



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Conceição Aparecida Vilella

Estudo do Efeito de Gangliosídeos sobre a Incidência e Morbidade do Diabetes Mellitus em Camundongos NOD/Uni (non-obese diabetic)

Form with handwritten text: 'Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a Conceição Aparecida Vilella e aprovada pela Comissão Julgadora' and date '03/07/2000'.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural na Área de Histologia.

UNICAMP BIBLIOTECA CENTRAL SEÇÃO CIRCULANTE

Orientador: Prof.Dr. Francesco Langone



220043572

UNIDADE	30
N.º CHAMADA:	T/Unicamp
	V711e
V.	Es.
TOMBO BC/	42286
PROC.	16-278100
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC@	R\$11,00
DATA	22/09/00
N.º CPD	

CM-00144205-6

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Vilella, Conceição Aparecida

V711e

Estudo do efeito de gangliosídeos sobre a incidência e morbidade do diabetes mellitus em camundongos NOD/Uni (*Non-obese diabetic*)/Conceição Aparecida Vilella. - - Campinas, SP[s.n.], 2000.

81f: ilus.

Orientador: Francesco Langone

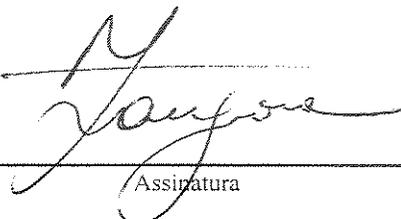
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Diabetes mellitus. 2. Camundongo NOD. 3. Gangliosídeos.
I. Langone, Francesco. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 03/07/2000.

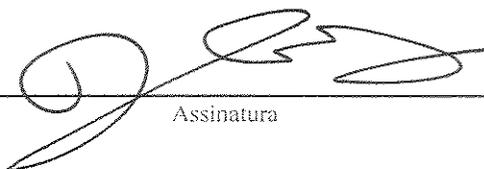
BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Francesco Langone (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner



Assinatura

Profa. Dra. Elizabeth João Pavin



Assinatura

Prof. Dr. Jose Vassallo

Assinatura

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE *Para*
Daniel, Ariel e Gabriel

Agradecimentos

Aos Profs. Drs. Ricardo de Lima Zollner, Elizabeth João Pavin e José Vassallo pela prontidão na leitura e por suas valiosas sugestões para o aprimoramento do mesmo.

A Walkyria Volpini (KIKA) minha amiga, por ter me apresentado ao “NOD”, ensinado a conhecê-lo e respeitá-lo. Por todo o seu carinho, espírito científico e paciência.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner por permitir que esse trabalho acontecesse.

A Margarida Maria de Melo Oliveira, nossa querida Meg, que Deus possa um dia retribuir todo auxílio, carinho e apoio que recebi.

Ao Luiz Henrique Boechat, pelo incentivo, bom humor e por todas as tardes que passamos sacrificando animais.

Aos aprimorandos do Laboratório de Imunologia Ângela, Edward, Maira e Danielle pelo incentivo e colaboração.

A Gláucia Monteiro de Castro pela “força” nos momentos de conclusão deste trabalho, doando o seu tempo, conhecimento e paciência. Foram vários sábados e domingos.

Ao meu marido por todos os fins de semana que me ajudou a injetar os animais e constante incentivo.

Aos meus queridos pais que me ajudaram a cuidar de meus filhos.

Ao Prof. Dr. José Vassallo por permitir o uso do Laboratório de Patologia Experimental.

A Fernanda, técnica do Laboratório de Patologia Experimental pela sua ajuda.

Aos Docentes , funcionários e colegas do Departamento de Histologia e Embriologia.

A TRB PHARMA pela doação dos gangliosídeos utilizados neste trabalho e pela concessão de uso do criostato Leica CM1850.

Sumário

ABREVIATURAS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O DIABETES MELLITUS	2
1.2. MODELOS EXPERIMENTAIS DE DM AUTO-IMUNE ESPONTÂNEO	6
1.3. MODELO DE DIABETES ACELERADO POR CICLOFOSFAMIDA	10
1.4. IMUNO INTERVENÇÃO DO DIABETES AUTO-IMUNE	11
1.5. GANGLIOSÍDEOS E SEU POTENCIAL IMUNOMODULADOR	13
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. ANIMAIS	21
3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTOS (TABELA 1)	22
3.3. DIAGNÓSTICO DE DIABETES E SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS	25
3.4. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	26
3.5. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	28
4. RESULTADOS	29
4.1. EFEITO DO TRATAMENTO COM GANGLIOSÍDEOS SOBRE A MANIFESTAÇÃO ESPONTÂNEA DO DIABETES MELLITUS AUTO-IMUNE	30
4.2. EFEITO DO TRATAMENTO COM GANGLIOSÍDEOS SOBRE A MANIFESTAÇÃO DE PROCESSO INFLAMATÓRIO E DESTRUIÇÃO DE ILHOTAS DE LANGERHANS	33
4.3. EFEITO DO TRATAMENTO COM GANGLIOSÍDEOS SOBRE A MANIFESTAÇÃO DO DIABETES MELLITUS AUTO-IMUNE ESPONTÂNEO ACELERADA PELA ADMINISTRAÇÃO DA CICLOFOSFAMIDA	37
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

Abreviaturas

APC:	Célula apresentadora de antígeno
BB:	Ratos “Bio Breeding”
CLT:	Linfócito T citotóxico
CD:	“Cluster differentiation”
CI:	Ciclofosfamida
DM-1:	Diabetes Mellitus tipo 1 –Auto-imune
DM/CI:	Diabetes Mellitus Auto-imune acelerado pela ciclofosfamida.
GAD:	“Glutamic acid decarboxylase”
IL:	Interleucina
ICA:	“Islet cell antibodies”
IAA:	“Insulin autoantibodies”
i.p. :	Intra peritoneal
kDa :	"Kilo Dalton"
MHC:	Complexo principal de histocompatibilidade
NOD:	Diabético não obeso
NOD/Uni:	NOD/Unicamp
NK:	"Natural Killer"
TCR:	Receptor de linfócitos T
Th1:	Linfócito T helper 1
Th2:	Linfócito T helper 2

Resumo

O diabetes mellitus tipo 1 auto-imune (DM-1) é uma doença resultante da disfunção e destruição das células β pancreáticas. Este processo, conhecido como insulite, é dependente da presença de infiltrados mononucleares nas ilhotas de Langerhans. O camundongo NOD (non obese diabetic) é modelo experimental do Diabetes Mellitus auto-imune espontâneo, que se desenvolve entre o 4º e o 6º mês de vida, semelhante à doença no humano. O propósito do presente estudo foi a verificação dos efeitos do tratamento com gangliosídeos na incidência do Diabetes Mellitus espontâneo e acelerado pela Ciclofosfamida (CI-DM) no camundongo NOD. Os animais foram tratados diariamente com a mistura de gangliosídeos GM1(21%),GD1a (40%), GD1b(16%),GT1b(19%) (150 mg/kg) entre 4ª, 17ª ou 25ª semanas de vida e o desenvolvimento do DM foi monitorizado através de glicosúria e glicemia. Após o sacrifício foram realizadas análises morfológicas, incluindo quantificação e qualificação dos graus de insulite. Os resultados mostram que a prevalência do DM foi menor nos animais tratados com gangliosídeos, mesmo naqueles submetidos à Ciclofosfamida (CI-DM). Estes achados estão compatíveis com a análise morfológica que demonstrou menor grau de insulite nos animais tratados, tanto no modelo espontâneo como no modelo CI-DM, estes resultados podem ser observados ainda 8 semanas após a interrupção do tratamento. Reforçando a hipótese da ação imunomodulatória dos gangliosídeos, provavelmente relacionada à inibição da proliferação de linfócitos T ou sinalização celular. Em conclusão, o tratamento do camundongo NOD com gangliosídeos pode diminuir o grau de insulite e a incidência do DM neste modelo experimental. Contudo, novos estudos, direcionados para análise dos mecanismos moleculares envolvidos neste processo são necessários para elucidação dos mecanismos específicos da ação imunomodulatória dos gangliosídeos.

Abstract

Diabetes mellitus type 1(DM-1) is an autoimmune disease that results from destruction and dysfunction of pancreatic β -cells. This process, known as insulinitis, is dependent on the presence of a mononuclear cells infiltrate in islets of Langerhans. Non obese diabetic (NOD) mouse is an experimental model of DM-1 that develops spontaneous diabetes between the 4th and 6th month of life, similar to human disease. The aim of the present study was to verify the effects of the treatment with gangliosides on the incidence of spontaneous and cyclophosphamide accelerated diabetes model (CY-DM) in NOD mice.

The animals were treated daily with a mixture of gangliosides GM1(21%),GD1a (40%), GD1b(16%),GT1b(19%) (150 mg/kg) between 4th and 17th or 24th week of life and monitorized for the development of DM-1 with urinary and blood glucose concentration. After sacrifice, morphologic analysis, including quantification and classification of insulinitis degree was performed.

The results show that the prevalence of diabetes was lower in gangliosides treated animals, even in those submitted to cyclophosphamide (CY-DM-1). These findings are in accordance with morphologic analysis that demonstrates that treated animals present lower degrees of insulinitis in both spontaneous and CY-DM-1, results that could be also observed 8 weeks after the interruption of treatment. These findings reinforce the hypothesis of the immunomodulatory action of gangliosides, probably related to the inhibition of T cells proliferation or cellular signaling.

In conclusion, treatment of NOD mice with gangliosides could decrease insulinitis degree and the prevalence of DM in this experimental model. However, new studies, directed to analyze the molecular mechanisms involved in these processes are needed in order to elucidate the specific mechanisms of immunomodulatory action of gangliosides.

1. Introdução

1. *O Diabetes Mellitus*

O *diabetes mellitus* é definido como síndrome heterogênea hiperglicêmica crônica, que afeta o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, resultante do déficit de produção de insulina pancreática e/ou da presença de fatores que se opõem à ação desse hormônio. Considerando-se suas características etiológicas e os mecanismos que o desencadeiam, o diabetes mellitus pode ser classificado como sendo de tipo 1, auto-imune ou idiopático (DM-1), e de tipo 2 (DM-2) (ADA 1997).

O início do DM-1 auto-imune é caracterizado como sendo, em geral, agudo, acometendo mais freqüentemente crianças e adolescentes. O(s) fator(es) desencadeante(s) e os mecanismos envolvidos na sua evolução, ainda não totalmente elucidados (EISENBARTH *et al.*, 1986; ATKINSOM *et al.*, 1994)

A primeira evidência para a origem auto-imune do DM-1 foi descrita por BOTTAZZO *et al.* (1974). Esses autores evidenciaram então, em pacientes com DM-1 recentemente diagnosticados, a presença de auto anticorpos circulantes órgão específicos, denominados anticorpos anti células da ilhota (ICA). Contudo, sabe-se atualmente, que os ICA são na verdade, marcadores imunológicos do DM-1, porém não exercendo efeito patogênico direto (PALMER *et al.*, 1983).

Reforçando a hipótese do DM-1 ser uma doença crônica auto-imune, está a destruição seletiva característica das células β das ilhotas de Langerhans pancreáticas,

mediada por linfócitos T. Esse processo seria decorrente da perda da tolerância desses linfócitos a determinados constituintes da célula β pancreática, secretora de insulina (ROSSINI *et al.*, 1993; SCHWARTZ, 1993). Além disso, o estudo do DM auto-imune espontâneo em modelos animais experimentais, fortalecem a hipótese da ocorrência de desequilíbrio entre sub-populações linfocitárias T efetoras e protetoras na indução do diabetes (ROSSINI *et al.*, 1993; BACH, 1994,1997).

Vários são os mecanismos propostos para ruptura da tolerância imunológica no DM-1, explorados experimentalmente em murinos, que estão relacionados às anomalias da tolerância central tímica e, sobretudo, às da tolerância periférica pós-tímica. Assim, a manifestação do DM-1 seria decorrente da crescente falha no bloqueio, anergia e/ou supressão periféricas da reatividade anti célula β . Estes distúrbios convergiriam, porém, para a resposta comandada por linfócitos T CD4+ contra constituintes da célula β , que seriam processados e expostos por células apresentadoras de antígeno (APC) (LAFFERTY, 1997).

Apesar das evidências da origem auto-imune do DM-1 ser dependente de linfócitos T, tal evidência no homem é até agora indireta. Os dados referentes a reatividade espontânea, *in vitro*, de células mononucleares de sangue periférico, em pacientes com DM-1 são raros e de difícil comparação. Os mesmos diferem tanto na preparação antigênica utilizada, quanto na metodologia adotada para definir a positividade das respostas proliferativas (CASTANO & EISDENBARTH, 1990). Assim, foi observada

reatividade de linfócitos T a quatro antígenos solúveis e em pacientes com DM-1: 1) Insulina humana; 2) GAD-65 (GAD: “Glutamic acid decarboxylase”) e GAD-67; 3) ICA 512/IA-2 (molécula “tyrosine phosphatase like”); 4) Glucagon (KELLER, 1990; HARRISON *et al.*, 1992; ATKINSON *et al.*, 1992; HONEYMAN *et al.*, 1993; DURINOVICH-BELLÓ *et al.*, 1996).

A presença de reatividade de linfócitos T de sangue periférico a uma proteína de peso molecular de 38kDa proveniente dos grânulos secretórios de insulina, em pacientes com DM-1 recente, também foi relatada (ROEP *et al.*, 1991). Contudo, tanto no homem, como em modelos murinos da doença, o antígeno auto-imune primário do DM-1 ainda não está bem caracterizado (BAEKESKOV *et al.*, 1990; PALMER *et al.*, 1994; MARSHALL *et al.*, 1994; SOLIMENA, 1998; ROEP *et al.*, 1999).

Por outro lado, sendo o DM-1 sindrômico, admitem-se vários processos imunopatogênicos cuja compreensão é complexa. Diversos autores têm investigado a hipótese de que a célula β pancreática seja suscetível a fatores variados de agressão como os radicais livres e, especialmente, os oriundos do sistema imunológico, como as citocinas (CORBETT *et al.*, 1993; EIZIRIK *et al.*, 1994; POCIOT *et al.*, 1994; EIZIRIK *et al.*, 1996). Tem sido também considerado que a expressão de peptídeos imunogênicos na célula β , induzidos por toxinas e infecções virais, poderiam aumentar a susceptibilidade destas à auto-reatividade (BACH, 1994).

Além disso, a predisposição genética do indivíduo parece desempenhar importante

papel, influenciada por fatores ambientais, no desencadeamento dos mecanismos de auto-imunidade. Nesse cenário em particular, deve-se considerar o papel fundamental do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) na predisposição genética para o DM-1. Os genes específicos do MHC estão relacionados ao desenvolvimento do DM-1, em três níveis principais: 1) Na seleção positiva de clones auto-reativos no timo: presença de alelos de suscetibilidade; 2) Na ausência de seleção negativa no timo: falta de alelos protetores para deletar clones auto-reativos; 3) Na ausência de anergia periférica de clones auto-reativos: gradiente de afinidade do MHC com o complexo peptídeo/TCR e ausência de linfócitos T supressores restritos ao MHC (NEPOM & ERLICH, 1991).

Outro aspecto importante do envolvimento direto dos linfócitos na determinação do DM-1 é a produção e liberação de citocinas por essas células no decurso da insulite. Tais moléculas mediarão o processo inflamatório local, alterando a função das células β e contribuindo para a destruição das ilhotas pancreáticas (BRADLEY *et al.*, 1999). Neste sentido, embora os mecanismos de destruição das ilhotas mediados por citocinas não estejam ainda bem caracterizados, diversos trabalhos têm evidenciado que os efeitos citotóxicos dessas moléculas sobre as ilhotas pancreáticas induzem a apoptose das células β (RABINOVITCH *et al.* 1994; THOMAS *et al.*, 1999).

Por fim, é importante destacar que grande parte da base de dados que sustentam a hipótese da participação dos linfócitos T na imunopatogênese do DM auto-imune espontâneo decorre da investigação de modelos animais geneticamente predispostos a

essa doença, como os raros BB (*Bio-Breeding*) e os camundongos da linhagem NOD (*non obese diabetic*) (ROSSINI *et al.*,1995; BACH & MATHIS, 1997).Particularmente , dados experimentais fornecidos pelos estudos realizados com camundongos da linhagem NOD (*non-obese diabetic*), comprovam que o desenvolvimento do DM auto-imune espontâneo decorre da interação entre linfócitos T reguladores, que suprimem a doença, e linfócitos T efetores, denominados diabetogênicos (ATKINSON 1997; KAY *et al.*, 1997; LAFFERTY,1997; BERGEROT *et al.*,1997).

2. Modelos Experimentais de DM Auto-imune Espontâneo

O modelo de diabetes auto-imune do rato BB foi descoberto no Canadá, por NAKHOODA *et al.* (1977), sendo denominado inicialmente como BB/DP (diabetes pronos). Esses animais desenvolvem DM espontâneo clínico, caracterizado por síndrome hiperglicêmica, entre o segundo e o quarto mês de vida, tanto em machos quanto em fêmeas. A frequência de aparecimento do DM espontâneo varia de 40 a 70% entre as diferentes colônias estabelecida no mundo, reconhecidas através do nome do respectivo laboratório, tais como BB/E (“Edimburg”), BB/Phi (“Philadelphia”), BB/Wor (“Worcester”).

O DM espontâneo não constitui, porém, a única manifestação de doença auto-imune do rato BB, o qual apresenta uma alta frequência de tiroidite e diversos auto-

anticorpos órgão específicos como: anti tireoglobulina, anti mucosa gástrica anti músculo liso (YALE & MAREEIS, 1982)

O DM espontâneo clínico nestes animais é precedido por um período de prédiabetes, caracterizado por insulite e presença de auto-anticorpos anti-ilhota, similarmente ao que ocorre nos camundongos NOD. Na insulite apesar de observarmos principalmente linfócitos T CD4+ e CD8+, porém macrófagos e linfócitos B são também encontrados nas ilhotas pancreáticas (SEEMAYER *et al.*, 1982).

O camundongo NOD foi descoberto no Japão, por MAKINO *et al.* (1980), após o cruzamento de uma sublinhagem CTS (propensa a catarata) com uma linhagem não consangüínea ICR. O primeiro caso de DM espontâneo foi observado em apenas camundongo fêmea, a partir da qual se estabeleceu a linhagem NOD isogênica.

A partir de então, esta linhagem foi distribuída à comunidade científica mundial, sendo que, no Brasil foi implantada por PAVIN & ZOLLNER (1994) a partir de animais fornecidos pelo Laboratório INSERM U-25-Necker/Paris, França. Essas colônias, estabelecidas em diferentes países podem diferir quanto a frequência e a idade de aparecimento do DM espontâneo, possivelmente devido às diversas condições ambientais e de manutenção dos animais. Em virtude dessas diferenças essas linhagens são designadas como de alta ou baixa frequência de diabetes mellitus espontâneo. Por outro lado, todas as colônias até hoje estabelecidas apresentam dimorfismo sexual quanto à frequência do DM espontâneo. De tal maneira que, para animais de 25 semanas de idade,

a frequência do DM espontâneo varia entre 5% e 90% nas fêmeas e entre 0% e 50% nos machos, nas diferentes colônias do mundo (KIKUTANI & MAKINO, 1992; POZZILI *et al.*, 1993).

O DM clínico nesses animais desenvolve-se entre o quarto e o sexto mês de vida, evidenciado através da hiperglicemia de sinais e sintomas dela decorrente tais como: poliúria, polidipsia. Contudo, como no homem, é precedido por uma fase de pré-diabetes, caracterizada por infiltração progressiva das ilhotas pancreáticas por células mononucleares, que tem início, geralmente, no primeiro mês de vida dos animais em ambos os sexos (KIKUTANI & MAKINO, 1992). A insulite é constituída, predominantemente, por linfócitos T CD4+ que são os primeiros a invadirem as ilhotas, seguidos pela migração de linfócitos T CD8+ (THIVOLET *et al.*, 1991).

Os linfócitos T auto-reativos demonstram ter papel crucial no aparecimento da diabetes nesses animais (TISCH & McDEVIT, 1996), sendo a ineficiência de eliminação destes podem contribuir para o aparecimento da doença. Assim, observou-se que a prevenção do DM espontâneo nos camundongos NOD pode ser obtida através de timectomia neonatal e que em camundongos NOD/nude, atímicos, não há a manifestação da doença. Além disso, diversos autores reportaram tratamentos imunossupressores, com atuação direcionada preferencialmente para linfócitos T, são capazes de suprimir a ocorrência do DM auto-imune espontâneo (OGAWA *et al.*, 1985; O REILLY *et al.*, 1991; HIDEKI *et al.*, 1992; BACH, 1994; KAY *et al.*, 1997; WONG *et al.*, 1997). Também

nestes animais foram obtidos dados indicando a existência de linfócitos T supressores com função de regulação negativa da auto-imunidade anti-ilhota. Concretamente, foi obtida a prevenção do DM espontâneo em camundongos NOD através da transferência de linfócitos CD4⁺ obtidos de animais que receberam o tratamento com adjuvante completo de Freund – CFA e superantígenos de *Staphylococcus* (KAWAMURA *et al.*, 1993; QIN *et al.*, 1993). Postulou-se então, que os mecanismos deste tipo de proteção envolveriam ação seletiva sobre certas subpopulações linfocitárias T CD4⁺, desviando a resposta imunitária de Th1 para Th2, linfócitos produtores de IL4 e IL10, ampliando assim a resposta humoral em detrimento da resposta celular.

Diversos experimentos envolvendo o camundongo NOD têm fornecido evidências do papel chave de substâncias mediadoras da destruição das células β pancreáticas produzidas por linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺. Dentre esses mediadores incluem-se os conteúdos granulares dos linfócitos T CD8⁺, como perforinas e granzimas, além de moléculas de superfície como Fas, Fas-L, TNF e outros membros da família TNF, além das citocinas liberadas pelas demais células envolvidas no processo inflamatório das ilhotas pancreáticas. Estes mediadores são conhecidos 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)

3. Modelo de Diabetes Acelerado por Ciclofosfamida

A Ciclofosfamida (CI) é um potente alquilante de DNA, que tem efeito citotóxico direto preferencial sobre células que se dividem rapidamente (TURK & PARKER, 1982). Em particular, a CI é utilizada como uma droga imunossupressora, para o tratamento de doenças auto-imunes mediadas por auto-anticorpos.

No campo experimental, diversos autores têm estudado o efeito da administração da CI em modelos animais de doenças auto-imunes induzidas por antígenos. Nos camundongos NOD os efeitos da CI foram descritos pela primeira vez por HARADA & MAKINO (1984) mostrando que essa droga é capaz de acelerar o aparecimento de diabetes em fêmeas e induzi-la em machos. Por outro lado CHARLTON & MANDEL, em 1989, reportaram que o efeito diabetogênico da CI decorre de sua ação sobre o sistema imunológico e não de uma ação citotóxica direta sobre as células β pancreáticas. Além disso, os autores observaram sensibilidade exclusiva às ações da CI na colônia NOD/WEHI, de baixa frequência de DM espontâneo, em análise conjunta de doze diferentes linhagens de camundongos.

Os mesmos autores sugeriram ainda que a fisiopatologia do DM-CI no camundongo NOD induzida é similar à da doença espontânea nestes animais. Assim, a CI atua sobre o sistema imunológico, acelerando o processo auto-imune de destruição de células β natural da linhagem. De fato, os estudos embasados no efeito da depleção de subpopulações T sobre a evolução da insulite e em modelos de isotransplantes de

pâncreas, ou transferência do DM espontâneo entre NOD/Wehi adultos, mostraram que a destruição das células β pancreáticas no modelo DM-CI é dependente de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, como ocorre na doença espontânea da linhagem NOD. Os autores propuseram ainda, que a administração de CI induziria a deleção sistêmica de linfócitos T supressores e efetores, específicos do DM-1. Porém, os linfócitos T efetores, possivelmente $CD4^+$, seriam reconstituídos mais rapidamente, promovendo desta forma, a evolução da insulite pancreática e o aparecimento do DM espontâneo clínico.

4. *Imunointervenção no Diabetes Auto-Imune*

O conhecimento sobre a patogênese do diabetes auto-imune e a condução de programas, visando sua detecção precoce, levaram à elaboração de estratégias de intervenção em seu curso natural. Porém os ensaios terapêuticos propostos podem ser considerados inespecíficos, visto que o auto antígeno primário da doença é ainda desconhecido.

As estratégias imunoterapêuticas do diabetes auto-imune humano têm sido direcionadas a duas categorias de indivíduos: diabéticos com DM-1 recentemente diagnosticado e pré diabéticos pertencentes a famílias de pacientes portadores do diabetes tipo 1, objetivando-se a preservação da função das células β residuais (BACH, 1994).

A partir de 1980, as terapias por imunointervenção têm sido aplicadas a diabéticos

tipo 1, utilizando-se duas grandes categorias de drogas segundo seu mecanismo de ação: as imunossupressoras e as imunomoduladoras (SKYLER & MARKS, 1993).

Nos primeiros estudos utilizando-se glicocorticóides como imunossupressores, (ELLIOT *et al.*, 1981), em associação ao soro anti linfocitário (EISENBARTH *et al.* 1985) ou a azatioprina (SILVERTEIN *et al.*, 1988). Os resultados destes tratamentos, de modo geral, não foram satisfatórios.

Resultados significativos foram obtidos porém, com a utilização de Ciclosporina A, potente imunossupressor que age seletivamente sobre a ativação dos linfócitos T inibindo a secreção de IL2 (SCHREIBER & CHABTREE, 1995). Dois estudos multicêntricos, realizados em pacientes adultos com DM-1, conduzidos na França, Canadá e Escandinávia, apresentaram resultados de eficácia similares. (FEUTREN *et al.*, 1986; The Canadian-European Diabetes Study Group, 1988). Contudo, a administração continuada de Ciclosporina trouxe riscos de nefrotoxicidade e hipertensão dose-dependentes, que exigiram o seguimento contínuo dos indivíduos tratados. Além disso, a interrupção do tratamento provocou a remissão total ou parcial da doença. Entretanto, os ensaios com Ciclosporina foram fundamentais pois demonstraram a possibilidade de impedir ou pelo menos retardar a destruição imune das células β pancreáticas no DM-1.

VOLPINI *et al.* (1996) demonstraram a prevenção do DM-CI induzido em NOD através de imunoterapia isolada utilizando-se anticorpos monoclonais depletantes anti-CD4 (YTS-191) e anti-CD8 (YTS-169), iniciada em momento crítico de progressão de

insulite invasiva/destrutiva (10º dia após a primeira dose de CI). O sucesso terapêutico foi obtido com o protocolo de curta duração (10 dias) e de baixas doses totais de anticorpos monoclonais (0,5 a 1,25 mg/camundongo). O tratamento com anti-CD4 impediu a evolução da insulite para os estádios finais, os quais não foram, porém bloqueados por anti-CD8.

5. *Gangliosídeos e Seu Potencial Imunomodulador*

Os gangliosídeos são glicoesfingolipídeos formados por uma porção hidrofóbica, de ácido graxo amido de esfingosina e uma cadeia hidrofílica de carboidratos, contendo uma ou mais moléculas de ácido siálico (ácido n-acetilneuramínico-NANA) o que lhes confere carga negativa. A cadeia oligossacarídica do gangliosídeo pode variar em composição, porém a seqüência básica compreende quatro sacarídeos: em geral glicose, galactose, N acetilgalactosamina e eventualmente, frutose. Nestes compostos, a cadeia oligossacarídica contém pelo menos um açúcar ácido ligado a ceramida (esfingosina + acil CoA). Embora sejam componentes normais da membrana celular da maioria dos tipos celulares, são encontrados em maior concentração nas células do sistema nervoso (LEDEEN & YU, 1982; TETTAMANT & RIBONI, 1994). Na molécula do gangliosídeo, o número e a posição dos resíduos de ácido siálico são variáveis, o que deu origem à sua classificação.

Os gangliosídeos localizam-se externamente à bicamada lipídica, sendo importantes em diversos processos biológicos participando da regulação, reconhecimento, adesão intercelular, proliferação, morfogênese, diferenciação, neuritogênese, apoptose e transformação oncogênica. Além disso atuam como receptor e co-receptor de várias substâncias bioativas como hormônios e citocinas, e na tradução de sinais para o meio intracelular (MAHONEY & SCHNAAR, 1997).

Considerando os diferentes mecanismos pelos quais os gangliosídeos podem associar-se às células, a alteração de seu perfil em um determinado tipo celular pode resultar na modulação das propriedades de superfície, atividades enzimáticas e função de outros tipos celulares, sendo considerados como um tipo de citocina (BERGELSON, 1995).

Diversos autores observaram que gangliosídeos poderiam inibir a proliferação e a atividade dos linfócitos T (LADISCH *et al.*, 1984; MERRIT *et al.*, 1984; OFFNER *et al.*, 1987). MERRIT *et al.* (1984) verificaram que gangliosídeos eram capazes de inibir a proliferação de linfócitos T citotóxicos dependentes de IL2 *in vitro*. OFFNER *et al.* (1987), por sua vez, mostraram que estas moléculas induziriam alterações na orientação molecular do CD4 presente nos linfócitos T helper. BRETZEL *et al.* (1990) estudando culturas de ilhotas pancreáticas de ratos Lewis (RT1)m tratadas com gangliosídeos, e destinadas ao transplante em ratos BdII (RT1), observaram uma significativa redução do número de células expressando o MHC Ia, sem alteração do número daquelas que

expressavam MHC I. O tratamento prolongou o tempo de sobrevivência das ilhotas transplantadas em 20% dos receptores.

A hipótese do envolvimento dos gangliosídeos no desenvolvimento do diabetes auto-imune recebeu importante subsídio, após a obtenção de evidências de que a natureza do antígeno alvo do anticorpo anti citoplasma da célula da ilhota (ICA), corresponderia a um sialoglicoconjugado (NAYA *et al.*, 1985). Posteriormente, COLMAN *et al.* (1988) verificaram que uma fração de monogangliosídeo extraído de pâncreas humano inibia a ligação do ICA em cortes histológicos de pâncreas.

Ao analisarem o padrão de distribuição dos gangliosídeos no pâncreas humano, DOTTA *et al.* (1989) verificaram que o gangliosídeo GM2-1 está expresso nas ilhotas pancreáticas humanas em grande quantidade, ao passo que no restante do órgão está em menor quantidade. Estudando a ligação de ICA em criocortes de pâncreas de camundongos NOD e camundongos C57BL/10 não diabéticos, DOTTA *et al.* (1990) verificaram uma forte imunomarcagem em ilhotas dos camundongos NOD.

DOTTA *et al.* (1992) realizaram um estudo comparativo da expressão de gangliosídeos em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD e de camundongos C57BL/10. Os resultados deste trabalho mostraram que há uma quantidade maior do gangliosídeo GM2-1 nas ilhotas dos camundongos NOD. Além disso, foi observada acentuada redução na quantidade dos gangliosídeos GM2-1 e GM3, concomitantes com o avanço da idade e com início do diabetes nestes animais. Estes achados foram

interpretados por DOTTA *et al.* (1992, 1997, 1998) como forte evidência de que o monosialogangliosídeo GM2-1 é o antígeno alvo do ICA.

No conjunto, essas observações têm reforçado a hipótese de que os gangliosídeos desempenham papel modulador importante na atividade imunológica e tem dado suporte a investigação de seu emprego para terapêutica dos distúrbios imunológicos (LADISCH *et al.*, 1984; DOTTA *et al.*, 1997).

Frente a esses fatos, WILBERZ, *et al.* (1988), trataram camundongos NOD com gangliosídeos objetivando o estudo de seu efeito sobre a incidência do *diabetes mellitus* nestes animais. Estes autores verificaram que a incidência da doença foi significativamente diminuída em fêmeas tratadas a partir da quarta semana de vida e nos machos, embora o tratamento com gangliosídeos não tenha reduzido a ocorrência da perivasculite, precursora da invasão das ilhotas de Langerhans pelas células inflamatórias.

Por sua vez, PAPACCIO *et al.* (1993) mostraram que a administração de gangliosídeos em camundongos NOD fêmeas, a partir da quinta semana até a vigésima primeira semana de vida, reduziu o aumento gradual da glicemia, retardando assim a instalação do diabetes clínico. Coerente com estes dados, observaram que o tratamento com gangliosídeos retardou a progressiva desorganização da cito-arquitetura das células β . Contudo, curiosamente, estes autores relataram não terem encontrado diferença significativa entre os animais tratados e os animais controle quanto ao aparecimento da insulite e da sua progressão. Além disso, na opinião dos autores os dados obtidos neste

trabalho não seriam suficientes para provar a eficiência da ação terapêutica dos gangliosídeos sobre a instalação e evolução do DM auto-imune.

2. Objetivos

Considerando a participação dos gangliosídeos sobre os processos imunológicos descritos na literatura e a natureza auto-imune do DM espontâneo apresentado por camundongos da linhagem NOD, este trabalho teve como objetivos:

1. Avaliar o efeito da administração crônica da mistura de gangliosídeos sobre a incidência e morbidade do DM auto-imune espontâneo em fêmeas dessa linhagem.
2. Investigar o efeito da administração crônica da mistura de gangliosídeos sobre o processo inflamatório nas ilhotas pancreáticas (insulite) que se verifica durante a fase pré-diabética e pós-diabética.
3. Verificar se a administração crônica da mistura de gangliosídeos inibe o efeito da ciclofosfamida sobre a instalação e desenvolvimento da insulite e da incidência do DM auto-imune espontâneo.

3. Material e Métodos

3.1. *Animais*

Os camundongos utilizados neste estudo foram 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 “germ free”. A frequência do DM auto-imune espontâneo registrada na colônia de camundongos NOD do CEMIB, a partir da sua implantação, tem se mantido ao redor de 64,3% entre as fêmeas e de 18,5% 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).

Foram empregados 75 camundongos fêmeas, retirados do CEMIB com 4 semanas de idade. A partir de seu recebimento, os animais foram mantidos no biotério do setor de pesquisa do Hospital SOBRAPAR e no 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 foram sacrificados ao completarem 17, 21 ou 25 semanas de vida, de acordo com o estabelecido para cada grupo experimental, ou quando apresentaram glicosúria por duas dosagens consecutivas e glicemia acima de 17.0 mM(KAWAMURA *et al.* .1993, JUN *et al.* 1999).

3.2. Grupos Experimentais e Tratamentos (tabela 1)

Para o estudo do efeito da administração diária de uma mistura de gangliosídeos sobre a ocorrência do diabetes, os animais foram divididos em dois grupos(A e B), sendo que, no grupo A foi permitida a ocorrência espontânea da doença e no grupo B esta foi acelerada pela administração de ciclofosfamida(tabela pg.34)

Os animais do grupo A foram subdivididos em seis subgrupos, de acordo com o tempo de sobrevivência máximo de 17 semanas(A1g e A1c), 21 semanas(A2g e A2c) e 25 semanas(A3g e A3c). A partir da 4^a semana de vida, todos os animais do subgrupos A1g, A2g e A3g receberam diariamente 150 mg/kg(dose única, i.p.) da seguinte mistura de gangliosídeos: GM1(21%), GD1a (40%), GD1b (16%), GT1b (19%) (Sinaxial[®], TRB Pharma). Os animais dos grupos A1g e A3g receberam este tratamento até a 17^a semana de vida, ou seja, durante 13 semanas. Após esse período de tratamento com gangliosídeos, os animais do grupo A3g foram apenas acompanhados para a monitoração do peso corporal e da ocorrência de glicosúria até a data do sacrifício. Por sua vez, os animais do grupo A2g receberam a mistura de gangliosídeos até a 21^a semana de vida, o que correspondeu 17 semanas de tratamento.

Os animais dos subgrupos A1c, A2c e A3c corresponderam aos controles dos subgrupos A1g, A2g e A3g, respectivamente. Esses animais receberam doses diárias de solução salina estéril (0,9%, i.p.), com volume igual ao recebido pelos animais tratados

com gangliosídeos, de acordo com o seu peso corporal e pelo mesmo período de tempo.

Os animais que desenvolveram diabetes foram sacrificados após a constatação por dois dias consecutivos de glicosúria positiva, seguida da verificação de glicemia acima de 17.0mM. Os animais que não apresentaram estado diabético foram sacrificados ao completarem 17, 21 ou 25 semanas de vida, de acordo com o grupo experimental a que pertenciam.

Os animais do grupo B foram divididos nos subgrupos Bg e Bc, sendo que os pertencentes ao subgrupo Bg receberam tratamento diário com a mistura de gangliosídeos(150 mg/Kg, dose única,i.p) a partir da 4^a. semana de vida, duas doses de ciclofosfamida(200 mg/Kg, i.p., Enduxan[®] Asta). Sendo a primeira dose dessa droga aplicada no início da 10^a. semana de vida e a segunda no início da 12^a. semana de vida, de acordo com o protocolo estabelecido originalmente por HARADA & MAKINO 1984 e adaptado para a colônia NOD/Uni do CEMIB por VOLPINI *et al.* 1995. Os animais do subgrupo Bc, constituíram os animais controle do grupo B, recebendo doses diárias de solução salina estéril (0,9%, i.p.) com volume igual ao recebido pelos animais tratados com gangliosídeos, de acordo com seu peso corporal, e duas doses de ciclofosfamida(200 mg/Kg, i.p.) no início da 10^a. e da 12^a. semanas de vida, respectivamente. Os animais dos grupos Bg e Bc foram sacrificados ao fim da 17^a. semana de vida, após a constatação do diabetes pela apresentação de glicosúria por dois dias consecutivos.

Tabela 1. Protocolos e Grupos Experimentais. A tabela abaixo resume os grupos experimentais empregados e os respectivos tratamentos e tempos de sobrevida máxima dos animais.

GRUPOS	SUBGRUPO	TRATAMENTO	TIPO	Dose	PERÍODO	SOBREVIDA
A	A1g (n=7)	Gangliosídeos	Diariamente	150 mg/kg ip.	4 ^a -17 ^a s.v.	17 semanas
	A1c (n= 12)	Salina	Diariamente	0.9% ip.	4 ^a -17 ^a s.v.	17 semanas
	A2g (n= 12)	Gangliosídeos	Diariamente	150 mg/kg ip.	4 ^a -21 ^a s.v.	21 semanas
	A2c (n= 12)	Salina	Diariamente	0.9% ip.	4 ^a -21 ^a s.v.	21 semanas
	A3g (n= 7)	Gangliosídeos	Diariamente	150 mg/kg ip.	4 ^a -17 ^a s.v.	25 semanas
	A3c (n= 14)	Salina	Diariamente	0.9% ip.	4 ^a -17 ^a s.v.	25 semanas
B	Bg (n= 5)	Gangliosídeos	Diariamente	150mg/kg ip.	4 ^a -17 ^a s.v.	17 semanas
		Ciclofosfamida	1 ^a dose	200 mg/kg ip.	10 ^a s.v.	
			2 ^a dose	200 mg/kg ip.	12 ^a s.v.	
	Bc (n= 6)	Salina	Diariamente	0.9% ip.	4 ^a -17 ^a s.v.	17 semanas
		Ciclofosfamida	1 ^a dose	200 mg/kg ip.	10 ^a s.v.	
			2 ^a dose	200 mg/kg ip.	12 ^a s.v.	

Grupos Experimentais		Período em Semanas de Vida dos Animais																								
Grupo A	N	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25			
Controle - Ac1	12																									
Gangliosídeos - A1g	7	Tratamento com gangliosídeos																								
Controle - Ac2	12																									
Gangliosídeos - A2g	12	Tratamento com gangliosídeos																								
Controle - Ac3	14																									
Gangliosídeos - A3g	7	Tratamento com gangliosídeos																								
Grupo B - Ciclofosfamida																										
Controle - Bc	6							C	C																	
Gangliosídeo - Bg	5	Tratamento com gangliosídeos																								
S/tratamento		Tratamento gangliosídeo	C	Administração Ciclofosfamida												Sacrifício	Tratamento gangliosídeo									

3.3. Diagnóstico de Diabetes e sacrifício dos animais

A ocorrência do *diabetes mellitus* foi monitorada em todos os animais a partir da sua retirada do CEMIB. Diariamente, entre 9 e 10 horas da manhã, foi verificada a ocorrência de glicosúria empregando-se o teste de glicofita (Glicofita, Lilly®). Os animais foram considerados diabéticos após constatação de glicosúria por dois dias consecutivos e confirmação da glicemia através de glicosímetro utilizando-se tiras reagentes (Haemo-Glukotest 20-800 R – Boehringer Mannheim.) retirando-se amostra de sangue pela cauda do animal. Desta forma, o diabetes foi confirmado pela verificação de um valor de glicemia maior que 17,0 mM.

Os animais que apresentaram diabetes antes de completado o tempo de sobrevida máxima (17, 21 ou 25 semanas) foram imediatamente anestesiados com 0,2 ml de hidrato de cloral 10% e sacrificados para remoção do pâncreas. Este órgão foi depositado em cápsulas contendo meio de inclusão (Tissue Tek OCT, Miles – USA) e rapidamente congelados em nitrogênio líquido. Este procedimento foi realizado sempre de modo que os pâncreas, ao serem colocados nas cápsulas, ficassem o mais distensos possível. A seguir, foram conservados em “bio-freezer” a -80°C até o seu processamento histológico. Após este procedimento, os pâncreas foram removidos para estudo morfológico empregando-se cortes obtidos em criostato (Leica, CM1850). O mesmo procedimento foi empregado em todos os animais ao final do período experimental.

3.4. Avaliação Histológica

A avaliação histológica dos pâncreas objetivou a análise da morfologia das ilhotas de Langerhans e de seu eventual grau de insulite, seguindo-se os critérios propostos por SIGNORE *et al.* 1989 e PAPACCIO, BACCARI & MEZZOGIORNO 1993. Esta avaliação foi realizada nos pâncreas provenientes dos animais dos subgrupos: A1g (n=4) e A1c (n=8) - 17 semanas de sobrevida/13 semanas de tratamento com gangliosídeos; A3g (n=7) e A3c (n=14) - 25 semanas de sobrevida/13 semanas de tratamento com gangliosídeos; e Bg (n=5) e Bc (n=6) - ciclofosfamida, 13 semanas de tratamento com gangliosídeos.

Após o posicionamento do pâncreas no suporte do criostato de maneira a se obter a maior área possível de corte, foi coletada uma série de nove cortes consecutivos, com 5µm de espessura, depositados em lâminas histológicas previamente silanizadas(γ Methacryl-Oxipropil-Methoxysilane–Sigma St Louis, USA). Após a obtenção da primeira série de cortes, o pâncreas foi desbastado de 300µm e a seguir, outra série de 9 cortes foi igualmente coletada. Repetiu-se este procedimento outras seis vezes obtendo-se os conjuntos de lâminas representados no esquema (pg. 33).

Os cortes foram então corados pela técnica da hematoxilina e eosina e examinados ao microscópio de luz (Zeiss, Axioscop). Para a avaliação do número de ilhotas de Langerhans e classificação destas, segundo o grau de insulite apresentado, foram selecionados as lâminas 1, 4, 7, 10, 13 e 16 obtidas de pâncreas provenientes de todos os

animais dos subgrupos A1g, A1c, A3g, A3c, Bg e Bc. A classificação das ilhotas analisadas foi realizada atribuindo-lhes o seguinte escore:

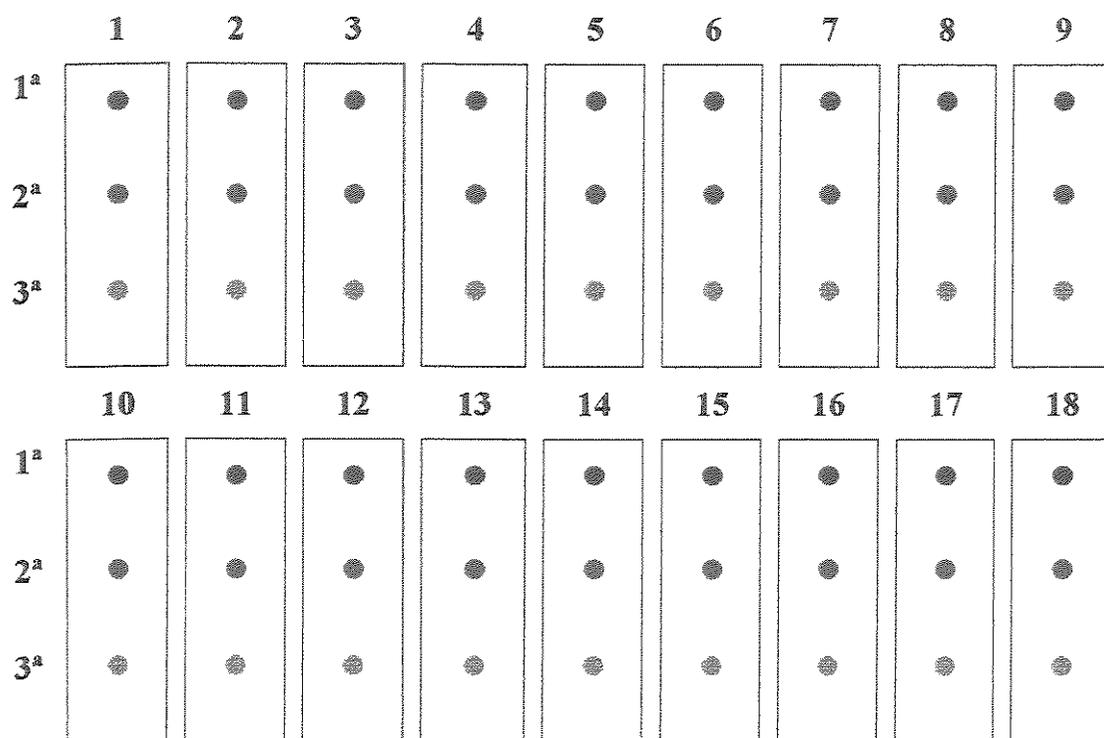
0 = ilhota normal, na ausência de infiltrado

1 = peri-insulite, presença de linfócitos somente ao redor da ilhota

2 = insulite moderada, infiltrado invadindo parcialmente a ilhota

3 = insulite avançada, infiltrado ocupando extensiva ou totalmente ilhota

Esquema representando o procedimento seguido para a obtenção dos conjuntos de cortes analisados para estudo morfológico e quantitativo das ilhotas pancreáticas



4. *Avaliação Estatística*

Para avaliação estatística dos resultados quantitativos correspondentes à incidência do *diabetes mellitus*, para contagem do número de ilhotas e sua classificação quanto ao grau de insulite, foi realizada primeiramente análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls, assumindo-se o nível de significância igual a 0.05.

4. Resultados

4.1. Efeito do Tratamento com Gangliosídeos Sobre a Manifestação Espontânea do Diabetes Mellitus Auto-imune

O acompanhamento dos animais durante os períodos de experimentação revelou que todos os camundongos NOD tratados com a mistura de gangliosídeos (subgrupos A1g, A2g e A3g) apresentaram teste negativo para glicosúria até completarem os tempos de sobrevivência máxima de 17, 21 e 25 semanas, respectivamente. A ausência do estado diabético foi confirmada pelo registro de glicemias menores que 17.0mM em todos esses animais. Os animais do subgrupo A3g não apresentaram os sinais clínicos de glicosúria e hiperglicemia, mesmo oito semanas após a interrupção do tratamento (Figura 1). Além disso, o crescimento corporal desses animais foi semelhante aos animais pertencentes aos subgrupos controle (A1c, A2c e A3c) que não ficaram diabéticos (Figura 2).

Por outro lado, nos subgrupos controle verificou-se a ocorrência de glicosúria em 25% (3/12) dos animais no subgrupo A1c, 50% (6/12) nos animais do subgrupo A2c e 50% (7/14) dos animais do subgrupo A3c (Figura 1). Sendo que a glicosúria foi verificada somente nos camundongos com mais de 15 semanas de idade, em todos os subgrupos controle. O estado diabético foi confirmado pela verificação de valores de glicemia acima de 17.0 mM em todos esses animais com teste positivo para glicosúria. Estes resultados mostraram que a incidência do diabetes mellitus espontâneo ocorrida no subgrupos controle A1c, A2c e A3c foi semelhante à verificada no CEMIB quando da implantação da colônia em 1994 (PAVIN & ZOLLNER, 1994).

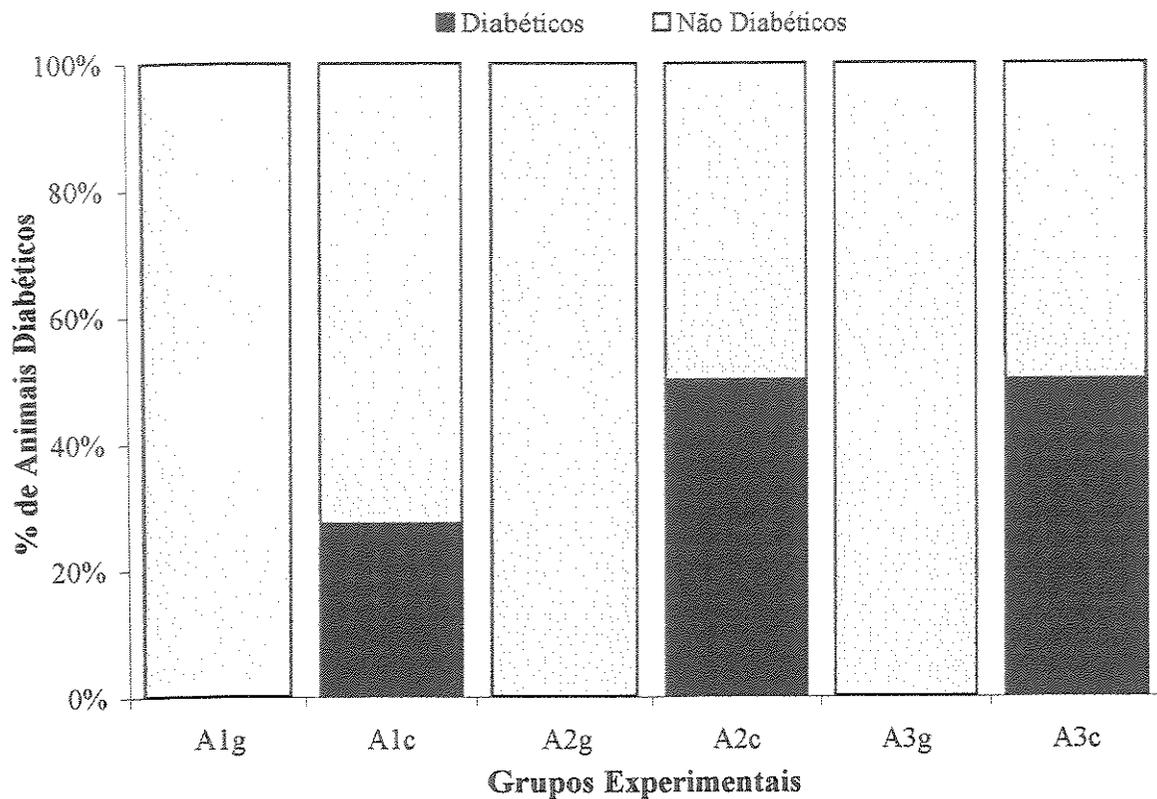


Figura 1. Gráfico representando incidência do diabetes. Em todos os subgrupos tratados com a mistura de gangliosídeos não foi observada ocorrência de diabetes mellitus auto-imune espontâneo. Dentre este destaca-se o subgrupo A3g, no qual o tratamento foi interrompido 8 semanas antes do sacrifício dos animais. Observe-se que nos animais controle a incidência da doença foi de 25% nos animais do subgrupo A1c e de 50% nos animais dos subgrupos A2c e A3c, respectivamente.

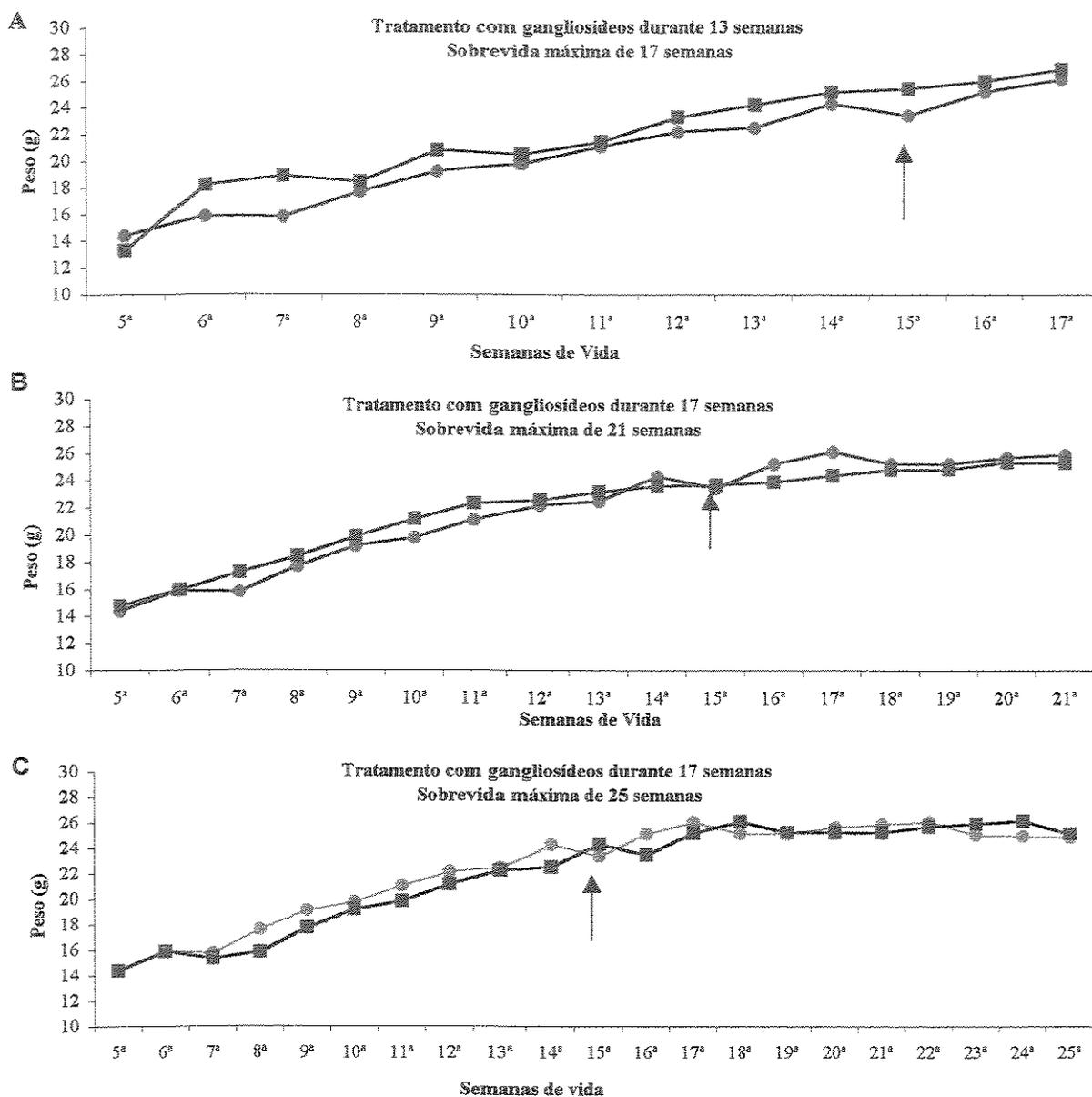


Figura 2. Os gráficos acima mostram a evolução do peso corporal nos animais do grupo A. Note-se que não houve diferenças de crescimento corporal entre os animais dos subgrupos tratados com gangliosídeos (A1g, A2g e A3g) e os respectivos subgrupos controle (A1c, A2c e A3c), independente dos tempos de tratamento e de sobrevida. Os valores representados para cada ponto correspondem à média do peso dos animais de cada grupo com teste negativo para glicosúria. As setas e os valores a elas associados indicam a semana em que foi diagnosticada glicosúria no grupo e o respectivo número de animais então sacrificados. (■ gangliosídeos/● controle)

4.2. Efeito do tratamento com gangliosídeos sobre a manifestação de processo inflamatório e destruição de ilhotas de Langerhans

Para análise histológica do efeito do tratamento com gangliosídeos sobre a manifestação de processo inflamatório e destruição de ilhotas de Langerhans foram empregados 18 cortes (5 μ m) semi-seriados do pâncreas total dos animais dos subgrupos A1g (n=4), A1c (n=8), A3g (n=7) e A3c (n=14).

Desta forma, foi efetuada a contagem do número de ilhotas em cada um dos animais, assim como sua classificação segundo o grau de insulite, de acordo com o seguinte escore: 0= Ilhota normal, ausência de infiltrado; 1= Peri-insulite, presença de infiltrado circundando a ilhota; 2= Insulite moderada, infiltrado invadindo parcialmente a ilhota; 3= Insulite avançada, infiltrado ocupando totalmente a ilhota (Prancha I).

A contagem do número de ilhotas mostrou que nos subgrupos A1g e A1c, os valores encontrados não diferiram estatisticamente, correspondendo a 41 \pm 7 (média \pm e.p.; n=4) e de 44 \pm 10 (n=8) ilhotas por animal, respectivamente. Por sua vez, nos animais dos subgrupos A3g e A3c o número médio de ilhotas por animal também foi estatisticamente semelhante, correspondendo a 83 \pm 6 (n=7) no subgrupo A3g e a 68 \pm 10 (n=14) no subgrupo A3c. Contudo, deve ser notado que estes resultados evidenciaram uma tendência de redução do número de ilhotas nos animais do subgrupo Ac3 quando comparado com o computado nos animais do subgrupo Ag3 (Figura 3).

A análise morfológica revelou que nos subgrupos tratados com gangliosídeos (A1g

e A3g) predominaram ilhotas normais e com peri-insulite (Prancha II, **a** e **b**), ao contrário do que se observou nos grupos controle (A1c e A3c), nos quais foram mais frequentes as ilhotas com insulite avançada (Prancha II, **c** e **d**). Por outro lado, não puderam ser observadas diferenças morfológicas entre as células das ilhotas ou do tecido exócrino dos animais tratados e controles.

A classificação das ilhotas, de acordo como o seu grau de insulite, mostrou que nos subgrupos tratados A1g e A3g o percentual de ilhotas com escore **0** correspondeu a 46,7% e 33,3%, respectivamente. Nos animais controle dos subgrupos A1c e A3c estes valores foram significativamente inferiores, e corresponderam a 15,1% e 16,6%, respectivamente. Por sua vez, as ilhotas com escore **1** nos subgrupos A1g e A3g perfizeram 17,6% e 40,14%, respectivamente. Enquanto que nos subgrupos controle A1c e A3c estas corresponderam a 22,5% e 22%, respectivamente. Por sua vez, as ilhotas com escore **2** encontradas nos subgrupos A1g e A3g corresponderam a 22,4% e 18,5%, ao passo que nos grupos controle A1c e A3c elas corresponderam a 29,3% e 36%, respectivamente. Por fim, as ilhotas classificadas com escore **3** nos subgrupos A1g e A3g corresponderam a 13,3% e 8,1%, enquanto que nos subgrupos controle A1c e A3c corresponderam a 33,1% e 25,4%, respectivamente (Figura 4).

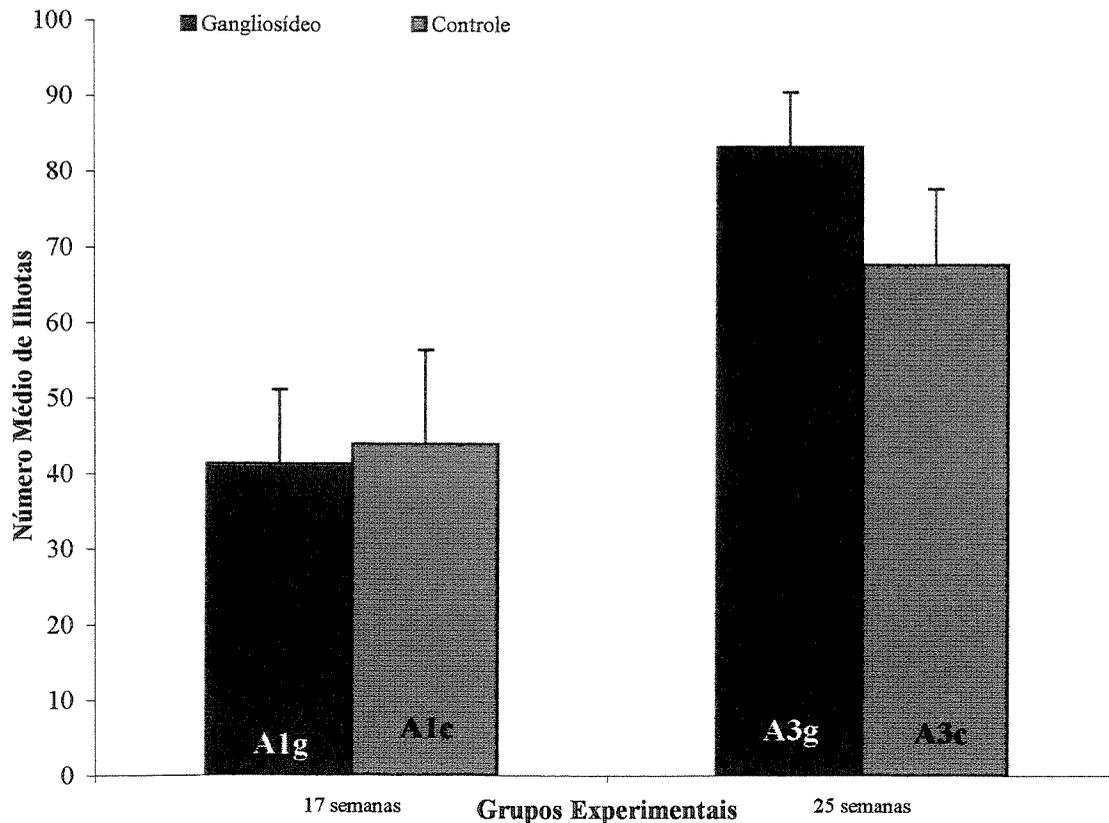


Figura 3. Gráfico representando o número de ilhotas de Langerhans (média \pm erro padrão) presentes no pâncreas dos animais tratados com gangliosídeos ou solução salina a partir da 4ª até a 17ª semana de vida. Note-se que os valores encontrados não diferiram estatisticamente entre os subgrupos analisados A1g (n=4), A1c (n=8), A3g (n=7) e A3c (n=14). Contudo, deve ser destacada a tendência de redução do número de ilhotas nos animais do subgrupo A3c quando comparado com o verificado nos animais do subgrupo A3g

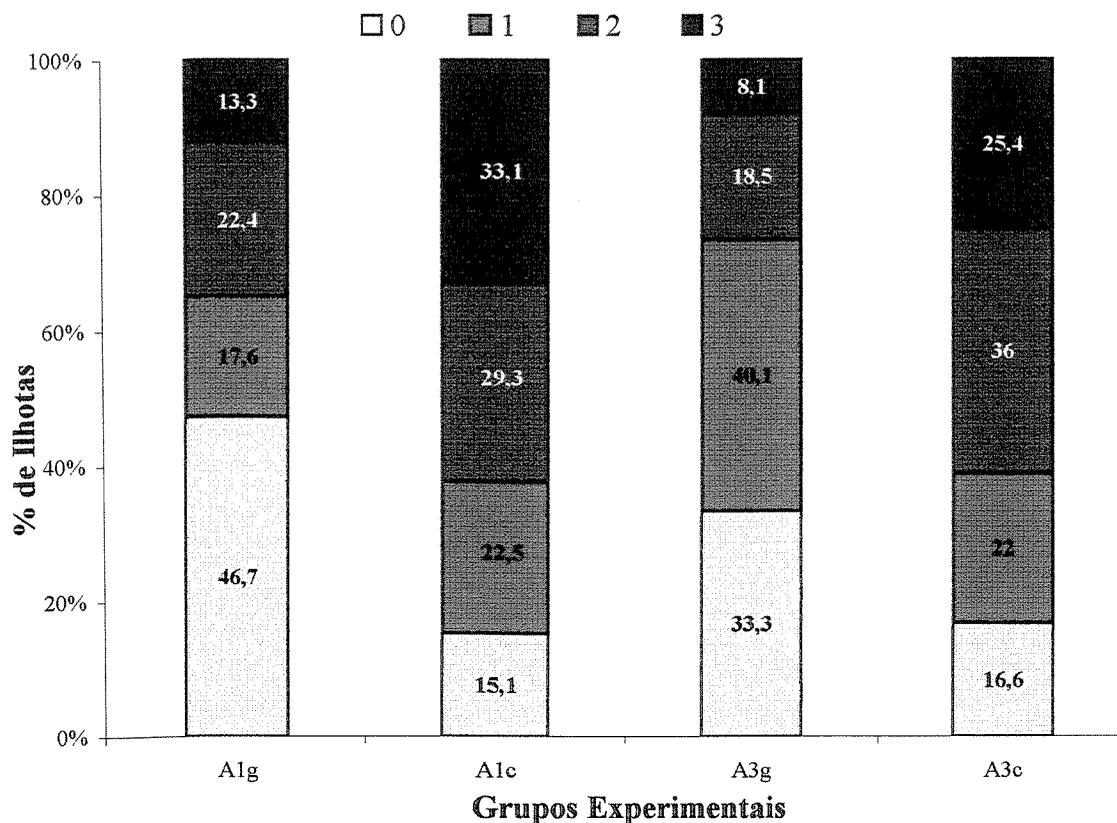


Figura 4. Gráfico representando classificação das ilhotas de Langerhans segundo o grau de insulite apresentado. Observe-se que nos subgrupos tratados com gangliosídeos (A1g e A3g) o percentual de ilhotas com escore 0 foi significativamente superior ao observado nos respectivos subgrupos controle. Por outro lado, o percentual de ilhotas com insulite, independentemente do seu escore, tendeu a ser sempre superior nos animais controle quando comparado com os dos animais tratados. Observe-se também que nos animais do subgrupo A3g o percentual de ilhotas com escore 1 foi superior ao dos animais dos subgrupos A1g, ao passo que não diferiram entre os respectivos subgrupos controle. Note-se ainda, que o percentual de ilhotas com escore 2 e 3 foi semelhante nos grupos A1g e A3g. (0= Ilhotas normais; 1= Peri-insulite; 2= Insulite média; 3= Insulite avançada)

4.3. Efeito do Tratamento com Gangliosídeos sobre a Manifestação do Diabetes Mellitus Auto-imune Espontâneo Acelerada pela Administração da Ciclofosfamida

Todos os animais dos subgrupos Bg e Bc apresentaram teste negativo para glicosúria ao atingirem a 10^a e a 12^a semana de vida. Desta forma, tanto os animais tratados com gangliosídeos (Bg), como os que receberam solução salina (Bc) a partir da 4^a semana de vida, não apresentavam sinal evidente de diabetes ao receberem a 1^a e a 2^a dose de ciclofosfamida.

Por sua vez, a totalidade dos animais do subgrupo Bc apresentaram teste positivo para glicosúria após a administração de ciclofosfamida. Sendo que a glicosúria foi constatada em 2 animais 15 dias após a primeira dose de ciclofosfamida, em 3 animais após 21 dias e em 1 animal após 28 dias. Desta forma, 100% (6/6) dos animais controle desenvolveram diabetes, acelerada pela ação da ciclofosfamida, antes de atingirem 17 semanas de vida (Figura 5). Os animais do subgrupo Bc tiveram crescimento corporal semelhante aos do subgrupo Bg até o momento que apresentaram glicosúria, quando então foram sacrificados (Figura 6).

Dentre os animais tratados com gangliosídeos (Bg), apenas 1 exibiu teste positivo para glicosúria 28 dias após a 1^a dose de ciclofosfamida e 1 após 39 dias. Os outros três animais desse subgrupo não apresentavam este sinal do diabetes ao atingirem a 17^a semana de vida. Assim, 60% (3/5) dos animais do subgrupo tratado com gangliosídeos

parecem terem sido protegidos da ação da ciclofosfamida no decurso do período experimental aqui estudado.

A contagem do número de ilhotas resultou em 29 ± 7 (média \pm e.p.; n=5) ilhotas por animal no subgrupo Bg, ao passo que no subgrupo Bc esse valor correspondeu a 13 ± 7 (n=6), significativamente inferior (Figura 7). A análise histológica revelou que nos animais do subgrupo Bg o pâncreas apresentava ilhotas com insulite e ilhotas normais, contrastando com o observado nos animais controle (Bc), onde estas últimas estavam ausentes. Desta forma, fazendo-se a classificação das ilhotas verificou-se que no subgrupo Bg 26,2% tiveram escore 0, 30,7% tiveram escore 1, 37,5% tiveram escore 2 e 5,6% tiveram escore 3. No subgrupo Bc os valores encontrados foram 0% de ilhotas com escore 0, 16,3% com escore 1, 32,5% com escore 2 e finalmente 51,2% com escore 3 (Figura 8).

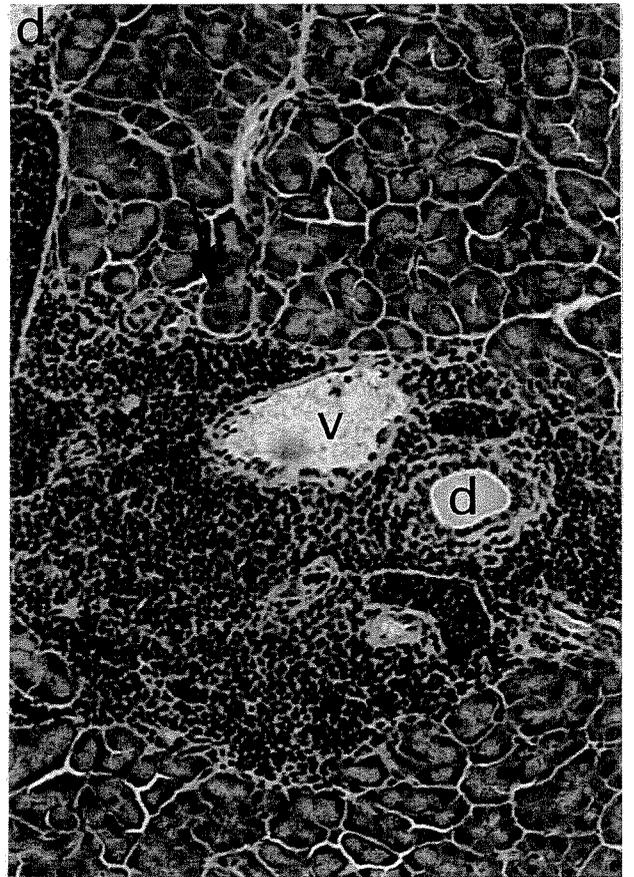
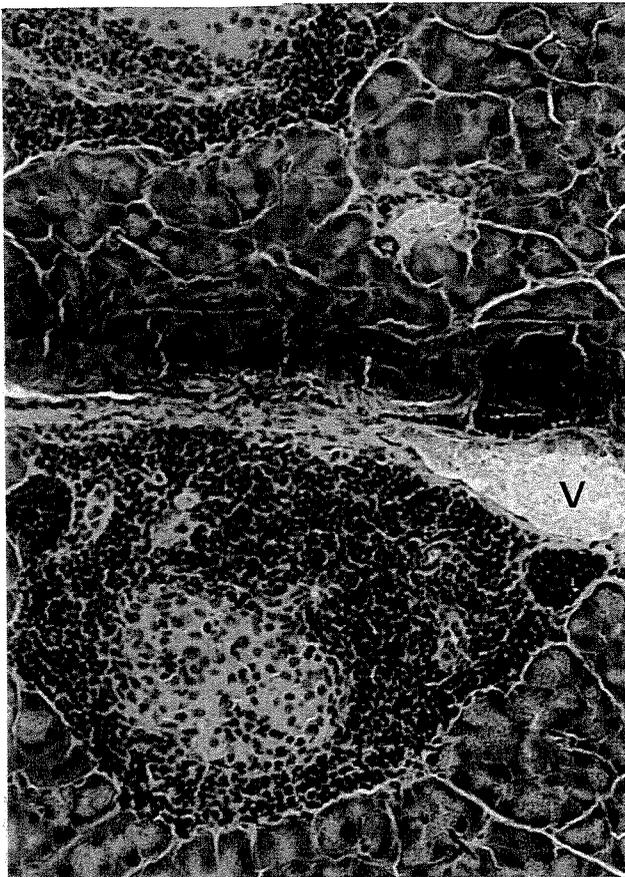
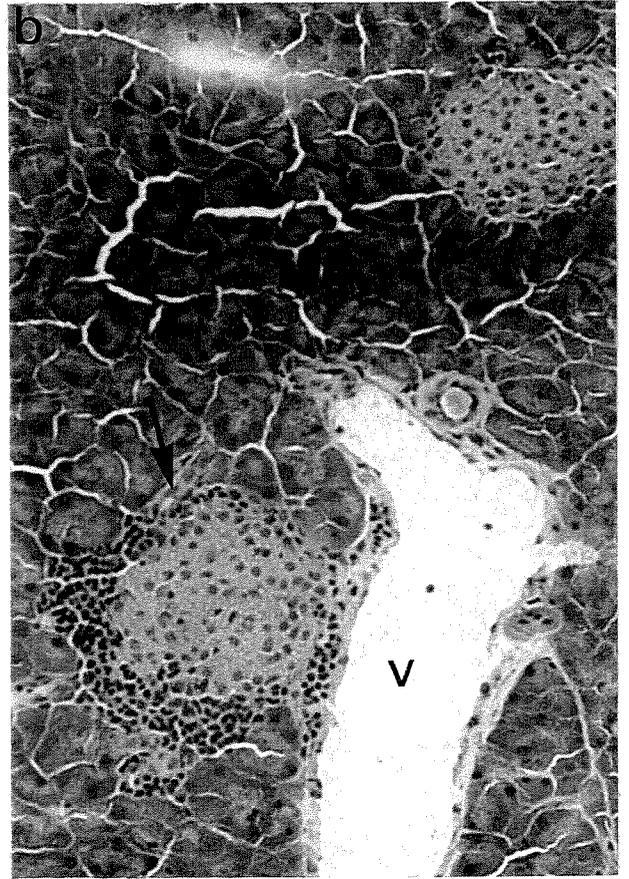
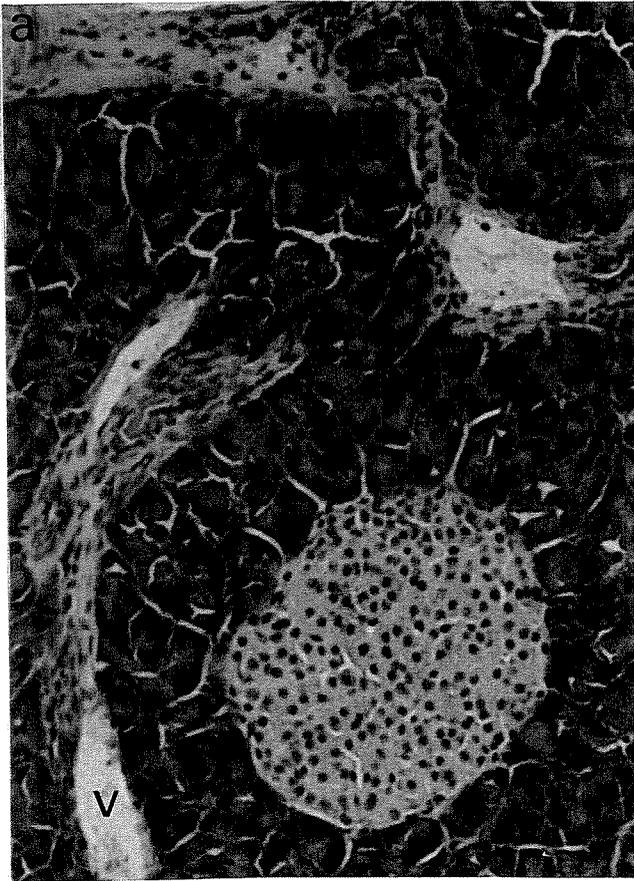
Prancha I. Fotomicrografia de Ilhotas de Langerhans de camundongos NOD demonstrando os diferentes graus de insulite.

Figura a) Fotomicrografia de Ilhota de Langerhans normal. Sua estrutura apresenta-se íntegra, sem a presença de infiltrados inflamatórios, tanto na própria ilhota como nos vasos adjacentes. Aumento 200x. HE. v= vaso; seta= Ilhota de Langerhans.

Figura b) Fotomicrografia de Ilhota de Langerhans com peri-insulite. Observar a presença de infiltrado inflamatório circundando a ilhota, assim como a presença de células mononucleares nas paredes dos vasos adjacentes. Aumento 200x. HE. . v= vaso; seta= Ilhota de Langerhans.

Figura c) Fotomicrografia de Ilhota de Langerhans apresentando insulite moderada. Ocorre a invasão parcial do infiltrado inflamatório na ilhota. Observar a presença de um grande número de células mononucleares circundando a ilhota, células estas presentes também no vaso. Aumento 200x. HE. . v= vaso; seta= Ilhota de Langerhans.

Figura d) Fotomicrografia de Ilhota de Langerhans com insulite avançada. As ilhotas com esta classificação apresentam-se com grande infiltrado inflamatório, o qual ocupa totalmente a ilhota. Aumento 200x. HE. . v= vaso; seta= Ilhota de Langerhans, d= ducto..

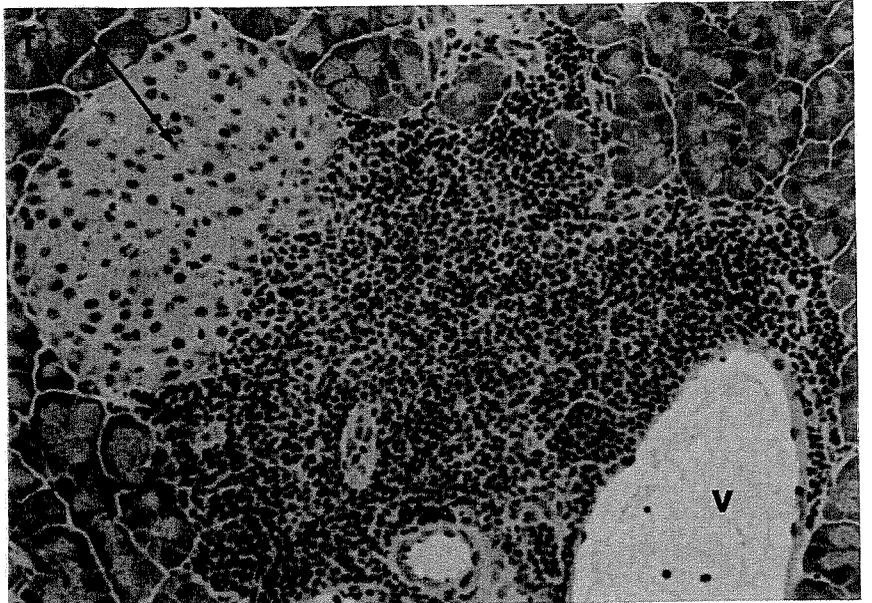
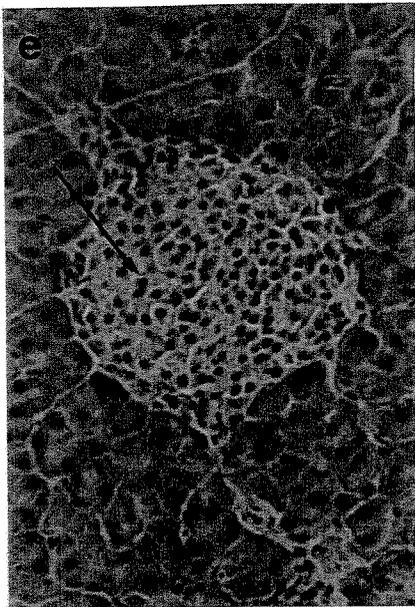
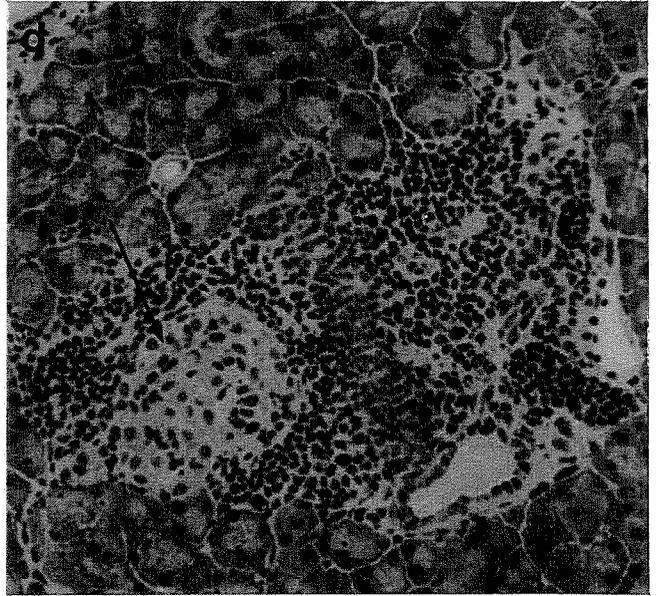
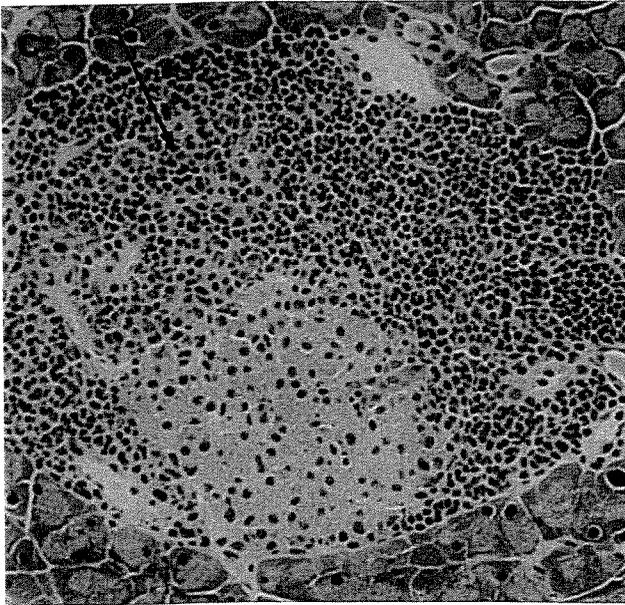
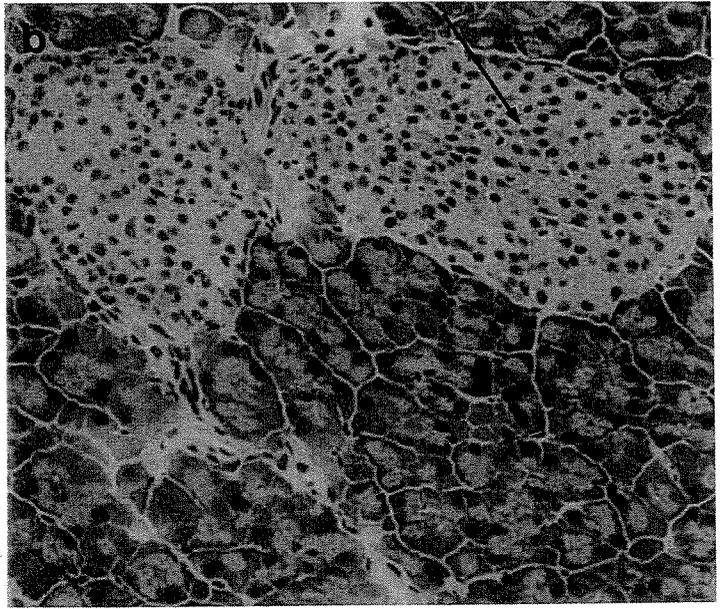
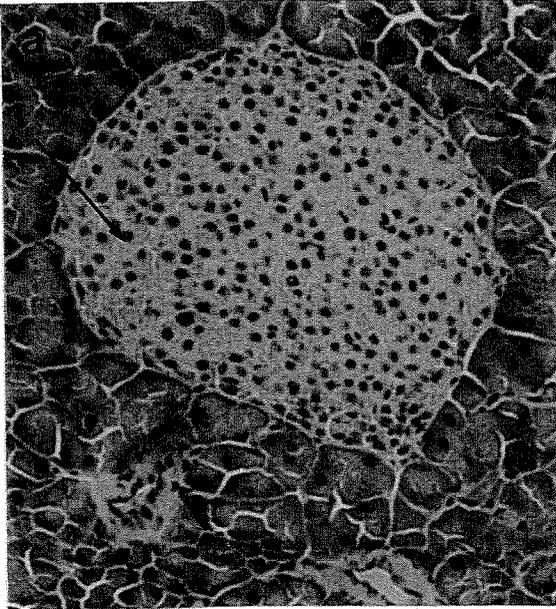


Prancha II. Fotomicrografias de Ilhotas de Langerhans de camundongos NOD dos diferentes grupos experimentais:

Figuras a e b) Fotomicrografias de pâncreas de animais dos Grupos tratados com gangliosídeos (A1g e A3g), onde podem ser observadas Ilhotas normais (a) e com leve periinsulite (b). Aumento 200x. HE.

Figuras c e d) Fotomicrografias de pâncreas de animais dos Grupos Controle (A1c e A3c). Observa-se nestes animais um comprometimento muito maior das ilhotas, com intensa invasão de células mononucleares. **c)** Ilhota de Langerhans de animal diabético, apresentando insulite moderada, onde o infiltrado invade parcialmente a ilhota. **d)** Ilhota de Langerhans de animal diabético com insulite avançada, observa-se intenso infiltrado inflamatório ocupando quase a totalidade da área da ilhota. Aumento 200x. HE.

Figuras e e f) Fotomicrografias de animais cujo diabetes foi acelerado através da administração de Ciclofosfamida, tratados com gangliosídeos (Bg) e grupo controle (Bc). Pode-se notar que a proteção conferida pelo tratamento com gangliosídeo é mantida mesmo com a presença da Ciclofosfamida. **e)** Ilhota de Langerhans de camundongo NOD tratado com gangliosídeo da 4ª a 17ª semana de vida que recebeu (CI i.p) na 10ª e 12ª semanas de vida (Bg). Como demonstrado nesta figura, a maioria das ilhotas apresenta-se normais ou com pequeno infiltrado inflamatório. **f)** Ilhota de Langerhans do grupo controle, constituído por camundongos NOD que receberam administração de Ciclofosfamida na 10ª e 12ª semanas de vida (Bc). Há a invasão maciça de células mononucleares ocupando quase a totalidade da ilhota, na maioria dos vasos observa-se a presença destes infiltrados. Aumento 200x. HE. v= vaso.



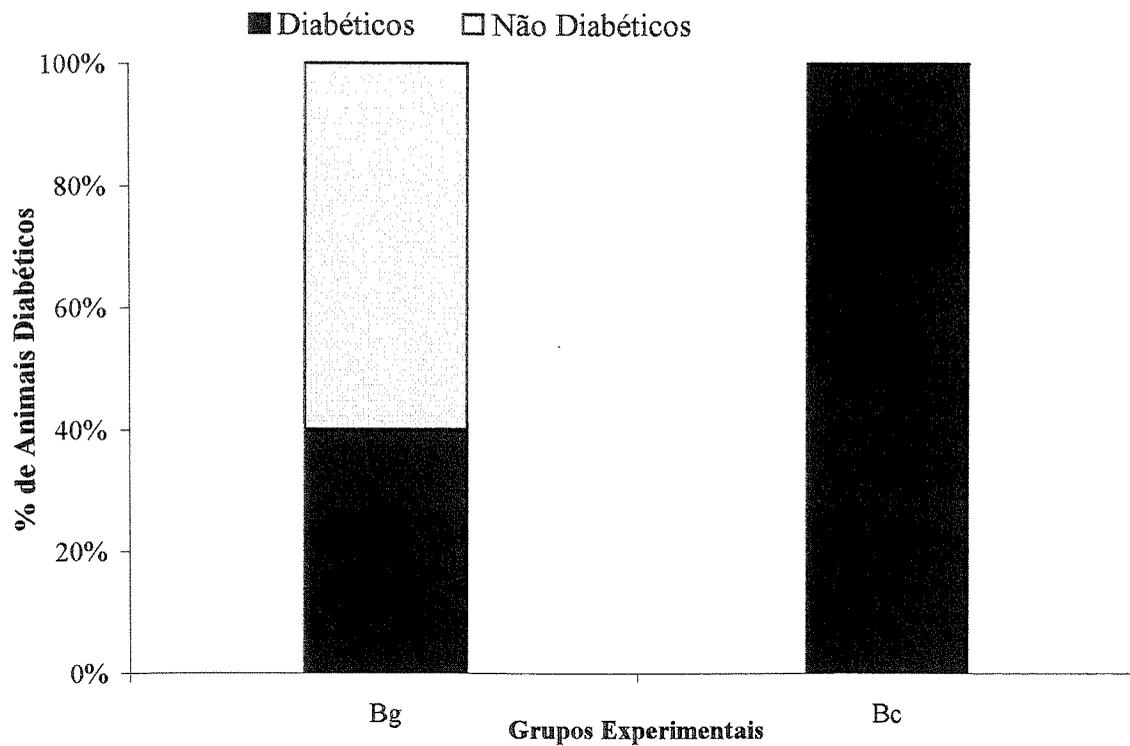


Figura 5. Gráfico representando incidência de diabetes entre os animais que receberam gangliosídeos (Bg) ou solução salina (Bc), a partir da idade de 4 semanas, e duas doses de ciclofosfamida ao atingirem a 10a e a 12a semana de vida, respectivamente. Note-se que a totalidade dos animais do subgrupo Bc (6/6) desenvolveram diabetes acelerada pela ciclofosfamida, contrastando com o observado no subgrupo tratado com gangliosídeos, onde 60% (3/5) dos animais não apresentaram sintomas da doença.

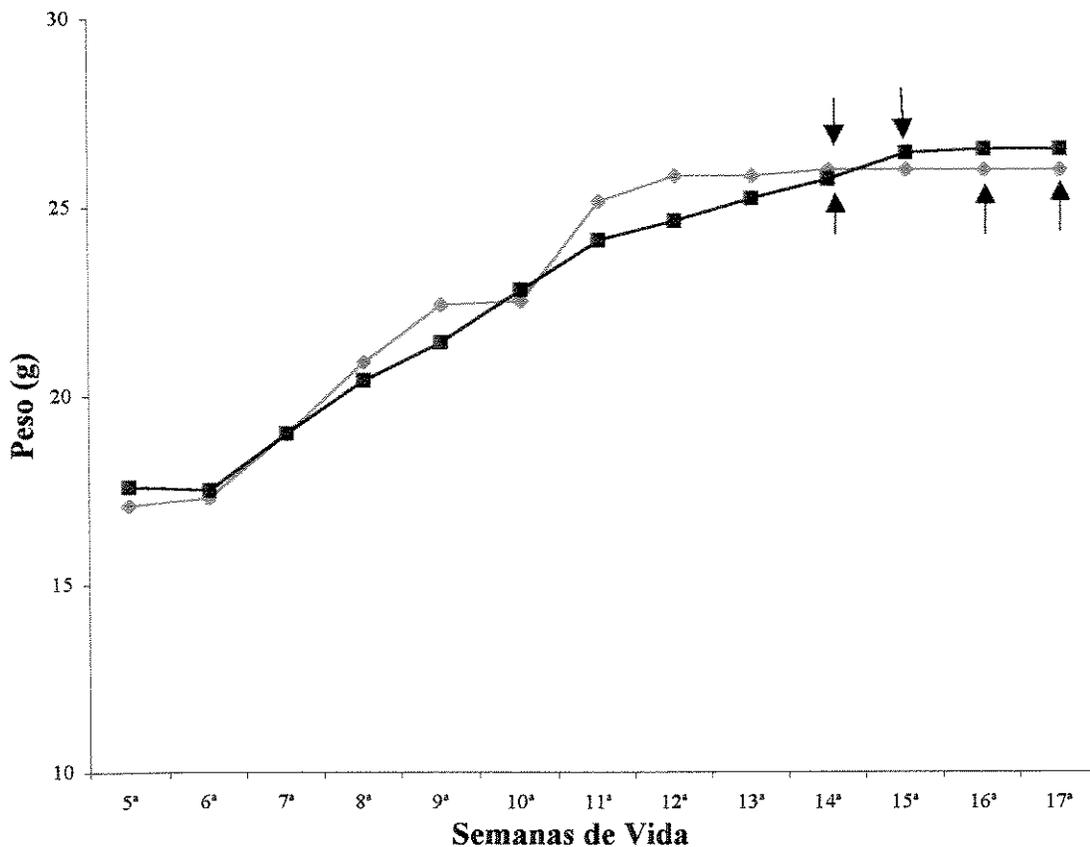


Figura 6. Gráfico representando evolução do peso corporal dos animais que receberam gangliosídeos (Bg) ou solução salina (Bc), a partir da idade de 4 semanas, e duas doses de ciclofosfamida ao atingirem a 10ª e a 12ª semana de vida, respectivamente (setas pequenas). Note-se que os animais do subgrupo Bc tiveram crescimento corporal semelhante aos do subgrupo Bg até o momento que apresentaram glicosúria, quando então foram sacrificados. As setas e os valores a elas associados indicam a semana em que foi diagnosticada glicosúria e o respectivo número de animais

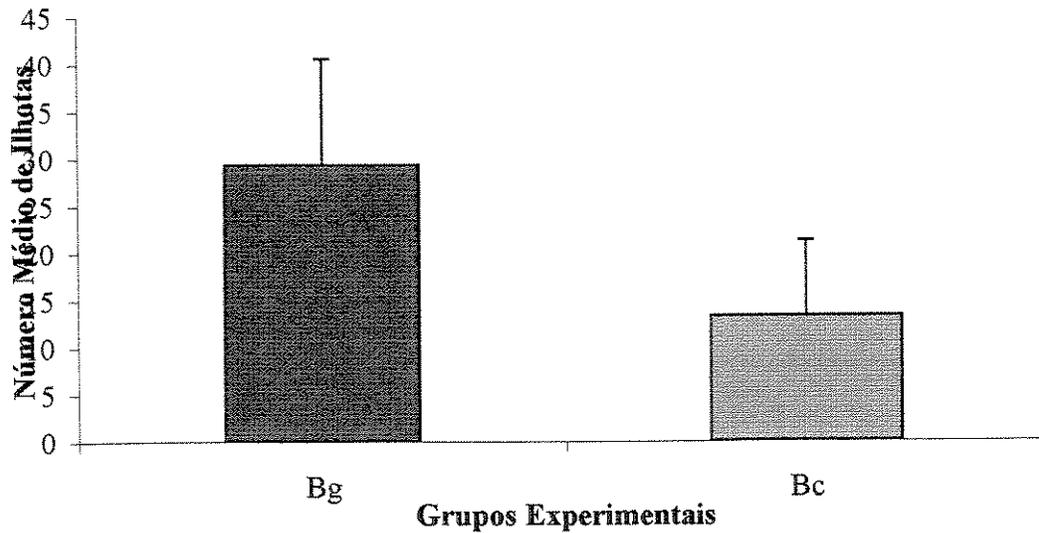


Figura 7. Gráfico representando o número (média/erro padrão) de ilhotas de Langerhans dos animais que receberam gangliosídeos (Bg; n=5) ou solução salina (Bc; n=6), a partir da idade de 4 semanas, e duas doses de ciclofosfamida ao atingirem a 10a e a 12a semana de vida, respectivamente. Note-se que houve que o número de ilhotas computadas no subgrupo controle foi significativamente inferior ao observado no subgrupo tratado com gangliosídeos (* $p < 0,05$).

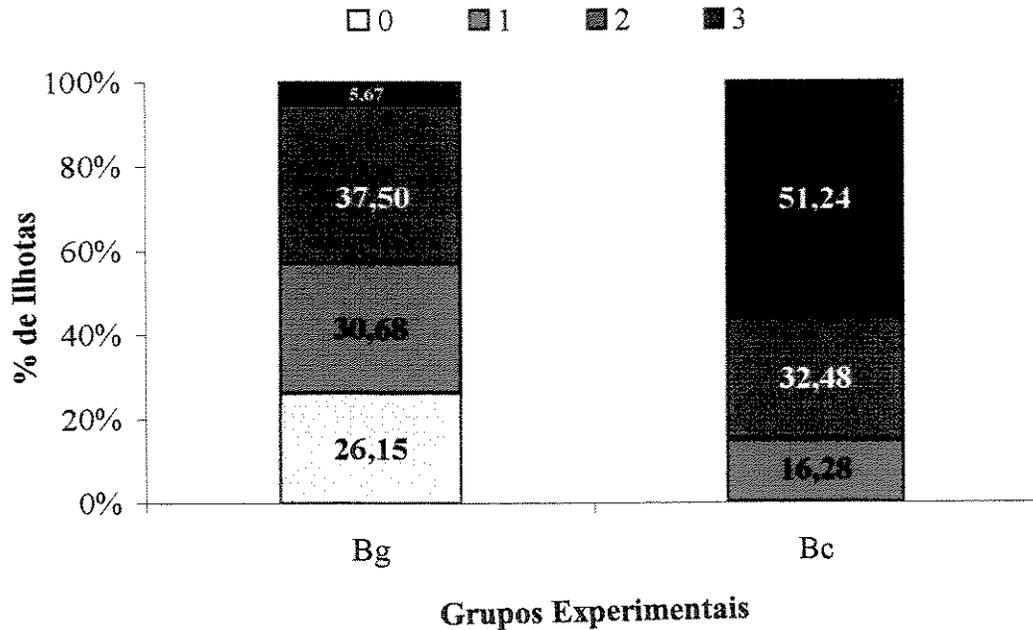


Figura 8 Gráfico representando a classificação das ilhotas de Langerhans, segundo o grau de insulite, encontradas nos animais dos subgrupos que receberam gangliosídeos (Bg; n=5) ou solução salina (Bc; n=6) a partir da idade de 4 semanas, e duas doses de ciclofosfamida ao atingirem a 10a e a 12a semana de vida, respectivamente. Observe-se que nos animais do subgrupo Bg o pâncreas possuía ilhotas com insulite e ilhotas normais, contrastando com o observado nos animais do subgrupo Bc, onde estas últimas estavam ausentes. Note-se ainda que no subgrupo Bc predominaram as ilhotas com escore 3. 0= Ilhotas normais; 1= Peri-insulite; 2= Insulite moderada; 3= Insulite avançada

5. Discussão

As fortes evidências existentes sobre a natureza auto-imune do DM-1 têm estimulado a pesquisa dos possíveis fatores desencadeantes da doença, bem como dos mecanismos que levam à disfunção e destruição das células β produtoras de insulina (BACH, 1994). Dentro desse contexto, tem sido muito importante o emprego dos camundongos da linhagem NOD como modelo experimental para investigar o efeito de diferentes moléculas com comprovadas ações sobre elementos do sistema imune que participam da patogenia do DMID (BACH & MATHIS, 1997).

O diabetes clínico nestes animais, como no homem, é precedido pela fase de pré-diabetes, caracterizada pela infiltração progressiva das ilhotas pancreáticas por células mononucleares (insulite), que tem início, geralmente, no primeiro mês de vida, em ambos os sexos (KIKUTANI & MAKINO, 1992). A insulite é iniciada por linfócitos T CD4+, que são os primeiros a invadirem as ilhotas e são predominantes no infiltrado, seguidos por linfócitos T CD8+ (THIVOLET *et al.*, 1991). Mais recentemente, TISCH & MCDEVIT (1996) verificaram que os linfócitos T auto reativos desempenham um papel crucial no desencadeamento do DM-1, reforçando a hipótese de que incapacidade de eliminar este tipo de células pelo sistema imune pode contribuir para o desenvolvimento das doenças autoimunes (COHEN *et al.*, 1992).

A investigação de terapias para o DM-1 baseadas em intervenções sobre o sistema imunológico têm revelado que estas podem ser uma estratégia promissora para impedir sua instalação e ou evolução. Assim, o estudo de substâncias com propriedades

imunomoduladoras potenciais têm atraído particular interesse dos pesquisadores (SKYLER & MARKS, 1993). Dentre essas substâncias estão os gangliosídeos empregados no presente trabalho. Porém, é importante destacar que apenas dois grupos registraram até o momento procedimentos experimentais similares aos aqui desenvolvidos, reportando resultados aparentemente contraditórios (WILBERTZ *et al.*, 1988; PAPACCIO *et al.*, 1993).

Nossos resultados mostraram que a administração de 150 mg/Kg/dia da mistura de gangliosídeos, composta por GM1(21%), GD1a(40%), GD1b(16%) e GT1b(19%), impediu a manifestação do *diabetes mellitus* espontâneo em 100% (4/4, A1g; 12/12, A2g; 7/7 A3g) das fêmeas da linhagem NOD tratadas durante 13 ou 17 semanas. Este resultado foi observado tanto no grupo dos animais que receberam tratamento até a data do sacrifício (17 ou 21 semanas de vida; grupos A1g e A2g), como no grupo cujo tratamento foi interrompido 8 semanas antes do sacrifício (25 semanas de vida, grupo A3g). Contrastando com estes resultados, nos grupos dos animais controle a incidência do DMID foi de 25% (A1c), 50% (A2c) e 50% (A3c), respectivamente.

Esses dados corroboram os registrados por (WILBERTZ *et al.*, 1988) no primeiro relato feito sobre o desenvolvimento do DM auto-imune espontâneo em camundongos da linhagem NOD tratados com gangliosídeos. Esses autores verificaram que a administração diária de 50 mg/kg de uma mistura de gangliosídeos, similar à empregada neste trabalho, reduziu em aproximadamente 50% a manifestação do DM auto-imune

espontâneo em fêmeas NOD de colônias com alta incidência da doença (80%). Uma comparação desses resultados com os obtidos no presente trabalho revela que a dose aqui empregada se mostrou mais eficaz, já que 100% dos animais dos subgrupos A1g, A2g e A3g não desenvolveram o DM auto-imune espontâneo. Contudo, devemos destacar que o tempo de sobrevivência máximo utilizado por WILBERTZ *et al.* (1988) foi de 35 semanas, o que pode ter contribuído para maior incidência da doença nos animais, não obstante o tratamento. Por outro lado, a ausência de DM auto-imune espontâneo no grupo A3g, com tratamento interrompido 8 semanas antes do sacrifício dos animais, é forte evidência da ação inibidora dos gangliosídeos sobre a evolução e manifestação clínica da doença.

Quanto à dose empregada, embora não tenhamos feito testes clínicos para avaliação de seus possíveis efeitos colaterais, verificamos que a administração diária de 150 mg/kg, desde a 4ª semana de vida, não influenciou o crescimento corporal dos animais durante os tempos experimentais previstos (17, 21 e 25 semanas). Além disso, PAPACCIO *et al.*, 1993 empregaram a mesma dosagem em camundongos NOD, por um período de 17 semanas, e não relataram a ocorrência de efeitos tóxicos nos animais.

PAPACCIO *et al.* (1993), também verificaram que a administração de gangliosídeos em camundongos NOD fêmeas, a partir da 5ª à 21ª semana de vida, reduziu o aumento gradual da glicemia, retardando assim a instalação do diabetes clínico. Por outro lado, esses autores relataram não terem encontrado diferença significativa entre os animais tratados e os animais controle quanto ao aparecimento e progressão da insulite,

embora afirmem que o tratamento com gangliosídeos retardou a progressiva desorganização da citoarquitetura das ilhotas.

Embora o critério utilizado por PAPACCIO *et al.* (1993) para o diagnóstico do diabetes tenha sido diferente daquele por nós empregado, podemos considerar que os nossos resultados complementam os obtidos por esses autores quanto a incidência da doença. PAPACCIO *et al.* (1993) basearam-se na avaliação semanal da glicemia, durante 7 ou 17 semanas, para definir o estado diabético dos animais. Em nossos protocolos experimentais o DM foi diagnosticado através da manifestação de glicosúria, confirmado pela subsequente avaliação da glicemia dos animais. Assim, todos os camundongos tratados com gangliosídeos atingiram 17, 21 ou 25 semanas de vida sem apresentarem glicosúria e com valores de glicemia abaixo de 17.0 mM. Ainda, conforme já considerado acima, a ausência de DM auto-imune espontâneo no grupo de animais cujo tratamento foi interrompido 8 semanas antes do sacrifício sugere a eficiência da ação terapêutica dos gangliosídeos sobre a instalação e evolução do DM. Este último protocolo experimental pode ser considerado uma extensão do trabalho realizado por PAPACCIO *et al.* (1993), comprovando a eficácia terapêutica dos gangliosídeos.

Além disso, corroborando nossos resultados clínicos, a avaliação morfológica do pâncreas nos animais tratados com gangliosídeos apresentaram menor incidência de insulite. Desta forma, nos animais tratados o percentual de ilhotas normais (A1g=46.7%; A3g=33.3%) foi superior ao dos animais controle (A1c=15.1%; A3c=16.6%). Por outro

lado, os percentuais de ilhotas com insulite moderada e insulite avançada, respectivamente, foi maior nos grupos controle. Estes resultados contrastam com o relatado por PAPACCIO *et al.* (1993) quanto a não ter encontrado diferença na incidência de insulite entre os animais tratados e controle, embora, curiosamente afirmem que os gangliosídeos retardaram a progressiva desorganização da citoarquitetura das ilhotas.

Em nosso trabalho, verificamos que o tratamento com gangliosídeos teve efeito importante sobre a aceleração do DM-CI. No protocolo empregado, 60% dos animais que receberam gangliosídeos não manifestaram a doença, ao passo que no grupo controle 100% dos animais ficaram diabéticos (tabela 1). Observamos também que o número de ilhotas de Langerhans por animal no subgrupo Bg foi superior ao do subgrupo Bc (Figura 7). Além disso, a análise histológica revelou que nos animais tratados com gangliosídeos o pâncreas apresentou ilhotas com insulite e ilhotas normais, contrastando com o observado nos animais controle (Bc), onde estas últimas estavam ausentes.

WILBERTZ *et al.* (1988) testaram o efeito da administração de gangliosídeos sobre a incidência do DM-CI em camundongos NOD machos e não observaram redução da incidência da doença. Porém, o modelo empregado por estes autores diferiu em pontos importantes do utilizado em nosso trabalho. Primeiramente, WILBERTZ *et al.* (1988) trataram os animais com gangliosídeos apenas durante 20 dias após a administração da ciclofosfamida (dose única de 200 mg/kg), contrastando com o nosso protocolo, onde os animais (fêmeas) começaram a ser tratados a partir da 4^a semana de vida. Além disso, os

animais receberam a dose de ciclofosfamida e começaram a ser tratados quando já tinham 15 semanas de vida. Isto é importante pois, embora fossem animais machos e, portanto, menos propensos ao diabetes, nessa idade a insulite poderia ter evoluído ao ponto de levar os animais mais próximos do limiar para a indução da doença. Finalmente, a dose diária empregada por WILBERTZ *et al.* (1988) foi de 100mg/kg, ao passo que no presente trabalho os animais receberam 150mg/kg/dia.

O modelo de DM-CI em camundongos NOD por nós empregado foi reproduzido de acordo com o original descrito por HARADA & MAKINO (1984). Tal modelo já havia sido anteriormente testado em nosso laboratório com colônia instalada no CEMIB/Unicamp e mostrou-se eficiente (VOLPINI *et al.*, 1995). Isto nos levou a considerá-lo bom modelo para testar a eficácia de drogas supostamente imunomoduladoras, como os gangliosídeos.

Assim, primeiramente, nossos resultados mostraram que a ciclofosfamida, administrada em duas doses, dentro do intervalo de duas semanas, reduziu o período pré-diabético nos camundongo NOD fêmeas por acelerar a progressão da insulite e, conseqüentemente a destruição das células β . Além disso, evidenciaram que a administração da mistura de gangliosídeos a partir da 4^a semana foi capaz de antagonizar a ação da ciclofosfamida retardando a progressão da insulite e, desta forma, reduzindo a incidência do DM auto-imune nos animais.

Por outro lado, embora os resultados obtidos neste trabalho favoreçam a existência

do efeito imunomodulador dos gangliosídeos que impede o desenvolvimento do DM auto-imune espontâneo nos camundongos NOD, os mecanismos envolvidos neste processo ainda são pouco conhecidos e permitindo levantamento de hipóteses interessantes.

No final da década de 70, diversos autores obtiveram as primeiras evidências de que gangliosídeos pudessem exercer efeito inibitório sobre a proliferação de linfócitos T (LENGLE *et al.*, 1979; WHISLER & YATES, 1980). Posteriormente, OFFNER *et al.* (1985,1987) observaram que gangliosídeos podem modular rápida e seletivamente a molécula de CD4 presente na superfície celular de linfócitos T, *in vitro*.

Durante a última década tem sido sugerido que os gangliosídeos podem ligar-se às células por interação de sua cadeia glicídica com proteínas de membrana, ou através da incorporação de sua porção hidrofóbica à bicamada lipídica da membrana plasmática. Podem, então, bloquear sítios de ligação específicos e também fornecer sítios de ligação adicionais passando a atuar como receptores ou co-receptores celulares (BERGELSON, 1995).

Particularmente, tem sido proposto que gangliosídeos podem inserir-se na membrana e ligar-se às moléculas associadas ao CD4⁺, levando ao seu mascaramento e/ou endocitose. O mecanismo pelo qual estes processos ocorrem não está estabelecido, entretanto acredita-se que seja em virtude da dissociação da proteinaquinase p56^{lck}, localizada na porção citoplasmática da molécula de CD4, presente na membrana celular

do linfócito T CD4⁺ (BERGELSON, 1995; GAROFALO *et al.*, 1998). Tem sido sugerido que os gangliosídeos suprimem a produção e ativação de linfócitos citotóxicos(CTLs), assim como a ativação e crescimento de linfócitos T helper (Th) e a citotoxicidade de células NK (BERGELSON, 1995).

Por outro lado, tem sido verificado que os gangliosídeos são capazes de inibir muitos passos da resposta imune celular *in vitro*, tais como o processamento de antígenos, sua apresentação, proliferação e função citotóxica (LADISCH *et al.*, 1994)

Considerando nossos resultados, podemos supor que o tempo de tratamento e a elevada dose de gangliosídeos empregada foram fatores importantes na manutenção da sua elevada disponibilidade plasmática. Este fato pode ter facilitado sua forte interação com linfócitos T CD4⁺, através dos mecanismos propostos acima, inibindo a proliferação e/ou função dessas células e, conseqüentemente, sua participação no desenvolvimento do DM auto-imune nos camundongos NOD.

Esta hipótese decorre do fato de que a inibição da resposta imune induzida por gangliosídeos tem efeito máximo quando sua ação é exercida durante a fase inicial da ativação dos linfócitos (DYATLOVITSKAYA & BERGELSON, 1987).

Segundo IRANI *et al.* (1996), a ação dos gangliosídeos parece estar direcionada para os linfócitos Th1, nos quais a produção de citocinas seria inibida, assim como sua proliferação, pelo bloqueio da fosforilação da Rb, proteína que uma vez fosforilada libera outras proteínas regulatórias permitindo a transição da fase G-1 para fase S em linfócitos.

O bloqueio da fosforilação da proteína Rb faz com que as proteínas regulatórias permaneçam seqüestradas atrasando ,desta forma ,o ciclo celular.

Assim, os resultados por nós observados nos animais dos subgrupos A1g, A2g e A3g, poderiam ser explicados pela ação direta dos gangliosídeos sobre linfócitos Th1, inibindo assim sua ação diabetogênica. Além disso, recentemente ABLAMUNITIS *et al.* (1999) obteve evidências que a aceleração do DM auto-imune espontâneo na linhagem NOD pela ciclofosfamida se deve ao fato das células Th1, produtoras de IFN- γ serem resistentes à ação depletora dessa droga. Assim, o efeito protetor dos gangliosídeos observado nos animais do subgrupo Bg podem representar forte evidência da ação desses compostos sobre células Th1, onde altos níveis de IFN- γ têm sido implicados com a incidência do DM auto-imune na linhagem NOD (DEBRAY-SACHS *et al.*, 1991; SHEHADEH *et al.*, 1993; ABLAMUNITIS *et al.*, 1999). Outro mecanismo que poderíamos aventar para explicar o efeito protetor dos gangliosídeos sobre o desenvolvimento do DM auto-imune em nosso experimento, seria a interferência dos gangliosídeos no sistema da IL-2 e seu receptor o IL-2r. Este mecanismo envolveria uma competição dos gangliosídeos deste último pela ligação com a citocina disponível e fundamental para a resposta proliferativa dos linfócitos (LU & SHAROM, 1995).

Nos últimos anos tem-se obtido fortes evidências de que a morte das células β nos camundongos NOD seja por apoptose (GREEN *et al.* 1999). De fato, diversos experimentos com esses animais têm sugerido o papel dos efeitos citotóxicos dos

linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ na efetiva indução da apoptose das células β . Dentre os mediadores da destruição das células β por esse processo incluem-se os conteúdos granulares das linfócitos T CD8⁺ (perforina e granzimas), moléculas de superfície (Fas, Fas-L), TNF α e outros membros da família, além das citocinas liberadas pelas células envolvidas no processo inflamatório da ilhota pancreática. Todos estes mediadores são conhecidos por induzirem a fragmentação do DNA e mudanças morfológicas características da apoptose através de sinalização de receptores que envolvem a ativação de proteases ou morfológicos por nós obtidos neste trabalho, relativos ao menor grau de caspases (RABINOVITCH *et al.*, 1994, KIM *et al.* 1999). Desta forma, os resultados morfológicos obtidos no presente trabalho relativos ao menor grau de comprometimento das ilhotas pancreáticas nos animais tratados com gangliosídeos, poderiam ser atribuídos a sua ação indireta sobre os mecanismos apoptóticos desencadeados pelos produtos dos linfócitos sobre os quais atuam.

Finalmente, devemos considerar a hipótese do envolvimento dos gangliosídeos no desenvolvimento do diabetes auto-imune. Esta hipótese recebeu subsídio importante através de evidências da natureza do antígeno alvo dos anticorpos anti-ilhota (ICA), ser um sialoglicoconjugado (NAKAY *et al.*, 1985). Posteriormente, COLMAN *et al.* (1988) verificaram que uma fração de monosialogangliosídeo extraído de pâncreas humano inibiu a ligação dos ICA em cortes congelados de pâncreas e processados imunistoquimicamente. Estudando a ligação dos ICA em cortes congelados de pâncreas

de camundongo NOD e camundongo C57BL/10 não diabéticos, DOTTA *et al.* (1990) observaram forte imunomarcção em ilhotas de camundongos NOD. Continuando seus experimentos, realizaram estudo comparativo da expressão de gangliosídeos em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD e camundongos C57BL/10 e demonstraram quantidade significativamente maior de gangliosídeos GM2-1 nas ilhotas dos camundongos NOD. Além disso, foi observada acentuada redução da quantidade dos gangliosídeos GM2-1 e GM3 com o avanço da idade e com o início do diabetes nestes animais (DOTTA *et al.*, 1992).

Considerando-se, segundo esses trabalhos, que o monosialogangliosídeo GM2-1 seja o antígeno alvo dos ICA (MISASI *et al.*, 1997), e que a fase pré-diabética é caracterizada pela presença desses anticorpos, nos parece plausível supor que a alta dose de gangliosídeos exógenos, administrada a partir da 4ª semana de vida, pudesse atuar como “seqüestradores” desses anticorpos, contribuindo assim para a proteção da células β .

Enfim a hipótese da ação imunomoduladora dos gangliosídeos, relacionada provavelmente com a inibição da proliferação de linfócitos e de intervenção nos processos de sinalização celulares levando à destruição das células β , preconizada por diversos autores, foi reforçada neste trabalho. Além disso, consideramos que nossos resultados instigam fortemente a necessidade de estudos de natureza molecular e imunoquímica para elucidar o(s) mecanismo(s) subjacente(s) à ação dos gangliosídeos.

6. Conclusões

A partir dos dados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

1. A administração de gangliosídeos na dose de 150 mg/kg/dia, a partir da 4ª semana de vida, protege os animais do aparecimento do DM auto-imune espontâneo.
2. A persistência do efeito protetor dos gangliosídeos sobre incidência do DM auto-imune espontâneo, mesmo 8 semanas após a suspensão do tratamento sugere a existência de uma ação efetiva sobre os elementos imunológicos envolvidos nessa patologia.
3. A proteção exercida pelos gangliosídeos é mantida nos animais onde o DM auto-imune espontâneo foi acelerada pela administração de duas doses de CI (200 mg/kg) na 10ª e 12ª semanas de vida (subgrupo Bg).
4. Os animais que receberam duas doses de CI (200mg/kg) apresentaram perfis morfológicos de insulite similares ao grupo controle, ou seja, ocorrência espontânea da doença, demonstrando sua validade enquanto modelo experimental do DM auto-imune espontâneo.
5. A pequena porcentagem de ilhotas de Langerhans com insulite moderada e avançada, reforçam a hipótese da ação imunomoduladora dos gangliosídeos sobre os elementos celulares presentes nas ilhotas de animais com DM auto-imune espontâneo.
6. Vários efeitos biológicos dos gangliosídeos já demonstrados, aliados aos nossos resultados, permitem inferir o possível envolvimento dos gangliosídeos como mensageiros nas etapas de sinalização celular.

7. Referências Bibliográficas

- ABLAMUNTS, V., QUINTANA, F., RESHEF, T., ELIAS, D., COHEN, I.R. 1999. Acceleration of autoimmune diabetes by cyclophosphamide is associated with an enhanced IFN γ secretion pathway. *J. Autoimmun.* 13:383-392.
- ABLAMUNTS, V., ELIAS, D., RESHEF, T., COHEN, I.R. 1988. Islet T cell secreting IFN γ in Nod mouse diabetes: arrest by p277 peptide treatment. *J. Autoimmun.* 11:73-81.
- 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
- BAEKESKOV, S., AANSTOOT, H.J., CHRISTGAU, S. 1990. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347:1551-1566.

- BERGELSON, L.D. 1995 Serum gangliosides as endogenous immunomodulators. *Imunol. Today* 16,483-486.
- BERGEROT, I., ARREAZA, G., CAMERON, M., CHOU, H., DEVOLITCH, T.L. 1997. Role of T-cell energy and suppression in susceptibility to IDDM. 70th Forum in Immunology. *Res. Immunol.* 148:349-358.
- 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.
- BRETZEL, R.G., FLESCHE, B.K., WILLIG, J., WOEHRLE, M., FEDERLIN, K., 1990. Effects of ganglioside (Cronassial) treatment on MHC Ia antigen expression and allograft survival of pancreatic islets in diabetic rats. *Diabetologia* 33:112-4.
- CASTAÑO, L. AND EISENBARTH, G.S. 1990. Type I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse and rat. *Ann. Rev. Immunol.* 8:647-679.
- CHARLTON, B., BACELJ, A., SLATTERY, R.M., MANDEL, T.E. 1989. Cyclophosphamide-induced diabetes in NOD/Wehi mice: evidence for suppression in spontaneous autoimmune diabetes mellitus. *Diabetes* 38: 441-447.

- COHEN, I.R. 1992. The cognitive paradigm and the immunological homunculus. *Immunol. Today*. 13: 490-494.
- 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
- COLMAN, P.G., NAYAK, R.C., CAMPBELL, I.L., EISENBARTH, G.S. 1988. Binding of cytoplasmatic islet cell antibodies is blocked by human pancreatic glycolipid extracts. *Diabetes* 37:645-652.
- DEBRAY-SACHS, M., CARNAUD, C., BOITARD, C., COHEN, H., GRESSER, L., BEDOSSA.P., BACH, J.F. 1991. Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN γ . *J. Autoimm* 4:237-248.
- DIABETES CARE, 2000 Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus.VOL 23 SUP.1
- DOTTA, F., COLMAN, P.G., LOMBARDI, D., SCHARP, D.W., ANFREANI, D., PONTIERI, G.M., DI MARIO, U., LENTI, L., EISENBARTH, G.S., NAYAK, R.C. 1989. Ganglioside expression in human pancreatic islets. *Diabetes* 38:1478-1483.
- DOTTA, F., APPEL, M.C., EDE, G., NAYAK, R.C., BONNER-WEIR, S., EISENBARTH, G.S. 1990. Expression by NOD mice of antibodies reacting with the "polar antigen" of RIN tumor cells. *J Autoimmun* 1, 3:59 (Abstract)

- DOTTA, F., PETERSON, L.B., PREVITI, M., METZGER, J., TIBERTI, C., ANASTASI, E., ZOPPITELLI, P., WICKER, L.S., DI MARIO, U. 1992. Pancreatic islet ganglioside expression in non obese diabetic mice: comparison with C57BL/10 mice and changes after autoimmune beta-cell destruction. *Endocrinology*, 130:37-42.
- DOTTA, F., FALORNI, A., TIBERTI, C., DIONISI, S., ANASTASI, E., TORRESI, P., LERNMARK, A., DI MARIO, U. 1997. Autoantibodies to the GM2-1 islet ganglioside and to GAD-65 at type 1 diabetes onset. *Journal of Autoimmunity* 10:568-588.
- DOTTA, F., PREVITI, M., NEERMAN-ARBEZ, M., DIONISI, S., CUCINOTTA, D., LENTI, L., DI MARIO, U., HALBAN, P.A. 1998. The GM2-1 ganglioside islet autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus is expressed in secretory granules and is not β cell specific. *Endocrinology* 139: 316-319.
- DURINOVICH-BELLÒ, I., HUMMEL, M., ZIEGLER, A.G. 1996. Cellular immune response to diverse islet cells antigens in IDDM. *Diabetes* 45:795-800.
- DYATLOVISTKAYA, E.V., BELGENSON, L.D. 1987. Glycosphingolipids and antitumor immunity: *Biochim. Biophys. Acta*, 907:125-143.
- 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 harmony of the spheres: induce nitric oxide synthase and related genes in pancreatic β cells. *Diabetologia* 39:875.
- ELLIOT, R.B., CROSSLEY, J.R., BERRYMAN, C.C., JAMES, A.G. 1981. Partial preservation of pancreatic beta-cell function in children with diabetes. *Lancet* 2: 631-632.
- FEUTREN, G., PAPOZ, L., ASSAN, R., VIASLLETES, B., KARSENTY, G., VEXIAU, P., DUROSTU, H., RODIER, M., SIRMAI, J., LALLEMAND, A., BACH, J.F. 1986. Cyclosporin increases the rate and length of remissions in insulin dependent diabetes of recent onset: results of a multicentre double-blind trial. *Lancet* 2:119-124.
- GAROFALO, T., SORICE, M., MISARI, R., CINQUE, B., GIAMMATTEO, M., PONTIERI, G.M., CIFONE, M.G., PAVAN, A. 1998. A novel mechanism of CD4 down-modulation induced by monosialoganglioside GM3. *J. Biol. Chem.* 273, 33153-33160.
- GREEN, E.A., FLAVEL, R.A. 1999. The initiation of autoimmune diabetes. *Current opinion in immunology*. 11: 663-669.
- HARADA, H. and MAKINO, S. 1984. Promotion of spontaneous diabetes in non-obese diabetes-prone mice by cyclophosphamide. *Diabetologia* 27:604-6.
- HARRISON, L.C., CHU, S.X., DE AIZPURUA, 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.

- HIDEKI, Y., MITSUNOBU, M., KIKUNO, K., JUNKO, K., SUSSUMO, M., MINORU, H. 1992. Analysis of the role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in autoimmune diabetes of NOD using transfer to NOD athymic nude mice. *Eur. J. Immunol.* 22:2387-2393.
- 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.
- IRANI, D.N., LIN, K., GRIFFIN, D.E. 1996. Brain-derived gangliosides regulate the cytokine production and proliferation of activated T cells. *J. Immunol.* 157:4333-4340.
- 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.
- 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.

- 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. AND MAKINO, S. 1992. - The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv. Immunol.*, 51:285-322.
- KIM., YU-HEE., KIM S., KIM, K.A., YAGITA, H., KAYAGAKI, N., KIM, W.W., LEE, M.S. 1999. Apoptosis of pancreatic β -cells detected in accelerated diabetes of NOD mice: a role of Fas-Fas ligand interaction in autoimmune diabetes: *Eur. J. Immunol* 29:455-465.
- LADISCH, S., ULSH, L., GILLARD, B., WONG, C. 1984. Modulation of the immune response by gangliosides - inhibition of adherent monocyte accessory function in vitro. *J. Clin. Invest.* 74:2074-2081.
- LADISCH, S., LI, R., OLSON, E., 1994 Ceramide structure tumor ganglioside immunosuppressive activity. *Proc. Acad. Sci. USA* 91:1974-1978.
- LAFFERTY, K.J. 1997. Immunobiology of autoimmune diabetes. *Res. Immunol.* 148:285-366.
- LEDEEN, R., YU, W.R. 1982. Gangliosides: structure, isolation and analysis methods in enzymology. *83:139-191.*
- LENGLE, E. E., KRISHNARAJ, R. KEMP, R.G. 1979. Inhibition of the lectin-induced mitogenic response of thymocytes by glycolipids. *Cancer Res.* 39:817.
- LU, P., SHAROM, F.J. 1995. Gangliosides are potent immunosuppressors of IL-2-mediated T-cell proliferation in a low protein environment. *Immunology*, 86:356-363.

- 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.
- MAHONEY, J.A. and SCHNAAR, R.L. 1997. Multivalent ganglioside and sphingosine conjugates modulate myelin protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1328, 30-40.
- MARSHALL, M.O., HOYER, P.E., PETERSEN, J.S., HEJNAES, K.R., GENOVESE, S., DYRBERG, T., BOTTAZZO, G.F. 1994. Contribution of glutamate decarboxylase antibodies to the reactivity of islet cell cytoplasmic antibodies. *J Autoimmun.* 7:497-508.
- MERRIT, W.D., BAILEY, J.M., PLUZNIK, D.H. 1984. Inhibition of interleukin-2-dependent cytotoxic T-lymphocyte growth by gangliosides. *Cell Immunol.* 89:1-7.
- MISASI, R., DIONISI, D., FARILLA, L., CARABBA, B., LENTI, L., DI MARIO, U., DOTTA, F. 1997. Gangliosides and autoimmune diabetes. *Diabetes Metab Rev.* 13: 163-179.
- NAGAI, Y. 1995. Functional roles of gangliosides in bio-signaling. *Behav. Brain Res.* 66:99-104.
- NAKAJIMA, H., FUJINO-KURIHARA, H., HANAFUSA, T., YAMADA, K., MIYAZAKI, A., MIYAGAWA, A., NONAKA, K., TARUI, S., TOCHINO, Y. 1985. Nicotinamide prevents the development of cyclophosphamide-induced diabetes mellitus in male non-obese diabetic (NOD) mice. *Biomed. Res.* 6:185-9.
- 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.

- NAYAK, R.C., OMAR, M.A.K., RABIZADEH, A., SRIKANTA, S. EISENBARTH, G.S. 1985. Citoplasmatic islet cell antibodies: evidence that the target antigen is a sialoglycoconjugate. *Diabetes* 34:617-619.
- NEPOM, G.T & ERLICH, H.1991. MHC class-II molecules and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 493-526.
- OFFNER, H., KONAT, G., SELA, B.A. 1981. Multi-sialo brain galngliosides are powerfull stimulators of active E roseting lymphocytes from multiple sclerosis patients. *J. Neurol. Sci.* 52:279-288.
- OFFNER, H., THIEME, T.,VANDERBARK, A.A. 1987. Ganglioside induce selective modulation of CD4 from helper T limphocytes. *J. Immunol.*139:3295-3305.
- OGAWA, M., MARUYAMA, T., HASEGAWA, T., KANAYA, T., KOBAYASHI, F., TOCHINO, Y., UDA, H. 1985. The inhibitory effect of neonatal thymeoctomy on the indice of insulitis in non-obese diabetic (NOD) mice . *Biomed. Res.* 6:103-105.
- 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 trangene expression. *Eur. J. Immunol.* 21: 1171-1180.
- 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.

PALMER, J.P. 1994. What is the best way to predict IDDM? *LANCET*, 343:1377-1378.

PAPACCIO, G., CHIEFFI, A., BACCARI, G., MEZZOGIORNO, V. 1993. *In vivo* effect of gangliosides on non-obese diabetic mice. *Acta Anat.* 147:168-173.

PAVIN, E.J. AND 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.

QIN, H.Y., SADELAIN, M.W.J., HITCHON, C., LAUZON, J., M SINGH, B. 1993. Complete Freund'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.

- RAMSDELL, F., SEAMAN, M.S., MILLER, R.E., PICHA, K.S., KENNEDY, M.K., LYNCH, D.H. 1994. Differential ability of Th1 and Th2 cell to express Fas-ligand and to undergo activation-induced cell death. *Int Immunol.* 6:1545-1553.
- ROEP, B.O., KALLAN, A.A., HAZENBOS, W.L.W., BRUINING, G.L., BAILYES, E.M., ARDEN, S.D., HUTTON, J.C., de VRIES, R.R.P. 1991. T-cell reactivity to 38 KD insulin-secretory-granule protein in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Lancet* 337:1439-1441.
- ROEP, B.O., ATKINSON, M.A., van ENDERT, P.M., GOTTLIEB, P.A., WILSON, S.B., SACHS, J.A. 1999. Autoreactive T cell responses in insulin-dependent (type 1) diabetes mellitus. *J. Autoimmun.* 13:267-282.
- ROSSINI, A.A., GREINER, D.L., FRIEDMAN, H.P., MORDES J.P. 1993. Immunopathogenesis of diabetes mellitus *Diabetes Rev.* 1: 46-75
- ROSSINI, A.A., HANDLER, E.S., MORDES, J.P., GREINER, D.L. 1995. Human autoimmune diabetes mellitus: lessons from BB rats and NOD mice-caveat emptor. *Clin. Immunolopathol.* 74:2-9.
- SCHREIBER, S.L. AND CRABTREE, G.R. 1995. Immunophilins, ligands, and the control of signal transduction. *Harvey Lect.* 91:99-114. Review.
- 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.
- SHEHADEH, N.N., LA ROSA, F., LAFFERTY, K.L. 1993. Altered cytokine activity in adjuvant inhibition of autoimmune diabetes. *J. Autoimmun.* 6:291.
- 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.
- SILVERTEIN, J., MACLAREN, N., RILEY, W., SPILLAR, R., RADENOVIC, D., JOHNSON, S. 1988. Immunosuppression with azothioprine and prednisone in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. *N.Engl.J.Med.*319:599-604.
- SKYLER, J.S. & MARKS, J.B. 1993. Immune intervention in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Rev.* 1:15-42.
- SOLIMENA, M. 1998. Vesicular autoantigens of type 1 diabetes. *Diabetes Metab.* 14:227-240.
- SUAREZ-PINZON, W.L., STRYNADKA, K., SCHULZ, R., RABINOVITCH, A. 1994. Mechanisms of cytokine-induced destruction of rat insulinoma cells: the role of nitric oxide. *Endocrinol.* 134:1006-1010.
- TETTAMANTI, G. AND RIBONI, L. 1994. Gangliosides turnover and neural cell function: a new perspective. *Progr. in Brain Reserch.* 101:77-100.
- TETTAMANTI, G. 1988. Towards to understandig of the physiological role of gangliosides. *In:*

LEDEEN, R.W., HOGAN, E.L., TETTAMANTI, G., YATES, A.J., YU, R.K. (eds), New Trends in Ganglioside Research: Neurochemical and Neuroregenerative Aspects, Fidia Research Series, Vol 14, Liviana Press, Springer/Verlag, Padova/Berlin, pp. 625-46.

THIVOLET, c., BENDELA, A., BEDOSSA, P., BACH, J.F., CARNAUD, C. 1991. CD8+T cell homing to the pancreas in the nonobese diabetic mouse is cd4=t cell dependent. *J.Immunol.* 146:85-88.

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. *The J. Of Immunol.* 163: 1562-1569.

THOMPSON, E.B. 1998. Special topic: apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60:525-532.

TISCH, R., Mc DEVITT, D. 1996. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell*, 85:291-297.

TURK, J.L & PARKER, D. 1982. Effect of cyclophosphamide on immunological control mechanism. *Immunol Rev* 65:99-113.

VOLPINI, W., PAVIN, E.J., VILLELA, C., ZOLLNER, R.L. 1995. Modelo de Diabetes auto-imune acelerado pela ciclofosfamida: resposta da colônia NOD brasileira. Resumos da X Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FESBE 14.34 (abstract).

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

- WAHASHI, 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.
- WIEGANDT, H. The gangliosides. *In:* Wiegandt H (ed) 1985. *Glycolipids. New Comprehens. Biochem Vol 10.* Elsevier, Amsterdam, pp 199-260,
- WILBERZ, S., HERBERG, L., RENOLD, A.E. 1988. Gangliosides in vivo reduce diabetes incidence in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 31: 855-857.
- WHISLER, R.L., YATES, A.L. 1980 Regulation of lymphocyte responses by human gangliosides: characteristics of inhibitory effects and the induction of impaired activation. *J. Immunol* 125:2106
- WONG, F.S. AND 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.
- YALE, J.F. & MARLISS, E.B. 1982 Altered immunity and diabetes in the BB rat. *Endocrinology* 110:1825-1827.