UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Impacto da deficiência do gene da galectina-1 no diabetes *mellitus*
experimental induzido por estreptozotocina**

Tálita Pollyanna Moreira dos Santos

RIBEIRÃO PRETO - SP

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Impacto da deficiência do gene da galectina-1 no diabetes *mellitus*
experimental induzido por estreptozotocina

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia
da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e
Fisiopatologia

Orientado(a): Tálita Pollyanna Moreira dos
Santos

Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Ribeirão Preto – SP

2020

RESUMO

SANTOS, TÁLITA POLLYANNA M. dos. **Impacto da deficiência do gene da galectina-1 no diabetes *mellitus* experimental induzido por estreptozotocina.** 2020. 75 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A galectina-1 (Gal-1) é uma proteína que se liga à glicanas que possuem resíduos de β -galactosídeos e apresenta propriedades imunorreguladoras. Este estudo investigou a influência da Gal-1 endógena na doença autoimune diabetes mellitus tipo 1 induzida experimentalmente por estreptozotocina (STZ). Camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e deficientes para o gene da galectina-1 (Gal-1 KO) foram tratados com STZ e monitorados quanto aos níveis sanguíneos de glicose. A análise histopatológica dos tecidos pancreáticos destes animais foi feita pela quantificação de células mononucleares infiltradas no interior das ilhotas de Langherans. Além disso, foi desenvolvido e validado o método analítico para determinação de alfa STZ no plasma dos camundongos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrômetro de massas (CLAE-EM). Tal método apresentou faixa de linearidade de 0,312 a 160 $\mu\text{g/mL}$ e ausência de efeito matriz. Os controles de qualidade nos ensaios de precisão e exatidão apresentaram coeficiente de variação e erro padrão relativo com valores inferiores à 15 %. Com relação à indução do diabetes, o tratamento de animais WT com STZ provocou consistente aumento da glicemia ($382,88 \text{ mg/dL} \pm 72,31$) bem como do infiltrado mononuclear nas ilhotas pancreáticas (169 ± 48 células mononucleares/ilhota) em relação aos animais do grupo controle. Por outro lado, os níveis glicêmicos de camundongos Gal-1 KO tratados com STZ apresentaram menor proeminência, em relação aos animais WT, com valores médio $252,66 \text{ mg/dL} \pm 26,17$. Padrão similar de atenuação também foi observado nas análises do infiltrado mononuclear nas ilhotas pancreáticas ($94,7 \pm 32,5$ células mononucleares/ ilhota). Sendo assim, conclui-se que a ausência da Gal-1 endógena torna os camundongos resistentes à indução do diabetes mellitus tipo 1 por STZ, de modo independente à biodisponibilidade deste fármaco.

Palavras-chave: Galectina-1; estreptozotocina; cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa; diabetes mellitus tipo 1.

ABSTRACT

SANTOS, T. P. M. dos. **Impact of galectin-1 gene deficiency on experimental diabetes mellitus induced by streptozotocin.** 2020. 75 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Galectin-1 (Gal-1) is a protein that binds to glycans with β -galactoside residues and exhibits immunoregulatory properties. This study investigated the influence of endogenous Gal-1 on the experimental induction of type 1 diabetes mellitus, an autoimmune disease, by streptozotocin (STZ). C57BL/6 wild type (WT) and deficient mice for the galectin-1 gene (Gal-1 KO) were treated with STZ and monitored by determination of glycemia. The histopathological analysis of the pancreatic tissues of these animals was performed by quantifying the mononuclear cells infiltrated inside the islets of Langerhans. Furthermore, an analytical method for the determination of alpha-STZ in mice plasma was developed and validated using high-performance liquid chromatography with detection by mass spectrometer (HPLC-MS). The method presented linearity range of 0.312 to 160 $\mu\text{g/mL}$ and also presented acceptable selectivity, accuracy and precision, as well as negligible matrix effect. WT mice treated with STZ showed a robust hyperglycemia ($382.88 \text{ mg/dL} \pm 72.31$), while this drug caused a discrete change in glycemic levels in Gal-1 KO mice ($252.66 \text{ mg/dL} \pm 26.17$). The number of mononuclear cells infiltrated in the islets of STZ-treated WT mice (169 ± 48 mononuclear cells/islet) was higher than the numbers of vehicle-treated WT mice (82 ± 22 mononuclear cells/islet) or Gal-1 KO treated mice with STZ (94.7 ± 32.5 mononuclear cells / islet). Finally, it is suggested that the absence of endogenous Gal-1 makes the Gal-1 KO mice resistant to the induction of type 1 diabetes mellitus by STZ, independently of the bioavailability of this drug.

Keywords: Galectin-1; streptozotocin; liquid chromatography; mass spectrometry; type 1 diabetes mellitus.

1. INTRODUÇÃO

O presente estudo investiga a patofisiologia do Diabetes *mellitus* tipo 1 experimental no âmbito da ausência genética da galectina-1. Neste contexto, estruturou-se o desenvolvimento da introdução abordando-se os seguintes tópicos: I) Diabetes *mellitus* – definição, classificação e epidemiologia; II) modelo experimental do diabetes *mellitus* tipo 1 e; III) galectina-1.

1.1. Diabetes *mellitus* – definição e epidemiologia

O termo *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) refere-se a uma desordem metabólica de etiologia autoimune caracterizada por hiperglicemia crônica e intolerância à glicose ocasionadas pela morte celular - mediada imunologicamente - das células β -pancreáticas produtoras de insulina que compõem as ilhotas de Langerhans (SICREE; SHAW; ZIMMET, 2006). Sendo assim, indivíduos com DM1 dependem de tratamento com insulina exógena para manutenção da vida.

Com relação às investigações sobre o DM1, estudos randomizados proporcionam robustez às evidências da destruição das células beta das ilhotas de Langerhans mediada por processo autoimune crônico como evento determinante da patogênese do DM1. No entanto, o evento desencadeador desse distúrbio imunológico permanece incompreendido (GEPTS, 1965; EISENBARTH, 1986; SEARCH GROUP *et al.*, 2004; ATKINSON; EISENBARTH; 2014). Até o momento tem-se que a maioria dos indivíduos com DM1 desenvolvem anticorpos anti-ilhota pancreática (ICA), anticorpos anti-insulina (IAA), anticorpos contra a isoforma de 65 kilodalton (KDa) da descarboxilase do ácido glutâmico (GAD65) e antígenos associados ao insulinoma 1A-2. Ainda assim é preciso salientar que há indivíduos diabéticos com características do DM1, porém não apresentam evidências de autoimunidade (ELIAS *et al.*, 1990; PAYTON; HAWKES; CHRISTIE, 1995; MACLAREN *et al.*, 1999; LUDVIGSSON *et al.*, 2012; CHAMBERLAIN *et al.*, 2017).

As investigações científicas direcionadas ao sistema imunológico associado ao DM1 demonstram que a atividade desse sistema contra às ilhotas pancreáticas desencadeia a liberação de citocinas (majoritariamente quimiocina 10 com motivo CXC [CXCL10], interleucinas 1 e 12 [IL-1 e IL-12, respectivamente], interferon gama [IFN- γ] e fator de necrose tumoral alfa [TNF- α]) (MEAGHER *et al.*, 2003; SARKAR *et al.* 2012) que se difundem no microambiente

pancreático. Relata-se ainda que essas citocinas são secretadas não somente por células imunológicas, mas também pelas células estromais e parenquimais do tecido pancreático. A difusão dessas moléculas pelo microambiente pancreático resulta em efeitos citotóxicos que desencadeiam a quebra da dupla fita de DNA das células β -pancreáticas produtoras de insulina e, por fim, resultando em uma resposta em cascata que culmina na morte celular. Nessa linha de estudo, BURKART *et al.* (1999) demonstraram, em estudo experimental com camundongos, que a enzima PARP (poli ADP ribose polimerase) é a molécula crucial para desencadear essa cascata de eventos para a morte das células beta pancreáticas no contexto do DM1.

Após essa breve explanação sobre o aspecto imunológico do DM1 podemos enfatizar o quadro epidemiológico da doença. Entretanto faz-se necessário relembrar a categorização da doença para que se possa demonstrar onde o DM1 está inserido. Sendo assim, a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2019, classificou a doença diabetes em seis categorias diferentes, baseadas no aspecto etiológico e clínico da doença. O DM1 é uma destas categorias que ainda inclui o diabetes tipo 2, diabetes tipo híbrido, diabetes não-classificável, diabetes com ocorrência durante a gravidez sem classificação e diabetes de outros tipos (quadro 1).

Quadro 1. Tipos de diabetes *mellitus*. Traduzido de OMS (2019).

Diabetes tipo I
Diabetes tipo II
Formas híbridas de diabetes
Diabetes de adultos imuno-mediada e de evolução lenta
Cetose propensa a diabetes tipo II
Outros tipos específicos
Diabetes monogênica
Defeito monogênico da atividade das células β
Defeito monogênico da ação insulínica
Doenças do pâncreas exócrino
Desordens endócrinas
Fármaco ou quimicamente induzida
Infecções
Formas especificamente incomuns de diabetes imuno-mediadas
Outras síndromes genéticas às vezes associadas ao diabetes
Diabetes não-classificável

Essa categoria deve ser utilizada temporariamente quando não há uma categoria clara de diagnóstico especialmente quando se está próximo ao diagnóstico de diabetes.
Primeira ocorrência de hiperglicemia durante a gestação
Diabetes mellitus durante a gravidez
Diabetes mellitus gestacional

Considerando que o objeto de estudo do presente trabalho é o DM1, destacaremos os aspectos de incidência e prevalência referentes à categoria em estudo. Analisando-se, portanto, o cenário epidemiológico global do diabetes, estima-se que a doença é prevalente 8.8% da população mundial adulta, o que representa um universo de 415 milhões de pessoas (WHITING *et al.*, 2011; OGURTSOVA *et al.*, 2017).

Estudos prospectivos descrevem que, em 2040, haverá aproximadamente 642 milhões de indivíduos diabéticos em todo o mundo (FERREIRA; FERREIRA, 2009; OMS, 2019; NORRIS; JOHNSON; STENE, 2020). Nesse universo de milhões de indivíduos diabéticos, o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) ainda é a forma mais prevalente da doença (aproximadamente 85-90% dos indivíduos diabéticos). Já o DM1 é o segundo tipo mais comum da doença, acometendo cerca de 10-15% do universo total de indivíduos diabéticos. Nas últimas três décadas houve um aumento da incidência global de 3-4% desta doença autoimune.

A característica marcante do DM1 é a sua maior prevalência em crianças abaixo de 15 anos e, nesse aspecto, estima-se que atualmente haja mais de 500.00 jovens acometidos (BURKART *et al.*, 1999; OGURTSOVA *et al.*, 2017). Ademais, as estimativas mundiais assinalam o aumento da doença na ordem de mais de 90.000 novos casos por ano (OGURTSOVA *et al.*, 2017; OMS, 2019).

Retomando-se os dados de prevalência e incidência citados anteriormente neste parágrafo, vale ressaltar que tais dados apresentam variação significativa caso se compare os índices do DM1 nos países economicamente favorecidos e nos economicamente desfavorecidos (figura 1). Tais discrepâncias dos índices estão relacionadas primordialmente à ausência de diagnóstico, resultante da escassez de ferramentas acessíveis em larga escala e não a aspectos genéticos e/ou fisiológicos diferentes entre a população desses países (KATSAROU *et al.*, 2017).

Indivíduos portadores de DM1 dependem da administração de insulina sintética ao longo de toda vida, entretanto, este não é o único impacto negativo da doença na qualidade de vida dos indivíduos (DAVIS *et al.*, 2005). Retinopatia, nefropatia e neuropatia são condições que

devem ser frequentemente investigadas em indivíduos diagnosticados com diabetes tipo 1, de acordo com dados da literatura, embora tais recomendações frequentemente variem (RIDDELL; PERKINS; 2006). Outro aspecto favorecido pelo DM1 é a ocorrência de comorbidades de caráter auto-imune. Nesse sentido, HOLMES (2001) e REWERS e colaboradores (2004) reportam uma frequência de 1-16% de doença celíaca em indivíduos portadores de DM1, ao passo que sua incidência na população em geral varia entre 0.3-1%. Hipotireoidismo e, menos frequentemente, hipertireoidismo também são comorbidades de caráter auto-imune comuns em indivíduos diabéticos tipo 1 (ROLDÁN *et al.*, 1999; KORDONOURI *et al.*, 2002; MOHN *et al.*, 2002; TRIOLO *et al.*, 2011).

Considerando o exposto ao longo do texto e, principalmente, ao longo deste parágrafo entende-se a importância das investigações sobre a etiopatogênese do DM1. Somente a partir destes achados é que se pode delinear e desenvolver estratégias não só para o tratamento da doença, mas também para as complicações decorrentes dela, bem como para o diagnóstico precoce e em larga escala. Neste contexto, o estudo do DM1 em modelos experimentais (MORDES; ROSSINI, 1981; KING, 2012) são ferramentas que favorecem o entendimento da etiopatogênese da doença e é o assunto do próximo tópico dessa introdução.

Figura 1. Mapa ilustrativo da incidência de diabetes mellitus tipo 1 no mundo.

Fonte: KATSAROU *et al.*, 2017

1.2. Modelo experimental do diabetes *mellitus* tipo 1 e estreptozotocina

Atualmente há modelos experimentais amplamente utilizados para investigação da patogênese do diabetes *mellitus* tipo 1. A classificação desses modelos se baseia na utilização ou não utilização de fármacos para indução da doença. Sendo assim, tem-se I) diabetes induzido quimicamente e II) diabetes espontâneo (REES; ALCOLADO, 2005). A abordagem farmacológica para indução do DM1 requer o emprego de substâncias que favoreçam a morte celular das células β produtoras de insulina. Nesse aspecto tem-se os fármacos aloxana e estreptozotocina como os compostos frequentemente utilizados para indução química do DM1 (LENZEN, 2008; KING, 2012).

O emprego da estreptozotocina, utilizando o protocolo de múltiplas doses consecutivas em baixa concentração (40 mg/Kg/dia durante cinco dias) proporciona vantagens na translação dos resultados experimentais para os estudos clínicos (LIKE; ROSSINI, 1976; LEITER, 1982), pois o estabelecimento da doença também é imunologicamente mediado (SZKUDELSKI, 2001). Ressalta-se que a referida abordagem em múltiplas doses resulta no diabetes insulino-dependente, entretanto o emprego da STZ também pode ser usado para modelo de diabetes *mellitus* não insulino-dependente (REES; ALCOLADO, 2005). Contudo, tal variação depende da dose e protocolo de aplicação. Considerando-se que o objetivo do presente estudo é investigar o impacto da galectina-1 no diabetes *mellitus* tipo 1, utilizamos como abordagem metodológica o protocolo preconizando múltiplas doses consecutivas de STZ em baixa concentração (40 mg/Kg). Sendo assim, não abordaremos as peculiaridades referentes ao uso de aloxana.

A estreptozotocina (abreviadamente STZ; 2-Deoxy-2-(methylnitrosoamino)carbonyl)amino)-D-glucopyranose) é um derivado de nitrosourea isolado da bactéria gram-positiva *Streptomyces achromogenes* em 1959 (AGARWAL, 1980). Essa molécula apresenta atividade antibiótica de amplo espectro além de propriedades antineoplásicas. Sua propriedade antineoplásica decorre da sua capacidade de inibir enzimas envolvidas na transferência de elétrons (tioredoxina-redutase, glutathione-redutase e a ribonucleotídeo redutase) resultando em efeito citostático (BOLZÁN; BIANCHI, 2002). Ademais, a STZ se caracteriza por ser um análogo tóxico de glicose que se acumula, preferencialmente, em células β -pancreáticas (LENZEN, 2008), e por esse motivo é amplamente utilizada no modelo experimental do DM1 (KOLB, 1987; AL-NAHDI *et al.*, 2019). A literatura científica afirma que esse acúmulo preferencial da STZ nas células β -pancreáticas produtoras de insulina se justifica pela elevada expressão do translocador de

glicose tipo 2 (GLUT2, do inglês *glucose transporter 2*) nestas células. É por meio desse receptor que a STZ consegue adentrar a célula e, neste ponto, vale destacar o papel crucial do GLUT2 para a capacidade diabetogênia da STZ e para a efetividade do modelo experimental de diabetes (WANG *et al.*, 1998). No entanto, há estudos que demonstram que a atividade citotóxica da STZ não se restringe somente às células produtoras de insulina, mas que também se estende às células hepáticas e renais, as quais também expressam GLUT2 (HOSOKAWA *et al.*, 2001; MUECKLER; THORENS, 2013). A evolução do conhecimento em relação ao metabolismo da STZ permitiu que a alegada especificidade exclusiva da STZ pelas células beta das ilhotas de Langerhans (KOLB, 1987) fosse devidamente refutada, evidenciando-se os danos causados por esta molécula nas células renais e hepáticas, as quais também amplamente expressam GLUT2 (ELSNER *et al.*, 2000; MUECKLER; THORENS, 2013).

Após adentrar à célula, a decomposição intracelular da STZ ocasiona danos no DNA em decorrência da alquilação e/ou pela geração de óxido nítrico. Esse dano no DNA resulta em intensa atividade enzimática de PARP ocasionado, assim, síntese acentuada de polímeros de ADP-ribose a partir da utilização exacerbada de NAD⁺ (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) como substrato (BURKART *et al.*, 1999). A consequência dessa intensa atividade de PARP é a drástica redução dos níveis de NAD⁺ que resultará na incapacidade da célula de gerar energia suficiente para a manutenção dos processos vitais para a sobrevivência celular e, assim, finalmente, culminando em sua morte (BURKART *et al.*, 1999). Além do dano celular ocasionado pela ação da STZ em si, há também o efeito citotóxico de moléculas envolvidas no processo inflamatório associado a esse dano genético inicial das células β pancreáticas. Esse efeito citotóxico acentua e amplia a destruição celular, assim proporciona não só o estabelecimento do DM1 mas também o estudo órgão-específico dessa autoimunidade. Apesar das principais vantagens desse modelo experimental de DM1 terem sido destacadas ao longo do texto, esse modelo apresenta como principal desvantagem a incapacidade de mimetizar fielmente as etapas de desenvolvimento do DM1 em humanos, como é observado no modelo de diabetes espontâneo utilizando camundongos NOD (do inglês *non obese diabetic*).

Uma importante característica química da STZ, com relevância para os estudos cromatográficos, é o seu caráter isomérico e, como tal, possuir uma forma alfa e outra beta (OLES, 1978). Relata-se que entre 90 a 120 minutos em solução se estabelece o equilíbrio dessas formas isoméricas de STZ (OLES, 1978; DE LA GARZA-RODEA *et al.*, 2010), conforme ilustrado na figura 2. O isômero alfa de STZ é descrito como a forma citotóxica da molécula (OLES, 1978; SZUDELSKI, 2001), e nas análises cromatográficas apresenta-se com maior tempo de retenção quando comparada ao isômero beta (OLES, 1978).

Figura 2 - Estrutura química da molécula de STZ. Na parte superior do painel acima observa-se a molécula de STZ em plano 2D. Na parte inferior do painel observa-se as formas isoméricas alfa e beta da molécula de STZ em solução, bem como a estrutura da molécula durante a transição entre as fases.

Fonte: Painel superior: Yan; Wu (2015). Painel inferior OLES (1978), modificado.

1.3. Galectina-1

As lectinas (do Latim *legere*, escolher – BOYD; SHAPLEIGH, 1954) são proteínas distintas de anticorpos e enzimas que apresentam a propriedade de reconhecer carboidratos de modo reversível e específico. Na natureza, as lectinas são encontradas desde vírus a seres humanos e são consideradas os decodificadores moleculares de informações biológicas codificadas em açúcares (LIS & SHARON, 1998; GABIUS, 2008).

As galectinas são lectinas conhecidas como proteínas ligadoras de glicanas (do inglês, glycan-binding proteins – GBP – ARTHUR *et al.*, 2015) que possuem resíduos de β -galactosídeos (BARONDES *et al.*, 1994). As galectinas estão presentes em todo o reino animal e mantiveram-se conservada ao longo do processo evolutivo (COOPER; BARONDES, 1999). Todas as galectinas possuem um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD, do inglês *carbohydrate recognition domain*) que consiste em uma sequência de aproximadamente 130 aminoácidos que apresentam uma conformação terciária globular que forma uma invaginação

onde ocorrerá a interação molecular com o carboidrato (LEFFLER *et al.*, 2002; Di LELLA *et al.*, 2011). Além de reconhecer β -galactosídeos, as galectinas também reconhecem sequências de N-acetilactosaminas e a presença de resíduos terminais de β -galactose, e o tamanho da cadeia de polilactosamina é requerimento crítico para a capacidade reconhecedora de carboidratos das galectinas (STOWELL *et al.*, 2004). Até o momento, a família das galectinas é composta por 15 membros e está subdividida em três categorias. Estas categorias são determinadas com base na homologia da sequência de aminoácidos que compõem o CRD e em suas arquiteturas moleculares. Estas categorias são: (i) prototípica, com um único CRD capaz de dimerizar; (ii) quimérica, que apresenta um único domínio CRD na região C-terminal e uma região N-terminal, não-ligante de carboidrato capaz de promover sua oligomerização; e (iii) repetições em série (“tandem-repeat”), com dois CRD’s distintos conectados por um peptídeo ligador (BARONDES *et al.*, 1994; ARTHUR *et al.*, 2015). Desse modo, tem-se que as galectinas que contêm um único CRD e formam homodímeros não covalentes pertencem à categoria denominada prototípicas, na qual a galectina-1 está inserida (Di LELLA *et al.*, 2011; ARTHUR *et al.*, 2015; CUMMINGS; LIU, 2015 *et al.*, 2015). A galectina-1, em solução, se apresenta como homodímeros não-covalentes com constante de dissociação de aproximadamente 1 a 2 μ M (STOWELL *et al.*, 2009). A dimerização pode ocorrer envolvendo a fita F1 e a fita S1 além dos resíduos de cisteínas de ambas as fitas. Entretanto, apesar de a galectina-1 possuir duas cisteínas terminais (Cys2 e Cys130), ambas permanecem em seu estado reduzido e não possuem papel no seu processo de dimerização. Sendo assim, os dímeros de galectina-1 são estabilizados por ligações de hidrogênio e interações eletroestáticas entre as interfaces das folhas beta F1 e S1 (JOHANNES; JACOB; LEFFLER, 2018).

Além da capacidade de se ligarem aos carboidratos, as galectinas também interagem com outras categorias de moléculas, como proteínas (CUMMINGS; LIU, 2015). Sua atividade lectínica ocorre em meio extracelular e as interações proteína-proteína ocorrem frequentemente, mas não somente, em meio intracelular (ARTHUR *et al.*, 2015; CUMMINGS; LIU, 2015).

Com relação à sua síntese, a galectina-1 é sintetizada como proteína citosólica e que permanece no citosol ou no núcleo dependendo da condição da célula em questão. No citosol, a galectina-1 se apresenta como proteína citoplasmática típica, ou seja, possuem uma região N-terminal acetilada e ausência de glicosilação (CUMMINGS; LIU, 2015 *et al.*, 2015; JOHANNES; JACOB; LEFFLER *et al.*, 2018). Para alcançar o meio extracelular a galectina-1 não utiliza a via clássica retículo endoplasmático - complexo de Golgi, pois não possui a sequência sinal de secreção. Há evidências que a secreção ocorre por transporte mediado por translocador direto na membrana plasmática (STEWART *et al.*, 2017). Assim, após alcançar o

meio extracelular pela via não clássica, a galectina-1 pode ser encontrada tanto na matriz extracelular quanto na superfície celular. Desse modo, ela é capaz de interagir seletivamente com seus ligantes na matriz celular ou na superfície de outras células por meio de interações proteína-carboidrato (atividade lectínica) ou interações proteína-proteína (CUMMINGS; LIU, 2015 *et al.*, 2015). O gene da galectina-1 de camundongo (*Lgals1*) localiza-se no cromossomo 15 e possui uma sequência de 408 pares de base que são codificados em proteína ácida de 135 aminoácidos (LOHR *et al.*, 2007).

Diversos estudos têm demonstrado a participação da galectina-1 na regulação da resposta imunológica e do processo inflamatório (THIEMANN; BAUM, 2016). A propriedade imunorreguladora da galectina-1 é multifacetada e associada a várias atividades como, deleção seletiva de células efectoras Th1 e Th17 (TOSCANO *et al.*, 2007); modulação funcional de células Th1 e Th2 (STOWELL *et al.*, 2008); promoção de fenótipo tolerogênico de células dendríticas (ILARREGUI *et al.*, 2009); indução da diferenciação, expansão e função de células T reguladoras (Tregs) (GARIN *et al.*, 2007; CEDENO-LAURENT *et al.*, 2012) e regulação funcional, controle da adesão ao endotélio e migração trans-endotelial de leucócitos (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003; LA *et al.*, 2003; NORLING *et al.*, 2008; DIAS-BARUFFI *et al.*, 2010; STAROSSOM *et al.*, 2012).

Desde a década de 80 tem sido investigado os efeitos preventivos e/ou terapêuticos das propriedades imunoreguladoras da galectina-1. Esta perspectiva terapêutica da galectina-1 como um importante agente endógeno envolvido na manutenção da homeostase imunológica, é contemporânea e vem ganhando cada vez mais relevância. O aumento de sua expressão ou sua administração está relacionada à melhora de processos autoimunes tanto clínicos quanto experimentais (THIEMANN; BAUM, 2016; MENDEZ-HUERGO *et al.*, 2019).

Com relação à sua atividade imunoregulatória em processos autoimunes, já foi descrito a participação da galectina-1 na inflamação testicular, artrite reumatóide, encefalomielite aguda experimental, inflamação na retina e diabetes mellitus tipo 1 (PERONE *et al.*, 2009; STAROSSOM *et al.*, 2012; PÉREZ *et al.*, 2015; MENDEZ-HUERGO *et al.*, 2019). Na condição autoimune artrite reumatóide, MENDEZ-HUERGO e colaboradores, em 2019, observaram que indivíduos em uso de anti-inflamatórios apresentavam aumento de galectina-1 sérica. Tal ocorrência sugere a associação desta proteína à ativação de circuitos de tolerância imunológica e remissão clínica da doença. Neste contexto, e sendo o diabetes *mellitus* tipo 1 o tópico central do presente estudo, discorre-se aqui sobre alguns dos estudos que investigaram a participação da galectina-1 nessa doença.

Tem-se assim o trabalho desenvolvido por PERONE e colaboradores em 2006 no qual demonstrou-se que o transplante de células dendríticas com expressão transgênica de galectina-1 é capaz de atrasar o desenvolvimento do DM1 em camundongos NOD (do inglês *Nonobese diabetic*). O efeito protetor da galectina-1 transgênica é explicado pelo aumento da apoptose de células T CD4 e CD8 e diminuição de células T CD4 autoreativas e secretoras de IFN- γ nos linfonodos pancreáticos dos animais tratados. Em outro estudo desse mesmo grupo (PERONE *et al.*, 2009) demonstrou-se que o tratamento de camundongos NOD com galectina-1 exógena impediu a ocorrência da hiperglicemia nos estágios iniciais (subclínicos) do DM1. Além disso, mostrou-se que a galectina-1 foi eficaz na reversão da hiperglicemia bem como da destruição imunológica das células β -pancreáticas dos camundongos diabéticos. Assim, pôde-se evidenciar que a galectina-1 possui influência no desenvolvimento e progressão do DM1 (PERONE *et al.*, 2009).

Em 2011, ZHOU e colaboradores demonstraram que camundongos portadores de DM1 induzida por STZ, apresentaram aumento dos níveis séricos e musculares de galectina-1 após tratamento com o composto APS. Além disso, esse aumento da expressão de galectina-1 estava associado à indução de apoptose das células TCD8⁺ pancreáticas, descritas como células importantes na patogênese do DM1. Já em estudos com pacientes, dados da literatura mostram que as células mononucleares de indivíduos com DM1 secretam menos galectina-1. Tal ocorrência sugere que os circuitos imunorreguladores protetores podem ser prejudicados devido a menor expressão dessa lectina endógena durante o curso do DM1. (GÓMEZ-TOURIÑO *et al.*, 2012). Todas essas observações reforçam o papel imunorregulatório da galectina-1 na patogênese do DM1 experimental e em pacientes portadores desta enfermidade.

Já no contexto de modelo farmacológico do DM1 utilizando STZ, consideramos relevante citarmos os trabalhos de MENSAH-BROWN e colaboradores em 2006 e 2009. Embora estes estudos tenham investigado os impactos da galectina-3 e não da galectina-1 no DM1, os resultados apresentados proporcionam perspectivas do papel imunológico regulado por galectinas no desenvolvimento do diabetes. O primeiro trabalho mostra a participação da interleucina 23 (IL-23) na montagem de um perfil inflamatório diabetogênico no DM1 induzido por STZ dependente da produção de interleucina 17 (IL-17) e IFN- γ no tecido pancreático. Já em 2009, MENSAH-BROWN e colaboradores utilizaram modelo idêntico ao empregado no presente trabalho e observaram que os camundongos geneticamente deficientes para a galectina-3 (*Lgals 3^{-/-}*) eram resistentes ao DM1 induzido por STZ. Este efeito protetor associado à ausência de galectina-3 endógena estava vinculado a dois aspectos principais: *i*) redução de infiltrado mononuclear e maior detecção de insulina nas ilhotas pancreáticas e; *ii*)

ineficiência na produção de mediadores inflamatórios (IFN- γ , iNOS, TNF- α e IL-17) pelas células imunes dos linfonodos drenantes do pâncreas. Durante o processo de destruição das células beta pancreáticas pelas células do sistema imune, observa-se que a fase inicial da doença é modulada, principalmente, por citocinas inflamatórias e antígenos células beta específicos liberados pelos macrófagos que culminam na necrose das células beta pancreáticas. Em seguida, tem-se a segunda fase do desenvolvimento da doença na qual a resposta imunológica contra as células beta pancreáticas são majoritariamente mediadas por células T. Nesse contexto, o estudo de MENSAH-BROWN e colaboradores (2009) caracteriza as principais citocinas e mediadores inflamatórios presentes na primeira fase da patogênese do DM1. Resguardadas as diferenças, tanto estruturais entre as galectinas-1 e 3, bem como as abordagens metodológicas empregadas nos referidos estudos e no presente trabalho, consideramos importante ressaltar a contribuição cientificamente relevante desses estudos no contexto da participação das galectinas na patogênese do DM1.

As galectinas são multifuncionais e podem apresentar atividades biológicas específicas, parcialmente sobrepostas e/ou opostas quanto à modulação de programas funcionais de células do sistema imunológico. Sendo assim, algumas galectinas participam, preferencialmente, da regulação da resposta inflamatória, como a galectina-1, e outras atuam como agentes pró-inflamatório, como a galectina-3 (ARTHUR *et al.*, 2015; TOSCANO *et al.*, 2018).

Como já mencionado, a galectina-1 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, com o TNF- α , IFN- γ , IL-17, envolvidas no processo autoimune associado ao DM1 (PERONE *et al.*, 2009) enquanto a galectina-3 favorece a produção destas citocinas pró-inflamatórias (MENSAH-BROWN *et al.*, 2009). Por outro lado, tanto a galectina-3 com a galectina-1 possuem atividades pró ou anti-inflamatórias controversas, dependendo de vários fatores que incluem sua localização intra ou extracelular, a célula alvo, padrões de glicosilação de potenciais ligantes, modelos experimentais e processos fisiopatológicos envolvidos (YANG; RABINOVICH; LIU, 2008). De todo modo, resguardadas as diferenças estruturais entre as galectinas-1 e 3, bem como as abordagens metodológicas empregadas nos referidos estudos e no presente trabalho, consideramos importante destacar a contribuição cientificamente relevante dos referidos estudos no contexto da participação das galectinas na patogênese do DM1.

Assim, o presente trabalho direciona-se à compreensão da participação da galectina-1 endógena no modelo experimental de DM1 induzido por STZ, com foco em estudos comparativos de biodistribuição deste fármaco em camundongos deficientes ou não de galectina-1.

2. CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos com este estudo, conclui-se que:

- Camundongos com deleção genética homozigótica da galectina-1 são resistentes ao DM1 induzido por STZ;
- O método de determinação de STZ em plasma de camundongos empregando-se CLAE-EM apresentou parâmetros de validação compatíveis com a aplicação do estudo de farmacocinética em camundongos tratados com doses múltiplas de STZ (40 mg/Kg);
- A ausência de galectina-1 endógena não altera a biodisponibilidade do fármaco STZ;
- A resistência dos camundongos Gal-1 KO ao DM1 induzido por STZ não está associada a alterações de sua biodisponibilidade nestes animais.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, M. K. Streptozotocin: mechanisms of action. **FEBS letters**, v. 120, n. 1, p. 1-3, 1980.
- AL-NAHDI, A. M. T.; JOHN, A.; RAZA, H. Streptozotocin-induced molecular and metabolic targets in pancreatic beta-cell toxicity. **Hamdan Medical Journal**, v. 12, n. 2, p. 65-71, 2009.
- ALKIRE, R. C. *et al.* Bioelectrochemistry: fundamentals, applications and recent developments. Wiley, 2013.
- AMISAKI, T. Gaussian Quadrature as a numerical integration method for estimating area under the curve. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 1, p. 70-77, 2001.
- ARTHUR, C. M. *et al.* Evolving mechanistic insights into galectin functions. In STOWELL, S. R.; CUMMINGS, R. D. (ed.) **Galectins: methods and protocols**. New York: Springer Science + Business Media, p. 1-36, 2015.
- ASHCROFT, F. M.; HARRISON, D. E.; ASHCROFT, S. J. H. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic β -cells. **Nature**, v. 312, n. 5993, p. 446-448, 1984.
- ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A.W. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 383, n. 9911, p. 69-82, 2014.
- AULTON, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. **Artmed**, 2008.
- AUVYNET, C. *et al.* Galectin-1 promotes human neutrophil migration. **Glycobiology**, v. 23, n. 1, p. 32-42, 2013.
- BARONDES, S. H. *et al.* Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 33, p. 20807-20810, 1994.
- BENZI, J. R. L. *et al.* The role of organic cation transporter 2 inhibitor cimetidine, experimental diabetes mellitus and metformin on gabapentin pharmacokinetics in rats. **Life Sciences**, v. 200, p. 63-68, 2018.
- BOLZÁN, A. D.; BIANCHI, M. S. Genotoxicity of streptozotocin. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 512, n. 2-3, p. 121-134, 2002.
- BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, n. 3091, p. 419, 1954.
- BURKART, V. *et al.* Mice lacking the poly (ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin. **Nature medicine**, v. 5, n. 3, p. 314-319. 1999.

CEDENO-LAURENT, F. *et al.* Galectin-1 triggers an immunoregulatory signature in Th cells functionally defined by IL-10 expression. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 7, p. 3127-3137, 2012.

CHAMBERLAIN, J. J. *et al.* Treatment of type 1 diabetes: synopsis of the 2017 American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes. **Annals of internal medicine**, v. 167, n. 7, p. 493-498, 2017.

COOPER, D. N.; BARONDES, S. H. God must love galectins; he made so many of them." **Glycobiology**, v. 9, n. 10, p. 979-984. 1999.

COSTA, F. R. C. *et al.* Gut microbiota translocation to the pancreatic lymph nodes triggers NOD2 activation and contributes to T1D onset. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 7, p. 1223-1239, 2016.

CUMMINGS, R. D.; LIU, F. T.; GALECTINS, V. G. R. VA rd, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart (Eds.), **Essentials of Glycobiology**. chapter 36, 2015.

DARROW, A. L.; SHOHET, R. V. Galectin-3 deficiency exacerbates hyperglycemia and the endothelial response to diabetes. **Cardiovascular diabetology**, v. 14, n. 1, p. 73, 2015.

DAVIS, R. E. *et al.* Impact of hypoglycaemia on quality of life and productivity in type 1 and type 2 diabetes. **Current medical research and opinion**, v. 21, n. 9, p. 1477-1483, 2005.

DE LA GARZA-RODEA, A. S. *et al.* Anomer-equilibrated streptozotocin solution for the induction of experimental diabetes in mice (*Mus musculus*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 49, n. 1, p. 40-44, 2010.

DIAS-BARUFFI, M. *et al.* Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 41282-41293, 2003.

DIAS-BARUFFI, M. *et al.* Differential expression of immunomodulatory galectin-1 in peripheral leukocytes and adult tissues and its cytosolic organization in striated muscle. **Glycobiology**, v. 20, n. 5, p. 507-520, 2010.

DI LELLA, S., V. *et al.* When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again. **Biochemistry**, v. 50, n. 37, p. 7842-7857, 2011.

DIEHL, K. H. *et al.* A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **Journal of Applied Toxicology: An International Journal**, v. 21, n. 1, p. 15-23, 2001.

EISENBARTH, G. S. Type I diabetes mellitus. **New England journal of medicine**, v. 314, n. 21, p. 1360-1368, 1986.

ELIAS, D. *et al.* Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n.4, p. 1576-1580, 1990.

ELSNER, M. *et al.* Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. **Diabetologia**, v. 43, n. 12, p. 1528-1533, 2000.

FERREIRA, Celma. L. R. A.; FERREIRA, Márcia. G. Características epidemiológicas de pacientes diabéticos da rede pública de saúde: análise a partir do sistema HiperDia. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 1, p. 80-86, 2009.

GABIUS, Hans-Joachim. Glycans: bioactive signals decoded by lectins. 2008.

GEPTS, W. (1965). Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 14, n. 10, p. 619-633, 1965.

GÓMEZ-TOURÍÑO, I. *et al.* Galectin-1 synthesis in type 1 diabetes by different immune cell types: Reduced synthesis by monocytes and Th1 cells. **Cellular immunology**, v. 271, n. 2, p. 319-328, 2011.

HOLMES, G. K. T. Coeliac disease and type 1 diabetes mellitus—the case for screening. **Diabetic Medicine**, v. 18, n. 3, p. 169-177, 2001.

HOSOKAWA, M.; Dolci, W; Thorens, B. Differential sensitivity of GLUT1-and GLUT2-expressing β cells to streptozotocin. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 289, n. 5, p. 1114-1117, 2001.

ILARREGUI, J. M. *et al.* Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. **Nature immunology**, v. 10, n. 9, p. 981, 2009.

JOHANNES, L.; JACOB, R.; LEFFLER, H. Galectins at a glance. **Journal of cell science**, v. 131, n. 9, 2018.

JOSLIN, J. O. Blood Collection Techniques in Exotic Small Mammals. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 18, n. 2, p., 117-139, 2009.

KARUNANAYAKE, E. H.; HEARSE, D. J.; MELLOWS, G. Streptozotocin: its excretion and metabolism in the rat. **Diabetologia**, v. 12, n. 5, p. 483-488, 1976.

KARUNANAYAKE, E. H.; HEARSE, D. J.; MELLOWS, G. The synthesis of [^{14}C] streptozotocin and its distribution and excretion in the rat. **Biochemical Journal**, v. 142, n. 3, p. 673-683, 1974.

KATSAROU, A. *et al.* Type 1 diabetes mellitus. **Nature reviews Disease primers**, v. 3, n. 1, p. 1-17, 2017.

KING, A. J. F. The use of animal models in diabetes research. **British journal of pharmacology**, v. 166, n. 3, p. 877-894, 2012.

KOLB, H. Mouse models of insulin dependent diabetes: Low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. **Diabetes / metabolism reviews**, v. 3, n. 3, p. 751-778, 1987.

KORDONOURI, O. *et al.* Predictivity of thyroid autoantibodies for the development of thyroid disorders in children and adolescents with Type 1 diabetes. **Diabetic medicine**, v. 19, n. 6, p. 518-521, 2002.

KOTT, L. *et al.* An evaluation of four commercial HPLC chiral detectors: a comparison of three polarimeters and a circular dichroism detector. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 43, n.1, p. 57 – 65, 2007.

LA, M. *et al.* A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation. **The American journal of pathology**, v. 163, n. 4, p. 1505-1515, 2003.

LEFFLER, H. *et al.* Introduction to galectins. **Glycoconjugate journal**, v. 19, n. 7-9, p. 433-440, 2002.

LEI, T. *et al.* Galectin-1 enhances TNF α -induced inflammatory responses in Sertoli cells through activation of MAPK signalling. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2018.

LEITER, E. H. Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulinitis in C57BL mice: influence of inbred background, sex, and thymus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 2, p. 630-634, 1982.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.

LEVI, G.; TARRAB-HAZDAI, R.; TEICHBERG, V. I. Prevention and therapy with electrolectin of experimental autoimmune myasthenia gravis in rabbits. **European journal of immunology**, v. 13, n. 6, p. 500-507, 1983.

LIKE, A. A.; ROSSINI, A. A. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. **Science**, v. 193, n. 4251, p. 415-417, 1976.

LIS, H. & SHARON, N..Lectins. In: Delves, PJ & Roitt, IM (eds). **Encyclopedia of Immunology** 2nd ed .,v.3. Academic Press, New York, p.1535-1541, 1998.

LOHR, M. *et al.* Murine homodimeric adhesion/growth-regulatory galectins-1,-2 and-7: comparative profiling of gene/promoter sequences by database mining, of expression by RT-PCR/immunohistochemistry and of contact sites for carbohydrate ligands by computational chemistry. **FOLIA BIOLOGICA-PRAHA**-, v. 53, n. 4, p. 109, 2007.

LUDVIGSSON, J. *et al.* GAD65 antigen therapy in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n.5, p. 433-442, 2012.

MACHERAS, P.; ARGYRAKIS, P. Gastrointestinal drug absorption: is it time to consider heterogeneity as well as homogeneity?. **Pharmaceutical research**, v. 12, n. 7, p. 842-847, 1997.

MACLAREN, N. *et al.* Only multiple autoantibodies to islet cells (ICA), insulin, GAD65, IA-2 and IA-2 β predict immune-mediated (type 1) diabetes in relatives. **Journal of autoimmunity**, v. 12, n. 4, p. 279-287, 1999.

MASIELLO, P. *et al.* (14C) Streptozotocin: its distribution and interaction with nucleic acids and proteins. **Biochemical pharmacology**, v. 30, n. 14, p. 1907-1913, 1981.

MEAGHER, C. *et al.* Cytokines and chemokines in the pathogenesis of murine type 1 diabetes. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 520, p. 133-158, 2003.

MENDEZ-HUERGO, S. P. *et al.* Clinical relevance of Galectin-1 and Galectin-3 in rheumatoid arthritis patients: differential regulation and correlation with disease activity. **Frontiers in immunology**, v.9, p. 3057, 2019.

MENSAH-BROWN, E. P. K. *et al.* Targeted disruption of the galectin-3 gene results in decreased susceptibility to multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice. **Clinical Immunology**, v. 130, n. 1, p. 83-88, 2009.

MENSAH-BROWN, E. P. K. *et al.* IL-23 leads to diabetes induction after subdiabetogenic treatment with multiple low doses of streptozotocin. **European journal of immunology**, v. 36, n. 1, p. 216-223, 2006.

MIN, K. S. Physiological significance of metallothionein in oxidative stress. Yakugaku zasshi: **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 127, n. 4, p. 695-702, 2007.

MOHN, A. *et al.* The effect of subclinical hypothyroidism on metabolic control in children and adolescents with Type 1 diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**, v. 19, n. 1, p. 70-73, 2002.

MORDES, J. P.; ROSSINI, A. A. Animal models of diabetes. **The American journal of medicine**, v. 70, n. 2, p. 353-360, 1981.

MUECKLER, M.; THORENS, B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. **Molecular aspects of medicine**, v. 34, n. 2-3, p. 121-138, 2013.

NAVARRO-FONTESTAD, C *et al.* A new mathematical approach for the estimation of the AUC and its variability under different experimental designs in preclinical studies. **Pharmaceutical statistics**, v. 11, n. 1, p. 14-23, 2012.

NAGAKI, Y.; ITO, K.; KUWAHARA, M. WTC rat has unique characteristics such as resistant to streptozotocin. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 8, p. 157-161, 2016.

NORLING, L.V. *et al.* Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 3, p. 682-690, 2008.

NORRIS, J. M.; JOHNSON, R. K.; STENE L. C. Type 1 diabetes – early life origins and changing epidemiology. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, 2020.

OGURTSOVA, K. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes research and clinical practice**, v. 128, p. 40-50, 2017.

YLES, P. J. High-pressure liquid chromatographic separation and determination of anomeric forms of streptozocin in a powder formulation. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 67, n. 9, p. 1300-1302, 1978.

OFFNER, H. *et al.* Recombinant human β -galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of neuroimmunology**, v. 28, n. 2, p. 177-184, 1990.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Classification of diabetes mellitus. 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325182/9789241515702-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso no dia: 05 de maio de 2020.

PAYTON, M. A.; HAWKES, C. J.; CHRISTIE, M. R. Relationship of the 37,000-and 40,000-M (r) tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (ICA512). **The Journal of clinical investigation**, v. 96, n. 3, p. 1506-1511, 1995.

PÉREZ, C. V. *et al.* Dual roles of endogenous and exogenous galectin-1 in the control of testicular immunopathology. **Scientific reports**, v. 5, p. 12259, 2015.

PERONE, M. J. *et al.* Suppression of autoimmune diabetes by soluble galectin-1. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 5, p. 2641-2653, 2009.

PERONE, M. J. *et al.* Dendritic cells expressing transgenic galectin-1 delay onset of autoimmune diabetes in mice. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 8, p. 5278-5289, 2006.

QINNA, N. A.; BADWAN, A. A. Impact of streptozotocin on altering normal glucose homeostasis during insulin testing in diabetic rats compared to normoglycemic rats. **Drug design, development and therapy**, v. 9, p. 2515-2525, 2015.

REES, D. A.; ALCOLADO, J. C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabetic medicine**, v. 22, n. 4, p. 359-370, 2005.

REWERS, M. *et al.* Celiac disease associated with type 1 diabetes mellitus. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, v. 33, n. 1, p. 197-214, 2004.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIDDELL, M. C.; PERKINS, B. A. Type 1 diabetes and vigorous exercise: applications of exercise physiology to patient management. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 30, n. 1, p. 63-71. 2006.

ROLDÁN, M. B.; ALONSO, M.; BARRIO, R. Thyroid autoimmunity in children and adolescents with Type 1 diabetes mellitus. **Diabetes, nutrition & metabolism**, v. 12, n. 1, p. 27-31, 1999.

SARKAR, S. A. *et al.* Expression and regulation of chemokines in murine and human type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 61, n. 2, p. 436-446, 2012.

SICREE, R.; SHAW, J.; ZIMMET, P. The Global Burden. Diabetes and Impaired Glucose Tolerance. Prevalence and Projections, Brussels, International Diabetes Federation, 2006. p. 16– 103.

SEARCH GROUP *et al.* SEARCH for Diabetes in Youth: a multicenter study of the prevalence, incidence and classification of diabetes mellitus in youth. **Controlled clinical trials**, v. 25, n. 5, p. 458-471, 2004.

STAROSSOM, S. C. *et al.* Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration. **Immunity**, v. 37, n. 2, p. 249-263, 2012.

STEWART, S. E. *et al.* A genome-wide CRISPR screen reconciles the role of N-linked glycosylation in galectin-3 transport to the cell surface. **J Cell Sci**, v. 130, n. 19, p. 3234-3247, 2017.

STOWELL, S. R. *et al.* Human galectin-1 recognition of poly-N-acetyllactosamine and chimeric polysaccharides. **Glycobiology**, v. 14, n. 2, p. 157-167, 2004.

STOWELL, S. R. *et al.* Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 5, p. 3091-3102, 2008..

STOWELL, S. R. *et al.* Ligand reduces galectin-1 sensitivity to oxidative inactivation by enhancing dimer formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 8, p. 4989-4999, 2009.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological research**, v. 50, n. 6, p. 537-546, 2001.

TOSCANO, M. A. *et al.* Differential glycosylation of TH 1, TH 2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. **Nature immunology**, v. 8, n. 8, p. 825-834, 2007.

THIEMANN, S.; BAUM, L. G. Galectins and immune responses - just how do they do those things they do?. **Annual review of immunology**, v. 34, p. 243-264, 2016.

TRIOLO, T. M. *et al.* Additional autoimmune disease found in 33% of patients at type 1 diabetes onset. **Diabetes care**, v. 34, n. 5, p. 1211-1213, 2011.

ZHOU, X. *et al.* Increased galectin-1 expression in muscle of Astragalus polysaccharide-treated Type 1 diabetic mice. **Journal of natural medicines**, v. 65, n. 3-4, p. 500, 2011.

WANG, Z.; GLEICHMANN, H. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. **Diabetes**, v. 47, n. 1, p. 50-56, 1998.

WHITING, D. R. *et al.* IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes research and clinical practice**, v. 94, n. 3, p. 311-321, 2011.

YANG, R.Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 10, 2008.