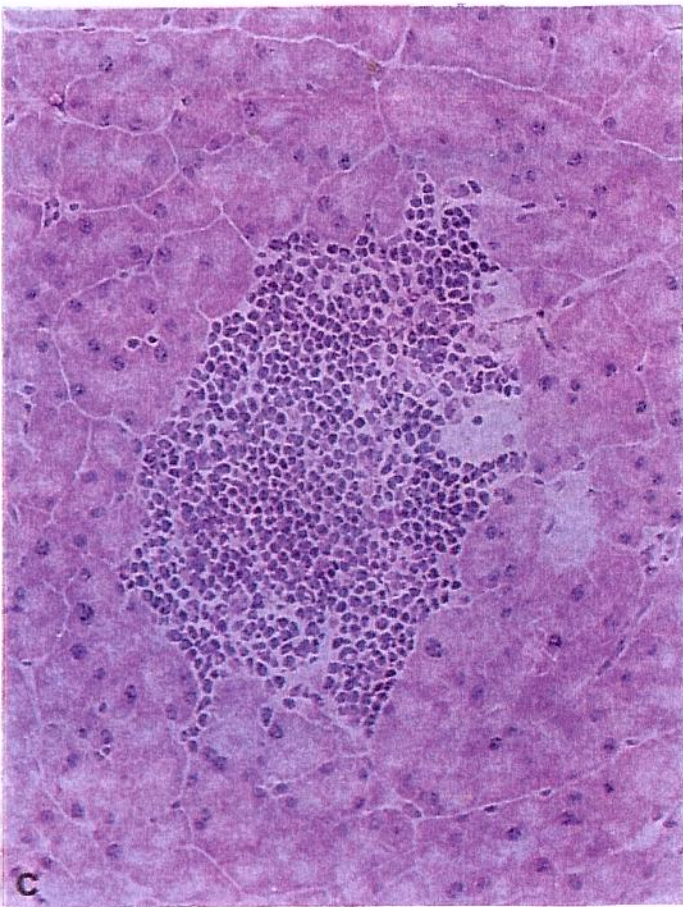
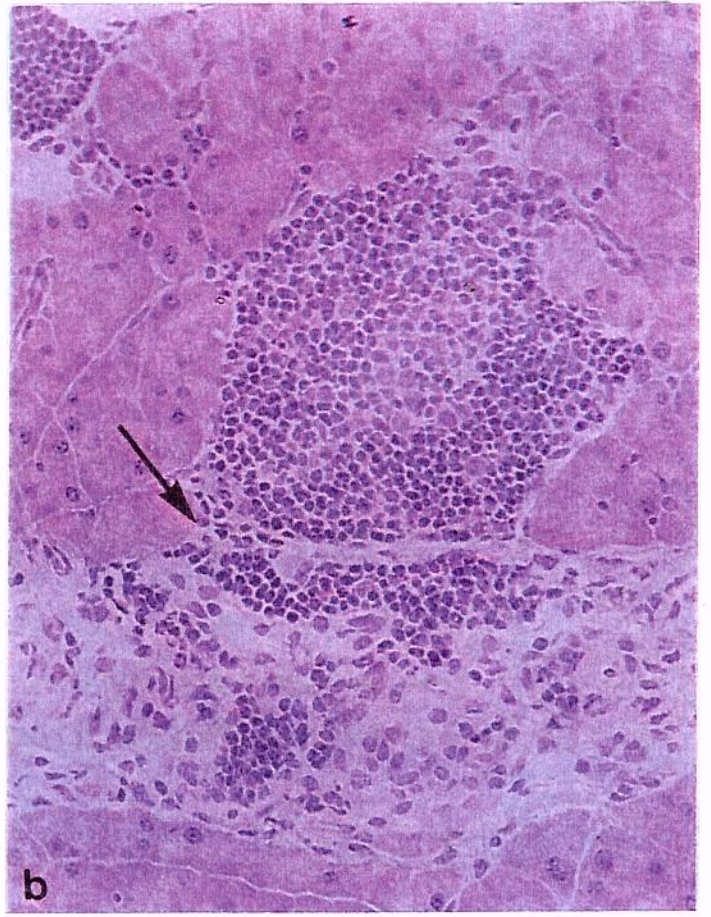
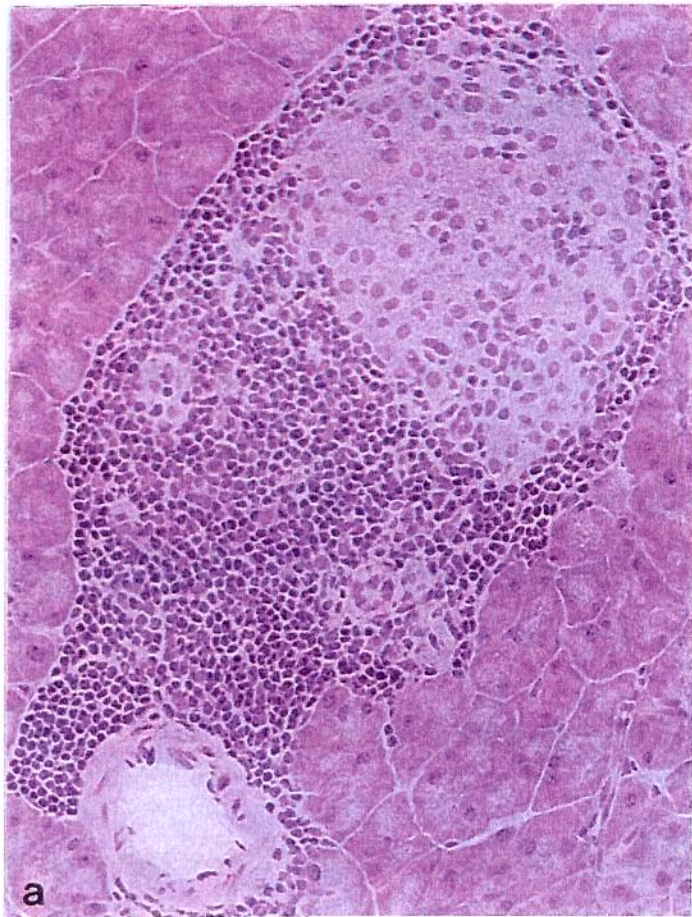
PRANCHA II. Fotomicrografias de cortes histológicos de pâncreas destacando ilhotas pancreáticas de camundongos NOD com 14 semanas de vida.

Figura a) Fotomicrografia destacando insulite moderada (Grau 3) em ilhota pancreática de animal com 14 semanas de vida. Observa-se o infiltrado inflamatório ocupando parcialmente a ilhota. HE. Aumento 200x.

Figura b) Fotomicrografia de ilhotas pancreáticas de animal com 14 semanas de vida, destacando ambos padrões de insulite, moderada (Grau 3) e avançada (Grau 4). Destaca-se o Infiltrado inflamatório ocupando totalmente a ilhota (seta). HE. Aumento 200x.

Figura c) Fotomicrografia de ilhota pancreática de animal com 14 semanas de vida destacando insulite destrutiva (Grau 4). Pode-se observar substituição das células normais da ilhota por infiltrado inflamatório. HE. Aumento 200x.

Figura d) Fotomicrografia de ilhota pancreática destacando a peri-insulite (Grau 1) em animal com 14 semanas de vida (seta) HE. Aumento 200x.



3. Aspectos Imunoistoquímicos: Fenótipo da Insulite

A fenotipificação do infiltrado insular, caracterizado através da imunoistoquímica, revelou a presença de linfócitos T (CD3+) em todos os graus de insulite. A prancha III, p. 89, representa a marcação de células T CD3+ nas ilhotas em diferentes estágios de insulite, evidenciando o envolvimento dos linfócitos T não somente no início da insulite como também na evolução do diabetes.

3. Viabilidade de Ilhotas pancreáticas Recém Isoladas

A coloração por exclusão com azul de tripan demonstrou que ilhotas pancreáticas recém isoladas pela técnica de digestão por collagenase apresentaram-se em cerca de 88% dos casos sem penetração do corante para o interior da célula, sugerindo assim, a integridade da membrana celular e deste modo, considerada ilhotas viáveis (Prancha IV **b**, p.91).

Através desta técnica foi possível demonstrar a eficiência da metodologia para isolamento de ilhotas pancreáticas por digestão enzimática utilizando collagenase tipo V, que posteriormente eram utilizadas em procedimentos de extração de RNAT.

4. Reação de Feulgen

Esta técnica é descrita como reação específica para DNA onde o material cromossômico é evidenciado pelo reativo de Schiff. As células eram caracterizadas como

sugestivas de processo apoptóticos ao apresentarem condensação e marginalização da cromatina no envoltório nuclear, bem como corpos apoptóticos. Células contendo cromatina descondensada com aspecto definido eram classificadas como normais.

Desta maneira, as células sugestivas de apoptose foram identificadas em cortes de pâncreas de animais diabéticos e não diabéticos (Pranchas V e VI, pp.93, 95). Entretanto, a frequência de animais com ilhotas contendo células sugestivas de apoptose apresentavam-se aumentadas nos animais diabéticos. Estas células estavam localizadas no interior e, na grande maioria, ao redor das ilhotas pancreáticas, contudo, não sendo possível afirmar o tipo celular encontrado. Poucas células apoptóticas foram encontradas na porção exócrina do pâncreas. As células apoptóticas localizadas nesses animais demonstraram diminuição no volume nuclear com características de condensação da cromatina (Prancha VI, p.95).

Nas ilhotas pancreáticas dos camundongos CBA/j, não foram observadas células com características apoptóticas em nenhum dos grupos estudados (Prancha V, p.93).

5. Técnica TUNEL

A fragmentação do DNA detectada pela técnica do TUNEL (Terminal deoxynucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling) foi verificada em cortes de pâncreas de animais diabéticos e não-diabéticos. Embora sem a realização da quantificação, pôde-se verificar maior incidência de células TUNEL⁺ nos animais mais velhos, entre 14-28 semanas e nos animais diabéticos (Prancha VII, p.97).

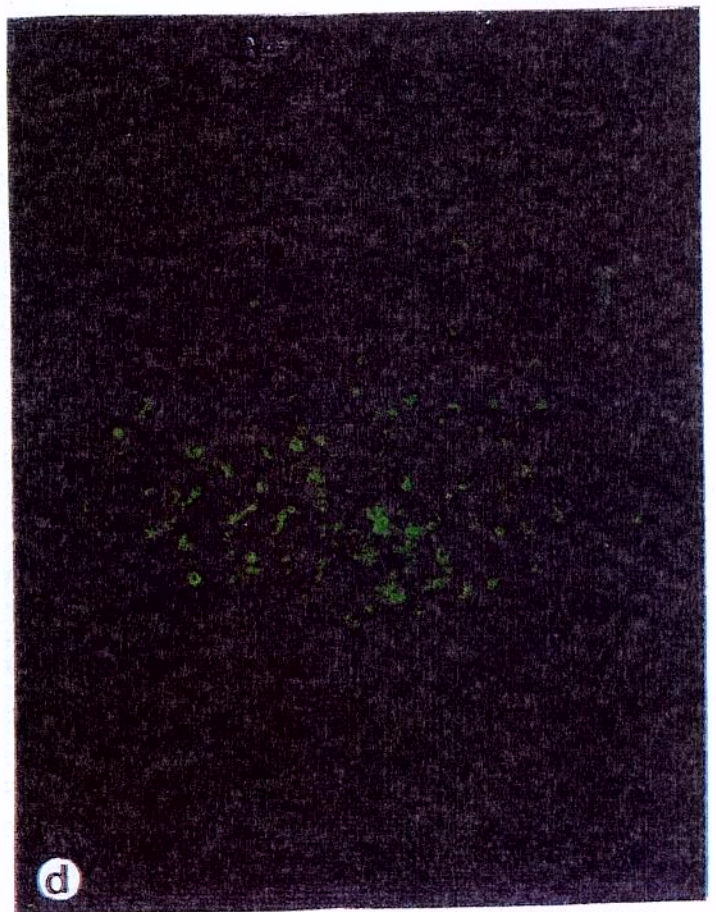
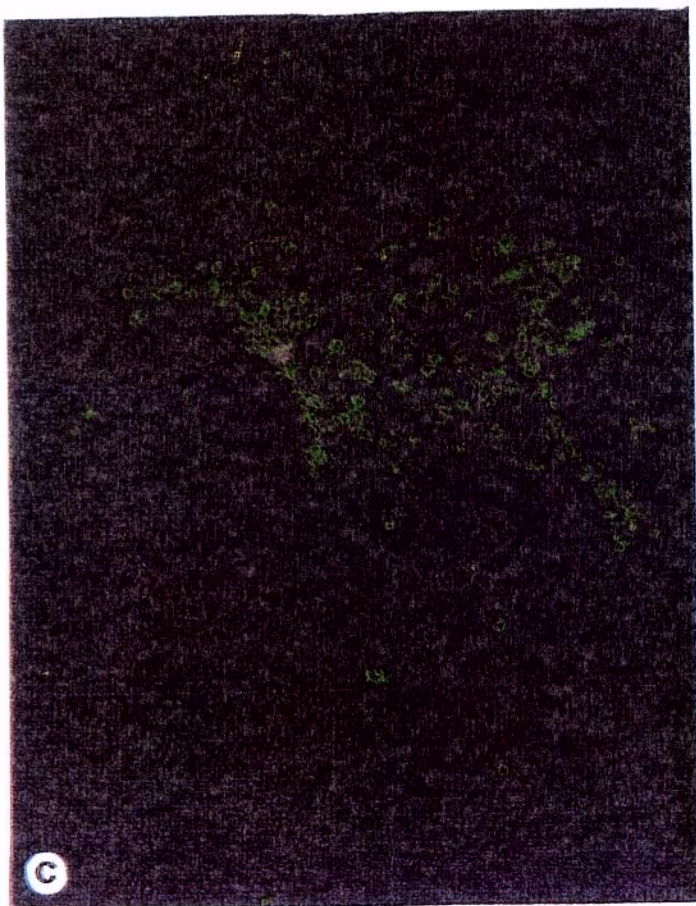
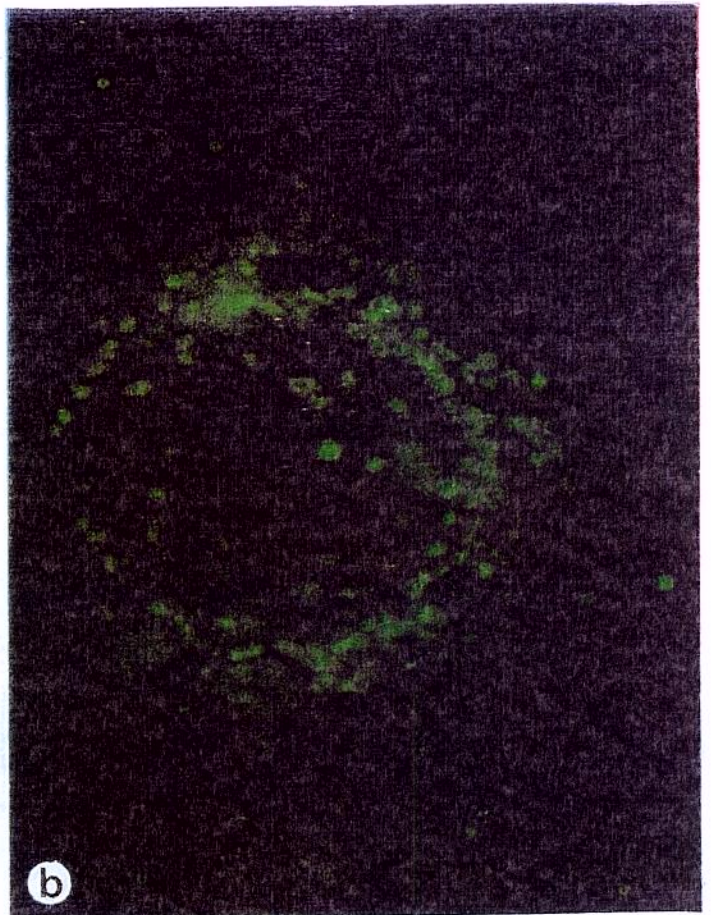
PRANCHA III. Fenotipificação de linfócitos T caracterizados através da técnica de imunoistoquímica em diferentes estágios da insulite em camundongos NOD.

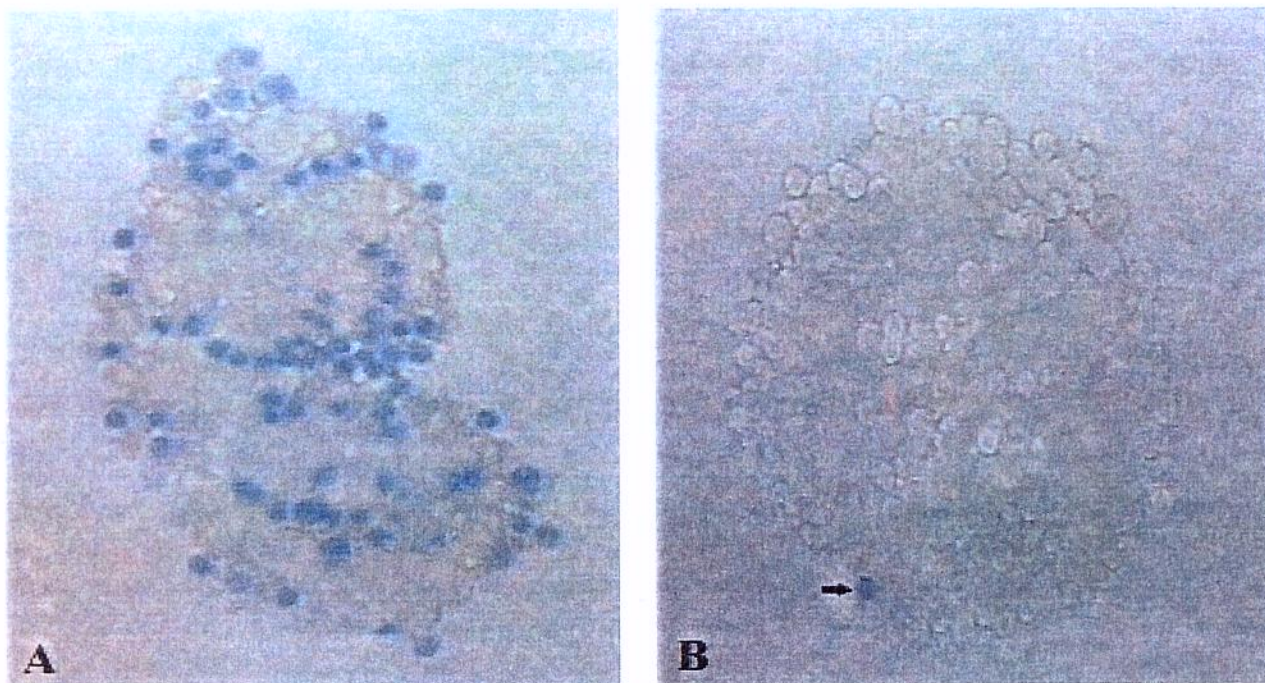
Figura a) Fotomicrografia de ilhota pancreática com peri-insulite (Grau 1). Presença de linfócitos T peri e intrainstular. Aumento 200x.

Figura b) Fotomicrografia de ilhota pancreática com peri-insulite (Grau 1). Presença de linfócitos T circundando a ilhota. Aumento 200x.

Figura c) Fotomicrografia de ilhota pancreática apresentando insulite moderada (Grau 2). Presença de linfócitos T invadindo parcialmente a ilhota. Aumento 200x.

Figura d) Fotomicrografia de ilhota pancreática apresentando insulite destrutiva (Grau 3). Linfócitos T ocupando totalmente a ilhota. Aumento 200x.





Prancha IV: Fotomicrografias de ilhotas pancreáticas recém isoladas pela técnica de digestão por collagenase, análise de viabilidade pela técnica de exclusão com azul de tripan. (A) **Ilhota inviável**, observa-se absorção do corante no interior células inviáveis. (B) **Ilhota viável**, observa-se a exclusão do corante das células, nota-se apenas uma célula inviável (seta), garantindo assim que todas as células da ilhota estão íntegras e a eficiência da metodologia.

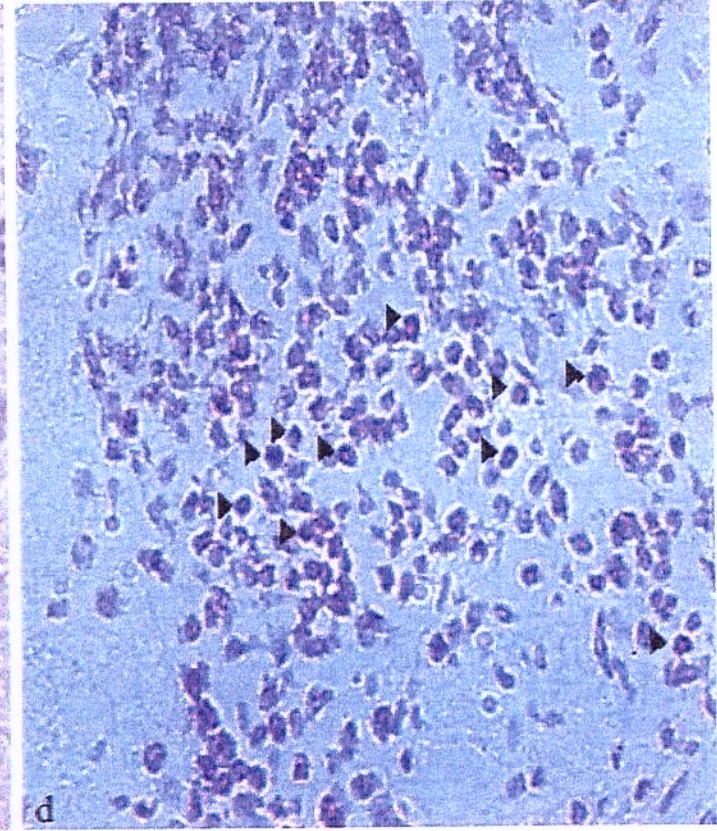
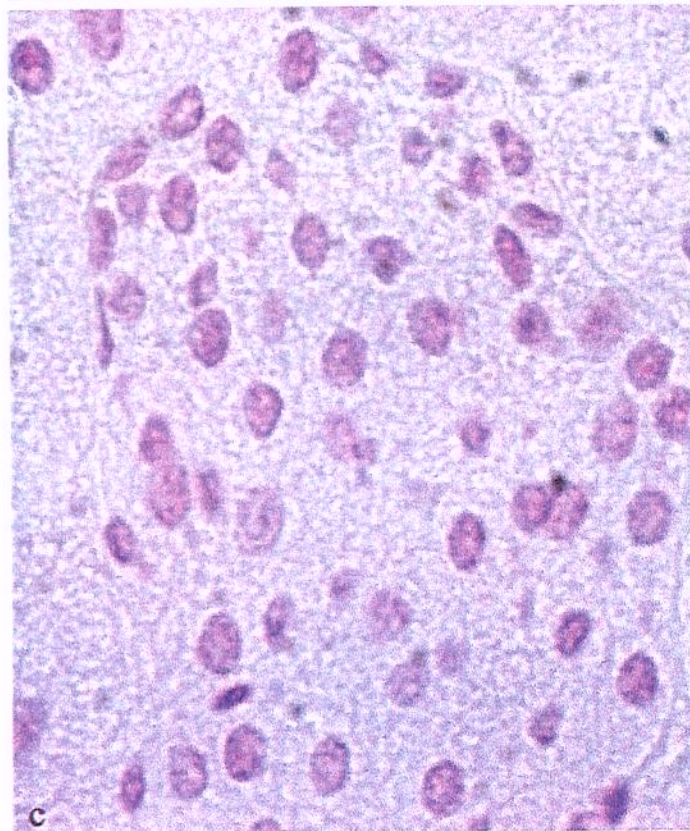
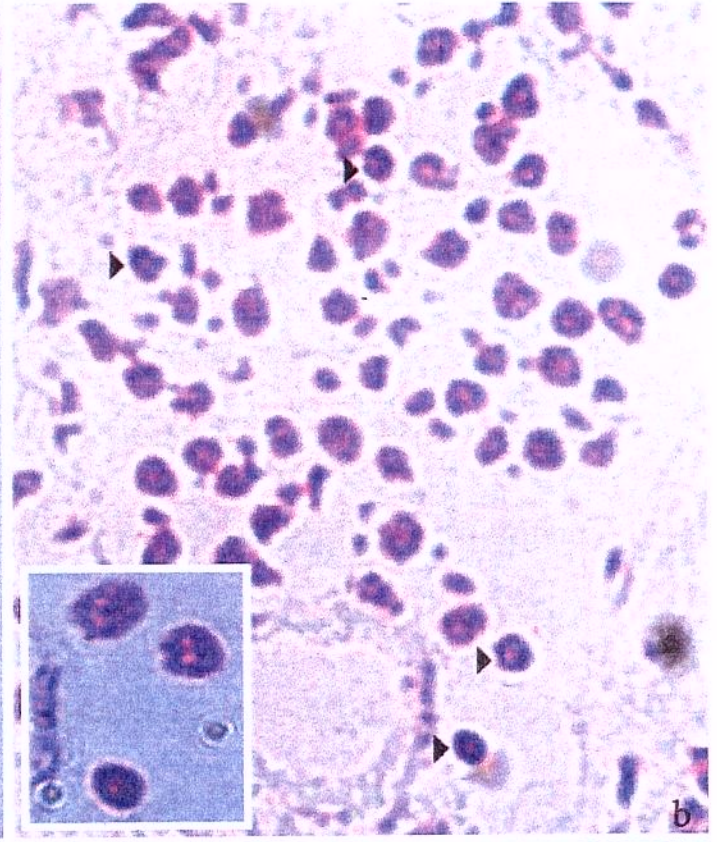
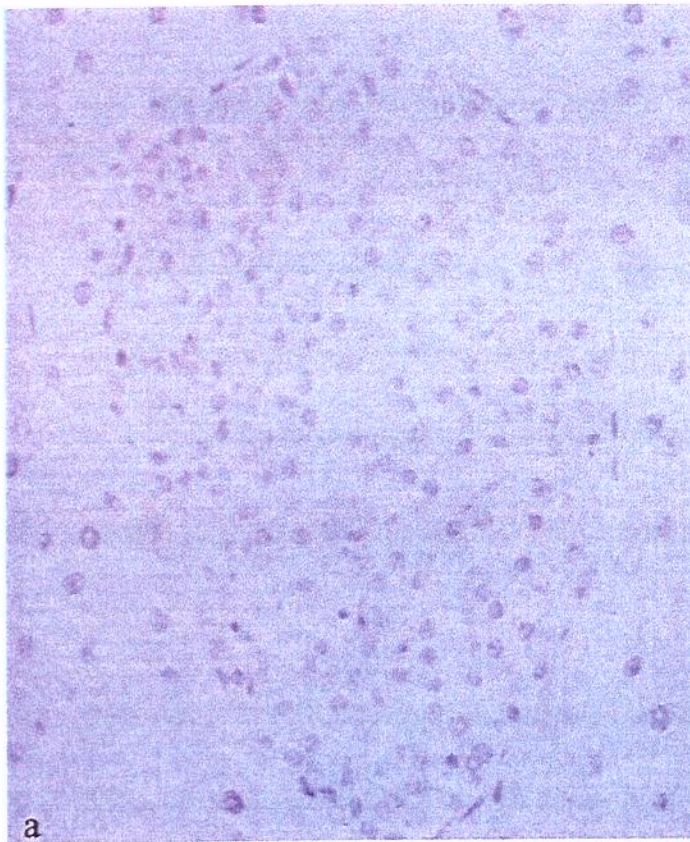
PRANCHA V. Fotomicrografias de cortes histológicos de pâncreas de camundongos NOD e CBA/j corados pela reação de Feulgen.

Figura a) Fotomicrografia de ilhota pancreática de camundongo CBA/j com 14 semanas de vida. Observam-se núcleos contendo cromatina descondensada com aspecto definido consideradas normal. Aumento 100x.

Figura b) Fotomicrografia de ilhota pancreática de camundongo NOD com 14 semanas de vida demonstrando a presença de núcleos sugestivos de apoptose. (cabeça de seta) aumento 200x. Em destaque, núcleos apresentando condensação de cromatina em aumento de 1000x.

Figura c) Fotomicrografia de ilhota pancreática de camundongo CBA/j com 28 semanas de vida. Observam-se células contendo cromatina descondensada com aspecto definido sendo consideradas normais. Aumento 600x.

Figura d) Fotomicrografia de ilhota de pancreática de camundongo NOD com 28 semanas de vida demonstrando a presença de muitas células sugestivas de apoptose no interior da ilhota com insulite invasiva (Grau 3). Aumento 400x.



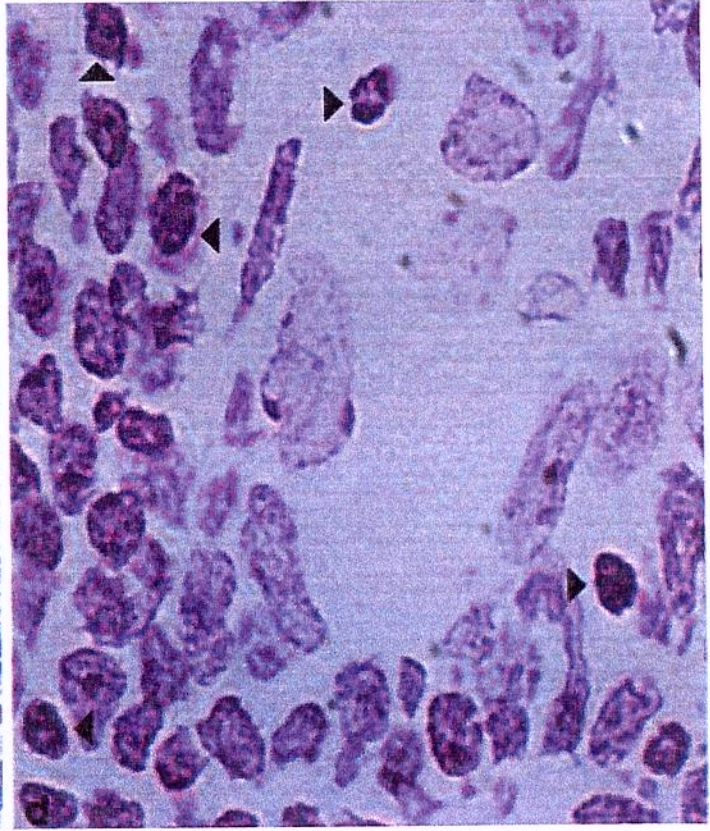
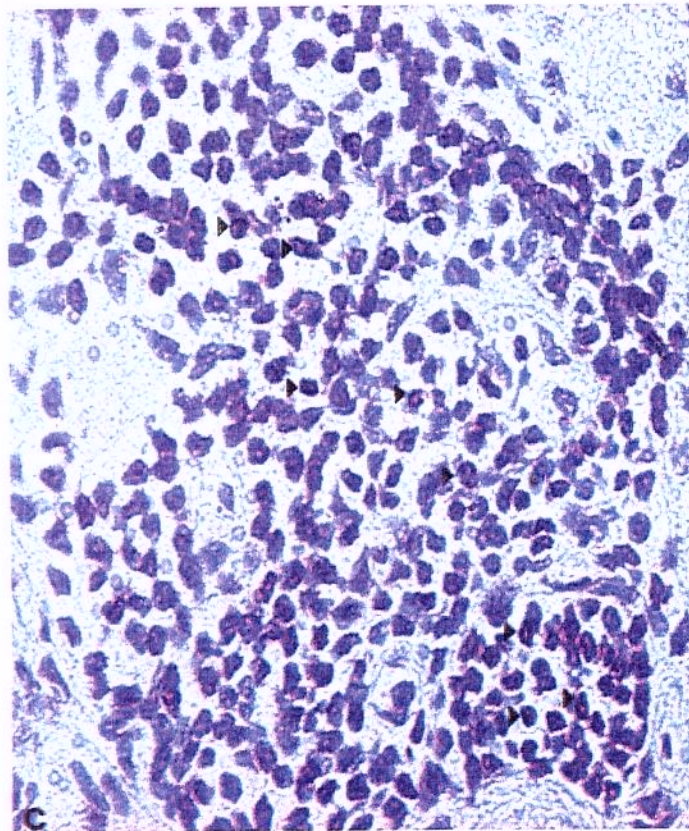
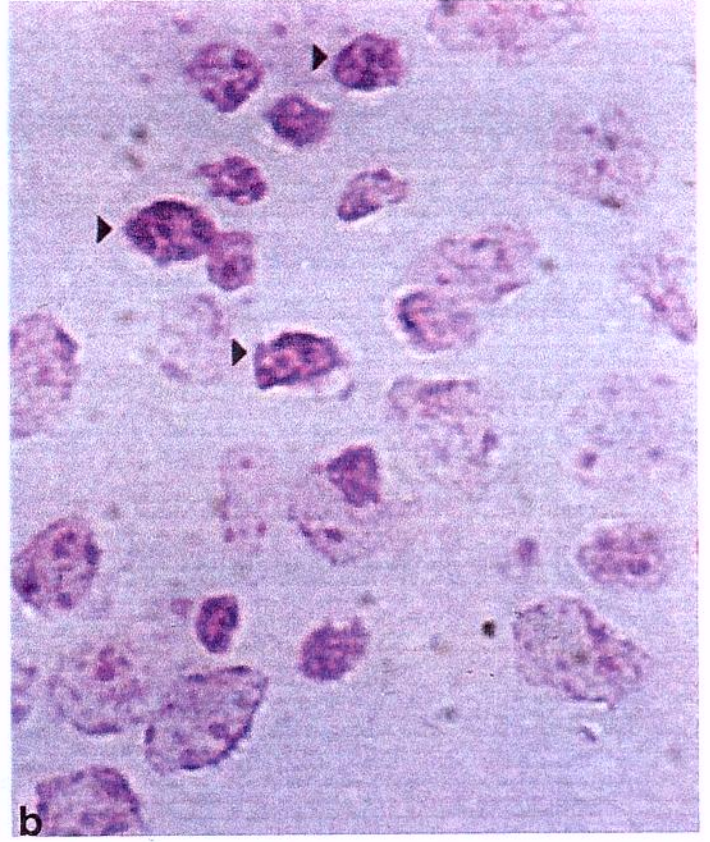
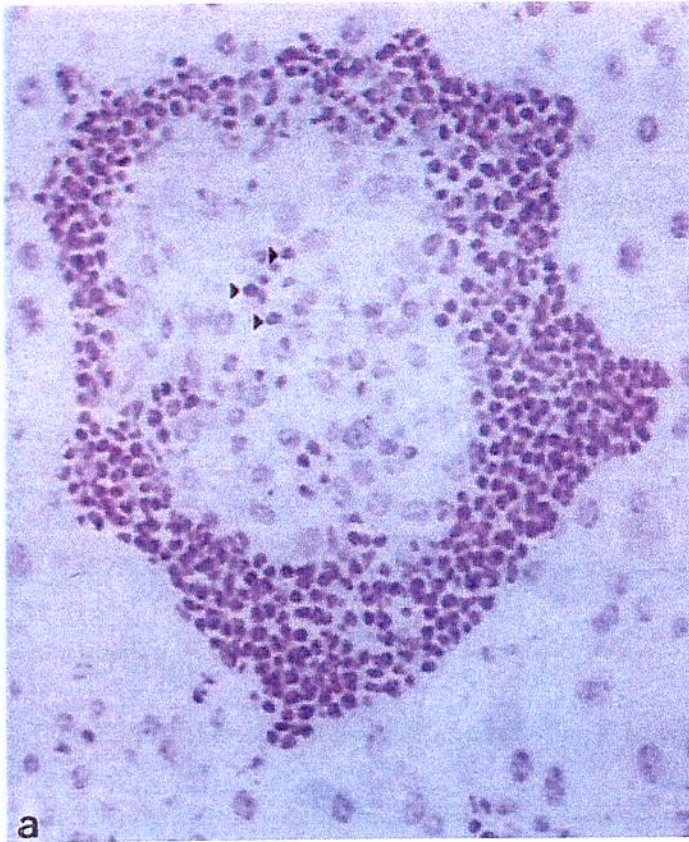
PRANCHA VI. Fotomicrografias de cortes histológicos de pâncreas de camundongos NOD diabéticos corados pela reação de Feulgen.

Figura a) Fotomicrografia de ilhota pancreática de camundongo NOD diabético. Observa-se ilhota apresentando insulite moderada (Grau 3) com a presença células sugestivas de apoptose no interior da ilhota (cabeça de seta). Feulgen. Aumento 200 x.

Figura b) Ampliação da figura a demonstrando mais claramente células apoptóticas (cabeça de seta). Feulgen. Aumento 1000x.

Figura c) Fotomicrografia de ilhota pancreática de camundongo NOD diabético com insulite destrutiva (Grau 4) demonstrando a presença de muitas células sugestivas de apoptose no interior da ilhota (cabeça de seta). Feulgen. Aumento 400 x.

Figura d) Fotomicrografia de ilhota pancreática de camundongo NOD diabético apresentando no seu interior células com características de apoptose (cabeça de seta). Observam-se características de condensação e marginalização da cromatina nuclear. Feulgen. Aumento 1000x.

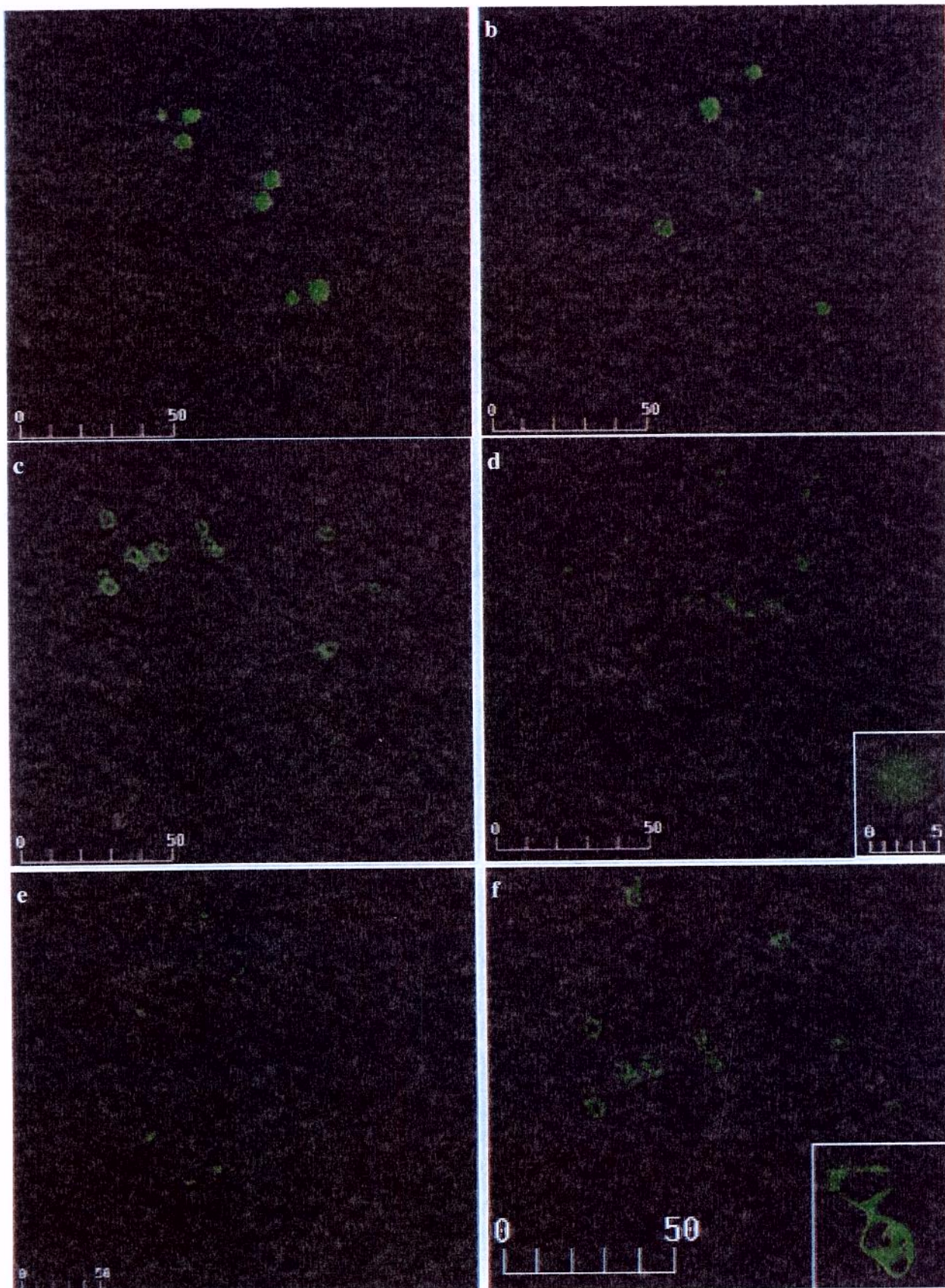


PRANCHA VII. Detecção de apoptose em pâncreas de camundongos NOD com 14, 28 semanas de vida e animais diabéticos, através da técnica de TUNEL.

Figura a, b) Fotomicrografias de ilhotas de pancreáticas de camundongos NOD com 14 semanas de vida TUNEL⁺. Esparsas células são observadas em todos os campos analisados.

Figura c, d) Fotomicrografias de ilhotas de pancreáticas de camundongos NOD com 28 semanas de vida não diabéticos. A frequência das células TUNEL⁺ aumenta com o avanço da idade, observar a configuração da marcação, predominantemente junto ao envoltório nuclear. Em maior aumento, detalhe de núcleo apoptótico TUNEL⁺.

Figura e, f) Fotomicrografias de ilhotas de pancreáticas de camundongos NOD diabéticos. O número maior de células TUNEL⁺ foi encontrado em animais diabéticos. Em maior aumento, detalhe de núcleos apoptóticos.



6. RT-PCR Semi-Quantitativo

6.1. *Expressão de gene estrutural (ciclofilina) nas amostras de mRNA*

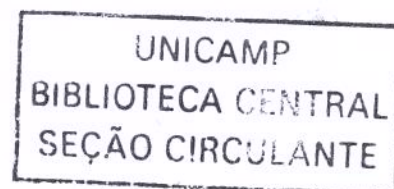
Para investigar a expressão de citocinas e componentes de apoptose no processo auto-imune do diabetes, foram estabelecidos diversos tempos para análise e associação entre a expressão gênica destas proteínas, componentes de apoptose e o processo inflamatório das ilhotas pancreáticas durante o desenvolvimento da doença. Todas as amostras de cDNA utilizadas para o estudo expressaram o produto do gene estrutural ciclofilina (276 pares de base) amplificado através da reação de polimerase em cadeia, confirmando sua qualidade para o uso nas análises propostas.

6.2. *Expressão Molecular de Citocinas e Componentes em Camundongos NOD não Diabéticos e CBA/j.*

6.2.1. Ilhotas Isoladas

A expressão de Fas, Fas-L, Bcl-w, TNF- α , INF- γ e insulina (controle interno de células β), foram observadas em todas as ilhotas isoladas dos animais dos grupos Bn e Bc e em todas as idades estabelecidas. Observaram-se diferentes níveis de expressão de componentes apoptóticos e citocinas em cada idade estipulada.

Não foi possível detectar amplificação de RNA mensageiro correspondente a IL-2 em nenhuma das amostras estudadas.



Fas, Fas-L e Bcl-w

Os níveis de expressão semiquantitativa de Fas foram superiores nos animais de 28 semanas (76 ± 24 UA) não diabéticos em comparação com os animais de 2 (20 ± 11 UA), 4 (63 ± 11 UA), 8 (22 ± 7 UA) e 14 (50 ± 7 UA) semanas de vida. Verificou-se ainda, que a expressão de Fas aumentou com o avanço da idade, com maior intensidade da expressão gênica nos animais de 14 e 28 semanas de vida (Figura 3a, p.102). Em relação aos animais controle (CBA/j) não foi possível observar elevação dos níveis deste componente de apoptose e os valores médios de expressão não diferiram entre os grupos de animais controles estudados.

A semi-quantificação da expressão do gene Fas-L permitiu verificar valores superiores nos animais de grupo Bn (NOD) em comparação com os respectivos controles Bc (CBA/j). Conforme demonstrado na figura 3b p.102, é possível observar elevação dos níveis de mRNA nos animais do grupo Bn com 14 (141 ± 7 UA) e 28 (150 ± 10 UA) semanas de vida, com expressão mais acentuada nos animais de 28 semanas não diabéticos.

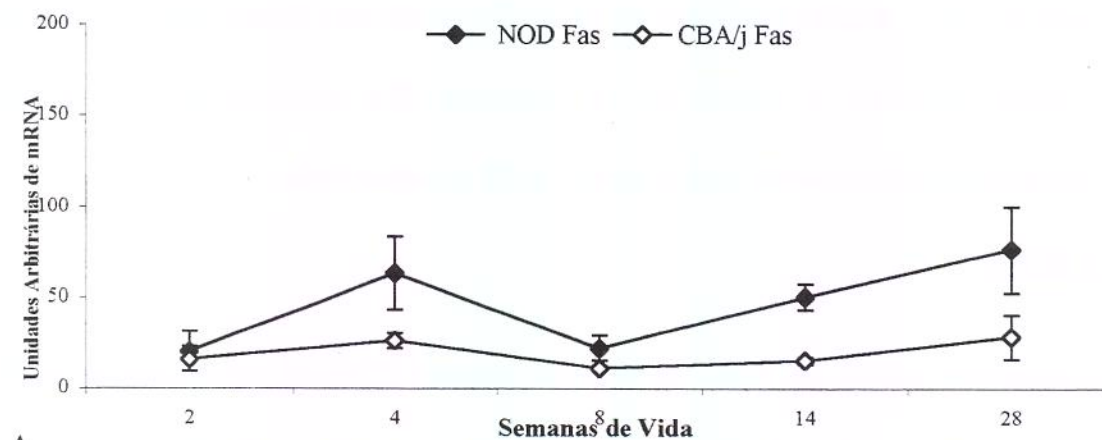
No estudo da expressão de mRNA para Bcl-w, o produto gênico expressou-se de forma intensa tanto no grupo Bn de 2 (74 ± 9 UA) e 4 (131 ± 27 UA) semanas de vida quanto no grupo controle (65 ± 4 UA; 131 ± 28 UA). Com o avanço da idade, a análise da expressão permitiu verificar nitidamente o intenso aumento da expressão gênica nos animais do grupo Bn com 14 (140 ± 10 UA) e 28 (174 ± 1 UA) semanas de vida, enquanto que nos grupos controles os níveis permaneceram constantes (Figura 3c, p.102).

Desta forma, o estudo detalhado do grupo Bn, conforme demonstrado na figura 3c, p.102, permite verificar a tendência de elevação dos componentes de apoptose, observando ainda nítido aumento nos animais de 28 semanas vida.

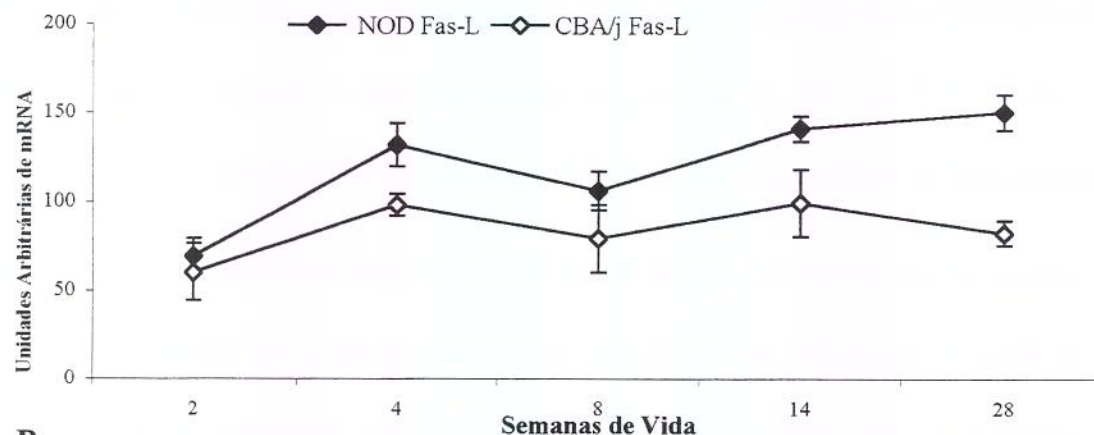
TNF- α e IFN- γ

A expressão gênica do fator de necrose tumoral (TNF- α) apresentou-se baixa no grupo Bn com 2 semanas de vida (41 ± 19 UA), contudo, a partir da 4^a semana (90 ± 35 UA) observou-se tendência de elevação, com pico de intensa expressão nos animais na 28^a semana de vida (145 ± 17 UA). Por outro lado, no grupo controle o produto gênico de TNF- α apresentou-se inferior e sem variações com o avanço da idade (Figura 4a, p.103).

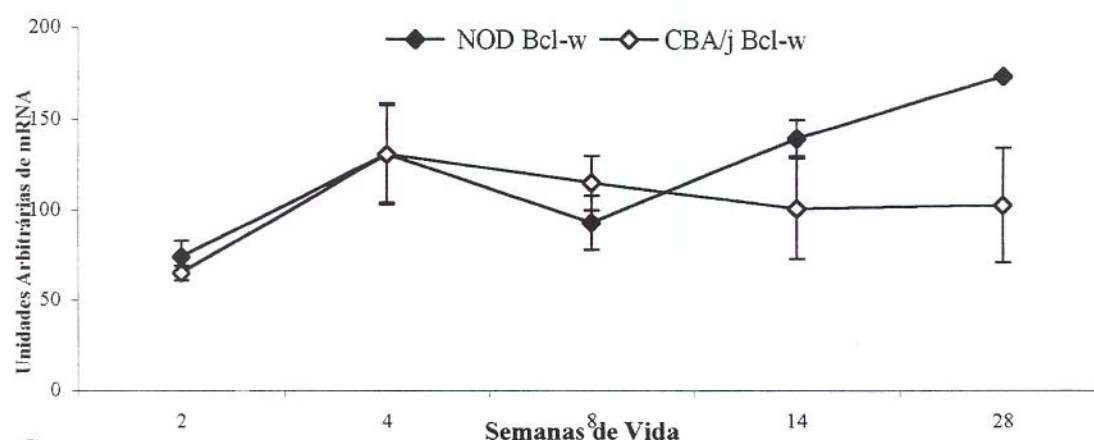
Embora baixos níveis de expressão de IFN- γ tenham sido detectados a partir da 2^a semana de vida no grupo Bn, esses níveis mantiveram-se até a 14^a semana (27 ± 3 UA), intensificando-se na 28^a semana de vida (149 ± 29 UA), enquanto no grupo Bc estes valores mantiveram-se em níveis inalterados em todas as idades estudadas (Figura 4b, p.103).



A



B



C

Figura 3. Componentes apoptóticos detectados em ilhotas pancreáticas isoladas. A análise do mRNA de Fas mostra aumento progressivo com o decorrer da idade nos camundongos NOD (grupo Bn), por outro lado, os animais do grupo Bc (CBA/j) apresentam níveis basais (A). Cinética semelhante foi observada na expressão gênica de Fas-L, no grupo Bn (NOD) há uma ligeira queda na 8ª semana de vida, com posterior aumento até a 28ª semana; o grupo Bc (CBA/j) apresenta cinética sem alterações, com ligeira diminuição na 8ª e 28ª semanas de vida (B). A detecção do mRNA de Bcl-w no grupo Bn (NOD) mostra que ocorre uma pequena queda na 8ª semana, seguida de um importante aumento até a 28ª semana de vida; no grupo Bc (CBA/j) a observação difere, uma vez que, ocorre aumento na 4ª semana de vida, seguido de ligeira queda até a 28ª semana de vida (C).

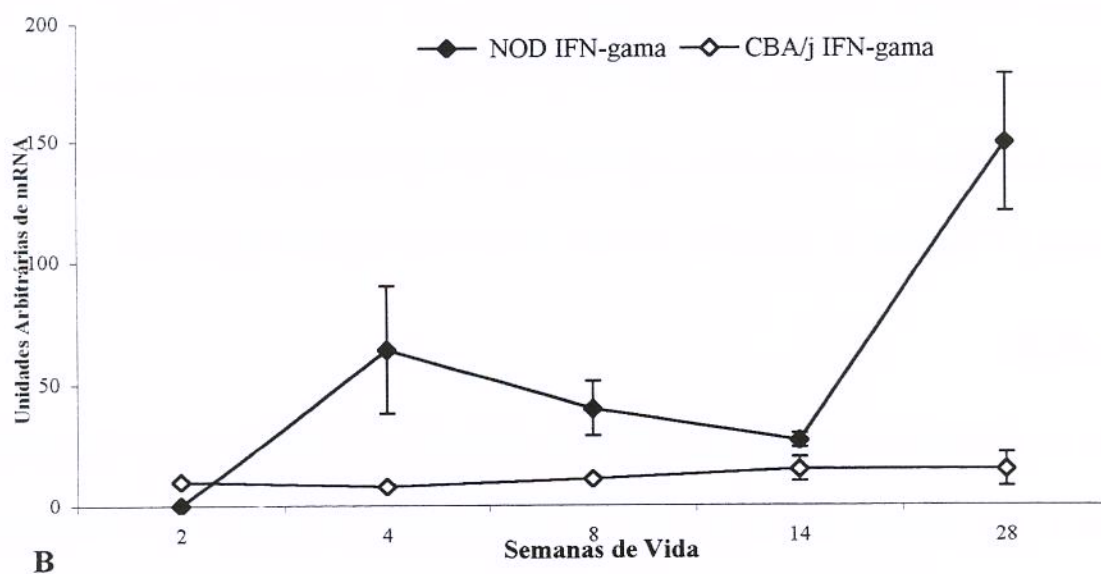
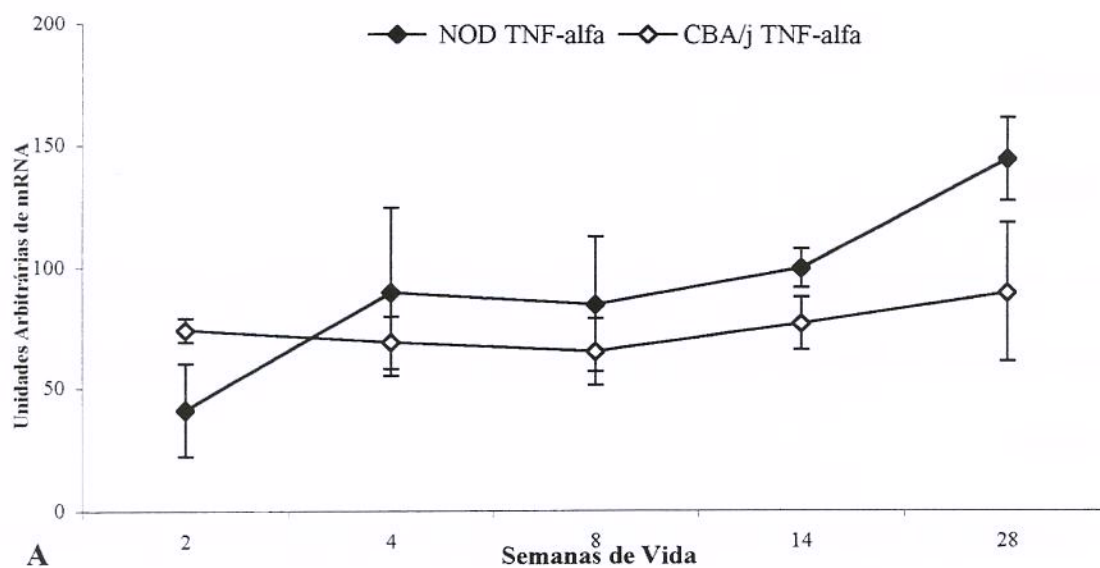


Figura 4. Detecção de citocinas em ilhotas de pancreáticas isoladas. Observa-se aumento progressivo nos níveis de TNF-alfa no grupo Bn (NOD), o qual cursa com a instalação do processo inflamatório; o grupo Bc (CBA/j) ao contrário, exibe níveis constantes de mRNA desta citocina (A). A detecção da expressão gênica do mRNA de IFN-gama no grupo Bn (NOD) apresenta dois picos: o primeiro na 4ª semana de vida e o segundo na 28ª semana de vida; no grupo Bc (CBA/j), conforme esperado, apresentou níveis basais desta citocina (B).

6.2.2. Pâncreas

Fas-L e Bcl-w

Não foi possível observar níveis de expressão de mRNA correspondente a Interleucina 2 (IL-2) e Fas em nenhuma das amostras de pâncreas estudado nos diversos grupos e idades.

A expressão de Fas-L estava aumentada no grupo An com 8 (110 ± 13 UA) e 14 semanas (122 ± 26 UA). Quando comparados com os grupos controle Ac (76 ± 10 UA; 82 ± 17 UA) (Figura 5a, p.106).

Por outro lado, da expressão do gene Bcl-w permitiu caracterizar níveis constantes na expressão detectada nos animais do grupo An até a 14^a semana de vida (121 ± 31 UA), com tendência de diminuição na 28^a (75 ± 20 UA). Similarmente, este perfil foi encontrado nos animais controle (Ac), contudo em níveis de expressão gênica inferior nos animais com 14^a semana de vida (113 ± 5 UA; 78 ± 8 UA) (Figura 5b, p.106).

TNF- α , IFN- γ

Ao se analisar a expressão de TNF- α no pâncreas verificou-se níveis ligeiramente aumentados nos animais do grupo An em comparação ao grupo Ac. Entretanto, é importante observar que as expressões não modificaram com o avanço da idade, tanto para o grupo An quanto para o grupo controle Ac (Figura 6a, p.107).

As expressões gênicas de IFN- γ para ambos grupos An e Ac ao longo das idades estudadas estavam diminuídos no grupo, embora os valores nos animais de 2 semanas de

vida do grupo Ac apresentaram-se mais elevados (65 ± 8 UA) em comparação ao grupo An na respectiva idade (23 ± 16 UA) (Figura 6b, p.107).

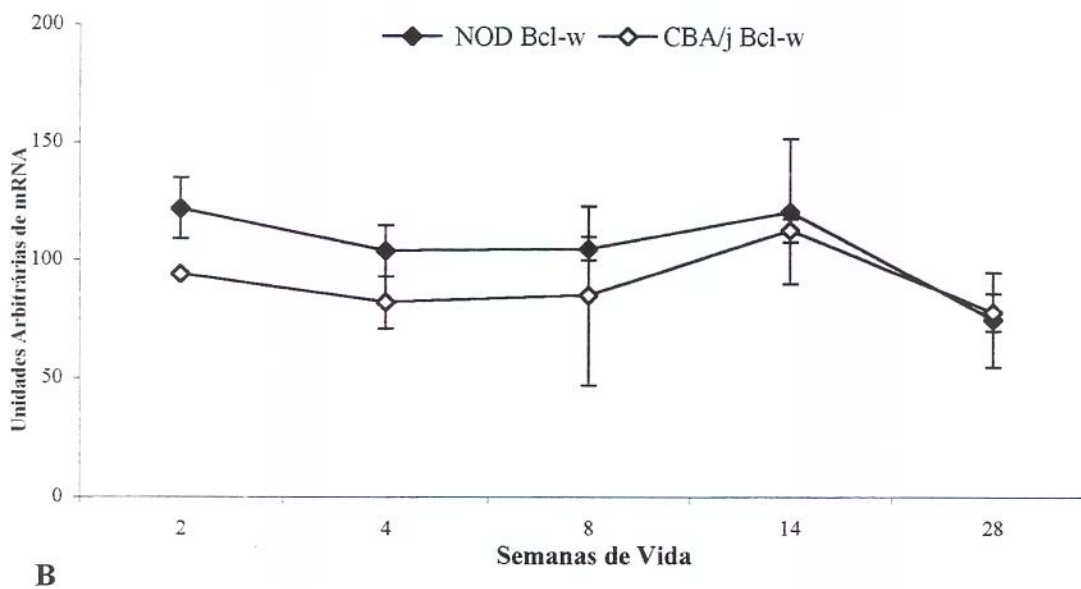
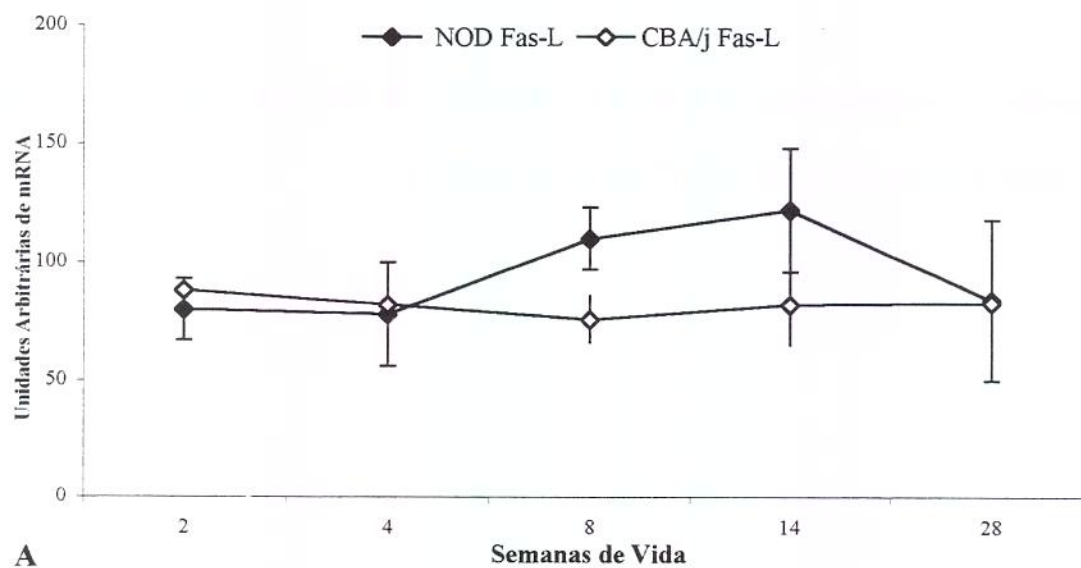


Figura 5. Componentes apoptóticos detectados em pâncreas. A detecção da expressão gênica do mRNA de Fas e Fas-L nos animais do grupo An (NOD) apresentam dois picos; o primeiro na 8ª semana e o segundo na 14ª semana de vida; retornando a níveis semelhantes aos dos animais do grupo Ac (CBA/J) na 28ª semana de vida (A). A detecção gênica de mRNA de Bcl-w nos animais do grupo An (NOD) apresenta níveis constantes até 14ª semana de vida, com diminuição na 28ª semana. Nos animais do grupo Ac (CBA/J) os níveis apresentam-se diminuídos em relação aos do grupo An (B).

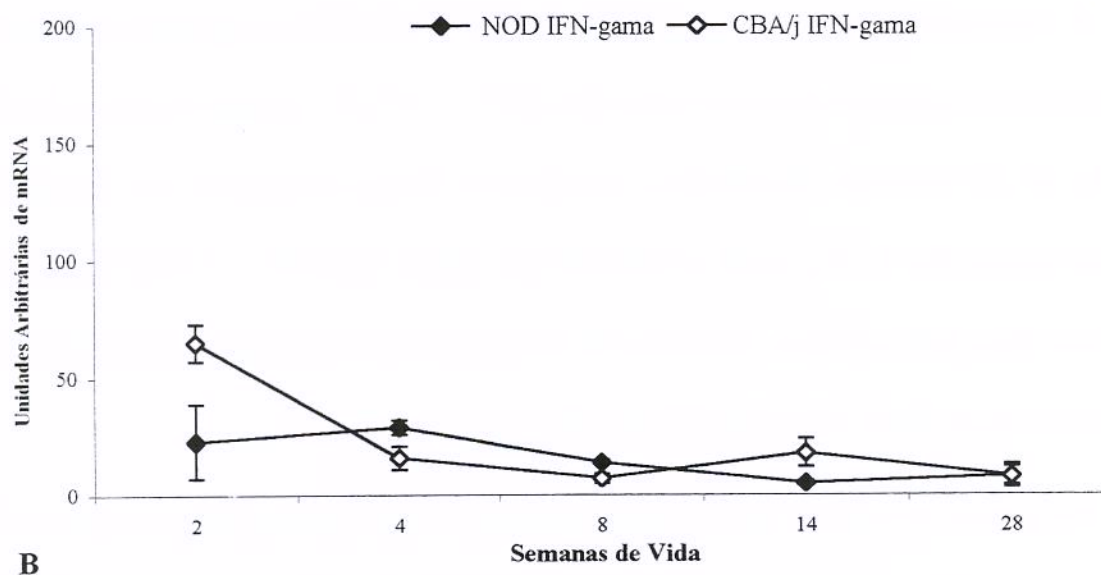
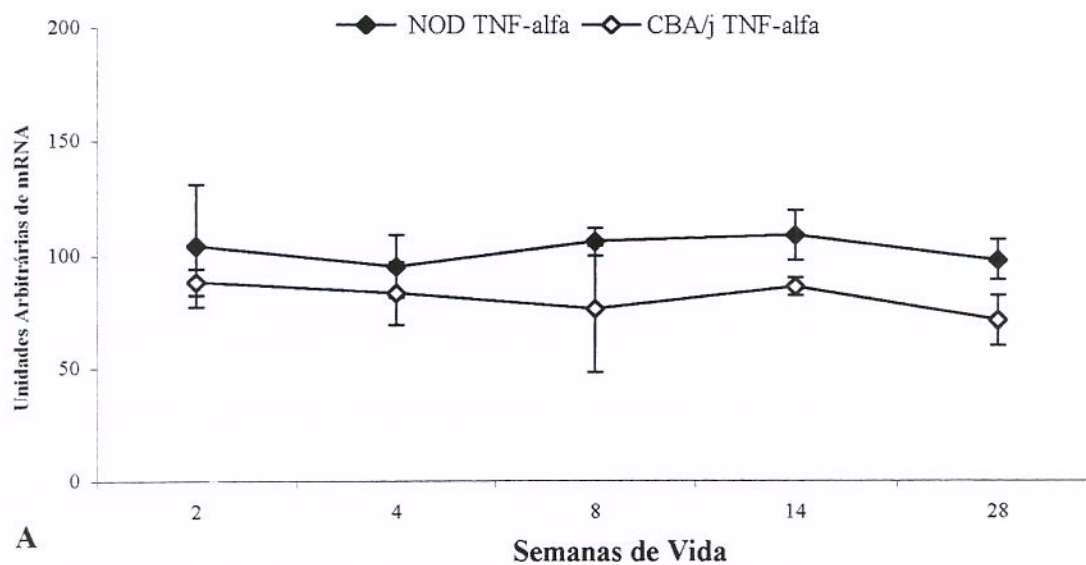


Figura 6. Detecção de citocinas em pâncreas. Observa-se valores relativamente constantes na expressão do mRNA de TNF-alfa do grupo An (NOD), com pequena queda na 28ª semana de vida, entretanto com valores maiores que o grupo Ac (CBA/j), o qual exibe níveis constantes de mRNA desta citocina (A). A detecção da expressão gênica do mRNA de IFN-gama no grupo An (NOD) encontra-se ligeiramente aumentada até a 4ª semana, quando ocorre um decréscimo, mantendo-se constante até a 28ª semana de vida; no grupo Ac (CBA/J) observa-se níveis aumentados desta citocina na 2ª semana de vida e nas idades posteriores estes níveis diminuem para valores semelhantes aos encontrados no grupo de animais NOD (B).

6.2.3. Sangue Periférico

Fas, Fas-L e Bcl-w

Amostras de mRNA de células sangüíneas periféricas foram analisadas no decorrer das 28 semanas de vida dos camundongos NOD (Bn) e CBA/j (Bc). Observou-se que os níveis médios de expressão gênica de Fas estavam elevados nos animais do grupo Bn com 4 semanas de vida (128 ± 13 UA), ocorrendo diminuição dos níveis médios de expressão no decorrer das 28 semanas de vida dos animais (26 ± 15 UA). Em relação aos animais controle (Bc), o produto gênico desta proteína expressou-se de forma intensa nos animais mais velhos deste grupo (28 semanas - 189 ± 26 UA) (Figura 7a, p.110).

A semi-quantificação da expressão de mRNA para Fas-L permitiu detectar maior intensidade de expressão tanto no grupo Bn (237 ± 16 UA) quanto no grupo Bc (190 ± 29 UA) de 28 semanas. Resultados antagônicos foram observados nos animais de 4 semanas (grupo Bn e Bc), onde os animais do grupo Bn (179 ± 5 UA) tinham níveis superiores para esta proteína, enquanto os animais que integravam o grupo Bc (47 ± 23 UA) observou-se níveis reduzidos (Figura 7b, p.110).

Os índices de mRNA Bcl-w apresentaram-se relativamente baixos entre a 2^a a 14^a semana de vida, após nota-se abrupto aumento desta proteína nos animais de 28 semanas, padrão este, semelhante em ambos os grupos (Bn= 219 ± 29 UA; Bc= 184 ± 8 UA) (Figura 7c, p.110).

TNF- α e IFN- γ

A avaliação do mRNA de TNF- α demonstrou que a cinética de expressão desta proteína não é linear, entretanto com nítida tendência de elevação em ambos grupos Bn (175 ± 23 UA) e Bc (132 ± 1 UA) com 28 semanas, com maior intensidade para o grupo Bn (Figura 8a, p.111).

Verificou-se aumento progressivo na expressão do gene IFN- γ detectada nos animais do grupo Bc, ao passo que, os animais do grupo Bn não apresentaram variação com o decorrer da idade (Figura 8b, p.111).

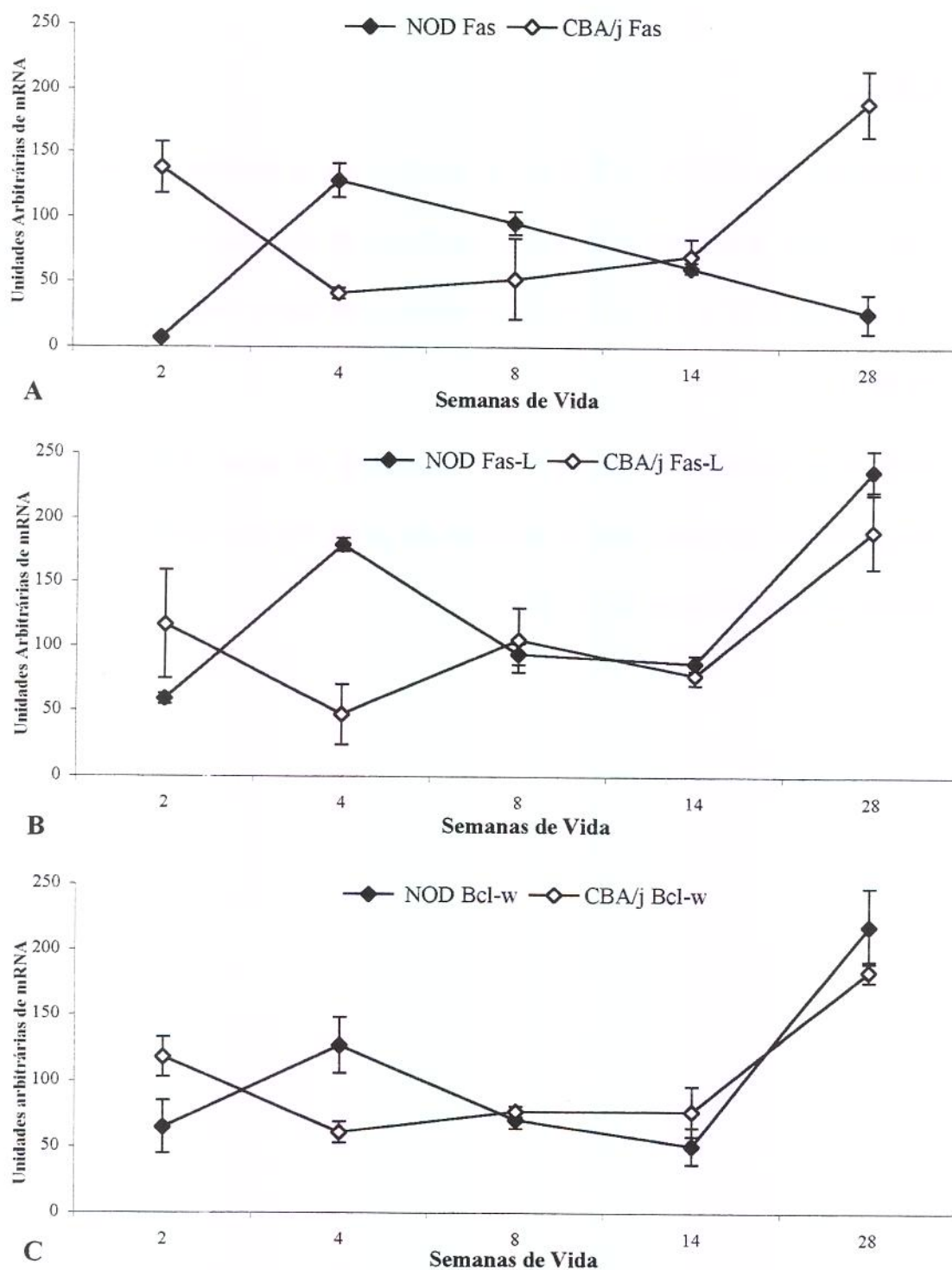


Figura 7. Componentes apoptóticos detectados em sangue periférico. A análise do mRNA de Fas mostra níveis aumentados na 4ª semana de vida, diminuindo gradativamente com o avanço da idade nos animais do grupo Bn (NOD), por outro lado, os animais do grupo Bc (CBA/j) apresentam níveis aumentados na 2ª semana de vida, decaindo na 4ª semana e, posteriormente aumentando progressivamente até a 28ª semana. Observar que as duas linhagens apresentam cinética antagônica de expressão gênica (A). A detecção da expressão gênica de Fas-L no grupo Bn (NOD) mostra a ocorrência de picos desta proteína na 4ª e 28ª semana, contudo com níveis mais elevados que o no grupo controle; o grupo Bc (CBA/j) apresenta valores diminuídos na 4ª semana de vida, com aumento progressivo até a 28ª semana (B). O estudo do mRNA de Bcl-w mostra que os animais mais jovens (2 semanas) do grupo Bn (NOD), apresentam níveis relativamente baixos desta proteína, com o envelhecimento dos animais verifica-se um aumento na 28ª semana de vida; cinética semelhante observa-se nos animais do grupo Bc (CBA/j), a diferença pode ser observada nos animais com 2 semanas, os quais apresentam valores aumentados de Bcl-w, que são mantidos até a 28ª semana de vida, quando ocorre um grande aumento na expressão da mesma (C).

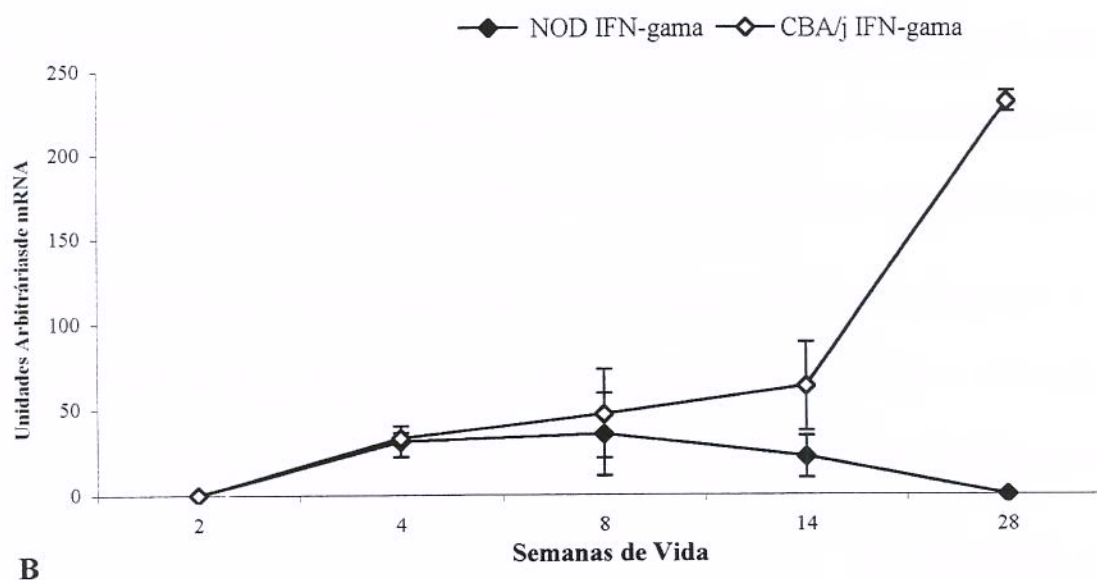
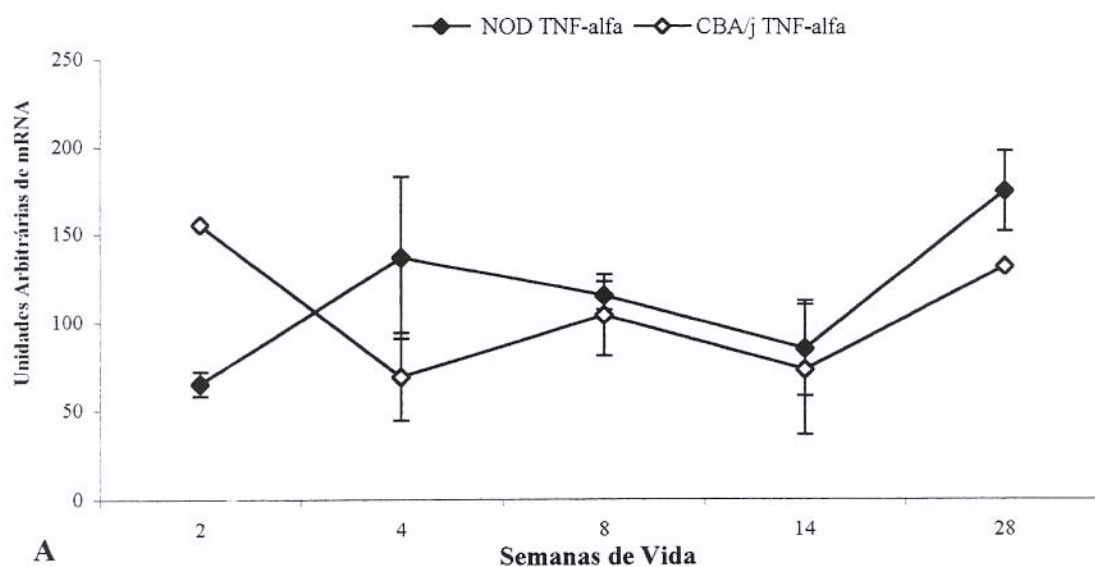


Figura 8. Detecção de citocinas em sangue periférico. A expressão do mRNA de TNF-alfa exibe padrões não lineares. No grupo Bn (NOD) observa-se valores inicialmente baixos, que variam com o decorrer da idade, apresentando aumento nos animais com 28 semanas; os animais do grupo Bc (CBA/j) exibem níveis inicialmente aumentados, que diminuem e posteriormente voltam a subir na 28ª semana de vida (A). A detecção da expressão gênica de IFN-gama no grupo Bn (NOD) apresenta-se baixos, sugestivo de níveis basais desta citocina; cinética semelhante foi observada nos animais do grupo Bc (CBA/j), entretanto, observa-se uma importante elevação nos níveis desta citocina na 28ª semana de vida. (B).

6.2.4. Baço

Fas, Fas-L e Bcl-w

Os valores da semiquantificação referente à expressão gênica do Fas foram baixos em ambos grupos Bn e Bc, entretanto, observa-se ligeiro aumento do nível de expressão no grupo Bn 28 semanas (85 ± 13 UA) (Figura 9a, p.114).

Os valores médios de expressão do produto gênico Fas-L, conforme demonstrado na figura 9b (p.114), permitem observar a existência de respostas aumentadas em ambos grupos Bn (150 ± 32 UA) e Bc (159 ± 14 UA) com 2 semanas de vida. Em visão mais detalhada de ambos os grupos, é possível verificar uma constância nos níveis de expressão nos animais controle (Bc). Em contraste os animais do grupo Bn, onde se verificou a tendência de elevação nos níveis de Bcl-w a partir da 8ª semana-e mantendo-se sempre superiores ao observado nos animais do grupo controle (Figura 9b, p.114).

A expressão para o mRNA do Bcl-w não apresentaram diferenças entre os grupos estudados (Bn e Bc), permitindo ainda verificar níveis aumentados nos animais de 2 semanas grupos Bn (140 ± 38 UA) e Bc (119 ± 1 UA) (Figura 9c, p.114)

TNF- α , IFN- γ e IL-2

Análise da expressão do mRNA de TNF- α no grupo Bn permitiu observar que os níveis de expressão aumentaram no decorrer da idade, ocorrendo ligeira diminuição nos animais de 28 semanas (153 ± 25 UA) (Figura 10a, p.115). Em contrapartida, os valores médios da semi-quantificação deste mRNA para os animais do grupo Bc apresentaram de

forma diminuída com o avanço da idade. Ainda neste contexto, é importante ressaltar que os níveis de expressão para TNF- α eram superiores nos animais do grupo Bc (Figura 10a, p.115).

Os níveis médios de expressão de INF- γ foram baixos em ambos os grupos (Bn e Bc), não sendo possível observar elevação nos níveis desta citocinas nas diferentes idades estudadas (Figura 10b, p.115).

Os valores da expressão gênica de IL-2 foram baixos em ambos o grupo (Bn e Bc) sem variações nas diferentes idades estudadas, cabe ressaltar ainda, que o baço foi à única fonte de estudo no qual o cDNA foi possível amplificar o sinal de IL-2 (Figura 10c, p.115).

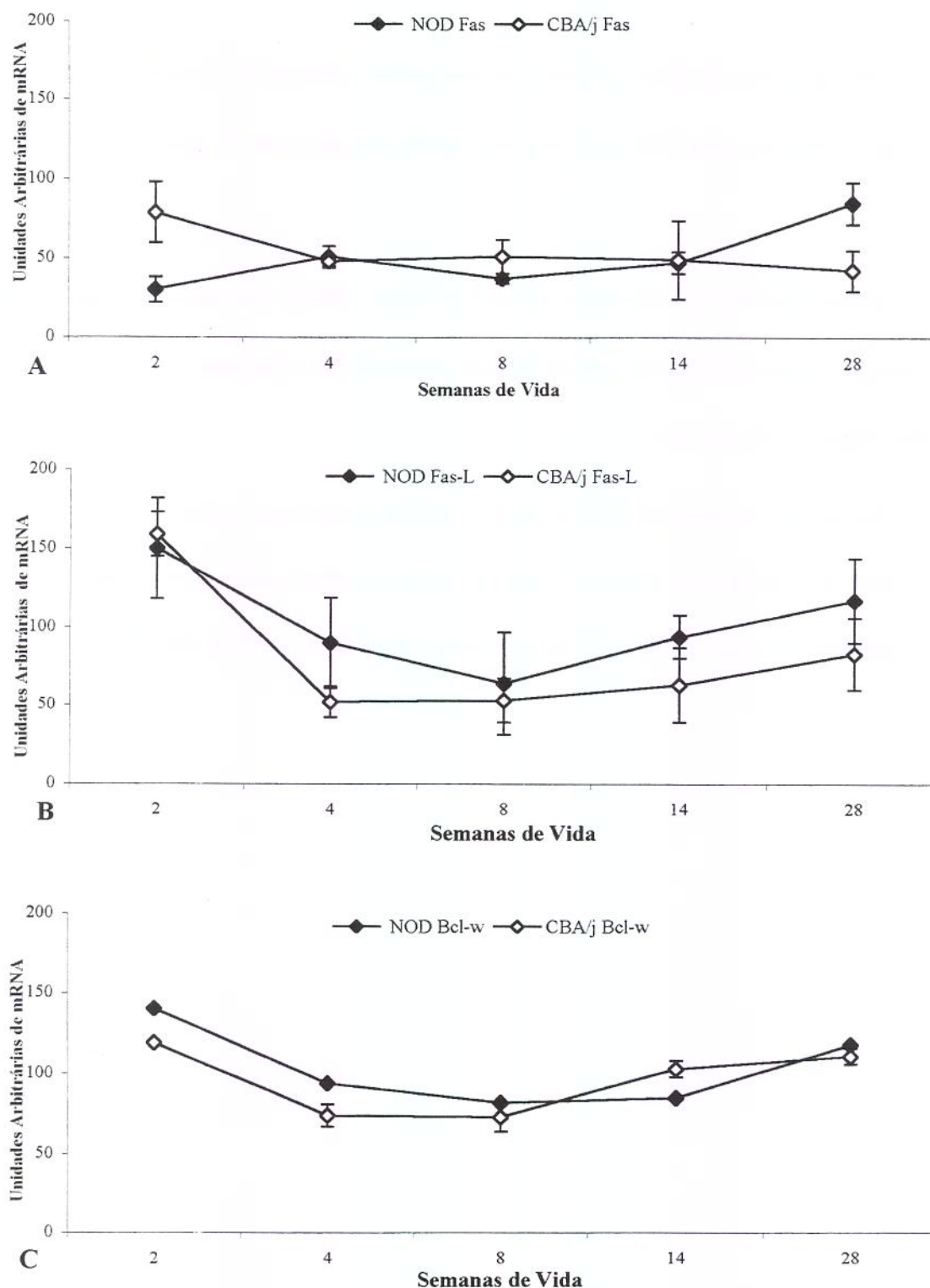


Figura 9. Componentes apoptóticos detectados em baço. A expressão do mRNA de Fas detectada no baço dos animais Bn (NOD) mostra níveis crescentes desta citocina a partir da 8ª semana; por outro lado, os animais do grupo Bc (CBA/j) não apresentam alterações, sugestivo de que estes sejam níveis basais (A). Os níveis de Fas-L no grupo Bn (NOD) apresentam queda até a 8ª semana, quando ocorre aumento progressivo até a 28ª semana; verificou-se que no grupo Bc (CBA/j) a cinética se apresenta de forma semelhante ao encontrado no grupo Bn (NOD), com níveis menores (B). O estudo do mRNA de Bcl-w mostra que tanto os animais do grupo Bn (NOD) como os do grupo Bc (CBA/j), apresentam queda na expressão deste mRNA até a 8ª semana de vida, com posterior elevação nos níveis até a 28ª semana (C).

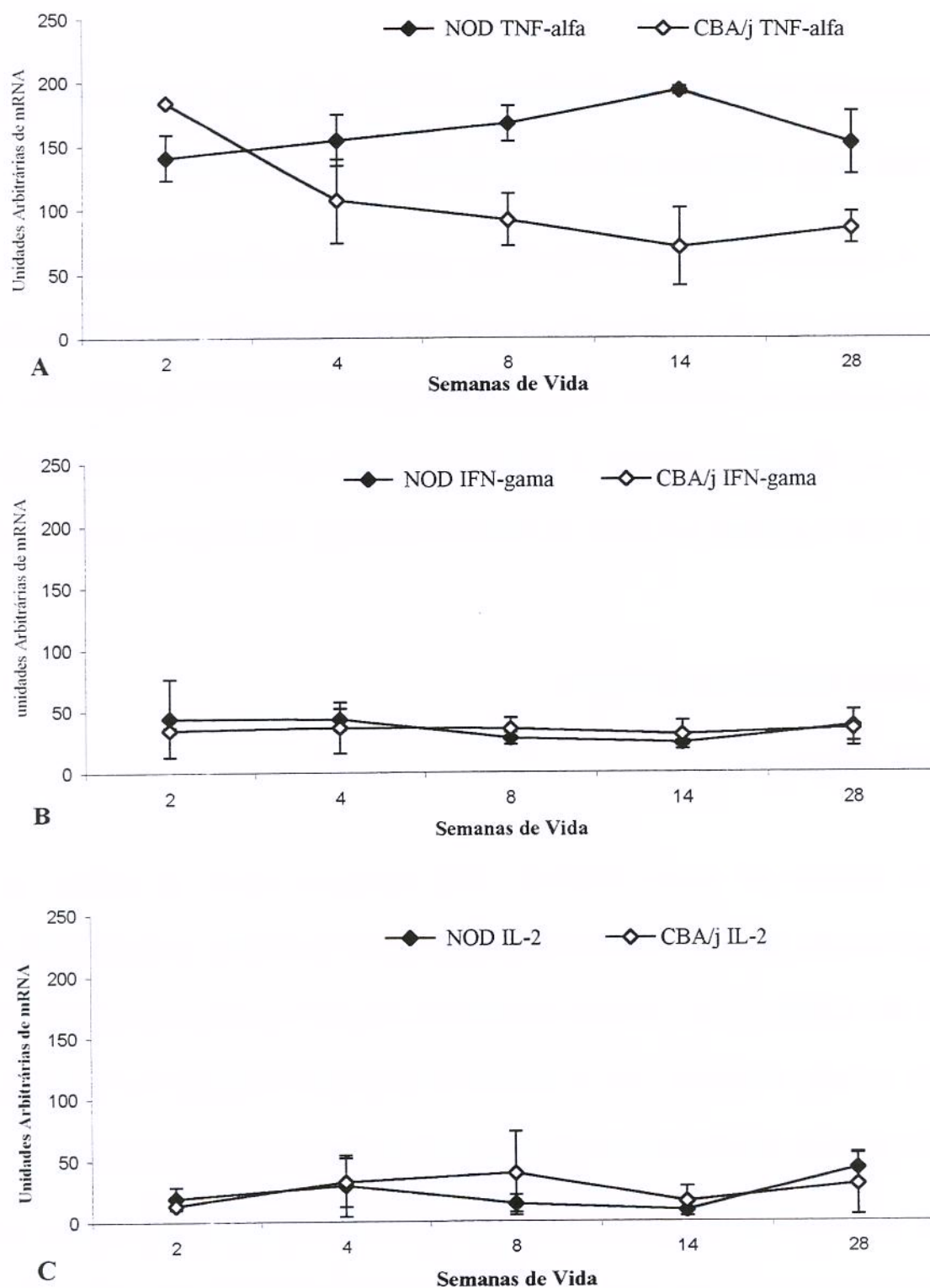


Figura 10. Detecção de citocinas em baço. O grupo Bn (NOD) exibe um aumento progressivo até a 14ª semana de idade quando ocorre uma pequena queda nos níveis do mRNA de TNF-alfa na 28ª semana; ao contrário, os animais do grupo Bc (CBA/j) apresentam valores aumentados nos animais com 2 semanas de vida, com queda na 4ª semana de vida, este nível permanece estável até a 28ª semana (A). A detecção da expressão gênica de IFN-gama tanto no grupo Bn (NOD) como no grupo Bc (CBA/j), apresentam-se reduzidos e inalterados por todo período avaliado (B). A avaliação dos índices de mRNA de IL-2 mostra que nos animais do grupo Bn (NOD) estes mantêm-se relativamente constantes e baixos até a 14ª semana, na 28ª semana ocorre uma pequena elevação desses índices; os níveis encontrados nos animais do grupo controle (Bn-CBA/j) não diferem substancialmente daqueles encontrados no grupo Bn (NOD), contudo, observou-se pequena elevação nos animais com 8 semanas de vida (C).

6.3. Expressão Molecular de Citocinas e Componentes de Apoptose em Sangue Periférico, Baço e Pâncreas de Camundongos NOD Diabéticos.

A expressão de mRNA de citocinas e componentes apoptóticos em camundongos NOD diabéticos (Ad) foi analisada em amostras de células sangüíneas periféricas, baço e tecido pancreático e comparada com animais do grupo An (NOD não diabéticos) e Ac (CBA/j) com 28 semanas de vida. A análise estatística (teste não-paramétrico de Mann-Whitney Exato) aplicada no grupo de animais diabéticos comprovou a homogeneidade deste grupo.

6.3.1. Células sangüíneas periféricas

Fas, Fas-L e Bcl-w

Os animais do grupo diabético (Ad) expressam níveis de mRNA de Fas significativamente ($p < 0.05$) maiores que seus controles correlatos, animais NOD de 28 semanas não diabéticos (An). Observa-se, contudo, situação oposta na comparação entre o grupo de animais diabéticos (Ad) e animais controle não correlatos Ac (CBA/j), cuja expressão de Fas é significativamente maior conforme Tabela 3, p.120; $p < 0.05$.

A avaliação da expressão de mRNA de Fas-L permitiu demonstrar valores significativamente inferiores ($p < 0.05$) nos animais diabéticos àqueles observados nos grupos An (NOD) e Ac (CBA/j) de 28 semanas de vida (Tabela 3, p.120).

Análise da expressão gênica de Bcl-w em sangue de animais diabéticos permitiu caracterizar níveis significativamente inferiores ($p<0.05$) quando comparados com animais do grupo An (NOD) Ac (CBA/j) 28 semanas (Tabela 3, p.120).

TNF- α , IFN- γ

O produto do gene do fator de necrose tumoral (TNF- α) apresentou-se significativamente inferior nos animais do grupo diabético (Ad), em comparação aos animais do grupo An (NOD 28 semanas) ($p<0.05$). Em contraste, os níveis de expressão deste gene apresentaram-se significativamente superiores nos animais diabéticos, quando comparados aos animais do grupo controle (CBA/j) ($p<0.05$ - Tabela 3, p.120).

Na análise da semi-quantificação da expressão do IFN- γ observou-se que os animais diabéticos apresentaram níveis significativamente superiores aos animais do grupo An (NOD não diabéticos de 28 semanas) e significativamente inferiores aos animais do grupo controle (CBA/j) ($p<0.05$ - Tabela 3, p.120).

6.3.2. Baço

Fas, Fas-L e Bcl-w

O mRNA de Fas estava expresso significativamente em níveis inferiores nos animais diabéticos (grupo Ad) em relação aos animais do grupo An com 28 semanas de vida ($p<0.05$) e, com valores de expressão que não diferiram estatisticamente com o grupo controle (Ac) estudado (Tabela 3, p.120).

A detecção da expressão do mRNA de Fas-L, como observado no sangue, apresentou-se novamente, significativamente inferior nos animais do grupo Ad (diabéticos) em comparação aos animais do grupo An (NOD) com 28 semanas de vida ($p < 0.05$). Ao passo que, a expressão observada nos animais controle Ac (CBA/j) foi significativamente superior ($p < 0.05$ - Tabela 3, p.120).

Na análise da expressão gênica de Bcl-w os níveis deste produto estavam significativamente inferiores nos animais do grupo Ad (diabéticos) em relação aos dos grupos An e Ac de 28 semanas de vida ($p < 0.05$) (Tabela 3, p.120).

TNF- α , IFN- γ e IL-2

Comparativamente, os animais do grupo Ad (NOD-diabéticos) expressaram níveis significativamente inferiores ($p < 0.05$) aos demais grupos, o correlato de 28 semanas não diabéticos (An, NOD) e o não correlato (Ac, CBA/j) também de 28 semanas de vida (Tabela 3, p.120).

Por outro lado, a expressão gênica de IFN- γ no grupo dos animais diabéticos (Ad) não diferiu estatisticamente entre os grupos estudados, apresentando valores uniformes (Tabela 3, p.120).

A expressão do gene para IL-2 no grupo diabético (Ad) permitiu observar resultados significativamente inferiores aos encontrados nos grupos An (NOD) e Ac (CBA/j) ($p < 0.05$ -Tabela 3, p.120).

6.3.3. Pâncreas

Não foi possível observar a expressão de mRNA correspondente a Fas, IL-2 e em nenhuma das amostras de pâncreas estudado nos diversos grupos e idades.

Fas-L e Bcl-w

Os níveis de expressão de Fas-L no grupo Ad (diabéticos) apresentaram-se significativamente diminuídos quando comparados aos pâncreas dos animais dos grupos An (NOD) e Ac (CBA/j) com 28 semanas de vida ($p < 0.05$) (Tabela 3, p.120).

Ao passo que, os valores médios de expressão para Bcl-w não diferiram estatisticamente entre os grupos estudados conforme descrito na tabela 3.

TNF- α , IFN- γ

Os níveis de expressão de TNF- α foram significativamente inferiores ($p < 0.05$) no grupo Ad (animais diabéticos) em comparação com os animais do grupo An (NOD) com 28 semanas de vida, não sendo possível observar diferença significativa nos níveis de expressão desta citocina nos animais do grupo Ac (CBA/j) com a respectiva idade (Tabela 3, p.120).

Por outro lado, ao se analisar a expressão gênica para IFN- γ no pâncreas de animais diabéticos verifica-se valores significativamente superiores ($p < 0.05$) aos dos animais de 28 semanas de vida do grupo An (NOD) e do grupo Ac (CBA/j) (Tabela 3, p.120).

mRNA	SANGUE			BAÇO			PÂNCREAS		
mRNA	Ad Grupo Diabéticos	An Grupo NOD(28s)	Ac Grupo CBAj(28s)	Ad Grupo Diabéticos	An Grupo NOD(28s)	Ac Grupo CBAj(28s)	Ad Grupo Diabéticos	An Grupo NOD(28s)	Ac Grupo CBAj(28s)
FAS	87*	26*	189*	43*	85*	42	-	-	-
FAS-L	84*	237*	190*	95*	117*	83*	70*	84*	83*
BCL-W	87*	219*	184*	95*	118*	111*	65	75	78
TNF- α	142*	175*	132*	67*	153*	86*	66*	98*	71
IFN- γ	35*	0	232*	37	37	35	23*	8*	8*
IL-2	-	-	-	16*	43*	30*	-	-	-

Teste não paramétrico de Mann-Whitney Exato (*p< 0.05), valores expressos em unidades arbitrárias (U.A).

Tabela 3. Dados comparativos da expressão gênica entre animais diabéticos com animais dos grupos An e Ac com 28 semanas de vida.

DISCUSSÃO

Grande parte do entendimento da fisiopatologia do diabetes mellitus auto-imune está fundamentado em estudos realizados em camundongos da linhagem de NOD, a qual se caracteriza pela ativação de linfócitos auto-reativos indutores da destruição das células β pancreáticas. Este modelo tem fornecido dados importantes para o desenvolvimento de terapias que poderão induzir mecanismos imuno-regulatórios responsáveis pela eliminação da resposta imune potencialmente patogênica (ANDORINI *et al.*, 2002).

Com a finalidade de elaborar protocolo adequado para a análise do infiltrado inflamatório entre o período da progressão da insulite e o desenvolvimento do diabetes clínico, foi realizado estudo histopatológico detalhado do pâncreas de camundongos NOD e CBA/j entre a 2ª semana e a 28ª semana de vida, avaliando-se assim, a cinética de evolução da insulite.

Os dados morfométricos obtidos através do estadiamento do processo inflamatório, permitiram avaliação segura do número e graus de insulite encontrados no período estudado. Conforme descrito anteriormente em Material e Métodos, foram analisados 1.470 μm de tecido por órgão por animal, o que permitiu análise representativa da totalidade do pâncreas, uma vez que foi abrangente o suficiente para o estudo do mesmo.

Paralelamente foi monitorizado o fenótipo das células do processo inflamatório nos pâncreas dos animais no período já descrito e, posteriormente, após a classificação da evolução da insulite foi realizada análise da reação de Feulgen e TUNEL nos respectivos pâncreas.

Os resultados demonstraram alterações estruturais nas ilhotas pancreáticas, ocasionadas pela infiltração de células mononucleares, característica da instalação da insulite tanto em animais diabéticos, como em pré-diabéticos. A evolução do processo inflamatório está associada à perda progressiva do número total de ilhotas (KIKUTANI & MAKINO, 1992).

Observou-se a reprodução dos achados morfológicos nas várias fases de evolução da insulite, no curso do DM-1 espontâneo em fêmeas NOD, como já descrito por SIGNORE *et al.* (1989). O infiltrado insular invasivo afetou de forma homogênea, o conjunto das ilhotas pancreáticas nos grupos estudados.

Assim, como estabelecido no protocolo para o estadiamento da evolução da insulite, evidenciou-se diminuição progressiva e proporcional, em função do tempo, do número de ilhotas normais ou levemente acometidas (peri-insulite), concomitante com o aumento do número de ilhotas pancreáticas com grau de insulite moderada, avançada e invasiva, dados estes já observados por VOLPINI (1996).

Diversos autores verificaram que a partir da 5ª semana, há a progressão da insulite até o início do diabetes que ocorre, dependendo da colônia, por volta 20ª a 25ª semana. Estes trabalhos descrevem o aumento da infiltração de células inflamatórias na ilhota, juntamente com a diminuição das células β (SIGNORE *et al.*, 1989; KIKUTANI & MAKINO, 1992; PAPACCIO, *et al.* 1993).

Conforme o esperado, nos animais diabéticos o número total de ilhotas estava diminuído, estas exibiam insulite invasiva e destrutiva. Verifica-se que a destruição das

ilhas pancreáticas desencadeia a formação de cicatrizes sem a presença de linfócitos, indicando a resolução do processo inflamatório nestes animais (SIGNORE, 1989).

MIYAZAKI *et al.*, 1985 e SIGNORE *et al.*, 1989 estudaram histologicamente o DM-1 espontâneo em camundongos NOD, relatando a proporção de ilhotas em diferentes graus de insulite, em função das idades dos animais. Nestes estudos, contudo, não foram relatados os números precisos de ilhotas de acordo com intensidade da insulite.

Nossos resultados evidenciam que apesar da ocorrência do processo infiltrativo intenso, semelhante aos animais diabéticos, nos grupos An 14 e 28 não houve a manifestação do diabetes clínico, provavelmente devido a maior prevalência de ilhotas funcionais.

Paralelamente à quantificação de ilhotas e à análise dos graus de insulite, foram realizados estudos imunoistoquímicos do pâncreas destes animais com o objetivo de demonstrar a presença de linfócitos T, os quais constituem 26-97% do total de células infiltradas, principais representantes das células inflamatórias nas ilhotas dos camundongos NOD, tanto pré-diabéticos quanto diabéticos (KIKUTANI & MAKINO, 1992 e TISCH & McDEVIT, 1996).

Estas observações confirmam o caráter de mediação e mecanismos efetores da resposta inflamatória dos linfócitos T e suas citocinas, observadas nas ilhotas pancreáticas (KAY, *et al.*, 1997; WONG & JANEWAY, 1997).

A citotoxicidade de linfócitos T auto-reativos provavelmente ocasiona a morte das células da ilha pancreática por indução de apoptose. Estudos demonstram a

citotoxicidade exercida por estas células através de duas vias independentes; a via perforinas-granzimas e via Fas, ambas podem acarretar a apoptose da célula alvo (CHERVONSKY *et al.*, 1997; SUAREZ-PINZON *et al.*, 1999; KREUWEL *et al.*, 1999).

Preliminarmente procedemos à detecção de células apoptóticas pancreáticas através da reação de Feulgen onde células com condensação cromatínica ou possíveis núcleos fragmentados foram observados, tanto no interior da ilhota pancreática como no processo inflamatório (WYLLIE *et al.*, 1980). Nossos resultados obtidos pela reação de Feulgen foram confirmados pela técnica de TUNEL.

No presente estudo realizou-se teste para a detecção de células apoptóticas, em todos animais do grupo An (NOD) e Ac (CBA/j). O surgimento de células apoptóticas durante o período de tempo estudado foi observado quando o processo de insulite já estava instalado, sendo observado nos animais NOD com 14 e 28 semanas na sua grande maioria e menos freqüentemente em animais diabéticos onde a insulite é invasiva e destrutiva. Tal fato pode ser explicado em virtude da destruição gradual da população de células β pelo extenso período pré-clínico observado no camundongo NOD, suficiente para justificar a perda das células β e resultar no diabetes (O'BRIEN *et al.*, 1997).

Este mesmo grupo de autores relata também, que a maior quantidade de eventos apoptóticos ocorre por volta da 15ª semana de vida do camundongo NOD, coincidindo com a fase que precede a manifestação do diabetes, compatível com o observado nos grupos de animais com 14 semanas de vida.

Ao associar a intensidade da insulite apresentada nos animais do grupo An 28 semanas, com a não manifestação do diabetes nestes animais, os resultados indicam um grande aumento de eventos apoptóticos nestes pâncreas, sugerindo que o aparecimento de eventos apoptóticos em camundongos NOD com idade avançada possa ser independente da lesão, caracterizando um evento natural.

Contudo, estratégia de estudo *in situ* da lesão das células β no DM-1 deverá ser continuada nos próximos segmentos deste estudo. Com abordagem quantitativa das células apoptóticas nas ilhotas pancreáticas, incluindo a identificação imunoistoquímica de hormônios insulares, de acordo com a idade e intensidade da insulite. Assim, os resultados aqui apresentados serão expandidos com em estes experimentos contribuindo para o esclarecimento dos mecanismos de destruição das células β da ilhota pancreática.

A associação de diferentes técnicas como o estudo da expressão gênica para componentes de apoptose, análise histopatológica, detecção de células apoptóticas *in situ*, são de grande contribuição para avaliação do grau de acometimento do pâncreas, correlacionando a dinâmica de aparecimento destes eventos com a destruição da ilhota.

Este trabalho foi desenvolvido visando caracterizar precocemente o início da expressão de componentes apoptóticos e citocinas pró-inflamatórias em ilhotas recém-isoladas, estendendo-se até a 28ª semana de vida do animal, ou até a manifestação do diabetes clínico.

Comprovando a presença de células β nas amostras de ilhotas isoladas, foi realizado RT-PCR para detecção do mRNA de insulina em todas as análises de citocinas e componentes apoptóticos.

Analisando-se o processo de insulite no camundongo NOD e a expressão gênica de componentes apoptóticos (Fas, Fas-L e Bcl-w), foi possível verificar a expressão aumentada de Fas e Fas-L em camundongos NOD com processo inflamatório intenso, sugerindo o envolvimento da apoptose mediada por Fas no desenvolvimento do diabetes auto-imune. Diversos artigos demonstram os mecanismos auto-imunes envolvidos na manifestação espontânea do DM-1 em camundongos NOD (CASTANO *et al.*, 1990; BACH, 1994).

A opção pela utilização de animais da linhagem CBA/j como controles, fundamentou-se na relativa susceptibilidade desta linhagem para algumas doenças auto-imunes induzidas, como a tireoidite experimental auto-imune e a encefalomielite experimental auto-imune (BEDIN, *et al.*, 1992; LEVINE & SOWINSKY, 1973). Assim, os dados comparativos entre as duas linhagens poderiam contribuir para melhor compreensão dos resultados.

No presente trabalho pudemos verificar o aumento da intensidade de expressão gênica de Fas e Fas-L nos animais do grupo Bn com 14 e 28 semanas de vida quando comparados ao controle Bc (CBA/j), associando-se com a intensidade do processo inflamatório presente nas ilhotas pancreáticas. É importante ressaltar a detecção da

expressão de Fas e Fas-L nos animais controle (CBA/j), sem qualquer processo inflamatório instalado em suas ilhotas pancreáticas.

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

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

Entretanto, outros autores têm demonstrado que a importância da interação Fas/Fas-L na instalação do diabetes é relativa, uma vez que o Fas é constitutivo na maioria dos tecidos e sua expressão pode aumentar na ocorrência do processo inflamatório. As ilhotas pancreáticas não são exceção, embora ilhotas normais de humanos e murinos possam induzir sua síntese *in vitro*, após incubação com citocinas, ou *in vivo*, após a infiltração de linfócitos. Estes autores concluem que a expressão de Fas e Fas-L na ilhota pancreática é dependente do estímulo fornecido pelo processo inflamatório. Portanto, a apoptose seria simplesmente consequência do processo de

destruição iniciado por outros mecanismos como perforinas, receptores de TNF e óxido nítrico (ALLISON & STRASSER, 1998; THOMAS, *et al.*, 1999).

Os altos níveis da proteína Fas-L expressos constitutivamente nas células α podem refletir mecanismos intrínsecos de defesa da ilhota pancreática, protegendo células β e impedindo desta forma a ação de linfócitos. Sabe-se que os linfócitos auto-reativos expressam constitutivamente a molécula de Fas e a interação deste com a molécula de Fas-L presente na suposta célula-alvo poderia desencadear a morte linfocitária por apoptose (SIGNORE, *et al.*, 1997 e 1998).

A participação do sistema Fas/Fas-L tem gerado discussões e polêmicas no meio científico, sem que haja consenso sobre o papel destas moléculas (MATHIS *et al.*, 2001). Alguns estudos indicam que a patogênese do diabetes auto-imune constitui um processo multifatorial, com estágios distintos e o envolvimento de várias células efectoras diferentes. É provável que existam interações funcionais significativas entre as diversas vias inflamatórias como, por exemplo, a indução de Fas por citocinas. Talvez mecanismos e tipos celulares distintos predominem em diferentes estágios da doença. Finalmente, é possível que diversas vias atuem em diferentes indivíduos influenciado por diferenças genóticas ou expressão de auto-antígenos (SU, *et al.*, 2000).

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

vários tipos celulares, essencial para o desenvolvimento adequado da espermatogênese (PRINT, *et al.*, 1998).

Nossos resultados mostraram níveis mais elevados na expressão gênica de Bcl-w nos animais do grupo Bn com 28 semanas, proporcional à ocorrência do processo inflamatório, o que sugere mecanismo protetor estimulado por este fenômeno. O mRNA de Bcl-w foi detectado ainda em ilhotas pancreáticas de camundongos CBA/j, apontando para sua expressão constitutiva.

A hipótese que células β são susceptíveis à apoptose *in vivo*, é uma das explicações do possível mecanismo de depleção destas células no DM-1. Vários genes da família Bcl têm sido encontrados na regulação da apoptose na ilhota pancreática, possivelmente regulando este fenômeno. Não se pode descartar ainda, que os níveis de expressão de Bcl afetem a capacidade de sobrevivência das células da ilhota regulando a apoptose das mesmas (IWAHASHI *et al.*, 1996).

Várias abordagens da expressão de citocinas Th1 em camundongos NOD estão disponíveis na literatura (BRADLEY *et al.*, 1999; HIRAI *et al.*, 2000), contudo, sem a comparação de várias idades ou análises precoces. A análise conjunta de componentes apoptóticos, especificamente Bcl-w, não foram ainda descritas. Neste contexto, os dados apresentados neste trabalho são de extrema relevância, uma vez que trazem novos subsídios para a compreensão da dinâmica de expressão de citocinas e componentes apoptóticos.

Considerando a análise da expressão de citocinas pró-inflamatórias em ilhotas pancreáticas, que caracterizam a resposta Th-1 (TNF- α e IFN- γ), os resultados apresentados sugerem o seu predomínio no pâncreas acometido com processo inflamatório intenso, reforçando o papel destas citocinas pró-inflamatórias na evolução da insulite e, conseqüente sua contribuição para a destruição das ilhotas pancreáticas.

As citocinas analisadas neste trabalho foram detectadas a partir da 2ª semana de vida (TNF- α). O período entre 21 e 25 dias após o início da expressão do TNF- α foi caracterizado como o momento de “decisão” para evolução da insulite não destrutiva, para destrutiva, sustentando a importância temporal da expressão desta citocina no desenvolvimento do diabetes (GREEN, *et al.*, 2000). Este padrão temporal foi verificado na detecção do mRNA do TNF- α , onde observou-se aumento significativo a partir da 4ª semana de vida, sugerindo o evento desencadeante da instalação da insulite destrutiva e do diabetes.

Esta expressão, em estágios avançados da doença, tem sido detectada por outros autores como TOYODA *et al.* (1994) e HIRAI *et al.* (2000). Este último demonstrou a evolução da expressão de INF- γ a partir de estágios precoces da doença (4 semanas de vida), com aumento característico ao redor da 20ª semana de vida.

A participação e os efeitos citotóxicos destas citocinas na destruição das ilhotas pancreáticas têm sido amplamente estudado por RABINOVITCH *et al.* (1998) e correlacionadas com a insulite destrutiva. Assim, estas citocinas aumentam sua expressão juntamente com o avanço da idade nos camundongos (MUIR *et al.*, 1995;

RABINOVITCH & SOAREZ-PINZON, 1998) dados estes confirmados pela RT-PCR e que reforçam a associação destas citocinas na destruição das ilhotas e manifestação do diabetes.

Por outro lado, a expressão de mRNA TNF- α , em relação aos controles não relacionados e aos NOD não diabéticos, permaneceu expresso em todo o período estudado e evolução da doença. Este resultado é semelhante ao obtido por TOYODA *et al.* (1994).

Quanto à expressão comparativa entre mRNA de citocinas e componentes de apoptose, pudemos verificar níveis aumentados de TNF- α , INF- γ e Fas nas ilhotas associado às alterações do escore do processo inflamatório. A citotoxicidade foi verificada pela presença de TNF- α e INF- γ na indução de Fas e lesão das células β .

A hipótese do sinergismo entre IFN- γ e TNF- α como agentes de indução de apoptose da célula β foi demonstrada *in vitro* em cultura de células de insulinoma (SUK, *et al.*, 2001), assim como na ilhota pancreática, contudo a natureza desta não foi esclarecida (CAMPBELL, *et al.*, 1988).

Para ampliar a compreensão do estabelecimento temporal de citocinas e componentes apoptóticos, estes resultados serão complementados em outro projeto a ser desenvolvido no Laboratório de Imunologia Clínica com o estudo da expressão de outros componentes apoptóticos e citocinas com padrão Th2, em pâncreas de animais diabéticos e seus respectivos controles.

Devido à indisponibilidade de ilhotas nos animais diabéticos, padronizamos adicionalmente o estudo em pâncreas total para todos os grupos analisados. Ao avaliarmos a expressão gênica dos componentes de apoptose no pâncreas total, não foi possível detectar a expressão de Fas em nenhum dos grupos de animais estudados (Bn, Bc e diabéticos). Uma possível explicação seria a utilização do órgão inteiro, o qual prejudica a detecção mais acurada dos pontos em questão, contudo estes dados foram esclarecidos pelo estudo realizado em ilhotas recém isoladas.

FAULKNER-JONES e colaboradores (1996) para realização da análise de mRNA de citocinas em pâncreas total, manipularam minimamente este órgão após o sacrifício, com objetivo de preservar os padrões de expressão observados *in vivo*. Reforçando que embora o pâncreas reflita as condições *in vivo* melhor que em ilhotas isoladas e linfócitos, está sujeito a um efeito de diluição de seus mRNAs.

Por outro lado, a expressão de Fas-L tem sido observada sem grandes variações, com padrões que não diferem de seu respectivo controle. De modo que, sua expressão não acompanhou a intensidade do processo inflamatório instalado no pâncreas dos animais do grupo An (NOD) com 28 semanas de vida. KIM *et al.* (2000) concluíram que a molécula Fas-L não é efetora da destruição das células β .

Os resultados obtidos na análise da expressão de mRNA de Bcl-w em pâncreas, demonstram que esta citocina diminui com o avanço da idade, dados compatíveis com seus respectivos controles, o grupo Ac (CBA/j). Entretanto, a análise de sua expressão em ilhotas isoladas destes animais, verifica-se níveis aumentados com o avanço da idade.

Na análise de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IFN- γ) a expressão foi constante em ambos os grupos estudados (An e Ac). Inesperadamente, nos resultados da expressão de mRNA de citocinas por RT-PCR em pâncreas total de camundongos NOD constatou-se incompatibilidade entre os resultados obtidos nas ilhotas isoladas, a insulite e a destruição das ilhotas pancreáticas. Este fato constitui um indicativo da importância da realização dos estudos de expressão gênica tanto na ilhota isolada, como em pâncreas total, dada a complementaridade de seus resultados.

O aparente paradoxo dos dados pode estar relacionado com as diferentes abordagens realizadas neste estudo. É importante ressaltar que a avaliação da expressão na ilhota reflete o quadro real exclusivamente da porção endócrina do pâncreas, isolando os demais tipos celulares presentes neste órgão, os quais podem interferir nos resultados obtidos. Esta hipótese, permitiu explicar as divergências obtidas pelos resultados.

A indução da apoptose via Fas é essencial na preservação da tolerância periférica, a deleção clonal é ineficaz em camundongos que apresentam mutação na molécula Fas e desenvolvem auto-imunidade (GREEN & SCOTT, 1994). Por consequência, está claro que a expressão diminuída de Fas pode afetar a capacidade de manutenção dos níveis normais da tolerância periférica, essencial para a proteção das doenças auto-imunes (FOWLKES & RAMSDELL, 1993).

Assim, na avaliação do mRNA de Fas em sangue periférico do camundongo NOD não diabético, nossos resultados indicam que com o avanço da idade, a expressão de mRNA de Fas diminui e Bcl-w aumenta.

Por outro lado, quando analisamos a expressão de mRNA de Fas no camundongo CBA/j verificamos resultados opostos aos do NOD, com aumento da expressão de Fas no sangue.

GIORDANO *et al.* (1995) relataram a expressão de mRNA Fas em células sangüíneas de pacientes com altos riscos de desenvolver o DM-1 em diferentes estágios da doença. Por outro lado, verificaram redução da expressão de Fas em linfócitos T e B em indivíduos pré-diabéticos e diabéticos como mecanismo alternativo de inibição da apoptose. Se lícito comparar o sistema murino com a doença humana, nossos resultados com relação ao Fas em células sangüíneas de NOD pré-diabéticos, coincidem com os relatos de GIORDANO *et al.*, 1995, salvo a não observação da redução de expressão de Fas nos animais diabéticos.

CHERRADI *et al.*, 1998, observaram em seus experimentos que na fase precoce (1^a semana de vida) do diabetes, as células T auto-reativas dos camundongos NOD exibem resistência aumentada para indução da apoptose, sendo este, uns dos fatores iniciantes de todo processo auto-imune do diabetes, indicando ainda, que este comportamento apoptótico é característico nas células T periféricas desses camundongos, podendo estar associado com os níveis de expressão de Bcl-w.

Demonstramos também, que níveis de citocinas e componentes apoptóticos em baço não refletem os dados observados no local da lesão (ilhota). TOYODA *et al.* 1994, não detectaram a expressão de INF- γ em baço dos camundongos NOD em qualquer

estágio estudado. Dados estes, não compatíveis com nossos, onde detectamos a expressão dessa citocinas no baço em todos os estágios, entretanto em níveis reduzidos.

Após a abordagem da cinética de instalação do processo inflamatório e expressão de componentes apoptóticos e citocinas em camundongos NOD (não diabéticos), no período compreendido entre 2 e 28 semanas de vida, o estudo foi direcionado na tentativa de elucidar os mecanismos efetores do desencadeamento do diabetes. A conclusão do presente trabalho pontua as principais diferenças entre o animais pré-diabéticos e os diabéticos.

O estudo da expressão gênica em animais diabéticos foi realizado em pâncreas, dada a impossibilidade de isolamento de ilhotas nesses animais, devido à intensidade de destruição e drástica redução no número total destas glândulas. Além disso, complementando os dados obtidos diretamente no órgão, a análise foi realizada em sangue periférico e baço. Mantendo como parâmetro de comparação os dados obtidos a partir dos camundongos NOD de 28 semanas não diabéticos.

A determinação dos níveis de expressão do mRNA de Fas-L nos animais diabéticos foi menor em comparação aos controles (Bn e Bc de 28 semanas). A diminuição destes níveis, acentua-se nos animais que manifestaram o diabetes após a 20ª semana de vida, o que sugere a necessidade desta molécula na proteção contra apoptose.

A expressão de Fas-L em células- α pode atuar como um protetor das células β do ataque imunológico (SIGNORE, 1997). Contudo, a inflamação no camundongo NOD pode sobrepor esta proteção, ocasionando a infiltração das células β . Esta hipótese é

sustentada em estudos da expressão do Fas-L em camundongos NOD, o qual apresenta uma mutação em seu gene fazendo com que este ligante tenha sua atividade de interação nove vezes menor que a observada em outras linhagens utilizadas como controle (KAYAGAJI *et al.*, 1997).

Nossos dados são compatíveis nas ilhotas isoladas de animais NOD com 28 semanas não-diabéticos, os quais apresentam altos níveis de Fas-L sem a manifestação clínica da doença.

Outro fato que desperta a atenção é a expressão diminuída do mRNA de Bcl-w, uma das moléculas moduladoras da apoptose, concomitantemente com a queda dos níveis de Fas-L, sugerindo a provável inativação do sistema anti-apoptótico celular, favorecendo desta forma a instalação do diabetes.

Em relação as citocinas Th1 analisadas, o TNF- α apresentou-se diminuído em comparação aos controles (Bn e Bc 28 semanas), esta redução pode estar associada ao término do processo inflamatório, uma vez que as ilhotas encontram-se destruídas. O TNF- α participa da instalação e manutenção dos linfócitos auto-reativos no sítio da lesão, com a resolução da resposta auto-imune e a eliminação da célula-alvo, os níveis desta citocina tendem a diminuir.

Dada sua participação no final do processo inflamatório, verifica-se um importante aumento nos níveis de IFN- γ nos animais diabéticos, com pico de expressão nos animais que manifestaram o diabetes entre a 18ª e 25ª semana de vida. O resultado dos grupos

controle Bn e Bc (28 semanas) são semelhantes, mesmo com o intenso processo inflamatório observado nos camundongos NOD.

Talvez o pico na expressão do IFN- γ represente fenômeno transitório necessário para destruição total das ilhotas e manifestação do diabetes. Sustentando esses dados, a expressão desta citocina está elevada também nas ilhotas isoladas, cujo maior pico de expressão se dá nos animais de 28 semanas não-diabéticos.

O IFN- γ e o TNF- α detectados com níveis elevados em humanos com manifestação recente do diabetes, indica o papel citotóxico destas citocinas. As ações imuno-regulatórias das citocinas são exercidas a pequenas distâncias (autócrinas e parácrinas), dificultando o estudo das funções das citocinas intra-ilhota na evolução da insulite destrutiva das células β , tanto em diabetes humano como em camundongos NOD (RABINOVITCH & SOAREZ-PINZON, 1998).

Nas amostras de sangue de animais diabéticos verificou-se níveis aumentados do mRNA de Fas quando comparados aos animais não diabéticos de 28 semanas, sugerindo a tentativa de manutenção da tolerância periférica, provavelmente induzindo a apoptose pelo processo denominado “morte celular induzida por ativação” (GREEN & SCOTT, 1994). Por outro lado, o mRNA de Fas-L de animais diabéticos mostrou-se diminuído em relação aos animais do grupo controle.

A comparação entre Fas e Fas-L em animais pré-diabéticos demonstra baixos níveis de Fas e altos níveis de Fas-L. Entretanto, ao analisar estes parâmetros nos animais diabéticos verificou-se que estas moléculas apresentam expressão oposta em relação aos

animais pré-diabéticos, na provável tentativa de eliminação dos linfócitos auto-reativos, o que talvez ocorra em virtude da conclusão da resposta imune e eliminação do “antígeno”.

O estudo da expressão de componentes apoptóticos em baço de animais diabéticos apresentou-se diminuída quando comparado com os níveis verificados nos animais com 28 semanas (não diabéticos). Este quadro também se reflete na expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-2), sugerindo a resolução deste processo. Dados semelhantes foram observados na encefalomielite experimental autoimune (EAE) nos períodos de remissão (OLSSON, 1995). Desta forma, com a destruição total das ilhotas pancreáticas, a resposta inflamatória diminuiria paulatinamente. O estudo destas citocinas e componentes apoptóticos em animais diabéticos mantidos com administração de insulina poderia esclarecer esta hipótese.

Por outro lado, não se observou diferença significativa na expressão do IFN- γ no baço, propondo a falta de correspondência com a lesão *in situ*. Contudo, na ilhota isolada verificou-se aumento desta citocina, sugerindo sua atuação tanto em estágios precoces da insulite como em períodos tardios após a destruição da ilhota (RABINOVITCH *et al.*, 1995).

Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que a ação patogênica das citocinas tenha início precoce, com o agravamento deste quadro desencadeando o diabetes. A partir destas observações, novos estudos poderão ser desenvolvidos objetivando a manipulação da expressão destas citocinas e/ou componentes de apoptose em fase precoce do desenvolvimento da insulite.

Contudo, os dados não são suficientes para afirmar que a apoptose induzida pela interação Fas/Fas-L seja ponto crucial na manifestação do diabetes. Os dados obtidos da literatura são também controversos em relação ao Fas/Fas-L, principalmente pela utilização de camundongos “Knockout” gerando diversas dúvidas, uma vez que estes animais têm sua resposta biológica alterada, podendo gerar interpretações incompletas do fenômeno a ser estudado.

Pelo fato da doença nos camundongos NOD se assemelhar em muitos aspectos ao DM-1 em humanos, o entendimento dos mecanismos envolvidos na morte das células β e os fatores que influenciam a suscetibilidade da apoptose podem direcionar o desenvolvimento de novas estratégias para prevenção do diabetes em humanos e também para intervenção precoce que limite o agravamento da doença.

1. A caracterização morfológica e os graus de insulite nos camundongos NOD pré-diabéticos e diabéticos apresentaram perfis evolutivos compatíveis com a idade de cada grupo estudado. Confirmando-se a mediação do processo inflamatório por linfócitos T através da imunoistoquímica.
2. A cinética de expressão molecular de componentes apoptóticos e citocinas foi confirmado em ilhotas recém-isoladas, onde verificou-se o aumento da expressão destas moléculas com o avanço da idade dos animais. A diminuição da expressão de Fas-L e Bcl-w ocorrida nos animais diabéticos sugere a perda de proteção que estes componentes apoptóticos conferem ao órgão.
3. Foi caracterizada no modelo de diabetes mellitus tipo I auto-imune a correlação entre a intensidade do processo inflamatório e a cinética de expressão de citocinas e componentes apoptóticos em ilhotas de Langerhans isoladas.
4. Níveis aumentados de componentes apoptóticos e citocinas pró-inflamatórias em ilhotas pancreáticas associam-se com o início da instalação do processo de insulite em camundongos NOD com 4 semanas de vida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTI K.G.M.M & ZIMMET P.Z. 1998. For the WHO Consultation. 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part I: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabetic Medicine*. 15: 539-553.
- ALLISON, J. & STRASSER, A. 1998. Mechanisms of β cell death in diabetes: A minor role for CD95. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:13818-13822.
- ANDORINI, L., GREGORI, S., HARRISON, L.C. 2002. Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models. *Trends Mol. Med*. 8:31-38.
- ATKINSON, M.A., KAUFMAN, B.L., CAMPBELL, L., GIBBS, K.A., SAH, S., BU, D.F., ERLANDER, M.G., TOBIN, A.J. McLAREN, N.K. 1992. Response of peripheral-blood mononuclear cells to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *Lancet* 339:458-459.
- ATKINSON, M.A. 1997. Mechanisms underlying the loss of self tolerance in NOD mice. 70th Forum in immunology. *Res Immunol* 148: 301-306.
- BACH, J.F. 1994. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocrine Rev*. 15:516-542.
- BACH, J.F. & MATTHIS, D. 1997 The NOD Mouse. 70th Forum in Immunology. *Res Immunol*. 148:285-286.

- BEDIN, C., BRAZILLET, MP., TEXIER, B., CHARREIRE, J. 1992. T cell mapping of one epitope from thyroglobulin inducing experimental autoimmune thyroiditis (EAT). *Int Rev Immunol.* 9(2):125-133.
- BEDOSSA, P., BENDELAC, A., BACH, J., CARNAUD, C. 1989. Syngeneic T cell transfer of diabetes into NOD newborn mice: In situ studies of the autoimmune steps leading to insulin-producing cell destruction. *Eur J Immunol.* 19:1947-1951.
- BOSCHERO, A.C., DELATTRE, E., SANTOS, ML. 1981. Inhibition of insulin release by the aminoglycoside antibiotic sisomycin. *Horm Metab Res.* 13(9):531-532.
- BOTTAZZO, G.F., FLORIN-CHRISTENSEN, A., DONIACH, D. 1974. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 2:1279-1283.
- BRADLEY, L.M., ASENSIO, V.C., SCHIOETZ, L.K., HARBERTSON, J., KRAHL, T., PATSTONE, G., WOOLF, N., CAMPBELL, I.L., SARVETNICK N. 1999. Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. *J Immunol.* 62: 2511-2520.
- CAMPBELL I.L, ISCALO A., HARRISON L.C. 1988. IFN- γ and tumor necrosis factor- α : cytotoxicity to murine islets of Langerhans. *J Immunol.* 141: 2325-2329.
- CASTAÑO L & EISENBARTH G.S. 1990. Type I Diabetes: A chronic autoimmune disease of human, mouse and rat. *Ann Rev Immunol.* 8: 647-679.
- CHERRADI-LAMHAMEDI S.E., LUAN, J.J., ELOY, L., FLUTEAU, G., BACH, J.F., GARCHON, H.J. 1998. Resistance of T-cells to apoptosis in autoimmune diabetic (NOD)

mice is increased in life and is associated with dysregulated expression of Bcl-x.
Diabetologia. 41:178-184.

CHERVONSKY, A.V., WANG, Y., WONG, F. S., VISINTIN, I., FLAVELL, R.A., JANEWAY, C.A., Jr., MATIS, L.A .1997. The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell*. 89:17-24.

CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 162: 156-59.

CORBETT, J.A., SWEETLAND, J. L., WANG, J., LANCASTER, JR., McDANIEL, M.L. 1993. Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1731.

DURINOVICH-BELLÒ. I., HUMMEL, M., ZIEGLER, A.G. 1996. Cellular immune response to diverse islet cells antigens in IDDM. *Diabetes*. 45:795-800.

EISENBARTH, G.S.1986. Type 1 diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease. *N Engl J Med*. 314: 1360-1368.

EIZIRIK, D.L., SANDLER, S., PALMER, J.P. 1993. Repair of pancreatic β cells. A relevant phenomenon in early IDDM? *Diabetes*. 42:1383-1391.

EIZIRIK, D.L., FLODSTROM, M., KARLSEN, A.E., WELSH, N. 1996. The hormone of the spheres: induce nitric oxide synthase and related genes in pancreatic β cells. *Diabetologia* 39:875.

EIZIRIK, D.L., MANDRUP-POULSEN T. 2001. A choice of death - the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia*. 44:2115-2133.

- FAULKNER-JONES, B., DEMPSEY-COLLIER, M., MANDEL, E.T., HARRISON, L.C. 1996. Both Th1 and Th2 cytokine mRNAs are expressed in the nod mouse pancreas in vivo. *Autoimmunity*. 23, 99-110.
- FOWLKES, B.J. & RAMSDELL. 1993. T-cell tolerance. *Curr Opin Immunol*. 5: 873-879.
- GARCHON, H.J., LUAN, J.J., ELOY, L., BEDOSSA, P., BACH, J.F. 1994. Genetic analysis of immune dysfunction in non-obese diabetic (NOD) mice: mapping of a susceptibility locus close to bcl-2 gene correlates with increased resistance of NOD T cells to apoptosis induction. *Eur J Immunol*. 24:380-384.
- GAVRIELI, Y., SHERMAN, Y., BEN-SASSON, S.A. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 119: 493-501.
- GERSCHENSON, L.E., ROTELLO, R.J. 1992. Apoptosis: a different type of cell death. *Faseb J*. 6:2450-55.
- GIBSON, L., HOLMGREEN, S.P., HUANG, D.C., BERNARD, O., COPELAND, N.G., JENKINS, N.A., SUTHERLAND, G.R., BAKER, E, ADAMS, J.M., CORY, S. 1996. Bcl-w, a novel member of the Bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene*.13(4):665-675.
- GIORDANO, C., MARIA, R., STASSI, G., TODARO, M., RICHIUSA, P., GIORDANO, M., TESTI, R., GALLUZZO, A. 1995. Defective expression of the apoptosis-inducing CD95 (Fas/APO-1) molecule on T and B cells in IDDM. *Diabetologia*. 38:1449-1454.
- GRANVILLE, D.J., CARTHY, C.M., HUNT, D.W.C., McMANUS, B.M. 1998. Apoptosis: molecular aspects of cell death and diseases. *Lab Invest*. 78(8):893-913.

- GREEN, D.R., SCOTT, D.W. 1994. Activation-induced apoptosis in lymphocytes. *Curr Op Immunol.* 6:476-487.
- GREEN, E.A., WONG, F.S., ESHIMA, K., MORA, C., FLAVELL, R.A. 2000. Neonatal tumor necrosis factor-alpha promotes diabetes in nonobese diabetic mice by CD154-independent independent antigen presentation to CD8+ T cells. *J Exp Med.* 191:225-238.
- GURLO, T., KAWAMURA, K., GRAFENSTEIN, H.V. 1999. Role of inflammatory infiltrate in activation and effect function of cloned islet reactive nonobese diabetic CD8+ T cells: Involvement of a nitric oxide-dependent pathway. *J Immunol.* 163: 5770-5780.
- HARRISON, L.C., CHU, S.X., DeAIZPURUA, H.J., GRAHM, M., HONEYMAN, M.C., COLMAN, P.G. 1992. Islet-reactive T cells are a marker of preclinical insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest.* 89:1161-1165.
- HARTEMANN, A H., RICHARD, M.F., BOITARD, C. 1999. Absence of significant Th2 response in diabetes-prone non-obese diabetic (NOD) mice. *Clin Exp Immunol.* 116:225-230.
- HAYWARD, A.R., SCHREIBER, M. 1989. Neonatal injection of CD4 antibody into nonobese diabetic mice reduces the incidence of insulinitis and diabetes. *J Immunol.* 143:1555-1559.
- HIRAI, H., KAIANO, T., ITO, T., KIDA, K. 2000. Analysis of cytokine mRNA expression in pancreatic islet of nonobese diabetic mice. *J Pediatric Endocrinol & Metabolism*, 13: 91-98.
- HONEYMAN, M.C., CRAM, D.S., HARRISON, L.C. 1993. Glutamic acids decarboxylase 67-reactive T-cells: a marker of insulin-dependent diabetes. *J Exp Med.* 177:535-540.

- INGELSSON, E., SALDEEN, J., WELSH, N. 1998. Islet expression of perforin, Fas/APO-1 and interleukin-1 converting enzyme (ICE) in non obese diabetic (NOD) mice. *Immunol Lett.* 63: 125-129.
- ITOH, N., TSUJIMOTO, Y., NAGATA, S. 1993. Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J Immunol.* 151:621-627.
- ITOH, N., IMAGAWA, A., HANAFUSA, T., WAGURI, M., YAMAMOTO, K., IWAHASHI, H., MORIWAKI, M., NAKAJIMA, H., MIYAGAWA, J., NAMBA, M., MAKINO, S., NAGATA, S., KONO, N., MATSUZAMA, Y. 1997. Requirement of Fas for the development of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med.* 186:613-618.
- IWAHASHI, H., HANAFUSA, T., EGUCHI, Y., NAKAJIMA, H., MIYAGAWA, J., ITOH, N., TOMITA, K., NAMBA, M., KUWAJIMA, M., NOGUCHI, T., TSUJIMOTO, Y., MATSUZAMA, Y. 1996. Cytokine-induced apoptotic cell death in a mouse pancreatic beta cell line: inhibition by bcl-2. *Diabetologia.* 39:530-536.
- JUN, H.S., YOON, C.S., ZBYTNUK, L., van ROOIJEN, N., YOON, J.W. 1999. The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med.* 18: 189-192.
- KAGI, D., ODERMATT, B., SEILER, P., ZINKERNAGEL, R.M., MAK, T.W., HENGARTNER, H. 1997. Reduced incidence and delayed onset of diabetes in perforin-deficient nonobese diabetic mice. *J Exp Med.* 186:989-997.
- KAWAMURA, T., NAGARA, M., UTSUGI, T., YOON, J.W. 1993. Prevention of autoimmune type I diabetes by CD4⁺ suppressor T cells in superantigen-treated non-obese diabetes mice. *J Immunol.* 151:4362-4370.

- KAY, T.W.H., CHAPLIN, H.L., PARKER, J.L., STEPHENS, L.A., THOMAS, H.E. 1997. CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes: clarification of their pathogenic roles in diabetes in the NOD mouse. 70th Forum in Immunology. Res Immunol.148:320-326.
- KAYAGAJI, N., YAMAGUSHI, N., NAGAO, F., MATSUO, S., MAEDA, H., OKOMURA, K., YAGITA, H. 1997. Polymorphism of murine Fas ligand that affects the biological activity. Proc Natl Acad Sci USA. 94:3913-3919.
- KELLER, R.J. 1990. Cellular immunity to human insulin in individuals at high risk for the development of type I diabetes mellitus. J Autoimmun. 3:321-327.
- KIKUTANI, H. & MAKINO, S. 1992. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. Adv Immunol. 51:285-322.
- KIM, S., KIM, K., HWANG, D.Y., LEE, T.H., KAYAGAKI, N., YAGITA, H., LEE, M.S. 2000. Inhibition of autoimmune diabetes by Fas Ligand: the paradox is solved. J Immunol. 164: 2931-2936.
- KIM, Y-H., KIM, S., KIM, K-A; YAGITA, H., KAYAGAKI, N., KIM, K-W., LEE, M-S. 1999. Apoptosis of pancreatic β -cells detected in accelerated diabetes of NOD mice: no role of Fas-Fas Ligand interaction in autoimmune diabetes. Euro J Immunol. 29:455-465.
- KRAMMER, P.H. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. Nature. 407:789-795.
- KREUWELL, H.T.C., MORGAN, D.J., KRAHL, T., KO, A., SARVETNICK, N., SHERMAN, L.A. 1999. Comparing the relative role of perforin/granzyme versus Fas/Fas ligand cytotoxic

- pathways in CD8⁺ T cell-mediated insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Immunol.* 163:4335-4341.
- LACY, P.E., KOSTIANOVSKY, M. 1967. A method for the isolation of intact islet of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes.* 16: 35-39.
- LAFFERTY, K.J. 1997. Immunobiology of autoimmune diabetes. *Res Immunol.* 148:285-366.
- LENARDO, M.J. 1996. Fas and the art of lymphocyte maintenance. *J Exp Med.* 183:721-724.
- LENARDO, M.J. The molecular regulation of lymphocyte apoptosis. 1997. 70th Forum in Immunology. *Res Immunol.* 9:1-5.
- LEVINE, S., & SOWINSKI, R. 1973. Experimental allergic encephalomyelitis in inbred and outbred mice. *J Immunol.* 110:139-143.
- LIU, D., PAVLOVIC, D., CHEN, MC., FLODSTROM, M., SANDLER, S., EIZIRIK, D.L. 2000. Cytokines induce apoptosis in β -cells isolated from mice lacking the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS^{-/-}). *Diabetes.* 49:1116-1122.
- MAKINO, S., KUNIMOTO, K., MURAOKA, Y., MIZUSHIMA, Y., KATAGIRI, K., TOCHINO, Y. 1980. Breeding of a non-obese diabetic strain of mice. *Exp Anim* 29:01-13.
- MATHIS, D., VENCE, L., BENOIST, C. 2001. β cell death during progression to diabetes. *Nature* 414:792-798.
- MILLER, B.J., APPLE, M.C., O'NEILL, J.J., WICKER, L.S. 1998. Both the Lyt2 and L3T4⁺ T cell subset are required for the transfer of diabetes in non-obese diabetic mice. *J Immunol.* 140:52-58.

- MIYAZAKI, A., HANAFUSA, T., YAMADA, K., MIYAGAWA, J., FUJINO-KURIHARA, H., NAKAJIMA, H., NONAKA, K., TARUI, S. 1985. Predominance of T lymphocytes in pancreatic islets and spleen of pre-diabetic non-obese diabetic (NOD) mice: a longitudinal study. *Clin Exp Immunol* 1985 Jun;60(3):622-30
- MOSKALEWSKI, S. 1965. Isolation and culture of the islet of Langerhans of the guinea pig. *Gen Comp Endocrinol.* 5:342.
- MUIR, A., PECK, A., CLARE-SALZLER, M., SONG, Y-H., CORNELIUS, J., LUCHETTA, R., KRISCHER, J., MACLAREN, N. 1995. Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulinitis characterized by diminished intraislet interferon- γ transcription. *J Clin Invest* 95:628-634.
- NAGATA, M., SANTAMARIA, P., KAWAMURA, T., UTSUGI, T., YOON, J.W. 1994. Evidence for the role of CD8⁺ cytotoxic T cells in the destruction of pancreatic beta cells in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 152:2042-2050.
- NAGATA, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell.* 88:355-365.
- NAKHOODA, A.F., LIKE, A.A., CHAPPEL, C.I., MURRAY, F.T., MARLISS, E.B. 1977. The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. *Diabetes.* 26:100-112.
- NEPOM, G.T., ERLICH, H. 1991. MHC class-II molecules and autoimmunity. *Annu Rev Immunol.* 9: 493-526.

- O'BRIEN, B.A., HARMON, B.V., CAMERON, D.P., ALLAN, D.J. 1997. Apoptosis is the mode of β -cell death responsible for development of IDDM in the nonobese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes*. 46: 750-757.
- O'REILLY, L.A., HUTCHINGS, P.C., CROCKER, P.R., SIMPSON, E., LUND, T., KIOUSSIS, D., TAKEI, F., BAIRD, J., COOKE, A. 1991. Characterization of pancreatic islet cell infiltrates in NOD mice: effect of cell transfer and transgene expression. *Eur J Immunol*. 21: 1171-1180.
- OLSSON, T. 1995. Cytokine-producing cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Neurology*. 45(suppl. 6):S11-S15.
- PALMER, J.P., COONEY, M.K., CROSSLEY, J.R., HOLLANDER, P.H., ASPLIN, C.M. 1981. Antibodies to viruses and to pancreatic islets in non-diabetic and insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Care*. 4: 525-528.
- PAPACCIO, G., CHIEFFI, A., BACCARI, G., MEZZOGIORNO, V. 1993. In vivo effect of gangliosides on non-obese diabetic mice. *Acta Anat*. 147:168-173.
- PARIJS, V.L., ABBAS, A.K. 1996. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. *Curr Opin Immunol*. 8: 355-361.
- PAVIN, E.J., ZOLLNER, R.L. 1994. Implantação da linhagem "NOD-mice" (camundongos diabéticos não-obesos) no Brasil: contribuição deste modelo animal ao estudo do diabetes mellitus insulino-dependente e outras doenças autoimunes. *Arq Bras Endo Metabol*. 38:105-108.

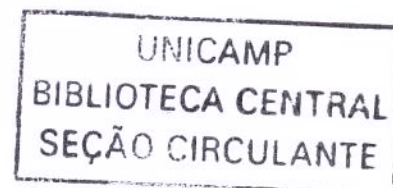
- POCIOT, F., RONNINGEN, K., BERGHOLDT, R., LORENZEN, T., JOHANNESSEN, J., YE, K.,
DINARELLO, C.A., NERUP, J. THE DANISH STUDY GROUP OF DIABETES IN
CHILDHOOD. 1994. Genetic susceptibility markers in danish patients with type 1 (insulin-
dependent) diabetes – evidence for polygenecity in man. *Autoimmunity*. 19:169-178.
- POZZILLI, P., SIGNORE, A., WILLIAMS, A.J.K. BEALES, P.E. 1993. NOD mouse colonies
around the world - recent facts and figures. *Immunol Today*. 14:193-196.
- PRINT, C.G., LOVELAND, K.L., GIBSON, L., MEEHAN, T., STYLIANOU, A., WREFORD,
N., DE KRETZER, D., METCALF, D., KONTGEN, F., ADAMS, J., CORY, S. 1998.
Apoptosis regulator Bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant.
Proc Natl Acad Sci USA. 95(21):12424-12431.
- PUKEL, C., BAQUERIZO, H., RABINOVITCH, A. 1988. Destruction of rat islet cell
monolayers by cytokines: synergistic interactions of interferon- γ , tumor necrosis factor,
lymphotoxin, and interleukin-1. *Diabetes*. 37: 133-136.
- QIN, H.Y., SADELAIN, M.W.J., HITCHON, C., LAUZON, J., M SINGH, B. 1993. Complete
Freud's adjuvant-induces T cell prevent the development and adoptive transfer of diabetes in
nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 150: 2072-2080.
- RABINOVITCH, A., SUAREZ-PINZON, W.L., SHI, Y., MORGAN, A.R., BLEACKLEY, R.C.
1994. DNA fragmentation is an early event in cytokine-induced islet beta-cell destruction.
Diabetologia. 37:733-738.

- RABINOVITCH, A., SUAREZ-PINZON, W.L., SORENSE, O., BLEACKLEY, R.C., POWER, P.R. 1995. INF- γ gene expression in pancreatic islet-infiltration mononuclear cells correlates with autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 154: 4874-4882.
- RABINOVITCH, A., SUAREZ-PINZON, W.L., SORENSEN, O., BLEACKLEY, R.C. 1996. Inducible nitric oxide synthase (iNOs) in pancreatic islet of nonobese diabetic mice: Identification of iNOs-expressing cells and relationships to cytokines expressed in the islet. *Endocrinol.* 137: 2093-2099.
- RABINOVITCH, A. 1998. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev.* 14: 129-151.
- RABINOVITCH, A., SUAREZ-PINZON, W.L. 1998. Cytokines and their roles in pancreatic islet β -cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochemical Pharmacology.* 55, 1139-1149.
- ROHANE, P.W., SHIMADA, A., KIM, D.T., EDWARDS, C.T., CHARLTON, B., SHULTZ, L.D., FATHMAN, C.G. 1995. Islet-infiltrating lymphocytes from prediabetic NOD mice rapidly transfer diabetes to NOD-scid/scid mice. *Diabetes.* 44:550-554.
- ROSSINI, A.A., GREINER, D.L., FRIEDMAN, H.P., MORDES J.P. 1993. Immunopathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes Rev.* 1: 46-75.
- SARVETNICK, N., SHIZURU, J., LIGGITT, D., MARTIN, L., MCINTYRE, B., GREGORY, A., PARSLOW, T., STEWART, T. 1990. Loss of pancreatic islet tolerance induced by beta-cell expression of interferon-gamma. *Nature.* 346: 844-847.

- SCAFFIDI, C., KIRCHHOFF, S., KRAMMER P.H., PETER, M.E. 1999. Apoptosis in lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* 11:277-285.
- SCHWARTZ, R.H. 1993. Immunological tolerance. In: PAUL, W.E. *Fundamental Immunology.* New York, Raven Press. p. 677-731.
- SEEMAYER, T.A., TANNENBAUM, G.S., GOLDMAN, H., COLLE, E. 1982. Dynamic time course studies of the spontaneously diabetic BB wistar rat. *Am J Pathol.* 106:237-249.
- SHIZURI, J.A., TAYLOR-EDWARDS C., BANKS, B.A., GREGORY, A.K., & FATHMAN, C.G. 1998. Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes. *Science.* 240: 659-662.
- SIGNORE, A., POZZILI, P., GALE, E.A.M., ANDREANI, D., BEVERLEY, P.C. 1989. The natural history of lymphocyte subsets infiltrating the pancreas of NOD mice. *Diabetologia.* 32:282-289.
- SIGNORE, A., ANNOVAZZI, A., PROCACCINI, E., BEALES, P.E., SPENCER, J., TESTI, R., RUBERTI, G. 1997. CD95 and CD95-ligand expression in endocrine pancreas of NOD, NOR and BALB/c mice. *Diabetologia.* 40(12):1476-1479.
- SIGNORE, A., ANNOVAZZI, A., GRADINI, R., LIDDI, R., RUBERT, G. 1998. Fas and Fas ligand-mediated apoptosis and its role in autoimmune diabetes. *Diabetes Metab Rev.* 14, 197-206.
- SU, X., HU, Q., KRISTAN, J.M., COSTA, C., SHEN, Y., GERO, D., MATIS, L.A., WANG, Y. 2000. Significant role for Fas in of the pathogenesis of autoimmune diabetes. *J Immunol.* 164:2523-2532.

- SUAREZ-PINZON, W., SORENSEN, O., BLEACKLEY, R.C., ELLIOTT, J.F., RAJOTTE, R.V., RABINOVITCH, A. 1999. Beta-cell destruction in NOD mice correlates with Fas (CD95) expression on beta-cells and proinflammatory cytokine expression in islets. *Diabetes*. 48(1):21-28.
- SUAREZ-PINZON, W.L., POWER, R.F., RABINOVITCH, A. 2000. Fas ligand-mediated mechanisms are involved in autoimmune destruction of islet beta cells in non-obese diabetic mice. *Diabetologia*. 43:1149-1156.
- SUK, K., KIM, S., KIM, Y.H., KIM, K.A., CHANG I., YAGITA, H., SHONG, M., LEE, M.S. 2001. IFN- γ /TNF- α Synergism as the final effector in autoimmune diabetes: a key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic β cell death. *J Immunol*. 166:4481-4489.
- THOMAS, H.E., DARWICHE, R., CORBETT, J.A., KAY, T.W.H. 1999. Evidence that β cell death in the nonobese diabetic mouse is Fas independent. *J Immunol*. 163: 1562-1569.
- THOMAS, H.E., KAY, T.W.H. 2000. Beta cell destruction in development of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes Metab Res And Rev*. 16: 251-261.
- THOMAS, H.E., DARWICHE, R., CORBETT, J.A., KAY, T.W. 2002. Interleukin-1 plus gamma-interferon-induced pancreatic beta-cell dysfunction is mediated by beta-cell nitric oxide production. *Diabetes*. 51(2):311-316.
- TISCH, R., Mc DEVITT, D. 1996. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell*. 85:291-297.

- TOYODA, H., FORMBY, B., MAGALONG, D., REDFORD, A., CHAN, E., TAKEI S., CHARLES, M.A. 1994. In situ islet cytokine gene expression during development of type I diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Immunol Lett.* 39: 283-288.
- VIDAL, B.C., MELLO, M.L.S. 1978. A Reação de Feulgen. *Ciência e Cultura.* 30 (6): 665-676.
- VIGNAUX, F., GOLSTEIN, P. 1994. Fas based lymphocyte-mediated cytotoxicity against syngeneic activated lymphocytes: a regulatory pathway ? *Eur J Immunol.* 24:923-927.
- VOLPINI, W. 1996. Tratamento do diabetes auto-imune pré-clínico do camundongo NOD (non obese diabetic) em fase de insulite intensa com anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti CD8. Tese de Doutorado.
- WONG, F.S. & JANEWAY, C.A. 1997. The role of CD4 and CD8 T cells in type I diabetes in the NOD mouse. *Res Immunol* 148: 327-32.
- WONG, F.S., VISINTIN, I., WEN, L., FLAVELL, R.A., JANEWAY, C.A. 1996. CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islet can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *J Exp Med.* 183:67-76.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - Report of a WHO Consultation, 1999. Part I: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva, World Health Organization. 1-49.
- WYLLIE, A.H., KERR, J.F.R., CURRIER, A.R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Ver Cytol.* 68:251-306.
- YALE, J.F. & MARLISS, E.B. 1982. Altered immunity and diabetes in the BB rat. *Endocrinol.* 110:1825-1827.



YAMADA, K., TAKANE-GYOTOKU, N., YUAN, X., ICHIKAWA, F., INADA, C.,
NONAKA, K. 1996. Mouse islet lysis mediated by interleukin-1-induced Fas. *Diabetologia*.
39:1306-1312.