LUCIANO FILGUEIRAS RIBEIRO JUNIOR

**O EIXO LTB₄/MYD88 NA INFLAMAÇÃO ESTÉRIL E NA SEPSE EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE DIABETES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

LUCIANO FILGUEIRAS RIBEIRO JUNIOR

**O EIXO LTB₄/MYD88 NA INFLAMAÇÃO ESTÉRIL E NA SEPSE EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE DIABETES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Profa. Dra. Sonia Jancar

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Ribeiro Junior, Luciano Filgueiras.

O eixo LTB4/MyD88 na inflamação estéril e na sepse em modelos experimentais de diabetes / Luciano Filgueiras Ribeiro Junior. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Sonia Jancar Negro.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunofarmacologia dos mediadores lipídicos.

Versão do título para o inglês: The LTB4/MyD88 axis in sterile inflammation and sepsis in experimental models of diabetes.

1. Diabetes 2. Sepse 3. Inflamação 4. Inflamação estéril 5. Inflamação pulmonar 6. Macrófago I. Negro, Profa. Dra. Sonia Jancar II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0127/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luciano Filgueiras Ribeiro Junior.

Título da Tese: O eixo LTB4/MyD88 na inflamação estéril e na sepse em modelos experimentais de diabetes.

Orientador(a): Profa. Dra. Sonia Jancar Negro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-900 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 139 nas fls. 64 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Sonia Jancar, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "***Efeito da insulina na inflamação pulmonar secundária a sepse em animais deabéticos***" do qual participou(aram) o(s) alunos ***Jollson de Oliveira Martins, Luciano Filgueiras Ribeiro Jr, Matheus Ferracini, Denise Barbosa Corrêa Anger*** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **15.12.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 16 de dezembro de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

linhas p/ alunos

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091 8405
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Of.Circ. CEUA.05.10

WTL/mcgn

São Paulo, 20 de abril de 2010.

Prezado^(a) Senhor^(a)

Em reunião realizada em 30.03.2010, a Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB, deliberou que os protocolos de experimentação aprovados terão um período adicional máximo (3 anos) de prorrogação.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da Comissão de Ética no
Uso de Animais - ICB /USP

Ilmo^(a), Sr^(a).
Prof^(a), Dr^(a), **SONIA JANCAR NEGRO**
Chefe do Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas- USP

FW: 10500 MD/R approval notice

De: **Serezani, Henrique** (hserezan@iu.edu) Este remetente está na lista de confiança.

Enviada: quinta-feira, 21 de novembro de 2013 21:59:28

Para: Luciano Filgueiras (lufilgueiras@hotmail.com)

1 anexo

10500 ORG Approved.docx (199,3 KB)

From: School of Medicine IACUC <somiacuc@iupui.edu>

Date: Thursday, May 16, 2013 12:19 PM

To: henrique serezani <hserezan@iu.edu>

Subject: 10500 MD/R approval notice

Dear Dr. Serezani,

The protocol approval notice is only sent to the PI, if someone in your lab needs the notice you will need to forward this email to them.

Please find attached a WORD.doc copy of your approved protocol.

Approval Date: 05/16/2013

Continuing Review Date: 05/16/2014

3 year Expiration Date: 05/16/2016

If you need to file an amendment in the future on this protocol, please edit your protocol to provide the additional information using **the track change mode** and send to somiacuc@iupui.edu with any other pertinent documents. If the amendment is not submitted with changes tracked it will be returned unreviewed until submitted in the proper format.

If you have any questions or need assistance please reply to this message or refer to the contact information below.

Esse trabalho foi desenvolvido no laboratório de Imunofarmacologia do departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP Brasil, e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2010/09388-3, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Parte deste trabalho foi desenvolvido no laboratório de Doenças Inflamatórias e Crônicas da *School of Medicine na Indiana University-Purdue University Indianapolis (IUPUI)*, Indianapolis- IN EUA com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2012/13623-3, do National Institutes of Health (NIH) *grant* HL-103777 sob supervisão do Dr. Carlos Henrique Serezani.

AGRADECIMENTOS

`A minha orientadora, profa. Sonia Jancar, pela orientação, confiança e pela oportunidade de fazer parte da sua equipe. A minha admiração por sua competência.

Ao meu co-orientador prof. Joilson de Oliveira Martins pela orientação.

Ao meu orientador do estágio nos EUA, Dr. Carlos Henrique Serezani, por ter me recebido em seu laboratório, pela orientação, confiança e paciência. Sua contribuição fez toda a diferença.

`A profa. Vera L Capellozi, pela sua contribuição nas análises histológicas.

Ao grupo de metabolismo da IUPUI -EUA: David Morris, Carmella Evans-Molina e Raghavendra G. Mirmira pelas discussões enriquecedoras.

Aos meus colegas de laboratório na IUPUI: Stephanie Brandt, Soujuan Wang, Zhuo Wang, Ana Elisa Ferreira, Flávia Sisti e Brad Griesenauer. Muito obrigado pelo companheirismo e pelas contribuições, foi um prazer trabalhar com vocês.

Aos professores da minha banca de qualificação: Niels Olsen Câmara, Alexandre Steiner e Ana Campa, as sugestões e discussões foram essenciais para o enriquecimento desse trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de Imunofarmacologia: Camila, Mari Morato, Francisco, Matheus, Mari Koga, Mateus, Edson, Junior, Raquel, Marlise e Silvana – pelo companheirismo, amizade, paciência e discussões. Todos vocês contribuíram de forma significativa para meu amadurecimento pessoal e profissional.

Aos Professores e funcionários do departamento de Imunologia, cada um de vocês sabe o quanto contribuíram para meu desenvolvimento pessoal e como cientista.

`A FAPESP, pelo apoio financeiro imprescindível para realização desse projeto.

`A minha família tão amada pelo apoio incondicional.

`A Deus, fonte de toda luz, inspiração e sabedoria
que esteve ao meu lado, me guiou e amparou durante toda essa caminhada.

RESUMO

Filgueiras LR. O eixo LTB₄/MyD88 na inflamação estéril e na sepse em modelos experimentais de diabetes. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

O diabetes tipo 1 (DT1) está associado a uma inflamação basal crônica (inflamação estéril) e menor resistência a infecções. A ativação de receptores da família toll-like (TLRs)/IL-1 receptor (IL-1R) tem um papel fundamental na fisiopatologia da inflamação, tanto estéril como séptica, e a molécula adaptadora MyD88 é essencial para a ativação da maioria destes receptores. O leucotrieno (LT) B₄ é um mediador lipídico da inflamação que amplifica a sinalização por receptores que utilizam a molécula adaptadora MyD88. Assim, foi nosso objetivo estudar os mecanismos moleculares envolvidos na inflamação estéril e séptica (sistêmica e pulmonar) em modelos experimentais de DT1, com ênfase no eixo LTB₄/MyD88. Os nossos resultados mostram que, comparados com não-diabéticos, os animais com DT1 apresentam níveis aumentados de TNF- α , IL-1 β e LTB₄ no soro e seus macrófagos tem maior expressão de MyD88 e da enzima 5-LO, responsável pela síntese de leucotrienos (LTs). A expressão aumentada de MyD88/STAT-1 é dependente de LTB₄ via ativação de AP-1/c-Jun. O tratamento com insulina in vivo restaurou os níveis de LTB₄ e MyD88 em macrófagos. A inibição farmacológica ou genética do eixo LTB₄/BLT-1 restaurou a expressão de MyD88 e a produção de IL-1 β e aumentou da produção do antagonista do IL-1R (IL-1RA) nos animais diabéticos. Os animais com DT1 submetidos a sepse polimicrobiana, apresentaram inflamação sistêmica (SIRS) exacerbada e maior mortalidade. A inibição genética ou farmacológica de 5-LO ou BLT-1 prolongou a sobrevivência dos camundongos diabéticos, reduziu os níveis de IL-1 β , IL-10 e TNF- α e aumentou o IL-1RA no soro. Contrariamente, a inflamação pulmonar secundária a sepse foi menos intensa nos animais diabéticos com menor infiltrado leucocitário, edema, expressão de COX-2, TGF- β e α -sma comparado aos não-diabéticos. Isso se correlacionou com aumento de SOCS-1, diminuição de MyD88 e menor ativação de NFkB nos macrófagos alveolares. Em conjunto, esses resultados sugerem que os níveis elevados de LTB₄ no diabético aumentam a expressão de MyD88 e a resposta inflamatória dependente de receptores da família TLR/IL-1R. Com isto, tanto a inflamação estéril como a sistêmica decorrente de sepse são mais intensas causando maior mortalidade. Nossos resultados revelaram um papel fundamental do eixo LTB₄/MyD88 na sepse em diabéticos.

Palavras-chave: Diabetes. Sepse. Inflamação. Inflamação Estéril. Inflamação Pulmonar. Macrófago.

ABSTRACT

Filgueiras LR. The LTB₄/MyD88 axis in sterile inflammation and sepsis in experimental models of diabetes. [Ph.D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014

Type 1 diabetes (T1D) is associated with basal chronic inflammation (sterile inflammation) and infection susceptibility. The activation of toll-like receptors (TLR)/ IL-1 receptor (IL-1R) family has a central role in the physiopathology of septic or sterile inflammation and the adaptor molecule MyD88 is essential for these receptors activation. Leukotriene (LT) B₄ is an inflammatory lipid mediator that amplifies the signalization of receptors that use MyD88 as adaptor molecule. Our aim was to study the molecular mechanisms involved in sterile and septic inflammation (both systemic and lung inflammation) in experimental models of T1D emphasizing LTB₄/MyD88 axis. Our results showed that, compared to non-diabetics, animals with T1D present higher levels of TNF- α , IL-1 β and LTB₄ in the serum and its macrophages have increased expression of MyD88 and the enzyme 5-LO, responsible for leukotrienes production. The increased MyD88/STAT-1 expression was driven by AP-1/c-Jun activation on a LTB₄-dependent manner. The *in vivo* insulin treatment restored LTB₄ and MyD88 levels in macrophages. The pharmacologic or genetic inhibition of LTB₄/MyD88 axis restored MyD88 expression, IL-1 β production and increased the production of IL-1R antagonist (IL-1RA) in diabetic animals. Animals with T1D submitted to polymicrobial sepsis showed increased systemic inflammation (SIRS) and mortality. The genetic or pharmacological inhibition of 5-LO or BLT-1 prolonged survival of diabetic mice, reduced IL-1 β , IL-10 and TNF- α levels and increased IL-1RA levels in the serum. In contrast, the sepsis-induced lung inflammation was less intense in diabetic animals with lower leukocyte infiltrate, edema and expression of COX-2, TGF- β and α -sma compared to non-diabetics. This correlated with increased SOCS-1, decreased MyD88 expression and impairment of NF κ B activation in alveolar macrophages. Together these results suggest that higher levels of LTB₄ in diabetics enhance MyD88 expression and the TLR/IL-1R family-dependent inflammatory response. Thus, both sterile and sepsis-dependent systemic inflammations are more intense leading in increased mortality. These results uncover a heretofore-pivotal role for LTB₄ in the sepsis of diabetics.

Keyword: Diabetes. Sepsis. Inflammation. Sterile Inflammation. Acute Lung Injury. Macrophage.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
DT1	Diabetes Tipo 1
DT2	Diabetes Tipo 2
IFN	Interferon
TNF	Fator de Necrose Tumoral
IL	Interleucina
NLRP3	Domínio de ligação de Nucleotídeo e Proteína contendo repetição de leucina 3- <i>Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat containing Protein 3</i>
IRS-1	Substrato do Receptor de Insulina 1 - <i>Insulin Receptor Substrate 1</i>
PAMP	Padrão Molecular Associado a Patógeno - <i>Pathogens Associated Molecular Patterns</i>
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica- <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
TLR	Receptores do Tipo Toll – <i>Toll Like</i>
AP-1	Proteína Ativadora 1 - <i>Activator Protein 1</i>
IRF-3	Fator Regulador de Interferon- <i>Interferon Regulatory Factors</i>
NFkB	Fator Nuclear – Kappa B- <i>Nuclear Factor-Kappa B</i>
COX-2	Ciclooxigenase-2
iNOS	Óxido nítrico Sintase Induzível
MyD88	Fator de Diferenciação Mielóide 88 - <i>Myeloid Differentiation Factor 88</i>
TICAM	Receptor Toll e Interleucina 1 contendo adaptador- <i>Toll Interleukin-1 receptor-Containing Adapter Molecule</i>
IL-1R	Receptor da Interleucina 1- <i>Interleucine 1 Receptor</i>

TRIF	Domínio TIR contendo Adaptador Indutor de IFN- β - <i>TIR-Domain-Containing Adapter-Inducing IFN-β</i>
TRAM	Molécula Adaptadora Relacionada ao TRIF - <i>TRIF-Related Adapter Molecule</i>
LT	Leucotrieno
5-LO	5-Lipooxigenase
AA	Ácido Araquidônico
PLA₂	Fosfolipase A2
FLAP	Proteína ativadora da Lipooxigenase 5 - <i>5-Lipoxygenase-Activating Protein</i>
CysLT	Cisteinil Leucotrieno
BLT-1	Receptor 1 do LTB ₄
BLT-2	Receptor 2 do LTB ₄
AMPc	Monofosfato Cíclico de Adenosina
IP3	1,4,5- Trifosfato de Inositol
PKC	Proteína Quinase C
SOCS-1	Supressor de Sinalização de Citocina - <i>Suppressor of Cytokine Signaling</i>
STAT-1	Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição 1 - <i>Signal Transducers and Activators of Transcription 1</i>
RNA_m	Ácido Ribonucleico mensageiro
CXCR2	Receptor de Quimiocina CXC – <i>CXC Chemokine Receptor</i>
ALI	Inflamação Pulmonar Aguda – <i>Acute Lung Injury</i>
ARDS	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo - <i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
BAL	Lavado Bronco Alveolar
α -sma	Actina de Músculo Liso-alpha smooth muscle actin
TGF-β	Fator de Crescimento Transformante - <i>Transforming growth factor beta</i>

NIH	<i>National Institute of Health</i>
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
STZ	Estreptozotocina
ALX	Aloxana
M-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos – <i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
CLP	Ligação e Perfuração do Ceco - <i>Cecal Ligation and Puncture</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Glicemia em diferentes modelos murinos de diabetes.....	43
Figura 2-	Macrófagos de animais diabéticos expressam níveis mais elevados de MyD88 comparado aos de animais controle.....	45
Figura 3-	A expressão de MyD88, mas não de outras moléculas adaptadoras, está aumentada em macrófagos de animais com DT1.....	47
Figura 4-	A deficiência na produção de insulina na DT1 induz aumento na expressão de MyD88/STAT-1.....	49
Figura 5-	A deficiência na produção de insulina na DT1 correlaciona-se com a produção aumentada de LTB ₄	52
Figura 6-	O aumento da expressão de MyD88/STAT-1 na DT1 é dependente de LTB ₄	53
Figura 7-	O LTB ₄ promove aumento de MyD88 via c-JUN/STAT-1.....	55
Figura 8-	A insulina controla a expressão de MyD88 via LTB ₄	57
Figura 9-	Macrófagos de animais com DT1 apresentam responsividade aumenta a estímulos MyD88 dependentes.....	50
Figura 10-	LTB ₄ é responsável pela inflamação estéril na DT1.....	61
Figura 11-	Protocolo utilizado para estudar a SIRS.....	63
Figura 12-	A produção aumentada de citocinas pelos diabéticos é dependente de LTB ₄	64
Figura 13	A inibição de LTB ₄ promove o controle bacteriano na cavidade peritoneal embora favoreça sua disseminação sistêmica.....	65
Figura 14-	O LTB ₄ é o principal mediador relacionado a mortalidade na sepse dos diabéticos.....	66
Figura 15-	Padronização da sepse em ratos.....	68

Figura 16-	O edema pulmonar nos diabéticos com sepse é menos intenso que nos não-diabéticos.....	70
Figura 17-	A migração de leucócitos para o pulmão induzida pela sepse é menor nos animais diabéticos.....	73
Figura 18-	Nos animais diabéticos a expressão de α -sma nos pulmões é menor que nos não-diabéticos.....	75
Figura 19-	A expressão de TGF- β nos pulmões dos animais diabéticos é menor que nos não diabéticos.....	78
Figura 20-	A sepse não altera a função pulmonar	80
Figura 21-	Macrófagos alveolares de animais diabéticos apresentam um desequilíbrio na expressão de MyD88 e SOCS-1 de forma independente de LTB ₄	82
Figura 22-	A ativação de NF κ B em macrófagos alveolares de diabéticos com sepse é deficiente.....	84
Figura 23-	Inflamação estéril e em consequência a sepse.....	97

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	A inflamação estéril no diabetes.....	21
1.2	A inflamação sistêmica na sepse.....	22
1.3	O LTB ₄ na inflamação e na regulação da expressão de MyD88.....	24
1.4	Susceptibilidade dos diabéticos a sepse: Inflamação x Infecção.....	26
1.5	A inflamação pulmonar secundária a sepse	27
2	OBJETIVOS.....	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1	Animais.....	32
3.2	Indução da diabetes.....	32
3.3	Obtenção de macrófago.....	33
3.4	Tratamentos.....	33
3.5	Isolamento de RNAm e PCR em tempo real (RT-PCR).....	34
3.6	Ensaio de Imunoprecipitação da Cromatina (ChiP).....	34
3.7	<i>Immunoblot</i>	35
3.8	Dosagem de citocinas, insulina, LTB ₄ e nitrito.....	36
3.9	Indução da sepse polimicrobiana.....	36
3.10	Bacteremia.....	37
3.11	Contagem de leucócitos na cavidade peritoneal.....	37
3.12	Contagem de leucócitos nos espaços aéreos.....	37
3.13	Histologia.....	38
3.13.1	<i>Morfometria das células inflamatórias</i>	38
3.13.2	<i>Morfometria do edema</i>	38

3.14	Imunohistoquímica.....	39
3.14.1	Morfometria.....	39
3.15	Análise estatística.....	40
4	RESULTADOS.....	42
4.1	A regulação de MyD88 na inflamação estéril e na inflamação decorrente da sepse em diabéticos.....	42
4.1.1	A expressão de MyD88 e STAT-1 em diferentes sub-populações de macrófagos de animais com DT1.....	44
4.1.2	O LTB ₄ na expressão de MyD88 em macrófagos de DT1.....	51
4.1.3	A resposta dos macrófagos a estímulos MyD88-dependentes e a inflamação estéril.....	58
4.1.4	O eixo LTB ₄ /BLT-1 e a mortalidade na sepse.....	62
4.2	A ALI secundária a sepse e a expressão de MyD88 em macrófagos alveolares.....	67
4.2.1	A ALI secundária a sepse.....	69
4.2.2	Ativação de macrófagos alveolares na ALI e expressão de MyD88.....	81
5	DISCUSSÃO.....	87
6	CONCLUSÕES.....	100
	REFERÊNCIAS.....	102
	APÊNDICE- Artigos publicados ou submetidos para publicação durante o doutorado	117

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 1999), o termo *diabetes mellitus* descreve uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica com alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Isto ocorre devido a falha na produção de insulina, falha de sua ação ou ambos (OMS, 1999). Existe ainda uma outra categoria chamada diabetes gestacional onde o estado hiperglicêmico desenvolve-se durante a gravidez. Embora os mecanismos envolvidos ainda não estejam completamente elucidados, acredita-se que os hormônios produzidos pela placenta combinados com o aumento da gordura materna contribuem para o estado de resistência a insulina (1).

A Diabetes Tipo 1 (DT1) também é conhecida como diabetes insulina-dependente pois seu tratamento requer reposição continua de insulina para manutenção dos níveis glicêmicos. Sabe-se que existe uma forte contribuição genética para seu desenvolvimento, porém os fatores que desencadeiam a destruição autoimune das células β pancreáticas ainda não são completamente conhecidos. Linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ além de macrófagos participam desse processo e, na maioria dos casos, os pacientes desenvolvem essa autoimunidade durante a infância e a obesidade não costuma estar associada (2, 3).

Já na Diabetes Tipo 2 (DT2), diversas moléculas tem sido implicadas no desenvolvimento da resistência a insulina como ácidos graxos não esterificados circulantes, citocinas inflamatórias, adipocinas entre outros. Geralmente desenvolve-se em pacientes na fase adulta e está relacionada a obesidade, sedentarismo e uma dieta pouco saudável. O tratamento inclui não apenas dieta e exercício físico mas também drogas que aumentam a sensibilidade a insulina (4).

Os dois tipo de diabetes estão associados a uma inflamação sistêmica crônica de baixa intensidade (Inflamação estéril). Na presença de infecções, a inflamação no diabético apresenta características distintas do sadio o que os tornam mais susceptíveis a infecções. É bem estabelecido que a diabetes afeta o sistema imune em diferentes

parâmetros e, recentemente tem-se acumulado evidências que indicam uma íntima relação entre os sistemas imune e endócrino (5, 6). Na Introdução desta tese vamos rever os dados mais relevantes da literatura que abordam o estado basal de inflamação estéril, a maior mortalidade por sepse e a inflamação sistêmica e pulmonar secundária a sepse no diabético. Serão enfatizados aos aspectos moleculares envolvidos.

1.1 A inflamação estéril no diabetes

A DT1 e a DT2 apresentam uma inflamação crônica de baixa intensidade que tem um papel fundamental na patogênese e na morbidade decorrente dessas enfermidades (7, 8). Tanto a hiperglicemia como a deficiência na produção de insulina podem levar a este estado “pró-inflamatório” caracterizado pela produção aumentada de citocinas inflamatórias como interferon (IFN)- γ , fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 α e IL-1 β e os macrófago, células centrais da imunidade inata, contribuem para isso (6, 9). Essa produção aumentada de citocinas na ausência de um agente infeccioso é denominada inflamação estéril (10, 11).

Na DT2 já foi demonstrado que o receptor NLRP3 (do inglês “Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat containing Protein 3”) presente nos macrófagos infiltrados no tecido adiposo de indivíduos obesos é ativado por gorduras saturadas como ácido palmítico e ceramidas. Como consequência dessa ativação, são produzidas e secretadas IL-1 β e IL-18 que atuam de duas maneiras: A IL-1 β inibe a sinalização da insulina diretamente por fosforilar um sítio inibidor do IRS-1 (do inglês, “Insulin Receptor Substrate 1”) impedindo a sinalização do receptor da insulina. Essa citocina também induz a produção de TNF- α que, de forma semelhante a IL-1 β , também promove resistência a insulina. Além disso, a IL-18 induz diferenciação de linfócitos

CD4⁺ efetor do tipo 1 (Th1, do inglês “T Helper 1”) no tecido adiposo responsável pela produção de IFN- γ (7, 12, 13).

Embora já tenha sido descrito que pacientes com DT1 apresentam níveis séricos aumentados de IL-1, ainda não está claro como e o quê desencadeia a inflamação estéril (14). Acredita-se que alterações tanto no componente inato como no adaptativo do sistema imune contribuem para isso. Em consequência a essa inflamação, os diabéticos desenvolvem uma série de complicações como retinopatia (15), disfunções endoteliais (16), problemas de cicatrização (17) e aterosclerose (18, 19).

Outro grave problema associado a diabetes é a menor resistência a infecções, sendo responsável pela morte de 22% dos pacientes diabéticos segundo estimativa (20). Esses pacientes apresentam risco 4 vezes maior de contrair infecções que culminam em quadro de sepse além de serem mais susceptíveis a ela (21-25).

1.2 A inflamação sistêmica na sepse

A sepse definida como síndrome clínica da resposta inflamatória sistêmica, é uma doença multifatorial decorrente de uma infecção não controlada adequadamente pelo hospedeiro. Bactérias e seus componentes disseminam-se e ativam receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos, ou PAMPS (do inglês “Pathogens Associated Molecular Patterns”) presentes na membrana plasmática dos leucócitos circulantes. A ativação destes receptores inicia uma resposta inflamatória sistêmica o que desencadeia a SIRS (do inglês “Systemic Inflammatory Response Syndrome”). Essa resposta inflamatória é caracterizada pela produção descontrolada de citocinas e mediadores inflamatórios (26, 27). Estudos em pacientes sépticos mostraram que uma série de citocinas estão relacionadas com o desenvolvimento da SIRS e a mortalidade na sepse. O TNF- α e a IL-1 β são citocinas produzidas principalmente por

leucócitos mononucleares em resposta ao LPS com diversas ações como indução de febre, ativação do sistema de coagulação e indução da expressão de moléculas de adesão pelo endotélio (28, 29). A IL-6 induz a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado (30) e a IL-10 em altas concentrações plasmáticas está associada a mortalidade aumentada (31).

O grupo mais estudado de receptores envolvidos no reconhecimento de patógenos é conhecido como receptores do tipo toll ou TLR (do inglês “Toll Like Receptors”) que podem reconhecer diferentes PAMPs como ácido lipoteicóico (TLR-2), flagelina (TLR-3), LPS (TLR-4) entre outros. A maioria desses receptores está presente na membrana plasmática porém alguns (como o TLR-3, 7, 8 e 9) são intracelulares e localizam-se em vesículas (32). Na sepse causada por bactérias Gram negativas, o LPS é reconhecido pelo TLR-4 junto ao CD14 e assim inicia-se uma série de eventos intracelulares envolvendo proteínas e fatores de transcrição como AP-1 (do inglês “*activator protein*”), IRF-3 (do inglês “*Interferon regulatory factors*”) e NFκB (do inglês “*nuclear factor-kappa B*”) que transcrevem genes que codificam citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas como a ciclooxigenase (COX)-2 e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (32, 33). Mais especificamente, a cascata de sinalização do receptor TLR-4 é feita por duas vias principais, uma dependente do MyD88 (do inglês “*myeloid differentiation factor 88*”) e outra MyD88 independente. Na primeira via, o domínio TICAM (do inglês “*Toll Interleukin-1 receptor-containing adapter molecule*”) se associa à molécula adaptadora MyD88, comum a quase todos os TLR, e numa sinalização análoga a do receptor de IL-1 (IL-1R), leva à ativação da expressão de centenas de genes da resposta inflamatória induzidos pelo fator de transcrição NFκB (34, 35). A segunda via se vale das moléculas adaptadoras TRIF (do inglês “*TIR-domain-containing adapter-inducing IFN-β*”) e TRAM (“*TRIF-related adapter molecule*”), que além da sinalização via NF-κB, é também responsável pela ativação do fator IRF-3, culminando na síntese de IFN-α e β (36). Entre os mediadores inflamatórios já citados, a sepse também induz a

produção de mediadores lipídicos entre eles o leucotrieno (LT) B₄ (37-39). Esse lipídio pró-inflamatório é fundamental para ativação eficiente de NFκB pelos TLRs de forma MyD88 dependente (40).

1.3 O LTB₄ na inflamação e na regulação da expressão de MyD88

Os mediadores lipídicos gerados pelo metabolismo da enzima 5- lipoxigenase (5-LO) a partir do ácido araquidônico (AA) liberado pela clivagem de membranas pela fosfolipase (PL) A₂ são chamados de LTs. Como as células mielóides possuem grande quantidade de AA esterificado em suas membranas e expressam de forma constitutiva tanto a PLA₂ como as demais enzimas da via metabólica da 5-LO e são capazes de gerar quantidades elevadas de LTs em poucos minutos após o estímulo (41). Para que essa síntese ocorra, tanto a 5-LO como a PLA₂ precisam ser ativadas, o que pode ocorrer por aumento de cálcio intracelular, ativação essa que é potencializada posteriormente por determinadas quinases. Juntamente com a proteína acessória FLAP (do inglês “5-lipoxygenase-Activating Protein”), a 5-LO oxida o AA gerando o intermediário LTA₄ que é rapidamente hidrolisado para a geração do LTB₄ pela LTA₄ hidrolase. Se ao invés de hidrolisado, o LTA₄ for conjugado com a forma reduzida da glutathione pela LTC₄ sintase, origina-se o LTC₄, um LT da família dos cisteinil leucotrieno (cysLTs) como o LTD₄ e LTE₄. Tanto a hidrólise do LTA₄ como a conjugação deste com glutathione são reações enzimáticas. Cada célula possui seu próprio perfil de produção de LTs, e essa especificidade é dada pelo balanço na expressão dessas enzimas. Enquanto mastócitos e eosinófilos sintetizam preferencialmente os cysLTs, e os neutrófilos e células dendríticas preferencialmente LTB₄, os macrófagos tem capacidade de produzir ambos (42).

Através de seus receptores acoplados a proteína G, os LTs regulam a função de diversos tipos celulares de forma autócrina ou paracrina. Existem dois receptores em que se liga o LTB₄, o BLT-1 e o BLT-2. Enquanto o BLT-2 é um receptor de baixa

afinidade que pouco se sabe sobre suas funções fisiológicas, o BLT-1 é o receptor de alta afinidade que pode se acoplar tanto a proteína $G_{\alpha i}$ como $G_{\alpha q}$. Via proteína $G_{\alpha i}$, LTB_4 induz a inibição da atividade da adenilato ciclase levando a diminuição dos níveis intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Já através do acoplamento com a proteína $G_{\alpha q}$, há a ativação da $PLC\beta$ induzindo acúmulo de IP3 (1,4,5 Trifosfato de Inositol) e ativação da proteína quinase C (PKC). Através dessas duas vias o LTB_4 potencializa as funções dos fagócitos, como fagocitose, atividade microbicida e produção de citocinas pro-inflamatórias (43). Além disso, foi demonstrado recentemente que via proteína $G_{\alpha i}$, o LTB_4 possui papel importante na ativação de macrófagos pelos TLRs que utilizam a molécula adaptadora MyD88. Nessas células, a proteína inibidora SOCS-1 (do inglês “Suppressor of Cytokine Signaling”) controla a expressão de MyD88 por inibir a transcrição de seu fator de transcrição STAT-1 (do inglês “Signal Transducers and Activators of Transcription”). Através do BLT-1, o LTB_4 aumenta a degradação do RNA mensageiro (RNAm) de SOCS-1 e dessa forma induz a expressão de MyD88 por promover a transcrição de STAT-1 (40).

Como MyD88 é a molécula adaptadora responsável pela transdução do sinal não apenas da maioria dos TLR (exceto o TLR-3) como também dos receptores da família da IL-1 tais como receptores de IL-1, IL-18, IL-33 (REF), sua expressão é fundamental para a resposta inflamatória. Acredita-se que MyD88 esteja diretamente envolvido tanto no reconhecimento de bactérias como no de dano tecidual promovendo a resposta imune inata e a inflamação (44). De fato já foi demonstrado que essa molécula é fundamental para o desenvolvimento de uma série de doenças com cunho inflamatório como aterosclerose (45), gota (46), artrite (47) além de resistência a insulina e inflamação estéril induzida por dieta (45). Embora já esteja claro que o LTB_4 é essencial para a inflamação alérgica e para resposta inflamatória de macrófagos (42), não se conhece o seu papel na inflamação estéril.

1.4 Susceptibilidade dos diabéticos a sepse: Inflamação x Infecção

Inicialmente acreditava-se que os altos níveis de glicemia dos diabéticos seria uma fonte extra de nutriente no organismo desses pacientes favorecendo o crescimento bacteriano e tornando-os mais susceptíveis a sepse. Hoje, sabe-se que a susceptibilidade aumentada é fruto de disfunções no sistema imune desses indivíduos (48). Para entender essa maior susceptibilidade a sepse devemos considerar dois fatores de grande relevância: a infecção e a inflamação sistêmica. Conforme já discutido anteriormente, a inflamação sistêmica é consequência a infecção não controlada e uma vez que essa inflamação se estabelece, ocorre um fenômeno chamado imunoparalisia. A imunoparalisia é caracterizada por falhas na função de macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos que ao apresentam suas funções deficientes na sepse, favorecem a proliferação bacteriana (49-53). Dessa maneira, a ativação mais intensa dos receptores para PAMPs suscitaria uma resposta inflamatória aumentada, dando início a um ciclo. Não está claro a exata contribuição de cada um desses fatores na mortalidade da sepse, porém enquanto alguns trabalhos demonstraram que o controle da infecção reverte o quadro inflamatório (54, 55), outros indicaram que ao controlar a inflamação, a infecção também passa a ser controlada (56, 57).

Analisando o fator infecção, os diabéticos apresentam uma série de defeitos no sistema imune que dificultam o controle dos patógenos. A falha da migração de leucócitos nos diabéticos já foi descrita em diversos modelos (58, 59). Neutrófilos de camundongos diabéticos expressam menos receptor para a quimiocina CXCR2 quando comparado aos não-diabéticos. Esse receptor é um dos responsável pela sua migração para o foco infeccioso e essa falha foi associada a maior susceptibilidade a sepse (59). Mais ainda, além dos fagócitos de diabéticos apresentam capacidade fagocítica reduzida para Candida albicans (60), zymosan (61), partículas opsonizadas por IgG (62) e

bactérias (63, 64), eles também possuem menor capacidade microbicida (61). Juntos, esses fatores favorecem a disseminação do patógeno pelo organismo do hospedeiro.

Assim, a maior disseminação dos patógenos nos diabéticos pelos fatores descritos induziria uma inflamação sistêmica mais intensa que, somada a inflamação estéril, causaria maior mortalidade dos diabéticos com sepse. Dado o papel central de MyD88 tanto na inflamação estéril como na SIRS decorrente da sepse, seria de interesse investigar a expressão de MyD88 e os mecanismos envolvidos em sua regulação, em macrófagos de diabéticos e seu efeito sobre esses dois tipos de inflamação.

1.5 A inflamação pulmonar secundária a sepse

Os leucócitos que foram ativados na circulação durante a sepse podem migrar para os tecidos causando inflamações secundárias em diversos órgãos tais como rins, coração e pulmão (26). Dentre estes, o pulmão é particularmente afetado desenvolvendo uma inflamação aguda chamada ALI (do inglês “Acute Lung Injury”) ou sua forma mais severa, ARDS (do inglês “Acute Respiratory Distress Syndrome”). Cerca de 50% dos pacientes com sepse desenvolvem inflamação pulmonar (65, 66). Apesar da incidência e susceptibilidade a sepse serem maiores nos diabéticos, a inflamação pulmonar secundária a sepse ocorre com menos frequência nesses pacientes (67, 68) e a razão disto não se conhece .

O processo patológico na ALI inicia-se com lesão do endotélio capilar no alvéolo resultando em edema e prejuízo nas trocas gasosas. Esse quadro progride com colapso alveolar, denudação da membrana basal epitelial, e perda das células do revestimento alveolar. Após essa fase, alguns pacientes evoluem para um quadro de fibrose onde os espaços alveolares são preenchidos por células mesenquimais e seus produtos junto com novos vasos sanguíneos. Esses achados de fibrose alveolítica se correlacionam com

aumento do risco de morte e esses pacientes apresentam perda da sua capacidade pulmonar (69-71). Embora essa fase proliferativa seja tradicionalmente descrita como um evento tardio, acredita-se que a ativação de fibroblastos se inicie de forma bastante precoce (72). Estudos demonstraram que o lavado bronco alveolar (BAL) colhido após 24h de ALI estimula proliferação e produção de colágeno tipo III em culturas de fibroblasto (73, 74). Outro estudo demonstrou que o lavado bronco alveolar (BAL) colhido na fase inicial da ALI promoveu a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos avaliada pela expressão de α -sma (do inglês “alpha smooth muscle actin”) de forma parcialmente dependente de TGF- β (do inglês “Transforming growth factor beta”) (75). Em diabéticos entretanto, as características da ALI secundária a sepse e os mecanismos envolvidos não são conhecidos.

Tendo em vista o papel central da molécula adaptadora MyD88, essencial na ativação de receptores da família TLR/IL-1R, foi nosso objetivo estudar os mecanismos moleculares envolvidos na regulação de sua expressão em macrófagos e consequências na inflamação estéril e decorrente da sepse (sistêmica e pulmonar) em modelos experimentais de diabetes.

3.1 Animais

Camundongos machos com 8 semanas de idade 5-LO^{-/-} (B6.129-Alox5tm1Fun) (76), BLT1^{-/-} (B6.129S4-Ltb4r1tm1Adl/J) (77) e a linhagem WT C57BL/6, NOD/ShiLtJ (78) e a linhagem WT ICR/HAL, db/db e db/+ C57BLKS/J, e db/db e db/db+ C57BL/6J foram obtidos dos laboratórios Jackson e mantidos de acordo com o guia para uso de animais de experimentação do *National Institute of Health* (NIH) para uso experimental com aprovação do comitê de ética de uso e cuidados de animais de experimentação da Indiana University. Ratos Wistar machos obtidos do Biotério Central de criação do Instituto de Ciências Biomédicas I da USP foram utilizados segundo os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA).

3.2 Indução da diabetes

Nos camundongos, a DT1 foi induzida com 5 doses i.p. por 5 dias consecutivos de estreptozotocina (STZ) (40 mg/Kg) em tampão de citrato (0,1 M pH 4,5). Nos ratos foi induzida com uma única dose de aloxana (ALX) (42 mg/Kg) em solução salina (NaCl 0,9%) i.v. A glicemia foi medida 10 dias após a última dose em um gota de sangue obtida da cauda dos animais utilizando Accu-Check Advantage II (Roche Diagnóstica, São Paulo, SP, Brazil). Foram considerados diabéticos os animais com glicemia igual ou superior a 300 mg/dL em dois dias consecutivos. Os animais controles receberam apenas o veículo.

3.3 Obtenção de macrófago

Macrófagos peritoneais residentes de camundongos foram obtidos após eutanásia em câmara de CO₂ através de lavagem peritoneal com 8 mL de PBS gelado. Macrófagos alveolares de ratos foram obtidos após eutanásia em câmara de CO₂ através de BAL com 10 mL de PBS gelado. As células foram colocadas para aderir em placa petri por 1 hora (37° C, 5% CO₂) e lavadas 2 vezes com RPMI a 37° C resultando em 99% de macrófagos (79).

Macrófagos diferenciados de medula de camundongo foram isolados conforme descrito por Davis e colaboradores (2005) (80) com pequenas modificações. As células da medula óssea foram obtidas de fêmures com PBS utilizando agulha de 26 x 12 gauge após eutanásia do animal em câmara de CO₂ e cultivadas em placa petri (37° C, 5%CO₂) com DMEM (Gibco, Long Island, NY, USA) na presença de M-CSF 20 ng/mL. No 3° dia o meio foi trocado com adição de M-CSF 20 ng/mL e no 6° dia os macrófagos aderidos foram lavados com meio a 37° C 2 vezes. Dessa maneira, 96% das células aderidas são F4/80⁺ e CD11b⁺.

3.4 Tratamentos

In vitro: Macrófagos peritoneais de camundongos foram estimulados com LPS (100 ng/mL – Sigma Aldrich), LTB₄ (100 nM – Cayman Chemical), IL-1 β (10 ng/mL – Sigma-Aldrich), ou insulina (1 mU/mL – Life Technologies) por 24 h seguido de isolamento de RNAm e coleta do sobrenadante para detecção de LTB₄, citocinas ou NO.

In vivo: Animais diabéticos foram tratados com AA-851 (50 mg/Kg em PBS – Sigma-Aldrich) duas vezes ao dia por 1 ou 6 dias ou tratados com insulina 2 UI duas vezes ao dia por 2 dias.

3.5 Isolamento de RNAm e PCR em tempo real (RT-PCR)

O RNAm total dos macrófagos foi isolado utilizando a coluna do kit comercial RNeasy (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante e quantificados com espectrofotômetro a um comprimento de 260 nm. O cDNA foi sintetizado utilizando o sistema de transcriptase reversa (miScript II, Qiagen), e o RNAm de interesse foi amplificado por RT-PCR (CFX96 Real-Time PCR Detection System – Bio-Rad Laboratories) utilizando primers para Myd88, Stat1, Socs-1, Alox-5, Ltb4r1, Trif, Ticam e β -actina (Integrated DNA Technologies). A expressão relativa foi calculada utilizando o método comparativo de Ct e expressos em relação ao controle ou WT (método $\Delta\Delta Ct$) (81).

3.6 Ensaio de Imunoprecipitação da Cromatina (ChIP)

O ensaio foi realizado utilizando do kit comercial SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP (Cell Signaling Technology) de acordo com instruções do fabricante. A cromatina foi fixada e cross-ligada com 1 % de formaldeído, digerida com nucleasse de *Micrococcus* e sonicada (UP100H; Hielscher) para obtenção de fragmentos de aproximadamente 150-900 pares de base. A cromatina digerida foi imunoprecipitada com anticorpo contra c-Jun (1:100; Cell Signaling) ou contra STAT-1 (1:50; clone H-300). Anticorpo IgG de coelho (1:100) e contra histona H3 (1:50) (Cell Signaling) foram utilizadas como controle negativo e positivo respectivamente. Para cada imunoprecipitação, foi utilizado 20 μ g de cromatina fixada e cross-ligada diluída em tampão ChIP com volume final de 0,5 mL, adicionado o anticorpo específico e incubado por 4h a temperatura ambiente sob rotação. Os complexos imune foram capturados utilizando 30 μ L de beads magnéticas (Cell Signaling Technology) de acordo com instruções do fabricante. A cromatina foi eluída das beads magnéticas pela incubação

por 30 minutos a 60 °C com tampão de eluição e as proteínas digeridas com proteinase K (Cell Signaling Technology) por 2 h a 65 °C. O DNA foi purificado com auxílio de colunas de separação (Qiagen) e as amostras foram testas com primers específicos para regiões promotoras dos genes de STAT-1 e MyD88 (conforme tabela abaixo) por RT-PCR.

	sense	anti-sense
MyD88 promotor 1	CACAAGTGGGTTGACTTTTAGGCT	GGCAGGCAACCCTGGGCCCCCGG
MyD88 promotor 2	AATAGATTAACCAAGTGAATTAA	TATTCTGGTAGTAGGGAGGGAAGAG
MyD88 promotor 3	GAAGGAGGTTTCCCAAACCTTCTGGTT	ACCCGGGGCTGAGCACAGCAAA
STAT-1 promotor 1	CAGGATGGAGGTTCTCAACCT	GTGAACGGATATCTGCAGCTC
STAT-1 promotor 2	GTGAACGGATATCTGCAGCTC	GGAAGTGCTTGTGAGCTATC
STAT-1 promotor 2	CAGTGGGTAGAAGGTCTTGCT	AGTGCATTGGAAAGCTGG

3.7 Immunoblot

Os macrófagos foram lisados com tampão (1 % Nonidet P-40, 0,5 % deoxicolato de sódio, 0,1 % SDS, 2 mM ortovanadato de sódio e coquetel inibidor de protease – Roche Scientific) e a concentração de proteínas foi determinada utilizando o kit comercial BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology) de acordo com instruções do fabricante. Quantidades iguais de proteína foram separadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e transferidas para membranas de nitrocelulose (Protran B83, GE HealthCare). As membranas foram bloqueadas com leite 7 % em Tampão Tris com 0,1 % Tween (TBST) e incubadas *overnight* com os seguintes anticorpos em tampão TBST com

2 % de BSA: MyD88 (1:500; Abcam), STAT-1 (1:500; Abcam), p-cJUN (1:500; Cell Signaling), cJUN (1:500; Cell Signaling), COX-2 (1:100; Cayman Chemicals), p-IkB α (1:500; Cell Signaling) p-p65 (1:500; Cell Signaling) ou β -actina (1:10.000; Sigma-Aldrich). Posteriormente, após lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário apropriado (anti-rabbit Sigma ou anti-mouse Sigma) conjugado com peroxidase e reagente quimioluminescente (ECL Western Blotting Substrate, Pierce) para finalmente ser exposto a filme fotográfico.

3.8 Dosagem de citocinas, insulina, LTB₄ e nitrito

Foram dosados TNF- α , IL-10, IL-1 β e IL-1RA por ELISA com o kit comercial DuoSet (R&D Systems) e LTB₄ por EIA (Cayman Chemicals) segundo instruções dos fabricantes. Insulina foi dosado por ELISA com o kit comercial (Millipore). Nitrito, o derivado estável oxidado de NO foi dosado utilizando o método de Griess conforme descrito (82).

3.9 Indução da sepse polimicrobiana

A sepse foi induzida por CLP conforme descrito (57) com pequenas modificações. Os animais foram anestesiados com ketamina : xylazina (ratos -150 mg/KG : 10 mg/Kg e camundongos 100 mg/KG : 10 mg/Kg i.p.), e foi induzida sepse severa com 6 perfurações no ceco utilizando agulha de 18 gauge nos camundongos e 12 perfurações com agulha de 20 gauge nos ratos. Um grupo de camundongos diabéticos foi tratado com AA-861 (50 mg/Kg i.p.; Cayman Chemical) 8 e 16 horas antes da cirurgia e 2 vezes ao dia após a cirurgia (Figura 11). A sobrevivência foi monitorada a cada 12 horas por 6 dias após CLP. Animais com sinais de morte iminente (incapacidade de manter postura/ ataxia/tremor e ou respiração ofegante) foram eutanasiados em câmara de CO₂. Em um

outro grupo experimental, os camundongos foram eutanasiados 6 horas após indução da sepse em câmara de CO₂ para determinação da bacteremia, produção de citocinas e migração de leucócitos. Para avaliação da inflamação pulmonar os ratos foram eutanasiados 6 horas após a indução da sepse em câmara de CO₂.

3.10 Bacteremia

Após 6 horas de CLP a cavidade peritoneal dos camundongos foram lavadas com PBS, e alíquotas de diluição seriada foram plaqueadas em agar Mueller-Hinton conforme descrito (57).

3.11 Contagem de leucócitos na cavidade peritoneal

O número de leucócitos na cavidade peritoneal dos camundongos após 6 horas de CLP foi determinado utilizando Hemavet HV950FS System conforme descrito (57).

3.12 Contagem de leucócitos nos espaços aéreos

Após 6 horas de CLP, os ratos foram submetidos a eutanásia em câmara de CO₂, a traqueia canulada para obtenção o LBA (PBS gelado) que foi posteriormente centrifugado a 300g por 10 minutos. O sobrenadante foi aliqotado para dosagem de LTB₄ conforme descrito no item 3.8 e as células ressuspendidas em PBS para contagem com auxílio da câmara de Neubauer. Para contagem diferencial as células foram aderidas a lâmina de vidro com auxilio de uma centrifuga histológica e coradas com hematoxilina e eosina (HE).

3.13 Histologia

Após serem lavados com PBS gelado, os pulmões foram fixados em formalina e processados para inclusão em parafina. Cortes de 5 μ m foram feitos, aderidos em lâminas e corados com HE ou conforme descrito na seção 3.14- Imunohistoquímica. O material foi analisado em um microscópio Nikon Eclipse E600 e as imagens foram capturadas utilizando-se uma câmera digital Nikon DXM1200C.

3.13.1 Morfometria das células inflamatórias

O índice de polimorfonucleares e mononucleares foi determinado pela técnica *point-counting* com auxílio de um retículo contendo 100 pontos e 50 retas acoplado a um microscópio óptico convencional a um aumento de 400x conforme descrito (83). Pontos sobre as células mononucleares e polimorfonucleares foram contados e divididos pelo total de intersecções sobre o espaço alveolar. Foram analisados 10 campos distintos por animal (n=5 animais).

3.13.2 Morfometria do edema

O índice do edema perivascular foi determinado nos vasos do eixo bronco-vascular. Foram contados os pontos que caíam na região de edema e a raiz quadrada desse valor dividida pela quantidade de intersecções no vasos. Foram analisados 10 campos distintos por animal (n= 5 animais).

3.14 Imunohistoquímica

Os cortes histológicos de pulmões foram desparafinizados em dois banhos subsequentes de xilol durante 30 minutos e hidratados em escala decrescente de etanol (100%, 95% e 70%) e depois em água destilada. O material foi submetido a um passo de recuperação antigênica em tampão citrato de sódio 10 mM a 90° C durante 20 minutos, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado incubando o material com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em PBS por 30 minutos para posterior bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos com BSA 10% por 30 minutos. Os cortes foram incubados *overnight* com anticorpos primários contra TGF- β (1:100, Rockland) e α -sma (1:20 Abcam) em PBS com Tween 0,3%. Posteriormente após lavagem com PBS os cortes foram incubados com anticorpo secundário conjugado com biotina (VectorLabs) por 1 hora a temperatura ambiente e com streptoavidina conjugada com peroxidase (Kit ABC Vector) por 1 hora a temperatura ambiente. Para revelação foi utilizada 0,03% de 3,3'-diaminobenzidine (DAB) em PBS com 0,8% de H₂O₂. Foi realizada a contra-coloração com hematoxilina de Mayer, a desidratação em escala crescente de álcoois para posterior diafanização em xilol e montagem em meio VectaMount (VectorLabs).

3.14.1 Morfometria

A marcação positiva foi quantificada com auxílio do software NIS Elements AR 2.30 Imaging. Foram analisados 10 campos do parênquima pulmonar de cada animal e calculada a média da área e o desvio padrão da média (n= 5 animais).

3.15 Análise estatística

As curvas de sobrevida estão expressas em percentual de sobrevivência e foram analisadas pelo teste Log-rank (Mantel-Cox). A bacteremia está expressa pela mediana. Os outros resultados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão da média (DPM) e analisados por ANOVA seguido pela análise de Bonferroni. Foram consideradas significativas as diferenças onde $p < 0,05$.

4.1 A regulação de MyD88 na inflamação estéril e na inflamação decorrente da sepse em diabéticos

Nestes estudos utilizamos diferentes modelos murinos de diabetes. A streptozotocina é uma droga diabetogênica que provoca a destruição das células beta pancreáticas ao passo que em camundongos da linhagem NOD, a destruição das células beta ocorre de forma espontânea por mecanismos autoimunes (84-86). Ambos são modelos clássicos para o estudo da DT1. Já as linhagens de camundongos db/db C57BLKS/J e db/db C57BL/6J são deficientes do receptor de leptina e ambas desenvolvem DT2 causada por resistência a insulina em consequência a obesidade (87). Conforme pode ser observado na figura 1, a diabetes, avaliada pelo o nível glicêmico, se desenvolveu com sucesso nos diferentes modelos utilizados

Figura 1- Glicemia em diferentes modelos murinos de diabetes

A DT1 foi induzida quimicamente com 5 injeções consecutivas diárias de STZ (40mg/Kg) e a glicemia foi medida 10 dias após a última dose. Os animais db/db desenvolvem DT2 espontaneamente e a glicemia foi medida na 10ª semana de vida. * $p < 0,05$ vs controle.

4.1.1 A expressão de MyD88 e STAT-1 em diferentes sub-populações de macrófagos de animais com DT1

Hipotetizamos que a inflamação estéril nos diabéticos se correlacionava com níveis mais elevados de MyD88 em macrófagos. Observamos que macrófagos peritoneais residentes de animais diabéticos (STZ) apresentavam maior expressão do RNAm de MyD88 e de STAT-1 (Figura 2A). O mesmo foi observado para macrófagos alveolares (Figura 2B). Quando avaliamos macrófagos diferenciados *in vitro* a partir da medula óssea, identificamos que os obtidos a partir da medula de animais diabéticos (STZ) apresentaram maior expressão do RNAm de MyD88 em comparação aos diferenciados da medula de não-diabéticos. O mesmo não foi observado para o RNAm de STAT-1 (Figura 2C).

Como um dos objetivos desse trabalho foi estudar a resposta a sepse, optamos por trabalhar com os macrófagos residentes peritoneais.

Figura 2- Macrófagos de animais diabéticos expressam níveis mais elevados de MyD88 comparado aos de animais controle

Expressão do RNAm de MyD88 e STAT-1 em macrófagos (A) peritoneais residentes, (B) alveolares e (C) derivados de medula óssea de animais diabéticos (STZ) e não-diabéticos (Ct), determinado por RT-PCR. Resultados expressos em média $\pm$ DPM de pelo menos 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ vs controle.

Avaliando a expressão de proteína nos macrófagos residentes, verificamos que de forma semelhante ao observado em RNAm, as células dos diabéticos (STZ) expressavam mais MyD88 e STAT-1 (Figura 3A). Os macrófagos de camundongos diabéticos NOD, seguiram o mesmo perfil observado nos obtidos de animais com diabetes induzida por STZ (Figura 3B). Verificamos ainda nesse modelo de diabetes espontânea que, entre diferentes moléculas adaptadoras, apenas o MyD88 teve sua expressão aumentada nos diabéticos (NOD). Tanto TRIF como TICAM estavam expressos em níveis semelhantes nos diabéticos (NOD) e não-diabéticos (Figura 3C).

Figura 3- A expressão de MyD88, mas não de outras moléculas adaptadoras, está aumentada em macrófagos de animais com DT1

(A) Expressão proteica de MyD88, T-STAT1 e β -actina em macrófagos peritoneais de animais controle e diabéticos determinado por *imunoblot*. Resultados representativos de 3 experimentos independentes. Os números abaixo de cada banda do gel indicam a densidade relativa de MyD88 e T-STAT-1 em relação a β -actina, determinada por análise densitométrica e expressos em média $\pm$ SEM. (B) Expressão de RNAm de MyD88 e STAT-1 em macrófagos de animais diabéticos (NOD) e controles determinados por RT-PCR. (C) Expressão de RNAm de TICAM e TRIF em macrófagos de animais diabéticos (STZ) e controles, determinado por RT-PCR. Resultados expressos em média $\pm$ DPM de pelo menos 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ vs controle.

Decidimos então investigar se o aumento na expressão de MyD88 dos macrófagos era dependente do tipo da diabetes. Primeiramente observamos que quando retirados de camundongos com DT2 (da linhagem db/db C57BLKS/J), tanto macrófagos de diabéticos como de não-diabéticos expressavam níveis semelhantes do RNAm de MyD88 e STAT-1 (Figura 4A). Para confirmar esse resultado, utilizamos ainda uma segunda linhagem de camundongo que desenvolve DT2, a linhagem db/db C57BL/6J. Essa linhagem sofre influencia de seu fundo (C57BL/6) e assim desenvolve hiperplasia compensatória das células beta produzindo níveis mais elevados de insulina (88, 89). Conforme esperado, os animais db/db C57BLKS/J apresentaram níveis de insulina 20 vezes maiores que os da linhagem db/db C57BL/6J (Figura 4B). Quando comparamos a expressão proteica nos macrófagos desses animais, não observamos alteração na expressão de MyD88 em nenhuma das duas linhagens com DT2 (Figura 4C). Como o aumento na expressão de MyD88 ocorreu apenas em animais com DT1 e a principal diferença entre os dois tipos de diabetes é a produção de insulina, investigamos a hipótese da insulina exercer efeito inibitório sobre a expressão de MyD88 em macrófagos. Quando estimulamos em cultura macrófagos obtidos de animais não-diabéticos com insulina, observamos que a expressão do RNAm de MyD88 e STAT-1 foi inibida logo nas primeiras horas e se manteve baixa por pelo menos 24 horas (Figura 4D).

Figura 4- A deficiência na produção de insulina na DT1 induz aumento na expressão de MyD88/STAT-1

(A) Expressão de RNAm de MyD88 e STAT-1 em macrófagos de animais com DT2 (C57BLKS/J) e controles determinados por RT-PCR. (B) Níveis séricos de insulina dos animais com DT1 (STZ), DT2 e seus controles determinados por ELISA. (C) Expressão proteica de MyD88 e β -actina em macrófagos peritoneais de animais com DT2 e seus controles determinada por *imunoblot*. Resultados representativos de 3 experimentos independentes. (D) Macrófagos de animais C57BL/6J não-diabéticos foram estimulados *in vitro* com 1mU de insulina por 24h e a expressão de RNAm de MyD88 e STAT-1 foi determinada por RT-PCR. Resultados expressos em média $\pm$ DPM de pelo menos 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ vs controle; # $p < 0,05$ vs db/db C57BLKS/J; & $p < 0,05$ vs db/db C57BL/6J.

4.1.2 O LTB₄ na expressão de MyD88 em macrófagos de DT1

Serezani e colaboradores demonstraram que o LTB₄ regula positivamente a expressão de MyD88 em macrófagos através de seu receptor de alta afinidade BLT-1. Como já foi demonstrado que o tratamento com insulina diminui a ativação de NFκB em monócitos humanos (90), examinamos a hipótese de que o LTB₄ seria responsável pela expressão aumentada de MyD88 nos animais com DT1. Como vimos que o aumento na expressão de MyD88 se correlacionou com baixos níveis de insulina inicialmente avaliamos a síntese de 5-LO e a expressão de BLT-1 em macrófagos de animais não-diabéticos estimulados *in vitro* com insulina. Observamos que, de forma semelhante ao observado com MyD88 e STAT-1, a insulina inibe a expressão do RNAm tanto da enzima 5-LO como do receptor BLT-1 logo nas primeiras horas e que essa inibição perdura por pelo menos 24 horas (Figura 5A). Quando investigamos a expressão dessas moléculas, observamos que a expressão basal da 5-LO nos macrófagos dos diabéticos (STZ) já era maior que nos não-diabéticos, embora não houvesse diferença na expressão de BLT-1 (Figura 5B). Do mesmo modo, a produção basal de LTB₄ por macrófagos provenientes de animais diabéticos (STZ) foi significativamente maior que a de animais não-diabéticos (figura 5C). Além disso, tanto camundongos diabéticos NOD como os com diabetes induzida por STZ apresentam níveis séricos de LTB₄ três vezes maiores que os encontrados nos animais controle (Figura 5D).

Figura 5- A deficiência na produção de insulina na DT1 correlaciona-se com a produção aumentada de LTB₄

(A) Macrófagos de animais C57BL/6J não-diabéticos foram estimulados *in vitro* com 1mU de insulina por 24h e a expressão de RNAm de 5-LO e BLT-1 foi determinada por RT-PCR. * $p < 0,05$ vs controle. (B) Expressão de RNAm de 5-LO e BLT-1 em macrófagos de animais diabéticos (STZ) e controles determinados por RT-PCR. (C) Concentração de LTB₄ após 24h de cultura *in vitro* de macrófagos de animais diabéticos (STZ) e não-diabéticos determinado por ELISA. (D) Níveis séricos de LTB₄ em animais diabéticos (STZ e NOD) e seus controles determinado por ELISA. Resultados expressos em média $\pm$ DPM de pelo menos 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ vs controle ou ICR/HAL.

Para determinar se o aumento na expressão de MyD88 nos macrófagos de diabéticos era dependente da produção aumentada de LTB₄ nessa doença, induzimos DT1 (STZ) em animais deficientes para 5-LO e BLT-1. Observamos que tanto a falta da enzima geradora de LTs como do receptor do LTB₄ impede o aumento nos níveis de RNAm de MyD88 e STAT-1 nos macrófagos de animais com DT1 (Figura 6A e B)

Figura 6- O aumento da expressão de MyD88/STAT-1 na DT1 é dependente de LTB₄

Expressão do RNAm de MyD88 (A) e STAT-1 (B) em macrófagos de animais WT, 5-LO^{-/-} e BLT-1^{-/-} de diabéticos (STZ) e não-diabéticos determinada por RT-PCR. Resultados expressos em média ± DPM de pelo menos 3 experimentos independentes. *p<0,05 vs controle WT; #p<0,05 vs STZ WT.

Nosso próximo passo foi investigar o programa molecular envolvido na indução de STAT-1 pelo LTB₄. O fator de transcrição AP-1 (do inglês “Activator Protein 1”) é um heterodímero compostos por proteínas das famílias c-Fos, c-Jun e ATF que é ativado em uma série de estímulos fisiológicos ou patológicos (91). Sendo a subunidade c-Jun a responsável pela transcrição do RNAm de STAT-1 (92), investigamos se o LTB₄ produzido na DT1 promove a expressão de STAT-1 via c-Jun. Inicialmente identificamos que embora a expressão de c-Jun ocorreu de forma semelhante tanto nos macrófagos de diabéticos como nos dos não-diabéticos, nos macrófagos de animais com DT1 (STZ) houve a fosforilação na serina 73, que é essencial para a atividade transcricional de c-Jun (93). Mais ainda, essa fosforilação foi dependente de LTB₄, uma vez que não ocorreu nas células dos animais diabéticos deficientes para 5-LO (Figura 7A). Além disso, a DT1 (STZ) promoveu a ligação de c-Jun a duas regiões promotoras diferentes do gene de STAT-1 nos macrófagos de forma dependente de LTB₄ (Figura 7B). Investigamos ainda se além de promover a ligação de c-Jun às regiões promotoras do gene de STAT-1, o LTB₄ induzia a ligação de STAT-1 a regiões promotoras do gene de MyD88 nos macrófagos. Verificamos que o estímulo *in vitro* de macrófagos de animais não-diabéticos com LTB₄ induziu a ligação de STAT-1 em uma das regiões promotoras do gene de MyD88 (Figura 7C).

Figura 7- O LTB₄ promove aumento de MyD88 via c-JUN/STAT-1

(A) Fosforilação e expressão de c-Jun em macrófagos de animais diabéticos (STZ) e não-diabéticos W.T. e 5LO^{-/-} determinada por *imunoblot*. Resultados representativos de 3 experimentos independentes. Os números abaixo de cada banda do gel indicam a densidade relativa de p-cJun em relação a t-c-Jun determinada por análise densitométrica e expressos em média $\pm$ SEM. (B e C) Cromatina de macrófagos diabéticos (STZ) e não-diabéticos de animais W.T. e 5-LO^{-/-} fixada com formaldeído foram imunoprecipitadas com (B) c-Jun e (C) STAT-1 complexado com a cromatina usando anticorpos específicos. A quantidade de fator de transcrição ligada a 3 regiões promotoras do gene de STAT-1 e MyD88 foi determinada por RT-PCR com primers específicos para essas regiões. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de pelo menos 3 experimentos independentes (n=4). *p<0,05 vs controle; #p>0,05 vs diabético (STZ) WT

Dessa maneira, demonstramos que na DT1 o aumento na expressão de MyD88 é dependente da produção aumentada de LTB₄ que, por sua vez, promove a ativação e a ligação de c-Jun em regiões promotoras do gene de STAT-1 além de promover a ligação de STAT-1 em uma região promotora do gene de MyD88.

Em seguida, investigamos o efeito do tratamento *in vivo* com insulina na produção sistêmica de LTB₄ e na expressão de 5-LO e MyD88 em macrófagos. Apesar da glicemia não ter sido controlada ao mesmo nível encontrado nos animais não-diabéticos (Figura 8A), o tratamento restaurou a expressão do RNAm tanto de 5-LO (Figura 8B) como de MyD88 (Figura 8C). Observamos também que esse tratamento restaurou a produção de LTB₄ sérico ao mesmo nível do encontrado em animais não-diabéticos (Figura 8D).

Figura 8- A insulina controla a expressão de MyD88 via LTB₄

Animais diabéticos (STZ) foram tratados com insulina de 12/12h por 2 dias e os macrófagos foram isolados. Foi determinada a glicemia dos animais (A). A expressão de RNAm de 5-LO (B) e MyD88 (C) nos macrófagos foi determinada por RT-PCR. Os níveis séricos de LTB₄ foi determinado por ELISA. Resultados expressos em média $\pm$ DPM de pelo menos 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ vs Ct; # $p < 0,05$ vs STZ.

4.1.3 A resposta dos macrófagos a estímulos MyD88-dependentes e a inflamação estéril

Em seguida, investigamos se o aumento de MyD88 induzido por LTB₄ nos macrófagos de diabéticos refletiria em maior responsividade a estímulos MyD88 dependentes e se contribuiria para a inflamação estéril. Observamos que quando estimulados com IL-1 β , macrófagos de diabéticos induzem maior expressão de MyD88 (Figura 9A) e produzem mais nitrito (Figura 9B) quando comparados aos obtidos de animais não diabéticos. O mesmo perfil foi observado para o estímulo com LPS, quando retirados de animais diabéticos, os macrófagos expressam mais MyD88 (Figura 9C), STAT-1 (Figura 9D), iNOS (Figura 9E) e produzem mais NO (Figura 9F) após esse estímulo do que os de animais não-diabéticos.

Figura 9- Macrófagos de animais com DT1 apresentam responsividade aumenta a estímulos MyD88 dependentes

Macrófagos de animais diabéticos (STZ) e não-diabéticos foram estimulados *in vitro* com 10 ng/mL de IL-1β (A e B) ou 100ng/mL de LPS (C a F) por 24h e as células e o sobrenadante foram colhidos. Expressão de RNAm de MyD88 (A e C), STAT-1 (D), iNOS (E) foi determinada por RT-PCR. Produção de nitrito no sobrenadante foi determinado por reação de Griess. Resultados expressos em média $\pm$ DPM de pelo menos 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ vs controle não-diabético; # $p < 0,05$ vs não-diabético tratado com LPS ou IL-1β e & $p < 0,05$ vs diabético (STZ) não estimulado.

Uma vez que a maioria das morbidades associadas a diabetes estão relacionadas a inflamação estéril (6), e nossos resultados demonstraram que o LTB₄ é responsável pelo aumento na expressão de MyD88, investigamos a contribuição do LTB₄ para a inflamação estéril. Enquanto os animais diabéticos apresentaram concentrações significativamente mais elevadas tanto de IL-1 β como TNF- α que os não-diabéticos (3 vezes maior para IL-1 β e 20 vezes para TNF- α), o tratamento com a droga inibidora da 5-LO (AA-861) reduziu esses níveis aos encontrados nos animais não-diabéticos (Figura 10A e B). Além disso, os camundongos diabéticos apresentaram níveis reduzidos do antagonista do receptor para IL1, IL1Ra, quando comparados aos não-diabéticos e o tratamento com AA-861 aumentou a produção de IL1Ra no soro dos diabéticos (Figura 10C). Confirmamos que a inflamação estéril na DT1 é dependente de LTB₄ uma vez que a indução de DT1 (STZ) em animais deficientes para 5-LO e BLT-1 não aumenta a produção de IL-1 β (Figura 10D). Além disso, a produção de TNF- α foi parcialmente dependente da ação de LTB₄ (Figura 10E).

Figura 10- LTB₄ é responsável pela inflamação estéril na DT1

Animais C57BL/6J diabéticos (STZ) foram tratados ou não com o inibidor da 5-LO AA-861 1 vez ao dia por 2 dias e os níveis séricos de IL-1 β (A), IL-1RA (B) e TNF- α (C) foram determinados por ELISA. Foi induzido diabetes (STZ) em animais W.T., 5-LO $^{-/-}$ e BLT1 $^{-/-}$ e determinado os níveis séricos de IL-1 β (D) e TNF- α (E) por ELISA. Resultados expressos em média $\pm$ DPM de pelo menos 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ vs controle ou WT não-diabético, # $p < 0,05$ vs diabético (STZ) não tratado ou K.O. não-diabético.

Juntos esses resultados indicam que o LTB₄ induz uma inflamação estéril nos camundongos com DT1 por 3 mecanismos: indução da produção de IL-1 β , inibição da produção de IL-1RA e aumento da responsividade do receptor de IL-1 por aumentar a expressão de MyD88.

4.1.4 O eixo LTB₄/BLT-1 e a mortalidade na sepse

Investigamos a hipótese da inflamação estéril iniciada pelo LTB₄ na DT1 potencializar a SIRS e assim contribuir para a mortalidade na sepse. Para isso, utilizamos duas abordagens diferentes esquematizadas na Figura 11. Tratamos camundongos diabéticos com AA-861 16 e 8 horas antes da indução de sepse e avaliamos a produção de citocinas e bacteremia. Para estudar a sobrevida, além do tratamento antes do CLP, também tratamos os camundongos duas vezes ao dia com AA-861 durante o período do experimento.

Figura 11- Protocolo utilizado para estudar a SIRS

Protocolo de tratamento para inibição da síntese de LTs na determinação dos parâmetros envolvidos na severidade e sobrevida na sepse.

Ao analisarmos a produção de citocinas, verificamos que os diabéticos respondem de forma mais intensa a sepse evidenciada pelos níveis mais elevados de citocinas no sangue e na cavidade peritoneal. Esse aumento é bastante evidente tanto para IL-1 β no sangue (diabéticos produzem 30 vezes mais) como para TNF- α na cavidade peritoneal (diabéticos produzem 10 vezes mais). Não foram detectados níveis de TNF- α no sangue (dados não mostrados). A inibição da síntese de LTs pelo tratamento com AA-861 reduziu significativamente os níveis de citocinas nos diabéticos (Figura 12A a E). Quando investigamos a produção de IL-1RA, verificamos que embora a sepse tenha induzido níveis semelhantes em diabéticos e não-diabéticos, o tratamento com AA-861 aumentou sua produção nos diabéticos (Figura 12B).

Figura 12- A produção aumentada de citocinas pelos diabéticos é dependente de LTB₄

Animais C57BL/6J não-diabéticos e diabéticos (STZ) tratados ou não com AA-861 foram submetidos a CLP conforme descrito em materiais e métodos. Concentração de IL-1 β (A), IL-1RA (B) e TNF- α (C) no sangue e IL-1 β (D) e IL-10 (E) na cavidade peritoneal foram determinadas após 6 horas de sepse por ELISA. Resultados expressos em média $\pm$ DPM de pelo menos 3 experimentos independentes (n=5) *p<0,05 vs não-diabético; #p<0,05 vs diabético (STZ) não tratado.

Com relação a bacteremia, observamos que nos diabéticos houve maior proliferação de bactérias na cavidade peritoneal e maior disseminação para o sangue. O

tratamento com AA-861 apesar de ter diminuído a quantidade de bactérias na cavidade peritoneal, promoveu sua disseminação sistêmica (Figura 13A e B). Não houve diferença na migração de leucócitos para a cavidade peritoneal (dados não mostrados)

Figura 13- A inibição de LTB₄ promove o controle bacteriano na cavidade peritoneal embora favoreça sua disseminação sistêmica

Animais C57BL/6J não-diabéticos e diabéticos (STZ) tratados ou não com AA-861 foram submetidos a CLP conforme descrito em materiais e métodos. CFU no lavado peritoneal (A) e no sangue (B). Resultados expressos em média $\pm$ DPM de pelo menos 3 experimentos independentes (n=5). * $p < 0,05$ vs não-diabético; # $p < 0,05$ vs diabético não tratado.

Quando avaliamos a sobrevida, os animais diabéticos se mostram extremamente susceptíveis uma vez que todos morreram 24 horas após a CLP enquanto apenas 20% dos não-diabéticos morreram nesse tempo. Ao final do sexto dia, 60% dos animais não-diabéticos sobreviveram a sepse. O tratamento dos diabéticos com AA-861 preveniu a morte de 40% dos animais (Figura 14). Para testar a hipótese de que o LTB_4 era o principal mediador responsável pela mortalidade nos diabéticos, utilizamos também animais deficientes para BLT-1. Verificamos que na ausência desse receptor, não houve diferença na mortalidade entre diabéticos e não-diabéticos uma vez que todos os animais dos dois grupos sobreviveram a sepse até o sexto dia (Figura 14).

Figura 14- O LTB_4 é o principal mediador relacionado a mortalidade na sepse dos diabéticos

Animais WT (C57BL/6J) não-diabéticos e diabéticos (STZ) tratados ou não com AA-861 foram submetidos a CLP conforme descrito em materiais e métodos. Também foi induzida a sepse em animais diabéticos (STZ) e não-diabéticos deficientes para 5-LO e BLT-1. A Sobrevida foi determinada a cada 12h por até 6 dias. Resultados expressos em % de sobrevida de 3 experimentos independentes (n=5).

Juntos esses resultados indicam que a inflamação estéril na DT1 mediada pelo LTB4 potencializa a resposta inflamatória sistêmica na sepse promovendo a mortalidade nos diabéticos.

4.2 A ALI secundária a sepse e a expressão de MyD88 em macrófagos alveolares

Para estudar a ALI pulmonar utilizamos ratos Wistar e a diabetes foi induzida com a droga aloxana (ALX) conforme descrito em materiais e métodos. A ALX é uma droga muito utilizada para estudar a DT1 em modelos animais pois, de forma semelhante a STZ, promove a destruição das células beta pancreáticas (84). Dessa maneira, 15 dias após a injeção de ALX os animais apresentaram glicemia de 512 ± 88 mg/dL, níveis semelhantes aos obtidos anteriormente nos camundongos com DT1 e DT2. Já os animais que receberam o veículo apresentaram glicemia de 92 ± 9 mg/dL.

Sendo a ALI uma inflamação secundária, desejávamos utilizar um modelo de sepse severa para garantir que a SIRS afetaria o pulmão. Primeiramente padronizamos o modelo de sepse e observamos que com 4 ou 6 perfurações no ceco, 100% dos animais sobreviveram até 72 horas. Com 12 perfurações 80% sobreviveu até 24h e em 72 horas, todos os animais estavam mortos (Figura 15A). Dessa maneira, optamos por utilizar 12 perfurações e para determinar o tempo em que a ALI seria estudada, avaliamos a sobrevida dos diabéticos. Observamos que de forma semelhante aos camundongos, todos os ratos diabéticos morreram 24 horas após a indução da sepse. O último tempo em que 100% dos animais estavam vivos foi nas 6 horas (Figura 15B) e assim, todos os demais experimentos foram realizados 6 horas após CLP.

Figura 15- Padronização da sepse em ratos

Ratos não-diabéticos foram submetidos a CLP de 4, 8 ou 12 perfurações no ceco e a sobrevida foi avaliada a cada 12h (A). Animais diabéticos e não-diabéticos foram submetidos a CLP com 12 perfurações e foi avaliada a sobrevida a cada 12h (B). * $p < 0,05$ vs 4 e 8 furos ou diabético. Resultados expressos em % de sobrevida de 3 experimentos independentes (n=5).

4.2.1 A ALI secundária a sepse

Inicialmente, investigamos o edema pulmonar nos diferentes segmentos do pulmão (traqueia, brônquio externo, brônquio interno e parênquima) pela técnica que mede o extravasamento do corante Azul de Evans conforme descrito em materiais e métodos. Observamos que 6 horas após indução da sepse houve aumento na permeabilidade vascular apenas nos brônquios internos enquanto os demais segmentos não apresentaram extravasamento de corante (Figura 16A). Avaliando por microscopia óptica o eixo bronco vascular em lamínas coradas com hematoxilina e eosina (HE), é possível observar um bronquíolo (identificado com a letra “B”), um pequeno vaso (identificado com a letra “V”) e o espaço indicado pela flecha é a região onde houve acúmulo de plasma proveniente do aumento da permeabilidade vascular (94) (Figura 16B). Observamos que essa área é menor nos animais diabéticos. Por histomorfometria, quantificamos 10 campos aleatórios de cada animal em um total de 5 animais (n=5) e calculamos o índice de edema conforme descrito em materiais e métodos. Dessa maneira, verificamos que o edema se desenvolveu de forma menos intensa nos pulmões dos animais diabéticos (Figura 16C). Confirmamos ainda pela dosagem de proteínas no BAL que nas 6 horas após a sepse o edema pulmonar foi menos intenso nos animais diabéticos (Figura 16D).

Figura 16- O edema pulmonar nos diabéticos com sepse é menos intenso que nos não-diabéticos

(A) Animais diabéticos (ALX) e não-diabéticos foram submetidos a CLP e após 6 horas foi injetado azul de evans de forma intravenosa. Após 30 min da injeção, os pulmões foram removidos, os diferentes segmentos (traqueia, brônquio interno, brônquio externo e parênquima) foram processados com formamida e com auxílio de um espectrofotômetro foi determinado o extravasamento do corante no tecido. Resultados expressos em média $\pm$ SEM (n=5). Em um outro grupo de animais, 6 horas após CLP foi realizado o BAL e os pulmões foram processados para histologia conforme descrito em materiais e métodos. (B) Fotomicrografia das lâminas dos pulmões corados com HE onde “B” indica brônquio, “V” vênula, e a seta indica a área de edema (B). Morfometria do edema calculada conforme descrito em materiais e métodos (C). Concentração de proteína no BAL (D). Resultados expressos em média $\pm$ DPM de pelo menos 3 experimentos. * $p<0,05$ vs SHAM não-diabético; # $p<0,05$ vs CLP não-diabético.

Analisando ainda o BAL investigamos a migração de leucócitos para o espaço aéreo. Observamos que 6 horas após CLP o infiltrado leucocitário foi significativamente menor nos animais diabéticos. Esse infiltrado foi constituído predominantemente por células mononucleares embora polimorfonucleares também estavam presentes. Houve menor migração dos dois tipos celulares para o espaço aéreo. (Figura 17A). Avaliamos também o infiltrado de leucócitos no tecido pulmonar em cortes de tecido corados em HE. Identificamos que de forma semelhante ao observado no BAL, nos diabéticos o infiltrado inflamatório no parênquima foi menor (Figura 17B). Quando quantificamos o infiltrado por morfometria, observamos que este seguiu o padrão já observado no lavado, com predomínio de células mononucleares porém os polimorfonucleares também estavam presentes. Os dois tipos celulares migraram menos para o parênquima dos pulmões dos animais diabéticos (Figura 17C).

Figura 17- A migração de leucócitos para o pulmão induzida pela sepse é menor nos animais diabéticos

Animais diabéticos (ALX) e não-diabéticos foram submetidos a CLP, após 6 horas foi realizado o BAL e determinado o número de leucócitos presentes nas vias aéreas (A). Após lavagem, os pulmões foram processados para histologia conforme descrito em materiais e métodos. (B) Fotomicrografia das lâminas dos pulmões corados com HE. (C) Morfometria dos leucócitos infiltrados no parênquima pulmonar conforme descrito em materiais e métodos. Resultados expressos em média $\pm$ DPM. * $p < 0,05$ vs SHAM não-diabético; # $p < 0,05$ vs CLP não-diabético.

Existem evidências que na ALI fibroblastos ativam-se diferenciando-se em miofibroblastos e que isto já ocorre em estágios iniciais da ALI. Os miofibroblastos passam a expressar uma proteína chamada α -SMA (do inglês “ α - smooth muscle actin”) que confere capacidade contrátil a essas células (95). Como no parênquima pulmonar a expressão de α -sma é restrita aos miofibroblastos (96), investigamos a expressão desta por imunohistoquímica. Na figura 18A é possível observar que a expressão de α -sma no parênquima dos pulmões dos animais não sépticos é praticamente ausente, porém após 6 horas da indução da sepse, houve um aumento significativo da expressão. Observamos ainda que a marcação positiva para α -sma foi menos intensa nos animais diabéticos. Como a expressão não ocorreu de forma homogênea, quantificamos a marcação positiva em 10 campos diferentes do parênquima de 5 animais de cada grupo com auxílio de um software e confirmamos o padrão observado nas lâminas (Figura 18B).

Figura 18- Nos animais diabéticos a expressão de α -sma nos pulmões é menor que nos não-diabéticos

A

B

Animais diabéticos (ALX) e não-diabéticos foram submetidos a CLP e após 6 horas os pulmões foram processados para imunohistoquímica. (A) Fotomicrografia das lâminas de pulmão com marcação para α -sma. (B) Morfometria da marcação positiva conforme descrito em materiais e métodos. Resultados expressos em média $\pm$ DPM. * $p < 0,05$ vs SAHM não-diabético; # $p < 0,05$ vs CLP não-diabético.

Como o TGF- β (do inglês “Transforming Growth Factor β) é uma citocina que sabidamente ativa a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos na ALI e correlaciona-se com a fibroproliferação nesses pacientes (75), analisamos sua expressão por imunohistoquímica. Observamos que a sepse aumentou a expressão de TGF- β , porém de forma menos intensa nos pulmões dos animais diabéticos (Figura 19A). Confirmamos esse padrão quantificando a marcação positiva conforme descrito em materiais e métodos (Figura 19B).

Figura 19- A expressão de TGF- β nos pulmões dos animais diabéticos é menor que nos não diabéticos

Animais diabéticos (ALX) e não-diabéticos foram submetidos a CLP e após 6 horas os pulmões foram processados para imunohistoquímica. (A) Fotomicrografia das lâminas de pulmão com marcação para TGF- β . (B) Morfometria da marcação positiva conforme descrito em materiais e métodos. Resultados expressos em média $\pm$ DPM. * $p < 0,05$ vs SAHM não-diabético; # $p < 0,05$ vs CLP não-diabético.

Visto que o processo inflamatório já estava instalado 6 horas após CLP, investigamos se a função pulmonar tinha sido afetada neste tempo. Esta foi medida em ratos não anestesiados expostos a doses crescentes de metacolina. Verificamos que não houve alteração da pausa maior (Penh, do inglês “enhanced pause”) nas diferentes doses indicando que nesse tempo a sepse ainda não tinha induzido alteração na função pulmonar. (Figura 20 A e B).

Figura 20- A sepse não altera a função pulmonar

Após 6 horas de sepse ou falsa cirurgia, os animais foram expostos a doses crescentes de metacolina e foi determinada a Penh com auxílio do Buxco (A) e a área sobre a curva foi calculada (B). Resultados expressos em média $\pm$ DPM de pelo menos 3 experimentos independentes.

Dessa maneira, caracterizamos a ALI secundária a sepse e demonstramos que os animais diabéticos desenvolvem uma inflamação menos intensa.

4.2.2 Ativação de macrófagos alveolares na ALI e expressão de MyD88

Para entender os mecanismos envolvidos na inflamação pulmonar menos intensa nos diabéticos investigamos a ativação dos macrófagos alveolares (MAs). Observamos que a expressão do RNAm de MyD88 nos MAs dos diabéticos foi 3 vezes maior quando comparada as células de animais não-diabéticos. Após a sepse a expressão de MyD88 diminuiu tanto nos não-diabéticos como nos diabéticos porém nos diabéticos essa diminuição foi tão drástica que RNAm de MyD88 não foi detectado nas 6 horas (Figura 21A). Confirmamos este padrão em níveis de proteína e verificamos que, embora os diabéticos expressavam quantidades evidentemente maiores de MyD88 que os não-diabéticos, após a sepse a expressão desta molécula foi bastante reduzida (Figura 21B). Investigamos se essa alteração na expressão de MyD88 poderia ser decorrente de uma diferença na produção de LTB₄ no pulmão. Observamos que após a sepse a produção de LTB₄ aumentou de forma semelhante nos diabéticos e não-diabéticos (Figura 21C). Avaliamos ainda a expressão da molécula inibidora SOCS-1 que sabidamente controla a expressão de MyD88 (40) e observamos que os MAs dos animais diabéticos não sépticos expressavam menos SOCS-1 quando comparados aos não-diabéticos. Após a sepse os MAs de animais diabéticos super-expressaram SOCS-1 comparados aos não-diabéticos (Figura 21D). Dessa maneira identificamos que há um desequilíbrio no balanço da expressão de MyD88 e SOCS-1 nos MAs de animais diabéticos de forma independente de LTB₄.

Figura 21- Macrófagos alveolares de animais diabéticos apresentam um desequilíbrio na expressão de MyD88 e SOCS-1 de forma independente de LTB₄

Animais diabéticos (ALX) e não-diabéticos foram submetidos a CLP e após 6 horas foi realizado o BAL e os macrófagos alveolares foram isolados. Nos macrófagos foi analisada a expressão do RNAm de MyD88 (A) e SOCS-1 (D) por RT-PCR e de proteína de MyD88 e β-actina (B) por *immunoblot* com anticorpos específicos. No BAL foi determinada a concentração de LTB₄ por ELISA (C). * $p < 0,05$ vs SHAM não diabético, & $p < 0,05$ vs CLP não-diabético e # $p < 0,05$ vs SHAM diabético.

A seguir, investigamos a ativação de NFkB nos MAs. Esse fator de transcrição é formado por um dímero de p50 e p65 que permanece sequestrado no citoplasma dos macrófagos pela ligação com a proteína reguladora IκB-α. Quando os receptores da família TLR/IL1R são ativados, IκB-α é fosforilado liberando as sub-unidades p50/p65 que migram para dentro do núcleo e iniciam a transcrição gênica. Observamos que a sepse induziu a fosforilação de IκB-α (Figura 22A) e p65 (Figura 22B) apenas nos MAs dos animais não-diabéticos. A fosforilação de p65 na serina 276 aumenta a interação desse fator de transcrição com outros co-ativadores como p300/CBP promovendo sua atividade de transcrição (97). Ao avaliarmos a expressão da enzima COX-2, que é um produto da transcrição de NFkB, observamos que a sepse aumentou a expressão dessa proteína apenas nos não-diabéticos, evidenciando assim que 6 horas após CLP houve uma falha de ativação de NFkB nos MAs (Figura 22C).

Figura 22- A ativação de NFkB em macrófagos alveolares de diabéticos com sepse é deficiente

Animais diabéticos (ALX) e não-diabéticos foram submetidos a CLP e após 6 horas foram isolados os MAs do BAL. Nas proteínas totais dos MAs, foi determinada a fosforilação de IkB- α (A) e fosforilação de p-65 (B) além da expressão de COX-2 (C) e β -actina por *imunoblot*. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

Nossos resultados mostraram que a ALI secundária a sepse é menos intensa nos diabéticos e correlaciona-se a um desequilíbrio na expressão das moléculas MyD88 e SOCS-1 levando a falha na ativação de NFkB.

Na primeira parte do trabalho, descrevemos alguns mecanismos moleculares envolvidos na geração da inflamação estéril na diabetes e na inflamação sistêmica desencadeada pela sepse. Nesse estudo, encontramos que: 1) macrófagos provenientes de camundongos com DT1, mas não DT2 apresentam níveis basais aumentados de MyD88 e STAT-1; 2) Este aumento está relacionado aos níveis basais elevados de LTB₄ encontrados no soro dos diabéticos e maior produção de LTB₄ por macrófagos de diabéticos em cultura 3) A inibição farmacológica ou genética da 5-LO preveniu o aumento na expressão de STAT-1/MyD88 em macrófagos de animais com DT1 sendo que o aumento da expressão de STAT-1 foi dependente da ativação de cJUN/AP1; 4) Animais com T1D apresentaram níveis basais das citocinas pro-inflamatórias IL-1 β e TNF- α aumentados em relação aos animais não diabéticos, e a inibição *in vivo* da síntese de LTs reduziu os níveis destas citocinas e aumentou os níveis do antagonista do receptor para IL-1 β e 5) Os animais diabéticos foram mais susceptíveis a sepse polimicrobiana e isto correlacionou-se com a inflamação sistêmica exacerbada, dependente da ativação do eixo LTB₄/BLT-1.

A inflamação estéril é a principal causa de morbidades associadas a DT1 incluindo complicações cardiovasculares, retinopatia, infarto e nefropatia. Essas enfermidades estão relacionadas com a produção de IL-1 β , IL-18 e IL-33 (98) e sua ação sobre seus receptores IL-1R, IL18R e ST2, respectivamente. Esses receptores, junto com a maioria dos TLRs, utilizam a molécula adaptadora MyD88 para induzir a resposta inflamatória (99). Dessa maneira, estudar os mecanismos envolvidos na regulação da expressão de MyD88 e de sua ação pode ajudar a elucidar os programas intracelulares envolvidos nas diversas morbidades associadas a diabetes.

Os resultados obtidos nesta tese mostram que a expressão da molécula adaptadora MyD88 está aumentada tanto em modelo de diabetes induzida quimicamente (camundongos C57BL/6 tratados com STZ) como em camundongos geneticamente susceptíveis (camundongos NOD). Isso sugere que essa expressão

aumentada é consequência da fisiopatologia da DT1 e provavelmente tem um papel central nas diversas morbidades associadas a essa doença. O aumento na expressão de MyD88 ocorreu nos três tipos de macrófagos de diabéticos estudados (diferenciados a partir de medula óssea, peritoneal e alveolar) e levou a uma maior responsividade destes a agonistas dos receptores TLR-4 e IL-1R, receptores esses que utilizam como molécula adaptadora o MyD88. Já foi demonstrado que em diferentes células do sistema imune de diabéticos o NFkB é ativado de forma constitutiva favorecendo assim a geração de mediadores inflamatórios (100, 101) e que macrófagos de animais com DT1 apresentam perfil inflamatório ou polarização para fenotipo M1 (18, 102). Assim, especulamos que a ativação constitutiva de NFkB e a geração de mediadores inflamatórios ocorre devido a constante ativação de MyD88 por ligantes endógenos, como os associados a estresse celular, os quais podem ser reconhecidos por TLR (103, 104). Dessa forma, a expressão aumentada de MyD88 pode ser a causa da inflamação estéril encontrada em diabéticos.

Embora essencial para a ativação de NFkB por receptores TLR/IL-1R, os mecanismos regulatórios da expressão de MyD88 em fagócitos ainda não são bem conhecidos. Diversos grupos já demonstraram que STAT-1 é responsável pela expressão de MyD88 em diferentes populações de macrófagos (105-107). Neste trabalho, demonstramos que a expressão aumentada de MyD88 na DT1 foi dependente dos altos níveis de LTB₄ presentes em diabéticos que potencializaram a ativação de STAT-1.

A produção de LTs na DT1 já foi demonstrada, pacientes diabéticos apresentam níveis constitutivos de LTE₄ na urina (108) e animais com diabetes induzida por STZ apresentam altos níveis séricos de LTB₄ (15, 109). Nosso trabalho demonstrou que tanto camundongos diabéticos NOD como os induzidos por STZ apresentam níveis basais de LTB₄ mais altos no soro e no sobrenadante de cultura de macrófagos comparados aos dos animais controles. Encontramos ainda que a produção basal aumentada de LTB₄ se correlaciona com aumento na expressão de 5-LO dos macrófagos de dois modelos

murinos diferentes de DT1. Os mecanismos envolvidos tanto no aumento da expressão de 5-LO como na ativação dessa enzima ainda são incertos, no entanto, a produção basal aumentada de LTB₄ possui implicações na resposta inflamatória que vão além dos seus efeitos sobre a expressão de MyD88. O LTB₄ é um potente agente quimiotático para neutrófilos (110) além de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio que levam a injúria tecidual (111). LTB₄ também induz ativação de NFκB gerando mediadores que podem ser responsáveis pela inflamação estéril observada na DT1 (40). O LTB₄ tem sido implicado como principal agente responsável por doenças inflamatórias como artrite e arteriosclerose (41) e os animais deficientes da molécula MyD88 estão protegidos do desenvolvimento dessas doenças (112, 113). Desta forma, a elucidação dos eventos relacionados a produção de LTB₄ e expressão de MyD88 são de grande relevância para identificação de novos alvos terapêuticos para outras doenças além da diabetes.

A deficiência na produção de insulina na DT1 representa a principal diferença entre os tipos 1 e 2 da diabetes. Embora a DT2 seja caracterizada pela resistência a insulina em órgãos como fígado, músculo e tecido adiposo, os macrófagos aparentemente ainda são capazes de responder a ela. Yano e colaboradores (2012) demonstraram que o tratamento com insulina aumenta a resistência a infecção por *Staphylococcus aureus* e restaura a defesa de camundongos com DT2 (114). Também foi demonstrado que o tratamento com insulina restaura a capacidade fagocítica e microbicida de macrófagos e neutrófilos de camundongos tanto com diabetes tipo 1 como 2 (62, 114). Em nosso trabalho não examinamos a resistência a infecções nos diabéticos mas a inflamação estéril que parece ser uma constante nesta doença. Neste caso, a insulina parece ter um efeito inibitório, visto que sua deficiência contribui para o quadro de inflamação estéril.

O efeito da insulina no sistema imune pode ser explicado por dois mecanismos diferentes: pela correção da hiperglicemia e portanto prevenção dos seus efeitos

secundários ou por afetar diretamente a ativação de macrófagos. De fato, estudos anteriores demonstraram que a insulina possui um evidente efeito anti-inflamatório por inibir a ativação de NFkB e a produção de mediadores (90). Não podemos excluir a hipótese de que em nosso modelo a hiperglicemia controle os níveis de LTB₄/MyD88 embora as evidências sugiram que esta hipótese é improvável: 1) os camundongos de 2 modelos de DT2 apresentam níveis de glicemia comparáveis aos encontrados nos modelos de DT1; 2) Tratamento *in vitro* com insulina de macrófagos retirados de animais controle inibiu a expressão de 5-LO e MyD88 independentemente dos níveis glicêmicos; 3) O tratamento *in vivo* com AA-861 não alterou os níveis glicêmicos. De qualquer maneira, mais experimentos precisam ser realizados para determinar exatamente o papel da hiperglicemia e da diminuição da insulina no controle de LTB₄/MyD88.

A inflamação estéril é caracterizada pela produção de mediadores inflamatórios da família da IL-1. A IL-1 α e IL1 β estão expressas como pro-proteínas e requerem a ativação de proteases, entre elas a caspase-1 gerada por ativação do inflamassoma. Uma variedade de agentes podem ativar os inflamassomas, e, em vista desta diversidade, foi sugerido que estes agentes não são obrigatoriamente ligantes diretos de receptores intracelulares tipo NOD (do inglês "The Nucleotide-binding Oligomerization Domain") mas fatores que induzam alterações nas condições celulares que ativariam estes receptores. Desse modo, podemos especular que a falta de insulina ou a hiperglicemia ocasionariam stress celular desencadeando a ativação do inflamassoma. De fato já foi mostrado que o NLRP3 é sensor de sinais de dano celular no contexto de anormalidades metabólicas (115). No nosso trabalho mostramos que o tratamento farmacológico com inibidor da síntese de LTB₄ reduziu a concentração de IL-1 β que estava aumentada no soro dos diabéticos. O IL-1RA sequestra IL-1 β do meio competindo assim pela ativação excessiva do receptor para IL-1 β (44). Observamos que os diabéticos apresentavam níveis de IL-1RA mais baixos e que a inibição da 5-LO

aumentou esses níveis. Nossos resultados mostram que o LTB₄ está envolvido no aumento da atividade da IL-1 β na diabetes pelo aumento de sua produção, inibição do IL-1RA e aumento da responsividade do IL-1R pelo aumento na expressão de MyD88. Podemos concluir portanto que o LTB₄ contribui para manutenção da inflamação estéril no diabético.

A sepse que é uma doença que comumente acomete pacientes diabéticos internados em centros de terapia intensiva, se caracteriza pelo desenvolvimento da SIRS (do inglês “Sistemic inflammatory Response Syndrome”) decorrente da produção exacerbada de citocinas que levam ao choque séptico e morte (116). Em nosso modelo, confirmamos que a diabetes confere uma maior susceptibilidade a sepse polimicrobiana e que a inibição farmacológica da 5-LO aumentou a sobrevivência dos animais e diminuiu a produção de citocinas tanto no sangue como na cavidade peritoneal. Por outro lado, este tratamento controlou a infecção no foco (cavidade peritoneal), embora tenha promovido a translocação de bactérias para o sangue. O fato da inibição da 5-LO ter promovido a disseminação bacteriana para o sangue está de acordo com a literatura uma vez que o LTB₄ potencializa a fagocitose e o *killig* de bactérias por fagócitos (117). Já na cavidade peritoneal dos animais tratados com AA-861 foi encontrada menor quantidade de bactéria provavelmente devido a evasão destas para o sangue. Com base nesses resultados, especulamos que os níveis elevados de LTB₄ encontrados nos diabéticos embora contribuam para o controle da infecção no foco infeccioso, também induzem a expressão de MyD88, ativação de NF κ B e produção de mediadores, potencializando a inflamação sistêmica induzida pela sepse. Esses dados evidenciam que a inflamação sistêmica tem maior contribuição para a susceptibilidade a sepse do que a infecção nos diabéticos. Não podemos deixar de considerar que, no caso de uma sepse menos intensa do que a induzida em nossos estudos, mecanismos compensatórios da inflamação sistêmica diminuem a intensidade da SIRS e neste caso os animais passem a morrer em decorrência da infecção.

Nosso trabalho demonstrou de forma clara que o LTB₄ aumenta a susceptibilidade a sepse uma vez que, não só a inibição farmacológica da 5-LO como a deficiência genética de BLT-1, protegeu os animais da morte. Mais ainda, na ausência de BLT-1 não há diferença na mortalidade entre diabéticos e não-diabéticos. Entretanto, dados da literatura são controversos. Rio-Santos e colaboradores (2006) observaram que a inibição da produção de LTs pelo tratamento com o inibidor de FLAP aumentou mortalidade por sepse (118) enquanto Benjamim e colaboradores observaram que o mesmo tratamento protegeu os animais da morte (119). Estes autores viram que mesmo perfil protetor foi encontrado nos animais deficientes para 5-LO. Para identificar qual leucotrieno estava associado a essa proteção, os autores antagonizaram os diferentes receptores. Ao utilizarem antagonista de BLT-1 (CP105696) os autores não observaram proteção embora os animais tratados com antagonista do receptor para CysLTs (MK571), melhorou a sobrevida na sepse (119).

Nossos achados possuem importância translacional uma vez que inibidores farmacológicos para 5-LO e antagonistas para BLT-1 já estão disponíveis e poderiam ser utilizados para controlar a inflamação estéril em pacientes com DTI de difícil controle.

Na segunda parte deste trabalho, avaliamos a inflamação pulmonar secundária a sepse polimicrobiana. Para isso, caracterizamos um modelo de ALI em ratos. De forma semelhante ao observado em humanos, a ALI foi menos intensa em diabéticos em todos os parâmetros analisados. Nesse modelo, apesar da função pulmonar permanecer preservada 6 horas após a CLP, os pulmões dos animais diabéticos desenvolveram menos edema, menor infiltrado inflamatório, menor expressão de COX-2 e TGF- β , além de menor ativação de fibroblastos medida pela expressão de α -sma no parênquima. Isso correlacionou-se com uma falha na ativação de NF κ B e um desequilíbrio na expressão das moléculas MyD88 e SOCS-1 nos macrófagos alveolares dos diabéticos. Após 6 horas da indução da sepse, a expressão de MyD88 estava inibida nessas células o que

explicaria a ativação deficiente de NFkB e consequentemente a inflamação menos intensa no pulmão dos diabéticos.

Em 2000, Moss e colaboradores demonstraram que em indivíduos com sepse a incidência de ALI era muito menor nos diabéticos (25%) do que nos não-diabéticos (47%) (67). Outros trabalhos comprovaram esse achado (120, 121), embora em casos de ALI não relacionada com sepse não observa-se essa relação. Em pacientes pós cirúrgicos onde não se desenvolveu a sepse, a diabetes foi associada a ALI mais severa (122). Em outro estudo em que foi utilizada a população geral de uma unidade de terapia intensiva, não foi observado associação entre intensidade da ALI e diabetes (123).

Como 90% dos diabéticos no mundo são do tipo 2 (OMS) e os estudos até 2013 não diferenciavam o tipo de diabetes presente, acreditava-se que esse fenômeno estava mais associado a síndrome metabólica do que a hiperglicemia (124). Um artigo recentemente publicado mostrou que os mecanismos responsáveis pela ALI menos intensa nos diabéticos não estão relacionados apenas com a síndrome metabólica pois observaram que a ALI foi menos intensa tanto pacientes com diabetes tipo 1 como com tipo 2 (125).

Apesar da sepse ser o principal agente causador de ALI, cerca de 40% dos casos (69), existem poucos trabalhos comparando ALI entre diabéticos e não-diabéticos em modelo de sepse. Outra crítica importante que havia até então na literatura é que a menor inflamação pulmonar associada a diabetes poderia ser decorrente a utilização de medicamentos por esses pacientes como aspirina (126, 127), estatinas (128, 129), inibidores da enzima conversora de angiotensina (130), insulina (131, 132), agonistas de PPAR- γ (133, 134) e metiformina (135). Nosso trabalho demonstrou em modelo animal que a inflamação pulmonar nos diabéticos foi menos intensa independente da utilização de qualquer droga. Corroborando com isso, Yu e colaboradores (2013) também demonstraram em um estudo com pacientes que a associação da diabetes com menor intensidade da ALI não poderia ser atribuída a nenhuma dessas drogas nem a outros

componentes como obesidade ou hiperglicemia aguda, evidenciando assim, um papel central na fisiopatologia da diabetes e não da síndrome metabólica (125).

Já é bem estabelecido que o componente inflamatório possui papel central tanto na instalação como no desenvolvimento da ALI (69) porém os mecanismos envolvidos ainda não estão totalmente esclarecidos. Em nosso modelo, descrevemos dois mecanismos centrais pelos quais a diabetes induziu ALI menos intensa. Primeiramente, observamos que o infiltrado inflamatório no pulmão dos diabéticos foi evidentemente menor tanto no parênquima como nos espaços aéreos. Esse infiltrado foi caracterizado por células mononucleares em ambos compartimentos. Menezes e colaboradores (2005) já haviam demonstrado que em modelo de ALI extra-pulmonar, o infiltrado inflamatório no pulmão era predominantemente mononuclear ao passo que na ALI pulmonar os leucócitos predominantes eram neutrófilos (136). Também corrobora com esses dados nosso trabalho anterior onde observamos em modelo de ALI induzida por instilação de LPS que a migração de leucócitos para o pulmão foi menor nos animais diabéticos (58). De fato, já é bem estabelecido que leucócitos de diabéticos apresentam falha na migração.

Avaliamos também a ativação de NFkB dos macrófagos alveolares (MAs) e observamos que esta foi deficiente nos diabéticos após a sepse, um segundo mecanismo que justifica a menor inflamação pulmonar. Isso pode ser explicado pela menor expressão de MyD88 nos macrófagos de diabéticos que correlacionou-se ao aumento na expressão da molécula inibidora SOCS-1. Antes da sepse, a expressão de MyD88 nos MAs era 3 vezes maior nos diabéticos que nos não-diabéticos. Após a sepse, houve uma redução na expressão de MyD88 porém de forma muito mais intensa nos diabéticos levando a níveis indetectáveis de RNAm de MyD88. Isso correlacionou-se com o aumento na expressão de SOCS-1 nesse animais. Como não observamos diferença na produção de LTB₄ no pulmão de diabéticos e não diabéticos, isto indica que o desequilíbrio entre MyD88 e SOCS-1 nos diabéticos é independente de LTB₄. Assim,

postulamos que a expressão aumentada de SOCS-1 nas células dos diabéticos após a sepse seja consequência da resposta aos TLR potencializada em consequência a super-expressão de MyD88. De fato, a molécula SOCS-1 já foi descrita como importante reguladora da resposta inflamatória em macrófagos funcionando como “feed back” negativo e evitando dessa maneira ativação excessiva dessas células (137). Camundongos deficientes de SOCS-1 desenvolvem auto-imunidade sistêmica severa além de doenças inflamatórias (138). Assim, quando passa a ser expressa em níveis mais elevados nos diabéticos, a SOCS-1 modularia a resposta MyD88 - dependente levando a falha na ativação de NFkB.

No microambiente sanguíneo as células estão em contato com altos níveis de LTB₄ o que promove a ativação e a sustentação não só da resposta inflamatória como da expressão de MyD88 em monócitos. Ao migrarem para o tecido pulmonar, os monócitos/macrófagos passam para um microambiente com níveis de LTB₄ semelhantes aos encontrados nos animais não-diabéticos, cessando assim o efeito estimulatório do LTB₄ sobre MyD88. Isto associado a expressão elevada do inibidor SOCS-1 inibe a resposta inflamatória dos AMs.

Esse mecanismo parece estar restrito aos macrófagos alveolares uma vez que dentre os órgãos inflamados secundariamente na sepse, apenas no pulmão a inflamação é menos intensa nos diabéticos (68). Portanto, a observação de que a inflamação pulmonar secundária a sepse é menos intensa nos diabéticos pode ser explicada pela expressão aumentada de SOCS-1 nos macrófagos alveolares regulando negativamente a expressão de MyD88 encontrada por nós, e diminuindo portanto a produção de citocinas pro-inflamatórias e de IGF-1 (do inglês “Insulin Growth Factor 1) por macrófagos estimulados com agonistas que atuam em receptores MyD88-dependentes. O IGF-1 quando detectado em níveis elevados no BAL de pacientes ou animais de experimentação, está associada a ALI mais severa (139, 140) e macrófagos de diabéticos produzem menos IGF-1 em resposta ao LPS que os não-diabéticos (141). Além disso,

sabe-se que o pulmão possui um ambiente supressor com alta produção basal de IL-10 por células epiteliais pulmonares (142) além de expressão de TGF-beta no parênquima pulmonar (143).

Embora avanços tecnológicos tenham ocorrido nos últimos anos, tanto a morbidade como a mortalidade da ALI ainda permanecem altas e um tratamento farmacológico efetivo não foi identificado (144). Dessa maneira, entender os programas moleculares envolvidos na modulação da ALI secundária a sepse pode indicar novos alvos terapêuticos para o tratamento dessa doença.

Tomados em conjunto nossos resultados nos permitem especular que na DT1 a falta de insulina na DT1 promove alterações nos macrófagos que resultam em aumento da síntese de LTB₄ e, possivelmente, na ativação de receptores intracelulares do tipo NOD levando a produção de citocinas como IL-1 β . O LTB₄ potencializa a expressão de MyD88 nos macrófagos tornando-os mais responsivos a agonistas de receptores da família TLR/IL-1R. A perpetuação do eixo LTB₄-MyD88 causaria um estado de inflamação basal no diabético (inflamação estéril). Numa situação de sepse, esta inflamação estéril do diabético potencializaria a inflamação sistêmica levando a maior mortalidade. O pulmão é afetado secundariamente, porém os macrófagos alveolares após a sepse apresentam expressão aumentada da molécula SOCS-1, inibidora de MyD88, e consequentemente a inflamação pulmonar é menos intensa nos diabéticos. Estas conclusões estão esquematizadas na Figura 23.

Figura 23- O eixo MyD88/LTB₄ em diabéticos

(A) A condição basal dos diabéticos é caracterizada pela inflamação estéril onde observa-se a expressão aumentada de MyD88 nos macrófagos e produção sistêmica de TNF- α e IL-1 β de forma dependente ao LTB₄. (B) Na sepse, a inflamação estéril dos diabéticos induzida pelo LTB₄ potencializa a SIRS e promove maior mortalidade. (C) Na inflamação pulmonar secundária a sepse os MAs apresentam um desequilíbrio na expressão de MyD88 e SOCS-1 provocando falha na ativação de NF κ B e inflamação pulmonar menos intensa.

Comparado com animais não-diabéticos:

1. Macrófagos de animais com DT1 expressam mais MyD88 e STAT-1 mas não TRIF e TICAM;
2. Mac de animais com DT1 expressam mais 5-LO e produzem níveis elevados de LTB₄;
3. A expressão aumentada de MyD88 e STAT-1 é dependente de LTB₄ via ativação de c-Jun/STAT-1;
4. A expressão aumentada de MyD88 e STAT-1 se correlaciona com a deficiência nos níveis de insulina mas não a hiperglicemia
5. Animais com DT1 apresentam níveis séricos basais aumentados de IL-1 β , TNF- α e reduzidos de IL-1RA de forma dependente ao LTB₄/BLT-1;
6. Animais com DT1 submetidos a CLP apresentam níveis elevados de IL-1b, TNF-a e IL-10 de forma dependente ao LTB₄;
7. Animais com DT1 são mais susceptíveis a sepse por CLP de forma dependente ao LTB₄;
8. A inibição da síntese de LTs nos diabéticos aumentou a disseminação de bactérias para o sangue;
9. A inflamação pulmonar secundária a sepse foi menos intensa nos diabéticos com menor infiltrado leucocitário, edema, expressão de COX-2, α -sma e TGF- β ;
10. A menor inflamação pulmonar decorrente das sepse nos diabéticos se correlacionou com aumento na expressão de SOCS-1, diminuição de MyD88 e falha na ativação de NFkB nos macrófagos alveolares.

REFERÊNCIAS*

1. Buchanan TA, Xiang A, Kjos SL, Watanabe R. What is gestational diabetes? *Diabetes care*. 2007 Jul;30 Suppl 2:S105-11. PubMed PMID: 17596457.
2. Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2006 Mar 11;367(9513):847-58. PubMed PMID: 16530579.
3. Foulis AK, McGill M, Farquharson MA. Insulitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man--macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells. *The Journal of pathology*. 1991 Oct;165(2):97-103. PubMed PMID: 1744803.
4. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. 2005 Apr 9-15;365(9467):1333-46. PubMed PMID: 15823385.
5. Trinanes J, Salido E, Fernandez J, Rufino M, Gonzalez-Posada JM, Torres A, et al. Type 1 diabetes increases the expression of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in the artery wall of candidate patients for kidney transplantation. *Diabetes care*. 2012 Feb;35(2):427-33. PubMed PMID: 22210567. Pubmed Central PMCID: 3263898.
6. Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nature reviews Immunology*. 2011 Nov;11(11):738-49. PubMed PMID: 21984069. Pubmed Central PMCID: 3383854.
7. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nature immunology*. 2011 May;12(5):408-15. PubMed PMID: 21478880.
8. Baumann B, Salem HH, Boehm BO. Anti-inflammatory therapy in type 1 diabetes. *Current diabetes reports*. 2012 Oct;12(5):499-509. PubMed PMID: 22791179.
9. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):860-7. PubMed PMID: 17167474.
10. Kono H, Onda A, Yanagida T. Molecular determinants of sterile inflammation. *Current opinion in immunology*. 2014 Feb;26:147-56. PubMed PMID: 24556412.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

11. Shen H, Kreisel D, Goldstein DR. Processes of sterile inflammation. *Journal of immunology*. 2013 Sep 15;191(6):2857-63. PubMed PMID: 24014880. Pubmed Central PMCID: 3787118.
12. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature medicine*. 2011 Feb;17(2):179-88. PubMed PMID: 21217695. Pubmed Central PMCID: 3076025.
13. Morris DL, Cho KW, Delproposto JL, Oatmen KE, Geletka LM, Martinez-Santibanez G, et al. Adipose tissue macrophages function as antigen-presenting cells and regulate adipose tissue CD4⁺ T cells in mice. *Diabetes*. 2013 Aug;62(8):2762-72. PubMed PMID: 23493569. Pubmed Central PMCID: 3717880.
14. Mandrup-Poulsen T, Pickersgill L, Donath MY. Blockade of interleukin 1 in type 1 diabetes mellitus. *Nature reviews Endocrinology*. 2010 Mar;6(3):158-66. PubMed PMID: 20173777.
15. Talahalli R, Zarini S, Sheibani N, Murphy RC, Gubitosi-Klug RA. Increased synthesis of leukotrienes in the mouse model of diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2010 Mar;51(3):1699-708. PubMed PMID: 19834040. Pubmed Central PMCID: 2868429.
16. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation research*. 2001 Feb 2;88(2):E14-22. PubMed PMID: 11157681.
17. Wetzler C, Kampfer H, Stallmeyer B, Pfeilschifter J, Frank S. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *The Journal of investigative dermatology*. 2000 Aug;115(2):245-53. PubMed PMID: 10951242.
18. Kanter JE, Kramer F, Barnhart S, Averill MM, Vivekanandan-Giri A, Vickery T, et al. Diabetes promotes an inflammatory macrophage phenotype and atherosclerosis through acyl-CoA synthetase 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012 Mar 20;109(12):E715-24. PubMed PMID: 22308341. Pubmed Central PMCID: 3311324.
19. Kanter JE, Bornfeldt KE. Inflammation and diabetes-accelerated atherosclerosis: myeloid cell mediators. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2013 Mar;24(3):137-44. PubMed PMID: 23153419. Pubmed Central PMCID: 3578033.

20. Smitherman KO, Peacock JE, Jr. Infectious emergencies in patients with diabetes mellitus. *The Medical clinics of North America*. 1995 Jan;79(1):53-77. PubMed PMID: 7808095.
21. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care*. 2004 May;27(5):1047-53. PubMed PMID: 15111519.
22. Martens GW, Arikan MC, Lee J, Ren F, Greiner D, Kornfeld H. Tuberculosis susceptibility of diabetic mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2007 Nov;37(5):518-24. PubMed PMID: 17585110. Pubmed Central PMCID: 2048677.
23. Puliti M, Bistoni F, Orefici G, Tissi L. Exacerbation of group B streptococcal sepsis and arthritis in diabetic mice. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2006 Aug;8(9-10):2376-83. PubMed PMID: 16844399.
24. Falagas ME, Alexiou VG, Giannopoulou KP, Siempos, II. Risk factors for mortality in patients with emphysematous pyelonephritis: a meta-analysis. *The Journal of urology*. 2007 Sep;178(3 Pt 1):880-5; quiz 1129. PubMed PMID: 17631348.
25. Stoeckle M, Kaech C, Trampuz A, Zimmerli W. The role of diabetes mellitus in patients with bloodstream infections. *Swiss medical weekly*. 2008 Sep 6;138(35-36):512-9. PubMed PMID: 18792825.
26. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):885-91. PubMed PMID: 12490963.
27. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nature reviews Drug discovery*. 2005 Oct;4(10):854-65. PubMed PMID: 16224456.
28. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Annals of internal medicine*. 1993 Oct 15;119(8):771-8. PubMed PMID: 8379598.
29. Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest*. 1993 Feb;103(2):565-75. PubMed PMID: 8432155.
30. Hack CE, Aarden LA, Thijs LG. Role of cytokines in sepsis. *Advances in immunology*. 1997;66:101-95. PubMed PMID: 9328641.

31. Lehmann AK, Halstensen A, Sornes S, Rokke O, Waage A. High levels of interleukin 10 in serum are associated with fatality in meningococcal disease. *Infection and immunity*. 1995 Jun;63(6):2109-12. PubMed PMID: 7768588. Pubmed Central PMCID: 173273.
32. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology*. 2001 Aug;2(8):675-80. PubMed PMID: 11477402.
33. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annual review of immunology*. 2003;21:335-76. PubMed PMID: 12524386.
34. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. 1999 Jul;11(1):115-22. PubMed PMID: 10435584.
35. Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *International immunology*. 2000 Jan;12(1):113-7. PubMed PMID: 10607756.
36. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 2003 Aug 1;301(5633):640-3. PubMed PMID: 12855817.
37. Soares EM, Mason KL, Rogers LM, Serezani CH, Faccioli LH, Aronoff DM. Leukotriene B4 enhances innate immune defense against the puerperal sepsis agent *Streptococcus pyogenes*. *Journal of immunology*. 2013 Feb 15;190(4):1614-22. PubMed PMID: 23325886. Pubmed Central PMCID: 3563855.
38. Aronoff DM. Cyclooxygenase inhibition in sepsis: is there life after death? *Mediators of inflammation*. 2012;2012:696897. PubMed PMID: 22665954. Pubmed Central PMCID: 3361325.
39. Mathiak G, Szewczyk D, Abdullah F, Ovadia P, Rabinovici R. Platelet-activating factor (PAF) in experimental and clinical sepsis. *Shock*. 1997 Jun;7(6):391-404. PubMed PMID: 9185238.
40. Serezani CH, Lewis C, Jancar S, Peters-Golden M. Leukotriene B4 amplifies NF-kappaB activation in mouse macrophages by reducing SOCS1 inhibition of MyD88 expression. *The Journal of clinical investigation*. 2011 Feb;121(2):671-82. PubMed PMID: 21206089. Pubmed Central PMCID: 3026722.

41. Peters-Golden M, Henderson WR, Jr. Leukotrienes. *The New England journal of medicine*. 2007 Nov 1;357(18):1841-54. PubMed PMID: 17978293.
42. Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *Journal of immunology*. 2005 Jan 15;174(2):589-94. PubMed PMID: 15634873.
43. Peres CM, Aronoff DM, Serezani CH, Flamand N, Faccioli LH, Peters-Golden M. Specific leukotriene receptors couple to distinct G proteins to effect stimulation of alveolar macrophage host defense functions. *Journal of immunology*. 2007 Oct 15;179(8):5454-61. PubMed PMID: 17911632.
44. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013 Dec 12;39(6):1003-18. PubMed PMID: 24332029. Pubmed Central PMCID: 3933951.
45. Yu M, Zhou H, Zhao J, Xiao N, Roychowdhury S, Schmitt D, et al. MyD88-dependent interplay between myeloid and endothelial cells in the initiation and progression of obesity-associated inflammatory diseases. *The Journal of experimental medicine*. 2014 May 5;211(5):887-907. PubMed PMID: 24752299. Pubmed Central PMCID: 4010914.
46. Chen CJ, Shi Y, Hearn A, Fitzgerald K, Golenbock D, Reed G, et al. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *The Journal of clinical investigation*. 2006 Aug;116(8):2262-71. PubMed PMID: 16886064. Pubmed Central PMCID: 1523415.
47. Choe JY, Crain B, Wu SR, Corr M. Interleukin 1 receptor dependence of serum transferred arthritis can be circumvented by toll-like receptor 4 signaling. *The Journal of experimental medicine*. 2003 Feb 17;197(4):537-42. PubMed PMID: 12591910. Pubmed Central PMCID: 2193870.
48. Koh GC, Peacock SJ, van der Poll T, Wiersinga WJ. The impact of diabetes on the pathogenesis of sepsis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2012 Apr;31(4):379-88. PubMed PMID: 21805196. Pubmed Central PMCID: 3303037.
49. Peck G, Andrades M, Lorenzi R, da Costa M, Petronilho F, Moreira JC, et al. Serum-induced macrophage activation is related to the severity of septic shock. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2009 Feb;58(2):89-93. PubMed PMID: 19184359.

50. Alves-Filho JC, Spiller F, Cunha FQ. Neutrophil paralysis in sepsis. *Shock*. 2010 Sep;34 Suppl 1:15-21. PubMed PMID: 20714263.
51. Grimaldi D, Louis S, Pene F, Sirgo G, Rousseau C, Claessens YE, et al. Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive care medicine*. 2011 Sep;37(9):1438-46. PubMed PMID: 21805160.
52. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *Journal of immunology*. 2002 Mar 1;168(5):2493-500. PubMed PMID: 11859143.
53. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nature reviews Immunology*. 2006 Nov;6(11):813-22. PubMed PMID: 17039247.
54. Alves-Filho JC, Sonogo F, Souto FO, Freitas A, Verri WA, Jr., Auxiliadora-Martins M, et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nature medicine*. 2010 Jun;16(6):708-12. PubMed PMID: 20473304.
55. Paula-Neto HA, Alves-Filho JC, Souto FO, Spiller F, Amendola RS, Freitas A, et al. Inhibition of guanylyl cyclase restores neutrophil migration and maintains bactericidal activity increasing survival in sepsis. *Shock*. 2011 Jan;35(1):17-27. PubMed PMID: 20823697.
56. Teixeira-da-Cunha MG, Gomes RN, Roehrs N, Bozza FA, Prescott SM, Stafforini D, et al. Bacterial clearance is improved in septic mice by platelet-activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH) administration. *PloS one*. 2013;8(9):e74567. PubMed PMID: 24069320. Pubmed Central PMCID: 3771912.
57. Ferreira AE, Sisti F, Sonogo F, Wang S, Filgueiras LR, Brandt S, et al. PPAR-gamma/IL-10 axis inhibits MyD88 expression and ameliorates murine polymicrobial sepsis. *Journal of immunology*. 2014 Mar 1;192(5):2357-65. PubMed PMID: 24489087. Pubmed Central PMCID: 3943997.
58. Martins JO, Ferracini M, Anger DB, Martins DO, Ribeiro LF, Jr., Sannomiya P, et al. Signaling pathways and mediators in LPS-induced lung inflammation in diabetic rats: role of insulin. *Shock*. 2010 Jan;33(1):76-82. PubMed PMID: 19373130.
59. Spiller F, Carlos D, Souto FO, de Freitas A, Soares FS, Vieira SM, et al. alpha1-Acid glycoprotein decreases neutrophil migration and increases susceptibility to sepsis

in diabetic mice. *Diabetes*. 2012 Jun;61(6):1584-91. PubMed PMID: 22415874. Pubmed Central PMCID: 3357278.

60. Panneerselvam S, Govindasamy S. Sodium molybdate improves the phagocytic function in alloxan-induced diabetic rats. *Chemico-biological interactions*. 2003 May 6;145(2):159-63. PubMed PMID: 12686492.

61. Alba-Loureiro TC, Munhoz CD, Martins JO, Cerchiaro GA, Scavone C, Curi R, et al. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2007 Aug;40(8):1037-44. PubMed PMID: 17665039.

62. Ferracini M, Martins JO, Campos MR, Anger DB, Jancar S. Impaired phagocytosis by alveolar macrophages from diabetic rats is related to the deficient coupling of LTs to the Fc gamma R signaling cascade. *Molecular immunology*. 2010 Jul;47(11-12):1974-80. PubMed PMID: 20510456.

63. Sima AA, O'Neill SJ, Naimark D, Yagihashi S, Klass D. Bacterial phagocytosis and intracellular killing by alveolar macrophages in BB rats. *Diabetes*. 1988 May;37(5):544-9. PubMed PMID: 3360215.

64. Lecube A, Pachon G, Petriz J, Hernandez C, Simo R. Phagocytic activity is impaired in type 2 diabetes mellitus and increases after metabolic improvement. *PloS one*. 2011;6(8):e23366. PubMed PMID: 21876749. Pubmed Central PMCID: 3158070.

65. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1994 Mar;149(3 Pt 1):818-24. PubMed PMID: 7509706.

66. Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995 Feb;151(2 Pt 1):293-301. PubMed PMID: 7842182.

67. Moss M, Guidot DM, Steinberg KP, Duhon GF, Treece P, Wolken R, et al. Diabetic patients have a decreased incidence of acute respiratory distress syndrome. *Critical care medicine*. 2000 Jul;28(7):2187-92. PubMed PMID: 10921539.

68. Esper AM, Moss M, Martin GS. The effect of diabetes mellitus on organ dysfunction with sepsis: an epidemiological study. *Critical care*. 2009;13(1):R18. PubMed PMID: 19216780. Pubmed Central PMCID: 2688136.

69. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *The New England journal of medicine*. 2000 May 4;342(18):1334-49. PubMed PMID: 10793167.
70. Meduri GU, Tolley EA, Chinn A, Stentz F, Postlethwaite A. Procollagen types I and III aminoterminal propeptide levels during acute respiratory distress syndrome and in response to methylprednisolone treatment. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998 Nov;158(5 Pt 1):1432-41. PubMed PMID: 9817690.
71. Chesnutt AN, Matthay MA, Tibayan FA, Clark JG. Early detection of type III procollagen peptide in acute lung injury. Pathogenetic and prognostic significance. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997 Sep;156(3 Pt 1):840-5. PubMed PMID: 9310002.
72. Clark JG, Milberg JA, Steinberg KP, Hudson LD. Type III procollagen peptide in the adult respiratory distress syndrome. Association of increased peptide levels in bronchoalveolar lavage fluid with increased risk for death. *Annals of internal medicine*. 1995 Jan 1;122(1):17-23. PubMed PMID: 7985891.
73. Polunovsky VA, Chen B, Henke C, Snover D, Wendt C, Ingbar DH, et al. Role of mesenchymal cell death in lung remodeling after injury. *The Journal of clinical investigation*. 1993 Jul;92(1):388-97. PubMed PMID: 8326006. Pubmed Central PMCID: 293623.
74. Marshall RP, Bellingan G, Webb S, Puddicombe A, Goldsack N, McAnulty RJ, et al. Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000 Nov;162(5):1783-8. PubMed PMID: 11069813.
75. Synenki L, Chandel NS, Budinger GR, Donnelly HK, Topin J, Eisenbart J, et al. Bronchoalveolar lavage fluid from patients with acute lung injury/acute respiratory distress syndrome induces myofibroblast differentiation. *Critical care medicine*. 2007 Mar;35(3):842-8. PubMed PMID: 17255860.
76. Chen XS, Sheller JR, Johnson EN, Funk CD. Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene. *Nature*. 1994 Nov 10;372(6502):179-82. PubMed PMID: 7969451.
77. Tager AM, Bromley SK, Medoff BD, Islam SA, Bercury SD, Friedrich EB, et al. Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. *Nature immunology*. 2003 Oct;4(10):982-90. PubMed PMID: 12949531.

78. Lampeter EF, Signore A, Gale EA, Pozzilli P. Lessons from the NOD mouse for the pathogenesis and immunotherapy of human type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1989 Oct;32(10):703-8. PubMed PMID: 2687059.
79. Aronoff DM, Canetti C, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *Journal of immunology*. 2004 Jul 1;173(1):559-65. PubMed PMID: 15210817.
80. Davies JQ, Gordon S. Isolation and culture of murine macrophages. *Methods in molecular biology*. 2005;290:91-103. PubMed PMID: 15361657.
81. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*. 2008;3(6):1101-8. PubMed PMID: 18546601.
82. Serezani CH, Perrela JH, Russo M, Peters-Golden M, Jancar S. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *Journal of immunology*. 2006 Sep 1;177(5):3201-8. PubMed PMID: 16920959.
83. Filgueiras LR, Jr., Martins JO, Serezani CH, Capelozzi VL, Montes MB, Jancar S. Sepsis-induced acute lung injury (ALI) is milder in diabetic rats and correlates with impaired NFkB activation. *PloS one*. 2012;7(9):e44987. PubMed PMID: 23024779. Pubmed Central PMCID: 3443211.
84. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*. 1981 Nov 19;294(5838):284-6. PubMed PMID: 6272129.
85. Tochino Y. The NOD mouse as a model of type I diabetes. *Critical reviews in immunology*. 1987;8(1):49-81. PubMed PMID: 2961513.
86. von Herrath M, Nepom GT. Animal models of human type 1 diabetes. *Nature immunology*. 2009 Feb;10(2):129-32. PubMed PMID: 19148193.
87. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. 1996 Feb 9;84(3):491-5. PubMed PMID: 8608603.
88. Hummel KP, Coleman DL, Lane PW. The influence of genetic background on expression of mutations at the diabetes locus in the mouse. I. C57BL-KsJ and C57BL-6J strains. *Biochemical genetics*. 1972 Aug;7(1):1-13. PubMed PMID: 4557514.

89. Genuth SM, Przybylski RJ, Rosenberg DM. Insulin resistance in genetically obese, hyperglycemic mice. *Endocrinology*. 1971 May;88(5):1230-8. PubMed PMID: 5278387.
90. Dandona P, Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Assian E, et al. Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001 Jul;86(7):3257-65. PubMed PMID: 11443198.
91. Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell*. 1988 Dec 2;55(5):875-85. PubMed PMID: 3142689.
92. Bhinge AA, Kim J, Euskirchen GM, Snyder M, Iyer VR. Mapping the chromosomal targets of STAT1 by Sequence Tag Analysis of Genomic Enrichment (STAGE). *Genome research*. 2007 Jun;17(6):910-6. PubMed PMID: 17568006. Pubmed Central PMCID: 1891349.
93. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000 Oct 13;103(2):239-52. PubMed PMID: 11057897.
94. Hizume DC, Rivero DH, Kasahara DI, Leme AS, Arantes-Costa FM, Olivo CR, et al. Effects of positive end-expiratory pressure in an experimental model of acute myocardial infarct in wistar rats. *Shock*. 2007 May;27(5):584-9. PubMed PMID: 17438466.
95. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *The American journal of pathology*. 2007 Jun;170(6):1807-16. PubMed PMID: 17525249. Pubmed Central PMCID: 1899462.
96. Bozyk PD, Moore BB. Prostaglandin E2 and the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011 Sep;45(3):445-52. PubMed PMID: 21421906. Pubmed Central PMCID: 3175580.
97. Vermeulen L, De Wilde G, Van Damme P, Vanden Berghe W, Haegeman G. Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *The EMBO journal*. 2003 Mar 17;22(6):1313-24. PubMed PMID: 12628924. Pubmed Central PMCID: 151081.
98. Hirsiger S, Simmen HP, Werner CM, Wanner GA, Rittirsch D. Danger signals activating the immune response after trauma. *Mediators of inflammation*. 2012;2012:315941. PubMed PMID: 22778496. Pubmed Central PMCID: 3388465.

99. Takeuchi O, Akira S. MyD88 as a bottle neck in Toll/IL-1 signaling. *Current topics in microbiology and immunology*. 2002;270:155-67. PubMed PMID: 12467250.
100. Mohammad MK, Morran M, Slotterbeck B, Leaman DW, Sun Y, Grafenstein H, et al. Dysregulated Toll-like receptor expression and signaling in bone marrow-derived macrophages at the onset of diabetes in the non-obese diabetic mouse. *International immunology*. 2006 Jul;18(7):1101-13. PubMed PMID: 16728431.
101. Liu J, Beller DI. Distinct pathways for NF-kappa B regulation are associated with aberrant macrophage IL-12 production in lupus- and diabetes-prone mouse strains. *Journal of immunology*. 2003 May 1;170(9):4489-96. PubMed PMID: 12707325.
102. Wu J, Kakoola DN, Lenchik NI, Desiderio DM, Marshall DR, Gerling IC. Molecular phenotyping of immune cells from young NOD mice reveals abnormal metabolic pathways in the early induction phase of autoimmune diabetes. *PloS one*. 2012;7(10):e46941. PubMed PMID: 23071669. Pubmed Central PMCID: 3469658.
103. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *Journal of immunology*. 2000 Jan 15;164(2):558-61. PubMed PMID: 10623794.
104. Devaraj S, Dasu MR, Park SH, Jialal I. Increased levels of ligands of Toll-like receptors 2 and 4 in type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2009 Aug;52(8):1665-8. PubMed PMID: 19455302. Pubmed Central PMCID: 2709882.
105. Harroch S, Gothelf Y, Revel M, Chebath J. 5' upstream sequences of MyD88, an IL-6 primary response gene in M1 cells: detection of functional IRF-1 and Stat factors binding sites. *Nucleic acids research*. 1995 Sep 11;23(17):3539-46. PubMed PMID: 7567467. Pubmed Central PMCID: 307235.
106. Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature reviews Immunology*. 2006 Sep;6(9):644-58. PubMed PMID: 16932750.
107. Levy DE, Darnell JE, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002 Sep;3(9):651-62. PubMed PMID: 12209125.
108. Boizel R, Bruttman G, Benhamou PY, Halimi S, Stanke-Labesque F. Regulation of oxidative stress and inflammation by glycaemic control: evidence for reversible activation of the 5-lipoxygenase pathway in type 1, but not in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2010 Sep;53(9):2068-70. PubMed PMID: 20535444.

109. Valdivielso JM, Montero A, Badr KF, Munger KA. Inhibition of 5-lipoxygenase activating protein decreases proteinuria in diabetic rats. *Journal of nephrology*. 2003 Jan-Feb;16(1):85-94. PubMed PMID: 12649539.
110. Flamand N, Mancuso P, Serezani CH, Brock TG. Leukotrienes: mediators that have been typecast as villains. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2007 Oct;64(19-20):2657-70. PubMed PMID: 17639273.
111. Serezani CH, Kane S, Collins L, Morato-Marques M, Osterholzer JJ, Peters-Golden M. Macrophage dectin-1 expression is controlled by leukotriene B4 via a GM-CSF/PU.1 axis. *Journal of immunology*. 2012 Jul 15;189(2):906-15. PubMed PMID: 22696442. Pubmed Central PMCID: 3392366.
112. Guerrero AT, Cunha TM, Verri WA, Jr., Gazzinelli RT, Teixeira MM, Cunha FQ, et al. Toll-like receptor 2/MyD88 signaling mediates zymosan-induced joint hypernociception in mice: participation of TNF-alpha, IL-1beta and CXCL1/KC. *European journal of pharmacology*. 2012 Jan 5;674(1):51-7. PubMed PMID: 22051147.
113. Bjorkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, Koehn S, Ordija CM, Lee MA, et al. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nature medicine*. 2004 Apr;10(4):416-21. PubMed PMID: 15034566.
114. Yano H, Kinoshita M, Fujino K, Nakashima M, Yamamoto Y, Miyazaki H, et al. Insulin treatment directly restores neutrophil phagocytosis and bactericidal activity in diabetic mice and thereby improves surgical site *Staphylococcus aureus* infection. *Infection and immunity*. 2012 Dec;80(12):4409-16. PubMed PMID: 23027538. Pubmed Central PMCID: 3497398.
115. Masters SL, Dunne A, Subramanian SL, Hull RL, Tannahill GM, Sharp FA, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1beta in type 2 diabetes. *Nature immunology*. 2010 Oct;11(10):897-904. PubMed PMID: 20835230. Pubmed Central PMCID: 3103663.
116. de Jong HK, van der Poll T, Wiersinga WJ. The systemic pro-inflammatory response in sepsis. *Journal of innate immunity*. 2010;2(5):422-30. PubMed PMID: 20530955.
117. Serezani CH, Aronoff DM, Jancar S, Mancuso P, Peters-Golden M. Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. *Blood*. 2005 Aug 1;106(3):1067-75. PubMed PMID: 15718414. Pubmed Central PMCID: 1895163.

118. Rios-Santos F, Benjamim CF, Zavery D, Ferreira SH, Cunha Fde Q. A critical role of leukotriene B4 in neutrophil migration to infectious focus in cecal ligation and puncture sepsis. *Shock*. 2003 Jan;19(1):61-5. PubMed PMID: 12558146.
119. Benjamim CF, Canetti C, Cunha FQ, Kunkel SL, Peters-Golden M. Opposing and hierarchical roles of leukotrienes in local innate immune versus vascular responses in a model of sepsis. *Journal of immunology*. 2005 Feb 1;174(3):1616-20. PubMed PMID: 15661924.
120. Gu WJ, Wan YD, Tie HT, Kan QC, Sun TW. Risk of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome in critically ill adult patients with pre-existing diabetes: a meta-analysis. *PloS one*. 2014;9(2):e90426. PubMed PMID: 24587357. Pubmed Central PMCID: 3937384.
121. Iscimen R, Cartin-Ceba R, Yilmaz M, Khan H, Hubmayr RD, Afessa B, et al. Risk factors for the development of acute lung injury in patients with septic shock: an observational cohort study. *Critical care medicine*. 2008 May;36(5):1518-22. PubMed PMID: 18434908.
122. Kor DJ, Warner DO, Alsara A, Fernandez-Perez ER, Malinchoc M, Kashyap R, et al. Derivation and diagnostic accuracy of the surgical lung injury prediction model. *Anesthesiology*. 2011 Jul;115(1):117-28. PubMed PMID: 21694510. Pubmed Central PMCID: 3986041.
123. Koh GC, Vlaar AP, Hofstra JJ, de Jong HK, van Nierop S, Peacock SJ, et al. In the critically ill patient, diabetes predicts mortality independent of statin therapy but is not associated with acute lung injury: a cohort study. *Critical care medicine*. 2012 Jun;40(6):1835-43. PubMed PMID: 22488007. Pubmed Central PMCID: 3379571.
124. Honiden S, Gong MN. Diabetes, insulin, and development of acute lung injury. *Critical care medicine*. 2009 Aug;37(8):2455-64. PubMed PMID: 19531947. Pubmed Central PMCID: 3103784.
125. Yu S, Christiani DC, Thompson BT, Bajwa EK, Gong MN. Role of diabetes in the development of acute respiratory distress syndrome. *Critical care medicine*. 2013 Dec;41(12):2720-32. PubMed PMID: 23963123. Pubmed Central PMCID: 4007199.
126. Looney MR, Nguyen JX, Hu Y, Van Ziffle JA, Lowell CA, Matthay MA. Platelet depletion and aspirin treatment protect mice in a two-event model of transfusion-related acute lung injury. *The Journal of clinical investigation*. 2009 Nov;119(11):3450-61. PubMed PMID: 19809160. Pubmed Central PMCID: 2769181.

127. Erlich JM, Talmor DS, Cartin-Ceba R, Gajic O, Kor DJ. Prehospitalization antiplatelet therapy is associated with a reduced incidence of acute lung injury: a population-based cohort study. *Chest*. 2011 Feb;139(2):289-95. PubMed PMID: 20688925. Pubmed Central PMCID: 3032365.
128. O'Neal HR, Jr., Koyama T, Koehler EA, Siew E, Curtis BR, Fremont RD, et al. Prehospital statin and aspirin use and the prevalence of severe sepsis and acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Critical care medicine*. 2011 Jun;39(6):1343-50. PubMed PMID: 21336116. Pubmed Central PMCID: 3102130.
129. Jacobson JR, Barnard JW, Grigoryev DN, Ma SF, Tudor RM, Garcia JG. Simvastatin attenuates vascular leak and inflammation in murine inflammatory lung injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2005 Jun;288(6):L1026-32. PubMed PMID: 15665042.
130. He X, Han B, Mura M, Xia S, Wang S, Ma T, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril prevents oleic acid-induced severe acute lung injury in rats. *Shock*. 2007 Jul;28(1):106-11. PubMed PMID: 17510605.
131. Chen HI, Yeh DY, Liou HL, Kao SJ. Insulin attenuates endotoxin-induced acute lung injury in conscious rats. *Critical care medicine*. 2006 Mar;34(3):758-64. PubMed PMID: 16505662.
132. Hagiwara S, Iwasaka H, Hasegawa A, Koga H, Noguchi T. Effects of hyperglycemia and insulin therapy on high mobility group box 1 in endotoxin-induced acute lung injury in a rat model. *Critical care medicine*. 2008 Aug;36(8):2407-13. PubMed PMID: 18596634.
133. Standiford TJ, Keshamouni VG, Reddy RC. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ as a regulator of lung inflammation and repair. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2005;2(3):226-31. PubMed PMID: 16222042.
134. Genovese T, Mazzon E, Di Paola R, Muia C, Crisafulli C, Caputi AP, et al. ROLE OF ENDOGENOUS AND EXOGENOUS LIGANDS FOR THE PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR α IN THE DEVELOPMENT OF BLEOMYCIN-INDUCED LUNG INJURY. *Shock*. 2005 Dec;24(6):547-55. PubMed PMID: 16317386.
135. Zmijewski JW, Lorne E, Zhao X, Tsuruta Y, Sha Y, Liu G, et al. Mitochondrial respiratory complex I regulates neutrophil activation and severity of lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008 Jul 15;178(2):168-79. PubMed PMID: 18436790. Pubmed Central PMCID: 2453511.

136. Menezes SL, Bozza PT, Neto HC, Laranjeira AP, Negri EM, Capelozzi VL, et al. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses. *Journal of applied physiology*. 2005 May;98(5):1777-83. PubMed PMID: 15649870.
137. Whyte CS, Bishop ET, Ruckerl D, Gaspar-Pereira S, Barker RN, Allen JE, et al. Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 is a key determinant of differential macrophage activation and function. *Journal of leukocyte biology*. 2011 Nov;90(5):845-54. PubMed PMID: 21628332.
138. Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature reviews Immunology*. 2007 Jun;7(6):454-65. PubMed PMID: 17525754.
139. Schnapp LM, Donohoe S, Chen J, Sunde DA, Kelly PM, Ruzinski J, et al. Mining the acute respiratory distress syndrome proteome: identification of the insulin-like growth factor (IGF)/IGF-binding protein-3 pathway in acute lung injury. *The American journal of pathology*. 2006 Jul;169(1):86-95. PubMed PMID: 16816363. Pubmed Central PMCID: 1698774.
140. Krein PM, Sabatini PJ, Tinmouth W, Green FH, Winston BW. Localization of insulin-like growth factor-I in lung tissues of patients with fibroproliferative acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003 Jan 1;167(1):83-90. PubMed PMID: 12502480.
141. Teppala S, Shankar A. Association between serum IGF-1 and diabetes among U.S. adults. *Diabetes care*. 2010 Oct;33(10):2257-9. PubMed PMID: 20639451. Pubmed Central PMCID: 2945170.
142. Fernandez S, Jose P, Avdiushko MG, Kaplan AM, Cohen DA. Inhibition of IL-10 receptor function in alveolar macrophages by Toll-like receptor agonists. *Journal of immunology*. 2004 Feb 15;172(4):2613-20. PubMed PMID: 14764735.
143. Takabayshi K, Corr M, Hayashi T, Redecke V, Beck L, Guiney D, et al. Induction of a homeostatic circuit in lung tissue by microbial compounds. *Immunity*. 2006 Apr;24(4):475-87. PubMed PMID: 16618605.
144. Cepkova M, Matthay MA. Pharmacotherapy of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Journal of intensive care medicine*. 2006 May-Jun;21(3):119-43. PubMed PMID: 16672636. Pubmed Central PMCID: 2765330.

APÊNDICE

Artigos publicados ou submetidos durante o período do doutorado

SIGNALING PATHWAYS AND MEDIATORS IN LPS-INDUCED LUNG INFLAMMATION IN DIABETIC RATS: ROLE OF INSULIN

Joilson O. Martins,* Matheus Ferracini,* Denise B.C. Anger,* Daniel O. Martins,* Luciano F. Ribeiro Jr,* Paulina Sannomiya,[†] and Sonia Jancar*

**Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, and [†]Research Division, Heart Institute (INCOR), School of Medicine, University of São Paulo, Brazil*

Received 24 Mar 2009; first review completed 25 Mar 2009; accepted in final form 31 Mar 2009

ABSTRACT—Diabetic patients are more susceptible to infections, and their inflammatory response is impaired. This is restored by insulin treatment. In the present study, we investigated the effect of insulin on LPS-induced signaling pathways and mediators in the lung of diabetic rats. Diabetic male Wistar rats (alloxan, 42 mg/kg i.v., 10 days) and control rats received intratracheal instillation of LPS (750 µg/0.4 mL) or saline. Some diabetic rats were given neutral protamine Hagedorn insulin (4 IU s.c.) 2 h before LPS. After 6 h, bronchoalveolar lavage was performed for the release of mediators, and lung tissue was homogenized for analysis of LPS-induced signaling pathways. Relative to control rats, diabetic rats exhibited a significant reduction in the LPS-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (64%), p38 (70%), protein kinase B (67%), and protein kinase C α (57%) and δ (65%) and in the expression of iNOS (32%) and cyclooxygenase 2 (67%) in the lung homogenates. The bronchoalveolar lavage fluid concentrations of NO (47%) and IL-6 (49%) were also reduced in diabetic rats, whereas the cytokine-induced neutrophil chemoattractant 2 (CINC-2) levels were increased 23%, and CINC-1 was not different from control animals. Treatment of diabetic rats with insulin completely or partially restored all these parameters. In conclusion, data presented show that insulin regulates mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, protein kinase C pathways, expression of the inducible enzymes, cyclooxygenase 2 and iNOS, and levels of IL-6 and CINC-2 in LPS-induced lung inflammation in diabetic rats. These results suggest that the protective effect of insulin in sepsis could be due to modulation of cellular signal transduction factors.

KEYWORDS—Diabetes mellitus, insulin, LPS, ERK, p38, Akt, PKC, iNOS, COX-2, IL-6, NO, CINC-1, CINC-2

INTRODUCTION

It has long been recognized that diabetic patients are more susceptible to infections and that their inflammatory response is impaired. Reversal of the impaired responses is attained by treatment of the animals with insulin (1–4). There is evidence that insulin through direct or indirect effects regulates the inflammatory response (5–8).

The LPS, a component of the Gram-negative bacterial cell wall, is known to induce systemic inflammation, which affects several organs (9), among them the lung, and in consequence, acute lung injury (ALI) may develop (10–13). Binding of LPS to toll-like receptors triggers a complex sequence of events leading to increased expression of specific genes through nuclear factor κ B (NF- κ B) (14) and release of a plethora of mediators that are involved in inflammatory response. These effects of LPS are consequent to activation of intracellular signaling cascades, among them the mitogen-activated protein kinases (MAPKs), which comprise the extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38. Protein kinase C (PKC) plays a central role in signal transduction and participates in diverse biologic and biochemical functions (15, 16). For example, PKC may participate in glycogen metabolism, neurotransmitter release, and protein transactivation by phos-

phorylation (15–17). Protein kinase B (Akt) is a downstream regulator of phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K) and is implicated on PI3K-mediated regulation of NF- κ B (18), an important transcription factor for proinflammatory mediators.

Insulin has the potential to interfere with these pathways by its effects at cellular level, which include glucose transport, glycogen synthesis, and mitogenesis (19) and stimulation of protein kinases and activation or repression of genes transcription (20).

Previous studies from our group have established a protocol of insulin treatment of alloxan-induced diabetic rats in which the dose of insulin was chosen as the dose able to significantly reverse inflammatory parameters that were reduced in diabetic rats. Although this dose of insulin only partially reduces the blood glucose, it maintains blood insulin levels elevated during the time of the experiment. It is plausible that the observed effects would be primarily due to the increased levels of insulin rather than to the reduction of glycemia. Using this protocol, we showed that insulin modulates the development of LPS-induced ALI in diabetic rats (1–3). We found that in ALI caused by intratracheal instillation of LPS, the neutrophil infiltration and the concentration of TNF- α , IL-1 β , and IL-10 in the airways are significantly reduced in diabetic rats compared with nondiabetic controls. All these parameters are restored after treatment of diabetic rats with the single dose of insulin. We also found that this effect of insulin on cytokines production is at the gene transcription level (3). In addition, despite no significant differences in lung intercellular adhesion molecule 1 and E selectin immune staining between LPS diabetic and LPS control rats, an increase in the expression of both adhesion molecules is observed after insulin treatment (1). We also found that the

Address reprint requests to Joilson O. Martins, PhD, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1730, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil. E-mail: martinsj@usp.br.

This research was supported by FAPESP and CNPq, Brazil.
DOI: 10.1097/SHK.0b013e3181a85ec4
Copyright © 2009 by the Shock Society

Sepsis-Induced Acute Lung Injury (ALI) Is Milder in Diabetic Rats and Correlates with Impaired NFκB Activation

Luciano R. Filgueiras, Jr.¹, Joilson O. Martins², Carlos H. Serezani³, Vera L. Capelozzi⁴, Marlise B. A. Montes¹, Sonia Jancar^{1*}

1 Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Department of Microbiology and Immunology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, United States of America, **4** Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

Acute lung injury (ALI) develops in response to a direct insult to the lung or secondarily to a systemic inflammatory response, such as sepsis. There is clinical evidence that the incidence and severity of ALI induced by direct insult are lower in diabetics. In the present study we investigated whether the same occurs in ALI secondarily to sepsis and the molecular mechanisms involved. Diabetes was induced in male Wistar rats by alloxan and sepsis by caecal ligation and puncture surgery (CLP). Six hours later, the lungs were examined for oedema and cell infiltration in bronchoalveolar lavage. Alveolar macrophages (AMs) were cultured in vitro for analysis of IκB and p65 subunit of NFκB phosphorylation and MyD88 and SOCS-1 mRNA. Diabetic rats were more susceptible to sepsis than non-diabetics. In non-diabetic rats, the lung presented oedema, leukocyte infiltration and increased COX2 expression. In diabetic rats these inflammatory events were significantly less intense. To understand why diabetic rats despite being more susceptible to sepsis develop milder ALI, we examined the NFκB activation in AMs of animals with sepsis. Whereas in non-diabetic rats the phosphorylation of IκB and p65 subunit occurred after 6 h of sepsis induction, this did not occur in diabetics. Moreover, in AMs from diabetic rats the expression of MyD88 mRNA was lower and that of SOCS-1 mRNA was increased compared with AMs from non-diabetic rats. These results show that ALI secondary to sepsis is milder in diabetic rats and this correlates with impaired activation of NFκB, increased SOCS-1 and decreased MyD88 mRNA.

Citation: Filgueiras LR Jr, Martins JO, Serezani CH, Capelozzi VL, Montes MBA, et al. (2012) Sepsis-Induced Acute Lung Injury (ALI) Is Milder in Diabetic Rats and Correlates with Impaired NFκB Activation. PLoS ONE 7(9): e44987. doi:10.1371/journal.pone.0044987

Editor: Patricia T. Bozza, Fundação Oswaldo Cruz, Brazil

Received: May 16, 2012; **Accepted:** August 11, 2012; **Published:** September 14, 2012

Copyright: © 2012 Filgueiras et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and National Institutes of Health (NIH R00HL103777-03). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: sojancar@icb.usp.br

Introduction

Diabetes is a syndrome characterized by chronic hyperglycaemia with disturbances in protein, lipid and carbohydrate metabolism owing to a deficiency in insulin production, action or both. In type 1 diabetes (T1D) the patients exhibit defective insulin production [1].

In experimental models of T1D, many aspects of the inflammatory response are reduced such as leukocytes' adhesion to endothelium and migration into the inflammatory site, mast cell degranulation, and production of prostaglandin (PG) E₂ [2]. Moreover, the phagocytes from diabetic rats have reduced capacity to ingest fungi [2] and IgG opsonized targets [3] and bacterial clearance is reduced in the peritoneal cavity of mice submitted to colon ligation and puncture (CLP) [4]. These alterations in inflammation and innate immunity contribute to the increased susceptibility to infection of diabetics.

In clinical studies, it was reported that the incidence of sepsis is increased in diabetic patients [5,6]. Sepsis develops when the initial host response to an infection is amplified and becomes damaging to the host [7]. Some structural components of bacteria

(pathogen-associated molecular patterns - PAMPs), are recognized by pattern recognition receptors (PRRs) expressed in phagocytes and other cell types [8] and are responsible for the initiation of the septic process. Upon infection with gram-negative bacteria, lipopolysaccharide (LPS) has a central role in disease development. The receptor complex formed by toll-like receptor (TLR) 4 and CD14 constitutes the LPS receptor in the host cells [8], and the signalling programme is initiated by two major distinct pathways: the myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and the TIR-domain-containing adapter-inducing IFN-β (TRIF) pathway. Both pathways result in activation of NFκB and transcription of several pro-inflammatory genes [8].

This amplified response, also called cytokine storm, results in a systemic inflammation that affects several organs. The lung is particularly affected and acute lung injury (ALI) secondary to sepsis is characterized by oedema, inflammatory cell infiltration and, in consequence, impaired gas exchange. In its severe form, hypoxia aggravates the patients condition and can lead to multi-organ failure [9]. About 40% of septic patients develop ALI [10]. In diabetics, however, the incidence of ALI is much lower [11] and

PPAR- γ /IL-10 Axis Inhibits MyD88 Expression and Ameliorates Murine Polymicrobial Sepsis

Ana Elisa Ferreira,^{*,†} Flavia Sisti,^{*,†} Fabiane Sônego,[†] Suojuan Wang,^{*} Luciano Ribeiro Filgueiras,^{*,‡} Stephanie Brandt,^{*} Ana Paula Moreira Serezani,[§] Hong Du,[¶] Fernando Q. Cunha,[†] Jose Carlos Alves-Filho,[†] and Carlos Henrique Serezani^{*}

Polymicrobial sepsis induces organ failure and is accompanied by overwhelming inflammatory response and impairment of microbial killing. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ is a nuclear receptor with pleiotropic effects on lipid metabolism, inflammation, and cell proliferation. The insulin-sensitizing drugs thiazolidinediones (TZDs) are specific PPAR- γ agonists. TZDs exert anti-inflammatory actions in different disease models, including polymicrobial sepsis. The TZD pioglitazone, which has been approved by the U.S. Food and Drug Administration, improves sepsis outcome; however, the molecular programs that mediate its effect have not been determined. In a murine model of sepsis, we now show that pioglitazone treatment improves microbial clearance and enhances neutrophil recruitment to the site of infection. We also observed reduced proinflammatory cytokine production and high IL-10 levels in pioglitazone-treated mice. These effects were associated with a decrease in STAT-1–dependent expression of MyD88 in vivo and in vitro. IL-10R blockade abolished PPAR- γ –mediated inhibition of MyD88 expression. These data demonstrate that the primary mechanism by which pioglitazone protects against polymicrobial sepsis is through the impairment of MyD88 responses. This appears to represent a novel regulatory program. In this regard, pioglitazone provides advantages as a therapeutic tool, because it improves different aspects of host defense during sepsis, ultimately enhancing survival. *The Journal of Immunology*, 2014, 192: 000–000.

The overwhelming production of systemic inflammatory mediators is a key feature in severe sepsis and is commonly associated with organ dysfunction and death (1). MyD88, an essential adaptor protein in the TLR/IL-1R1–signaling pathway, plays an important role in the production of inflammatory mediators during sepsis. *Myd88*-deficient mice fail to produce high levels of IL-6, CXCL1, and CXCL2 during cecal ligation and puncture (CLP)-induced sepsis (2). Therefore, it should be possible to reduce systemic inflammation by modulating MyD88 expression or activity. The expression of MyD88 was shown to be upregulated by LPS and inflammatory mediators, such as TNF- α and IFN- γ (3), and downregulated by IL-10 (4). Moreover, we

demonstrated previously that leukotriene B₄ also induces MyD88 expression in a STAT-1–dependent manner (5).

Thiazolidinediones (TZDs) are potent insulin-sensitizing drugs that function via activation of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ . Pioglitazone is a TZD approved by the U.S. Food and Drug Administration that is used for type 2 diabetes treatment. Rosiglitazone and troglitazone also show potent insulin-sensitizing properties, but they were removed from the market because of undesired side effects (6). In addition to the glucose control, the activation of PPAR- γ by TZDs is involved in the modulation of atherosclerosis, adipocyte proliferation, and inflammation (7). Indeed, natural and synthetic PPAR- γ ligands have been tested in experimental models of sepsis because of their known anti-inflammatory effects. Data show that treatment with TZDs and natural ligands for PPAR- γ reduces the release of IL-6, IL-10, TNF- α , and CCL2, as well as the neutrophil infiltration in lung and liver induced by polymicrobial sepsis or endotoxemia (8, 9). In addition, treatment of endotoxemic mice with PPAR- γ agonists reduces levels of high mobility group box 1 and markers for organ dysfunction. As a consequence, survival of mice is increased significantly by those treatments (8, 10–12). However, the mechanism for the anti-inflammatory effects of PPAR- γ agonists is not fully understood. A well-accepted hypothesis is that activated PPAR- γ directly interacts with a transcription factor, resulting in its transrepression (13). Indeed, the synthetic PPAR- γ agonist ciglitazone reduces IKK activity and I κ B degradation induced by hemorrhagic shock (9). Along these lines, the natural PPAR- γ agonist 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15d-PGJ₂) reduces IFN- α – and IFN- γ –induced STAT-1 phosphorylation in different cell types (14).

The aim of this study was to determine whether PPAR- γ impairs STAT-1 activation, thereby reducing STAT-1–dependent MyD88 expression during CLP-induced sepsis. We found that treatment with pioglitazone, a synthetic agonist of PPAR- γ , inhibited STAT-1

^{*}Department of Microbiology and Immunology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202; [†]Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, Brazil; [‡]Department of Pediatrics, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202; [§]Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil; and [¶]Department of Pathology and Laboratory Medicine, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202

Received for publication September 4, 2013. Accepted for publication December 27, 2013.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, National Institutes of Health Grant HL-103777, and the Ralph W. and Grace M. Showalter Research Trust Fund.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Carlos Henrique Serezani, Department of Microbiology and Immunology, Indiana University School of Medicine, 950 West Walnut Street, Room 379, Indianapolis, IN 46202. E-mail address: hserezani@iu.edu

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: CLP, cecal ligation and puncture; 15d-PGJ₂, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; qPCR, quantitative PCR; SOCS, suppressor of cytokine signaling; TIR, Toll-IL-1R; TZD, thiazolidinedione; WT, wild-type.

Copyright © 2014 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/14/\$16.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1302375

Leukotriene B₄ Enhances the Generation of Proinflammatory MicroRNAs To Promote MyD88-Dependent Macrophage Activation

Zhuo Wang,^{*,1} Luciano Ribeiro Filgueiras,^{*,†,1} Soujuan Wang,^{*}
Ana Paula Moreira Serezani,[‡] Marc Peters-Golden,[§] Sonia Jancar,[†] and
C. Henrique Serezani^{*}

MicroRNAs are known to control TLR activation in phagocytes. We have shown that leukotriene (LT) B₄ (LTB₄) positively regulates macrophage MyD88 expression by decreasing suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) mRNA stability. In this study, we investigated the possibility that LTB₄ control of MyD88 expression involves the generation of microRNAs. Our data show that LTB₄, via its receptor B leukotriene receptor 1 (BLT1) and Gαi signaling, increased macrophage expression of inflammatory microRNAs, including miR-155, miR-146b, and miR-125b. LTB₄-mediated miR-155 generation was attributable to activating protein-1 activation. Furthermore, macrophage transfection with antagomirs against miR-155 and miR-146b prevented both the LTB₄-mediated decrease in SOCS-1 and increase in MyD88. Transfection with miR-155 and miR-146b mimics decreased SOCS-1 levels, increased MyD88 expression, and restored TLR4 responsiveness in both wild type and LT-deficient macrophages. To our knowledge, our data unveil a heretofore unrecognized role for the GPCR BLT1 in controlling expression of microRNAs that regulate MyD88-dependent activation of macrophages. *The Journal of Immunology*, 2014, 192: 2349–2356.

Activation of pattern recognition receptors (PRRs) by either pathogen-associated molecular pattern molecules (PAMPs) or by endogenous damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) elicits proinflammatory programs characterized by the production of inflammatory mediators that are important for the control of microbial infection (1). However, excessive production of such mediators also results in tissue injury (2). Among the PRRs, TLRs are the best studied. TLR family members and the IL-1βR share a conserved cytoplasmic Toll/IL-1R (TIR) domain that binds adaptor proteins, including myeloid differentiation factor 88 (MyD88) (3). MyD88 mediates signaling through all of the known TLRs except TLR3. MyD88 is necessary for host defense against a variety of experimental infections (4, 5); it also promotes development of atherosclerosis, autoimmune

responses, diabetes, colitis, and familial Mediterranean fever (4, 5). MyD88 directs a variety of signaling programs that culminate in the activation of the master transcription factor NF-κB, leading to the expression of proinflammatory genes (6). Among the mediators produced by activated macrophages, the 5-lipoxygenase (5-LO)-derived bioactive lipid leukotriene (LT) B₄ (LTB₄) is conventionally known as a potent phagocyte chemoattractant, and its role in eliciting acute inflammatory responses and maintaining chronic inflammation is well established (7). We and others have shown that LTB₄ signaling via its cognate receptor B leukotriene receptor 1 (BLT1) through a Gαi-mediated decrease in cAMP levels enhances phagocytosis and killing of both opsonized and nonopsonized (8–12) microbes. LTB₄ activates NF-κB (13) and stimulates production of cytokines including TNF-α (14), and it enhances the production of microbicidal molecules including ROIs (9), RNIs (15, 16), and antimicrobial peptides. We have also shown that LTB₄ has a permissive role in TLR activation by mediating both basal and inducible MyD88 expression and NF-κB activation in macrophages in vitro and in vivo (13). Suppressor of cytokine signaling (SOCS-1) is an important inhibitor of JAK2 and STAT1 (17)—a transcription factor for MyD88 (13)—and it impairs TLR activation by increasing degradation of MyD88-like adaptor and IRAKs (18, 19). A key mechanism of LTB₄/BLT1-mediated effects is enhanced degradation of mRNA encoding SOCS-1 (13). Reducing the SOCS-1 level represents an important step in macrophage activation (19). SOCS-1 mRNA levels can be controlled both at the levels of transcription and via microRNA-mediated inhibition. MicroRNAs are small oligonucleotides (~22 nt) that bind complementary sequences in mRNAs, usually resulting in gene silencing via translational repression or target degradation (20). MicroRNAs are also potent regulators of homeostasis and of pathologic conditions. Recent studies have shown that microRNAs are key determinants of macrophage activation, controlling the expression of a variety of molecules involved in PRR signaling and NF-κB activation (20). There are several reports showing that SOCS-1 is targeted by

^{*}Department of Microbiology and Immunology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202; [†]Department of Immunology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil; [‡]Herman B. Wells Center for Pediatric Research, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202; [§]Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, University of Michigan Health System, Ann Arbor, MI 48109

¹Z.W. and L.R.F. contributed equally to this work.

Received for publication November 6, 2013. Accepted for publication December 27, 2013.

This work was supported by National Institutes of Health Grants HL-058897 (to M.P.-G.) and HL-103777-01 (to C.H.S.) and by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Address correspondence and reprint requests to: Dr. C. Henrique Serezani, Department of Microbiology and Immunology, Indiana University School of Medicine, 950 West Walnut Street, Room 379, Indianapolis, IN 46202. E-mail address: hserezani@iu.edu

Abbreviations used in this article: AP-1, activating protein-1; BLT1, B leukotriene receptor 1; cysLT, cysteinyl LT; cysLT1, cysLT receptor 1; DAMP, damage-associated molecular pattern molecule; 5-LO, 5-lipoxygenase; LT, leukotriene; LTB₄, leukotriene B₄; PAMP, pathogen-associated molecular pattern molecule; pri-microRNA, primary microRNA; PRR, pattern recognition receptor; PTX, pertussis toxin; qPCR, quantitative PCR; SOCS-1, suppressor of cytokine signaling; WT, wild type.

Copyright © 2014 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/14/\$16.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1302982

Leukotriene B₄-mediated sterile inflammation favors susceptibility to sepsis in murine type 1 diabetes

Luciano Filgueiras^{1,2}, Stephanie Brandt¹, Soujuan Wang¹, Zhuo Wang¹, David Morris³, Carmella Evans-Molina³, Raghavendra G. Mirmira³, Sonia Jancar², C. Henrique Serezani¹.

¹Department of Microbiology and Immunology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis.

²Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

³Department of Medicine, Indiana University School of Medicine, Indianapolis.

Running title: LTB₄ and susceptibility to sepsis in T1DM.

Key words: eicosanoid, SIRS, sepsis, diabetes, leukotriene, 5-LO inhibitor, translational

*Address correspondence: Dr. C. Henrique Serezani, Department of Microbiology and Immunology, Indiana University School of Medicine, 950 West Walnut Street, Room 379, Indianapolis, IN 46202. E-mail address: hserezan@iu.edu

Sepsis-induced lung inflammation is modulated by insulin

¹Luciano Ribeiro Filgueiras Jr., ²Vera L. Capelozzi, ^{3,*}Jailson O. Martins, ^{1,*}Sonia Jancar

¹Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil

²Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Brazil

³Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil

*These authors contributed equally to this work and SJ is the corresponding author.

Key Words: alveolar macrophages, lung inflammation, diabetes, CLP, ALI, insulin.

Abstract

We have previously shown that diabetic rats are more susceptible to sepsis, but develop a milder lung inflammation than non-diabetics. In the present study, we further investigated the lung inflammation secondary to sepsis and the effect of insulin treatment. Diabetes was induced in male Wistar rats by alloxan and sepsis by cecal ligation and puncture surgery (CLP). Some diabetic rats were given neutral protamine Hagedorn (NPH) insulin (4 IU, s.c.) 2 hours before CLP. Six hours later, the lungs were examined for edema, cell infiltration and prostaglandin-E2 levels in the bronchoalveolar lavage (BAL). The results confirmed that leukocyte infiltration and edema were milder in diabetic rats, and returned to control levels after insulin treatment. Basal concentration of PGE2 was not affected by sepsis and was much lower in diabetics, with insulin treatment returning PGE2 levels to the same as those of non-diabetics. In this model of lung inflammation, early fibroblast activation was demonstrated by increased transforming growth factor (TGF)- β and α -smooth muscle actin (SMA) expression in the lung parenchyma, as well as an elevated number of cells with the morphology of myofibroblasts. These parameters were significantly lower in diabetic rats and were returned to control levels by insulin treatment. These results suggest that insulin modulates inflammation and myofibroblast differentiation in early stages of sepsis-induced acute lung inflammation. These results confirm and extend previous findings showing that the lung of diabetic rats is protected from secondary injury caused by sepsis and shows that insulin abolishes this protection.