

WILSON MITSUO TATAGIBA KUWABARA

***AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE TLR₄ E POSSÍVEL
CORRELAÇÃO COM ESTRESSE DE RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO EM NEUTRÓFILOS NO
DIABETES MELLITUS TIPO 2***

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

São Paulo
2017

WILSON MITSUO TATAGIBA KUWABARA

***AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE TLR₄ E POSSÍVEL
CORRELAÇÃO COM ESTRESSE DE RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO EM NEUTRÓFILOS NO
DIABETES MELLITUS TIPO 2***

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

Área de Concentração:
Fisiologia Humana

Orientadora:
Dra. Tatiana Carolina Alba Loureiro

Versão original

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Kuwabara, Wilson Mitsuo Tatagiba
Avaliação da ativação de TLR4 e possível correlação
com estresse de retículo endoplasmático em
neutrófilos no diabetes mellitus tipo 2 / Wilson
Mitsuo Tatagiba Kuwabara; orientadora Dra. Tatiana
Carolina Alba Loureiro. -- São Paulo, 2017.
233 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Neutrófilos. 2. Diabetes tipo 2. 3. Obesidade
. 4. Inflamação. 5. TLR4. I. Alba Loureiro, Dra.
Tatiana Carolina , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Wilson Mitsuo Tatagiba Kuwabara

Título da Tese: Avaliação da Ativação de TLR4 e Possível Correlação Com Estresse de Retículo Endoplasmático em Neutrófilos no *Diabetes Mellitus* Tipo 2

Orientador(a): Dra. Tatiana Carolina Alba Loureiro

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:

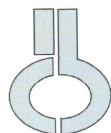
Instituição:

Presidente:

Assinatura:.....

Nome:

Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **109** nas fls. **10** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Tatiana Carolina Alba Loureiro**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Avaliação da ativação de TLR4 e possível correlação com estresse de retículo endoplasmático em neutrófilos no diabéticos mellitus tipo 2*" do qual participam o(s) aluno(s) **Wilson Mitsuo Tabagiba Kuwabara**, e o pesquisador **Rui Curi**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **27.09.2013**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 30 de setembro de 2013.

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

E se tudo isso se concretiza, com a robustez que lhe é dado, com honestidade e perseverança, com tamanha força e fé, é graças a vocês, meus queridos e amados pais (Wilson e Carmen). Todos empecilhos e inseguranças que a ciência me traz, se tornam pequenos e ínfimos com vocês ao meu lado. Uma eternidade, eu levaria, para retribuir todo amor e paciência que me foi e é dedicado.

Aos meus irmãos, Yoiti e Mayumi, agradeço por dividir comigo toda essa caminhada e existência... Por mais que a distância nos separe e nos leve por diferentes caminhos, um bom filho sempre à casa torna e nela tenho certeza que os encontrarei de braços abertos.

Aos meus grandes companheiros de jornada, meus irmãos da vida, Caroline Mendes, Erlando Schimdt, Luiz Cuenca, Yuri Mendes, Ana Souza, Claudia Hayashi, Julieta Scialfa, Vanessa Scialfa, Jéssica Andrade, Livia Geovane, Paulo Santos, Akemi Cuvabara e Allan Tempesta, agradeço por tornar tudo isso mais leve e prazeroso. Nada seria igual sem vocês por perto.

À minha grande querida orientadora e amiga, Tatiana Alba-Loureiro, agradeço e dedico esse nosso trabalho. Por todo amor, paciência e dedicação, eu te agradeço. Pelo exemplo de honestidade, força e paixão, eu te agradeço. Por nunca desistir de mim, por sempre me colocar pra cima e por toda discussão e cada ensinamento, eu mais uma vez te agradeço. É com profunda

gratidão e orgulho desse nosso trabalho que eu finalizo mais essa etapa da minha vida. Se pudesse voltar no tempo, faria tudo exatamente igual. E tudo isso valeu a pena por que você sempre esteve ao meu lado. No final de toda boa história, o bem sempre vence.

Por fim, por todas as oportunidades nessa minha existência, pela família, pelos amigos e pelo amparo contínuo e persistente, agradeço a Deus e à toda espiritualidade que me auxilia.

“A ciência sem a religião é manca, a religião sem a ciência é cega”, Albert Einstein, 1941.

*Em especial, agradeço à FAPESP (2015/03175-1) e ao CNPq
(163439/2013-3) pelo apoio financeiro.*

*“Eu quase desejo não ter descido por aquela toca do coelho...
mas ainda assim... ainda assim... é bastante curioso, sabe, esse
tipo de vida!”*

Alice no País das Maravilhas

RESUMO

KUWABARA, W. M. T. **Avaliação da ativação de TLR4 e possível correlação com estresse de retículo endoplasmático em neutrófilos no diabetes mellitus tipo 2.** 2017. 233 f. Tese de doutorado (Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2017.

Os receptores *toll-like* (TLR) representam um instrumento importante das células do organismo humano no reconhecimento de agentes invasores ou de moléculas indicativas de injúria tecidual. São conhecidos em humanos 10 membros da família *toll-like*, sendo TLR4 e TLR2 os mais extensivamente estudados. TLR4 está presente na superfície da membrana celular e reconhece o lipopolissacarídeo (LPS), uma molécula proveniente da membrana externa de bactérias gram-negativas. Caracterizados como células da primeira linha de defesa da imunidade inata do organismo, os neutrófilos expressam a maioria dos receptores *toll-like* com exceção do TLR3. A ativação do TLR4 nessas células desencadeia a produção de citocinas, responsáveis pelo recrutamento de células do sistema imune para o foco da inflamação; aumenta a quimiotaxia de células imunes e ativa proteínas relacionadas à morte celular como caspase 8 e JNK. Em diversos tipos celulares a ativação da via de TLR4 promove um aumento do estresse de retículo endoplasmático devido a alta demanda na produção de proteínas, principalmente citocinas e quimiocinas. Por outro lado, um estresse de retículo endoplasmático já instalado na célula pode inibir a ação dessa via, tornando as células resistentes a ligantes de TLR4. Levando em conta que algumas síndromes, como no caso do *diabetes mellitus*, são caracterizadas pelas dificuldades inflamatórias e maior susceptibilidade do indivíduo a complicações no processo infeccioso; o objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta neutrofílica ao LPS e portanto as vias de ativação de TLR4 frente a duas condições: a obesidade e o diabetes tipo 2. Além disso, esse trabalho também visou elucidar a comunicação das vias de TLR4 e UPR de neutrófilos nessas mesmas condições. Ratos GK, Wistar e Wistar alimentados com dieta hiperlipídica foram submetidos à um estímulo de LPS intratraqueal e após 6 horas de instilação foi feito o lavado bronco alveolar. Wistar alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram um quadro de obesidade com diminuição da sensibilidade a insulina, enquanto animais GK apresentaram todo o fenótipo diabético tipo 2. Neutrófilos de animais do grupo HFD migraram menos para o sítio de inflamação devido a uma deficiência das quimiocinas CXCL1, CXCL2 e CXCL3 e das citocinas IL6 e IL1 β . Neutrófilos de animais GK migraram menos para o pulmão devido a uma menor produção das citocinas IL6, IL1 β , TNF α e proteínas de adesão ao endotélio: ICAM2, LFA1 e Itgb2. Por fim, neutrófilos de animais diabéticos e alimentados com dieta hiperlipídica parecem ser resistentes ao LPS por deficiência na via do TLR4.

Palavras-chave: Neutrófilos. TLR4. Inflamação. Estresse de Retículo Endoplasmático.

ABSTRACT

KUWABARA, W. M. T. **Evaluation of the TLR4 activation and its possible correlation with the endoplasmatic reticulum stress in neutrophils in *diabetes mellitus* type 2.** 2017. 233 p. PhD thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2017.

Toll-like receptors (TLRs) represent an important tool for human organism in recognizing invading agents or molecules indicative of tissue injury. TLR4 and TLR2 are the most extensively studied receptors in the TLR family. TLR4 is present on the surface of cell membrane and recognizes lipopolysaccharide (LPS), a molecule from the outer membrane of gram-negative bacteria. Characterized as cells of the first line of defense of the organism's innate immunity, neutrophils express most toll-like receptors with the exception of TLR3. Activation of TLR4 in these cells triggers the production of cytokines, recruits cells from the immune system to the inflammation site; enhances chemotaxis of immune cells and activates cell death related proteins such as caspase 8 and JNK. In several cell types the activation of the TLR4 pathway promotes an increase in endoplasmic reticulum stress due to high demand in the production of proteins, mainly cytokines and chemokines. On the other hand, an endoplasmic reticulum stress already installed can inhibit TLR pathway, making the cells resistant to TLR4 ligands. Taking into account that some syndromes, such as diabetes mellitus, is characterized by the inflammatory difficulties and greater susceptibility of the individual to complications in the infectious process; the aim of this study was to evaluate the neutrophilic response to LPS and therefore the TLR4 activation pathway in two different conditions: HFD inducing obesity and type 2 diabetes. In addition, this work also aims to elucidate the TLR4 and UPR interaction in neutrophils. GK, Wistar and HFD fed Wistar rats were submitted to an intratracheal LPS stimulation and after 6 hours of instillation the bronchoalveolar lavage was collected. HFD fed rats showed a decrease in insulin sensitivity, whereas GK animals presented the whole type 2 diabetic phenotype. Neutrophils from the HFD group migrated less to the site of inflammation due to a deficiency of chemokines CXCL1, CXCL2 And CXCL3 and IL6 and IL1 β cytokines. Neutrophils from GK animals migrated less to the lung due to lower production of IL6, IL1 β , TNF α and endothelial adhesion proteins: ICAM2, LFA1 and Itgb2. Finally, neutrophils from the diabetic and HFD groups seems to be resistant to LPS because of deficiency in the TLR4 pathway.

Keywords: Neutrophils. TLR4. Inflammation. Endoplasmic Reticulum Stress.

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1- *Activator Protein 1*

APO-1 - *apoptosis antigen 1*

ASC- *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*

ASK1- *Apoptosis signal-regulating kinase 1*

ATF4- *Activating Transcription Factor 4*

ATF6- *Activating Transcription Factor 6*

ATP- *Adenosine Triphosphate*

Bax- *Bcl-2-associated X protein*

Bcl - *B-cell lymphocytic-leukaemia proto-oncogene*

CD95 -*cluster of differentiation 95*

CHOP- *CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein*

CINC2- *Chemokine (C-X-C motif) ligand 2*

COX- *Cyclooxygenase*

CREB- *cAMP responsive element binding protein*

DAMP- *Damage-associated molecular patterns*

DNA- *Deoxyribonucleic acid*

EDEM- *ER-degradation enhancer mannosidase alfa-like 1*

EDTA - *ácido etilenodiaminotetracético*

eIF2 α - *eukaryotic translation factor 2 α*

ERAD- *Endoplasmatic reticulum associated degradation*

ERK- *Extracellular signal-regulated kinases*

Ero1 β - *Endoplasmatic reticulum resident oxiredutase 1 β*

EROs - *espécies reativas de oxigênio*

FADD- *Fas-Associated protein with Death Domain*

GRP75- *Glucose regulated protein 75kDa*

GRP78- *Glucose regulated protein 78kDa*

GRP94- *Glucose regulated protein 94kDa*

I- κ B α - *inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase α*

ICAM - *Intercellular Adhesion Molecule*

IFN- γ - *interferon-gama*

IKK- *Inhibitor of nuclear factor kappa B Kinase*
IL- *Interleukin*
INF- *Interferon*
iNOS - *inducible NOS*
IP3R- *inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*
IRAK- *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase*
IRE1- *Inositol-requiring kinase 1*
IRF- *Interferon Regulatory Factor*
JUN (SAPK/JUNK)- *Stress-activated protein kinase/Jun-amino-terminal kinase*
LBP- *LPS Binding Protein*
LPS – *lipopolissacarídeo*
MAPK6- *Mitogen Activated Protein Kinase 6*
Mcl-1- *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1*
mRNA- *messenger Ribonucleic acid*
MyD88-*Myeloid differentiation primary response gene 88*
NAD+ - *Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo*
NADPH - *Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida*
NEMO- *NF-κB essential modulator*
NF-κB- *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NLR- *NOD-Like Receptors*
NOD- *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*
NOD- *Nucleotide-binding oligomerization domain receptors*
NOS- *nitric oxide synthases*
Noxa- *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*
PACS2- *phosphofurin acidic cluster sorting protein 2*
PAMPs- *Pathogen-associated molecular patterns*
PDI- *Protein Disulfide Isomerases*
peIF2 α- *phosphorilated eIF2 α-*
PERK- *Double-stranded RNA-activated protein kinase-laxax ER kinase*
PG - *prostaglandina*
PKC- *Protein Kinase C*
PMNs- *Polimorfonucleares*
PRR- *Pattern Recognition Receptor*

PYCARD- *PYD and CARD domain containing protein*
RE- *Reticulo Endoplasmático*
RIP- *Receptor-Interacting Protein*
RNA- *Ribonucleic acid*
S1P- *Site 1 protease*
S2P- *Site 2 Protease*
SERCA- *sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*
sXBP1- *Spliced XBP1*
TAB- *TAK1 Binding Protein*
TAK1- *Transforming growth factor beta-Activated Kinase 1*
TANK1- *TRAF family member-Associated NF- κ B activator Kinase 1*
TBK1- *TANK1 Binding Protein*
TGF- β 1 - *Transforming Growth Factor- β 1*
TIRAP/Mal- *Toll/Interleukin-1 Receptor Domain-Containing Adapter Protein*
TLR- *Toll Like Receptors*
TMB - *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*
TNF - *Tumor Necrosis Factor*
TNFRs - *Tumor Necrosis Factor Receptors*
TRADD- *Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain*
TRAF- *TNF receptor-associated factor*
TRAM- *TRIF-Related Adaptor Molecule*
TRIF- *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*
XBP1- *X-box binding protein*

SUMÁRIO

1 Introdução	16
2 Justificativa	26
3 Objetivos	27
4 Material e métodos	28
4.1 Animais.....	28
4.2 Teste de tolerância à glicose (TTG) e insulinemia.....	29
4.3 Teste de tolerância à insulina (TTI).....	29
4.4 Parâmetros séricos	30
4.5 Cromatografia gasosa – perfil de ácidos graxos.....	30
4.5.1 Plasma.....	30
4.5.2 Ração.....	31
4.6 Determinação plasmática de transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP).....	31
4.7 Sinalização da Insulina no músculo sóleo.....	31
4.8 Sinalização da Insulina no Fígado e Tecido adiposo branco retroperitoneal.....	32
4.9 Análises Histológicas do Fígado.....	32
4.9.1 Avaliação Morfoquantitativa	32
4.9.2 Avaliação de Gordura no Fígado.....	33
4.9.3 Avaliação de Glicogênio hepático.....	33
4.10 Análise do infiltrado inflamatório no Tecido adiposo branco retroperitoneal.....	34
4.10.1 Imunohistoquímica do Tecido adiposo branco retroperitoneal.....	34
4.11 Instilação com lipopolissacarídeo (LPS) de <i>Escherichia coli</i>	34
4.12 Lavado Broncoalveolar (LBA).....	35
4.13 Lâminas e coloração.....	35
4.14 Imunofenotipagem da superfície celular.....	35
4.15 Citocinas LBA e adipocinas.....	36
4.16 Mieloperoxidase (MPO)	36
4.17 Migração <i>in vitro</i>	36
4.18 Produção de Citocinas por Macrófagos alveolares e Neutrófilos do sangue (<i>in vitro</i>)	37

4.19 Expressão gênica das citocinas, enzimas antioxidantes, proteínas de adesão e inflamossomos.....	37
4.20 Western Blotting.....	40
4.21 Ensaio de splicing de XBP1.....	41
4.22 Cinética de estímulo de LPS e Tunicamicina (TUN).....	41
5 Resultados	42
5.1 Caracterização dos modelos de Diabetes tipo 2.....	42
5.2 Perfil inflamatório e função dos neutrófilos nos modelos experimentais.....	63
5.3 Avaliação das vias de TLR4 e estresse de RE e a interação entre as mesmas em neutrófilos do LBA.....	78
6 Discussão	85
7 Conclusão	101
Referências	102
ANEXOS	
A - Ponceau das membranas de citocinas do Fígado	121
B - Ponceau das membranas de citocinas do TAB	122
C - Artigo PLOS ONE	123
D - Artigo Frontiers in Immunology	139
E - Artigo Frontiers in Physiology (Submetido)	150
APÊNDICE A - Hemograma Completo dos animais	199

1 Introdução

Todos organismos multicelulares desde os mais primitivos até as plantas, répteis, aves e mamíferos, estão expostos a um ambiente inóspito repleto de patógenos e microrganismos. Esses agentes, quando não controlados, comprometem o equilíbrio fisiológico dos hospedeiros e podem até mesmo levá-los a morte. Uma maneira selecionada pela evolução de lidar com os agentes invasores, sendo capaz de conter e combater esses microrganismos, é o reconhecimento de estruturas moleculares por Receptores Reconhedores de Padrões (PRRs) (ARESCOUG; GORDON, 2008). Os PRRs são capazes de reconhecer padrões moleculares típicos de patógenos (*Pathogen-associated molecular pattern* - PAMPs) e/ou padrões moleculares associados ao dano tecidual (*Damage-associated molecular patterns* - DAMPs) (BIANCHI, 2007). Os PRRs são encontrados em praticamente todos os tecidos, mas principalmente em células do sistema imune inato, cujo o papel é essencialmente combater os agentes invasores. Os PRRs são divididos em dois grandes grupos: os receptores exclusivamente intracelulares (receptores NOD-like ou NLRs) e os receptores extra e intracelulares (*Toll like receptors* ou TLRs). Dessa maneira, esses receptores conseguem reconhecer padrões moleculares solúveis no plasma, bem como moléculas que são liberadas por patógenos intracelulares ou por consequência dessa invasão (ARESCOUG; GORDON, 2008). Os NLRs são responsáveis pela formação dos inflamossomos, que são complexos multiproteicos citosólicos contendo receptores NOD-like, uma molécula adaptadora ASC e pró-caspase 1. Quando ativados por PAMPs ou DAMPs, ocorre ativação das caspase 1 e um aumento na produção de interleucinas 1 β e 18 (IL-1 β e IL-18), dando início ao processo inflamatório (FRANCHI et al., 2009).

Externamente, os TLRs são os responsáveis pelo reconhecimento de PAMPs e DAMPs. Até o presente momento, a família dos TLRs é constituída por 13 membros. TLR2 e TLR4 são os receptores mais estudados em células do sistema imune inato, e são os responsáveis por mediar respostas contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, respectivamente (MUZIO et al., 2000). TLR2 forma um heterodímero com TLR1 para detectar peptídeos triacilados ou com TLR6 para detectar peptídeos diacilados, enquanto o TLR4 reconhece o componente lipídeo A do lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram negativas (TAKEUCHI et al., 2010). O LPS é um componente derivado da membrana externa de bactérias gram-negativas e constituído por um glicofosfolipídio ancorado a membrana, denominado lipídeo A, que confere principal porção relacionada à atividade biológica da molécula, e por um heteropolissacarídeo hidrofílico unidos por ligação covalente

(CAVAILLON; HAEFFNER-CAVAILLON, 1990; RIETSCHHEL et al., 1994). A região do lipídio A da molécula de LPS se liga a uma glicoproteína de fase aguda, denominada de proteína de ligação ao LPS (*LPS binding protein*, LBP) (TOBIAS et al., 1986; 1989) formando um complexo 1000 vezes mais ativo que o LPS livre (MATHISON et al., 1992).

Ao se ligar ao TLR4, o LPS ativa duas vias de sinalização distintas, uma dependente da molécula *Myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88) e outra dependente de *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF). MyD88 é essencial para a cascata de sinalização de diversos TLRs, com exceção de TLR3 (AKIRA; TAKEDA, 2004). Crianças com deficiência de MyD88 sofrem de infecções bacterianas recorrentes e são mais suscetíveis a morte. A sinalização de TLR2 e TLR4 requer a molécula adaptadora TIRAP/Mal que se liga ao TLR e promove ativação de MyD88. MyD88 interage com *interleukin-1 receptor-associated kinase 4* (IRAK-4), uma serina/treonina-quinase com um domínio de morte N-terminal. IRAK-4 ativa outros membros da família IRAK, IRAK-1 e IRAK-2 (KAWAGOE et al., 2008). Os IRAKs então se dissociam do MyD88 e interagem com o *Tumor Necrosis Factor receptor-associated factor 6* (TRAF6). Juntamente com as ubiquitinas E2, Ubc13 e Uev1A, TRAF6 catalisa a formação uma cadeia de poliubiquitina na própria molécula de TRAF6 (XIA et al., 2009), que ativa *transforming growth factor beta-activated kinase 1* (TAK1), proteína ligadora 1 de TAK1 (TAB1), TAB2 e TAB3. Esse complexo ativado fosforila *inhibitor of nuclear factor kappa B kinase* (IKK- β) e MAP quinase quinase 6. Em seguida, o complexo IKK, composto de IKK- α , IKK- β e modulador essencial de NF- κ B (NEMO), fosforila I κ B α , uma proteína inibidora do NF- κ B. I κ B α fosforilada sofre degradação pelo sistema de ubiquitina-proteassoma, liberando, assim, o NF- κ B para translocar para o núcleo e ativar a expressão de genes relativos a citocinas pró-inflamatórias. A ativação da cascata da MAP quinase é responsável pela formação de outro complexo de fator de transcrição, *activator protein 1* (AP-1), que tem também como alvo os genes de citocinas (Figura 1) (TAKEUCHI et al., 2010).

TLR4 exige outro adaptador, *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM), para ativar TRIF. TRIF associa com TRAF3 e TRAF6 através de motivos ligadores de TRAF presentes na sua porção N-terminal. TRIF também contém uma proteína C-terminal de interação com receptor (RIP) e motivo homotípico de interação (Rhim) responsável pela interação com RIP1 e RIP3. A proteína associada ao domínio de morte TNFR (TRADD), forma um complexo com a proteína contendo domínio de morte associada à FAS (FADD) e RIP1 e também medeia a ubiquitinação de RIP1, uma etapa necessária para a ativação do NF- κ B. FADD ativa caspase-8 ou caspase-10 e a caspase clivada ativa o NF- κ B (TAKAHASHI et al., 2006.).

TRAF3 é importante para a ativação de duas quinases relacionadas a IKK, quinase ligadora de TANK 1 (TBK1) e IKK-i (também conhecida como IKK-ε). TBK1 e IKK-i fosforila *Interferon Regulatory Factor 3 e 7* (IRF3 e IRF7); dímeros de IRF3 e IRF7 translocam para o núcleo, resultando em indução de *Interferons* (IFNs) do tipo I e a expressão de genes relacionados a essa proteína (HACKER et al., 2006; OGANESYAN et al., 2006).

A ativação das vias do TLR4 pelo LPS, eleva o metabolismo celular, estimulando a produção de proteínas necessárias para combate do agente invasor, dentre elas as citocinas, quimiocinas e agentes germicidas. Em teoria, um aumento na síntese proteica, gera uma sobrecarga na organela responsável pela síntese e dobramento de proteínas, o retículo endoplasmático (RE) (GROOTJANS et al., 2016). Em situações de estresse, proteínas mal formadas começam a ser produzidas devido a demanda de síntese proteica maior que a capacidade que organela conseguiria realizar. Para reverter essa situação, aumentar a capacidade de síntese, eliminar as proteínas com defeito e manter a homeostase celular, o RE ativa uma via chamada de resposta à proteínas mal formadas ou do inglês *Unfolded Protein Response* (UPR). Para tanto, o RE possui três proteínas que se localizam na membrana da organela, que funcionam como sensores dessas proteínas mal formadas: *Inositol-requiring kinase 1* (IRE-1α), *Double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase* (PERK) e *Activating Transcription Factor 6* (ATF6). *Glucose regulated protein 78kDa* (GRP78/BIP) é uma molécula chave para a detecção do aumento das proteínas mal formadas e desencadeamento da UPR (SCHRÖDER; KAUFMAN, 2005).

IRE1 em seu estado inativo, está associado à chaperona do RE, Bip (GRP78). Quando a concentração de proteínas mal formadas aumenta no lúmen do RE, Bip dissocia-se do IRE1 para se ligar as proteínas mal formadas e impedir a aglomeração das mesmas. (TRIASOPHON et al., 1998; WANG, et al., 1998). Essa dissociação faz com que o IRE1 oligomerize com outras moléculas de IRE1, também dissociadas, acarretando a autofosforilação do seu domínio citoplasmático e a consecutiva ativação da IRE1 ribonuclease (RNase) (TODD et al., 2008). Essa RNase cliva *X-box binding protein 1* (XBP1) mRNA para retirada de um íntron de 26 nucleotídeos. O resultado da retirada dos 26 íntrons é o *spliced XBP1* (XBP1s) que é um ativador da transcrição de vários genes relacionados a UPR. Alguns dos genes que são ativados pela via IRE1/XBP1 são aqueles envolvidos no *Endoplasmatic reticulum associated degradation* (ERAD), como o *ER-degradation enhancer mannosidase alfa-like 1* (EDE1) (YOSHIDA et al., 2003). Além do processamento do XBP1 mRNA, IRE1 promove, direta ou indiretamente, a rápida quebra e destruição de vários mRNAs associados com o RE rugoso, promovendo a diminuição da

entrada de novas proteínas no lúmen do RE. A forma ativada do IRE1 se liga ao TRAF2, que conecta IRE1 a proteína quinase Ask1, ativando a quinase pró-apoptótica JNK (JUN N-terminal kinase) (URANO et al., 2000). JNK ativada pode, então, ativar a morte celular por apoptose ou autofagia. A atividade de IRE1 é modulada pela interação com *Bcl-2-associated X protein* (BAX) inibitor 1 e de proteínas da família *B-cell lymphocytic-leukaemia proto-oncogene-2* (BCL-2) (HETZ; GLIMCHER 2008; LISBONA et al. 2009).

PERK possui um domínio luminal semelhante ao de IRE1 e se liga a Bip. Quando a concentração de proteínas mal formadas aumenta no lúmen do RE, PERK se dissocia da Bip, dimeriza-se e autofosforila, levando a ativação de sua função quinase eIF2 α (*eukaryotic translation factor 2 α*) através da fosforilação em Ser51. (HARDING et al., 1999). Embora a fosforilação do eIF2 α - necessária para o acoplamento da subunidade 80S do ribossomo (LU et al., 2004) - iniba a síntese geral de proteínas, ele é necessário para a tradução de vários mRNAs. Um fator de transcrição cuja tradução é ativada pela fosforilação do eIF2 α é o *Activating Transcription Factor 4* (ATF4) (HARDING et al., 1999), que pertence a família *cAMP-response element binding* (CREB) e ativa vários genes envolvidos no controle da UPR, incluindo chaperonas como a Bip e a *Glucose-regulated protein 94* (GRP94), genes envolvidos na supressão do stress oxidativo e no metabolismo e transporte de aminoácidos. ATF4 também atua na ativação de CHOP (*CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein*), que embora ocorra no início da ativação da UPR, está correlacionado com apoptose depois de prolongado stress de RE em alguns tipos celulares e em vários estados patológicos (ZINSZNER et al., 1998).

ATF6 é uma proteína transmembrânica de 90 kDa, que permanece no RE durante condições normais através de sua associação com Bip (SOMMER et al., 2002). Quando a concentração de proteínas mal formadas aumenta no lúmen do RE e Bip se dissocia, ATF6 é translocado para o Complexo de Golgi, onde é clivado por site-1 (S1P) e site-2 (S2P) proteases, as quais liberam o domínio citosólico de 50 kDa como um fator de transcrição ativo (ATF650). O ATF650 se desloca até o núcleo e ativa a transcrição de vários genes envolvidos no controle de qualidade do RE, incluindo chaperonas como a Bip, XBP1, componentes do ERAD, o indutor de apoptose CHOP e o Ero1 β (*Endoplasmatic reticulum resident oxiredutase 1 β*) que tem um papel essencial na manutenção do ambiente oxidante do RE (SHIMIZU; HENDERSHOT, 2009).

Sabe-se que essas duas vias, TLR4 e estresse de RE, estão interconectadas e juntas são essenciais para o combate de microrganismos invasores pelas células do sistema imune. Por exemplo, em macrófagos, Woo et al. (2009) demonstraram que o estímulo prolongado com

doses baixas de LPS inibiu a ativação de ATF4 mediada por estresse de retículo e bloqueou a indução de CHOP. Martinon et al. (2010) demonstraram que após ativação de TLR2 e TLR4 em macrófagos há inibição do estresse de RE decorrente da inibição da cascata de sinalização da UPR. Os pesquisadores também demonstraram que a ativação dos receptores (TLR2 e TLR4) promove o *splicing* de XBP-1 e, conseqüentemente, a ativação de sua cascata de uma maneira independente do estresse de RE, estabelecendo que as vias de TLR e IRE1 são interconectadas. As duas vias atuam, concomitantemente, maximizando a resposta imune inata aos patógenos, mesmo que a resposta ao estresse de retículo e a resposta inflamatória por IRE1 sejam por vias diferentes (MARTINON et al., 2010) Recentemente, Coope et al. (2012) verificaram que em linhagem humana de macrófago (THP-1) a ativação prolongada (24 horas) de TLR4 por LPS produz estresse de retículo devido a expressão insuficiente de chaperonas, especialmente GRP94, que atuam na demanda do dobramento de novas moléculas de TLR4 para reposição na superfície da membrana celular. Outra célula do sistema imune inato em que essas vias parecem exercer um papel importante durante o processo inflamatório, é o neutrófilo. Trabalhos recentes têm mostrado uma associação entre a ativação de TLR4 e o estresse de retículo (MARTINON et al., 2010; WOO et al., 2009) e uma possível hipótese para modulação do tempo de vida dos neutrófilos no processo inflamatório.

Os neutrófilos são células fagocitárias que agem na primeira linha de defesa do organismo contra os microrganismos invasores. Estas células sintetizam proteínas que participam de suas próprias funções efetoras e polipeptídeos pró e antiinflamatórios, como, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e interferons (CASSATELA et al., 1999). Os neutrófilos possuem função importante na iniciação e sustentação do processo inflamatório, além de contribuir na regulação das reações imunes (SAVILL, 1995).

A resposta neutrofilica à lesão compreende a aderência destas células ao endotélio de vênulas pós-capilares (marginação leucocitária), a migração das células aderentes para o exterior do vaso, através de junções interendoteliais (diapedese), seu deslocamento no sítio extravascular (quimiotaxia) e subsequente acúmulo no sítio de lesão. Estes eventos dependem de duas propriedades fundamentais da célula: adesão e locomoção (TONNESEN, 1989).

Após a migração, os neutrófilos entram em contato com a partícula ou microrganismo invasor, o que promove a extensão do pseudópode e o englobamento da partícula, formando o fagossomo (MUDD et al., 1934). A capacidade de englobamento dos fagócitos é influenciada por moduladores (GILES et al., 2000) incluindo citocinas (FRANC et al., 1999), prostaglandinas (REN; SAVILL, 1995), hormônios (ROSSI et al., 1998), endotoxinas (PAAPE et al., 2000) e metabólitos (VANHOLDER et al., 1993, 1993b). No entanto, a

diminuição da capacidade fagocitária pode ser uma das causas para o aumento da predisposição à infecções em algumas patologias e condições de stress (DJALDETTI et al., 2002).

As complexas vias de sinalização promovidas pelo englobamento de partículas ou microrganismos invasores levam a fusão de grânulos, ricos em proteases, com o fagossomo. Além da desgranulação no fagolisossomo ou no espaço extracelular (BERTON, 1999), a ação microbicida dos neutrófilos também depende da ativação da oxidase dependente de NADPH (ROSSI; ZATTI, 1964) e, conseqüentemente, da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que incluem o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e radical hidroxil (OH) (BABIOR et al., 1973; FANTONE; WARD, 1982).

A resposta inflamatória aguda apresenta um “programa de parada” endógeno espontâneo devido substâncias produzidas na própria inflamação que limita a destruição tecidual. A morte celular dos neutrófilos e a sua ingestão pelos macrófagos são os principais mecanismos para retirar os neutrófilos que recrutaram para o sítio de inflamação e, então, promover o término do processo inflamatório (SAVILL, 1995). Dessa maneira, alterações no processo de morte celular podem ser responsáveis pela permanência da resposta inflamatória causando prejuízo tecidual (PRINCE et al., 2011).

Uma das primeiras alterações marcantes no processo apoptótico é a agregação e condensação da cromatina em grandes massas granulares compactas que se ligam à carioteca formando um núcleo picnótico. Em um estágio posterior, ocorre clivagem do DNA internucleossomal com o aparecimento de fragmentos nucleares discretos (KERR et al., 1972). Enquanto isso, o citoplasma se condensa, aumenta a densidade de organelas intactas, microvilos desaparecem, levando a diminuição do volume celular e desintegração de junções celulares. Outro processo que marca o início da apoptose é a externalização de fosfatidilserina que promove o reconhecimento das células apoptóticas por células fagocíticas que apresentam receptores para este fosfolípido (VERMES et al., 1995).

A morte de neutrófilos também envolve cascatas proteolíticas com caspases, calpains e proteassoma que ativam quinases, dissociam a ligação protéica dos filamentos de actina (KNEPPER-NICOLAI et al., 1998), e participam nas transformações morfológicas nucleares (WITKO-SARSAT et al., 2000). Existem duas principais vias que regulam a apoptose, a primeira é a via dos receptores de morte ou extrínseca, iniciada pelos TNFRs (Tumor Necrosis Factor Receptors) e pelos Fas (CD95/Apo-1) e, a segunda, a via intrínseca, que

envolve mitocôndria e membros da família Bcl-2 (ASHKENAZI; DIXIT, 1998; GREEN, 1998; TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2000).

Alterações funcionais dos neutrófilos são encontradas em várias patologias, dentre elas a granulomatose de Wegener (WITKO-SARSAT et al., 2010), doença granulomatosa crônica (DINAUER et al., 1992), síndrome de Sweet (YI et al., 2009), artrite reumatoide (NÉMETH, 2012), lupus eritematoso (KAPLAN, 2011) e *diabetes mellitus*, entre outros.

Em estudos realizados na década de 70 foram verificadas alterações funcionais e metabólicas importantes em neutrófilos de pacientes diabéticos tipo 1. Em 1971, Mowat and Baum observaram diminuição do movimento quimiotáxico de neutrófilos em pacientes com *diabetes mellitus*. Tan et al. (1975) correlacionaram o aumento da susceptibilidade de pacientes diabéticos à infecção com a capacidade bactericida ineficiente dos neutrófilos. Em 1978, Nolan et al. verificaram diminuição da fagocitose por granulócitos em pacientes com diabetes não controlado.

Os estudos continuaram na década de 80, nos quais se verificou que o burst oxidativo estava diminuído no neutrófilo de pacientes com *diabetes mellitus* (MARKERT et al., 1984; SAGONE et al., 1983; WILSON, 1984); e que a glicose e os corpos cetônicos influenciam esta função neutrofilica através da via dos polióis (WILSON; REEVES, 1986). Nesta via atuam duas enzimas importantes: a primeira, aldose redutase, reduz glicose a sorbitol e utiliza o NADPH como co-fator, e a segunda, sorbitol desidrogenase, utiliza NAD⁺ como co-fator e converte sorbitol em frutose. Como clinicamente se observava diminuição da resistência à infecção no diabetes, características gerais destas células, como fagocitose, capacidade bactericida e produção de ânion superóxido foram investigadas (NIELSEN; HINDSON, 1989; REPINE et al., 1980; WIERUSZ-WYSOCKA et al., 1985). Em alguns casos, o estudo foi restrito a infecções mais comuns nestes pacientes, como àquelas causadas por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (MARKERT et al., 1984; RAYFIELD et al., 1982). No final da década de 80 e início da de 90, demonstrou-se ocorrer diminuição da adesão dos neutrófilos ao endotélio e, conseqüentemente, da migração neutrofilica, o que estaria envolvida na baixa resistência à infecção no diabetes (ANDERSEN et al., 1988; FORTES et al., 1991; PEREIRA et al., 1987; SANNOMIYA et al., 1990).

A inibição da quimiotaxia de leucócitos, associada ao estado diabético, é um evento de instalação precoce. A migração de neutrófilos para o foco da lesão encontra-se diminuída, em modelo de pleurisia, 3 dias após a indução do *diabetes mellitus*, coincidindo com o aparecimento de uma proteína de (12 kDa), no plasma, com efeito inibitório sobre a quimiotaxia. O tratamento relativamente prolongado (12 dias) dos animais com insulina

resulta na recuperação gradual da quimiotaxia avaliada *in vivo*, em modelo de pleurisia por análise em microscopia intravital, e *in vitro* por análise em câmara de Boyden. Tratamentos agudos (3 dias) são inefetivos (PEREIRA et al., 1987; SANNOMIYA et al., 1990).

Utilizando-se da técnica de microscopia intravital, Fortes et al. (1991) verificaram que o número de leucócitos em contato com o endotélio vascular (*rolling behavior*) encontra-se marcadamente reduzido em ratos diabéticos. Entretanto, o número de leucócitos circulantes não está alterado. Sob influência de um estímulo inflamatório, leucócitos migram para o tecido perivascular de animais controles e este evento acompanha-se de redução no número de células que rolam sob o endotélio (*rollers*). Nos animais diabéticos, o número de leucócitos em *rolling behavior* não se altera e esse pequeno número de células migra para o tecido conectivo adjacente. A interação alterada leucócito-endotélio não é observada em animais diabéticos tratados com insulina (FORTES et al., 1991). As alterações da interação leucócito-endotélio no *diabetes mellitus* associam-se à presença da proteína (>12kDa), que por sofrer reação de glicação (SANNOMIYA et al., 1997), apresenta atividade inibitória sobre a expressão da molécula de adesão ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*) em células endoteliais de vênulas pós-capilares (ANJOS-VALLOTA et al., 1999; 2006).

A capacidade de resposta leucocitária a gradientes de concentração de estímulos quimiotáxicos é essencial para a defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores (GALLIN et al., 1980; WARD, 1974). Alterações na quimiotaxia, quando presentes, tornam o paciente diabético mais susceptível à infecções. A diminuição da quimiotaxia nesses pacientes (DELAMAIRE et al., 1997; GEERLINGS; HOEPELMAN, 1999), pode ser consequência da hiperglicemia (WIERUSZ-WYSOCKA et al., 1988), embora Tater et al. (1987) não tenham demonstrado correlação entre quimiotaxia e valores glicêmicos. Neutrófilos de pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 apresentam diminuição da capacidade fagocítica (DELAMAIRE et al., 1997; MARHOFFER et al., 1992; WALRAND et al., 2004). Contudo, Tater et al. (1987) e Balasoju et al. (1997) não encontraram a mesma alteração. A atividade bactericida exercida pelos neutrófilos apresenta-se diminuída em pacientes diabéticos (GALLACHER et al., 1995; WALRAND et al., 2004). Por sua vez, vários pesquisadores (GALLACHER et al., 1995; NIELSON; HINDSON, 1989; OLDENBORG et al., 2000; ORTMAYER; MOHSENIN, 1996; PERNER et al., 2003), exceto Mohanty et al. (2000) observaram que a hiperglicemia diminui a capacidade de *burst* respiratório de neutrófilos.

A produção de citocinas por neutrófilos também é alterada pela hiperglicemia e/ou hiperinsulinemia. Pacientes diabéticos apresentam valores basais séricos elevados de TNF-alfa, IL-6 e IL-8 (MYSLIWSKA et al., 1998; PICKUP; CROOK, 1998; ZOZULINSKA et

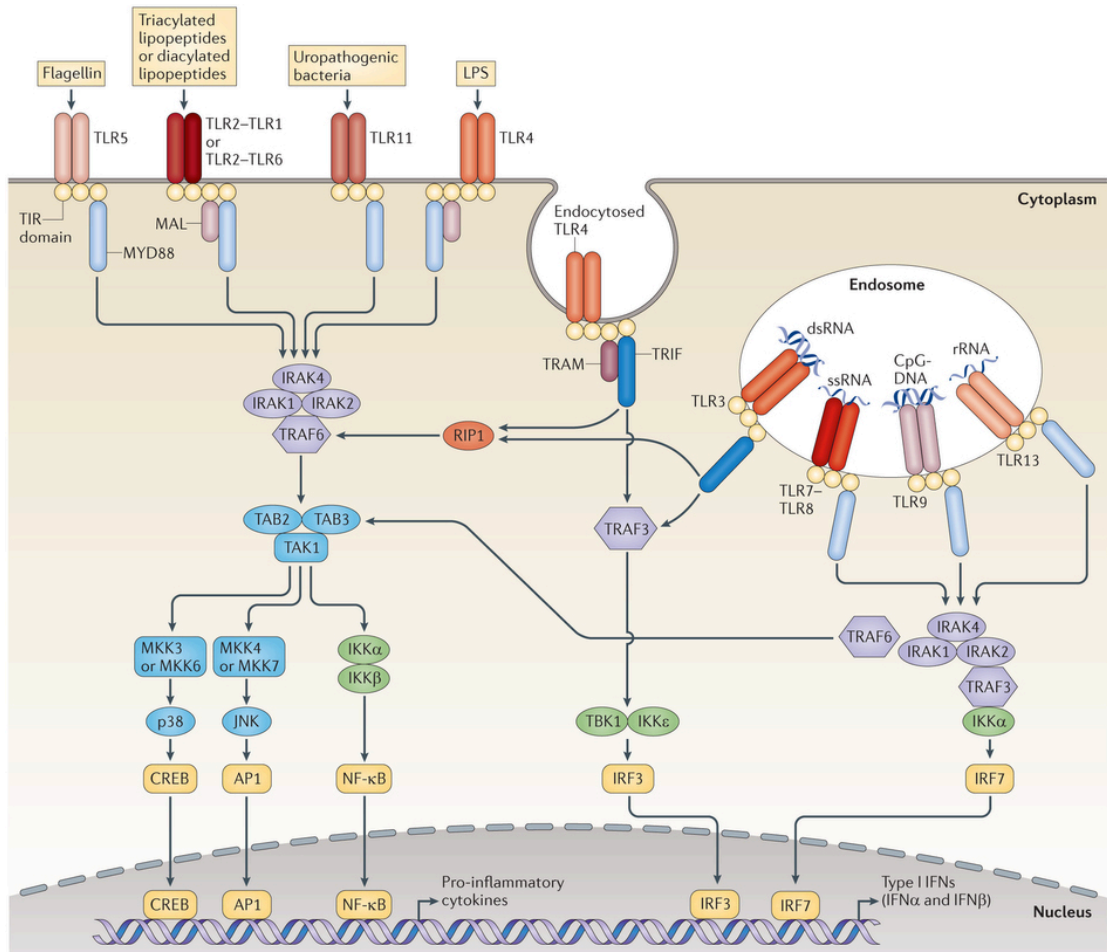
al., 1999). Entretanto, os efeitos da glicose e insulina na produção de citocinas pró-inflamatórias induzida por LPS *in vitro* e *in vivo* são contraditórias (FRAKER et al., 1989; KIRWAN et al., 2001; LIDA et al., 2001; NEWTON, 1993; ORLINSKA; SATOMI et al., 1985). Em modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS, animais diabéticos apresentam redução (50%) na geração de íons superóxido por neutrófilos presentes no lavado broncoalveolar e a mesma magnitude de redução da concentração de TNF- α no sobrenadante deste (BOICHOT et al., 1999). A produção/liberação de PGE₂ por estas células também está reduzida (ALBA-LOUREIRO et al., 2006a). Martins et al. (2006) verificaram que a insulina modula a produção/liberação de citocinas pró inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e anti inflamatória (IL-10) no lavado broncoalveolar, a expressão de moléculas de adesão (*Intercellular Adhesion Molecule 1* [ICAM-1] e E-selectina) no endotélio pulmonar e a migração de neutrófilos para o mesmo órgão após instilação intratraqueal de LPS. Essa modulação pelo hormônio pode ser atribuída, em parte, pela ativação da subunidade p65 de NF- κ B e fosforilação de *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells Inhibitor, alpha* (I κ B α) (MARTINS et al., 2009). Em 2010, Martins et al., verificaram que ratos diabéticos tratados com LPS exibiram redução na fosforilação das proteínas *Extracellular signal-Regulated Kinase* (ERK), p38, *Protein kinase B* (AKT), *Protein kinase C* (PKC)- α e PKC- γ e, redução na expressão de *Inducible nitric oxide synthase* (iNOS) e *Cyclooxygenase* (COX-2) no exsudato proteico proveniente do tecido pulmonar, redução na concentração de NO e IL-6 e aumento dos níveis de *chemokine (C-X-C motif) ligand 3* (CINC-2) no lavado broncoalveolar. O tratamento dos animais diabéticos com insulina promoveu o retorno da fosforilação das moléculas de sinalização, expressão de enzimas e dos níveis da produção/liberação das citocinas aos apresentados pelos animais controles.

Alba-Loureiro et al. (2006b) verificaram redução na utilização de glicose e glutamina para produção de ATP e aumento da oxidação de ácido palmítico por neutrófilos de ratos diabéticos. Estas alterações metabólicas devem estar relacionadas com a diminuição da produção de peróxido de hidrogênio e da capacidade fagocitária destas células.

Dessa maneira, entendendo a importância dos neutrófilos na homeostasia do organismo, a importância das vias de TLR4 e estresse de RE na regulação do processo inflamatório e as alterações que o *diabetes mellitus* gera nas funções dos neutrófilos, este estudo visou investigar a integração dessas duas cascatas de sinalização no processo inflamatório mediado por neutrófilos sob dois modelos experimentais: 1) diabetes tipo 2 espontaneamente desenvolvido através da análise destas células em animais Goto-Kakizaki e 2) animais obesos induzidos por dieta hiperlipídica. A utilização desses dois modelos permitiu

avaliar as diferenças que as duas situações distintas exerceram nas vias de sinalização de TLR4 e estresse de retículo, bem como nas funções do neutrófilo.

Figura 1 - Sinalização das vias dos receptores toll-like : via MyD88-dependente e TRIF-dependente (O’neill et al, 2013).



2 Justificativa

A ativação de TLR4 em neutrófilos de indivíduos diabéticos ainda é uma área pouco estudada. Na literatura não há trabalhos que relacionam a atividade de TLR4 ao estresse de retículo em neutrófilos na condição diabética. Sendo assim, esse estudo teve o objetivo de elucidar a participação desses receptores na resposta inflamatória dos neutrófilos de animais diabéticos tipo 2 e animais alimentados com dieta hiperlipídica; e a possível correlação da participação do estresse de retículo no processo da resposta inflamatória em neutrófilos nos diferentes modelos.

3 Objetivos

O objetivo geral do projeto foi estudar a ativação de TLR4 em neutrófilos de ratos diabéticos e ratos tratados com dieta hiperlipídica. E nesse mesmo contexto, analisar a influência da via da UPR retículo endoplasmático na via desse receptor.

4 Materiais e Métodos

4.1 Animais

Ratos Goto-Kakizaki e Wistar machos, procedentes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade São Paulo foram alocados em racks ventiladas no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade São Paulo e utilizados de acordo com certificado aprovado pela CEUA ICB (109/2013) e normas estabelecidas pelo CONCEA. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (máximo de 4 ratos/gaiola) em ambiente com temperatura de 23 ± 2 °C, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à água. Os animais foram divididos em três grupos: (1) Wistar alimentados com ração controle (10% calorias derivadas de lipídeo, 20% de proteína e 70% de carboidrato; 3,85 kcal/g); (2) Wistar alimentados com ração hiperlipídica (60% calorias derivadas de lipídeo, 20% de proteína e 20% de carboidrato; 5,24 kcal/g) e (3) GK alimentado com ração controle. As composições nutricionais das rações utilizadas estão organizadas na tabela 1. A dieta foi administrada por 8 semanas a partir dos 2 meses de idade (JIANG et al., 2011; PETTERSSON et al., 2011). O ganho de peso dos animais foi avaliado semanalmente e o consumo de ração avaliado a cada 3 dias.

Tabela 1 - Composição nutricional das rações controle e hiperlipídica

(Continua)

Ingredientes	Ração Controle	Ração Hiperlipídica
Caseína (80 mesh)	200 g (800 Kcal)	200 g (800 Kcal)
L-Cisteína	3 g (12 Kcal)	3 g (12 Kcal)
Ingredientes	Ração Controle	Ração Hiperlipídica
Amido de Milho	315 g (1260 Kcal)	0 g (0 Kcal)
Maltodextrina 10	35 g (140 Kcal)	125 g (500 Kcal)

Tabela 1 - Composição nutricional das rações controle e hiperlipídica

		(Conclusão)
Sacarose	350 g (1400 Kcal)	68,8 g (275,2 Kcal)
Celulose (BW200)	50 g (0 kcal)	50 g (0 kcal)
Óleo de Soja	25 g (225 Kcal)	25 g (225 Kcal)
Banha de Porco	20 g (180 Kcal)	245 g (2205 Kcal)
Mix Mineral S10026	10 g (0 Kcal)	10 g (0 Kcal)
Fosfato de Cálcio	13 g (0 Kcal)	13 g (0 Kcal)
Carbonato de Cálcio	5,5 g (0 Kcal)	5,5 g (0 Kcal)
Citrato de Potássio	16,5 g (0 Kcal)	16,5 g (0 Kcal)
Mix de Vitaminas V10001	10 g (40 Kcal)	10 g (40 Kcal)
Bitartarato de Colina	2 g (0 Kcal)	2 g (0 Kcal)
Total	1055 g (4057 Kcal)	773,8 g (4057 Kcal)

4.2 Teste de tolerância à glicose (TTG) e insulinemia

Os animais receberam uma injeção intraperitoneal de 2 g de D-glicose/Kg de peso corpóreo. A glicemia foi avaliada através de um monitor de glicose (Roche Diagnostics Corporation) e a insulinemia pelo kit Rat/mouse Insulin Elisa (Millipore), utilizando-se amostras de sangue obtidas da extremidade da cauda dos animais nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose. O experimento foi conduzido após 12 horas de jejum.

4.3 Teste de tolerância à insulina (TTI)

Os animais receberam uma injeção intraperitoneal de 0,5 UI de insulina regular humana (Humulin, Lilly) por kg de peso corpóreo. A glicemia foi avaliada através de um monitor de glicose (Roche Diagnostics Corporation) utilizando-se amostras de sangue obtidas da extremidade da cauda dos animais nos tempos 0, 4, 8, 12, 15, 20 e 30 minutos após a administração de glicose. O experimento foi conduzido após 12 horas de jejum.

4.4 Parâmetros séricos

Após 6 horas de instilação intratraqueal de salina ou LPS, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina/quetamina (Virbac do Brasil, São Paulo, Brazil) (8 e 80 mg/Kg de peso corpóreo, respectivamente) pela via intraperitoneal e o sangue coletado da aorta abdominal com EDTA como anticoagulante. O plasma separado por centrifugação (500 g por 10 min) foi utilizado para as seguintes análises: insulina, determinado através do método ELISA de acordo com as instruções dos fabricantes (Millipore - insulina); ácidos graxos livres, quantificados através de ensaio enzimático colorimétrico a 550 nm (NEFA C) da *Wako Chemicals GmbH* e os triglicérides, colesterol total e HDL conforme as instruções do fabricante (*BioClin Kit*). O LDL foi calculado seguindo equação de Friedewald (FRIEDEWALD et al., 1972).

4.5 Cromatografia gasosa – perfil de ácidos graxos

4.5.1 Plasma

O sangue dos animais foi centrifugado a 500 g por 10 minutos e o plasma foi separado. 150 µL de plasma foram adicionados a uma solução de NaOH 0,5 M em metanol e submetidos a um banho a 100 °C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 mL de BF₃-Metanol 14% ao homogenato e aquecido a 100 °C por 30 minutos. Foram adicionados 1,5 mL de isoctano seguida de adição de solução saturada de NaCl para a separação das fases orgânica e aquosa. A fase orgânica que contém os ácidos graxos foi retirada, evaporada em nitrogênio gasoso e resuspendida em hexano. Amostras resuspendidas foram injetadas no cromatógrafo a gás GC 17 A Shimadzu/ Class GC 10 equipado com detector de ionização de chama. Como padrão interno foi utilizado o triglicérideo tritridecanoína.

4.5.2 Ração

Rações foram pulverizadas, homogenizadas e 80 mg de gordura de acordo com a ração, foram dissolvidas em etanol. Adicionou-se 5 ml de HCL 8,3M ao homogenato e submetido a um banho à 80 °C por 40 minutos. Éter etílico e éter de petróleo foram adicionados na proporção de 1:1 e as amostras centrifugadas a 600 x g por 10 minutos. A fase superior foi separada e evaporada a 40 °C em atmosfera de nitrogênio gasoso. 1 ml de BF₃-Metanol 7% e 0,5 ml de tolueno foram adicionados e as amostras foram aquecidas a 100 °C por 45 minutos. Por fim, foram adicionados 2,5 ml de água, 1 ml de hexano e 0,5 g de Na₂SO₄. As amostras foram colocadas no *shaker* e a fase superior foi injetada no cromatógrafo a gás GC 17 A Shimadzu/ Class GC 10 equipado com detector de ionização de chama. Como padrão interno foi utilizado o triglicerídeo tritridecanoína.

4.6 Determinação plasmática de transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP)

TGO e TGP foram determinadas no plasma de animais em jejum por 12 horas, através do ensaio enzimático colorimétrico da LabTest (Minas Gerais, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante.

4.7 Sinalização da Insulina no músculo sóleo

Após 4 h de jejum, os ratos foram anestesiados com solução de cloridrato de xilasina e quetamina (I.P.) na concentração de 8 e 80 mg/kg respectivamente (Virbac do Brasil, São Paulo, Brasil). O músculo sóleo foi removido, cuidadosamente e rapidamente isolado e incubado como descrito anteriormente por Crettaz et al. (1980) e Challiss et al. (1983) e rotineiramente realizado pelo nosso grupo (HIRABARA et al., 2006; HIRABARA et al., 2013). Resumidamente, os músculos sóleo foram pré-incubados a 35 °C em tampão de bicarbonato Krebs-Ringer, pH 7,4, e mantidos durante 30 minutos com 95% de O₂ e 5% de

CO₂ contendo 5,5 mM glicose, a 90 oscilações/minuto. Após 30 minutos, os músculos foram transferidos para frascos contendo tampão de Krebs na presença ou ausência de insulina (7 nM) e incubados durante 20 minutos. Após a incubação, os músculos foram imediatamente homogeneizados em tampão RIPA (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) contendo coquetel de inibidores de protease (Roche, Basileia, Suíça), a 4 °C, com auxílio de Polytron PT-MR 3100 (Kinematica AG, Luzern, Suíça), operado a velocidade máxima, por 30 s. Os extratos de tecido foram centrifugados a 10.000 x g, 4°C durante 10 minutos e os sobrenadantes foram recolhidos para análise de transferência de Western.

4.8 Sinalização da Insulina no Fígado e Tecido adiposo branco retroperitoneal

Após 4 h de jejum, os ratos foram anestesiados como descrito acima. A cavidade abdominal foi acessada e uma parte do fígado e do tecido adiposo retroperitoneal foram removidas e imediatamente homogeneizadas em tampão RIPA (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA), contendo coquetel inibidor de protease (Roche, Basileia, Suíça) à 4° C, como descrito acima. Após a remoção inicial do tecido (condição basal), a veia porta foi acessada e 0,5 mL de solução de insulina (preparada em NaCl a 0,9%), que contém uma dose de 2 UI/Kg foi injetada. Após 60 s e 120 s, outra parte do fígado e do tecido adiposo retroperitoneal foram removidas (condição estimulada por insulina), respectivamente, e homogeneizadas em tampão RIPA. Todos os extratos de tecido foram centrifugados a 10.000 x g, a 4 °C, durante 10 minutos, e os sobrenadantes recolhidos para a análise de transferência de Western.

4.9 Análises Histológicas do Fígado

4.9.1 Avaliação Morfoquantitativa

Após a coleta e fixação prévia em paraformaldeído 4% tamponado (overnight), os espécimes foram desidratados por uma série crescente de álcoois, diafanizados em xilol,

incluídos em parafina e posteriormente seccionados (4 μm). As lâminas obtidas foram coradas pela técnica de Hematoxilina- Eosina (HE) e utilizadas nas avaliações morfológica e quantitativa das células do fígado. A área (μm^2) do perfil celular e nuclear dos hepatócitos foi determinada através da medida de 50 células e respectivos núcleos/animal, escolhidas aleatoriamente, perfazendo um total de 250 células/grupo. A densidade celular (células/ mm^2) foi estipulada como descrito por Mandarim de Lacerda (1995), utilizando-se 5 secções semi-seriadas/animal e analisados 2 campos/secção, totalizando 10 fotomicrografias/animal. As análises morfoquantitativas foram realizadas utilizando-se um equipamento computadorizado de imagem (Axio Vision 4.5 Zeiss ®) acoplado a um microscópio trinocular com objetiva de 40 x.

4.9.2 Avaliação de Gordura no Fígado

Fragmentos do fígado foram incluídos em meio Tissue-Tek ®, congelados em nitrogênio líquido e seccionados transversalmente (10 μm). As lâminas obtidas foram fixadas em paraformaldeído 4% tamponado, lavadas em água destilada e coradas com Oil Red O para a evidência de lipídeos, posteriormente os cortes foram contra corados com Hematoxilina. A avaliação qualitativa das lâminas foi realizada a partir de fotomicrografias capturadas por câmera acoplada em microscópio, com objetiva de 40 x.

4.9.3 Avaliação de Glicogênio hepático

Lâminas contendo cortes transversais congelados (10 μm) foram coradas com a técnica histoquímica do Ácido Periódico de Schiff (PAS) e contra coradas com hematoxilina para a evidência do glicogênio hepático. A avaliação qualitativa das lâminas foi realizada a partir de fotomicrografias capturadas por câmera acoplada em microscópio, com objetiva de 40 x.

4.10 Análise do infiltrado inflamatório no Tecido adiposo branco retroperitoneal

A evidenciação de infiltrados inflamatórios foi realizada em cortes semi-seriados do tecido adiposo retroperitoneal com 5 µm de espessura. As lâminas foram submetidas à coloração HE e técnica de imunohistoquímica utilizando o marcador de macrófagos anti-CD11b/c.

4.10.1 Imunohistoquímica do Tecido adiposo branco retroperitoneal

Após bloqueio de ligações inespecíficas com BSA 3%, as secções foram incubadas overnight com anticorpo mouse anti-rat CD11b/c (BD Pharmingen™, 1:1000). Posteriormente, o tecido foi incubado com anticorpo secundário biotilado IgG anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, 1:200) por 2 horas, lavados em tampão fosfato sem cloreto de sódio e incubados com Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, 1:100) por 2 horas. A detecção do complexo antígeno-anticorpo foi realizada através do cromógeno 3,3'-diaminobenzidine (DAB) por 5 minutos em temperatura ambiente. O tecido foi contra corado com hematoxilina. Lâminas sem o anticorpo primário foram utilizadas como controle negativo das reações.

4.11 Instilação com lipopolissacarídeo (LPS) de Escherichia coli

Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina/quetamina (Virbac do Brasil, São Paulo, Brazil) (8 e 80 mg/Kg de peso corpóreo, respectivamente) pela via intraperitoneal. A instilação foi realizada pelo acesso da traquéia com auxílio de um cateter. Na luz traqueal, foram injetados 0,2 mL de solução salina contendo 750 µg de lipopolissacarídeo de *E. coli* (*Sigma Chemical Co.*, St. Louis, MO, USA). Os animais controle receberam o mesmo volume de salina.

4.12 Lavado Broncoalveolar (LBA)

O LBA foi obtido 6 horas após a administração de LPS ou salina. Os animais foram anestesiados, conforme descrito anteriormente. Os pulmões foram lavados pela instilação de 20 mL de tampão fosfato salina (*Phosphate buffered saline - PBS*) a temperatura ambiente através de um tubo de polipropileno (1 mm de diâmetro) inserido na traquéia. O fluido do LBA não foi utilizado se o volume recuperado for menor que 85% dos 20 mL instilados. Baixos volumes recuperados indicam que quantidade substancial de células permanece no pulmão e, portanto, não refletem o processo inflamatório instalado. O número total de células foi determinado utilizando câmara de Newbauer.

4.13 Lâminas e coloração

Células (2×10^5) foram alocadas nas câmaras do citospin Excelsa Flex (FANEM) juntamente com as lâminas de microscopia e centrifugadas à 1000 rpm por 5 minutos. Após centrifugação, lâminas foram coradas com Instant-Prov (NewProv) e fotografadas no microscópio Nikon Eclipse E1000.

4.14 Imunofenotipagem da superfície celular

A identificação e proporção das células foram confirmadas por marcação de moléculas de superfície celular após o lavado broncoalveolar. Foram utilizados os seguintes marcadores: CD45 (leucócitos) conjugado a PE-Cy7, CD11b (macrófagos/monócitos) conjugado a APC e HIS48 (granulócitos) conjugado a FITC. Os anticorpos foram adquiridos da BD Bioscience. Os parâmetros acima descritos foram avaliados através de citometria de fluxo FACSCanto II da Becton Dickinson (Califórnia, EUA). Foram considerados neutrófilos apenas a subpopulação que apresentar marcação positiva para CD45, CD11b, HIS48 .

Primeiramente, foi realizado o bloqueio de porção Fc dos receptores celulares, assegurando que o anticorpo se ligue exclusivamente à porção ligante do antígeno de interesse. Para tanto, as células foram incubadas com anti-rat CD32 por 5 minutos à 4°C. Em seguida, foram adicionados os anticorpos monoclonais, conforme descrito acima, às células e, estas incubadas por 30 minutos ao abrigo da luz a 4°C. Após o tempo decorrido, as amostras foram lavadas com *stain buffer* (BD Biosciences) centrifugadas a 350 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuscitado em 300 µL de solução salina isotônica para análise.

4.15 Citocinas LBA e adipocinas

A determinação de IL-1 β , IL-6, IL-10, CXCL3 (CINC-2 α) e TNF- α foi realizada em amostras do sobrenadante do LBA seis horas após a instilação dos animais com LPS ou salina. A leptina e adiponectina foram avaliadas no plasma dos animais. As dosagens foram realizadas utilizando-se o método de *ELISA*, conforme instruções do fabricante (*R&D Systems, Minneapolis, EUA*).

4.16 Mieloperoxidase (MPO)

A Atividade da MPO e a quantidade total presente no LBA foram determinadas por ensaio fluorimétrico, conforme instruções do fabricante (Myeloperoxidase – MPO - Activity Assay Kit – Fluorometric - ab111749).

4.17 Migração *in vitro*

Neutrófilos (5×10^4) separados do sangue foram alocados na parte superior de um *transwell* específico para ensaios de migração com membrana com poros de 3 µm de diâmetro (Corning HTS Transwell). Na parte inferior da câmara de migração, sobrenadante de

macrófagos alveolares estimulados com LPS por 24 horas foi utilizado como estímulo de migração. Após 4 horas de ensaio, neutrófilos que migraram (parte inferior da sistema) foram contados em câmara de Neubauer. Membranas foram recortadas e coradas para verificação da aderência dos neutrófilos nas mesmas. Foi observado que neutrófilos não aderem nas membranas e após migração ficam suspensos no líquido da parte inferior.

4.18 Produção de Citocinas por Macrófagos alveolares e Neutrófilos do sangue (in vitro)

Neutrófilos (2×10^6 /ml) separados do sangue e macrófagos alveolares (1×10^6 /ml) foram submetidos à um estímulo com LPS por 6 horas em cultura. Citocinas foram dosadas no sobrenadante da cultura conforme descrito anteriormente (item 4.15).

4.19 Expressão gênica das citocinas, enzimas antioxidantes, proteínas de adesão e inflamossomos

O RNA total de neutrófilos foi obtido de 1×10^7 células pelo método de extração com isotiocianato de guanidina (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987), usando o reagente TRIzol® (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*), que mantém a integridade do RNA, enquanto rompe membrana e todos os componentes celulares. Inicialmente, as amostras homogeneizadas foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente para permitir dissociação completa dos complexos protéicos, foi adicionado clorofórmio (0,2 mL) e centrifugado a $12.000 \times g$ por 15 minutos, a 4°C . A fase aquosa foi transferida para microtubos com etanol 70% e após homogeneização, o RNA foi isolado através de colunas do *kit RNeasy Mini (Qiagen)*. Ao término da extração, o RNA foi quantificado e sua pureza verificada através da razão 260/280 nm. O RNA total foi utilizado na síntese de cDNA através do *High-Capacity cDNA reverse transcription Kit (ThermoFischer)*, conforme instruções do fabricante. Os genes avaliados por *PCR tempo real foram*: IL-1 β , IL-6, IL-18, CXCL-1, CXCL-2, CXCL-3, IL-10, TNF- α ,

LFA-1, ICAM-1, ICAM-2, Itgb2, TLR4, TLR2, MyD88, TRIF, TRAF6, FADD, IRAK1, IRAK2, IRAK4, IRF3, NFkB2, COX2, Elastase, Alox5, Catalase, Gpx1, NLRP3, NLRP1, NLRC4, PYCARD, AIM2 e Caspase 1. O PCR tempo real (HIGUCHI et al., 1992) foi realizado em um equipamento Rotor Gene Q (*Corbett Research, Mortlake, Australia*), através do *Jump Start SYBR® Green kit* (Sigma Aldrich) que contém SyBR® Green I como sonda fluorescente. A quantificação da expressão gênica foi calculada por $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001), utilizando a expressão dos genes RPL37a, ciclofilina B (CyB) e HPRT1 como genes normalizadores (DASU et al., 2008). As sequências dos *primers sense e antisense* de cada gene avaliado estão organizados na tabela 2 abaixo:

Tabela 2 - Sequências de primers de genes analisados por qPCR.

(Continua)

Gene	Primers	Nm	Produto
IL-1β	S: AAATGCCTCGTGCTGTCTGA AS: AGGCCACAGGGATTTTGTCG	NM_031512.2	133 bp
IL-6	S: AGAGACTTCCAGCCAGTTGC AS: AGTCTCCTCTCCGGACTTGT	NM_012589.2	85 bp
IL-18	S: AACCGCAGTAATACGGAGCAT AS: CGTTGGCTGTTCGGTCGATA	NM_019165.1	101 bp
IL-10	S: CCTCTGGATACAGCTGCGAC AS: ATGGCCTTGTAGACACCTTTGT	NM_012854.2	120 bp
TNF-α	S: CTGTGCCTCAGCCTCTTCTC AS: ACTGATGAGAGGGAGCCCAT	NM_012675.3	126 bp
CXCL-1	S: CCACACTCAAGAATGGTCGC AS: ACTTGGGGACACCCTTTAGC	NM_030845.1	93 bp
CXCL-2	S: CACCAACCATCAGGGTACAGG AS: TTGGTAGGGTCGTCAGGCA	NM_053647.1	71 bp
CXCL-3	S: AGCCACTCTCAAGGATGGTCAA AS: ACAGGGAGGGGCTCTTCAGTA	NM_138522.1	95 bp
LFA-1	S: ATCGCACACACATGGACTGT AS: GCTTCCCTGGTTGGCTTCTT	NM_01033998	80 bp
ICAM-1	S: GCCTGGGGTTGGAGACTAAC AS: CTGTCTTCCCCAATGTCGCT	NM_012967.1	91 bp
ICAM-2	S: ATGAGCCTCCAGCTCAGGTA AS: AGAGCAGAGAGGGGTGAGG	NM_10077251	126 bp
Itgb2	S: GTTTCAGACAGAGGTCCGGCA AS: AATTCCTCCGGACAGGCAG	NM_10377802	103 bp

Tabela 2 - Sequências de primers de genes analisados por qPCR.

			(Conclusão)
TLR4	S: TCCACAAGAGCCGGAAAGTT AS: TGAAGATGATGCCAGAGCGG	NM_019178.1	126 bp
TLR2	S: ATCACTGCACCCTCAATGGG AS: TGTGCAGGCTCCGTATTGTT	NM_198769.2	102 bp
MyD88	S: GAGAGCAGTGTCCCACAGAC AS: AGCAGATGAAGGCGTCGAAA	NM_198130.1	97 bp
TRIF	S: GACTAGAAGTCAGCCTCGCC AS: GCCGGTGGAGTGTAACGTAT	XM_08757917	70 bp
TRAF6	S: CGCCAAAATGGAAACGCAGA AS: TGCTTCCATCTCGGCAACTT	NM_01107754	88 bp
FADD	S: TGAGGCCAAGATTGATGGCA AS: GAGGCGTTCTCCTTCTCGAC	NM_152937.2	105 bp
IRAK1	S: CTCTCCCAGCTTTTCCAGG AS: GAGGAGGGGGCTGAAGATTG	NM_01127555	107 bp
IRAK2	S: ACATCTACCAGCTGCCGTCC AS: TCCACTCACTGAGCGTGTCC	NM_01025422	70 bp
IRAK4	S: CCAGTCCAGGCCATCAAAGT AS: CCGATAGACACAGGTCGCTC	NM_01106791	122 bp
IRF3	S: GATGAGGGGTCCTCAGACCT AS: TGCTGGGTTTGGGAAGTTGT	NM_01006969	87 bp
NFkB2	S: ATGCCGGAGAATGAAGAGCC AS: AGCGTTCAACAGCAGGGTC	NM_00100834	162 bp
COX2	S: ATGCTACCATCTGGCTTCGG AS: TGGAACAGTCGCTCGTCATC	NM_017232.3	88 bp
Elastase	S: CAGCGCATCTTTGAGAACGG AS: TGGTAGCTGAGCCATTGAGC	NM_00110676	80 bp
Alox5	S: TGGCATCTAGGTGTCAGTGTG AS: CCTCCAGGTTCTTGCGGAAT	NM_012822.1	133 bp
Catalase	S: GCGGATTCTGAGAGAGTGG AS: GACTGTGGAGAATCGGACGG	NM_012520.2	148 bp
Gpx1	S: GGTAGGTCCAGACGGTGTTC AS: ATCGGGTTCGATGTTCGATGG	NM_030826.3	70 bp
NLRP3	S: CCAGGAGTTCTTTGCGGCTA AS: GCCTTTTTCGAACTTGCCGT	NM_01191642	145 bp
NLRP1	S: GACAGTACCAGGCAGTTCGT AS: AGTAGGGCTGTGTTTGCCTC	NM_172322.1	132 bp
NLRC4	S: TCTACAGGGACTGATCGGCA AS: CAGCAGATTGGGCAGACTGA	NM_01309432	100 bp
PYCARD	S: GACAGTACCAGGCAGTTCGT AS: AGTAGGGCTGTGTTTGCCTC	NM_172322.1	132 bp
AIM2	S: GCGGGACAATTGTGAATGGC AS: CAACACCTCCATGGTCCCTC	XM_00105714	104 bp
Caspase1	S: GACCGAGTGGTCCCTCAAG AS: GACGTGTACGAGTGGGTGTT	NM_012762.2	108 bp

Tabela 2 - Sequências de primers de genes analisados por qPCR.

			(Conclusão)
RPL37a	S:CGCTAAGTACACTTGCTCCTTCTG AS:GCCACTGTTTTTCATGCAGGAAC	NM_00120531	91 bp
CyB	S:CTCCGTGGCCAACGATAAGA AS:AGGTCACCTCGTCCTACAGGT	NM_022536.2	95 bp
HPRT1	S:GCGAAAGTGGAAAAGCCAAGT AS:GCCACATCAACAGGACTCTTTAG	NM_012583.2	98 bp

4.20 Western Blotting

A análise de western blotting foi realizada conforme descrito anteriormente (OHIRA et al., 2004; OMORI et al., 2004). Neutrófilos (1×10^7) e tecidos (100 mg) foram rapidamente lisados pela adição de 60 μ L de tampão 1% Triton X100 com 1% (v/v) ou 500 μ L de tampão RIPA, respectivamente, cocktail inibidor de protease (Sigma-Aldrich) e 1 mM PMSF. Aliquotas destas amostras foram separadas por SDS-PAGE (30 μ g/poço). As proteínas separadas foram transferidas, eletroforéticamente, para membranas de nitrocelulose utilizando tampão Tris-borato [25 mM Tris, 192 mM glicina e 20% (v/v) metanol, pH 8,4] (TOWBIN et al., 1979). Proteínas foram transferidas a 80 V por 150 minutos a 4 °C. As membranas foram bloqueadas por 1 h a temperatura ambiente com 5% de leite desnatado (pH 7,6). O tampão de bloqueio foi removido e as membranas foram incubadas com os anticorpos primários apropriados (Neutrófilos: TLR4, TLR2, pIKB α , IKB α , pNFK β , NFK β ; Tecidos: pAKT, AKT, pGSK-3 β , GSK-3 β , IL-1 β , IL-10, IL-6, TNF α) overnight a 4 °C em 20 mM Tris HCl (pH 7,6) contendo 250 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20, 1% (w/v) BSA e 0,002% (w/v) NaN₃. As membranas foram subsequentemente lavadas três vezes (10 minutos por lavagem) com TBST [20 mM Tris-HCl(pH 7,6) contendo 150 mM NaCl e 0,1% (v/v) Tween 20] e então incubadas com os anticorpos secundários (goat anti-mouse ou rabbit IgG-HRP conjugada) em TBST por 1 h a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas três vezes em TBST. A atividade da HRP foi visualizada pela incubação das membranas por 1 minuto à temperatura

ambiente com sistema de detecção ECL (Sigma), seguido de foto detecção pelo aparelho AI600 (GE). Ao término dos experimentos, os blots foram normalizados pela membrana corada com ponceau como previamente descrito por Romero-Calvo et al. (2010) e Aldridge et al. (2008). A densidade das bandas foi determinada através do software Image J (NIH).

4.21 Ensaio de splicing de XBP1

O cDNA XBP-1 de neutrófilo de rato foi amplificado por RT-PCR (Qiagen OneStep RT-PCR kit) utilizando-se de primers que se ligam antes do íntron que é excisado pela atividade exonuclease do IRE1. Dessa maneira, os primers conseguem sintetizar o cDNA do mRNA correspondente ao IRE1 inteiro e clivado. As sequências dos primers para amplificar XBP-1 e sXBP1 de rato foram: 5' AAA CAG AGT AGC AGC ACA GAC TGC 3' e 5' TCC TTC TGG GTA GAC CTC TGG GAG 3'. O protocolo para RT-PCR foi o seguinte: 50 °C (30 minutos); 95 °C (15 minutos); 35 ciclos de {94 °C (1 minuto), 60 °C (1 minuto), 72 °C (1 minuto)} e 72 °C (10 minutos). Os cDNAs produzidos pelo RT-PCR foram submetidos à eletroforese em um gel de agarose 3% e visualizados utilizando-se brometo de etídio.

4.22 Cinética de estímulo de LPS e Tunicamicina (TUN)

Neutrófilos foram extraídos por lavagem peritoneal após 4 horas de injeção de 10 ml de glicogênio de ostra tipo II no peritônio dos animais. Células foram mantidas em cultura em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Neutrófilos permaneceram em cultura por 20h com ou sem estímulo. O estímulo constituiu em 2,5 ug/ml de LPS, ligante e ativador de TLR4, ou TUN (2mg/ml) que é um agente causador de estresse de retículo endoplasmático ou, co-estímulo de TUN (2 mg/ml) + LPS (2,5 ug/ml). Citocinas do sobrenadante da cultura foram dosadas nos tempos 3, 6, 9, 12, 16 e 20 horas após os diferentes estímulos.

5 Resultados

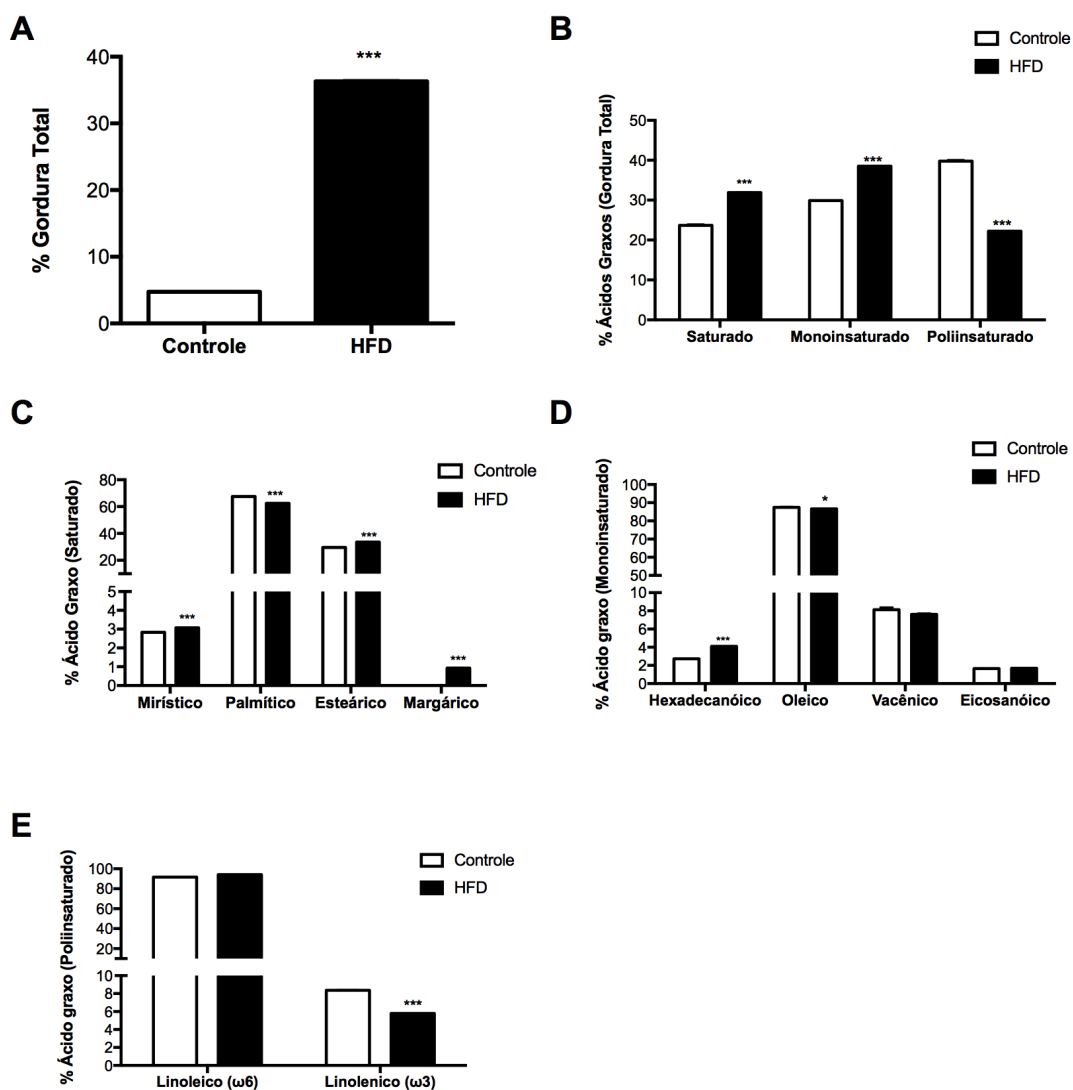
Os resultados obtidos no decorrer deste estudo foram organizados em três subitens:

- 1) Caracterização dos modelos de Diabetes tipo 2
- 2) Perfil inflamatório e função dos neutrófilos nos modelos experimentais
- 3) Avaliação das vias de TLR4 e estresse de RE e a interação entre as mesmas em neutrófilos do LBA

5.1. Caracterização dos modelos de Diabetes tipo 2.

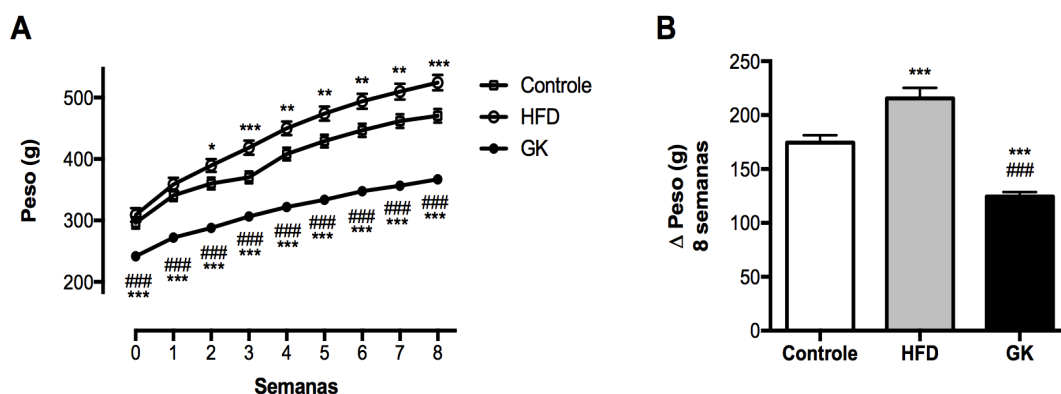
As rações utilizadas nesse estudo divergem na distribuição de energia provindas de lipídios e carboidratos e mantêm a mesma quantidade e energia provindas de proteínas. A diferença entre as rações está na matéria prima da fonte de lipídios: na ração controle foi utilizado apenas óleo de soja, enquanto na hiperlipídica foi utilizado banha de porco e óleo de soja. Para averiguação da porcentagem de quilocalorias provenientes da gordura e verificação do perfil de ácidos graxos, as rações foram submetidas a análise através da cromatografia gasosa. A ração hiperlipídica apresentou maiores concentrações de ácidos graxos saturado e monoinsaturado e menor concentração de ácidos graxos poliinsaturados quando comparada com a ração controle (Figura 2B). Ratos alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) mostraram maior ganho de peso em relação aos ratos controle (20%) e GK (90%) (Figura 3), enquanto animais GK apresentaram menor ganho de peso quando comparado com os outros grupos após 8 semanas de tratamento (Figura 3). Embora os animais GK tenham sido selecionados a partir de animais wistar, os animais diabéticos são menores e ao término das 8 semanas de tratamento não atingiram o mesmo tamanho do animais do grupo grupo controle (Figura 4).

Figura 2 - Análise de porcentagem de gordura (A) e Perfil de ácidos graxos na ração (B-E). As determinações foram realizadas por cromatografia gasosa após extração lipídica da ração.



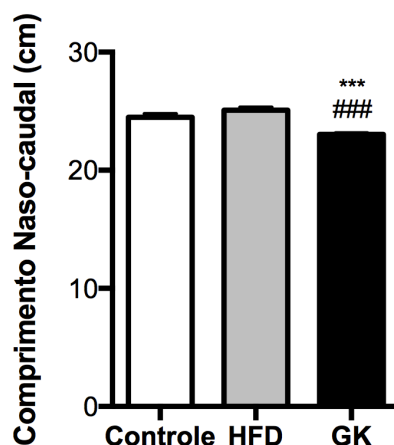
Considerando as análises, foi possível verificar o perfil da composição dos ácidos graxos (B); ácidos graxos saturados (C), ácidos graxos monoinsaturados (D) e ácidos graxos poliinsaturados (E) detectados pelo cromatógrafo. Grupos estudados: Controle (n=3) e HFD (n=3). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de replicatas utilizadas em cada grupo. (*) indica $p < 0,05$ vs controle; (***) indica $p < 0,001$ vs controle.

Figura 3 - Avaliação semanal do peso dos animais (A) e ganho de peso corpóreo após 8 semanas de dieta (B).



Grupos estudados: Controle (n=24); HFD (n=22) e GK (n=34). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo. (*) indica $p < 0,05$ vs controle; (**) indica $p < 0,01$ vs controle; (***) indica $p < 0,001$ vs controle; (###) indica $p < 0,001$ vs HFD.

Figura 4 - Comprimento naso-caudal.

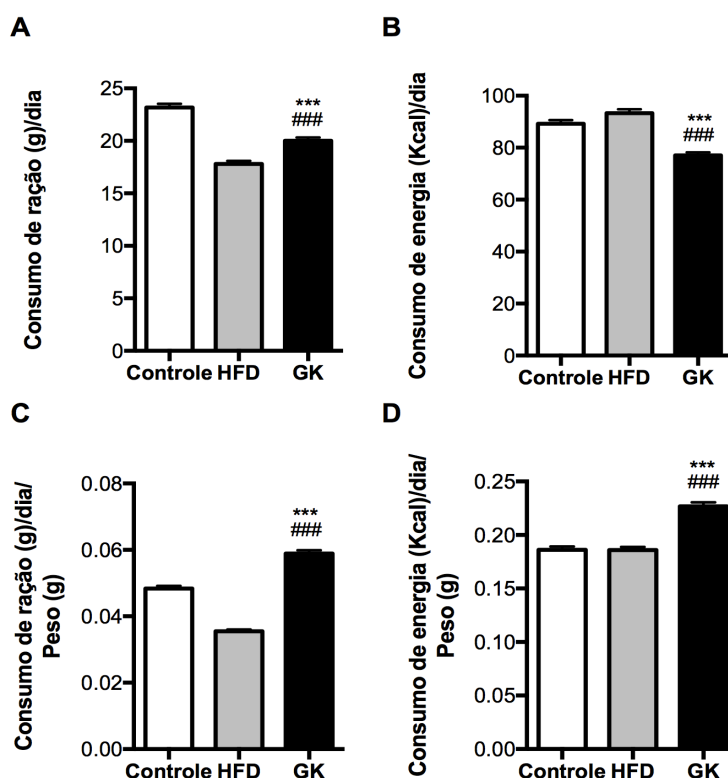


Grupos estudados: Controle (n=24); HFD (n=22) e GK (n=34). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo. (***) indica $p < 0,001$ vs controle; (###) indica $p < 0,001$ vs HFD.

Dessa maneira, foram utilizadas duas abordagens para mensurar o consumo de ração e energia dos grupos experimentais. A primeira baseou-se apenas no consumo diário de ração pelos animais (Figura 5A e 5B). Na segunda, o consumo diário foi normalizado pelo peso do animal, por considerar que os animais de diferentes peso e tamanho consumam diferentes quantidades de ração diariamente (Figura 5C e 5D). Essa última abordagem evidenciou que animais GK ingeriram maior quantidade de ração e, conseqüentemente, consumiram mais energia que os animais dos outros grupos experimentais. Observou-se também que animais do

grupo HFD consumiram menor quantidade diária de ração porém, o consumo energético se igualou ao apresentado no grupo controle (Figura 5).

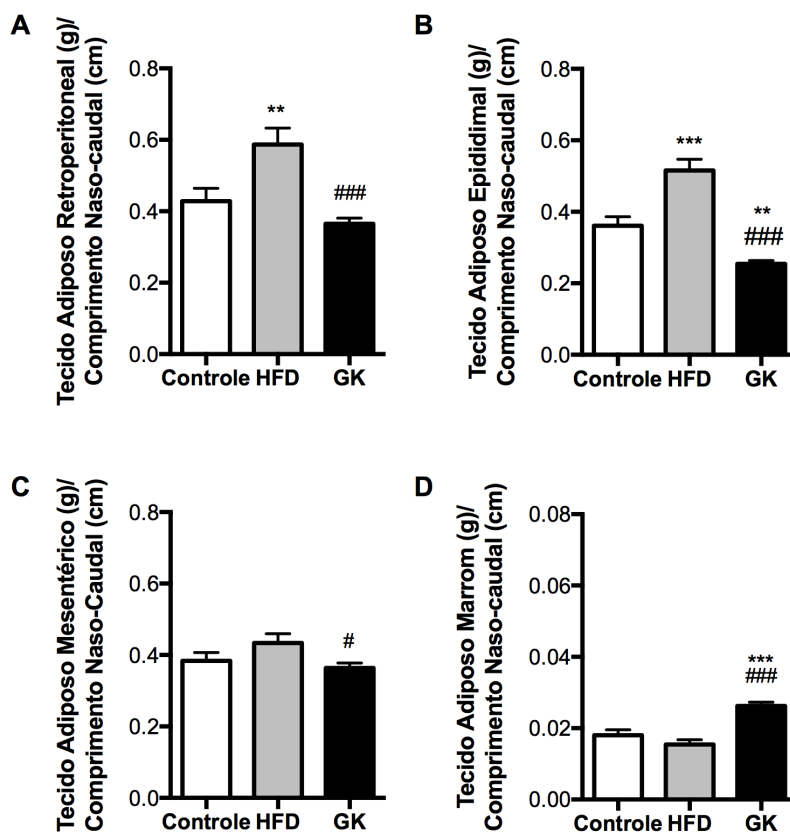
Figura 5 - Consumo diário de ração (gramas) (A); consumo energético diário (Kcal) (B); ambos normalizados pelo peso corpóreo dos animais (C e D).



Grupos estudados: Controle (n=24); HFD (n=22) e GK (n=34). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo. (***) indica $p < 0,001$ vs controle; (###) indica $p < 0,001$ vs HFD.

A dieta HFD contribuiu para o aumento da massa adiposa do animal, principalmente dos tecidos adiposos retroperitoneal (Figura 6A) e epididimal (Figura 6B). Por outro lado, os animais GK apresentaram menor massa adiposa quando comparado com os outros grupos experimentais, exceto pelo tecido adiposo marrom, que aumenta consideravelmente nesse grupo (Figura 6).

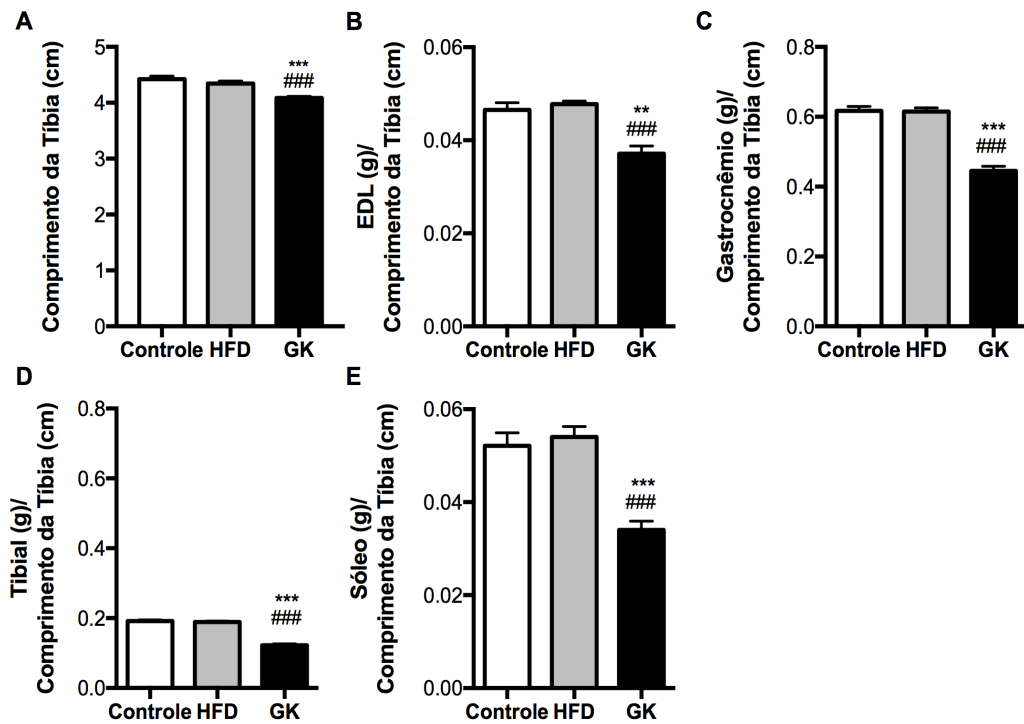
Figura 6 - Peso úmido dos depósitos de tecido adiposo branco.



Seis horas após a instilação intratraqueal de salina ou LPS, os animais foram anestesiados e eutanasiados. Os tecidos foram coletados e determinou-se o peso úmido dos tecidos adiposo retroperitoneal, epididimal, mesentérico e marrom; sendo normalizado pelo comprimento naso-caudal do animal. Grupos estudados: Controle (n=24); HFD (n=20) e GK (n=31). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo. (*) indica $p < 0,05$ vs controle; (**) indica $p < 0,01$ vs controle; (***) indica $p < 0,001$ vs controle; (#) indica $p < 0,05$ vs HFD; (###) indica $p < 0,001$ vs HFD.

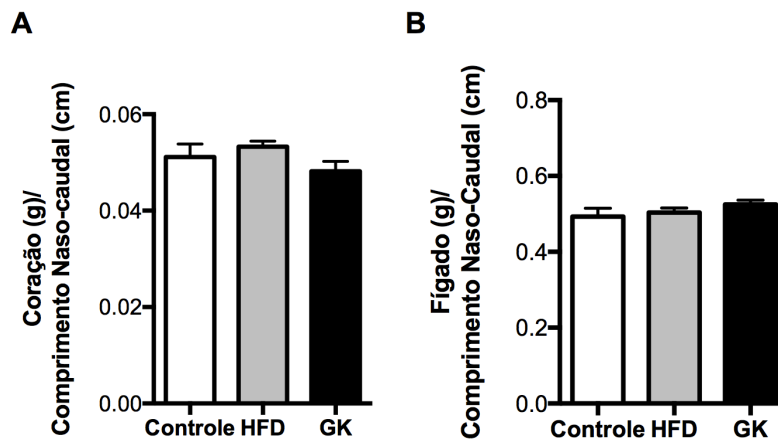
Não houve diferença do peso dos músculos gastrocnêmio, tibial, EDL e sóleo entre os grupos controle e HFD. No entanto, os animais GK apresentaram menor peso desses músculos quando comparado com os outros grupos (Figura 7). Não houve diferença do peso úmido do fígado e coração dentre os grupos estudados (Figura 8).

Figura 7 - Peso úmido dos músculos esqueléticos.



Seis horas após a instilação intratraqueal de salina ou LPS, os animais foram anestesiados e eutanasiados. Os tecidos foram coletados e determinou-se o peso úmido dos músculos gastrocnêmio, tibial, EDL e sóleo; sendo normalizado pelo comprimento da tibia do animal. Grupos estudados: Controle (n=12); HFD (n=10) e GK (n=21). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo (***) indica $p < 0,001$ vs controle; (###) indica $p < 0,001$ vs HFD.

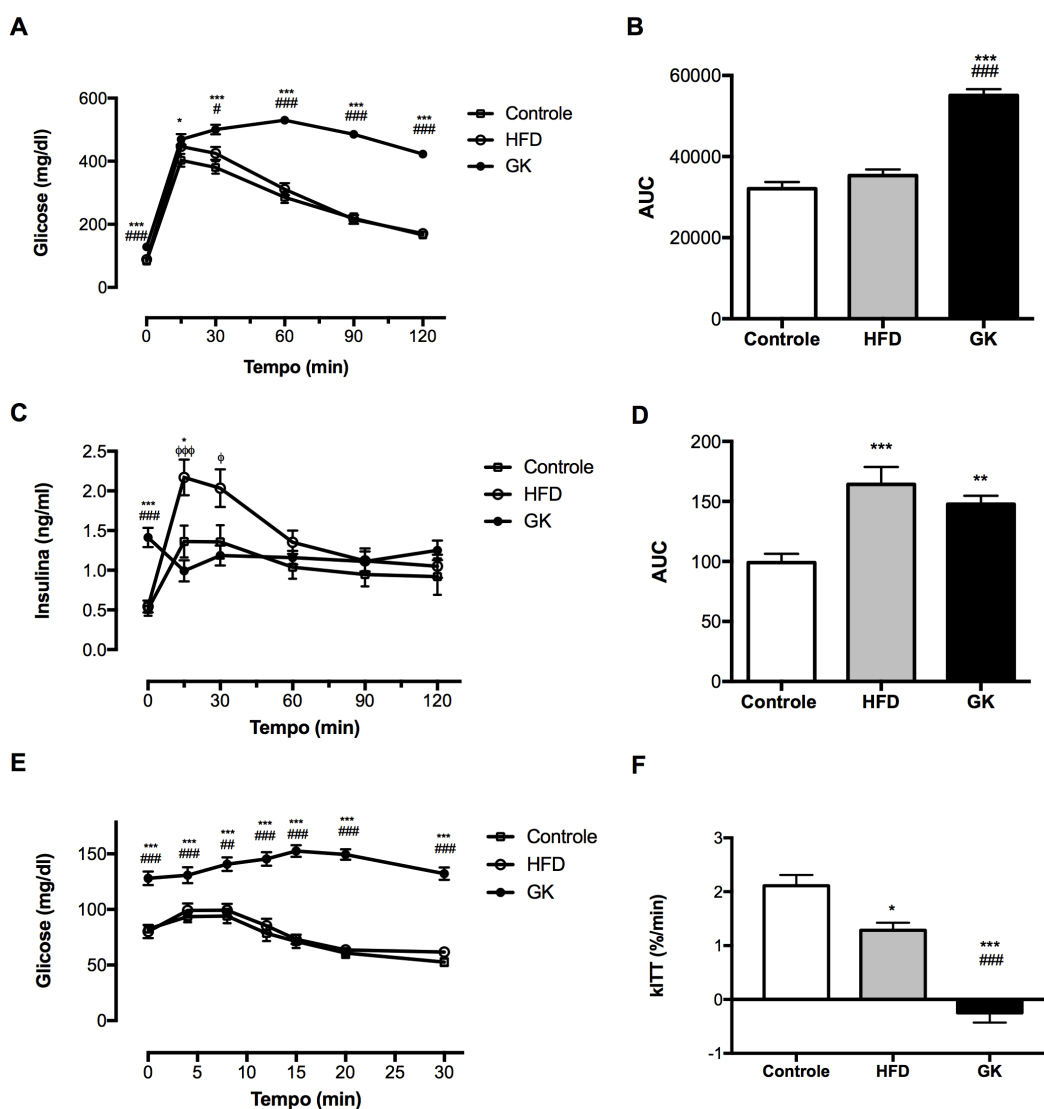
Figura 8 - Peso úmido do Coração (A) e do fígado (B).



Seis horas após a instilação intratraqueal de salina ou LPS, os animais foram anestesiados e eutanasiados. Os tecidos foram coletados e seus pesos aferidos; os valores foram normalizados pelo comprimento naso-caudal do animal. Grupos estudados: Controle (n=24); HFD (n=20) e GK (n=31). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo.

No teste de tolerância à glicose (TTG), verificou-se que duas horas após a injeção intraperitoneal de glicose (2g/kg), a concentração plasmática de glicose permanecia alta nos animais GK. Nos animais HFD verificou-se que o retorno da concentração plasmática de glicose foi similar aos animais do grupo controle. (Figura 9A; 9B). Para verificar a insulinemia frente à sobrecarga de glicose, dosou-se o hormônio em jejum e 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após à injeção de glicose (i.p). Os ratos GK apresentaram maior concentração plasmática de insulina basal porém, 15 minutos após o estímulo com glicose, observou-se diminuição do hormônio no plasma, diferentemente do apresentado em animais dos grupos HFD e controle no mesmo período (Figura 9C; 9D). Um fato importante foi observado neste protocolo, sendo que animais do grupo HFD apresentaram a maior concentração plasmática de insulina após o estímulo com glicose, quando comparado ao grupo controle, indicando a necessidade maior do hormônio para manter a homeostasia glicêmica, como observado em animais do grupo controle (Figura 9A). Essa condição é indicativa do quadro de resistência à insulina desenvolvida pelo grupo HFD. No teste de tolerância à insulina (TTI), animais GK não responderam ao hormônio, apresentando altas concentrações de glicose plasmática, mesmo após uma injeção intraperitoneal de insulina (0,5 UI/kg) (Figura 9E). Após cálculo da constata de sensibilidade à insulina (KITT), verificou-se que os animais do grupo HFD possuem sensibilidade a insulina diminuída, enquanto ratos GK apresentaram resistência à insulina de grande magnitude (Figura 9F).

Figura 9 - Glicemia medida durante GTT (A); Área abaixo da curva de glicemia medida durante GTT (B); Níveis plasmáticos de insulina medidos durante GTT (C), área sob curva dos níveis plasmáticos de insulina medidos durante GTT (D); Glicemia medida durante ITT (E); Taxa constante para ITT - kITT (F).

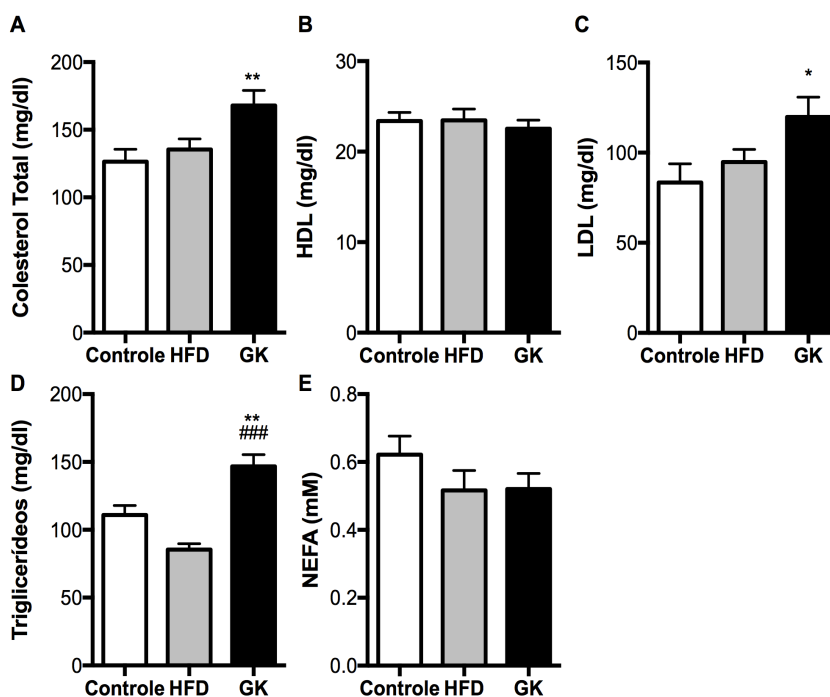


Os resultados são apresentados como média \pm e.p.m e n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Grupos estudados: Controle (n = 24), HFD (n = 17) e GK (n = 31). (*) P <0,05 vs controle; (**) p <0,01 vs controle; (***) p <0,001 versus controle; (#) P <0,05 vs HFD; (###) p <0,001 vs HFD; (ϕ) p <0,05 vs GK; ($\phi\phi\phi$) p <0,001 vs GK.

Ao analisar o perfil lipídico no plasma dos animais, observou-se que os ratos GK apresentaram maior concentração de colesterol total, triglicerídeos e LDL quando comparados com os outros grupos. A concentração de HDL e ácidos graxos livres permaneceram constante no plasma dos animais dos grupos estudados (Figura 10). Os marcadores de lesão hepática, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) aumentaram no plasma dos animais GK (Figura 11). Não houve diferença nas

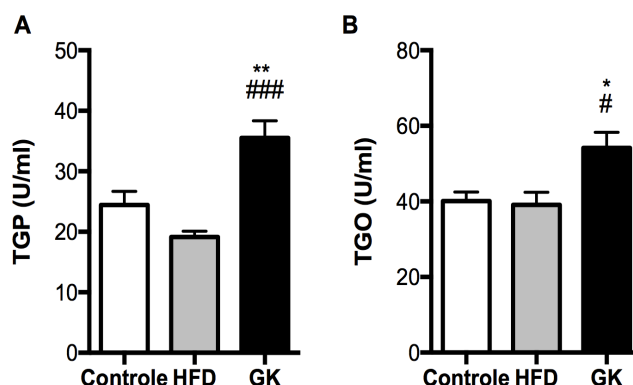
concentrações plasmáticas de leptina e adiponectina nos animais dos grupos estudados (Figura 12). Com base nas alterações verificadas no perfil lipídico dos animais GK, avaliou-se o perfil de ácidos graxos no plasma dos animais por cromatografia gasosa.

Figura 10 - Conteúdo plasmático de colesterol total (A); HDL (B); LDL (C); Triglicérides (D); ácidos graxos livres – NEFA (E) nos grupos estudados.



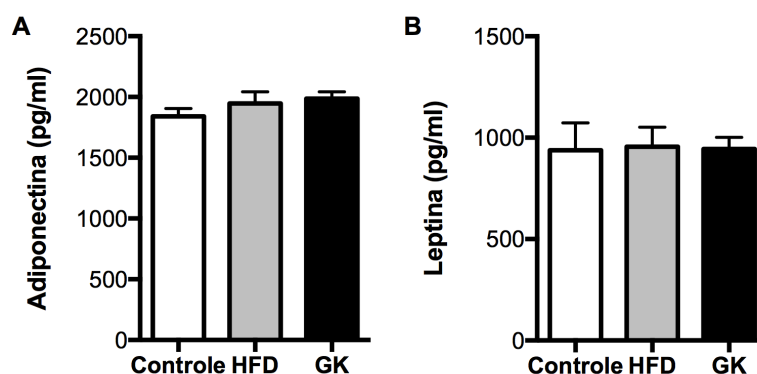
Seis horas após a instilação intratraqueal de salina ou LPS, os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado através da aorta abdominal. As dosagens foram realizadas no plasma, sendo o perfil lipídico por método enzimático-colorimétrico. Grupos estudados: Controle (n=24); HFD (n=20) e GK (n=31). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo. (*) indica $p < 0,05$ vs controle; (**) indica $p < 0,01$ vs controle; (#) indica $p < 0,05$ vs HFD; (###) indica $p < 0,001$ vs HFD.

Figura 11 - Conteúdo plasmático de TGP (A) e TGO (B) nos grupos estudados.



Grupos estudados: Controle (n=24); HFD (n=20) e GK (n=31). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo. (*) indica $p < 0,05$ vs controle; (**) indica $p < 0,01$ vs controle; (#) indica $p < 0,05$ vs HFD; (###) indica $p < 0,001$ vs HFD.

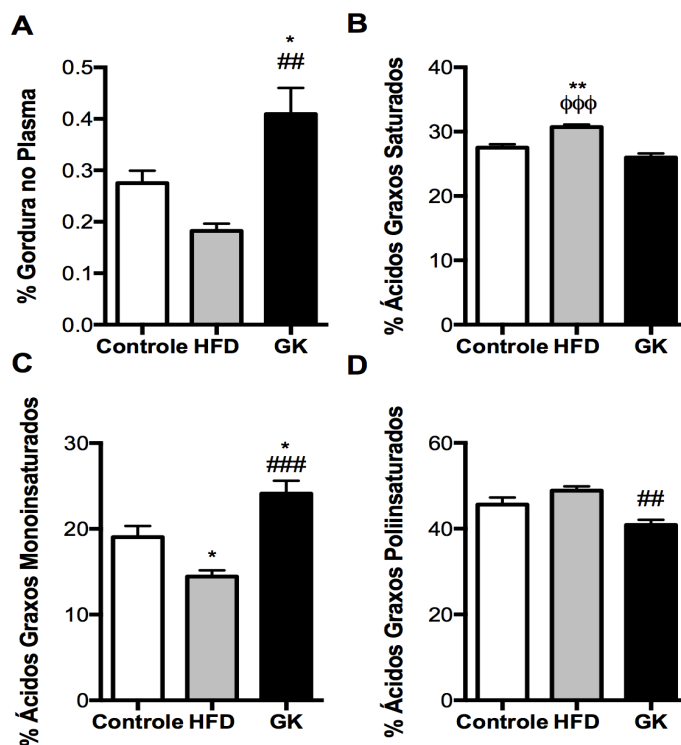
Figura 12 - Conteúdo plasmático de Adipocina (A) e Leptina (B) nos grupos estudados.



Grupos estudados: Controle (n=24); HFD (n=20) e GK (n=31). As dosagens foram realizadas no plasma pelo método de ELISA. Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo.

Através do CG confirmou-se novamente que os animais GK apresentam maior concentração plasmática de gordura total quando comparado com animais dos outros grupos (Figura 13A), possibilitando identificar que os ácidos graxos saturados estão mais abundante no plasma dos animais que receberam dieta HFD, enquanto ácidos graxos monoinsaturados estão mais abundantes no plasma do GK e em menores concentrações em animais do grupo HFD. Já os ácidos graxos poliinsaturados foram encontrados em menores concentrações no plasma de animais GK, considerando o perfil dos ácidos graxos detectado no plasma de animais controle (Figura 13B).

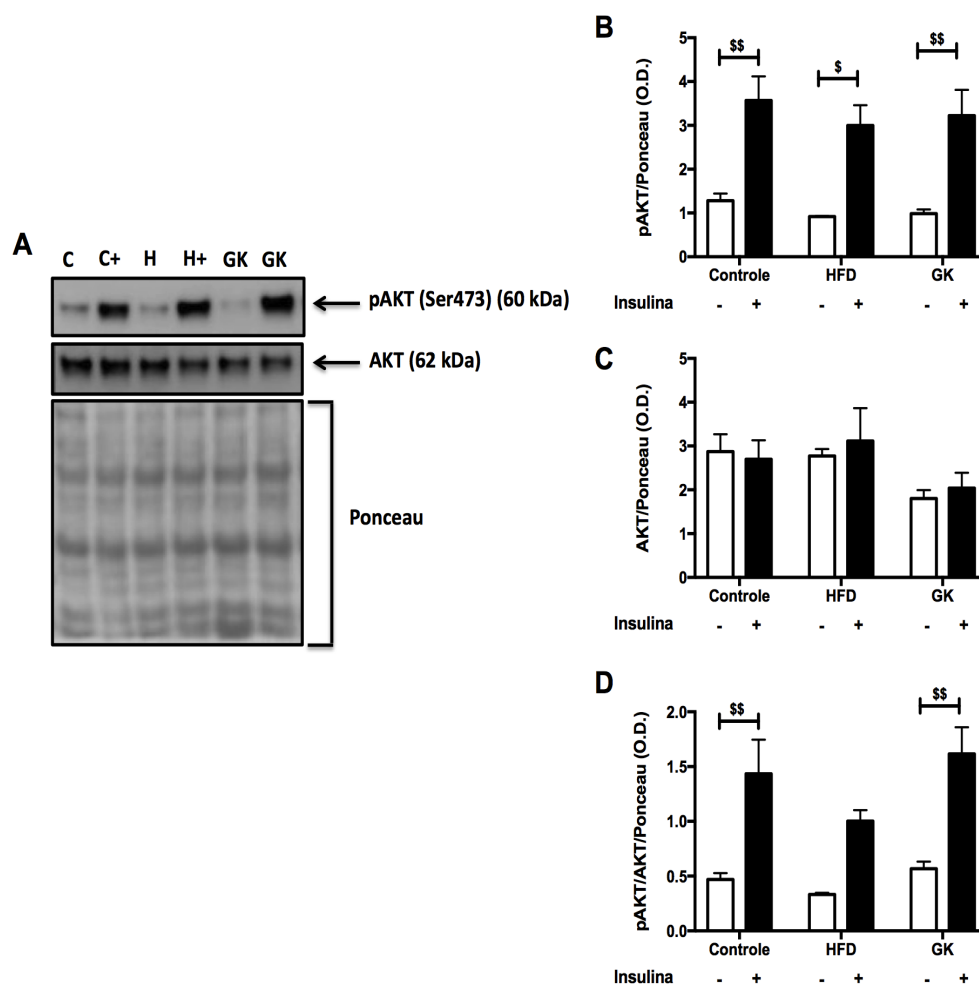
Figura 13 - Análise de porcentagem de gordura (A) e Perfil de ácidos graxos no plasma (B; C; D).



As determinações foram realizadas por cromatografia gasosa após extração lipídica do plasma. Considerando as análises, foi possível verificar o conteúdo de gordura total no plasma (A); ácidos graxos saturados (B), ácidos graxos monoinsaturados (C) e dos ácidos graxos poliinsaturados (D) detectados pelo cromatógrafo. Grupos estudados: Controle (n=5); HFD (n=5) e GK (n=5). Os valores representam a média ± e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo. (*) indica $p < 0,05$ vs controle; (**) indica $p < 0,01$ vs controle; (φφφ) indica $p < 0,001$ vs GK; (φφφ) indica $p < 0,001$ vs GK; (##) indica $p < 0,01$ vs HFD; (###) indica $p < 0,001$ vs HFD.

A fim de verificar a integridade da resposta à insulina nos tecidos periféricos dos grupos em questão, a via de sinalização de insulina pAKT- pGSK-3 β no músculo sóleo, tecido adiposo retroperitoneal e o fígado foram analisados antes e após o estímulo da insulina,. No músculo sóleo, após o estímulo *in vitro* de insulina, o conteúdo de pAKT aumentou igualmente em todos os grupos (Figura 14A). O conteúdo de AKT total e a razão pAKT/AKT foram semelhantes em todos os grupos estudados (Figura 14B; 14C).

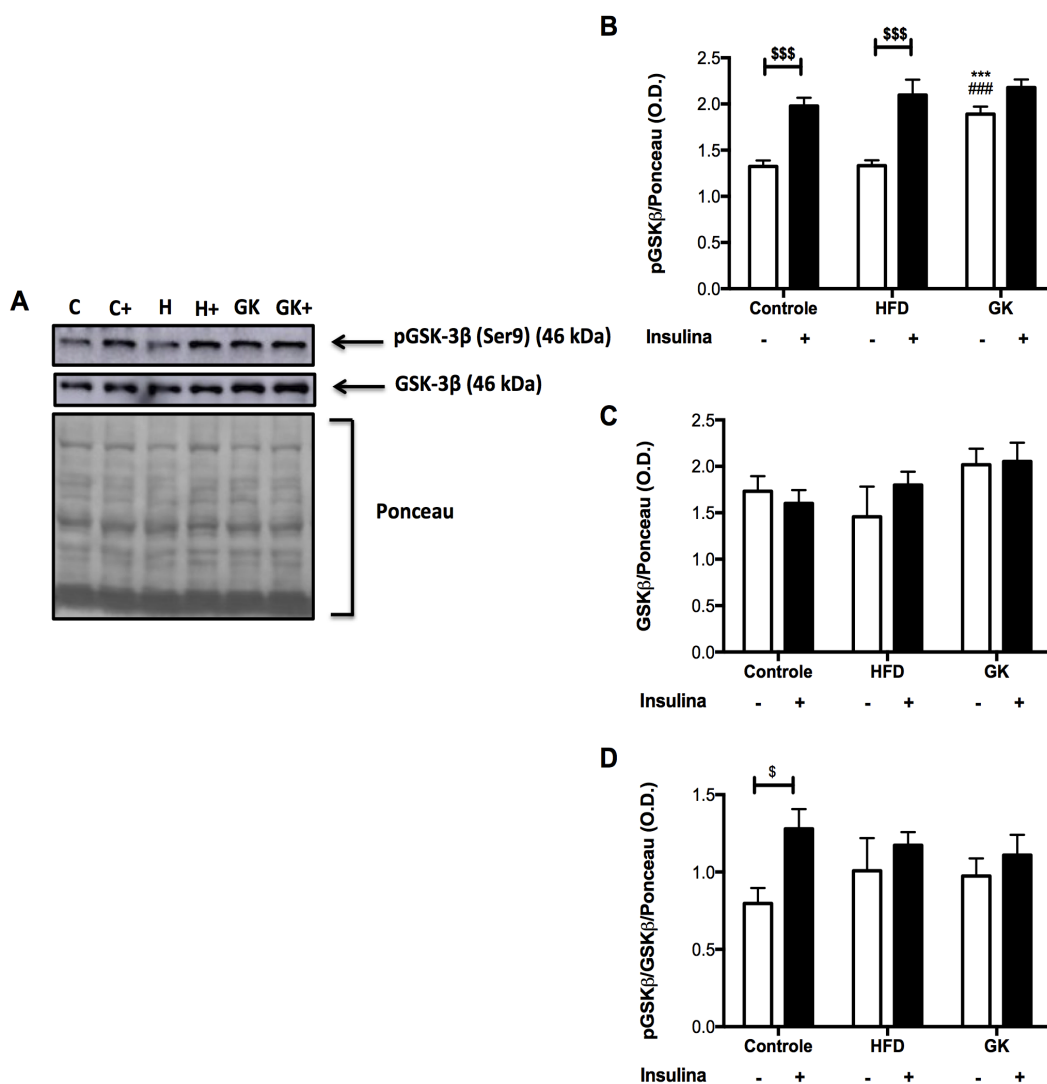
Figura 14 - Quantificação de pAKT e AKT no músculo sóleo por WB (A-D).



Estímulo positivo: insulina (7 nM). Gráficos presentes significam O.D. \pm e.p.m. das bandas e n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Grupos estudados: controle (n = 5); HFD (n = 3) e GK (n = 5). (\$) $p < 0,05$; (\$\$) $p < 0,01$ conforme indicado nos gráficos.

O conteúdo de pGSK-3 β não aumentou após o estímulo de insulina nos ratos GK, sendo que conteúdo de pGSK-3 β , antes do estímulo de insulina, neste grupo, já apresentava-se maior quando comparado aos outros grupos (Figura 15A). A razão de pGSK-3 β /GSK-3 β foi alterada nos grupos HFD e GK, não mostrando aumento após estímulo de insulina como observado no grupo controle (Figura 15D).

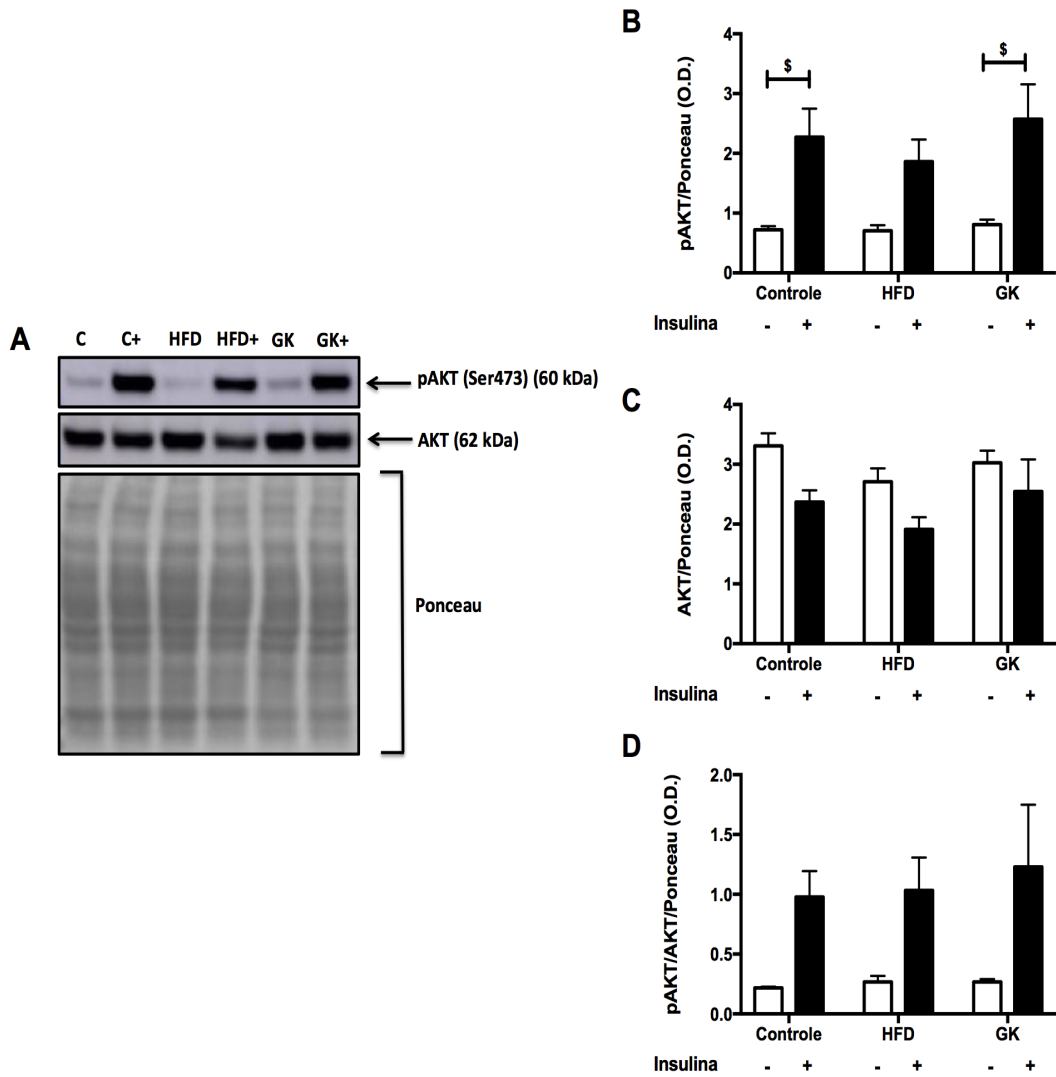
Figura 15 - Quantificação de pGSK-3 β e GSK-3 β no músculo sóleo por WB (A-D).



Estímulo positivo: insulina (7 nM). Gráficos presentes significam O.D. \pm e.p.m. das bandas e n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Grupos estudados: controle (n = 5); HFD (n = 3) e GK (n = 5). (***) indica $p < 0,001$ vs controle; (###) indica $p < 0,001$ vs HFD; (\$) $p < 0,05$; (\$\$\$) $p < 0,001$ conforme indicado nos gráficos.

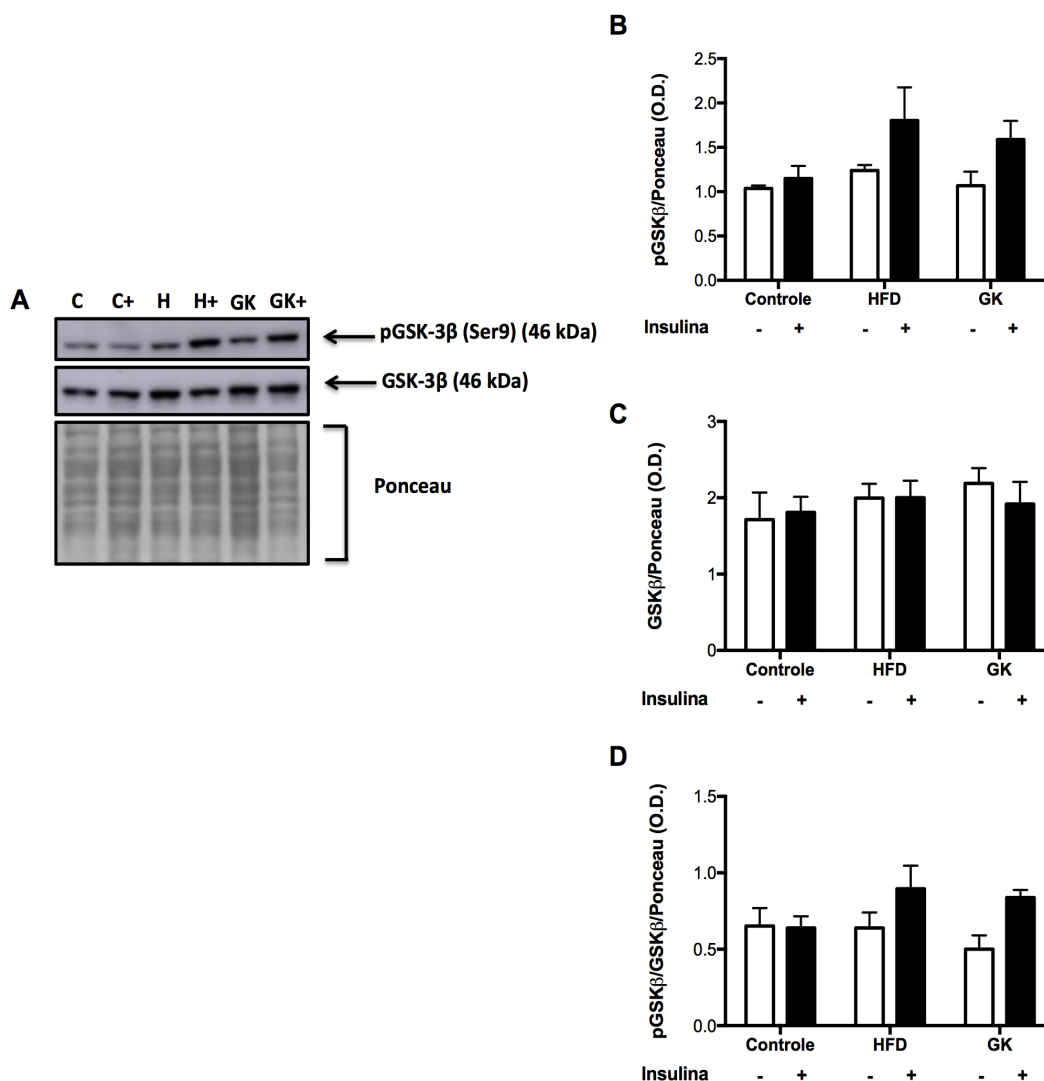
No fígado, o grupo HFD não mostrou diferença no conteúdo de pAKT após o teste de insulina *in vivo* (Figuras 16A). O fígado do grupo GK respondeu igualmente ao grupo controle (Figuras 16A-D). O conteúdo de pGSK-3 β e a relação pGSK-3 β /GSK-3 β foram estatisticamente semelhantes entre todos os grupos (Figuras 17A-D).

Figura 16 - Quantificação de pAKT e AKT no fígado por WB (A-D).



Estímulo positivo: insulina (7 nM). Gráficos presentes significam O.D. \pm e.p.m. das bandas e n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Grupos estudados: controle (n = 5); HFD (n = 3) e GK (n = 5). (\$) $p < 0,05$ conforme indicado nos gráficos.

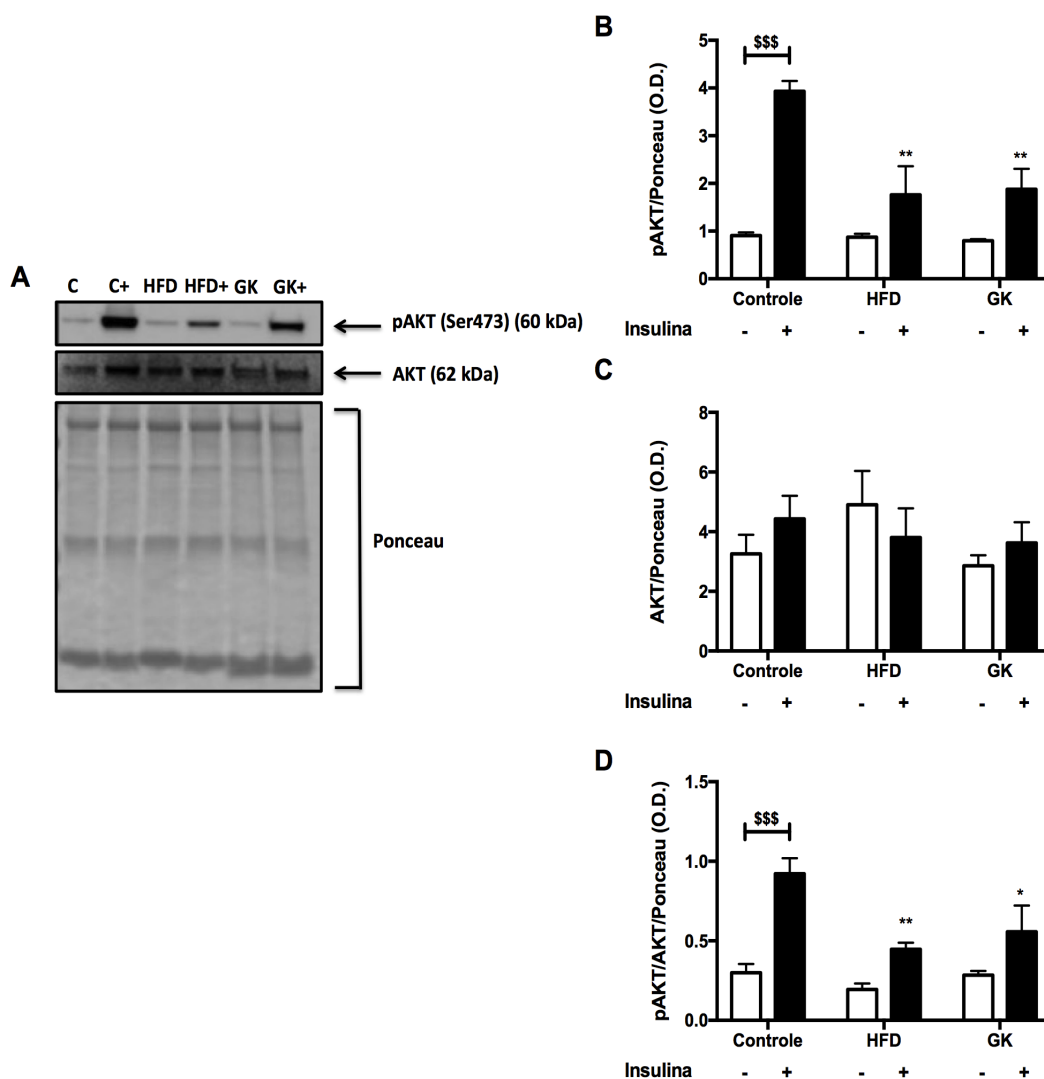
Figura 17 - Quantificação de pGSK-3 β e GSK-3 β no fígado por WB (A-D).



Estímulo positivo: insulina (7 nM). Gráficos presentes significam O.D. \pm e.p.m. das bandas e n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Grupos estudados: controle (n = 5); HFD (n = 3) e GK (n = 5) conforme indicado nos gráficos.

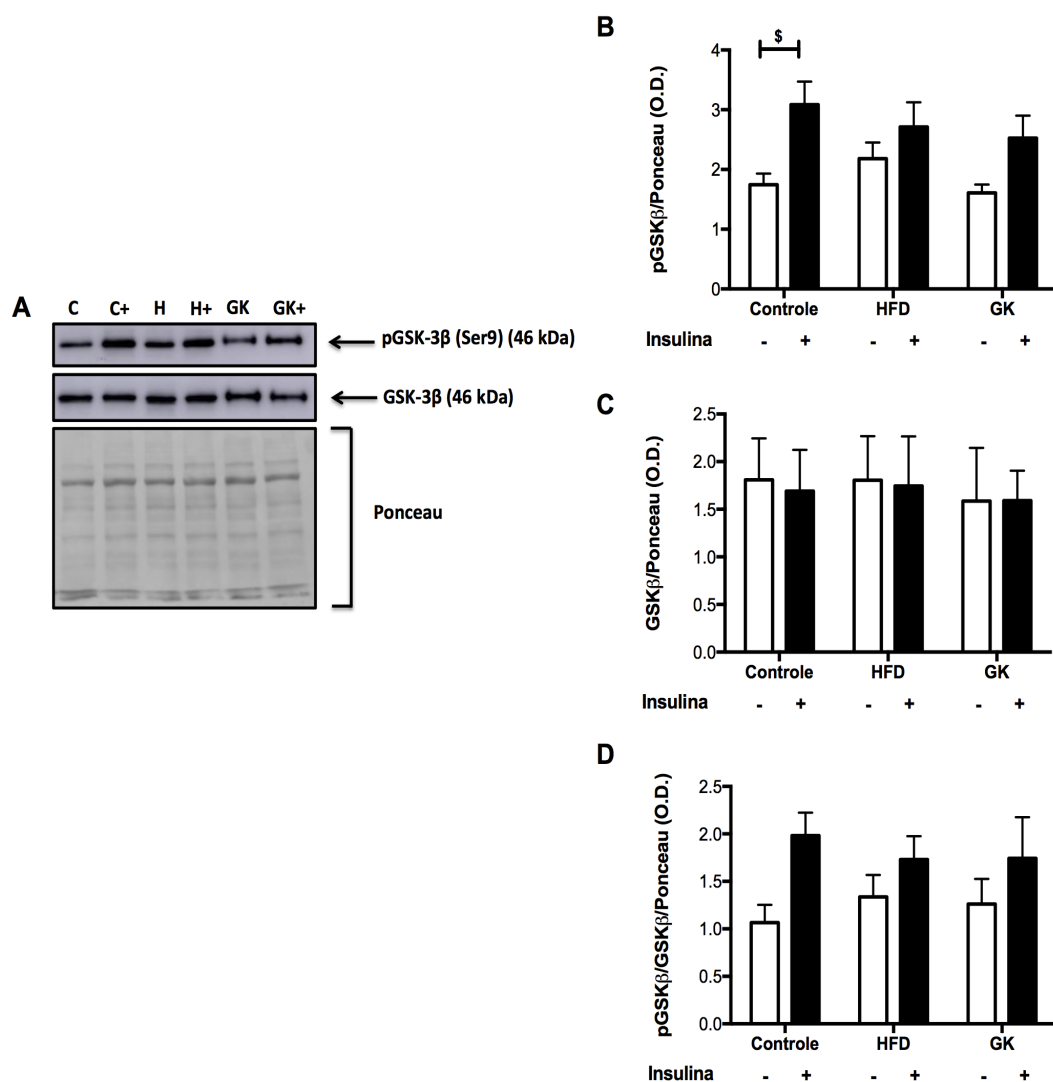
O tecido adiposo retroperitoneal dos grupos GK e HFD apresentou menor conteúdo de pAKT e menor razão de pAKT/AKT, após o teste de insulina in vivo, quando comparado ao grupo controle (Figuras 18A, 18D respectivamente). Da mesma maneira, conteúdo de pGSK-3 β nos grupos GK e HFD não aumentou após o estímulo com insulina, como observado no grupo controle. (Figuras 19A-D).

Figura 18 - Quantificação de pAKT e AKT no tecido adiposo retroperitoneal por WB (A-D).



Estímulo positivo: insulina (7 nM). Gráficos presentes significam O.D. \pm e.p.m. das bandas e n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Grupos estudados: controle (n = 5); HFD (n = 3) e GK (n = 5). (*) indica $p < 0,05$ vs controle; (**) indica $p < 0,01$ vs controle; (\$\$\$) $p < 0,001$ conforme indicado nos gráficos.

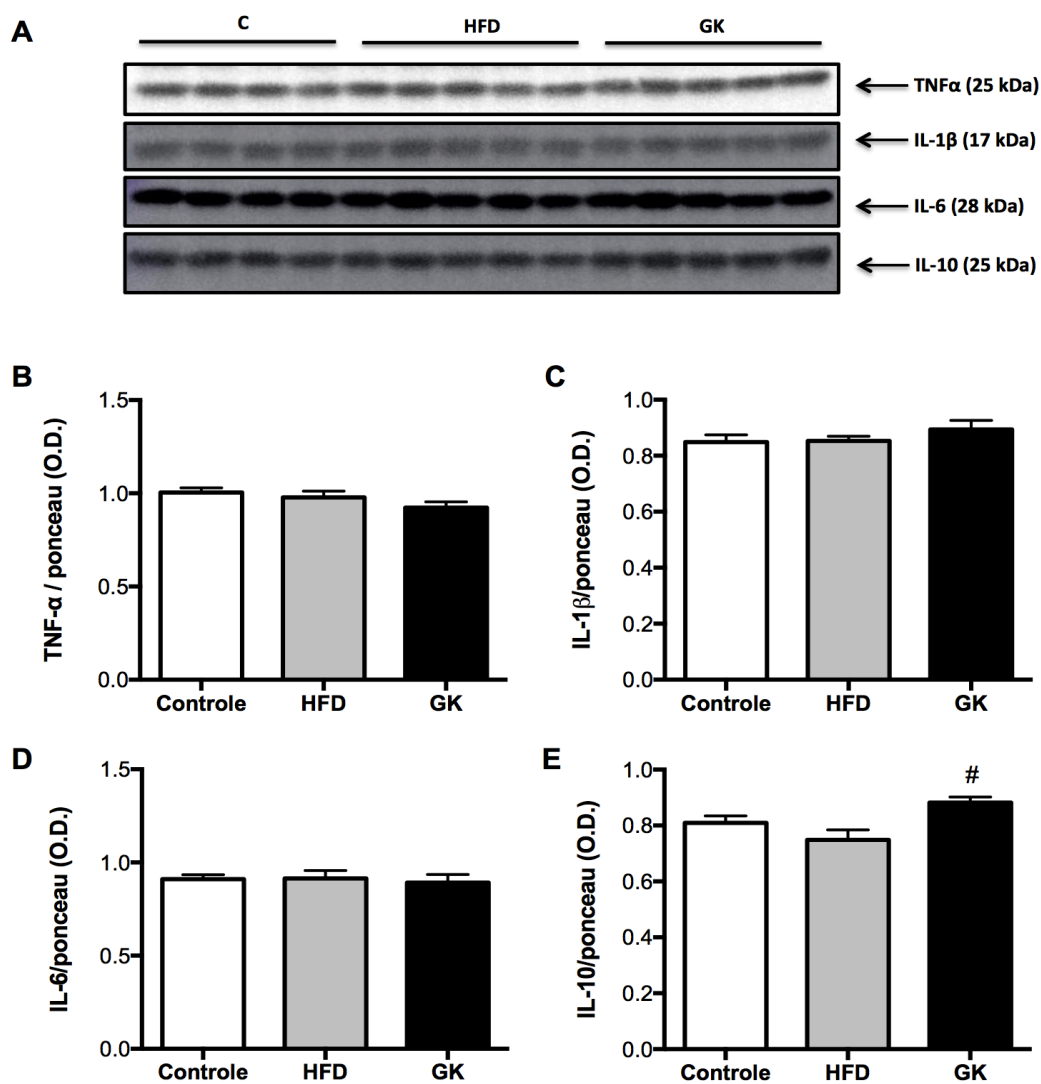
Figura 19 - Quantificação de pGSK-3 β e GSK-3 β no tecido adiposo retroperitoneal por WB (A-D).



Estímulo positivo: insulina (7 nM). Gráficos presentes significam O.D. \pm e.p.m. das bandas e n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Grupos estudados: controle (n = 5); HFD (n = 3) e GK (n = 5). (\$) p < 0,05 como indicado nos gráficos.

Para verificar se essas alterações na resposta à insulina foram devidas a um processo inflamatório, as citocinas foram mensuradas nos mesmos tecidos periféricos. Não foram observadas diferenças nos conteúdos de TNF- α , IL1- β , IL-6 e IL-10 no músculo sóleo dentre os grupos estudados (Figura 20).

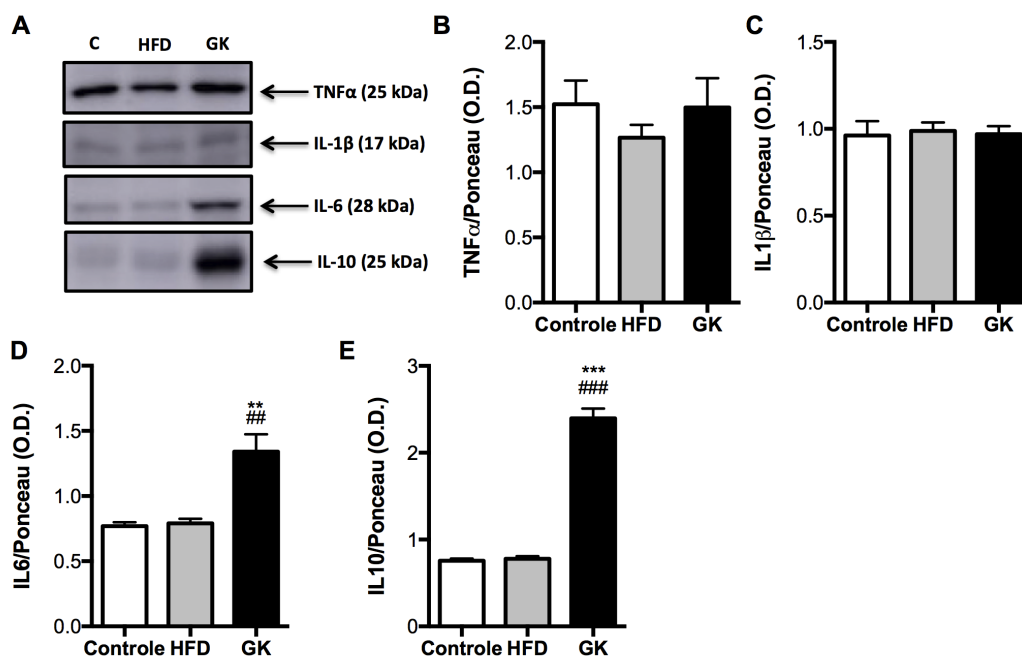
Figura 20 - Quantificação de citocinas inflamatórias no músculo sóleo por WB (A); TNF- α (B); IL-1 β (C); IL-6 (D) e IL-10 (E).



Gráficos presentes significam O.D. \pm e.p.m. das bandas e n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Grupos estudados: controle (n = 4); HFD (n = 4) e GK (n = 4). (#) p < 0,05 vs HFD.

No fígado, observou-se um aumento no conteúdo de IL-6 e IL-10 no grupo GK (Figuras 21D; 21E) e não houve diferenças entre os grupos HFD e controle (Figuras 21A-E).

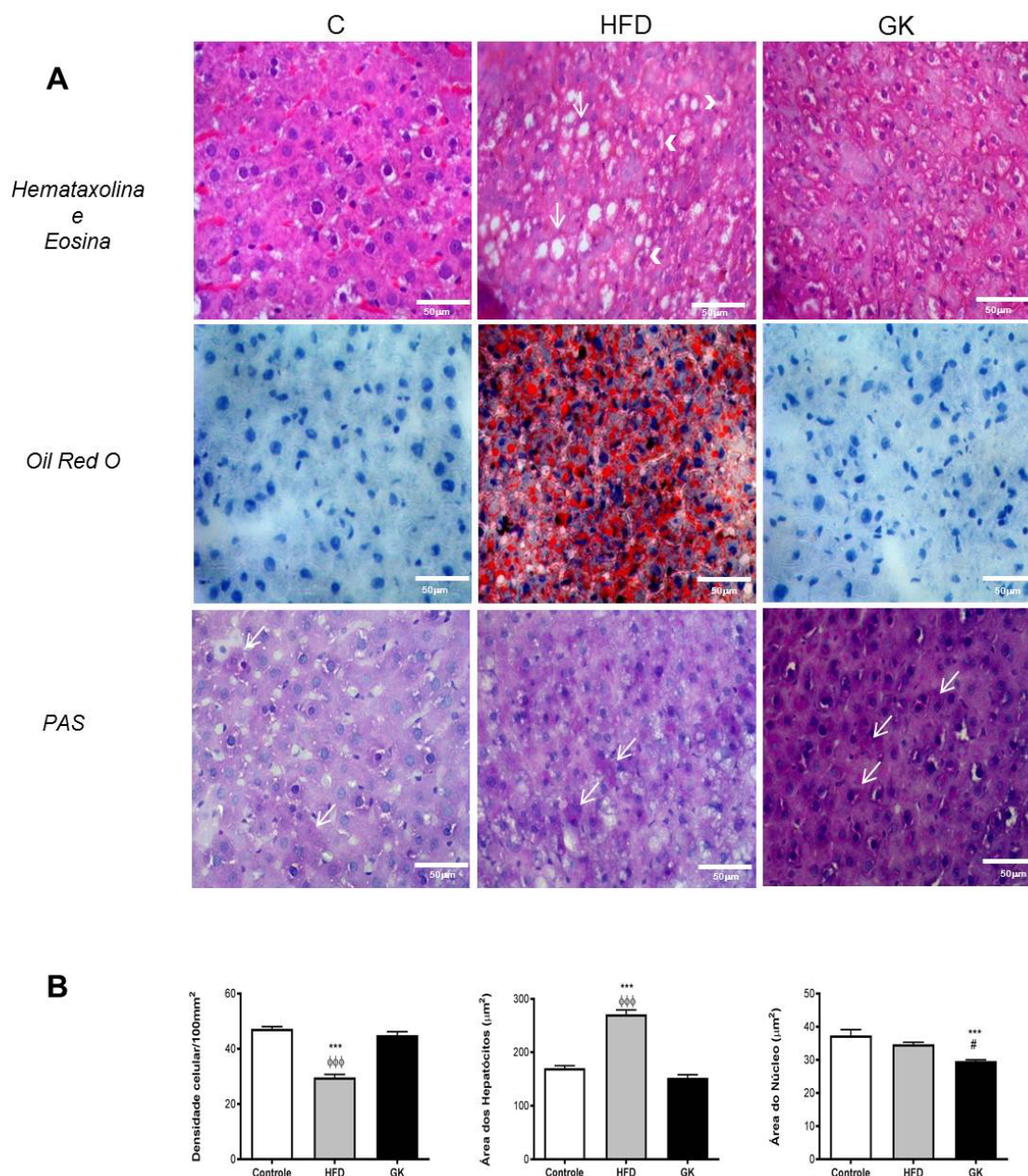
Figura 21 - Quantificação de citocinas inflamatórias no fígado por WB (A); TNF- α (B); IL1- β (C); IL-6 (D) e IL-10 (E).



Gráficos presentes significam O.D. \pm e.p.m. das bandas e n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Grupos estudados: controle (n = 4); HFD (n = 4) e GK (n = 4). (**) indica $p < 0,01$ vs controle; (***) indica $p < 0,001$ vs controle; (##) $p < 0,01$ vs HFD; (###) $p < 0,001$ vs HFD.

Morfológicamente, o fígado de ratos alimentados com dieta HFD apresentou menor densidade de células e área de hepatócitos mais elevados, enquanto o fígado de ratos GK apresentou menor área nuclear (Figura 22B). Quando corados com *oil red*, os hepatócitos do grupo HFD apresentaram grande acúmulo de gordura, ao contrário dos hepatócitos de ratos GK e grupo controle, em que não houve depósito de gordura (Figura 22A).

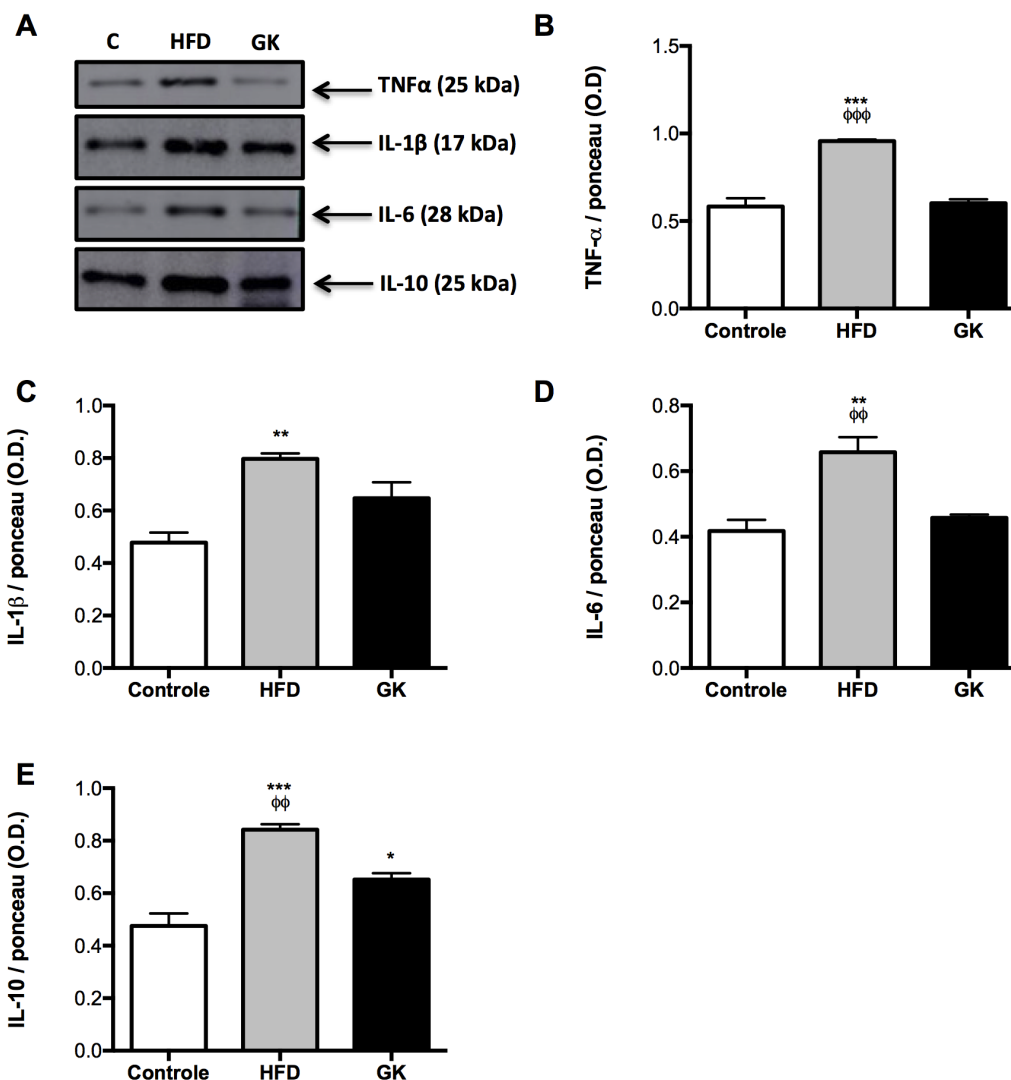
Figura 22 - Análise histológica do fígado (A).



As colorações HE e Oil Red (A) revelaram micro e macro esteatose hepática (setas) em ratos alimentados com HFD. O PAS (A) revelou alta concentração de glicogênio no fígado de ratos GK. As avaliações morfo-quantitativas (B) consideraram a densidade celular, hepatócitos e áreas nucleares. Os resultados são apresentados como média \pm e.p.m. e n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Grupos estudados: controle (n = 6); HFD (n = 6) e GK (n = 6). (***) p < 0,001 versus controle; (#) P < 0,05 vs HFD; ($\Phi\Phi\Phi$) indica p < 0,001 vs GK. Barra de calibração: 50µm.

Os animais do grupo HFD apresentaram tecido adiposo retroperitoneal inflamado, devido ao aumento no conteúdo de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 quando comparado aos outros grupos (Figuras 23A-E). No grupo GK, apenas IL-10 encontrou-se aumentada, quando comparado ao grupo controle (Figura 23E).

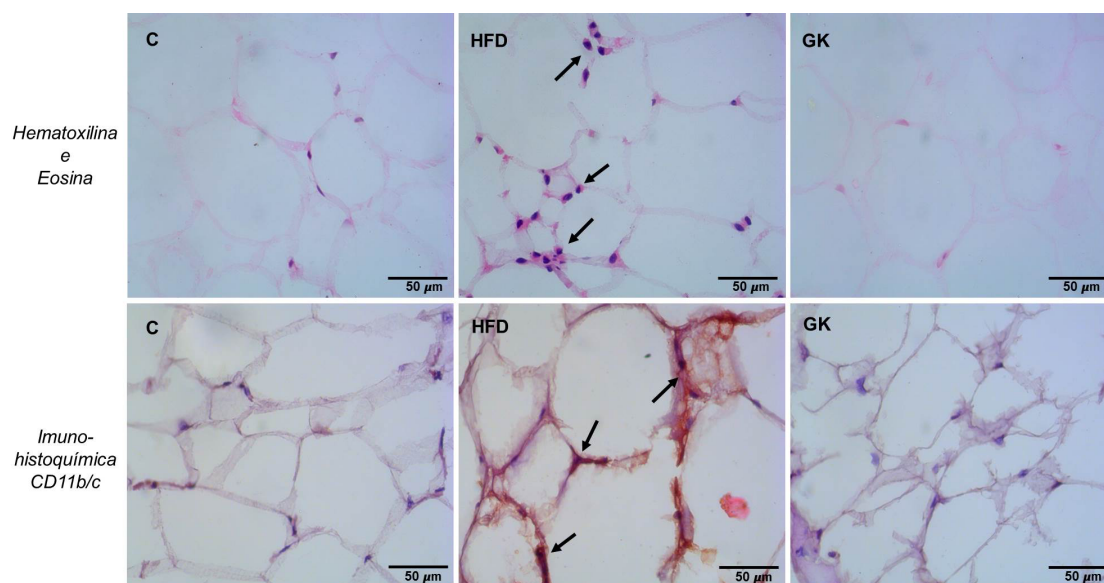
Figura 23 - Conteúdo de TNF- α (B); IL1- β (C); IL-6 (D) e IL-10 (E) no tecido adiposo retroperitoneal.



Gráficos representam O.D. \pm e.p.m. das bandas e n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Grupos estudados: Controle (n = 4); HFD (n = 4) e GK (n = 4). (*) p < 0,05 vs controle; (**) p < 0,01 vs controle; (***) p < 0,001 versus controle; ($\Phi\phi$) indica p < 0,01 vs GK; ($\Phi\phi\phi$) indica p < 0,001 vs GK.

Maior infiltrado inflamatório foi observado no tecido adiposo de animais alimentados com dieta HFD e nenhuma diferença na quantidade de infiltrado leucocitário foi observada no tecido adiposo de ratos GK (Figura 24).

Figura 24 - Análise histológica do tecido adiposo retroperitoneal.

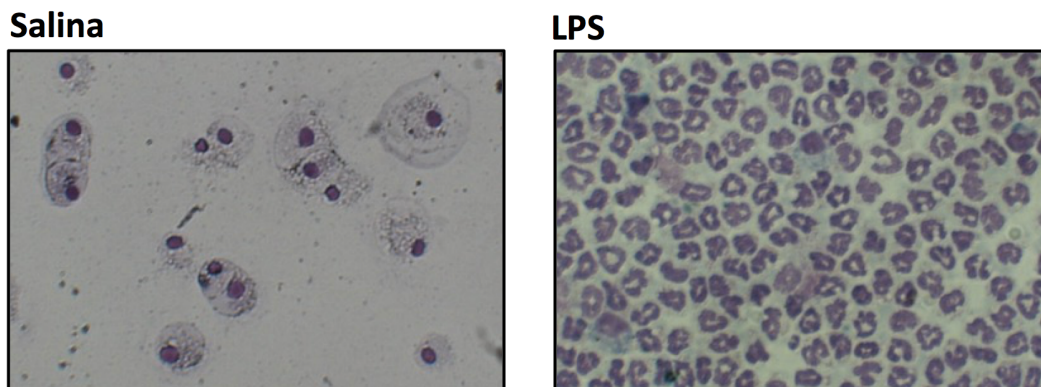


Tanto a coloração HE como a imuno-histoquímica para CD11b/c revelaram infiltrado de células mononucleares (flechas) em torno dos adipócitos no grupo HFD. Os resultados são apresentados como imagens representativas e n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Grupos estudados: controle (n = 6); HFD (n = 6) e GK (n = 6). Barra de calibração: 50µm.

5.2. Perfil inflamatório e função dos neutrófilos nos modelos experimentais

Após a análise de parâmetros relacionados às alterações metabólicas devido ao tratamento de 8 semanas de dieta HFD, demos continuidade a análise da resposta inflamatória, primordialmente relacionada ao papel dos neutrófilos, frente a condição *diabetes mellitus* tipo 2 e perante ao quadro de obesidade e resistência à insulina instalado pela dieta. O desafio inflamatório consistiu na instilação de lipopolissacarídeo (LPS), e seis horas após, o pulmão foi lavado e as células que migraram, retiradas para posteriores análises. Na figura 25 verifica-se o perfil de células presentes no LBA de um animal controle (salina), identificando a presença de macrófagos pulmonares residentes e, a presença de neutrófilos no animal instilado com LPS.

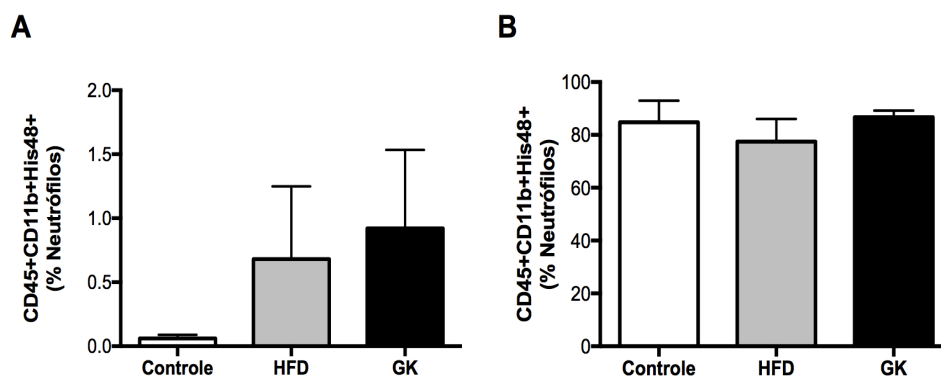
Figura 25 - Fotos representativas das células do lavado broncoalveolar.



O LBA foi realizado 6 horas após a instilação intratraqueal de salina ou LPS.

A análise de imunofenotipagem das células provenientes do LBA, por citometria de fluxo, confirmou que cerca de 98% das células que migraram para o pulmão após estímulo com LPS eram neutrófilos (Figura 26B). Não houve diferença no perfil de células do LBA dentre os grupos estudados (Figura 26).

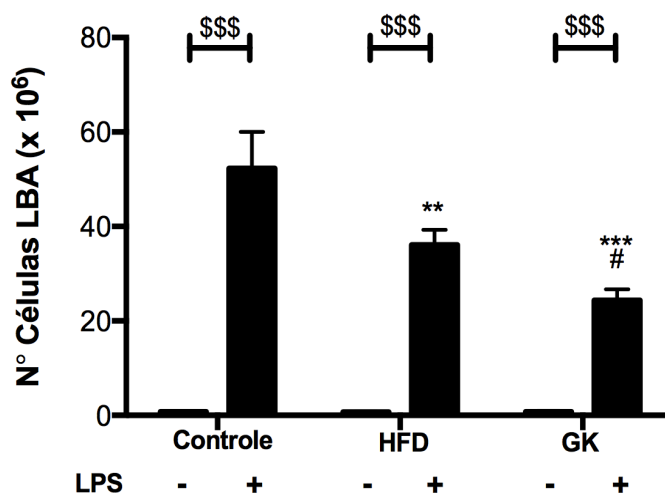
Figura 26 - Imunofenotipagem do LBA após instilação com salina (A) ou LPS (B).



O lavado broncoalveolar foi realizado 6 horas após a instilação intratraqueal de salina ou LPS. Para a imunofenotipagem, as células foram incubadas com os marcadores: CD45-PECy7 (marcador geral de leucócitos), CD11b-APC (marcador de granulócitos) e His48-FITC (marcador específico de neutrófilos). Grupos estudados: Controle (n=6); HFD (n=5) e GK (n=9). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo.

No LBA observou-se menor migração de células para o pulmão, após instilação com LPS, nos animais dos grupos HFD e GK (Figura 27).

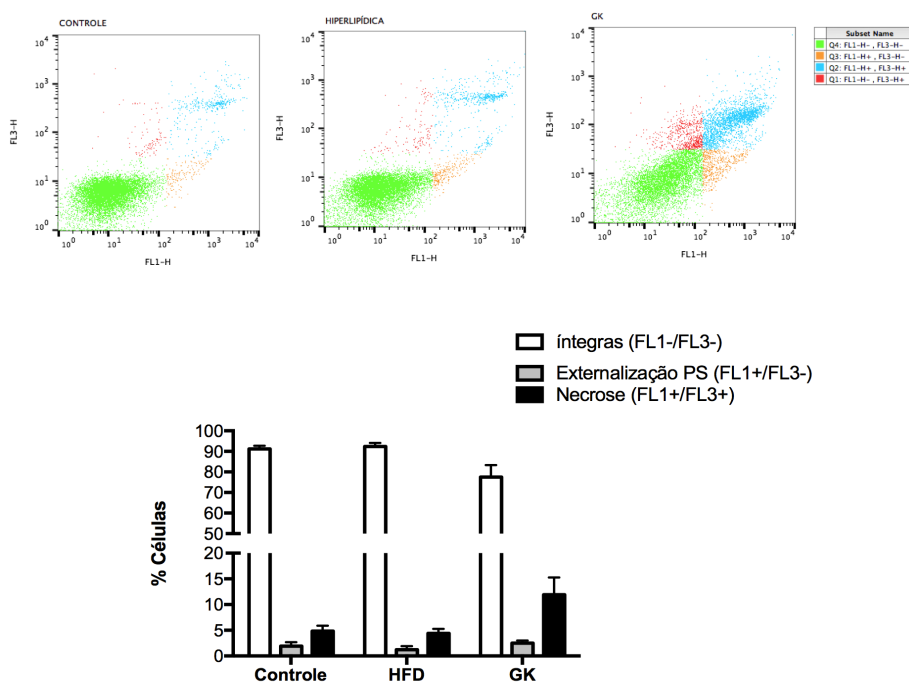
Figura 27 - Número de células que migraram para o pulmão após LBA. O lavado broncoalveolar foi realizado 6 horas após a instilação intratraqueal de salina ou LPS.



Grupos estudados: Controle (n=24); HFD (n=22) e GK (n=34). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo. (**) indica $p < 0,01$ vs controle; (***) indica $p < 0,001$ vs controle; (\$\$\$) indica $p < 0,001$ vs o grupo salina referente ao mesmo grupo.

Parâmetros relacionados à morte celular também foram avaliados e, verificou-se neutrófilos dos animais GK apresentaram aumento na porcentagem de células com fosfatidilserina externalizada, indicativo de início do processo apoptótico, e em apoptose tardia ou necrose, evidenciando um desbalanço funcional dessas células. Não houve alteração destes parâmetros em células provenientes de animais dos grupos GK e controle (Figura 28).

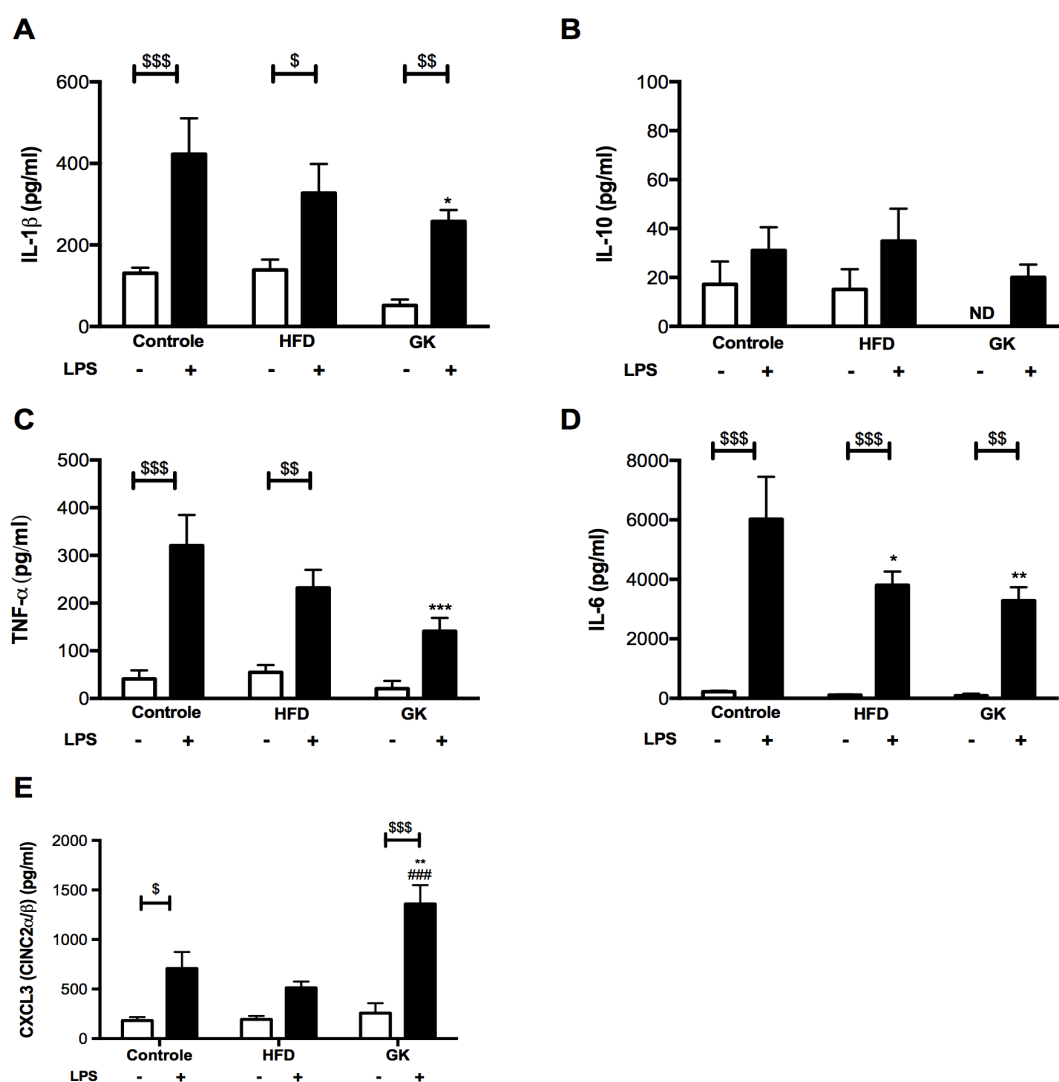
Figura 28 - Representação em gráfico *dot plot* (A) da externalização de fosfatidilserina de neutrófilos oriundos do LBA de ratos analisados em citômetro de fluxo.



Na abscissa está representada a fluorescência emitida pela anexina V-FITC e na ordenada a fluorescência emitida pelo 7-AAD. A região G4 corresponde à células com membrana plasmática íntegra, na região G3 observa-se as células com fosfatidilserina externalizada e na região G2, células em apoptose tardia ou necrose. Porcentagem de neutrófilos (B) avaliados por citometria de fluxo, conforme descrito acima. Grupos estudados: Controle (n=6); HFD (n=5) e GK (n=9). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo.

Uma das funções dos neutrófilos no sítio inflamatório é a produção de citocinas e quimiocinas. Ao investigarmos algumas delas, verificamos que neutrófilos oriundos de animais GK produziram/liberaram menor quantidade de IL-1 β , TNF- α e IL-6 no LBA após estímulo com LPS, quando comparado às células do grupo controle; não produziram/liberaram IL-10 em condições basais e produziram/liberaram maior quantidade de CXCL3 (CINC-2 α/β) que células dos outros grupos, após instilação com LPS. Os neutrófilos provenientes dos animais do grupo HFD produziram/liberaram menor quantidade de IL-6 após estímulo com LPS, quando comparado com células do grupo controle (Figura 29).

Figura 29 - Dosagem de produção/liberação de citocinas por ELISA. O LBA foi realizado 6 horas após a instilação intratraqueal de LPS.

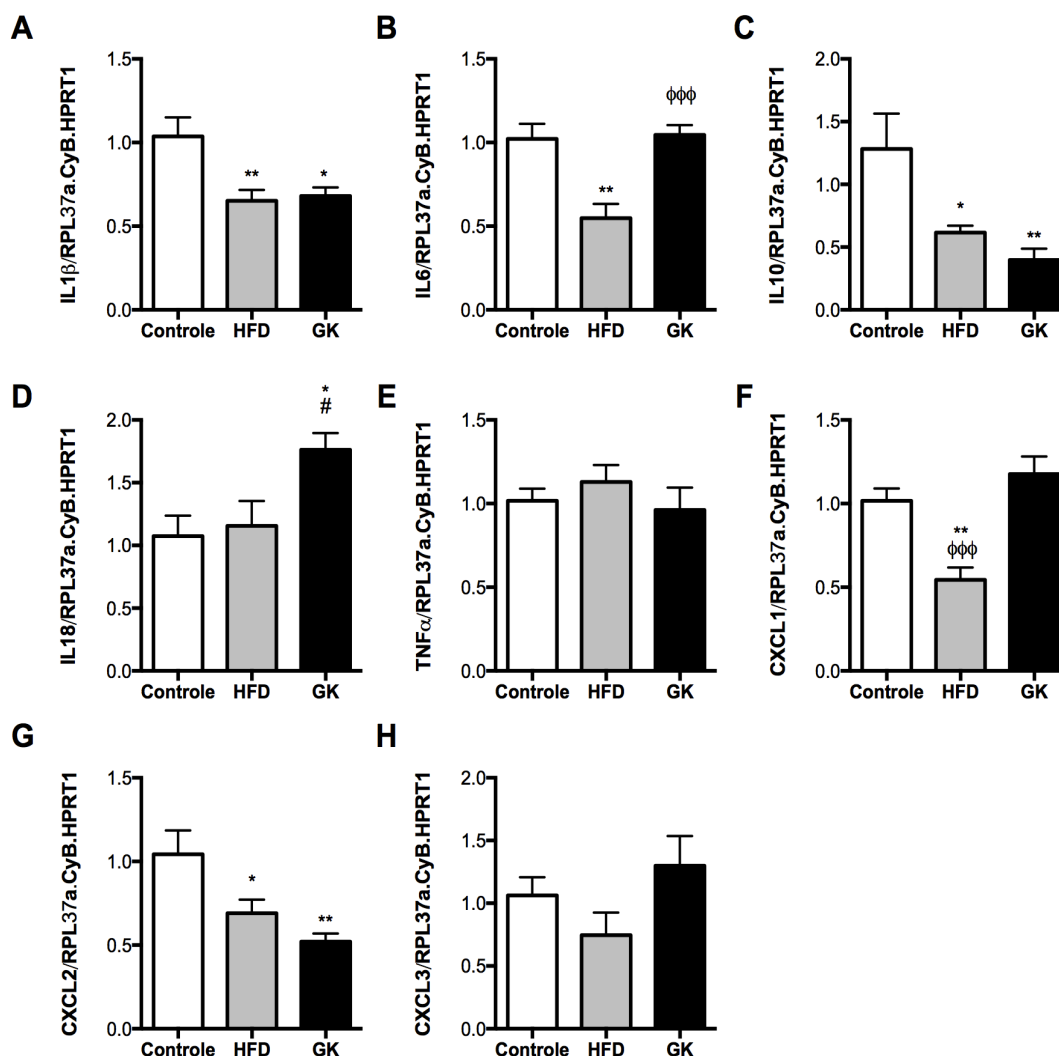


Grupos estudados: Controle (n=24); HFD (n=22) e GK (n=34). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo. (*) indica $p < 0,05$ vs controle; (**) indica $p < 0,01$ vs controle; (***) indica $p < 0,001$ vs controle; (###) indica $p < 0,001$ vs HFD; (\$) indica $p < 0,05$ vs o grupo salina referente ao mesmo grupo; (##) indica $p < 0,01$ vs o grupo salina referente ao mesmo grupo; (###) indica $p < 0,001$ vs o grupo salina referente ao mesmo grupo.

Considerando diminuição na migração de neutrófilos para o pulmão dos animais dos grupos GK e HFD, após instilação intratraqueal de LPS, e a diminuição na produção/liberação de citocinas e quimiocinas por estas células (Figuras 27 e 29), viu-se necessário avaliar a expressão gênica dessas citocinas nos neutrófilos do LBA. A análise da expressão gênica evidenciou que neutrófilos de animais GK apresentaram menor expressão dos genes IL-1 β , IL-10, CXCL2 e, maior para IL-18. No entanto, neutrófilos provenientes dos animais do

grupo HFD expressaram menos IL-1 β , IL-6, IL-10, CXCL1 e CXCL2, quando comparado com neutrófilos do grupo controle (Figura 30).

Figura 30 - Perfil da expressão gênica de citocinas.

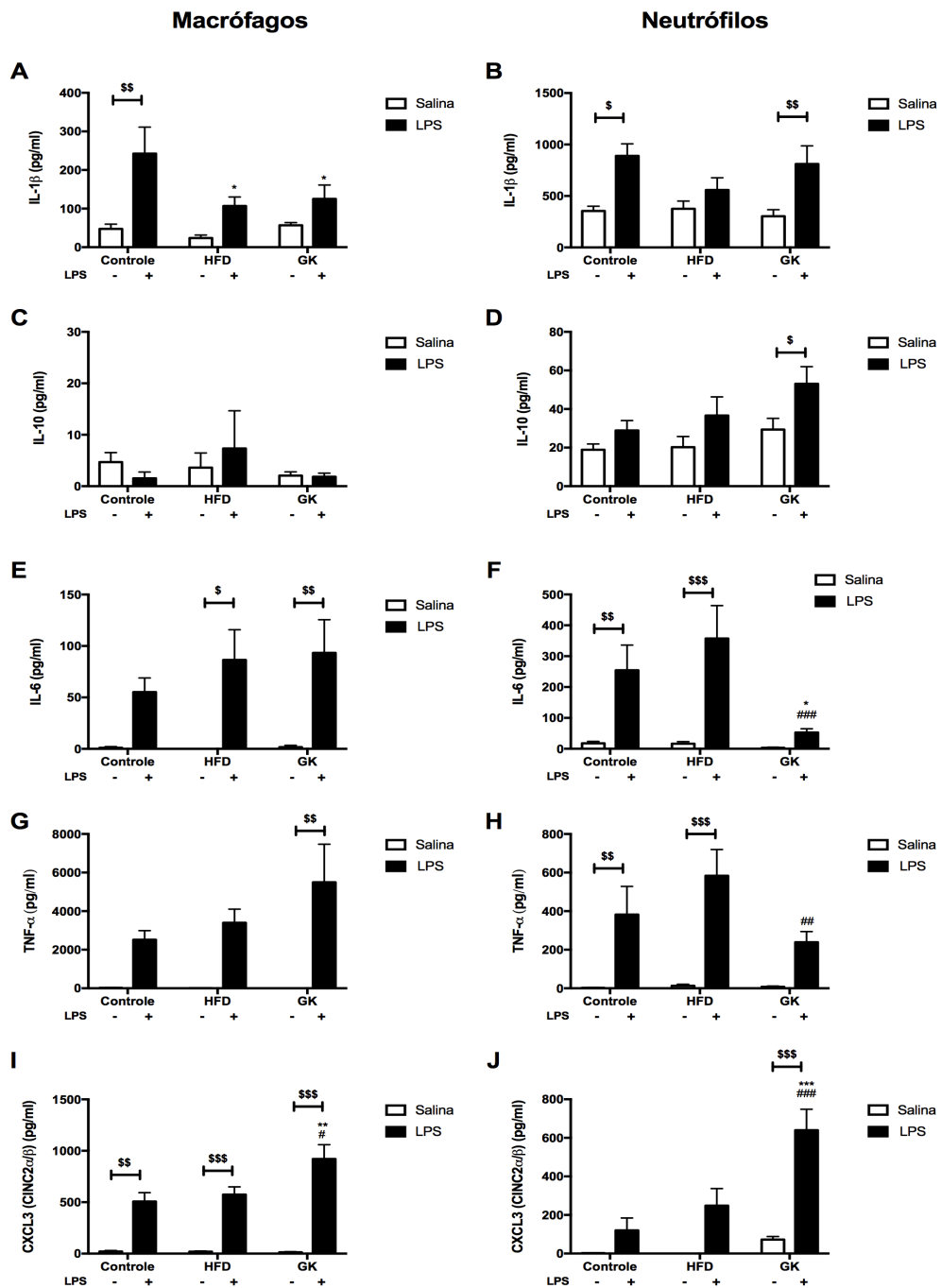


Os neutrófilos foram obtidos do LBA 6 horas após a instilação intratraqueal de LPS. A expressão gênica foi avaliada por PCR tempo real utilizando-se SyBR green como sonda fluorescente. Grupos estudados: Controle (n=12); HFD (n=12) e GK (n=12). Os valores representam a média \pm e.p.m. e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo. (*) indica $p < 0,05$ vs controle; (**) indica $p < 0,01$ vs controle; ($\phi\phi\phi$) indica $p < 0,001$ vs GK; (#) indica $p < 0,05$ vs HFD.

No pulmão há uma população residente de macrófagos alveolares e após a instilação com LPS há uma grande migração de neutrófilos para o local. Para diferenciar a produção de citocinas dos macrófagos residentes, da produção por neutrófilos infiltrados, foi realizado um ensaio *in vitro* afim de identificar a origem da deficiência na produção/liberação de citocinas verificada. Para tanto, cultura celular de macrófagos alveolares (1×10^6 /mL) e neutrófilos oriundos do sangue (2×10^6 /mL) com e sem estímulo com LPS (6 horas) foi realizada..

Observou-se que macrófagos alveolares de animais GK, após estímulo com LPS, produziram menor quantidade de IL-1 β (Figura 31A) e maior quantidade de CINC-2 α/β (Figura 31I) em relação ao controle. Além disso, essas células apresentaram maior magnitude de produção de TNF- α (Figura 31G) quando comparado com outros grupos. Macrófagos do grupo HFD produziram citocinas de maneira similar aos macrófagos de animais controle, exceto na produção de IL-1 β que foi menor (Figura 31A). Neutrófilos de animais GK, após estímulo com LPS, produziram maior quantidade de IL-10 (Figura 31D) e CINC-2 α/β (Figura 31J), no entanto, menor quantidade de IL-6 (Figura 31F) e TNF- α (Figura 30H) quando comparados com os outros grupos. Além disso, produziram em maior magnitude IL-10 após estímulo com LPS (Figura 31D). Neutrófilos de animais HFD responderam de maneira similar aos neutrófilos de animais controle após estímulo (Figura 31B; D; F; H; J).

Figura 31 - Produção de citocinas por Macrófagos (A; C; E; G; I) e Neutrófilos (B; D; F; H; J) após estímulo com LPS por 6 horas in vitro.

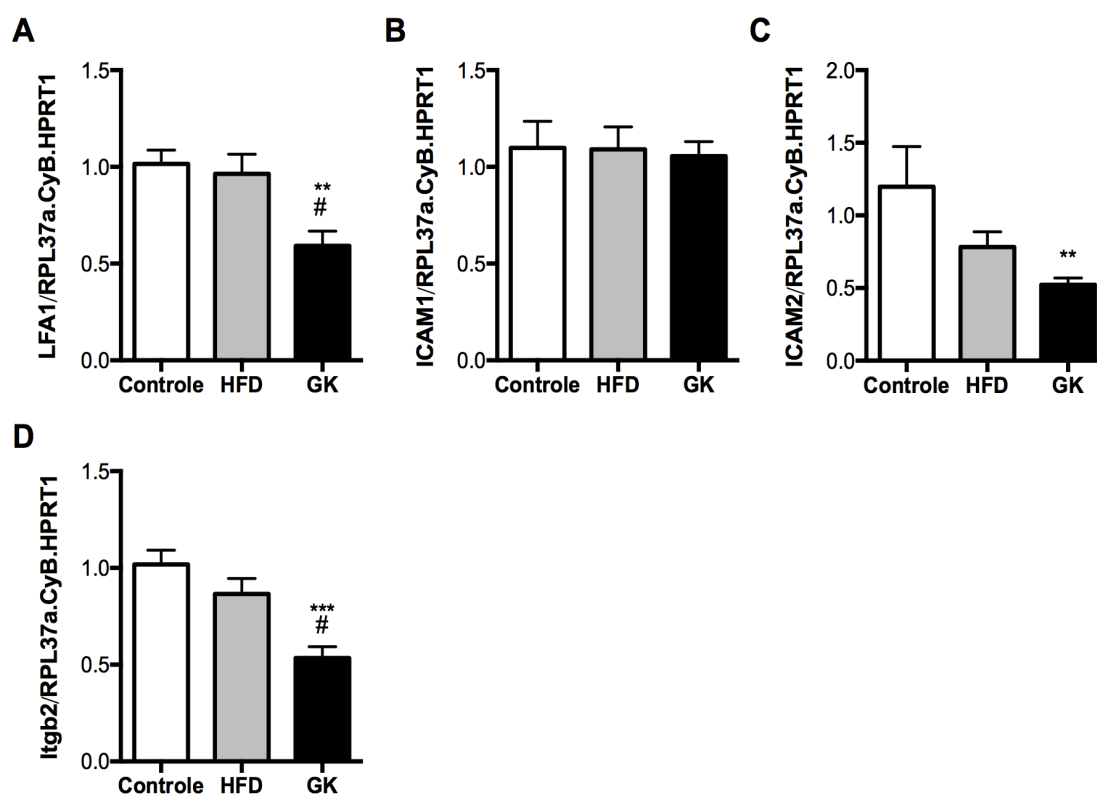


Os neutrófilos foram obtidos do sangue e macrófagos do LBA. Grupos estudados: Controle (n=6); HFD (n=6) e GK (n=8). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo. (*) indica $p < 0,05$ vs controle; (**) indica $p < 0,01$ vs controle; (***) indica $p < 0,001$ vs controle; (#) indica $p < 0,05$ vs HFD; (##) indica $p < 0,01$ vs HFD; (###) indica $p < 0,001$ vs HFD; (\$) indica $p < 0,05$ vs o grupo salina referente ao mesmo grupo; (\$\$) indica $p < 0,01$ vs o grupo salina referente ao mesmo grupo; (\$\$\$) indica $p < 0,001$ vs o grupo salina referente ao mesmo grupo.

O processo de migração, não depende apenas de citocinas e quimiocinas, mas também das proteínas de adesão localizadas na superfície dos neutrófilos e do endotélio. Dessa maneira, a expressão gênica dessas proteínas foi investigada por PCR tempo real. Verificou-

se que neutrófilos de animais GK apresentaram menor expressão de LFA-1 (Figura 32A), ICAM-2 (Figura 32C) e Integrina beta-2 (Itgb-2) (Figura 32D). No entanto, neutrófilos provenientes dos animais do grupo HFD não apresentaram alteração na expressão dos genes avaliados, mesmo apresentando menor número de células no LBA após a instilação com LPS (Figura 32).

Figura 32 - Perfil da expressão gênica das moléculas de adesão.

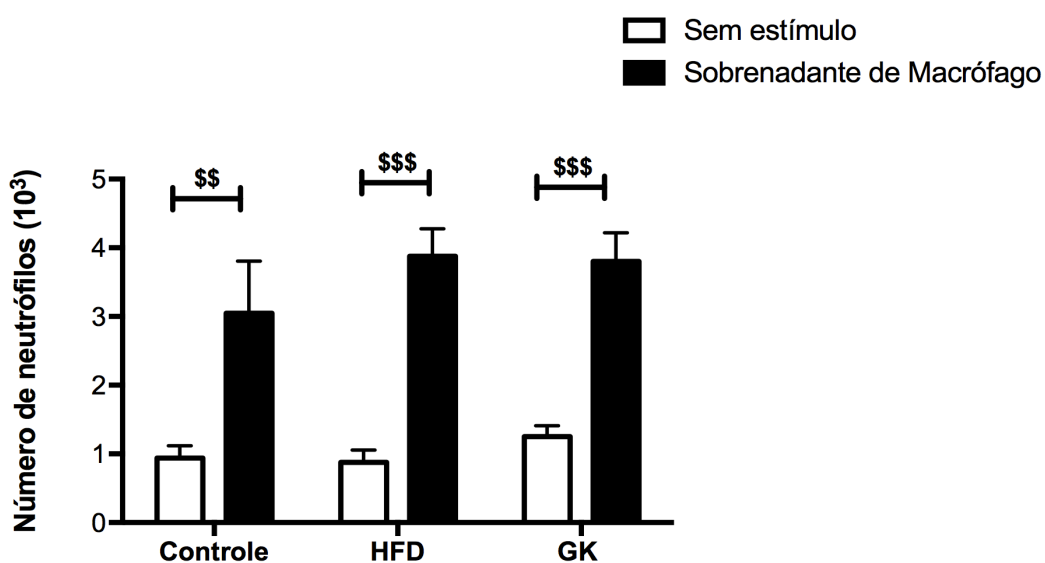


Os neutrófilos foram obtidos do LBA 6 horas após a instilação intratraqueal de LPS. A expressão gênica foi avaliada por PCR tempo real utilizando-se SyBR green como sonda fluorescente. Grupos estudados: Controle (n=12); HFD (n=12) e GK (n=12). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo. (**) indica $p < 0,01$ vs controle; (***) indica $p < 0,001$ vs controle; (#) indica $p < 0,05$ vs HFD; (##) indica $p < 0,01$ vs HFD.

A fim de verificar se o menor número de células do infiltrado de animais GK e HFD era decorrente das alterações na produção de citocinas/quimiocinas, da deficiente expressão gênica de proteínas de adesão ou se poderia haver algum comprometimento no processo de migração *per se*, o ensaio de migração *in vitro* foi realizado. Para tanto, macrófagos alveolares de animais controles foram incubados com LPS por 24 horas e o sobrenadante, rico em citocinas inflamatórias e quimiocinas, foi utilizado como estímulo de migração para os

neutrófilos dos grupos estudados. Dessa maneira, houve a possibilidade de analisarmos a capacidade de migração dos neutrófilos, dos diferentes grupos experimentais, frente à idêntica concentração de citocinas produzidas pelos macrófagos alveolares. Observou-se que na presença do sobrenadante de macrófago não houve diferença na migração de neutrófilos entre os animais controle, HFD e GK (Figura 33).

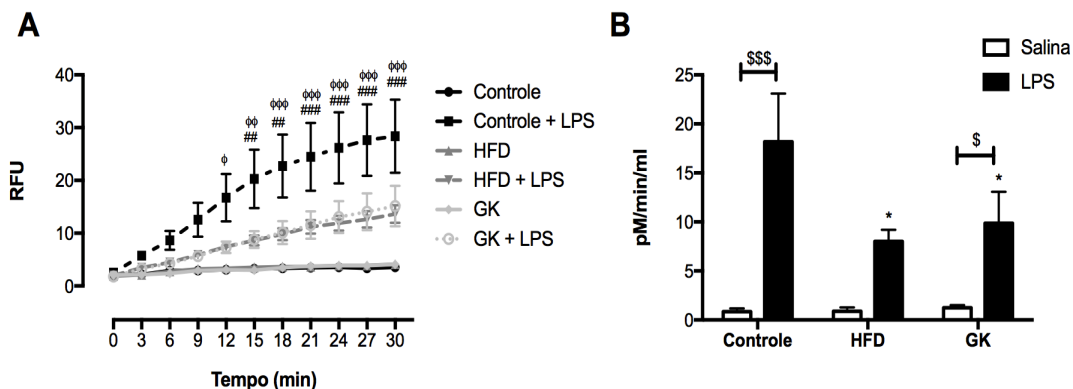
Figura 33 - Número de neutrófilos que migraram em 4 horas após estímulo com sobrenadante de macrófagos tratados com LPS por 24 horas.



Grupos estudados: Controle (n=4); HFD (n=5) e GK (n=6). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo. (\$\$) indica $p < 0,01$ vs o grupo sem estímulo referente ao mesmo grupo; (\$\$\$) indica $p < 0,001$ vs o grupo sem estímulo referente ao mesmo grupo.

Após migrarem para o sítio inflamatório, os neutrófilos fagocitam o agente invasor e o eliminam com o auxílio de várias enzimas granulares. Dentre elas, a mieloperoxidase (MPO), principal enzima que atua no potencial bactericida/inflamatório e específica de neutrófilos, foi mensurada no LBA dos animais instilados ou não com LPS. Os neutrófilos dos grupos GK e HFD apresentaram uma menor atividade e quantidade dessa enzima após estímulo com LPS (Figura 34A; B).

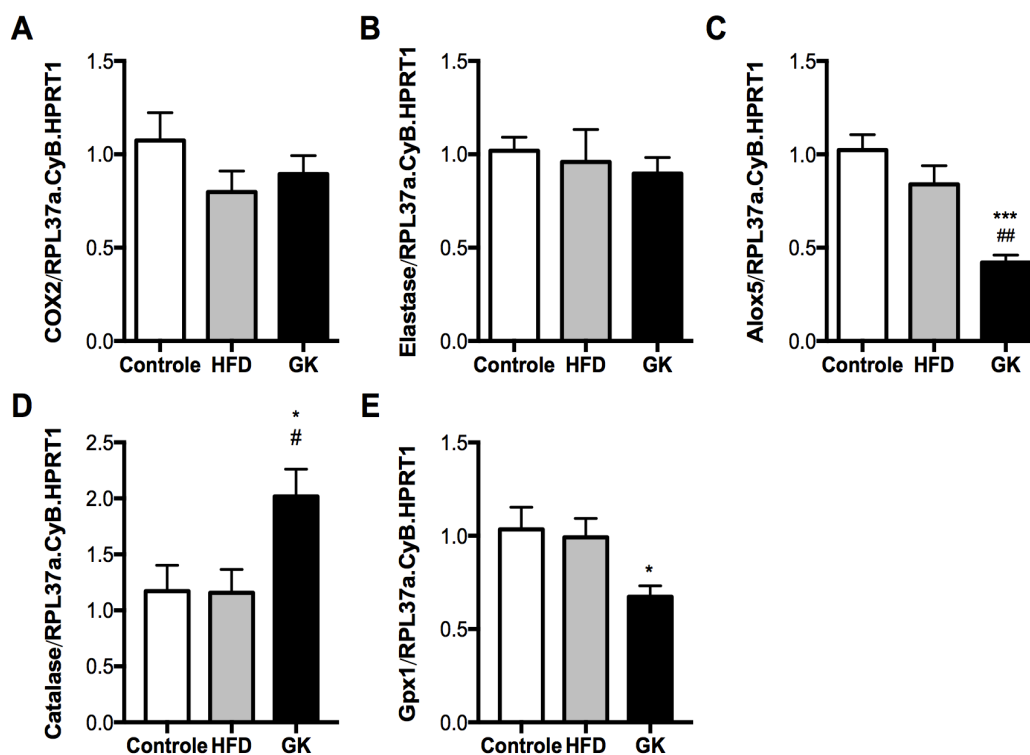
Figura 34 - Atividade de MPO no LBA de animais instilados ou não com LPS..



Grupos estudados: Controle (n=11); HFD (n=9) e GK (n=13). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo (##) indica $p < 0,01$ vs HFD; (###) indica $p < 0,001$ vs HFD; (Φ) indica $p < 0,01$ vs GK; ($\Phi\Phi\Phi$) indica $p < 0,001$ vs GK.

Nos neutrófilos do LBA avaliou-se também o perfil das enzimas antioxidantes, das enzimas que participam na síntese de PGE_2 e LTB_4 por PCR tempo real. Os neutrófilos de animais GK apresentam menor expressão dos genes *Alox5* (Figura 35C), enzima chave na produção de LTB_4 , e *GPX1* (Figura 35E), enzima antioxidante. Por outro lado, essas células apresentaram maior expressão da enzima antioxidante, a catalase (Figura 35D). Não houve diferença na expressão do gene da elastase e COX_2 (Figura 35A, 35B) em neutrófilos dos grupos estudados.

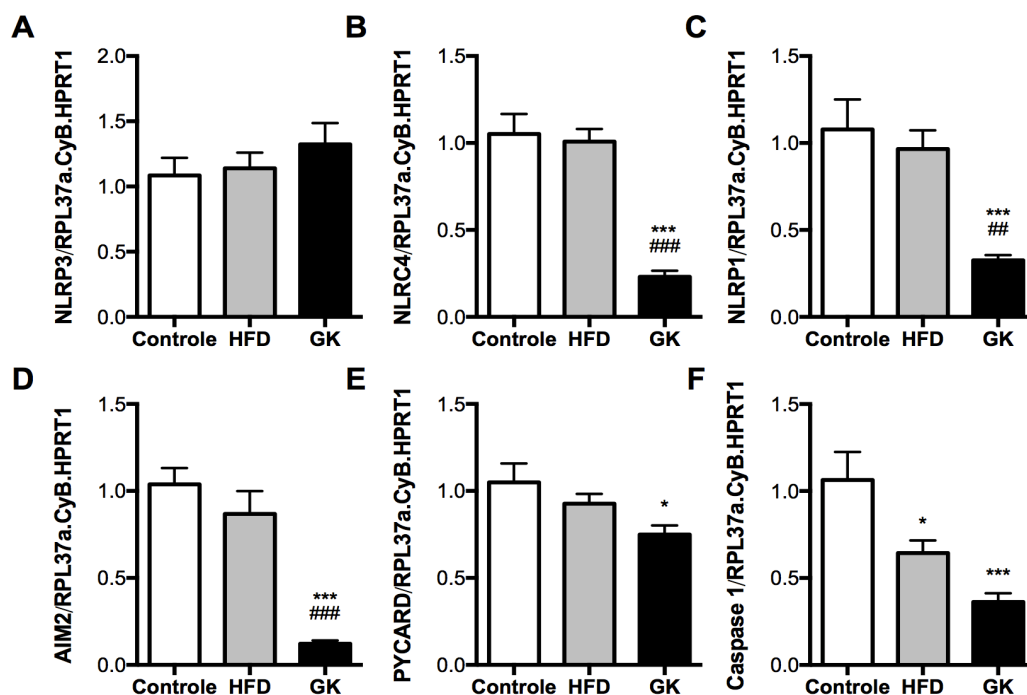
Figura 35 - Perfil da expressão gênica de enzimas antioxidantes e envolvidas na produção de mediadores lipídicos. Os neutrófilos foram obtidos do LBA 6 horas após a instilação intratraqueal de LPS.



A expressão gênica foi avaliada por PCR tempo real utilizando-se SyBR green como sonda fluorescente. Grupos estudados: Controle (n=12); HFD (n=12) e GK (n=12). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo. (*) indica $p < 0,05$ vs controle; (***) indica $p < 0,01$ vs controle; (#) indica $p < 0,05$ vs HFD; (##) indica $p < 0,01$ vs HFD.

Genes envolvidos na formação e via dos inflamossomos, estruturas chave na inflamação do sistema imune inato, também foram avaliados. Neutrófilos obtidos de animais GK apresentaram considerável redução na expressão de NLRC4 (Figura 36B), NLRP1 (Figura 36C), AIM2 (Figura 36D), PYCARD (Figura 36E) e caspase 1 (Figura 36F). Porém, células oriundas de animais do grupo HFD apresentaram somente redução na expressão de caspase 1 (Figura 36F).

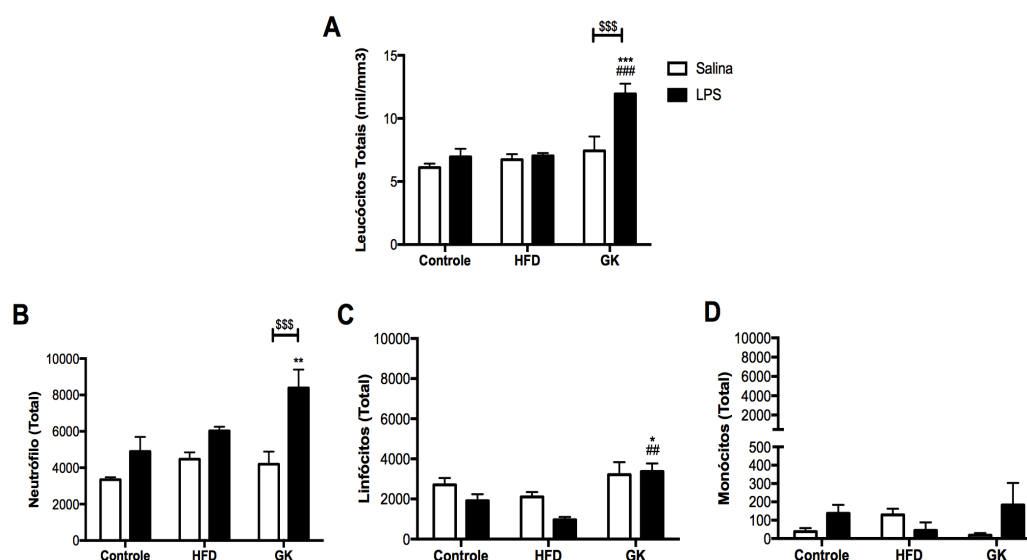
Figura 36 - Perfil da expressão genes envolvidos na formação e via dos inflamassomos.



Os neutrófilos foram obtidos do LBA 6 horas após a instilação intratraqueal de LPS. A expressão gênica foi avaliada por PCR tempo real utilizando-se SyBR green como sonda fluorescente. Grupos estudados: Controle (n=12); HFD (n=12) e GK (n=12). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo. (*) indica $p < 0,05$ vs controle; (***) indica $p < 0,01$ vs controle; (##) indica $p < 0,01$ vs HFD; (###) indica $p < 0,001$ vs HFD.

Após análise do perfil inflamatório e migratório dos neutrófilos no pulmão após instilação com LPS, questionou-se a possibilidade de alterações no número de leucócitos circulantes após esse estímulo. O menor número de neutrófilos circulantes acarretaria a menor quantidade de células disponíveis para migrar para o local da inflamação. O sangue dos animais foi coletado no momento da eutanásia para análises plasmáticas, como mencionado anteriormente, mas também para realização do leucograma. Sangue total desses animais foi enviado a PROVET – Medicina Veterinária Diagnóstica para realização dos ensaios de hemograma completo (Apêndice). Os animais GK apresentaram maior número de leucócitos totais após instilação com LPS quando comparado aos animais dos grupos controle e HFD (Figura 37A), decorrente do aumento de neutrófilos e linfócitos circulantes (Figura 37B e 37C).

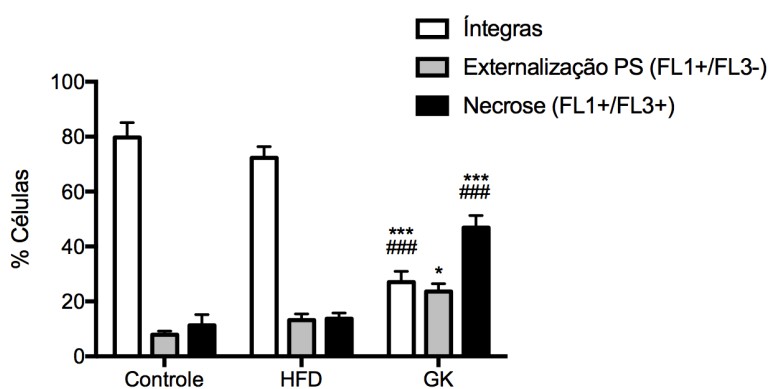
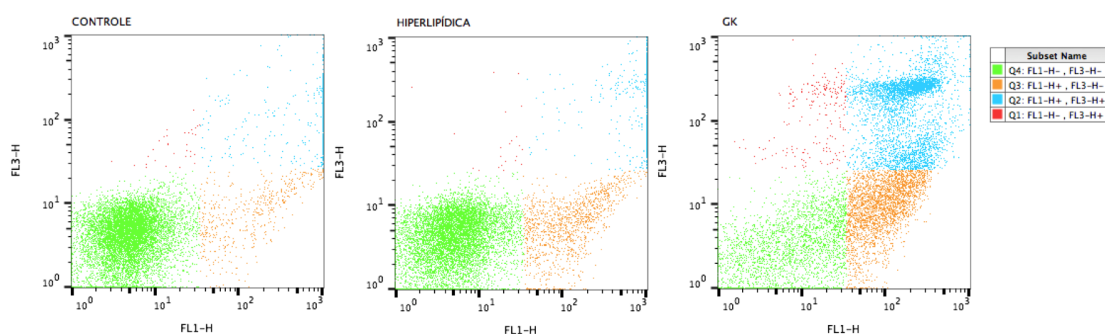
Figura 37 - Leucograma.



O sangue foi coletado através da aorta abdominal 6 horas após instilação intratraqueal com salina ou LPS. Grupos estudados: Controle (n=14); HFD (n=7) e GK (n=12). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo. (*) indica $p < 0,05$ vs controle; (**) indica $p < 0,01$ vs controle; (***) indica $p < 0,001$ vs controle; (\$\$\$) indica $p < 0,001$ vs o grupo salina referente ao mesmo grupo; (###) indica $p < 0,01$ vs HFD; (####) indica $p < 0,001$ vs HFD.

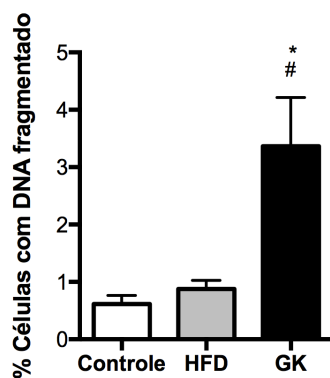
O aumento do número de neutrófilos não implica, diretamente, em maior capacidade funcional destas células. Dessa maneira, avaliou-se alguns parâmetros relacionados à morte celular para verificar se essas células estariam íntegras e aptas a iniciar um processo inflamatório. Nos animais GK foi identificado o aumento da porcentagem de neutrófilos com fosfatidilserina externalizada, indicativo de início do processo apoptótico, e um aumento de células em apoptose tardia ou necrose (Figura 38). Aumento na proporção de células com DNA fragmentado também foi observado nos neutrófilos de animais GK (Figura 39).

Figura 38 - Representação em gráfico *dot plot* (A) da externalização de fosfatidilserina de neutrófilos oriundos do sangue de ratos analisados em citômetro de fluxo.



Na abscissa está representada a fluorescência emitida pela anexina V-FITC e na ordenada a fluorescência emitida pelo 7-AAD. A região G4 corresponde à células com membrana plasmática íntegra, na região G3 observa-se as células com fosfatidilserina externalizada e na região G2, células em apoptose tardia ou necrose. Porcentagem de neutrófilos (B) avaliados por citometria de fluxo, conforme descrito acima. Grupos estudados: Controle (n=7); HFD (n=11) e GK (n=15). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo. (*) indica $p < 0,05$ vs controle; (***) indica $p < 0,001$ vs controle; (###) indica $p < 0,001$ vs HFD;

Figura 39 - Porcentagem de neutrófilos com DNA fragmentado analisados através de citometria de fluxo.

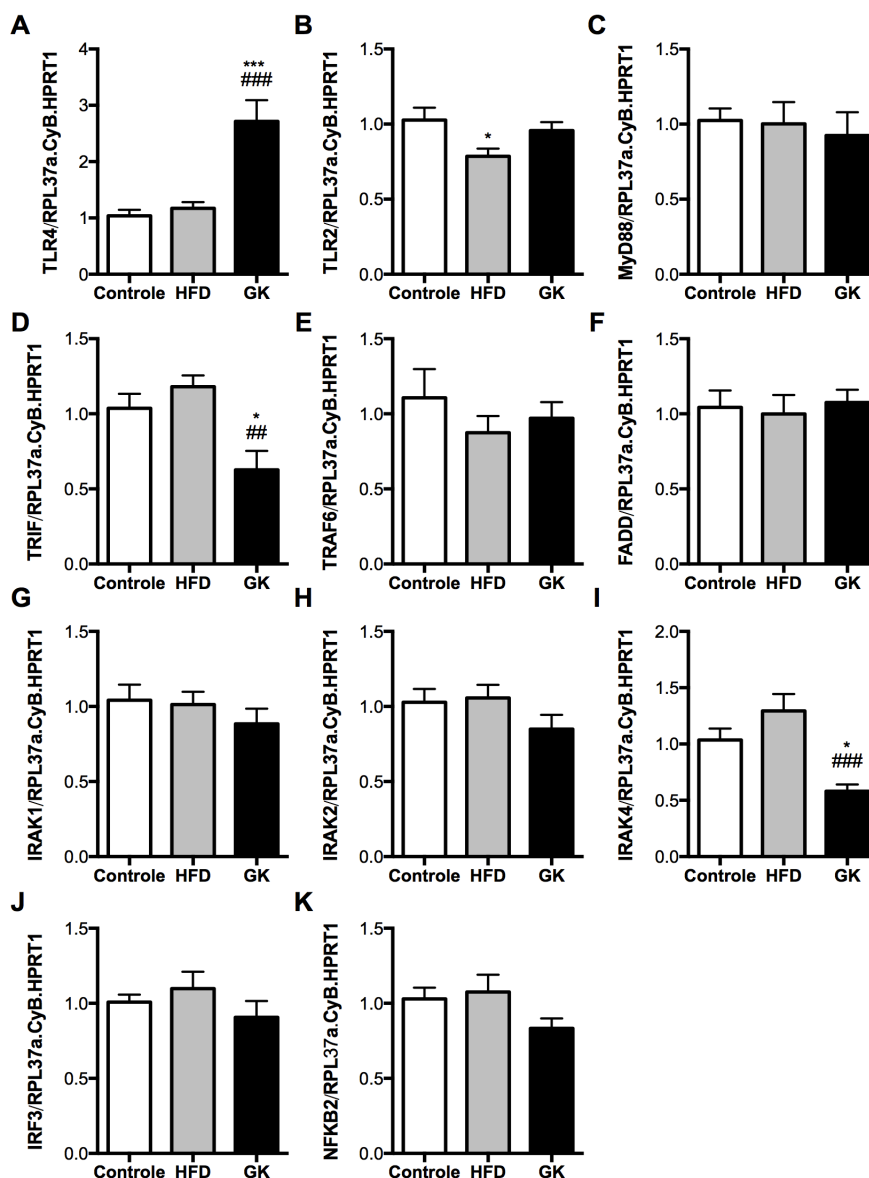


Os neutrófilos foram obtidos do sangue após separação por gradiente de histopaque 1077. Grupos estudados: Controle (n=7); HFD (n=11) e GK (n=15). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo. (*) indica $p < 0,05$ vs controle; (#) indica $p < 0,05$ vs HFD.

5.3 Avaliação das vias de TLR4 e estresse de RE e a interação entre elas em neutrófilos do LBA

Dando continuidade a avaliação funcional dos neutrófilos obtidos do LBA após instilação com LPS, avaliou-se a via de sinalização decorrente de TLR4 por expressão gênica. Neutrófilos de animais GK apresentaram maior expressão do gene do TLR4 e menor expressão dos genes TRIF (Figura 40D) e IRAK4 (Figura 40I) quando comparado aos outros grupos estudados. Neutrófilos de animais do grupo HFD apresentaram menor expressão do gene do TLR2 (Figura 40B).

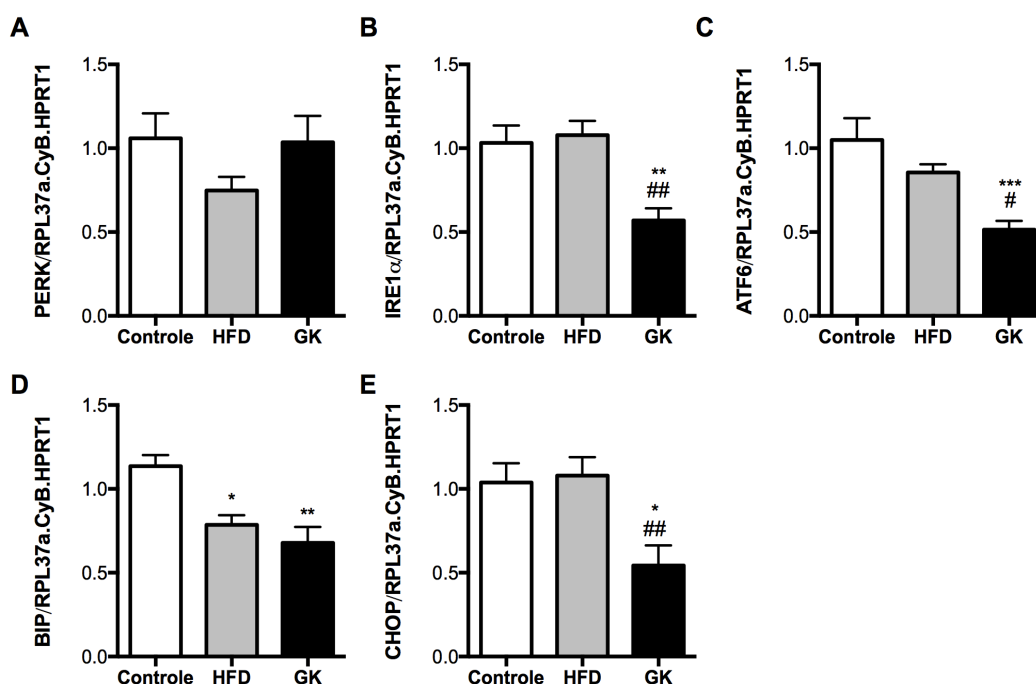
Figura 40 - Perfil da expressão gênica de proteínas envolvidas na via de sinalização do TLR4.



Os neutrófilos foram obtidos do LBA 6 horas após a instilação intratraqueal de LPS. A expressão gênica foi avaliada por PCR tempo real utilizando-se SyBR green como sonda fluorescente. Grupos estudados: Controle (n=12); HFD (n=12) e GK (n=12). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo. (*) indica $p < 0,05$ vs controle; (***) indica $p < 0,001$ vs controle; (##) indica $p < 0,01$ vs HFD; (###) indica $p < 0,001$ vs HFD.

O perfil da expressão gênica referente a via da UPR do retículo endoplasmático também foi avaliado por PCR. Neutrófilos de animais GK apresentaram menor expressão de IRE1 α (Figura 41B), ATF6 (Figura 41C), Bip (Figura 41D) e CHOP (Figura 41E) quando comparados com neutrófilos dos animais controle e HFD. Neutrófilos de animais do grupo HFD apresentaram expressão de Bip diminuída em relação ao grupo controle (Figura 41D).

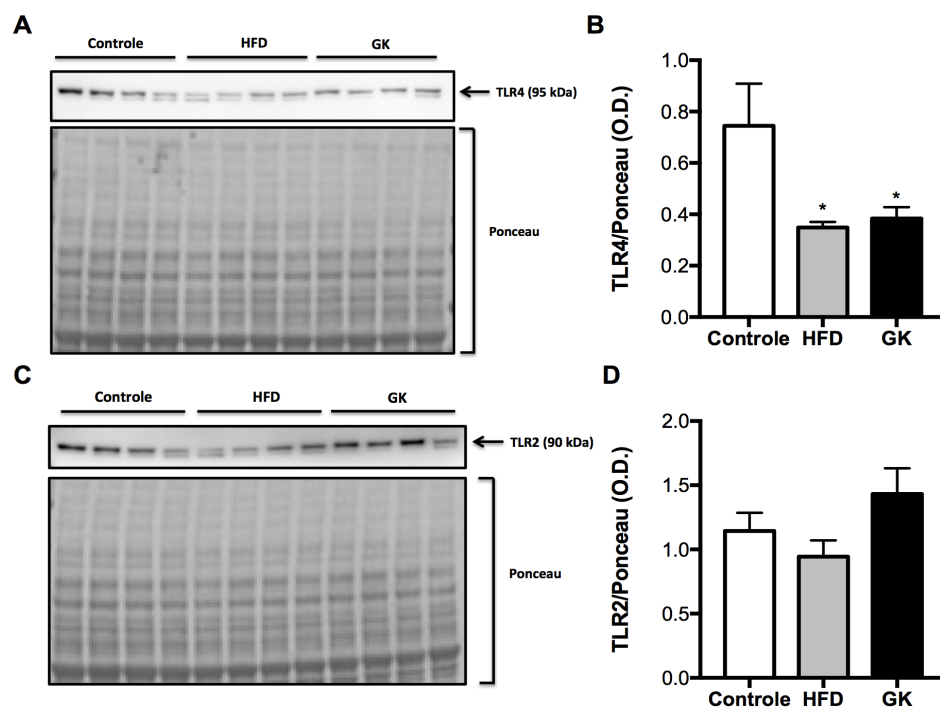
Figura 41 - Perfil da expressão gênica de proteínas envolvidas na via de sinalização da UPR. Os neutrófilos foram obtidos do LBA 6 horas após a instilação intratraqueal de LPS.



A expressão gênica foi avaliada por PCR tempo real utilizando-se SyBR green como sonda fluorescente. Grupos estudados: Controle (n=8); HFD (n=8) e GK (n=8). Os valores representam a média \pm e.p.m e o n representa o número de animais utilizados em cada grupo. (*) indica p<0,05 vs controle; (**) indica p<0,01 vs controle; (***) indica p<0,001 vs controle; (#) indica p<0,05 vs HFD; (##) indica p<0,01 vs HFD.

Após análise da expressão gênica, o conteúdo proteico referente a essas duas vias foi analisado por *western blotting*, bem como o *splicing* de XBP1 por PCR. Neutrófilos de animais GK e HFD apresentaram menor conteúdo de TLR4 (Figura 42A; B) e não houve diferença significativa em relação ao conteúdo de TLR2 entre os grupos estudados (Figura 42C; D).

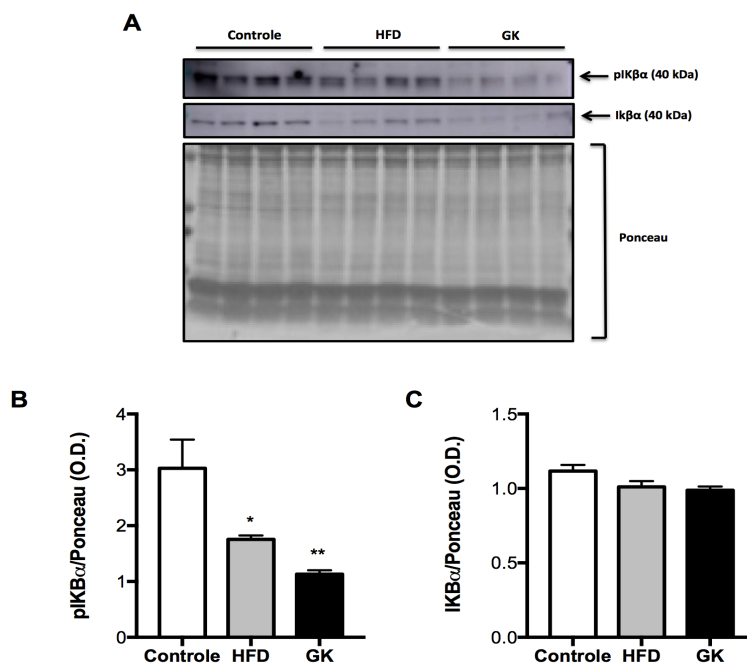
Figura 42 - Conteúdo de TLR4 (A; B) e TLR2 (C; D) em neutrófilos do LBA.



Os neutrófilos foram obtidos do LBA 6 horas após a instilação intratraqueal de LPS. Gráficos representam O.D. \pm e.p.m. das bandas e n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Grupos estudados: Controle (n = 4); HFD (n = 4) e GK (n = 4). (*) $p < 0,05$ vs controle.

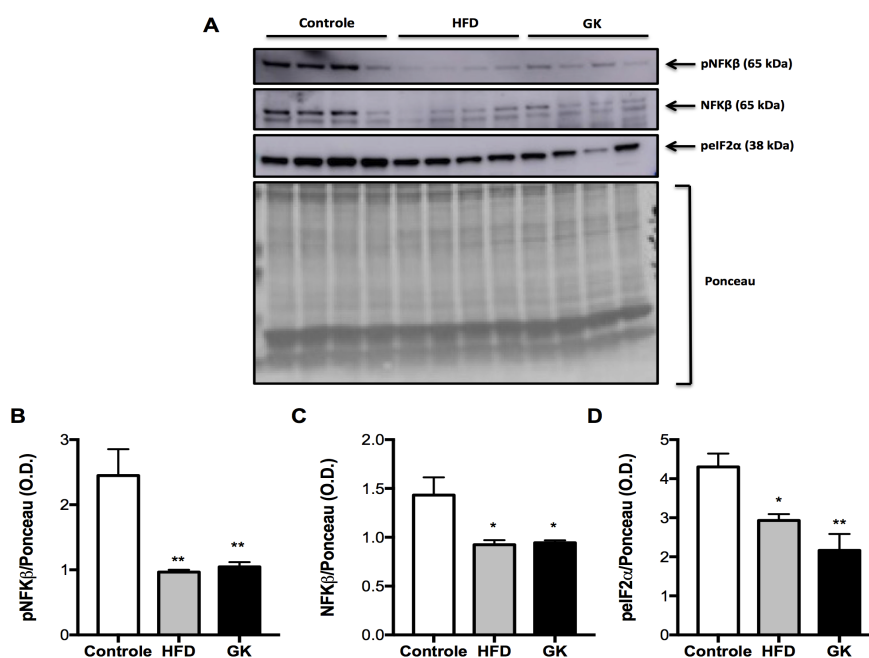
Neutrófilos de animais GK e HFD apresentaram também menor fosforilação de I κ B α (Figura 43), p65NFK β e eIF2 α (Figura 44).

Figura 43 - Conteúdo de pIKB α (A; B) e IKB α (A; C) em neutrófilos do LBA.



Os neutrófilos foram obtidos do LBA 6 horas após a instilação intratraqueal de LPS. Gráficos representam O.D. \pm e.p.m. das bandas e n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Grupos estudados: Controle (n = 4); HFD (n = 4) e GK (n = 4). (*) p < 0,05 vs controle; (**) p < 0,01 vs controle

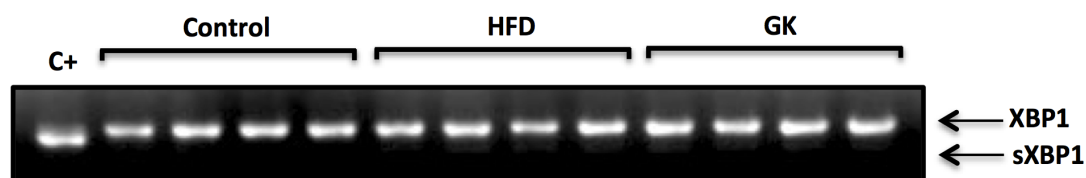
Figura 44 - Conteúdo de pNFK β (A; B), NFK β (A; C) e pI κ B2 α em neutrófilos do LBA.



Os neutrófilos foram obtidos do LBA 6 horas após a instilação intratraqueal de LPS. Gráficos representam O.D. \pm e.p.m. das bandas e n representa o número de animais utilizados em cada grupo. Grupos estudados: Controle (n = 4); HFD (n = 4) e GK (n = 4). (*) p < 0,05 vs controle; (**) p < 0,01 vs controle

Por fim, verificou-se que o LPS por 6 horas foi incapaz de promover ou inibir completamente o *splicing* de XBP1 (Figura 45).

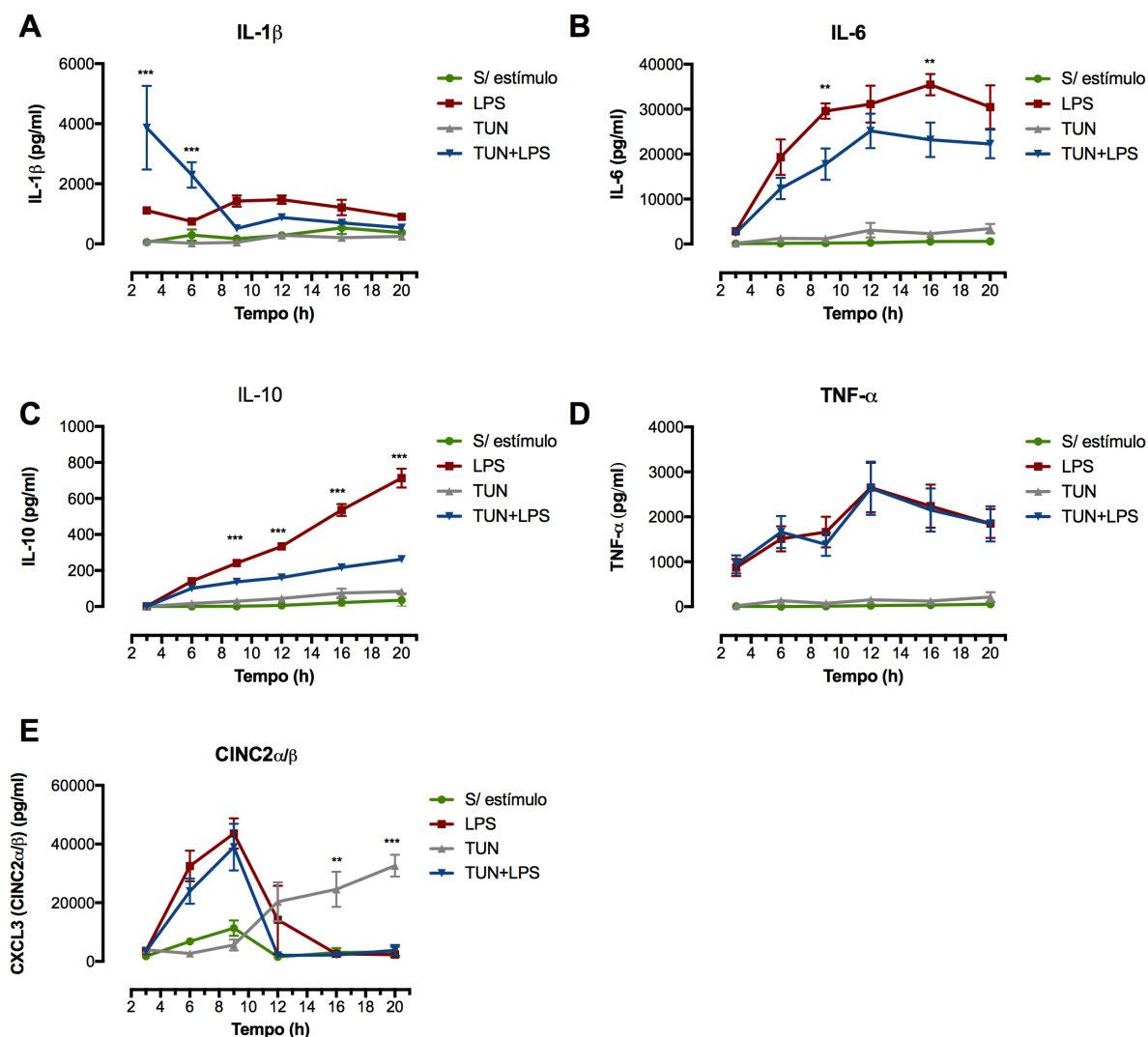
Figura 45 - *Splicing* de XBP1 em neutrófilos do LBA.



Os neutrófilos foram obtidos do LBA 6 horas após a instilação intratraqueal de LPS. Grupos estudados: Controle (n = 4); HFD (n = 4) e GK (n = 4).

Para verificar a interação entre a via de TLR4 e a UPR do RE, o ensaio *in vitro* com neutrófilos obtidos do lavado peritoneal, 4 horas após o estímulo com glicogênio de ostra, foi realizado. Para tanto, neutrófilos (2×10^6) foram estimulados com tunicamicina (TUN), um agente indutor de estresse de RE, LPS ou com LPS + TUN. A produção de citocinas foi mensurada ao longo de 20h de ensaio. O estresse de retículo endoplasmático, promovido pela TUN, inibiu a produção de IL-6 (Figura 46C) pelo LPS e aumentou nas primeiras horas a produção de IL-1 β quando associado ao LPS (Figura 46A). O estresse de RE, promovido pela TUN, promoveu o aumento da produção/liberação de CINC-2 α/β pelos neutrófilos, ao longo das 20h de permanência em cultura (Figura 46E).

Figura 46 - Produção de citocinas por neutrófilos estimulados com LPS, TUN ou LPS +



TUN.

Neutrófilos foram retirados da cavidade peritoneal 4 horas após injeção com glicogênio de ostra 1%. (*) $p < 0,05$ vs controle; (**) $p < 0,01$ vs controle; (***) $p < 0,001$ vs controle.

6 Discussão

De acordo com a *American Diabetes Association (ADA, 1997)*, *diabetes mellitus* é definido como um conjunto de doenças caracterizado pelo aumento da concentração plasmática de glicose devido à deficiência na produção de insulina e/ou deficiência na ação desse hormônio (resistência à insulina). Ratos Goto Kakizaki (GK) foram animais geneticamente selecionados e desenvolvem o *diabetes mellitus* tipo 2. O primeiro trabalho que descreveu esses animais data de 1976 (GOTO; KAKIZAKI; MASAKI, 1976), no qual os mesmos foram selecionados da linhagem Wistar por apresentarem alteração na glicemia de jejum e no teste de tolerância a glicose. Tanto os machos quanto as fêmeas que exibiam essas alterações na homeostasia de glicose foram selecionados para acasalamento. A cada nova prole, os pesquisadores observavam maior número de animais com alta concentração plasmática de glicose. A seleção foi realizada até a obtenção da prole na qual 100% dos animais apresentavam resistência à insulina no ensaio de TTG e hiperglicemia de jejum moderada. Esta seleção originou a primeira linhagem de ratos diabéticos tipo 2 não obesos com características genéticas provenientes da linhagem Wistar (GOTO; KAKIZAKI; MASAKI, 1976). Trabalhos posteriores mapearam geneticamente os animais GK e evidenciaram diferenças em diversos cromossomos, em diferentes loci quando comparados com animais controle. Portanto, concluiu-se que as características exibidas pelos ratos GK não estão associadas à uma mutação genética específica, mas sim a um conjunto de modificações em diferentes cromossomos que levaram ao desbalanço na homeostasia de glicose (GALLI et al., 1996; GAUGUIER et al., 1996).

No ocidente, a obesidade é um dos principais fatores associados ao *diabetes mellitus* tipo 2 (XUE et al., 2011). O ganho de peso promove o aumento de massa adiposa que, quando exacerbado, gera uma situação de hipóxia em alguns adipócitos, causando morte

celular e necrose. Além disso, excessivo acúmulo de gordura nos adipócitos gera um remodelamento do tecido adiposo branco e, conseqüente, estresse de retículo endoplasmático que, por sua vez, promove o aumento na produção de citocinas e quimiocinas (adipocinas) que atuam como fatores quimioatraentes de células do sistema imune para o tecido (NISHAN; KALUPAHANA; KATE, 2011). Esse infiltrado gera o estado inflamatório que impede a ação da insulina (SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006; YE, 2013). Por outro lado, no oriente, cerca de 60% dos diabéticos tipo 2 são magros (XUE et al., 2011). A incidência do diabetes no mundo oriental está associada à outras patologias, como a doença pulmonar obstrutiva crônica, periodontite, artrite reumatoide, distrofia muscular e hepatite C; que possuem como ponto comum à obesidade a inflamação crônica. Dessa maneira, a inflamação subclínica persistente parece ser um fator de risco independente para o desenvolvimento do *diabetes mellitus* tipo 2 (VOZAROVA et al., 2002; DUNCAN et al., 2003).

Nesse trabalho dois diferentes modelos experimentais de diabetes tipo 2 foram utilizados para investigar a progressão desta doença e as conseqüências da mesma no processo inflamatório: o primeiro que evidencia o fator genético (ratos GK) e o segundo que aborda os efeitos ambientais sobre o metabolismo do animal (ratos obesos induzidos por HFD). Vários trabalhos na literatura científica já descreveram as diferenças genéticas dos ratos GK que os levam a desenvolver o fenótipo diabético (GAUGUIER et al., 1996; GALLI et al., 1996). Esses animais desenvolvem o DM2 de forma espontânea, sem interferência da obesidade e têm sido amplamente utilizados para compreender os mecanismos de falha das células beta pancreáticas na produção de insulina e suas complicações a curto e a longo prazo (MOVASSAT et al., 2007; EHSES et al., 2007; PORTHA et al., 2009). Os ratos GK também são resistentes à insulina, mas os mecanismos responsáveis por essa resistência ainda não estão completamente elucidados.

O músculo sóleo de animais GK responderam igualmente ao estímulo de insulina quanto a fosforilação de AKT no sítio da serina 473 quando comparados com animais controle e HFD. O músculo esquelético é o tecido periférico mais importante para controle da glicemia no organismo dos mamíferos (DEFRONZO et al., 1981) e mesmo que nossos resultados não indicassem qualquer falha na fosforilação de AKT no músculo sóleo em ratos GK após estímulo com insulina, observou-se uma diminuição na fosforilação de GSK-3 β . pAKT fosforila GSK-3 β para transmitir o sinal da insulina através da célula e desencadear os efeitos desse hormônio, como aumento de translocação de GLUT4 para membrana, aumento da síntese proteica e diminuição dos processos catabólicos (BARNARD; YOUNGREN, 1992; WOLFE, 2000). Esses resultados indicam que o estímulo com insulina não foi corretamente transmitido no sóleo desses animais, levando a uma condição de resistência à esse hormônio. Outros mecanismos podem estar envolvidos na resistência à insulina no músculo esquelético desses animais, como defeitos observados na microvasculatura muscular de ratos GK podem contribuir para o comprometimento do metabolismo e função das células musculares (PADILLA et al., 2007). Além disso, estudo prévio de Dadke et al. mostrou aumento na atividade da tirosina fosfatase 1B (PTP1B) antes e após o estímulo da insulina no músculo esquelético de ratos GK. PTP1B é conhecida por causar desfosforilação de sítios de tirosina e, conseqüentemente, atua como regulador negativo da sinalização de insulina inativando receptores de sinalização desse hormônio (DADKE et al., 2000).

O tecido adiposo também é um sítio importante para manutenção da homeostase da glicose em mamíferos. O tecido adiposo branco retroperitoneal (rTAB) de ratos GK apresentou menor fosforilação de AKT após o estímulo com insulina, indicando, novamente, a resistência periférica à insulina neste modelo animal. Os ratos GK têm menor acúmulo de gordura nos depósitos de tecido adiposo branco provavelmente, devido ao comprometimento na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros, levando a um defeito no

armazenamento de triglicerídeos e ao aumento da liberação de ácidos graxos livres para o plasma (BARBU et al., 2009; XUE et al., 2011; XUE et al., 2015). A falha no processo de diferenciação de adipócitos observada em ratos GK pode ser consequência da inflamação crônica observada no TAB desses animais (LACASA et al., 2007). Nossos resultados confirmaram um aumento no conteúdo de IL-10 no rTAB de ratos GK, que é indicativo de processo inflamatório crônico neste tecido. Além disso, nossos resultados evidenciaram falha dos animais GK em diminuir a concentração plasmática de glicose e aumentar os níveis plasmáticos de insulina após um estímulo de glicose, indicando deficiências na produção e secreção de insulina por células β pancreáticas. A insuficiência na produção e secreção de insulina por células β pancreáticas de ratos GK também é observada e bem estabelecida por outros grupos na literatura (EHSES et al., 2007; MOVASSAT et al., 2007; PORTHA et al., 2009). No entanto, é importante considerar que a produção de glicose hepática basal elevada como consequência da diminuição do efeito supressor da insulina nos hepatócitos, contribuem também para níveis elevados de glicose no plasma de ratos GK (BERTHELIER et al., 1997; BISBIS et al., 1993; PICAREL-BLANCHOT et al., 1996).

A hiperglicemia *per se* é capaz de promover a inflamação no fígado de animais GK, alterando a expressão de genes que controlam a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (ALMON et al., 2009). Nossos resultados confirmaram o estado inflamatório no fígado de ratos GK evidenciando um aumento no conteúdo de IL-6 e IL-10 neste tecido. Além disso, nas análises histológicas, observou-se maior conteúdo de glicogênio e ausência de acúmulo de gordura no fígado desses animais. De acordo com que foi encontrado em nossas análises, Almon et al demonstraram que a hiperglicemia crônica promove a deposição de glicogênio e impede o acúmulo excessivo de gordura no fígado de animais GK (ALMON et al., 2009). Por fim, todos os resultados nestes animais confirmaram sua confiabilidade como modelo

experimental para se investigar o desenvolvimento e consequências do DM2 devido exclusivamente a um fator intrínseco: a carga genética.

O modelo de obesidade por dieta hiperlipídica em animais de experimentação é a que melhor mimetiza a obesidade humana (BELPERIO et al., 2002; SURWIT et al., 1988; WEST et al., 1992). Embora a dieta hiperlipídica utilizado nesse estudo não tenha sido capaz de induzir hiperglicemia em ratos Wistar, como também observado por outros pesquisadores (SINITSKAYA et al., 2007; WONGCHITRAT et al., 2017), ela desencadeou o estado pré-diabético nesses animais. A dieta hiperlipídica induziu obesidade com hipertrofia dos depósitos de TAB, principalmente retroperitoneal e epididimal. Esta expansão de TAB foi acompanhada pelo aumento na infiltração de leucócitos e inflamação neste tecido. De acordo com nossos resultados, outros grupos também relataram aumento na expressão de genes inflamatórios no tecido adiposo branco após tratamento com dieta hiperlipídica (KELLER; ATTIE, 2010; MORAES et al., 2003). Durante a obesidade, a infiltração de leucócitos no TAB, composta principalmente por macrófagos, aumenta a produção de TNF- α e IL-6, a fim de se iniciar e manter um processo inflamatório (CAWTHORN; SETHI, 2008; SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006). Embora Wernstedt Asterholm et al. já estabeleceram que a inflamação do tecido adiposo é uma resposta adaptativa essencial para o armazenamento de excesso de nutrientes e para a expansão e remodelamento do TAB durante a alimentação com dieta hiperlipídica, o estímulo inflamatório constante nesse tecido pode levar ao comprometimento da sinalização da insulina e, conseqüentemente, a resistência à insulina (ASCHAR; SHEIKI, 2017; SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006).

As citocinas promovem a fosforilação de serina do substrato de receptor de insulina-1 (IRS-1) e prejudicam a sinalização de insulina impedindo a via PI3K (GALLAGHER et al., 2010; SHI et al., 2006;). A inflamação foi provavelmente a principal causa da resistência à insulina no TAB no modelo de obesidade induzido por dieta hiperlipídica, uma vez que houve

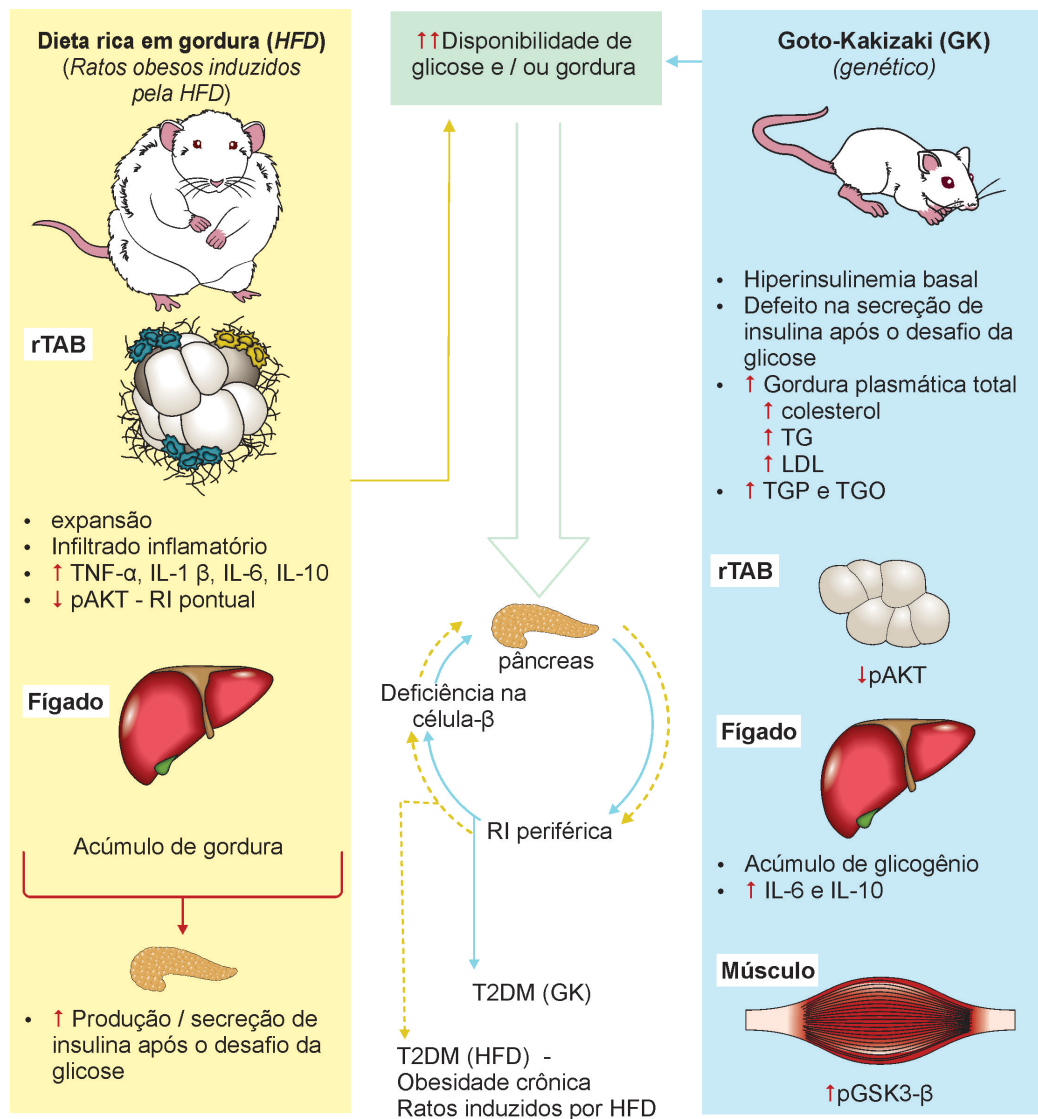
o aumento concomitante no conteúdo de citocinas e diminuição da fosforilação de AKT nesse tecido. Mesmo que os animais alimentados com essa dieta não apresentassem resistência insulínica estabelecida no músculo esquelético sóleo e fígado, a resistência à insulina no TAB foi identificada pontualmente. Ratos do grupo HFD não apresentaram intolerância à glicose no ensaio de TTG, no entanto, esses animais mostraram um grande aumento na secreção de insulina após o estímulo da glicose, indicando que esses animais apresentaram menor sensibilidade à insulina. Estes dados foram confirmados quando o KITT foi calculado, corroborando com as alterações encontradas no rTAB.

Embora Karpe et al e esse presente trabalho mostrassem que, em condições de jejum, os níveis plasmáticos de ácidos graxos livres não eram diferentes entre o controle e os grupos HFD, Liu et al. concluiu que, no estado alimentado, a dieta hiperlipídica promoveu níveis elevados de ácidos graxos livres (*Free Fatty Acids* - FFA) circulantes como resultado do aumento da ingestão dietética de lipídios e capacidade prejudicada da insulina pós-prandial para inibir efetivamente a lipólise (LIU et al., 2015). É importante considerar a composição de FFA no plasma desses animais. Nossos resultados demonstraram que os animais HFD apresentaram alta porcentagem de ácidos graxos saturados (*Saturated Fatty Acids* - SFA) e baixa concentração de ácidos graxos monoinsaturados (*Monounsaturated Fatty Acids* - MUFA) no plasma. Esta diferença pode ser uma consequência da diminuição da atividade da enzima SCD1 (*Stearoyl-CoA desaturase-1*), predominantemente expressa no fígado, que converte SFA derivado de ácidos graxos provenientes da dieta ou da lipogênese *de novo* em MUFA, conforme descrito por Paton e Ntambi (PATON; NTAMBI, 2009). SFA elevado e diminuição da atividade de SCD1 resulta em apoptose de hepatócitos, esteatose hepática e fibrose (LI et al., 2009). Os níveis baixos de triglicérides observados em animais alimentados com dieta hiperlipídica podem ser explicados pelo maior acúmulo de gordura no fígado, como demonstrado anteriormente por Pan et al. e Liu et al.

O estímulo intrínseco *versus* extrínseco no desenvolvimento do DM2 foi o tema principal na primeira parte desse trabalho. A escolha de um modelo experimental é de crucial importância para o entendimento da fisiopatologia da doença. Nessa parte de caracterização dos modelos experimentais, mostramos dois modelos completamente diferentes para estudar o DM2. O modelo genético, ratos GK, que apresentou todas as características típicas dessa síndrome, e podem ser claramente observadas após 2 meses do nascimento. No entanto, mesmo antes do nascimento, esses animais já demonstram menor massa de células beta pancreáticas e microangiopatia de ilhotas (CALDERARI et al., 2007; GIROIX et al., 2011; MIRALLES; PORTHA, 2001; PLACHOT; MOVASSAT; PORTHA, 2001;), indicando que o principal defeito deste modelo é encontrado na produção de insulina. Conseqüentemente ao comprometimento na capacidade de secretar e produzir insulina, as outras características típicas da síndrome se desenvolvem, como por exemplo, a hiperglicemia, aumento da gordura no plasma, inflamação hepática, glicotoxicidade e, assim por diante. Contrariamente a este modelo, nosso estímulo extrínseco para o desenvolvimento do DM2, a dieta hiperlipídica, mostrou um cenário completamente diferente. Nesses animais, o fígado e o músculo responderam ao estímulo da insulina, embora o fígado tenha apresentado considerável acúmulo de gordura. No entanto, observamos que os ratos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram menor sensibilidade à insulina e apresentaram maior produção/secreção de insulina para manter os níveis glicêmicos normais. Isso ocorreu principalmente devido ao excesso de acúmulo de gordura no TAB, promovendo infiltração de leucócitos e inflamação neste sítio. Este processo inflamatório foi responsável pelo comprometimento da resposta da insulina neste tecido, como observado pela diminuição da fosforilação de AKT. Portanto, neste modelo, o início do desenvolvimento do DM2 ocorre especificamente no tecido adiposo branco. O tecido adiposo inflamado e hipertrofiado requer mais insulina para manter a homeostase de glicose, sobrecarregando as células beta pancreáticas a produzirem insulina.

Com o passar do tempo, a alta demanda na produção do hormônio pode comprometer a sobrevivência e função dessas células. Dessa maneira, nossos resultados indicam que a exposição crônica à dieta hiperlipídica, provavelmente, levaria ao quadro de falência de células beta pancreáticas, diminuição nos níveis plasmáticos de insulina e, finalmente, ao estabelecimento de DM2 (Figura 47).

Figura 47 - GK *versus* Ratos obesos induzidos por HFD: Dois modelos experimentais para estudar o desenvolvimento do diabetes tipo 2.



A fim de estudar a resposta inflamatória frente a obesidade e ao *diabetes mellitus* tipo 2, neutrófilos provenientes do sangue e do LBA pós instilação com LPS foram analisados. Alguns trabalhos demonstram a deficiência na quimiotaxia e produção de citocinas por neutrófilos de camundongos obesos (ob/ob, db/db e dieta hiperlipídica) (UBAGS et al., 2016). Porém, pouco se sabe quanto a função dessa célula frente ao *diabetes mellitus* tipo 2 já estabelecido. Nosso estudo mostrou menor capacidade de migração dos neutrófilos para o pulmão nos grupos GK e hiperlipídica, fato esse que poderia ser decorrente de alteração na disponibilidade de leucócitos na circulação sanguínea desses animais. Porém, os animais GK e hiperlipídica, quando não submetidos ao desafio com LPS, apresentam a mesma concentração de neutrófilos no sangue que os animais controles, indicando que não houve prejuízo na produção dessas células pela medula óssea. Porém, quando instilou-se LPS nos animais, verificou-se o aumento do número de neutrófilos no sangue de animais GK, indicando possível prejuízo na migração das células para o foco de inflamação pulmonar. Não foram observados neutrófilos imaturos ou progenitores de neutrófilos na corrente sanguínea dos grupos experimentais (Apêndice A). Com relação aos animais que receberam dieta hiperlipídica, não se observou o acúmulo de neutrófilos na corrente sanguínea após instilação com LPS. Provavelmente, a diminuição de neutrófilos que migraram para o pulmão após LPS tenha sido decorrente do direcionamento dessas células para outro foco de inflamação nos animais obesos. Sabe-se que nesta condição o tecido adiposo atua como outro sítio de inflamação, pois o aumento de massa adiposa está diretamente relacionada com um aumento de citocinas inflamatórias pelos adipócitos (HOTAMISLIGIL et al., 1995; OUCHI et al., 2011). A análise de cortes histológicos do tecido adiposo branco retroperitoneal de fato confirmou esse hipótese, evidenciando o processo inflamatório local e aumento de leucócitos para esse sítio.

Deve-se considerar a importância da produção de citocinas por neutrófilos, pois as mesmas são responsáveis por influenciar, sustentar e direcionar a evolução do processo inflamatório. Dentre as citocinas avaliadas no LBA destaca-se a diminuição da produção/liberação de IL-1 β , IL-6 e TNF- α por neutrófilos dos animais GK. Durante o processo inflamatório, a IL-1 β produzida por neutrófilos é responsável por estimular a síntese e liberação de moléculas de fase aguda, ativação de células B e T, e indução de citocinas regulatórias como IL-6, IL-8 e GM-CSF (DINARELLO, 1991). IL-1 β também exerce efeito autócrino e parácrino, estimulando a própria liberação de IL-1 β (MARUCHA; ZEFF; KREUTZER, 1990) e a indução local de moléculas de adesão das células endoteliais, promovendo acúmulo de leucócitos no local de inflamação (LLOYD; OPPENHEIM, 1992). TNF- α desempenha funções imuno-modulatórias semelhantes a IL-1 β (LLOYD; OPPENHEIM, 1992). Com relação a IL-6, atribui-se a função de auxiliar no perfil de recrutamento leucocitário durante o processo inflamatório, via regulação seletiva de citocinas inflamatórias e eventos apoptóticos (HURST et al., 2001; JONES, 2005; MCLOUGHLIN et al., 2003). Experimentos que utilizaram camundongos knockout para IL-6, evidenciaram que na ausência da citocina não há alteração no infiltrado neutrofilico inicial (HURST et al., 2001), porém não ocorre o acúmulo de neutrófilos no sítio de inflamação, favorecendo a resolução do processo inflamatório (XING et al., 1998).

Observou-se nos grupos controle e GK aumento da quimiocina CXCL3 (CINC-2 α/β), potente fator quimiotático para neutrófilos e principal mediador da inflamação aguda (TAKANO; NAKAGAWA, 2001). Esse aumento não colaborou para o processo de migração destas células para o pulmão de animais GK após a instilação com LPS. Essa disfunção na quimiotaxia já vem sendo descrita por alguns trabalhos (UBAGS et al., 2016) e também no *diabetes mellitus* tipo 1 (ALBA-LOUREIRO et al., 2006). Neutrófilos provenientes de

animais sob dieta hiperlipídica apresentaram diminuição de IL-6, sem aumento na produção de CXCL3 como observado nos outros grupos experimentais.

As citocinas IL-1 β e IL-10 também estão menos expressas em neutrófilos de animais sob dieta hiperlipídica e GK, enquanto a citocina IL-6 está menos expressa apenas no grupo hiperlipídica. Essas diferenças evidenciam, novamente, o prejuízo na resposta inflamatória nos dois grupos experimentais. Ao se ressaltar a importância da IL-10 em limitar a duração e o prejuízo na resposta inflamatória (CASSATELLA et al., 1994), evidenciamos que as alterações observadas estariam contribuindo para o desequilíbrio de mediadores pró e anti-inflamatórios e, conseqüentemente, no desempenho funcional dos neutrófilos. Em animais obesos, as alterações parecem ser evidenciadas ainda no processo de quimiotaxia devido a deficiência na expressão de CXCL-1 e CXCL-2 pelos neutrófilos. Estas quimiocinas são constitutivamente expressas na medula óssea, por células endoteliais e megacariócitos (KING et al., 2001; EASH et al., 2010), atuam como potentes quimioatraentes e ativadores de neutrófilos, sendo responsáveis pela emigração destas células da corrente sanguínea e direcionando-os para os sítios de inflamação (LATERVEER et al., 1995; OPDENAKKER, 1998).

Como no pulmão há uma população residente de macrófagos, considerou-se a possível influência dessas células no processo inflamatório. Para tanto, macrófagos alveolares e neutrófilos do sangue foram separadamente levados a cultura com ou sem estímulo com LPS por 6 horas para se verificar a capacidade de produção de citocinas por estas células. Verificou-se que macrófagos de animais GK e HFD produzem menos IL-1 β , comprometendo o início do processo inflamatório e ativação dos neutrófilos atraídos para o local da inflamação (LLOYD; OPPENHEIM, 1992; MARUCHA; ZEFF; KREUTZER, 1990). Neutrófilos de animais GK quando estimulados apenas com LPS, sem interferência de citocinas e quimiocinas produzidas por macrófagos, produziram menos IL-6 e TNF- α e mais

CXCL3, indicando um desbalanço na função inflamatória dessas células. Por outro lado, neutrófilos de animais HFD, apresentaram perfil semelhante de produção de citocinas ao do grupo controle. Esse resultado indica que a deficiência inflamatória verificada em animais do grupo HFD não seria devido, prevalentemente, ao mal funcionamento neutrofilico mas sim decorrente da deficiência da função dos macrófagos residentes e, conseqüentemente, ao processo de quimiotaxia dos neutrófilos para o local da inflamação.

O processo de migração ocorre com a participação de moléculas de adesão que promovem a interação leucócito-endotélio, as quais estão agrupadas em selectinas, integrinas e imunoglobulinas. As selectinas iniciam os eventos de sinalização para o processo de adesão leucocitária no decorrer da inflamação fisiológica ou patológica. A L-selectina é expressa na superfície dos leucócitos (KAHN et al., 1998) e a P-selectina é expressa principalmente em megacariócitos e plaquetas, sendo que na presença de TNF- α , IL-1 β e LPS ocorre aumento da transcrição de seu mRNA (LIU et al., 2010; YAO et al., 1990). O mesmo ocorre com a E-selectina que é constitutivamente expressa em células endoteliais (VESTWEBER et al., 1999). O aumento da expressão de E-selectina durante a inflamação, permite maior tempo de contato dos neutrófilos com o endotélio vascular que, associado ao aumento de quimiocinas como a CXCL-1 (JUNG et al., 1998), promove a ativação das integrina β 2, também conhecida como CD18, que medeiam a adesão e a migração transendotelial, através dos ligantes das células endoteliais, particularmente ICAM-1 (LEFORT; LEY, 2012).

Em nosso estudo verificamos que neutrófilos de animais GK apresentaram menor expressão gênica das integrinas LFA-1 e integrina β 2, assim como da ICAM-2 evidenciando que as células oriundas destes animais possuem menor capacidade de adesão e migração para o sítio inflamatório, corroborando com a diminuição do número de células observado no LBA após LPS. No entanto, a deficiência da migração de neutrófilos observada no LBA de animais

alimentados com ração hiperlipídica parece ser decorrente primordialmente do prejuízo na quimotaxia induzido pela disfunção de macrófagos alveolares e não na adesão ao endotélio.

Curiosamente, neutrófilos de animais GK exibiram aumento na expressão de IL-18 quando comparado com células dos outros grupos experimentais. IL-18 e IL-1 β são produtos da clivagem de pró-IL-18 e pró-IL-1 β , respectivamente, promovida pela caspase 1 presente no complexo NLRP3 inflamossomo (GUO, 2015). Resumidamente, o inflamassomo é um complexo multiproteico formado por receptores NOD-like, uma molécula adaptadora ASC e pró-caspase 1. Os inflamossomos são conhecidos como *Pattern Recognition Receptors* (PPR) por serem capaz de reconhecer DAMPS e PAMPs e estão localizados no citosol de células eucarióticas, principalmente em células do sistema imune inato. Para ativação dos inflamossomos são necessários dois sinais: o primeiro é o *priming* da célula pela ativação do TLR4 pelo seu ligante, principalmente LPS. Esse *priming* promove o aumento da expressão de pró-IL-18 e pró-IL-1 β e moléculas que participam da formação do complexo multiproteico do inflamossomo. O segundo sinal é capaz de ativar a caspase 1 pela maturação e ativação do inflamossomo. Caspase 1 ativada é capaz de processar pró-IL-18 e pró-IL-1 β em suas formas ativas. Exemplos de segundo sinal são: ATP, hiperglicemia, fragmentos de DNA, cristais de uréia e espécies reativas de oxigênio.

Os neutrófilos dos animais GK apresentaram menor expressão dos genes dos inflamossomos, exceto NLRP3. Mesmo com a expressão similar de NLRP3, neutrófilos de animais GK e HFD apresentaram menor concentração de IL-1 β . A diminuição dessa citocina pode estar associada à menor expressão de caspase 1 observada nesses grupos. Macrófagos de camundongos *knockout* para caspase 1 possuem deficiência semelhante na produção de IL-1 β (LI et al., 1995).

É sabido na literatura que neutrófilos expressam NLRP3, capaz de processar pró-IL-1 β em IL-1 β (MANKAN et al., 2012), porém essa clivagem pode ocorrer de forma alternativa

e independente do inflamossomo, via elastase 1 (GUMA et al., 2009). A elastase 1 é uma enzima específica de neutrófilos e está presente nos grânulos primários dessas células (LACY, 2006). Observou-se que essa enzima foi expressa de maneira similar pelos neutrófilos dos grupos experimentais estudados, indicando o não envolvimento da elastase 1 na ativação de IL-1 β no nosso modelo experimental.

A enzima chave no processo inflamatório mediado por neutrófilos, mieloperoxidase (MPO), também foi investigada no LBA. Observamos que neutrófilos de animais GK e HFD apresentaram menor atividade dessa enzima, indicando deficiência na ação microbicida e, conseqüentemente, na resolução do processo inflamatório nestes animais. Várias mutações e deleções herdadas no gene que codifica a MPO resultam em diminuição da produção e atividade enzimática (KLEBANOFF, 2005; PETRIDES, 1998). Infecções por *Candida albicans* são comuns em pacientes com deficiência de MPO, especialmente naqueles que também desenvolvem, concomitantemente, o diabetes (CECH et al., 1979; NAUSEEF, 2007; PARRY et al., 1981). Além disso, complicações infecciosas ou inflamatórias graves são frequentemente observadas em pacientes completamente deficientes em MPO (KUTTER, 1998). Por fim, camundongos *knockout* para MPO são mais suscetíveis a infecções bacterianas e fúngicas (ARATANI et al., 2000).

Outras enzimas importantes no estresse oxidativo e na produção de mediadores lipídicos inflamatórios também foram analisadas. Verificou-se que em neutrófilos de animais GK apresentaram menor expressão de Alox5 (enzima chave na produção de LTB₄) e GPX1, enzima antioxidante. A expressão da catalase, enzima antioxidante capaz de converter o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, está aumentada em neutrófilos de animais GK. Dessa maneira, ensaios de atividade, bem como análise do conteúdo dessas enzimas ainda devem ser realizados a fim de se investigar a situação redox dessas células e, também a capacidade na produção de mediadores lipídicos pelas mesmas.

Com relação à cascata de sinalização decorrente da ativação das células por LPS, pesquisou-se inicialmente a via de TLR4 por PCR. Os neutrófilos de animais GK apresentaram aumento na expressão de TLR4 e menor expressão de IRAK4 e TRIF, quando comparado com a expressão das mesmas por neutrófilos dos outros grupos experimentais. Koziczak-Holbro et al., demonstrou que a inativação de IRAK4 em camundongos *knockout* para essa proteína protege os animais de choque séptico induzido por LPS e, diminui a produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos estimulados por IL-1 β e outros ligantes de TLR, tornando as células resistentes ao LPS. TRIF é essencial para ativação das vias de TLR3 e TLR4 independente de MYD88 e o *knockout* de TRIF promove diminuição da expressão de genes induzíveis por interferon γ (INF- γ) em resposta à ligantes de TLR4 (HOEBE et al., 2003; YAMAMOTO et al., 2003). Nossos resultados também mostraram por WB, que a via de TLR4 está comprometida nos neutrófilos dos animais GK e HFD, devido à diminuição do conteúdo de TLR4, da fosforilação de pIKB α e NFK β . Dessa maneira, demonstramos que neutrófilos de animais GK e HFD apresentam o quadro de resistência ao LPS.

Além da alteração de expressão de componentes da via de sinalização relacionada à TLR4, verificamos que neutrófilos de animais GK são mais susceptíveis ao processo de morte celular, seja apoptose ou necrose, antes e após migração para o pulmão. Sendo assim, a deficiência na migração e na produção de citocinas inflamatórias também são decorrentes do processo de morte dos neutrófilos provenientes de animais GK e, até o momento ainda é pouco estudado. Nosso grupo tem evidências de que neutrófilos, provenientes de ratos diabéticos tipo 1, apresentam o processo de morte acelerado por estresse de retículo endoplasmático e ausência do processo autofágico (KUWABARA et al., 2017). Porém, pouco se sabe sobre processo de morte de neutrófilos frente ao *diabetes mellitus* tipo 2. Sabe-se que a ativação de TLR4 promove o aumento do estresse de retículo, nos tecidos adiposo, muscular

e hepático; na micróglia; em macrófagos e no endotélio de vasos sanguíneos, por aumentar a demanda na produção de proteínas, principalmente de citocinas e quimiocinas (KIM et al., 2015; MARTINON et al., 2010; MASSON et al., 2015; PIERRE et al., 2013). Por outro lado, o estresse de retículo endoplasmático já instalado impede a resposta de ativação de TLR4 em macrófagos, comprometendo o processo inflamatório (KOMURA et al., 2013). Nós observamos que o estresse de RE inibiu a ação do LPS, diminuindo a produção de IL-6 e IL-10 e, contraditoriamente, aumentando a capacidade do LPS em produzir IL-1 β nas primeiras horas de estímulo, e diminuição após 6 horas de LPS. A produção de TNF- α não foi alterada quando neutrófilos foram tratados concomitantemente com TUN e LPS. Além disso, observou-se, *in vivo*, uma diminuição da fosforilação de p e IF2 α em neutrófilos de animais GK e HFD quando comparados com neutrófilos de animais controle, demonstrando o comprometimento na ativação da via da PERK nessas células e indicando, possivelmente, a importância dessa via no processo inflamatório. Não foi observada deficiência na via do IRE-1 α , pois não se verificou diferença no *splicing* de XBP1 em neutrófilos dos grupos estudados, após 6 horas de estímulo com LPS *in vivo*. Em macrófagos, Martinon et. al mostraram que LPS, através da ativação da via de TLR4, promove o *splicing* de XBP1 independente da via da UPR e, que o XBP1 ativado por TLR4 é essencial para a produção de citocinas pró-inflamatórias. Esses pesquisadores demonstraram também que a ativação do IRE-1 α pelo estresse de RE atua em sinergia com a ativação de TLR4 para a produção de citocinas (MARTINON et al., 2010). Em neutrófilos, a comunicação entre essas duas vias deve ocorrer de outra maneira, pois o LPS foi incapaz de promover o *splicing* de XBP1 ou inibiu completamente a via de IRE-1 α . Dessa maneira, outras abordagens, como uso de animais *knockout* ou silenciamento de neutrófilos *in vitro*, deverão ser utilizadas para compreender a interação dessas vias nestas células.

7 Conclusão

Esse estudo concluiu que a obesidade e o *diabetes mellitus* tipo 2 promovem a diminuição da migração de neutrófilos para o sítio de inflamação. Esses dados corroboram com outros estudos na literatura (UBAGS et al., 2016) e também com as evidências clínicas de que pacientes diabéticos e obesos são mais susceptíveis a infecções pulmonares bacterianas, virais e fúngicas (FEZEU et al., 2011; MERTZ et al., 2013; PHUNG et al., 2013). A obesidade parece interferir na sinalização para migração de neutrófilos, enquanto o *diabetes mellitus* tipo 2 interfere não apenas na quimiotaxia mas também em proteínas de adesão do neutrófilo ao endotélio. Além disso, neutrófilos de animais diabéticos tipo 2 parecem ser resistentes ao LPS, pela menor produção e expressão de citocinas inflamatórias, menor expressão gênica dos inflamosomos e de proteínas da via do TLR4. Sendo assim, neutrófilos de animais diabéticos se apresentam com menor capacidade de combater um agente invasor, aumentando assim a vulnerabilidade à infecções supra citadas. Neutrófilos de animais obesos parecem responder melhor ao LPS que neutrófilos de animais diabéticos, porém, com alterações pontuais suficientes para comprometer a correta sinalização da via do TLR4 e, conseqüentemente, o processo inflamatório. Por fim, conclui-se que o via da UPR é essencial para correta ativação do receptor TLR4, no entanto, não conseguimos desvendar com as metodologias propostas, em qual ponto essas duas vias se comunicam e interagem com as funções dos neutrófilos.

*Referências Bibliográficas**

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol.**, v. 4, p. 499-511, 2004.

ALBA-LOUREIRO, T. C.; HIRABARA, S. M.; MENDONÇA, J. R.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. C. Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils. **J. Endocrinol.**, v. 188, p. 295–303, 2006b.

ALBA-LOUREIRO, T. C.; HIRABARA, S. M.; MENDONÇA, J. R.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. C. Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils. **J. Endocrinol.**, v. 188, p. 295–303, 2006.

ALBA-LOUREIRO, T. C.; MARTINS, E. F.; LANDGRAF, R. G.; JAN, C. A. R. S.; CURI, R.; SANNOMIYA, P. Role of insulin on PGE2 generation during LPS-induced lung inflammation in rats. **Life Sci.**, v. 78, p. 578 – 585, 2006a.

ALMON, R. R.; DUBOIS, D. C.; LAI, W.; XUE, B.; NIE, J.; JUSKO, W. J. Gene expression analysis of hepatic roles in cause and development of diabetes in Goto-Kakizaki rats. **J Endocrinol.**, v. 200, p. 331-346, 2009.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diab. Care.**, v. 20, p. 1183-1197, 1997.

ANDERSEN, B.; GOLDSMITH, G. H.; SPAGNUOLO, P. J. Neutrophil adhesive dysfunction in diabetes mellitus: the role of cellular and plasma factors. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 111, p. 275-285, 1988.

ANJOS-VALLOTA, E. A.; MARTINS, J. O.; OLIVEIRA, M. A.; CASOLARI, D. A.; BRITTO, L. R. G.; TOSTES, R. C.; FORTES, Z. B.; SANNOMIYA, P. Inhibition of tumor necrosis factor- α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression in diabetic rats: role of insulin. **Inflamm. Res.**, v. 55, p. 16-22, 2006.

ARATANI, Y.; KURA, F.; WATANABE, H.; AKAGAWA, H.; TAKANO, Y.; SUZUKI, K.; MAEDA, N.; KOYAMA, H. Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. **J Infect Dis.**, v. 182, p. 1276-1279, 2000.

ARESCHOUG, T.; GORDON, S. Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands. **Contrib Microbiol.**, v. 15, p. 45-60, 2008.

ASGHAR, A.; SHEIKH, N. Role of immune cells in obesity induced low grade inflammation and insulin resistance. **Cell Immunol.**, v. 315, p. 18-26, 2017.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, v. 281, p. 1305-1308, 1998.

BABIOR, B. M.; KIPNES, R. S.; CURNUTTE, J. T. Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **J. Clin. Invest.**, v. 52, p. 741, 1973.

BALASOIU, D.; VAN KESSEL, K. C.; VAN KATS-RENAUD, H. J.; COLLET, T. J.; HOPELMAN, A. I. Granulocyte function in women with diabetes and asymptomatic bacteriuria. **Diabetes Care**, v. 20, p. 392–395, 1997.

BARBU, A.; HEDLUND, G. P.; LIND, J.; CARLSSON, C. Pref-1 and adipokine expression in adipose tissues of GK and Zucker rats. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 299, p. 163-171, 2009.

BARNARD, R. J.; YOUNGREN, J. F. Regulation of glucose transport in skeletal muscle. **FASEB J.**, v. 6, p. 3238-3244, 1992

BELPERIO, J. A.; KEANE, M. P.; BURDICK, M. D.; LONDHE, V.; XUE, Y. Y.; LI, K.; PHILLIPS, R. J.; STRIETER, R. M. Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. **The Journal of clinical investigation**, v. 110, p. 1703-1716, 2002.

BERNALES, S.; PAPA, F. R.; WALTER, P. Intracellular signaling by the unfolded protein response. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 22, p. 487–508 , 2006.

BERTHELIER, C.; KERGOAT, M.; PORTHA, B. Lack of deterioration of insulin action with aging in the GK rat: a contrasted adaptation as compared with nondiabetic rats. **Metabolism.**, v. 46, p. 890-896, 1997.

BERTON, G. Desgranulation. In: Gallin, j.i. and Snyderman, R. (eds): *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins: 1999, 703p.

BERTONI, A. G.; SAYDAH, S.; BRANCATI, F. L.; Diabetes and the risk of infection-related mortality in the US. **Diabetes Care**, v. 24, p. 1044-1049, 2001.

BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **J Leukoc Biol.**, v. 81, p. 1-5, 2007.

BISBIS, S.; BAILBE, D; TORMO, M. A.; PICAREL-BLANCHOT, F.; DEROUET, M.; SIMON, J.; PORTHA, B. Insulin resistance in the GK rat: decreased receptor number but normal kinase activity in liver. **Am J Physiol.**, v. 265, p. E807-E813, 1993.

BOICHOT, E.; SANNOMIYA, P.; ESCOFIER, N.; GERMAIN, N.; FORTES, Z. B.; LAGENTE, V. Endotoxin-induced acute lung injury in rats. Role of insulin. **Pulm. Pharmacol. Ther.**, v. 12, p. 285-290, 1999.

CALDERARI, S.; GANGNERAU, M. N.; THIBAUT, M.; MEILE, M. J.; KASSIS, N.; ALVAREZ, C.; PORTHA, B.; SERRADAS, P. Defective IGF-2 and IGFR1 protein

production in embryonic pancreas precedes beta cell mass anomaly in Goto-Kakizaki rat model of type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 50, p. 1463–1471, 2007.

CAPEL, S. E.; HUNT, D.; MAIMBERG, K.; PATHAK, P.; GERSTEIN, H. C. Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic patients: a systematic overview. **Stroke**, v. 32, p. 2426-2432, 2001.

CASSATELLA, M. A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. **Adv Immunol.**, v. 73, p. 369-509, 1999.

CASSATELLA, M. A.; MEDA, L.; GASPERINI, S.; CALZETTI, F.; BONORA, S. Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. **J Exp Med.** v. 179, p. 1695-1699, 1994.

CAVAILLON, J. M.; HAEFFNER-CAVAILLON, N. Signals involved in interleukin-1 synthesis and release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes/macrophages. **Cytokine**, v. 2, p. 313-329, 1990.

CAWTHORN, W. P.; SETHI, J. K. TNF-alpha and adipocyte biology. **FEBS Lett.**, v. 582, p. 117-131, 2008.

CHALLISS, R. A.; ESPINAL, J.; NEWSHOLME, E. A. Insulin sensitivity of rates of glycolysis and glycogen synthesis in soleus, stripped soleus, epitrochlearis, and hemidiaphragm muscles isolated from sedentary rats. **Biosci Rep.**, v. 3, p. 675-679, 1983.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques.**, v. 15, p. 532-537, 1993.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem.**, v. 162, p. 156-159, 1987.

COLOTTA, F.; RE, F.; POLENTARUTTI, N.; SOZZANI, S.; MANTOVANI, A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. **Blood**, v. 80, p. 2012-2020, 1992.

CONNER, T. M.; FLESNER-GURLEY, K. R.; BARNER, J. C. Hyperglycemia in the Hospital Setting: The Case for Improved Control Among Non-Diabetics. **Ann Pharmacother.**, v. 39, p. 492-501, 2005.

COOPE, A.; MILANSKI, M.; ARRUDA, A. P.; IGNACIO-SOUZA, L. M.; SAAD, M. J.; ANHÊ, G. F.; VELLOSO, L. A. Chaperone insufficiency links TLR4 protein signaling to endoplasmic reticulum stress. **J Biol Chem.**, v. 287, p. 15580-15589, 2012.

CRETTAZ, M.; PRENTKI, M.; ZANINETTI, D.; JEANRENAUD, B. Insulin resistance in soleus muscle from obese Zucker rats. Involvement of several defective sites. **Biochem J.**, v. 186, p. 525-534, 1980.

DADKE, S. S.; LI, H. C. KUSARI, A. B.; BEGUM, N.; KUSARI, J. Elevated expression and activity of protein-tyrosine phosphatase 1B in skeletal muscle of insulin-resistant type II diabetic Goto-Kakizaki rats. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 274, p. 583-589, 2000.

DASU, M. R.; DEVARAJ, S.; ZHAO, L.; HWANG, D. H.; JIALAL, I. High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes: mechanism of activation. **Diabetes**, v. 57, p. 3090-3098, 2008.

DEFRONZO, R. A.; JACOT, E.; JEQUIER, E.; MAEDER, E.; WAHREN, J.; FELBER, J. P. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. **Diabetes**, v. 30, p. 1000-1007, 1981

DELAMAIRE, M.; MAUGENDRE, D.; MORENO, M.; LE GOFF, M. C.; ALLANNIC, H.; GENETET, B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. **Diabet Med.**, v. 14, p. 29-34, 1997.

DICK, E. P.; PRINCE, L. R.; PRESTWICH, E. C.; RENSHAW, S. A.; WHYTE, M. K.; SABROE, I. Pathways regulating lipopolysaccharide-induced neutrophil survival revealed by lentiviral transduction of primary human neutrophils. **Immunology**, v. 127, p. 249-255, 2009.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, p. 3720-3732, 2011.

DINAUER, M. C.; ORKIN, S. H. Chronic granulomatous disease. **Annu Rev Med.**, v. 43, p. 117-124, 1992.

DUNCAN, B. B.; SCHMIDT, M. I.; PANKOW, J. S.; BALLANTYNE, C. M.; COUPER, D.; VIGO, A., et al. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. **Diabetes**, v. 52, p.1799-1805, 2003.

EASH, K. J.; GREENBAUM, A. M.; GOPALAN, P. K.; LINK, D. C. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. **J Clin Invest.**, v. 120, p. 2423-2431, 2010.

EHSES, J. A.; PERREN, A.; EPPLER, E.; RIBAU, P.; POSPISILIK, J. A.; MAOR-CAHN, R.; GUERPEL, X.; ELLINGSGAARD, H.; SCHNEIDER, M. K.; BIOLLAZ, G.; FONTANA, A.; REINECKE, M.; HOMO-DELARCHE, F.; DONATH, M. Y. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 56, p. 2356-2370, 2007.

FANTONE, J. C.; WARD, P. A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. **Am. J. Pathol.**, v. 107, p. 397-418, 1982.

FEZEU, L.; JULIA, C.; HENEGAR, A.; BITU, J.; HU, F. B.; GROBBEE, D. E.; KENGNE, A. P.; HERCBERG, S.; CZERNICHOV, S. Obesity is associated with higher risk of intensive care unit admission and death in influenza A (H1N1) patients: a systematic review and meta-analysis. **Obes Rev.**, v. 12: 653-659, 2011.

FORTES, Z. B.; FARSKY, S. P.; OLIVEIRA, M. A.; GARCIA-LEME, J. Direct vital microscopic study of defective leukocyte-endothelial interaction in diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 40, p. 1267-1273, 1991.

FRAKER, D. L.; MERINO, M. J.; NORTON, J. A. Reversal of the toxic effects of cachectin by concurrent insulin administration. **Am J Physiol.**, v. 256, p. E725–731, 1989.

FRANC, N. C.; WHITE, K.; EZEKOWITZ, R. A. Phagocytosis and development back to the future. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 11, p. 47-52, 1999.

FRANCHI L.; WARNER, N.; VIANI, K.; NUÑEZ, G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. **Immunol Rev.**, v. 227, p. 106-128, 2009.

FRANK, B. Globalization of Diabetes: The role of diet, lifestyle, and genes. **Diabetes Care**, v. 34, p. 1249–1257, 2011.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem.**, v. 18, p. 499-502, 1972.

GALLACHER, S. J.; THOMSON, G.; FRASER, W. D.; FISHER, B. M.; GEMMELL, C. G.; MACCUISH, A. C. Neutrophil bactericidal function in diabetes mellitus: evidence for association with blood glucose control. **Diabet Med.**, v. 12, p. 916–920, 1995.

GALLAGHER, E. J.; LEROITH, D.; KARNIELI, E. Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome. **Mt Sinai J Med.**, v. 77, p. 511-523, 2010.

GALLI, J.; LI, L. S.; GLASER, A.; OSTENSON, C. G.; JIAO, H.; FAKHRAI-RAD, H.; JACOB, H. J.; LANDER, E. S.; LUTHMAN, H. Genetic analysis of non-insulin dependent diabetes mellitus in the GK rat. **Nat Genet.**, v. 12, p. 31-37, 1996.

GALLI, J.; LI, L. S.; GLASER, A.; OSTENSON, C. G.; JIAO, H.; FAKHRAI-RAD, H.; JACOB, H. J.; LANDER, E. S.; LUTHMAN, H. Genetic analysis of non-insulin dependent diabetes mellitus in the GK rat. **Nat Genet.**, v. 12, p. 31–37, 1996

GAUGUIER, D.; FROGUEL, P.; PARENT, V.; BERNARD, C.; BIHOREAU, M. T.; PORTHA, B.; JAMES, M. R.; PENICAUD, L.; LATHROP, M.; KTORZA, A. Chromosomal mapping of genetic loci associated with non-insulin dependent diabetes in the GK rat. **Nat Genet.**, v. 12, p. 38–43, 1996.

GAUGUIER, D.; FROGUEL, P.; PARENT, V.; BERNARD, C.; BIHOREAU, M. T.; PORTHA, B.; JAMES, M. R.; PENICAUD, L.; LATHROP, M.; KTORZA, A. Chromosomal mapping of genetic loci associated with non-insulin dependent diabetes in the GK rat. **Nat Genet.**, v.12, p. 38-43, 1996.

GEERLINGS, S. E.; HOEPELMAN, A. I. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v. 26, p. 259–265, 1999.

GILES, K. M.; HART, S. P.; HASLLETT, C.; ROSSI, A. G.; DRANSFIELD, I. An appetite for apoptotic cells? Controversies and challenges. **Br. J. Haematol.**, v. 109, p. 1-12, 2000.

GIROIX, M. H.; IRMINGER, J. C.; LACRAZ, G.; NOLL, C.; CALDERARI, S.; EHSES, J. A.; COULAUD, J.; CORNUT, M.; KASSIS, N.; SCHMIDLIN, F.; PAUL, J. L.; KERGOAT, M.; JANEL, N.; HALBAN, P. A.; HOMO-DELARCHE, F. Hypercholesterolaemia, signs of islet microangiopathy and altered angiogenesis precede onset of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki (GK) rat. **Diabetologia**, v. 54, p. 2451–2462, 2011.

GOTO, Y.; KAKIZAKI, M.; MASAKI, N. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. **J. exp. Med.**, v. 119, p. 85-90, 1976.

GREEN CONAWAY, D. L.; ENRIQUEZ, J. R.; BARBERENA, J. E.; et al. Assessment of and physician response to glycemic control in diabetic patients presenting with an acute coronary syndrome. **Am Heart J.**, v. 152, p. 1022-1027, 2006.

GREEN, D. R. Apoptotic pathways: the roads to ruin. **Cell**, v. 94, p. 695-698, 1998.

GROOTJANS, J.; KASER, A.; KAUFMAN, R. J.; BLUMBERG, R. S. The unfolded protein response in immunity and inflammation. **Nat Rev Immunol.**, v. 16, p. 469-84, 2016.

GUMA, M.; RONACHER, L.; LIU-BRYAN, RU.; TAKAI, S.; KARIN, M.; CORR, M. Caspase-1 Independent IL-1 β Activation in Neutrophil Dependent Inflammation. **Arthritis Rheum.**, v. 60, p. 3642–3650, 2009.

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P. Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nature medicine**, v. 21, p. 677-686, 2015.

HACHIYA, O.; TAKEDA, Y.; MIYATA, H.; WATANABE, H.; YAMASHITA, T.; SENDO, F. Inhibition by bacterial lipopolysaccharide of spontaneous and TNF-alpha-induced human neutrophil apoptosis in vitro. **Microbiol Immunol.**, v. 39, p. 715-723, 1995.

HACKER, H.; REDECKE, V.; BLAGOEV, B.; KRATCHMAROVA, I.; HSU, L. C.; WANG, G. G.; KAMPS, M. P.; RAZ, E.; WAGNER, H.; HACKER, G.; et al. Specificity in Tolllike receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. **Nature**, v. 439, p. 204–207, 2006.

HARDING, H. P.; ZHANG, Y.; RON, D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmatic-reticulum-resident kinase. **Nature**, v. 397, p. 271-274, 1999.

HAYASHI, F.; MEANS, T. K.; LUSTER, A. D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. **Blood**, v. 102, p. 2660-2669, 2003.

HETZ, C.; GLIMCHER, L. The daily job of night killers: alternative roles of the BCL-2 family in organelle physiology. **Trends Cell Biol.**, v. 18, p. 38-44, 2008.

HIRABARA, S. M.; FOLADOR, A.; FIAMONCINI, J.; LAMBERTUCCI, R. H.; RODRIGUES, C. F. JR.; ROCHA, M. S.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R. K.; MARTINS, A. R.; RODRIGUES, A. C.; CARPINELLI, A. R.; PITHON-CURI, T. C.; FERNANDES, L. C.; GORJÃO, R.; CURI, R. 2013. Fish oil supplementation for two generations increases insulin sensitivity in rats. **J Nutr Biochem.**, v. 6, p. 1136-1145, 2013.

HIRABARA, S. M.; SILVEIRA, L. R.; ALBERICI, L. C.; LEANDRO, C. V.; LAMBERTUCCI, R. H.; POLIMENO, G. C.; CURY BOAVENTURA, M. F.; PROCOPIO, J.; VERCESI, A. E.; CURI, R. Acute effect of fatty acids on metabolism and mitochondrial coupling in skeletal muscle. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1757, p. 57-66, 2006.

HOEBE, K.; DU, X.; GEORGEL, P.; JANSSEN, E.; TABETA, K.; KIM, S. O.; et al. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. **Nature**, v. 8, p. 424-743, 2003.

HOTAMISLIGIL, G. S.; ARNER, P.; CARO, J. F.; ATKINSON, R. L.; SPIEGELMAN, B. M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **J Clin Invest.**, v. 95, p. 2409-2415, 1995.

HURST, S. M.; WILKINSON, T. S.; MCLOUGHLIN, R. M.; JONES, S.; HORIUCHI, S.; YAMAMOTO, N.; ROSE-JOHN, S.; FULLER, G. M.; TOPLEY, N.; JONES, S. A. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. **Immunity**, v. 14, p. 705-714, 2001.

IMGALLS, R. R.; ARNAOUT, M. A.; DELUDE, R. L.; FLAHERTY, S.; SAVEDRA, R.; JR. GOLENBOCK, D. T. The CD11/CD18 integrins : characterization of three novel LPS signaling receptors. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 397, p. 107-117, 1998.

JIANG, M.; ZHANG, Y. ; LIU, M.; LAN, M. S. ; FEI, J. ; FAN, W. ; GAO, X. ; et al. Hypermethylation of hepatic glucokinase and L-type pyruvate kinase promoters in high-fat diet-induced obese rats. **Endocrinol.** v. 152, p. 1284-1289, 2011.

JONES, S. A. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. **J. Immunol.**, v. 175, p. 3463-3468, 2005.

JUNG, U.; NORMAN, K. E.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K.; BEAUDET, A. L.; LEY, K. Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine- induced inflammatory cell recruitment in vivo. **J Clin Invest.**, v. 102, p. 1526-1533, 1998.

KAHN, J.; WALCHECK, B.; MIGAKI, G. I.; JUTILA, M. A.; KISHIMOTO, T. K. Calmodulin regulates L-selectin adhesion molecule expression and function through a protease-dependent mechanism. **Cell**, v. 92, p. 809-818, 1998.

KAPLAN, M. J. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. **Nat Rev Rheumatol.**, v. 7, p. 691-699, 2011.

KARPE, F.; DICKMANN, J. R.; FRAYN, K. N. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. **Diabetes**, v. 60, p. 2441-2449, 2011.

KAWAGOE, T.; SATO, S.; MATSUSHITA, K.; KATO, H.; MATSUI, K.; KUMAGAI, Y.; SAITOH, T.; KAWAI, T.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Sequential control of Tolllike receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. **Nat. Immunol.**, v. 9, p. 684-691, 2008.

KELLER, M. P.; ATTIE, A. D. Physiological insights gained from gene expression analysis in obesity and diabetes. **Annu Rev Nutr.**, v. 30, p. 341-364, 2010.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer.**, v. 26, p. 239-571, 1972.

KIM, J.; JANG, H. J.; HWANG, D. H. Toll-like receptor 4-induced endoplasmic reticulum stress contributes to impairment of vasodilator action of insulin. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism Published**, v.9, p. 767-776, 2015.

KING, A. G.; HOROWITZ, D.; DILLON, S. B.; LEVIN, R.; FARESE, A. M.; MAC-VITTIE, T. J.; PELUS, L. M. Rapid mobilization of murine hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties and evaluation of hematopoietic progenitor cell mobilization in rhesus monkeys by a single injection of SB-251353, a specific truncated form of the human CXC chemokine GRObeta. **Blood**, v. 97, p. 1534–1542, 2001.

KIRWAN, J. P.; KRISHNAN, R. K.; WEAVER, J. A.; DEL AGUILA, L. F.; EVANS, W. J. Human aging is associated with altered TNF-alpha production during hyperglycemia and hyperinsulinemia. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 281, p. 1137–1143, 2001.

KITAHARA, A.; TOYOTA, T.; KAKIZAKI, M.; GOTO, Y. Activities of hepatic enzymes in spontaneous diabetes rats produced by selective breeding of normal Wistar rats. **Tohoku J. Exp. Med.**, v. 126, p. 7–11, 1978.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J Leukoc Biol.**, v. 77, p. 598-625, 2005.

KNEPPER-NICOLAI, B.; SAVILL, J.; BROWN, S. B. Constitutive apoptosis in human neutrophils requires synergy between calpains and the proteasome downstream of caspases. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 30530-30536, 1998.

KNOL, M. J.; TWISK, J. W.; BEEKMAN, A. T.; HEINE, R. J.; SNOEK, F. J.; POUWER, F. Depression as a risk factor for the onset of type 2 diabetes mellitus. A meta-analysis. **Diabetologia**, v. 49, p. 837–845, 2006.

KOLB, H.; MANDRUP-POULSEN, T. The global diabetes epidemic as a consequence of lifestyle-induced low-grade inflammation. **Diabetologia**, v. 53, p. 10–20, 2010.

KOMURA, T.; SAKAI, Y.; HONDA, M.; TAKAMURA, T.; WADA, T.; KANEKO S. ER stress induced impaired TLR signaling and macrophage differentiation of human monocytes. **Cell Immunol.**, v. 282, p. 44-52, 2013.

KOZICZAK-HOLBRO, M.; GLUCK, A.; TSCHOPP, C.; MATHISON, J. C.; GRAM, H. IRAK-4 kinase activity-dependent and -independent regulation of lipopolysaccharide-inducible genes. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, p. 788-796 , 1998.

KUTTER, D. Prevalence of myeloperoxidase deficiency: population studies using Bayer-Technicon automated hematology. **J Mol Med.**, v. 76, p. 669-675.

KUWABARA, W. M.; CURI, R.; ALBA-LOUREIRO, T. C. Autophagy Is Impaired in Neutrophils from Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Front Immunol.**, v. 20, p. 8-24.

LACASA, D.; TALEB, S.; KEOPHIPHATH, M.; MIRANVILLE, A.; CLEMENT, K. Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. **Endocrinology**, v. 148, p. 868-877, 2007.

LACY, P. Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 2, p. 98- 103, 2006.

LANSANG, M. C.; UMPIERREZ, G. E. Management of Inpatient Hyperglycemia in Noncritically Ill Patients. **Diabetes Spectrum**, v. 21, p. 248-255, 2008.

LATERVEER, L.; LINDLEY, I. J.; HAMILTON, M. S.; WILLEMZE, R.; FIBBE, W. E. Interleukin 8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability. **Blood**, v. 85, p. 2269–2275, 1995.

LATHAM, R.; LANCASTER, A. D.; COVINGTON, J. F.; PIROLO, J. S.; THOMAS, C. S. J. R. The association of diabetes and glucose control with surgical-site infections among cardiothoracic surgery patients. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 22, p. 607-612, 2001.

LEFORT, C. T.; LEY, K. Neutrophil arrest by LFA-1 activation. **Front Immunol.**, v. 3, p. 157- 163, 2012.

LEHRER, R. I.; CLINE, M. J. Leukocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis—role of myeloperoxidase in resistance to *Candida* infection. **J Clin Invest.**, v. 48, p. 1478-1488, 1969.

LEITE, S. A.; LOCATELLI, S. B.; NIECE, S. P.; OLIVEIRA, A. R.; TOCKUS, D.; TOSIN, T. Impact of hyperglycemia on morbidity and mortality, length of hospitalization and rates of re-hospitalization in a general hospital setting in Brazil. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 2, p. 49, 2010.

LI, P.; ALLEN, H.; BANERJEE, S.; et al. Mice deficient in IL-1 betaconverting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. **Cell**, v. 80, p. 401–411, 1995.

LI, Z. Z.; BERK, M.; MCINTYRE, T. M.; FELDSTEIN, A. E. Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease role of stearoyl-CoA desaturase. **J Biol Chem.**, v. 284, p. 5637–5647, 2009.

LIDA, K. T.; SHIMANO, H.; KAWAKAMI, Y.; SONE, H.; TOYOSHIMA, H.; SUZUKI, S.; et al. Insulin up-regulates tumor necrosis factor-alpha production in macrophages through an extracellular-regulated kinase-dependent pathway. **J Biol Chem.**, v. 276, p. 32531–32537, 2001.

LISBONA, F.; ROJAS-RIVEIRA, D.; THIELEN, P.; ZAMORANO, S.; TODD, D.; MARTINON, F.; GLAVIC, A.; KRESS, C.; LIN, J. H.; WALTER, P.; REED, J. C.; GLIMCHER, L. H.; HETZ, C. BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1alpha. **Mol Cell.**, v. 33, p. 679-425, 2009.

LIU, T. W.; HEDEN, T. D.; MATTHEW MORRIS, E.; FRITSCHKE, K. L.; VIEIRA-POTTER, V. J.; THYFAULT, J. P. High-Fat Diet Alters Serum Fatty Acid Profiles in Obesity Prone Rats: **Implications for In Vitro Studies Lipids**, v. 50, p. 997-1008, 2015.

LIU, Z.; MINER, J. J.; YAGO, T.; YAO, L.; LUPU, F.; XIA, L.; MCEVER, R. P. Differential regulation of human and murine P-selectin expression and function in vivo. **J Exp Med.**, v. 207, p. 2975–2987, 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LLOYD, A. R.; OPPENHEIM, J. J. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. **Immunol Today.**, v. 13, p. 169-172, 1992.

LU, P. D.; HARDING, H. P.; RON, D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. **J Cell Biol.**, v. 167, p. 27-33, 2004.

LUCHI, M.; MUNFORD, R. S. Binding, internalization and deacylation of bacterial lipopolysaccharide by human neutrophils. **J. Immunol.**, v. 151, p. 959-969, 1993.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Métodos quantitativos em morfologia. Rio de Janeiro: Ed UDUERJ, 1995.

MANKAN, A. K.; DAU, T.; JENNE, D.; HORNING, V. The NLRP3/ASC/Caspase-1 axis regulates IL-1 β processing in neutrophils. **Eur J Immunol.**, v. 42, p. 710-715, 2012.

MARHOFFER, W.; STEIN, M.; MAESER, E.; FEDERLIN, K. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. **Diabetes Care**, v. 15, p. 256–260, 1992.

MARKERT, M.; CECH, P.; FREI, J. Oxygen metabolism of phagocytosing human polymorphonuclear leukocytes in diabetes mellitus. **Blut.**, v. 49, p. 447-455, 1984.

MARTINON, F.; CHEN, X.; LEE, A. H.; GLIMCHER, L. H. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. **Nat Immunol.**, v. 11, p. 411-418, 2010.

MARTINS, J. O.; FERRACINI, M.; ANGER, D. B.; MARTINS, D. O.; RIBEIRO, L. F. JR; SANNOMIYA, P.; JANCAR, S. Signaling pathways and mediators in LPS-induced lung inflammation in diabetic rats: role of insulin. **Shock**, v. 33, p. 76-82, 2010.

MARTINS, J. O.; MEYER-PFLUG, A. R.; ALBA-LOUREIRO, T. C.; MELBOSTAD, H.; MIRANDA, W.; COIMBRA, R.; CURI, R.; et al. Modulation of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation: role of insulin. **Pharmacia**, v. 25, p. 260–266, 2006.

MARTINS, J. O.; ZANONI, F. L.; MARTINS, D. O.; COIMBRA, R.; KRIEGER, J. E.; JANCAR, S.; SANNOMIYA, P. Insulin regulates cytokines and intercellular adhesion

molecule-1 gene expression through nuclear factor-kappaB activation in LPS-induced acute lung injury in rats. **Shock**, v. 31, p. 404–409, 2009.

MARUCHA, P. T.; ZEFF, R. A.; KREUTZER, D. L. Cytokine regulation of IL-1 beta gene expression in the human polymorphonuclear leukocyte. **J Immunol.**, v. 145, p. 2932-2937, 1990.

MASSON, G. S.; NAIR, A. R.; DANGE, R. B.; SILVA-SOARES, P. P.; MICHELINI, L.; FRANCI, J. Toll-Like Receptor 4 Promotes Autonomic Dysfunction, Inflammation and Microglia Activation in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus: Role of Endoplasmic Reticulum Stress. **PLoS One**, v. 10, e0122850, 2015.

MATHISON, J. C.; TOBIAS, P. S.; WOLFSON, E.; ULEVITCH, R. J. Plasma lipopolysaccharide(LPS)-binding protein. A key component in macrophage recognition of gram-negative bacteria. **J. Immunol.**, v. 149, p. 200-206, 1992.

MCLOUGHLIN, R. M.; WITOWSKI, J.; ROBSON, R. L.; WILKINSON, T. S.; HURST, S. M.; WILLIAMS, A. S.; WILLIAMS, J. D.; ROSE-JOHN, S.; JONES, S. A.; TOPLEY, N. Interplay between IFN- γ and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation. **J. Clin. Invest.**, v. 112: 598-607, 2003.

MERTZ, D.; KIM, T. H.; JOHNSTONE, J.; LAM, P. P.; SCIENCE, M.; KUSTER, S. P.; FADEL, S. A.; TRAN, D.; FERNANDEZ, E.; BHATNAGAR, N.; LOEB, M. Populations at risk for severe or complicated influenza illness: systematic review and meta-analysis. **Bmj.**, v. 347, p. f5061, 2013.

MIRALLES F, PORTHA B. 2001. Early development of beta-cells is impaired in the GK rat model of type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 50, p. S84–88, 2001.

MOHANTY, P.; HAMOUDA, W.; GARG, R.; ALJADA, A.; GHANIM, H.; DANDONA, P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 85, p. 2970–2973, 2000.

MORAES, R. C.; BLONDET, A.; BIRKENKAMP-DEMTROEDER, K.; TIRARD, J.; ORNTOFT, T. F.; GERTLER, A.; DURAND, P.; NAVILLE, D.; BÉGEOT, M. Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. **Endocrinology**, v. 144, p. 4773-4782, 2003.

MOVASSAT, J.; CALDERARI, S.; FERNÁNDEZ, E.; MARTÍN, M. A.; ESCRIVÁ, F.; PLACHOT, C.; GANGNERAU, M. N.; SERRADAS, P.; ALVAREZ, C.; PORTHA, B. Type 2 diabetes—a matter of failing beta-cell neogenesis? Clues from the GK rat model. **Diabetes Obes Metab.**, v. 9, p. 187–195, 2007.

MOWAT, A. G.; BAUM, J. Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, v. 284, p. 621-627, 1971.

MUDD, J.; MCCUTCHEON, M.; LUCKE, B. Phagocytosis. **Physiol. Rev.** v. 14, p. 210, 1934.

MUZIO, M.; POLENTARUTTI, N.; BOSISIO, D.; MANOJ KUMAR, P. P.; MANTOVANI, A. Toll-like receptor family and signalling pathway. **Biochem Soc Trans.**, v. 28, p. 563-566, 2000.

MYSLIWSKA, J.; ZORENA, K.; BAKOWSKA, A.; SKURATOWICZ-KUBICA, A.; MYSLIWSKI, A. Significance of tumor necrosis factor alpha in patients with long-standing Type-I diabetes mellitus. **Horm Metab Res.**, v. 30, p. 158–161, 1998.

NAUSEEF, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. **Immunol Rev.**, v. 219, p. 88-102.

NÉMETH, T.; MÓCSAI, A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. **Immunol Lett.**, v. 143, p. 9-19, 2012.

NIELSEN, C. P.; HINDSON, D. A. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte respiratory burst by elevated glucose concentrations in vitro. **Diabetes**, v. 38, p. 1031-1035, 1989.

NISHAN, S.; KALUPAHANA, T.; KATE, J. Claycombe and Naima Moustaid-Moussa. (n-3) Fatty Acids Alleviate Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance: Mechanistic Insights. **American Society for Nutrition. Adv. Nutr.**, v. 2, p. 304–316, 2011

NOLAN, C. N.; BEATY, H. N.; BAGDADE, J. D. Further characterization of the impaired bactericidal function of granulocytes in patients with poorly controlled diabetes. **Diabetes**, v. 27, p. 889-894, 1978.

O'NEILL, L. A. J.; GOLENBOCK, D; BOWIE, A. G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. **Nature Reviews Immunology.**, v. 13, p. 453–460, 2013.

OGANESYAN, G.; SAHA, S. K.; GUO, B.; HE, J. Q.; SHAHANGIAN, A.; ZARNEGAR, B.; PERRY, A.; CHENG, G. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. **Nature**, v. 439, p. 208–211, 2006.

OHIRA, T.; BANNENBERG, G.; ARITA, M.; TAKAHASHI, M.; GE, Q.; VAN DYKE, T. E.; STAHL, G. L.; SERHAN, C. N.; BADWEY, J. A. A stable aspirin- triggered lipoxin A4 analog blocks phosphorylation of leukocyte-specific protein 1 in human neutrophils. **J. Immunol.**, v. 173, p. 2091–2098, 2004.

OLDENBORG, P. A.; SUNDQVIST, I. M.; SEHLIN, J. Different effects of glucose on extracellular and intracellular respiratory burst response in normal human neutrophils activated with the soluble agonist fMet-Leu-Phe. **Diabet Med.**, v. 17, p. 532–537, 2000.

OMORI, K.; NARUISHI, K.; NISHIMURA, F.; YAMADA-NARUISHI, H.; TAKASHIBA, S. High glucose enhances interleukin-6-induced vascular endothelial growth factor 165 expression via activation of gp130-mediated p44/42 MAPK-CCAAT/enhancer binding protein signaling in gingival fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 6643–6649, 2004.

OPDENAKKER, G.; FIBBE, W. E.; VAN DAMME, J. The molecular basis of leukocytosis. **Immunol Today.**, v. 19, p. 182–189, 1998.

- ORLINSKA, U.; NEWTON, R. C. Role of glucose in interleukin-1 beta production by lipopolysaccharide-activated human monocytes. **J Cell Physiol.** v. 157, p. 201–208, 1993.
- ORTMEYER, J.; MOHSENIN, V. Inhibition of phospholipase D and superoxide generation by glucose in diabetic neutrophils. **Life Sci.**, v. 59, p. 255–262, 1996.
- OSTENSON, C. G.; KHAN, A.; ABDEL-HALIM, S. M.; GUENIFI, A.; SUZUKI, K.; GOTO, Y.; EFENDIC, S. Abnormal insulin secretion and glucose metabolism in pancreatic islets from the spontaneously diabetic GK rat. **Diabetologia**, v. 36, p. 3–8, 1993.
- OUCHI, N.; PARKER, J. L.; LUGUS, J. J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol.**, v. 11, p. 85–97, 2011.
- PAAPE, M. J.; SHAFER-WEAVER, K.; CAPUCO, A.V.; VAN OOSTVELDT, K.; BURVENICH, C. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 480, p. 259-277, 2000.
- PADILLA, D. J.; MCDONOUGH, P.; BEHNKE, B. J.; KANO, Y.; HAGEMAN, K. S.; MUSCH, T. I. POOLE, D. C. Effects of type II diabetes on muscle microvascular oxygen pressures. **Respir Physiol Neurobiol.**, v. 156, p. 187–195, 2007.
- PAN, M.; SONG, Y. L.; XU, J. M.; GAN, H. Z. Melatonin ameliorates nonalcoholic fatty liver induced by high-fat diet in rats. **J Pineal Res.**, v. 41, p. 79-84, 2006.
- PARRY, M. F.; ROOT, R. K.; METCALF, J. A.; DELANEY K, K.; KAPLOW, L. S.; RICHAR, W. J.; Myeloperoxidase deficiency—prevalence and clinical significance. **Ann Intern Med.**, v. 95, p. 293-301, 1981.
- PATON, C, M.; NTAMBI, J. M. Biochemical and physiological function of stearyl-CoA desaturase. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 297, p. E28-37, 2009.
- PEREIRA, M. A. A.; SANNOMIYA, P.; GARCIA-LEME, J. Inhibition of leukocyte chemotaxis by factor in alloxan-induced diabetic rat plasma. **Diabetes**, v. 36, p. 1307-1314, 1987.
- PERNER, A.; NIELSEN, S. E.; RASK-MADSEN, J. High glucose impairs superoxide production from isolated blood neutrophils. **Intensive Care Med.**, v. 29, p. 642–645, 2003.
- PETRIDES, P. E. Molecular genetics of peroxidase deficiency. **J Mol Med.**, v. 76, p. 688-698, 1998.
- PETTERSSON, U. S.; CHRISTOFFERSSON, G.; MASSENA, S.; AHL, D.; JANSSON, L.; HENRIKSNÄS, J.; PHILLIPSON, M. Increased recruitment but impaired function of leukocytes during inflammation in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. **PLoS One**, v. 6, e22480, 2011.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, e 45, 2001.

PHUNG, D. T.; WANG, Z.; RUTHERFORD, S.; HUANG, C.; CHU C. Body mass index and risk of pneumonia: a systematic review and meta-analysis. **Obes Rev.**, v. 14, p. 839-857, 2013.

PICAREL-BLANCHOT, F.; BERTHELIER, C.; BAILBÉ, D.; PORTHA, B. Impaired insulin secretion and excessive hepatic glucose production are both early events in the diabetic GK rat. **Am J Physiol.**, v. 271, p. E755–E762, 1996.

PICKUP, J. C.; CROOK, M. A. Is Type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? **Diabetologia**, v. 41, p. 1241–1248, 1998.

PIERRE, N.; DELDICQUE, L.; BARBE, C.; NASLAIN, D.; CANI, P. D.; FRANCAUX, M. Toll-like receptor 4 knockout mice are protected against endoplasmic reticulum stress induced by a high-fat diet. **PLoS One**, v. 8, p. 650-661, 2013.

PLACHOT, C.; MOVASSAT, J.; PORTHA B. Impaired beta-cell regeneration after partial pancreatectomy in the adult Goto-Kakizaki rat, a spontaneous model of type 2 diabetes. **Histochem Cell Biol.**, v. 116, p. 131–139, 2001.

POMPOSELLI, J. J.; BAXTER J. K.; BABINEAU, T. J.; POMFRET, E. A.; DRISCOLL, D. F.; FORSE, R. A.; BISTRIAN, B. R. Early postoperative glucose control predicts nosocomial infection rate in diabetic patients. **J Parenter Enteral Nutr.**, v. 22, p. 77-81, 1998.

PORTHA, B.; LACRAZ, G.; KERGOAT, M.; HOMO-DELARCHE, F.; GIROIX, M. H.; BAILBÉ, D.; GANGNERAU, M. N.; DOLZ, M.; TOURREL-CUZIN, C.; MOVASSAT, J. The GK rat beta-cell: a prototype for the diseased human beta-cell in type 2 diabetes? **Mol Cell Endocrinol.**, v. 297, p. 73–85, 2009.

PORTHA, B.; SERRADAS, P.; BAILBE, D.; SUZUKI, K.; GOTO, Y.; GIROIX, M. H. Beta-cell insensitivity to glucose in the GK rat, a spontaneous nonobese model for type II diabetes. **Diabetes**, v. 40, p. 486–491, 1991.

PRINCE, L. R.; WHYTE, M. K.; SABROE, I.; PARKER, L. C. The role of TLRs in neutrophil activation. **Curr Opin Pharmacol.**, v. 11, p. 397-403, 2011.

RAYFIELD, E. J.; AULT, M. J.; KEUSCH, G. T.; BROTHERS, M. J.; NECHEMIAS, C.; SMITH, H. Infection and diabetes: the case for glucose control. **Am. J. Med.**, v. 72, p. 439-450, 1982.

REN, Y.; SAVILL, J. Proinflammatory cytokines potentiate thrombospondin-mediated phagocytosis of neutrophils undergoing apoptosis. **J. Immunol.**, v. 154, p. 2366-2374, 1995.

REPINE, J. E.; CLAWSON, C. C.; GOETZ, F. C. Bactericidal function of neutrophils from patients with acute bacterial infections and from diabetics. **J. Infect. Dis.**, v. 142, p. 869-875, 1980.

RIETSCHEL, E. T.; KIRIKAE, T.; SCHADE, U. F.; MAMAT, U.; SCHMIDT, G.; LOPPNOW, H.; ULMER, A. J.; ZHRINGER, U.; SEYDEL, U.; DI PADOVA, J.; SCHREIER, M.; BRADE, H. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **FASEB J.**, v. 8, p. 217-225, 1994.

ROSENGREN, A. H.; JOKUBKA, R.; TOJJAR, D.; GRANHALL, C.; HANSSON, O.; LI, D. Q.; NAGARAJ, V.; REINBOTHE, T. M.; TUNCEL, J.; ELIASSON, L.; GROOP, L.; RORSMAN, P.; SALEHI, A.; LYSSSENKO, V.; LUTHMAN, H.; RENSTROM, E. Overexpression of alpha2A-adrenergic receptors contributes to type 2 diabetes. **Science**, v. 327, p. 217–220, 2009.

ROSSI, F.; ZATTI, M. Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. **Experientia**, v. 20, p. 21-23, 1964.

SABROE, I.; JONES, E. C.; USHER, L. R.; WHYTE, M. K.; DOWER, S. K. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. **J Immunol**, v. 168, p. 4701-4710, 2002.

SAGONE, A. L.; GREENWALD, J.; KRAUT, E. H.; BIANCHINE, J.; SINGH D. Glucose: a role as a free radical scavenger in biological systems. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 101, p. 97-104, 1983.

SANNOMIYA, P.; OLIVEIRA, M. A.; FORTES, Z. B. Aminoguanidine and the prevention of leukocyte dysfunction in diabetes mellitus: a direct vital microscopic study. **Br. J. Pharmacol.**, v. 122, p. 894-898, 1997.

SANNOMIYA, P.; PEREIRA, M. A. A.; GARCIA-LEME, J. Inhibition of leukocyte chemotaxis by serum factor in diabetes mellitus: selective depression of cell responses mediated by complement-derived chemoattractants. **Agents and Actions**, v. 30, p. 369-376, 1990.

SATOMI, N.; SAKURAI, A.; HARANAKA, K. Relationship of hypoglycemia to tumor necrosis factor production and antitumor activity: role of glucose, insulin, and macrophages. **J Natl Cancer Inst.**, v. 74, p. 1255–1260, 1985.

SCHRODER, M.; KAUFMAN, R. J. The mammalian unfolded protein response. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 74, p. 739–789, 2005.

SHAW, B. R.; HUX, J. E. Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, p. 510-513, 2003.

SHI, H.; KOKOEVA, M. V.; INOUE, K.; TZAMELI, I.; YIN, H.; FLIER, J. S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 116, p. 3015-3025, 2006.

SHIMIZU, Y.; HENDERSHOT, L. M. Oxidative folding: cellular strategies for dealing with the resultant equimolar production of reactive oxygen species. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, p. 2317-31, 2009.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 116, p. 1793-1801, 2006.

SINITSKAYA, N.; GOURMELEN, S.; SCHUSTER-KLEIN, C.; GUARDIOLA-LEMAITRE, B.; PÉVET, P.; CHALLET, E. Increasing the fat-to-carbohydrate ratio in a high-fat diet prevents the development of obesity but not a prediabetic state in rats. **Clin Sci (Lond)**, v. 113, p. 417-425, 2007.

SOMMER T, JAROSCH E. BiP binding keeps ATF6 at bay. **Dev Cell**, v. 3, p. 1-2, 2002.

SURWIT, R. S.; KUHN, C. M.; COCHRANE, C.; MCCUBBIN, J. A.; FEINGLOS, M. N. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. **Diabetes**, v. 37, p. 1163-1167, 1988.

SUZUKI, N.; AIZAWA, T.; ASANUMA, N.; SATO, Y.; KOMATSU, M.; HIDAKA, H.; ITOH, N.; YAMAUCHI, K.; HASHIZUME, K. An early insulin intervention accelerates pancreatic beta-cell dysfunction in young Goto-Kakizaki rats, a model of naturally occurring noninsulin-dependent diabetes. **Endocrinol.**, v. 138, p. 1106–1110, 1997.

TAKAHASHI, K.; KAWAI, T.; KUMAR, H.; SATO, S.; YONEHARA, S.; AKIRA, S. Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. **J. Immunol.**, v. 176, p. 4520–4524, 2006.

TAKANO, K.; NAKAGAWA, H. Contribution of cytokine-induced neutrophil chemoattractant CINC-2 and CINC-3 to neutrophil recruitment in lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. **Inflamm Res.**, v. 50, p. 503-508, 2011.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, p. 805-820, 2010.

TAN, J. S.; ANDERSON, J. L.; WATANAKUNAKORN, C.; PHAIR, J. P. Neutrophil dysfunction in diabetes mellitus. **Clin. Experim.**, v. 85, p. 26-33, 1975.

TASALI, E.; LEPROULT, R.; SPIEGEL, K. Reduced sleep duration or quality: relationships with insulin resistance and type 2 diabetes. **Prog Cardiovasc Dis.**, v. 51, p. 381–391, 2009.

TATER, D.; TEPAUT, B.; BERCOVICI, J. P.; YOUINO, P. Polymorphonuclear cell derangements in Type I diabetes. **Horm Metab Res.**, v. 19, p. 642–647, 1987.

TOBIAS, P. S.; SOLDAU, K.; ULEVITCH, R. J. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 10867-10871, 1989.

TOBIAS, P. S.; SOLDAU, K.; ULEVITCH, R. J. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. **J. Exp. Med.**, v. 164, p. 777-793, 1986.

TODD, D. J.; LEE, A-H.; GLIMCHER, L. H. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. **Nat Rev Immunol.**, v. 8, p. 663-674, 2008.

TONNESEN, M. G. Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium. **J Invest Dermatol.**, v. 93, p. 53-58, 1989.

TRIASOPHON, W.; WELIHINDA, A. A.; KAUFMAN, R. J. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. **Genes Dev.**, v. 12, p. 1812-1824, 1998.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Bcl-2: Life-or-death switch. **FEBS Lett.**, v. 466, p. 6-10, 2000.

UBAGS, N. D. J.; BURG, E.; ANTKOWIAK, M.; WALLACE, A. M.; DILLI, E.; BEMENT, J.; WARGO, M. J.; POYNTER, M. E.; WOUTERS, E. F. M.; SURATT, B. T. A comparative study of lung host defense in murine obesity models: insights into neutrophil function. **The American Thoracic Society**, In Press, 2016.

UMPIERREZ GE, ISAACS SD, BAZARGAN N, YOU X, THALER LM, KITABCHI AE. Hyperglycemia: An Independent Marker of In-Hospital Mortality in Patients with Undiagnosed Diabetes. **J. Clin. Endocrinol & Metab.**, v. 87, p. 978-982, 2002.

URANO, F.; WANG, X.; BERTOLLI, A.; ZHANG, Y.; CHUNG, P.; HARDING, H. P.; RON, D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase 1 IRE1. **Science**, v. 287, p. 664-666, 2000.

VANHOLDER, R.; HSU, C.; RINGOIR, S. Biochemical definition of the uremic syndrome and possible therapeutic implications. **Artif. Organs.**, v. 17, p. 234-239, 1993.

VANHOLDER, R.; VAN BIESEN, W.; RINGOIR, S. Contributing factors to the inhibition of phagocytosis in hemodialyzed patients. **Kidney Int.**, v. 44, p. 208-214, 1993b.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J. Immunol. Methods.**, v. 184, p. 39-51, 1995.

VESTWEBER, D.; BLANKS, J. E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. **Physiol Rev.**, v. 79, p. 181-213, 1999.

VOZAROVA, B.; WEYER, C.; LINDSAY, R. S.; PRATLEY, R. E.; BOGARDUS, C.; TATARANNI, P. A. High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. **Diabetes**, v.51, p. 455-61, 2002.

WALRAND, S.; GUILLET, C.; BOIRIE, Y.; VASSON, M. In vivo evidences that insulin regulates human polymorphonuclear neutrophil functions. **J. Leukoc. Biol.**, v. 76, p. 1104-1110, 2004.

WANG, X. Z.; HARDIG, H. P.; ZHANG, Y., JOLICOUER, E. M.; KURODA, M.; RON D. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. **Embo J.**, v. 17, p. 5708-5717, 1998.

WARD, P. A. Leukotaxis and leukotactic disorders. **Am. J. Pathol.**, v. 77, p. 520-538, 1974.

WERNSTEDT ASTERHOLM, I.; TAO, C.; MORLEY, T. S.; WANG, Q. A.; DELGADO-LOPEZ, F.; WANG, Z. V.; SCHERER, P. E. Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. **Cell Metab.**, v. 20, p. 103-118, 2014.

WEST, D. B.; BOOZER, C. N.; MOODY, D. L.; ATKINSON, R. L. Dietary obesity in nine inbred mouse strains. **The American journal of physiology**, v. 262, p. 1025-1032, 1992.

WIERUSZ-WYSOCKA, B.; WYSOCKI, H.; WYKRETOWICZ, A.; KLIMAS, R. The influence of increasing glucose concentrations on selected functions of polymorphonuclear neutrophils. **Acta Diabetol Lat.**, v. 25, p. 283–288, 1988.

WIERUSZ-WYSOCKA, B.; WYSOCKI, H.; WYKRETOWICZ, A.; SZCZEPANIK, A.; SIEKIERKA, H. Phagocytosis, bactericidal capacity, and superoxide anion (O₂⁻) production by polymorphonuclear neutrophils from patients with diabetes mellitus. **Folia Haematol.**, v. 112, p. 658-668, 1985.

WILLI, C.; BODENMANN, P.; GHALI, W. A.; FARIS, P. D.; CORNUZ, J. Active smoking and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **JAMA**, v. 298, p. 2654–2664, 2007.

WILSON, R. M.; REEVES, W. G. Neutrophil phagocytosis and killing in insulin-dependent diabetes. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 63, p. 478-484, 1986.

WITKO-SARSAT, V.; REUTER, N.; MOUTHON, L. Interaction of proteinase 3 with its associated partners: implications in the pathogenesis of Wegener's granulomatosis. **Curr Opin Rheumatol.**, v. 22, p. 1-7, 2010.

WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P. & HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab. Invest.**, v. 80, p. 617-653, 2000.

WOLFE, R. R. Effects of insulin on muscle tissue. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.**, v. 3(1), p. 67-71, 2000.

WONGCHITRAT, P.; KLOSEN, P.; PANNENGPETCH, S.; KITIDEE, K.; GOVITRAPONG, P.; ISARANKURA-NA-AYUDHYA, C. High-fat diet-induced plasma protein and liver changes in obese rats can be attenuated by melatonin supplementation. **Nutr Res.**, v. 42, p. 51-63, 2017.

WOO, C. W.; CUI, D.; ARELLANO, J.; DORWEILER, B.; HARDING, H.; FITZGERALD, K. A.; RON, D.; TABAS, I. Adaptive suppression of the ATF4-CHOP branch of the unfolded protein response by toll-like receptor signalling. **Nat Cell Biol.**, v. 1, p. 1473-1480, 2009.

XIA, Z. P.; SUN, L.; CHEN, X.; PINEDA, G.; JIANG, X.; ADHIKARI, A.; ZENG, W.; CHEN, Z. J. Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. **Nature**, v. 461, p. 114–119, 2009.

XING, Z.; GAULDIE, J.; COX, G.; BAUMANN, H.; JORDANA, M.; LEI, X. F.; M. K. ACHONG, M. K. IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 311-320, 1998.

XUE, B.; NIE, J.; WANG, X.; DUBOIS, D. C.; JUSKO, W. J.; ALMON R. R. Effects of High Fat Feeding on Adipose Tissue Gene Expression in Diabetic Goto-Kakizaki Rats. **Gene Regul Syst Bio.**, v. 9, p. 15-26, 2015.

XUE, B.; SUKUMARAN, S.; NIE, J.; JUSKO, W. J.; DUBOIS, D. C., ALMON, R. R. Adipose tissue deficiency and chronic inflammation in diabetic Goto-Kakizaki rats. **PLoS One**, v. 25 p. 6-12, 2011.

XUE, B.; SUKUMARAN, S.; NIE, J.; JUSKO, W. J.; DUBOIS, D. C.; ALMON, R. R. Adipose tissue deficiency and chronic inflammation in diabetic Goto-Kakizaki rats. **PLoS One**, v. 6, p. e17386, 2011.

YAGIHASHI, S.; GOTO, Y.; KAKIZAKI, M.; KASEDA, N. Thickening of glomerular basement membrane in spontaneously diabetic rats. **Diabetologia**, v. 15, p. 309–312, 1978.

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**, v. 3, p. 301:640, 2003.

YAO, L.; SETIADI, H.; XIA, L.; LASZIK, Z.; TAYLOR, F. B.; MCEVER, R. P. Divergent inducible expression of P-selectin and E-selectin in mice and primates. **Blood**, v. 94, p. 3820–3828, 1990.

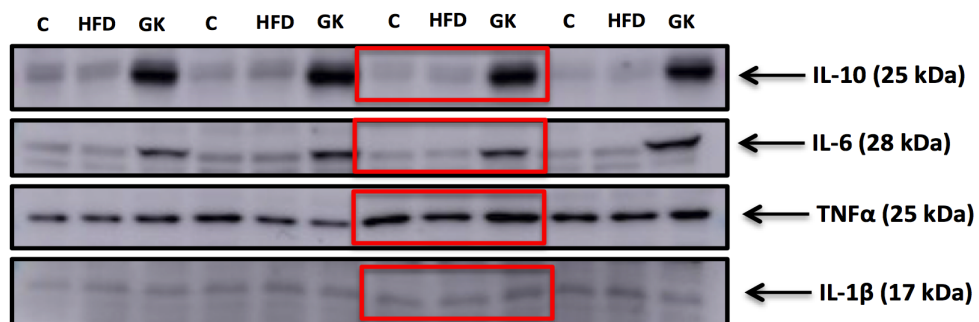
YE, J. AND MCGUINNESS, O. P. Inflammation during obesity is not all bad: Evidence from animal and human studies. **Am J Physiol. Endocrinol Metab.**, v. 304, p. 466–477, 2012.

YOSHIDA, H.; MATSUI, T.; HOSOKAWA, N.; KAUFMAN, R. J.; NAGATA, K.; MORI, K. A. Time dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. **Dev Cell.**, v. 4, p. 265-271, 2003.

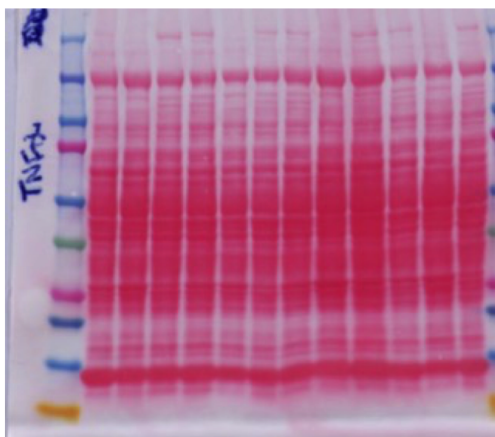
ZINSZNER, H.; KURODA, M.; WANG, X.; BATCHVAROVA, N.; LIGHTFOOT, R. T.; REMOTTI, H.; STEVENS, J. L.; RON, D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. **Genes Dev.**, v.12, p. 982-995, 1998.

ZOZULINSKA, D.; MAJCHRZAK, A.; SOBIESKA, M.; WIKTOROWICZ, K.; WIERUSZ-WYSOCKA, B. Serum interleukin-8 level is increased in diabetic patients. **Diabetologia**, v. 42, p. 117–118, 1999.

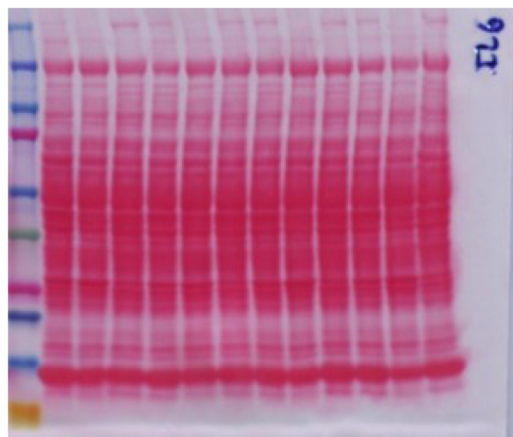
ANEXO A- Ponceau das membranas de citocinas do Fígado



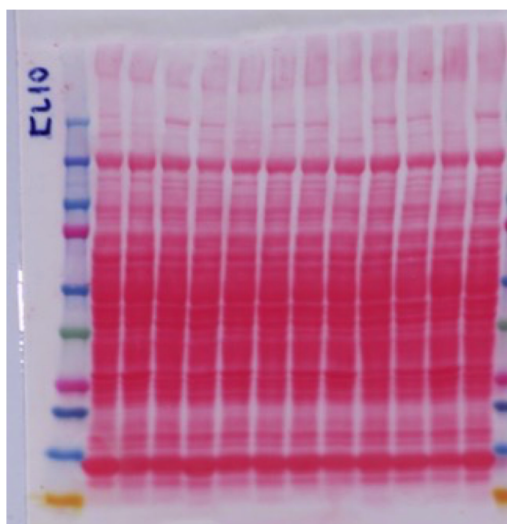
TNF α



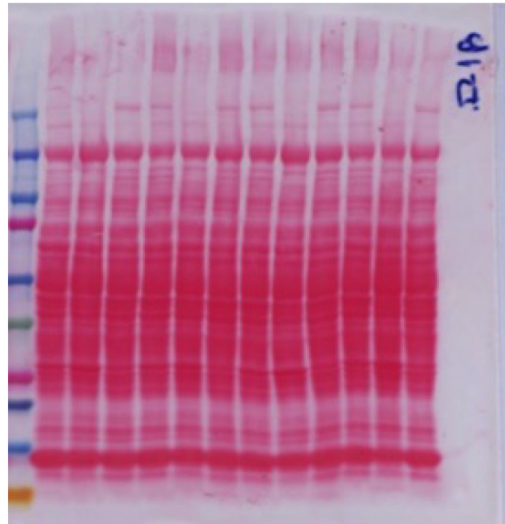
IL-1 β

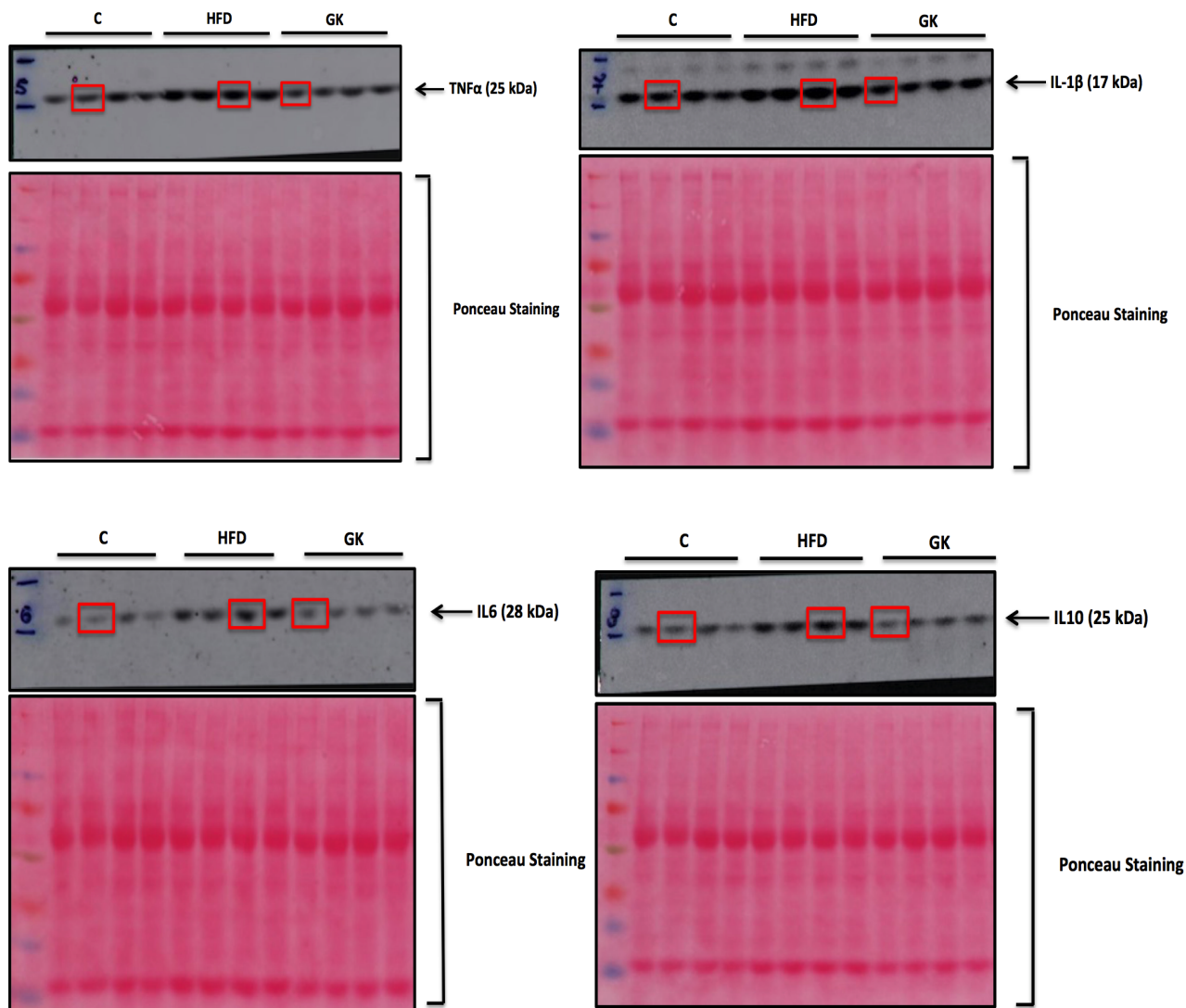


IL-6



IL-10



ANEXO B- Ponceau das membranas de citocinas do TAB

Marked samples were ran separately to make an article figure montage.

RESEARCH ARTICLE

NADPH Oxidase-Dependent Production of Reactive Oxygen Species Induces Endoplasmatic Reticulum Stress in Neutrophil-Like HL60 Cells

Wilson Mitsuo Tatagiba Kuwabara^{1*}, Liling Zhang², Irmgard Schuiki², Rui Curi¹, Allen Volchuk², Tatiana Carolina Alba-Loureiro¹

1 Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Department of Physiology, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

* wilsonk@icb.usp.br



OPEN ACCESS

Citation: Kuwabara WMT, Zhang L, Schuiki I, Curi R, Volchuk A, Alba-Loureiro TC (2015) NADPH Oxidase-Dependent Production of Reactive Oxygen Species Induces Endoplasmatic Reticulum Stress in Neutrophil-Like HL60 Cells. PLoS ONE 10(2): e0116410. doi:10.1371/journal.pone.0116410

Academic Editor: Nades Palaniyar, The Hospital for Sick Children and The University of Toronto, CANADA

Received: July 18, 2013

Accepted: December 9, 2014

Published: February 10, 2015

Copyright: © 2015 Kuwabara et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)- 2012/05349-9, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). 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.

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) primarily produced via NADPH oxidase play an important role for killing microorganisms in neutrophils. In this study we examined if ROS production in Human promyelocytic leukemia cells (HL60) differentiated into neutrophil-like cells (dHL60) induces ER stress and activates the unfolded protein response (UPR). To cause ROS production cells were treated with PMA or by chronic hyperglycemia. Chronic hyperglycemia failed to induce ROS production and did not cause activation of the UPR in dHL60 cells. PMA, a pharmacologic NADPH oxidase activator, induced ER stress in dHL60 cells as monitored by IRE-1 and PERK pathway activation, and this was independent of calcium signaling. The NADPH oxidase inhibitor, DPI, abolished both ROS production and UPR activation. These results show that ROS produced by NADPH oxidase induces ER stress and suggests a close association between the redox state of the cell and the activation of the UPR in neutrophil-like HL60 cells.

Introduction

Neutrophils are essential components of the innate immune system and have an important role in initiating and sustaining the inflammatory process. These cells synthesize proteins that participate in their own effector functions and in the inflammatory response, such as polypeptides, cytokines, chemokines, growth factors and interferons [1]. Neutrophils depend on the activation of NADPH oxidase [2] and hence the generation of reactive oxygen species (ROS) for their microbicidal activity [3; 4]. The ingestion of dead neutrophils by macrophages is the main mechanism to remove neutrophils recruited to the inflamed site and, thus, to promote the resolution of inflammation [5]. The high demand for the production of proteins and inflammatory responses requires the endoplasmatic reticulum (ER), an important organelle to maintain cell homeostasis [6].

The ER is present in all eukaryotic cells and is responsible for secretory and membrane protein biosynthesis. The lumen of the ER has a unique microenvironment and various protein folding chaperones that promote secretory protein biosynthesis and folding. The ER is the primary intracellular calcium reservoir and has a more oxidizing environment relative to the cytosol. High levels of intraluminal calcium are required for proper function of various chaperone proteins [7] and an oxidizing environment is required for efficient disulfide bond formation. Alterations in the ER microenvironment can result in ER stress caused by the accumulation of unfolded proteins. Eukaryotic cells respond to ER stress by activation of signaling cascades known as the Unfolded Protein Response (UPR). The UPR is detailed in some recent reviews [8–11].

Briefly, the ER stress response involves activation of three ER components: Inositol-Requiring kinase 1 (IRE1), double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase (PERK) and Activating transcription factor 6 (ATF6) [7; 12; 13]. When the concentration of unfolded proteins increases in the lumen of the ER, the chaperone Glucose Regulated Protein 78 (GRP78) (also named BiP) dissociates from the luminal domains of PERK, IRE1 and ATF6 to bind to unfolded proteins and promote protein folding. This causes activation of UPR pathways as follows: IRE1 oligomerizes, leading to autophosphorylation of its cytoplasmic domain and activation of the IRE1 endoribonuclease domain [10]. This results in cleavage of the X-box binding protein (XBP1) mRNA to remove a 26 nucleotides intron. The mRNA is re-ligated generating spliced XBP1 mRNA (sXBP1), which is efficiently translated. XBP1 is a transcription factor that activates many genes such as chaperones, ER associated degradation components and secretory pathway genes. PERK pathway activation involves oligomerization and autophosphorylation, leading to activation of the PERK kinase domain that phosphorylates Ser51 of the subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α) [7]. Although the phosphorylation of eIF2 α inhibits general protein synthesis, translation of select mRNAs including Activating Transcription Factor 4 (ATF4) is increased [12]. ATF4 belongs to the cAMP-response element binding (CREB) family of transcription factors and activates genes involved in oxidative stress suppression, metabolism and transport of amino acids. ATF6 activation involves translocation to the Golgi apparatus, where it is cleaved by Site-1 (S1P) and Site-2 (S2P) proteases that release a soluble 50-kDa domain (ATF6p50) protein. ATF6p50 migrates to the nucleus and activates the transcription of many genes involved in ER quality control, including GRP78 and GRP94 [10; 13].

ROS can activate UPR by changing the redox state in the ER lumen. ROS are also produced by the ER during basal cell metabolism and are increased during ER stress [14; 15]. Several cell types and particularly phagocytes such as neutrophils, express proteins of the Nox family and produce ROS by using NADPH [15–17]. The NADPH oxidase is an enzyme complex consisting of cytoplasmic proteins (p40^{phox}, p47^{phox} and p67^{phox}) and membrane proteins (gp91^{phox} or Nox2 and p22^{phox}) to form a flavo-hemoprotein known as cytochrome b558 [18; 19]. NADPH oxidase transfers an electron of the complex to the oxygen molecule in the phagosome or in the cytosol, generating superoxide anion [20–23] and hydrogen peroxide, which is formed by spontaneous dismutation or by superoxide dismutase (SOD) activity [3; 24]. Most of the generated hydrogen peroxide is consumed by neutrophil myeloperoxidase [25; 26]. This enzyme catalyzes the formation of HOCl by oxidation of chloride ions [27; 28], the primary oxidant bactericidal agent produced by neutrophils [23; 29]. Some studies have shown that ROS produced by the NADPH oxidase are important mediators in the activation of ER stress [14; 15; 30–32]. However, the contribution of NADPH oxidase in causing ER stress in neutrophils has not been studied. Here we found that activation of NADPH oxidase by Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) and the consequent increase in ROS production induced ER stress and activation of the UPR in neutrophil-like cells.

Materials and Methods

HL60 cell culture and differentiation

Human HL-60 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA) and grown in endotoxin-free RPMI 1640 medium containing 5.5 mM glucose and 10% heat-inactivated FBS at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Media was changed every 3 days. To differentiate HL60 cells into neutrophil-like cells (dHL60), 1.25% DMSO was added to the media for 6 days as previously reported [3, 4]. After the differentiation, dHL-60 cells (1x10⁶ cells/mL) were cultured for 24 h in 5.5 mM [normal glucose (NG)] or 25 mM glucose [high glucose (HG)]. The nonphysiological sugar, 19.5 mM mannitol (MN), was used to examine the impact of the osmotic pressure exerted by glucose. Cell line passage numbers used were between 11 and 28.

Flow cytometric analysis

To assess the production of ROS, dHL60 cells were labeled with 10 μM DHR 123 (Dihydrorhodamine 123) and stimulated with 200 nM PMA or PMA+ DPI (10 μM) (Diphenyleneiodonium). For flow cytometric quantification of ROS, cells (1.5 x 10⁶) were incubated with or without DPI for 20 min stimulation with PMA. PMA was added 15 min before the analysis. Undifferentiated HL60 cells were used as a negative control. Following treatments, flow cytometric analyses were conducted on a FACSLSR II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) flow cytometer. Cells were excited at 488 nm and emitted light measured at 510/20 nm. Data analysis was performed using the BD FACS Diva software version 6.0.

Intracellular calcium concentration

dHL60 cells (1.5 x 10⁶) were incubated for 24 h under the following conditions: NG, HG and MN. Then, cells were labeled with Indo-1-AM (5 μM) for one hour at 37°C. After incubation, cells were washed with Ca²⁺ buffer (150 mM NaCl, 4 mM KCl, 25 mM HEPES, 3 mM CaCl₂, 5 mM pyruvate, 10 mM glucose, pH 7.3) and kept at room temperature prior to analysis. For calcium influx measurements, dHL60 were resuspended in Ca²⁺ buffer with 1 mg/mL albumin (BSA). For ER calcium content, cells were washed and kept in Ca²⁺ free buffer (150 mM NaCl, 4 mM KCl, 25 mM HEPES, 5 mM pyruvate, 10 mM glucose, 2 mM EGTA, pH 7.3). After labeling the cells with Indo-1-AM, intracellular calcium changes were monitored by fluorimetry (F-2500, HITACHI) at 37°C under constant agitation. PMA (1 μM) or fMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine) (1 μM) were added to stimulate calcium influx. The ionophore, ionomycin (1 μM) and magnesium chloride (2 mM) (MnCl₂) were used in the ER calcium content measurements and to determine the maximum and the minimum concentration of intracellular calcium, respectively. Intracellular calcium was calculated as previously reported [33].

XBP-1 mRNA splicing

Total RNA was isolated from dHL60 cells (1.5 x 10⁶) using TRIzol reagent (Invitrogen) and RNeasy Mini Kit (Qiagen). The RNA was reverse transcribed to single-stranded cDNA using the High-Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). The resulting cDNA was used for the PCR analysis. Human XBP-1 cDNA was amplified by OneStep RT-PCR kit (Qiagen) using primers that flank the intron excised by IRE1 exonuclease activity as previously described (21). Primer sequences used to amplify human XBP-1 were: 5'-TTA CGA GAG AAA ACT CAT GGC C-3' and 5'-GGG TCC AAG TTG TCC AGA ATG C -3'. The protocol used for the RT-PCR was as follows: 50°C (30 min); 95°C (15 min); 35 cycles of 94°C (1 min),

55°C (1 min), 72°C (1min); 72°C (10 min). RT-PCR products were resolved on a 3% agarose gel and visualized using ethidium bromide.

Western blot analysis

Cells (1×10^7) were transferred to tubes and centrifuged at 1,200 rpm for 10 min at 4°C. The pellet was washed with 1 ml of cold phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged at 1,200 rpm for 10 min at 4°C. The pellet was resuspended in 60 μ l of Triton X100 lysis buffer. Proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked for 1h at room temperature with 5% skim milk and incubated with the specific primary antibodies overnight. Following incubation with secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase, the bands were detected with the enhanced chemiluminescence system (Amersham Biosciences). Immunoblots were scanned and quantified using ImageJ software. ATF4 goat polyclonal antibody (ab1371) was purchased from Abcam. Bip rabbit polyclonal (3183) and phospho-eIF2 α rabbit polyclonal (9721) antibodies were purchased from Cell Signaling. GADD34 rabbit polyclonal antibody (sc-8327) was purchased from Santa Cruz Biotechnology, and the γ -tubulin monoclonal antibody (T6557) was purchased from Sigma Aldrich.

Real time polymerase chain reaction

Total RNA was obtained from 1×10^7 dHL60 by the guanidine isothiocyanate extraction method [34], using TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) followed by isolation using RNeasy mini kit (Qiagen). The purity was assessed by the 260/280 nm ratio and the quantity measured at 260 nm. The cDNA was synthesized from total RNA (1.0 μ g) using the High capacity kit (Invitrogen). The following primers were used: ATF4 5'-GACCGAAATGAGCTTCCTGA-3' and 5'-ACCCATGAGGTTTGAAGTGC-3'; GRP78 5'-GCCTGTATTTCTAGACCTGCC-3' and 5'-TTCATCTTGCCAGCCAGTTG-3'; C/EBP homologous protein (CHOP) 5'-CTGCTTCTCTGGCTTGGCTG-3' and 5'-GCTCTGGGAGGTGCTTGTGA-3'; ER-localized DnaJ 4 (ERdJ4) 5'-CGCCAAATCAAGAAGGCCT-3' and 5'-CAGCATCCGGGCTCTTATTTT-3'; Growth Arrest DNA damage protein 34 (GADD34) 5'-GGAGGAAGAGAATCAAGCCA-3' and 5'-TGGGGTCCGAGCCTGAAGAT-3'; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPDH 5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3' and 5'-TCTAGACGGCAGGT CAGGTCCACC-3'; Homocysteine-induced ER protein (Herp) 5'-CACCGCGACTTGGAGCT GAGTGG-3' and 5'-TCTGTGGATTCAGCCACCTTGG-3'; 18S 5'-GCAATTATCCCCAT GAACG-3' and 5'-GGGACTTAATCAACGCAAGC-3'. Real-time PCR analysis was performed using the SyBR Green JumpStart kit (Sigma Aldrich) in a Rotor Gene 6000 equipment (Corbett Research, Mortlake, Australia). Gene expression was performed by $2^{-\Delta\Delta CT}$ [35,36], using GAPDH and 18S genes as inner controls.

Data Analysis

Results are presented as means \pm S.E.M. Statistical significance was assessed by two way ANOVA followed by the Bonferroni test. $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results

PMA activates NADPH oxidase and increases ROS production

HL60 cell is a tumor cell line that was isolated from a single patient with acute promyelocytic leukemia and can be differentiated *in vitro* into a variety of blood cell types [37]. To differentiate them into neutrophils polar components such as DMSO or retinoic acid are used. After

differentiation, although they are not identical to primary neutrophils, neutrophil-like HL60 cells (dHL60) express all the components of NADPH oxidase and its functionality is similar to primary neutrophils [37–40].

dHL60 were used as a model to study the effect of ROS production on ER stress and UPR activation. Undifferentiated HL60 cells were used as a negative control; since they express nox proteins at a lower level than in dHL60 [41] and ROS production is not expected to be increased by PMA. Compared to dHL60, undifferentiated HL60 cells have higher basal ROS levels, which likely reflects a higher metabolic rate [15, 42] (Fig. 1A). Although chronic hyperglycemia has been shown to increase ROS levels in various cell types [43–46] it failed to increase ROS production in dHL60 cells as detected by DHR 123 [47] (Fig. 1B). However, we observed a 5-fold increase in ROS production after PMA in dHL60 cells but not in undifferentiated HL60 cells (Fig. 1C). ROS production stimulated by PMA in dHL60 cells was mostly NADPH oxidase-dependent since DPI, a specific inhibitor of the NADPH oxidase [16], significantly inhibited ROS production (Fig. 1A,C).

PMA does not affect cellular calcium levels

PMA activates PKC, which promotes the assembly of NADPH oxidase proteins [48]. ER stress can be caused by depletion of ER calcium stores as can be pharmacologically-induced using thapsigargin [46]. To examine if PMA or high glucose affect cellular calcium levels, intracellular calcium dynamics were monitored by using Indo-1-AM an ester of the calcium sensitive

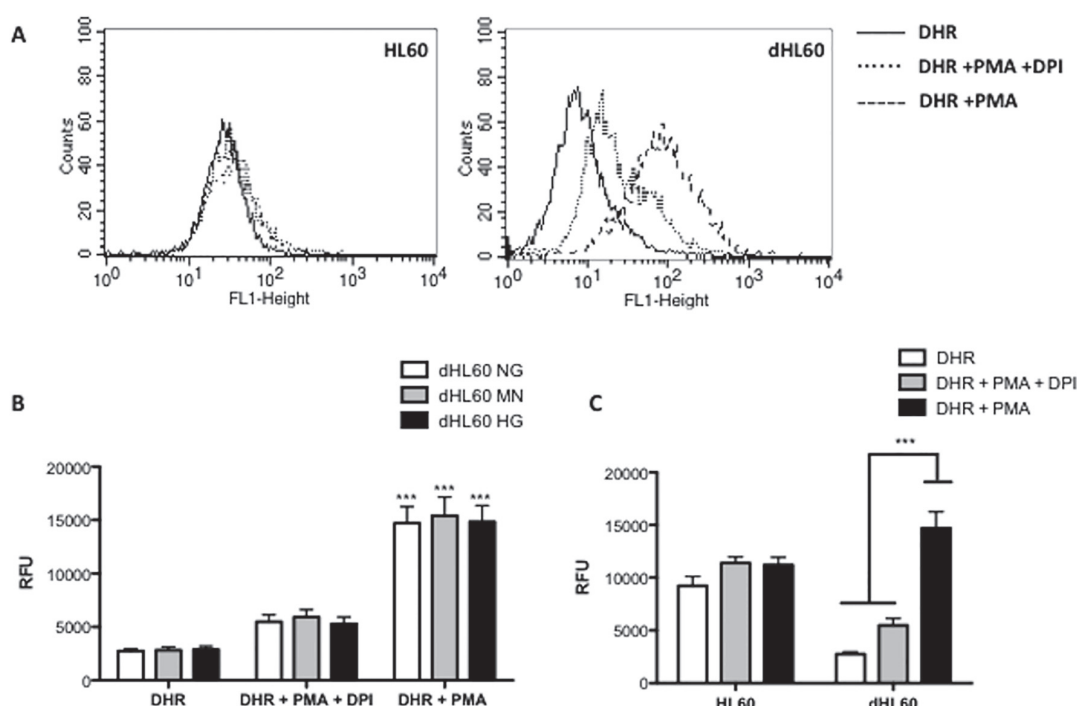


Fig 1. Effect of hyperglycemia and PMA on ROS production in neutrophil-like HL60 cells (dHL60) and non-differentiated HL60 cells. PMA (1 μ M) triggered the production of ROS only in dHL60 (A; C). Hyperglycemia did not affect the ROS production in neutrophil-like HL60 cells (B). DPI (10 μ M) was used as NADPH oxidase inhibitor. [NG] normoglycemic media (5.5 mM of glucose); [MN] Mannitol enriched media (5.5 mM of glucose + 19.5 mM of mannitol); [HG] Hyperglycemic media (25 mM of glucose). DHR (10 μ M) was used to monitor ROS production by flow cytometry. Graphs show median of fluorescence \pm S.E.M. Results are from 6 independent experiments. (***) Indicate $p < 0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0116410.g001

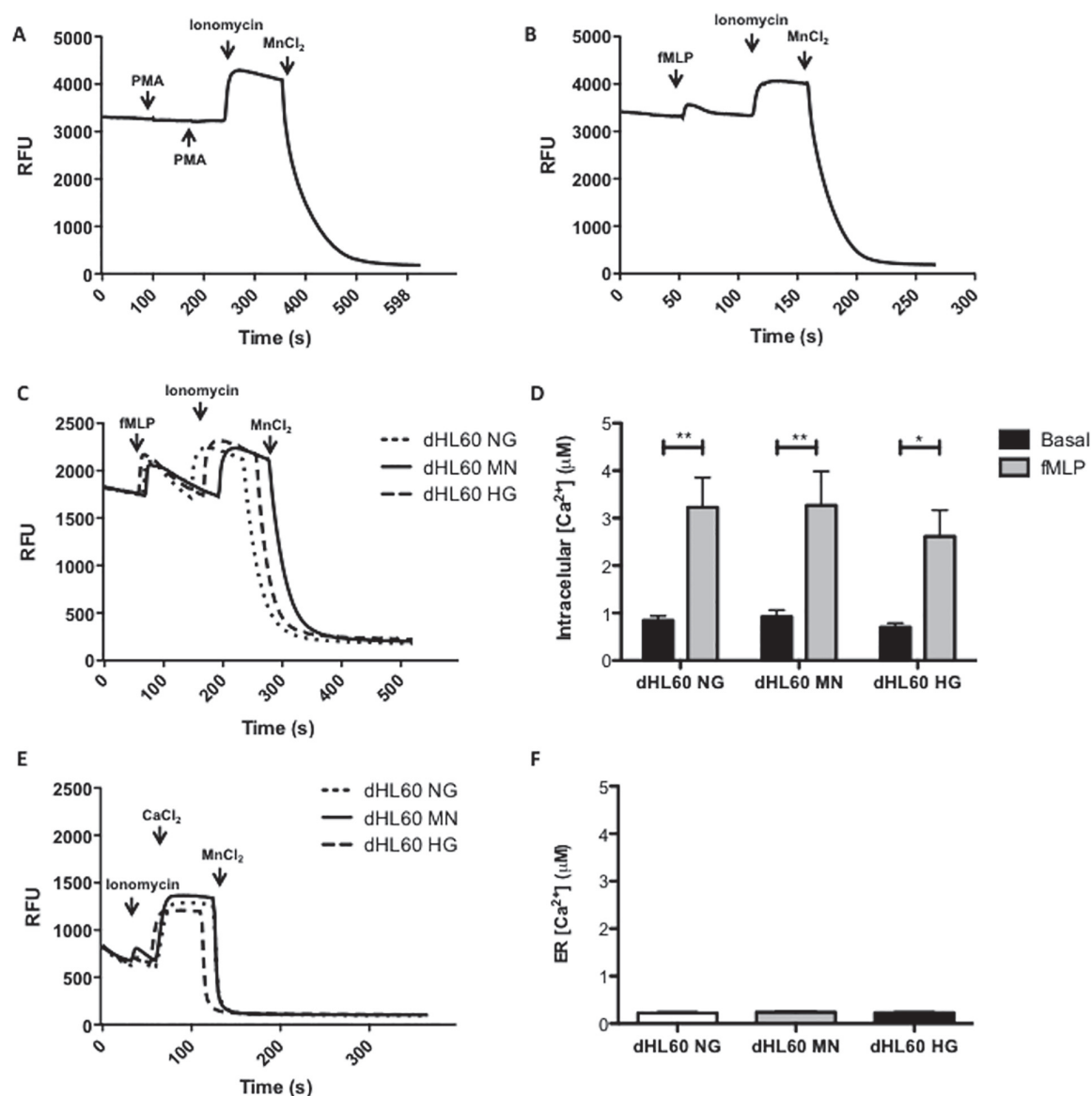


Fig 2. Effect of PMA, fMLP and hyperglycemia on calcium influx and ER calcium content in neutrophil-like HL60 cells (dHL60). PMA (1 μM) (A) did not alter calcium dynamics in dHL60 cells. fMLP (1 μM) (B-D) promoted calcium influx in neutrophil-like HL60 cells; and hyperglycemia (C) did not disturb the calcium intake by fMLP stimulation. ER calcium content in dHL60 was not altered by hyperglycemia (E; F). Calcium dynamics were monitored by Indo-1-AM (1 μM) using fluorometry. [NG] normoglycemic media (5.5 mM of glucose); [MN] Mannitol enriched media (5.5 mM of glucose + 19.5 mM of mannitol); [HG] Hyperglycemic media (25 mM of glucose). Graphs show fluorescence intensity during the time of analysis (A; B; C; E). Histograms show the mean intracellular calcium concentration ± S.E.M. (D) and the mean ± S.E.M. of ER calcium content (F). Results are from 4 independent experiments. (**) Indicate $p < 0.01$ and (*) indicate $p < 0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0116410.g002

dye Indo-1 [47]. PMA failed to cause calcium influx (Fig. 2A) compared to fMLP used as a positive control (Fig. 2B). Similarly, chronic hyperglycemia did not cause variations in ER calcium content nor differences in calcium influx when cells were stimulated with fMLP (Fig. 2C-F).

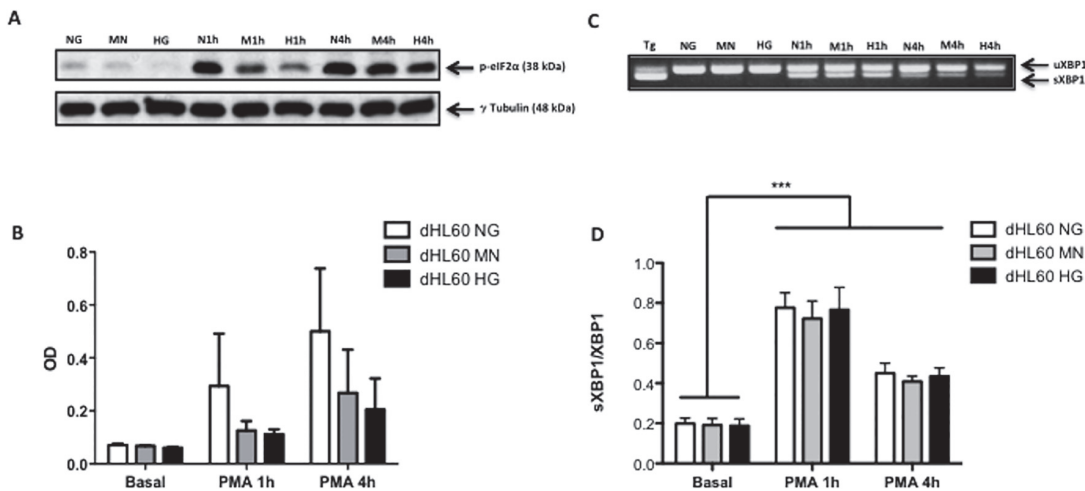


Fig 3. Effect of hyperglycemia and PMA on eIF2 α phosphorylation and splicing of XBP1 mRNA in neutrophil-like HL60 cells (dHL60).

Hyperglycemia failed to modulate eIF2 α phosphorylation (A; B) and splicing of XBP1 (C; D). Splicing of XBP1 mRNA was caused by PMA (1 μ M) stimulus (1 and 4h) (C; D). [NG] normoglycemic media (5.5 mM of glucose); [MN] Mannitol enriched media (5.5 mM of glucose + 19.5 mM of mannitol); [HG] Hyperglycemic media (25 mM of glucose). Histogram (B) shows the mean \pm S.E.M. optical density (OD) of the protein bands (A). γ Tubulin was used as loading control. (C) Complementary cDNA bands of unspliced XBP1 (uXBP1) (top band) and spliced (sXBP1) (bottom band). Results is representative of 3 independent experiments. [Tg] Positive control (1 μ M Thapsigargin, 1h); [N1h] NG + 1h PMA; [M1h] MN + 1h PMA; [H1h] HG + 1h PMA; [N4h] NG + 4h PMA; [M4h] MN + 4h PMA; [H4h] HG + 4h PMA.

doi:10.1371/journal.pone.0116410.g003

PMA induces ER stress by activating the NADPH oxidase

To examine if PMA or high glucose caused ER stress we monitored activation of the PERK and IRE1 UPR pathways. Levels of phospho-eIF2 α and spliced XBP1 mRNA were measured in dHL60 incubated in high glucose alone or treated with PMA for 1 and 4 h in normal or high glucose. Hyperglycemia alone failed to cause UPR activation (Fig. 3A-D). However, PMA caused an increase in spliced XBP1 mRNA levels in all conditions (normal glucose, mannitol control and high glucose) (Fig. 3C-D).

Next we examined whether the activation of PERK and IRE1 by PMA in dHL60 cells was due to ROS produced by NADPH oxidase activation. PMA caused an increase in phospho-eIF2 α levels after 1 and 4 hours of treatment and DPI abolished this effect (Fig. 4A,C). However, the levels of the PERK pathway regulated proteins GADD34 and ATF4 were not changed with PMA treatment (Fig. 4B,E,F). The UPR regulated ER chaperone GRP78 was also investigated. Treatment with PMA for 1 and 4 h increased the protein levels of GRP78 and this was completely prevented by the NADPH oxidase inhibitor DPI (Fig. 4B,D). To investigate the IRE1 pathway, levels of sXBP1 mRNA were analyzed. PMA increased the levels of sXBP-1 after 1 and 4h of treatment and this effect was inhibited by DPI (Fig. 5). Thus, activation of both PERK and IRE1 pathways by PMA is dependent on NADPH oxidase ROS production and not on PKC activation *per se*.

Finally, we examined by real time PCR if the expression of genes regulated by the UPR (GRP78, Herp, GADD34, CHOP, ATF4 and ERdj4) is altered by PMA in dHL60 cells. Expression of GRP78 and Herp increased when dHL60 cell were treated with known ER stress-inducing compounds tunicamycin and/or thapsigargin, but PMA treatment had no significant effect (Fig. 6A,B). GADD34 expression was increased in dHL60 cells stimulated with PMA for 1 and 4h. DPI enhanced this effect at 1h, but partially inhibited this increase at the 4h time point (Fig. 6C). CHOP expression was also increased by PMA and similar to GADD34 DPI enhanced

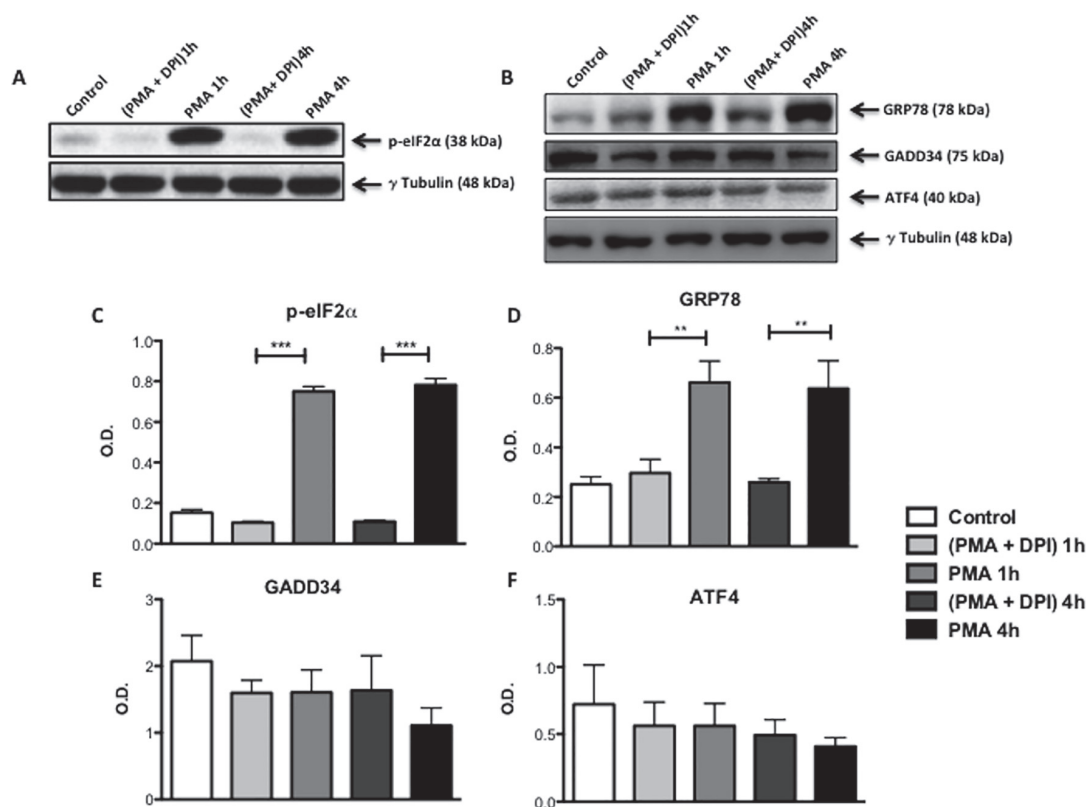


Fig 4. Effect of ROS production on UPR regulated proteins in neutrophil-like HL60 cells (dHL60). PMA (1 μ M) treatment for 1 and 4h increased phosphorylated eIF2 α (A; C) and GRP78 protein levels (B; D). This was blocked by DPI (10 μ M), a NADPH oxidase inhibitor (A; B; C; D). GADD34 and ATF4 protein content was not altered by PMA (E; F). Histograms (C; D; E; F) show the mean \pm S.E.M. of the optical density (OD) of the protein bands. γ Tubulin was used as loading control. Results are from at least 3 independent experiments. (***) Indicates $p < 0.001$ and (**) Indicates $p < 0.01$.

doi:10.1371/journal.pone.0116410.g004

this effect at the 1h time point (Fig. 6D). The expression of ATF4 was increased by PMA at 4h and DPI potentiated the PMA effect at both 1 h and 4 h (Fig. 6E). In contrast, DPI inhibited PMA induction of the co-chaperone protein ERdj4 at 4h of treatment (Fig. 6F).

Discussion

It was once thought that neutrophils were terminally differentiated cells lacking transcription activity and protein synthesis. More recently, however, it has been reported that neutrophils in fact exhibit a high capacity to carry out *de novo* synthesis of various proteins, such as cytokines and chemokines with immunomodulatory properties [1; 48]. The neutrophil ER is functional and should be considered as a key organelle in mediating cell viability, especially in the activated state, when the production of secretory proteins increases [49]. However, activated neutrophils are also large producers of ROS primarily via NADPH oxidase. Given that ROS can induce ER stress [14; 15; 30–32], a situation that leads to an increase unfolded and misfolded proteins in the organelle, we sought to determine if ER stress occurs in neutrophils exposed to chronic hyperglycemia or when acutely activated.

Chronic hyperglycemia is known to induce ROS production in many cell types, but failed to increase ROS levels or to cause ER stress in dHL60 cells. This is likely due to glucose transporter (GLUT) expression in these cells. Neutrophils and dHL60 express GLUT 1 exclusively [43;

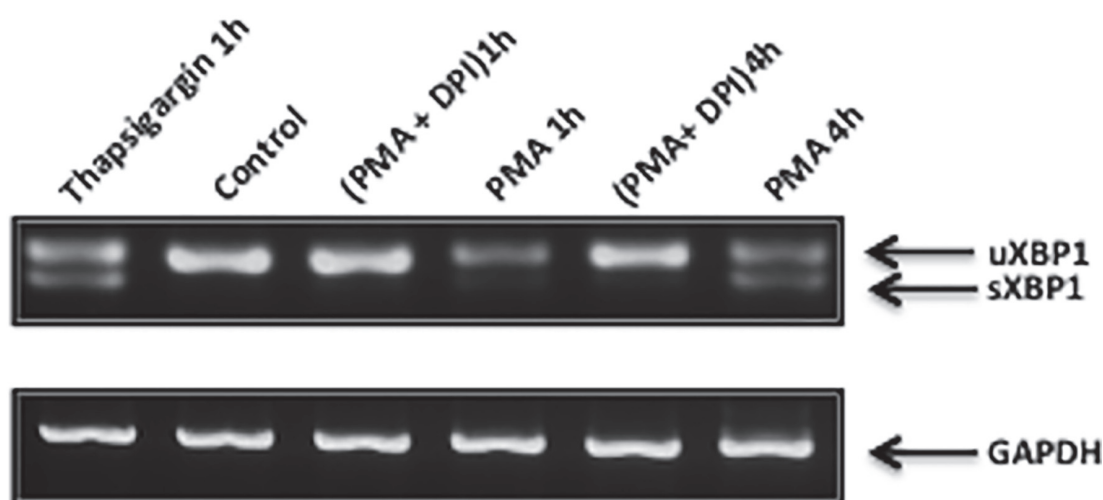


Fig 5. Effect of ROS production on the IRE1 α /XBP1 pathway in neutrophil-like HL60 cells (dHL60). PMA (1 μ M) treatment for 1h and 4h caused an increase in spliced XBP1 (sXBP1) mRNA content as monitored by RT-PCR (top panel). DPI (10 μ M) inhibited the splicing of XBP1 mRNA. GAPDH was used as a loading control (bottom panel). Results are from 3 independent experiments. Thapsigargin (1 μ M, 1h) was used as a positive control for ER stress-induced XBP1 splicing.

doi:10.1371/journal.pone.0116410.g005

[50–52], which has a low K_m and gets saturated such that glucose transport does not increase despite high extracellular levels, protecting the cell against glucotoxicity. In contrast, GLUT 2 has a high K_m for glucose (~17 mM), so the higher the concentration of glucose in the extracellular media, the higher the transport into the cell [52]. Pancreatic β -cells that express GLUT2 respond to high glucose concentration by producing and secreting more insulin. Thus, hyperglycemia by stimulating insulin biosynthesis and ROS production causes ER stress in these cells [39; 52; 53].

We found that dHL60 cells treated with the PKC activator, PMA, showed large increases in ROS production that correlated with induction of ER stress markers. It has been shown previously that fMLP triggers ROS production in dHL60 which is accompanied by calcium influx [54]. It is known that ER stress can be caused by reducing ER calcium levels such as with the compound thapsigargin that inhibits the ER Ca^{2+} -ATPase [55–57], or by ionomycin a calcium ionophore that increases the influx of Ca^{2+} [58]. However, PMA failed to induce calcium influx and, thus its ability to induce ER stress in dHL60 occurred independently of calcium changes. Importantly, DPI a specific inhibitor of NADPH oxidase protein complex assembly, which does not inhibit PKC [48], prevented ROS induction and activation of the ER stress.

In response to ER stress, three UPR signaling pathways are activated that are initiated by PERK, IRE1 and ATF6 proteins [59]. We monitored two of these pathways in response to PMA treatment. The PERK pathway was monitored by the levels of eIF2 α phosphorylation. Phosphorylation of eIF2 α results in a transient reduced general protein synthesis that is cytoprotective since this will limit the amount of new protein synthesis in the ER. PMA induced a rapid (within 1h) and large increase in phospho-eIF2 levels that was completely inhibited by DPI and is thus NADPH oxidase dependent. Reduced protein synthesis caused by eIF2 α phosphorylation would be expected to result in increased ATF4 and GADD34 protein levels [60]. However, no changes in these proteins were observed after 1 h or 4h PMA treatment. The reason for this is unclear, although the inhibition of protein synthesis may not be sufficient to allow for enhanced ATF4 translation and the effect on general protein translation should be

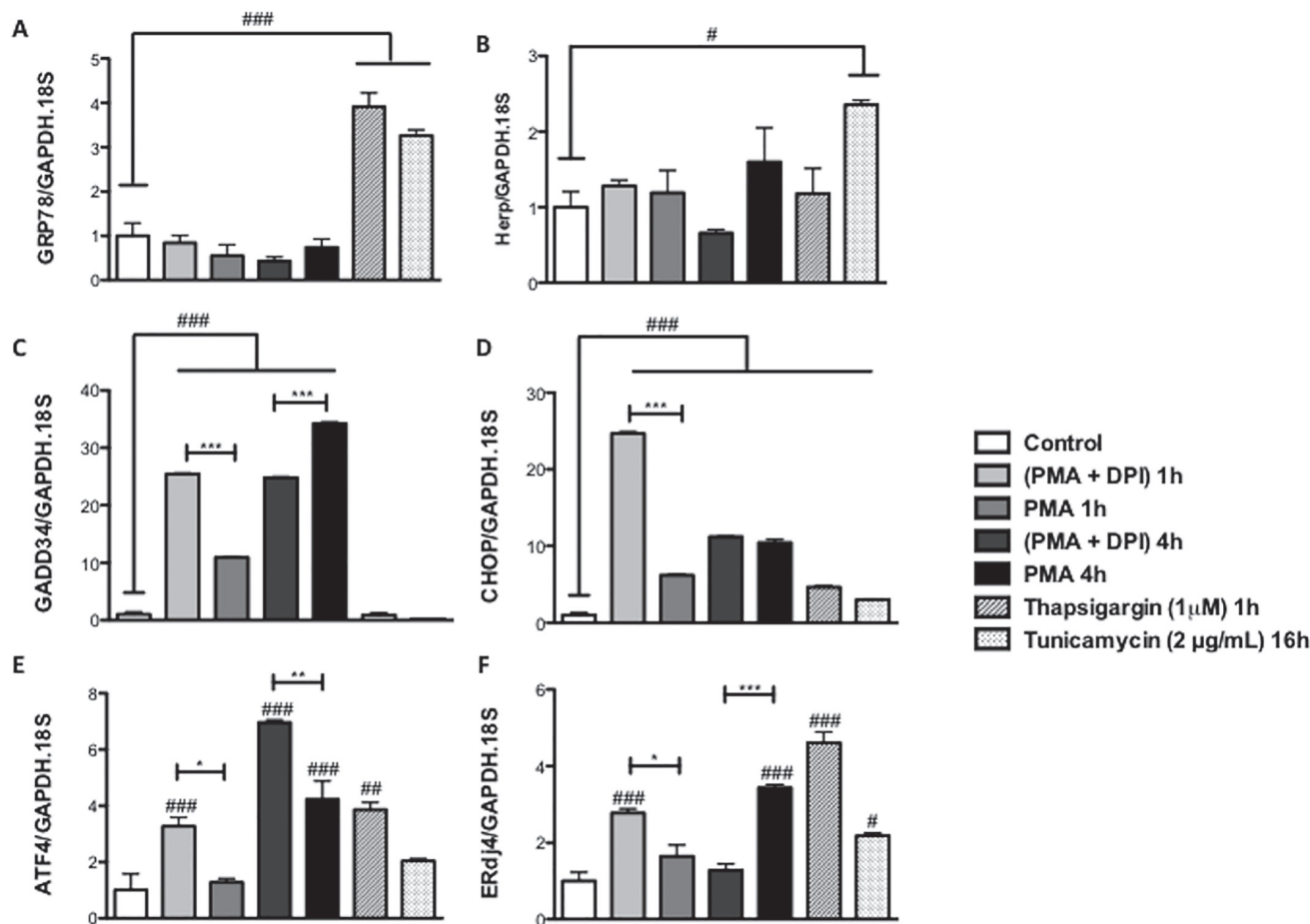


Fig 6. Effect of ROS production on the expression of genes involved in the unfolded protein response (UPR). GAPDH and 18S were used as reference control genes. Results are from 6 independent experiments. Thapsigargin (1 μM) 1h and Tunicamycin (2 μg/ml) 16h were used as positive controls. (***) Indicates $p < 0.001$; (**) Indicates $p < 0.01$ and (*) Indicates $p < 0.05$; (###) indicates $p < 0.001$ vs control group; (##) indicates $p < 0.01$ vs control group; (#) indicates $p < 0.05$ vs control group.

doi:10.1371/journal.pone.0116410.g006

measured in future experiments. Interestingly, ATF4, GADD34 and CHOP mRNA levels were increased by PMA treatment, although this was not inhibited by DPI, suggesting an NADPH oxidase (and ER stress) independent effect. Indeed, in some cases DPI potentiated the effect of PMA, which might relate to other cellular effects of DPI, such as inhibition of O_2° and H_2O_2 production by mitochondria [61], induction of DNA damage [62] and increase in mRNA and protein levels related to cell death [63].

Phosphorylation of eIF2 α can be mediated by kinases other than PERK (10) and therefore can occur independent of ER stress. That PMA does indeed induce ER stress is apparent from the large induction of sXBP1 mRNA and GRP78 protein levels, two bona fide markers of ER stress (10). The fact that both changes are completely inhibited by DPI indicates that the effect is dependent on NADPH oxidase activation and likely ROS production. In the second pathway investigated, IRE1 splices cytosolic XBP1 mRNA that results in production of the XBP1 transcription factor. XBP1 regulates numerous genes including ER chaperones, genes involved in ERAD, genes involved in ER expansion and secretory protein trafficking [64–71]. Interestingly

however, neither GRP78 nor the ERAD gene Herp were affected by PMA treatment for either 1 or 4 h, despite a clear increase in sXBP1 mRNA levels. This is surprising since XBP1 is known to contribute to regulating the induction of these genes in response to ER stress and GRP78 protein levels were increased. It is possible that the changes in mRNA levels for these genes occur at some point during the 1h PMA treatment and levels are reduced to basal subsequently. The positive control treatments (tunicamycin and thapsigargin) increased the levels of these genes, thus the lack of effect is not due to technical issues with the assay. However, PMA did induce another gene regulated by the IRE1 α /XBP1 pathway, the co-chaperone ERdj4 that has multiple functions in the ER lumen, such as removal of newly synthesized unfolded and/or misfolded proteins by promoting the GRP78 ATPase activity [72, 73] or by enhancing the activity of the ERAD machinery [74, 75]. At 4h of PMA treatment the induction of ERdj4 expression in response to PMA was completely inhibited, indicating the effect was due to NADPH oxidase activation.

In summary, we have shown that neutrophil-like HL60 cells undergo ER stress when the NADPH oxidase is activated. Thus, in response to activation dHL60 cells are eliciting an adaptive system (the UPR) to maintain ER homeostasis and cell survival during the potentially detrimental presence of excess ROS production. We suggest that the UPR is vital for neutrophils to perform their function in the immune response. The UPR will allow cells to maintain survival for potentially multiple encounters with pathogens and likely more importantly, to maintain the ability to synthesize and secrete cytokines and chemokines as part of the inflammatory response. Future studies should investigate the UPR in the context of activation in primary neutrophils. Knowledge of UPR activation may lead to a better understanding of neutrophil functions, such as phagocytosis, cytokine and chemokine production and cell survival

Supporting Information

S1 Fig. Effect of Hyperglycemia and PMA on eIF2 α phosphorylation (n = 3). Membranes were cut where indicated for primary antibody incubations.

(TIF)

S2 Fig. Effect of Hyperglycemia and PMA on the splicing of XBP1. (n = 3)

(TIF)

S3 Fig. Effect of ROS production on the phosphorylation of eIF2 α (n = 3). Membranes were cut where indicated for primary antibody incubations.

(TIF)

S4 Fig. Ponceau staining of the membranes (n = 6). Membranes were cut where indicated for primary antibody incubations.

(TIF)

S5 Fig. Effect of ROS production on the levels of GRP78 and GADD34 (n = 6). Membranes were cut as indicated in the ponceau staining (S4 Fig.) for primary antibody incubations.

(TIF)

S6 Fig. Effect of ROS production on the levels of ATF4. Y Tubulin was used as a loading control (n = 6). Membranes were cut as indicated in the ponceau staining (S4 Fig.) for primary antibody incubations.

(TIF)

S7 Fig. Effect of ROS production on the splicing of XBP1 (n = 6). GAPDH was used as a reference control gene (n = 3).

(TIF)

S8 Fig. Graphs representing qPCR amplification and melting curves of the genes involved in the UPR (GRP78, GADD34, CHOP, ATF4, ERdj4 and Herp) and two reference control genes (GAPDH and 18S).

(ZIP)

S1 Table. Median of fluorescence intensity (DHR 123: λ excitation: 488nm; λ emission 520nm – Flow cytometer analysis).

(PDF)

S2 Table. Intracellular calcium measurements (Indo 1: λ excitation = 331nm; λ emission = 410 nm – Fluorimeter analysis).

(PDF)

S3 Table. ER calcium measurements (Indo 1: λ excitation = 331nm; λ emission = 410 nm Fluorimeter analysis).

(PDF)

S4 Table. The cycle threshold (Ct) mean values of the UPR (GRP78, GADD34, CHOP, ATF4, ERdj4 and Herp) and reference control (GAPDH and 18S) genes.

(PDF)

Acknowledgments

The authors are indebted to the constant support of Dr. Sergio Grinstein, Hospital for Sick Children, Toronto, Canada. This research was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: WK AV TA-L. Performed the experiments: WK LZ IS. Analyzed the data: WK AV TA-L. Contributed reagents/materials/analysis tools: AV. Wrote the paper: WK AV RC TA-L.

References

1. Cassatella MA (1999) Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol* 1999; 73: 369–509. PMID: [10399011](#)
2. Rossi F, Zatti M (1964) Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia* 20(1): 21–23. PMID: [4379032](#)
3. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT (1973) Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 52: 741–744. PMID: [4346473](#)
4. Fantone JC, Ward PA (1982) Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 107: 397–418.
5. Savill J, Haslett C (1995) Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Semin Cell Biol* 6(6): 385–393. PMID: [8748146](#)
6. López-García P, Moreira D (2006) Selective forces for the origin of the eukaryotic nucleus. *Bioessays* 28(5):525–533. PMID: [16615090](#)
7. Lai E, Teodoro T, Volchuk A (2007) Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* 22:193–201. PMID: [17557940](#)

8. Rutkowski DT, Hegde RS (2010) Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *J Cell Biol* 189(5): 783–794. doi: [10.1083/jcb.201003138](https://doi.org/10.1083/jcb.201003138) PMID: [20513765](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20513765/)
9. Tabas I, Ron D (2011) Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 3: 184–90. doi: [10.1038/ncb0311-184](https://doi.org/10.1038/ncb0311-184) PMID: [21364565](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21364565/)
10. Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Bio* 8(7): 519–29. PMID: [17565364](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17565364/)
11. Wiseman RL, Haynes CM, Ron D (2010) SnapShot: The unfolded protein response. *Cell* 140(4): 590–590. doi: [10.1016/j.cell.2010.02.006](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.006) PMID: [20178750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20178750/)
12. Bernales S, Papa FR, Walter P (2006) Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 487–508. PMID: [16822172](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16822172/)
13. Schroder M, Kaufman RJ (2005) The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74: 739–789. PMID: [15952902](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15952902/)
14. Li G, Scull C, Ozcan L, Tabas I (2010) NADPH oxidase links endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and PKR activation to induce apoptosis. *J Cell Biol* 191(6):1113–1125. doi: [10.1083/jcb.201006121](https://doi.org/10.1083/jcb.201006121) PMID: [21135141](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21135141/)
15. Santos CX, Tanaka LY, Wosniak J, Laurindo FR (2009) Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal* 11:2409–2427. doi: [10.1089/ARS.2009.2625](https://doi.org/10.1089/ARS.2009.2625) PMID: [19388824](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19388824/)
16. Brinkmann VU, Reichard C, Goosmann B, Fauler Y, Uhlemann DS, et al. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532–1535. PMID: [15001782](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15001782/)
17. Chen K, Kirber MT, Xiao H, Yang Y, Keaney JF Jr (2008) Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J Cell Biol* 181(7): 1129–1139. doi: [10.1083/jcb.200709049](https://doi.org/10.1083/jcb.200709049) PMID: [18573911](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18573911/)
18. Babior BM, Curnutte JT, Kipnes RS (1975) Biological defense mechanisms. Evidence for the participation of superoxide in bacterial killing by xanthine oxidase. *J Lab Clin Med* 85: 235–244. PMID: [1089740](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1089740/)
19. Parkos CA, Allen RA, Cochraine CG, Jesaitis AJ (1987) Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. *J Clin Invest* 80(3): 732–742. PMID: [3305576](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3305576/)
20. Han C, Freeman JL, Lee T, Motalebi SA, Lambeth JD (1998) Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem* 273(27): 16663–16668. PMID: [9642219](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9642219/)
21. Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH, Lambeth JD (1999) The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem* 274(33): 22999–30005. PMID: [10438466](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10438466/)
22. Babior BM (1991) The respiratory burst oxidase and the molecular basis of chronic granulomatous disease. *Am J Hematol* 37(4): 263–266. PMID: [1858784](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1858784/)
23. Klebanoff SJ (1968) Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide anti-bacterial system. *J Bacteriol* 95(6): 2131–2138. PMID: [4970226](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4970226/)
24. Imlay JA, Linn S (1986) Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J Bacteriol*, 166(2): 519–527. PMID: [3516975](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3516975/)
25. Klebanoff SJ (1992) Phagocytic cells: products of oxygen metabolism. In: Gallin JI, Goldstein IM Snyderman R, editors, *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. New York: NY Raven, p. 451.
26. Kettle AJ, Winterbourn CC (1997) Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. *Redox Rep* 3: 3.
27. Agner K (1972) Biological effects of hypochlorous acid formed by “MPO”-peroxidation in the presence of chloride ions. In: Akeson A, Ehrenberg A, editors, *Structure and Function of Oxidation Reduction Enzymes*. New York, NY.: Pergamon, pp. 329–335.
28. Harrison JE, Shultz J (1976) Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 251(5): 1371–1375. PMID: [176150](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/176150/)
29. Iyer GYN, Islam MF, Quastel JH (1961) Biochemical aspects of pathogenesis. *Nature* 192: 535–541.
30. Domigan NM, Charlton TS, Duncan MW, Winterbourn CC, Kettle AJ (1995) Chlorination of tyrosyl residues in peptides by myeloperoxidase and human neutrophils. *J Biol Chem* 270(28): 16542–16548. PMID: [7622459](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7622459/)
31. Santos CX, Nabeebaccus AA, Shah AM, Camargo LL, Filho SV, et al. (2013) Endoplasmic Reticulum Stress and Nox-Mediated Reactive Oxygen Species Signaling in the Peripheral Vasculature: Potential Role in Hypertension. *Antioxid Redox Signal* “In Press”.

32. Wu RF, Ma Z, Liu Z, Terada LS (2010) Nox4-derived H₂O₂ mediates endoplasmic reticulum signaling through local Ras activation. *Mol Cell Biol* 14:3553–68. doi: [10.1128/MCB.01445-09](https://doi.org/10.1128/MCB.01445-09) PMID: [20457808](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20457808/)
33. MacDougall SL, Grinstein S, Gelfand EW (1988) Activation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in human B lymphocytes by anti-immunoglobulin. *J Clin Invest* 81(2): 449–454. PMID: [2448342](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2448342/)
34. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156–159. PMID: [2440339](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2440339/)
35. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method *Methods* 25(4): 402–408. PMID: [11846609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/)
36. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9): e 45. PMID: [11328886](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11328886/)
37. Collins SJ (1987) The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* 70(5): 1233–1244. PMID: [3311197](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3311197/)
38. Davis RC, Thomason AR, Fuller ML, Slovlin JP, Chou CC, et al. (1987) mRNA species regulated during the differentiation of HL60 cells to macrophages and neutrophils. *Dev Biol* 119: 164–174. PMID: [3792627](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3792627/)
39. Henderson LM, Banting G, Chappell JB (1995) The arachidonate-activable, NADPH oxidase-associated H⁺ channel. Evidence that gp91-phox functions as an essential part of the channel. *J. Biol. Chem.* 270,5909–5916. PMID: [7890722](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7890722/)
40. Paclet MH, Henderson LM, Campion Y, Morel F, Dagher MC (2004) Localization of Nox2 N-terminus using polyclonal antipeptide antibodies. *Biochem J* 382: 981–6. PMID: [15233623](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15233623/)
41. Lin C, Wang H (2012) NADPH oxidase is involved in H₂O₂-induced differentiation of human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. *Cell Biol Int* 36(4):391–395. doi: [10.1042/CBI20110290](https://doi.org/10.1042/CBI20110290) PMID: [22082048](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22082048/)
42. Shimizu Y, Hendershot LM (2009) Oxidative folding: cellular strategies for dealing with the resultant equimolar production of reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal* 11(9): 2317–31. doi: [10.1089/ARS.2009.2501](https://doi.org/10.1089/ARS.2009.2501) PMID: [19243234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19243234/)
43. Unger RH (1991) Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells. *Science* 8: 251:1200–12005. PMID: [2006409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2006409/)
44. Liu W, Zhu X, Wang Q, Wang L (2013) Hyperglycemia induces endoplasmic reticulum stress-dependent CHOP expression in osteoblasts. *Exp Ther Med* 5(5):1289–1292. PMID: [23737866](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23737866/)
45. Lakshmanan AP, Harima M, Suzuki K, Soetikno V, Nagata M, et al. (2013) The hyperglycemia stimulated myocardial endoplasmic reticulum (ER) stress contributes to diabetic cardiomyopathy in the transgenic non-obese type 2 diabetic rats: a differential role of unfolded protein response (UPR) signaling proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 45(2):438–447. doi: [10.1016/j.biocel.2012.09.017](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.09.017) PMID: [23032698](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23032698/)
46. Sage AT, Holtby-Ottenhof S, Shi Y, Damjanovic S, Sharma AM, et al. (2012) Metabolic syndrome and acute hyperglycemia are associated with endoplasmic reticulum stress in human mononuclear cells. *Obesity (Silver Spring)* 20(4):748–755. doi: [10.1038/oby.2011.144](https://doi.org/10.1038/oby.2011.144) PMID: [21633399](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21633399/)
47. Walrand S, Valeix S, Rodriguez C, Ligoit P, Chassagne J, et al. (2003) Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin Chim Acta* 331: 103–10. PMID: [12691870](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12691870/)
48. Ellis JA, Mayer SJ, Jones OT (1988) The effect of the NADPH oxidase inhibitor diphenyleioidonium on aerobic and anaerobic microbicidal activities of human neutrophils. *Biochem J* 251(3): 887–91. PMID: [2843166](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2843166/)
49. Kass GE, Orrenius S (1999) Calcium signaling and cytotoxicity. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 1: 25–35. PMID: [10229704](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10229704/)
50. Ahmed N, Berridge MV (1999) N-glycosylation of glucose transporter-1 (Glut-1) is associated with increased transporter affinity for glucose in human leukemic cells. *Leuk Res* 4: 395–401.
51. Schuster DP, Brody SL, Zhou Z, Bernstein M, Arch R, et al. (2007) Regulation of lipopolysaccharide-induced increases in neutrophil glucose uptake. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292(4): 845–851. PMID: [17122354](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17122354/)
52. Thorens B, Mueckler M (2010) Glucose transporters in the 21st Century. *Am J PhysiolEndocrinolMetab* 298(2).
53. Back SH, Kaufman RJ (2012) Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem* 81: 767–93. doi: [10.1146/annurev-biochem-072909-095555](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072909-095555) PMID: [22443930](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22443930/)
54. Brécharde S, Bueb JL, Tschirhart EJ (2005) Interleukin-8 primes oxidative burst in neutrophil-like HL-60 through changes in cytosolic calcium. *Cell Calcium* 37(6):531–40. PMID: [15862344](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15862344/)
55. Coe H, Michalak M (2009) Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Gen PhysiolBiophys* 28: 96–103.

56. Lytton J, Westlin M, Hanley MR (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem* 266: 17067–17071. PMID: [1832668](#)
57. Li MQ, Baumeister P, Roy B, Phan T, Foti D, et al. (2000) ATF6 as a transcription activator of the endoplasmic reticulum stress element: thapsigargin stress-induced changes and synergistic interactions with NF-Y and YY1. *Mol Cell Biol* 20: 5096–5106. PMID: [10866666](#)
58. Miyake H, Hara I, Arakawa S, Kamidono S (2000) Stress protein GRP78 prevents apoptosis induced by calcium ionophore, ionomycin, but not by glycosylation inhibitor, tunicamycin, in human prostate cancer cells. *J Cell Biochem* 77: 396–408. PMID: [10760948](#)
59. Samali A, FitzGerald U, Deegan S, Gupta S (2010) Methods for monitoring endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Int J Cell Biol* 2010: 830307–830318. doi: [10.1155/2010/830307](#) PMID: [20169136](#)
60. Teng Y, Gao M, Wang J, Kong Q, Hua H, et al. (2014) Inhibition of eIF2a dephosphorylation enhances TRAIL-induced apoptosis in hepatoma cells. *Cell Death Dis* 5: e1060. doi: [10.1038/cddis.2014.24](#) PMID: [24525736](#)
61. Li Y, Trush MA (1998) Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochem Biophys Res Commun* 253:295–299. PMID: [9878531](#)
62. Riganti C, Gazzano E, Polimeni M, Costamagna C, Bosia A, et al. (2004) Diphenyleneiodonium inhibits the cell redox metabolism and induces oxidative stress. *J Biol Chem* 279: 47726–47731. PMID: [15358777](#)
63. Zhai YP, Lu Q, Liu Y, Cheng Q, Wei Y, et al. (2013) Over-production of nitric oxide by oxidative stress-induced activation of the TGF- β 1/PI3K/Akt pathway in mesangial cells cultured in high glucose. *Acta Pharmacol Sinica* 34:507–514. doi: [10.1038/aps.2012.207](#) PMID: [23524565](#)
64. Clauss IM, Chu M, Zhao JL, Glimcher LH (1996) The basic domain/leucine zipper protein hXBP-1 preferentially binds to and transactivates CRE-like sequences containing an ACGT core. *Nucleic Acids Res* 24:1855–1864. PMID: [8657566](#)
65. Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, et al. (2001) Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412:300–307. PMID: [11460154](#)
66. Iwakoshi NN, Lee AH, Vallabhajosyula P, Otipoby KL, Rajewsky K, et al. (2003) Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat Immunol* 4:321–329. PMID: [12612580](#)
67. Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH (2003) XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 23:7448–7459. PMID: [14559994](#)
68. Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, Lee AH, Qian SB, et al. (2004) XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* 21:81–93. PMID: [15345222](#)
69. McGehee AM, Dougan SK, Klemm EJ, Shui G, Park B, et al. (2009) XBP-1-deficient plasmablasts show normal protein folding but altered glycosylation and lipid synthesis. *J Immunol* 183:3690–3699. doi: [10.4049/jimmunol.0900953](#) PMID: [19710472](#)
70. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107:881–891. PMID: [11779464](#)
71. Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, et al. (2007) IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* 318:944–949. PMID: [17991856](#)
72. Lu PD, Harding HP, Ron D (2004) Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol* 167:27–33. PMID: [15479734](#)
73. Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poepl A, Jurisica I, et al. (2011) Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* 333: 218–221. doi: [10.1126/science.1201219](#) PMID: [21737740](#)
74. Vattem KM, Wek RC (2004) Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11269–11274. PMID: [15277680](#)
75. Palam LR, Baird TD, Wek RC (2011) Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation. *J Biol Chem* 286:10939–10949. doi: [10.1074/jbc.M110.216093](#) PMID: [21285359](#)

ANEXO D
(Artigo Fontiers in Immunology - 2017)



Autophagy Is Impaired in Neutrophils from Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Wilson Mitsuo Tatagiba Kuwabara*, Rui Curi and Tatiana Carolina Alba-Loureiro

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

We tested the hypothesis that changes reported on functions of neutrophils from streptozotocin-induced diabetic rats involve autophagy impairment. Wistar rats were rendered diabetic by streptozotocin injection (65 mg/kg, i.v.), and the measurements were carried out 2 weeks afterward. Neutrophils were collected through intraperitoneal cavity lavage after 4 h of i.p. oyster glycogen type 2 injection. Neutrophils cultured with PMA (20 nM) for 1 h were used for analysis of plasma membrane integrity, DNA fragmentation, and mitochondrial depolarization by flow cytometry; expression of Atg5, Atg14, Beclin1, LC3BII, and Rab9 by RT-PCR; the contents of caspase 3, LC3BII/LC3BI, and pS6 by western blotting; ATP content by fluorescence assay; reactive oxygen species production by chemiluminescence (Luminol), and autophagy by immunofluorescence tracking LC3B cleavage. Herein, neutrophils from diabetic rats had high DNA fragmentation, depolarization of mitochondrial membrane, low content of ATP, and high content of cleaved caspase 3 after PMA stimulation. Neutrophils from diabetic rats also had low expression of LC3B, failed to increase the expression of Rab9 and Atg14 induced by PMA stimulation. Neutrophils from diabetic animals also had low cleavage of LC3BI to LC3BII and do not present punctate structures that label autophagosomal membranes after stimulus. The changes of neutrophil function reported in diabetic rats do involve impaired autophagy. The suppression of autophagy in neutrophils from diabetic rats may be associated with the activation of the mTOR signaling as indicated by the high content of pS6.

OPEN ACCESS

Edited by:

Uday Kishore,
Brunel University London, UK

Reviewed by:

Kenneth Reid,
Green Templeton College University
of Oxford, UK
Uttara SenGupta,
Lovely Professional University, India

*Correspondence:

Wilson Mitsuo Tatagiba Kuwabara
wilsonk@icb.usp.br

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular Innate Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 23 September 2016

Accepted: 06 January 2017

Published: 20 January 2017

Citation:

Kuwabara WMT, Curi R and
Alba-Loureiro TC (2017) Autophagy
Is Impaired in Neutrophils from
Streptozotocin-Induced Diabetic
Rats.
Front. Immunol. 8:24.
doi: 10.3389/fimmu.2017.00024

Keywords: neutrophil, diabetes type 1, autophagy, cell death and LC3B

INTRODUCTION

Changes in neutrophil functions, such as chemotaxis (1), production of inflammatory mediators (2, 3), phagocytosis (4), bactericidal activity (5, 6), production of reactive oxygen species (ROS) (7, 8), and programmed cell death (9), contribute to the high incidence of infections in diabetic patients. We, previously, reported that type I diabetes impairs neutrophil migration by decreasing the expression of adhesion proteins, e.g., intracellular adhesion molecule 1, production of prostaglandin E₂ (PGE₂), interleukin 1 β , tumor necrosis factor α (TNF- α), cytokine-induced neutrophil chemoattractant 2 α / β (CINC-2 α / β), and interleukin 10 (3, 10–12).

During the apoptosis process, neutrophils exhibit marked morphological changes, such as cytoplasm condensation, organelle aggregations, nuclear chromatin cleavage, formation of apoptotic

bodies, and reduction in cell volume (13, 14). Apoptotic neutrophils also have increased expression of pro-apoptotic B-cell lymphoma 2 (BCL-2) family members, activation of caspases, reduction of mitochondrial membrane potential, phosphatidylserine externalization on plasma membrane, and DNA fragmentation (15, 16). Autophagy plays an essential role in regulating cell death. It prevents apoptosis (17) by removing pro-apoptotic proteins, e.g., B-cell lymphoma-associated X and BCL-2 antagonist killer or by generating caspase inhibitors (18, 19). Autophagy is an evolutionary cellular degradation mechanism involved in cell homeostasis. It is mainly activated by nutrient starvation (20), oxidative stress (21), endoplasmic reticulum stress (22), and energy deficiency (23).

Macroautophagy is the major type of autophagy in which cytosol and organelles are sequestered within double-membrane vesicles (autophagosome) that deliver their contents to the lysosome/vacuole for enzymatic degradation and product recycling (24). Autophagosome formation is completed after the initiation, elongation, and expansion stages being controlled by autophagy-related genes (Atg) (25), Unc-51-like kinase, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and ATG12-ATG5-ATG16L1 complexes, and microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) family members (26, 27). In mammalian cells, the conversion of LC3BI to LC3BII is a marker of autophagy (28).

Autophagy is regulated by changes in cell metabolism (29). The serine/threonine-protein kinase mammalian target of rapamycin (mTOR) is known to play a central role in cell survival, growth, proliferation, and cell metabolism by increasing various anabolic processes (e.g., lipids and proteins synthesis), and by inhibiting catabolic processes, such as autophagy (30, 31). This protein is activated whenever there is nutrient surplus in the cell, such as amino acids, free fatty acids (FFAs), and glucose (29, 30, 32). Activated mTOR phosphorylates the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) and the p70 ribosomal S6 kinase 1 (S6K1), which phosphorylates the ribosomal protein S6 and consequently regulates protein synthesis (33). Moreover, stimulation of mTOR leads to activation of sterol regulatory element-binding protein 1 (34) and of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) (35) and so regulates lipid synthesis. mTOR activation may inhibit autophagy through Atg13, UNC-51-like kinase 1 (ULK1) phosphorylation. Phosphorylated Atg13 and ULK1 become inactive and then block the initiation of the autophagy process (29, 36–38).

Autophagy is involved in different steps of neutrophil defense against pathogens. Yano and Kurata (39) described that the mobilization of neutrophil lysosomes/endosomes and the release of their cargoes into the autophagic-vesicles contribute to the intracellular pathogen killing. LC3BII was detected in phagosomes from bone marrow-derived murine neutrophils (40). Mitroulis' group reported that autophagy plays an important role in the phagocytosis-independent and phagocytosis-dependent microorganism killing in human neutrophils (41).

The information above led us to postulate that impaired autophagy may be involved in the changes of neutrophil functions in type-I diabetes. Autophagy was examined in neutrophils from streptozotocin-induced diabetic rats for 2 weeks. The following autophagy signs were measured: expression of LC3B,

response of Atg5, Atg14, beclin-1, and Ras-related protein 9 (Rab9) to Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA), cleavage of LC3BI to LC3BII, content of pS6 and ATP levels. The participation of mTOR signaling was estimated by measuring its product, the pS6 content. Neutrophil function was assessed by measurement of apoptosis markers (DNA fragmentation, mitochondrial membrane depolarization, and caspase 3 activation) and PMA-stimulated ROS production.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats weighing 200 ± 20 g (about 2 months of age) were obtained from the Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo. The rats were maintained at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ under a cycle of 12 h light: 12 h darkness, being allowed free access to food and water. The Animal Ethical Committee of the Institute of Biomedical Sciences approved the experimental procedure of this study (number 148/2009).

Induction of Type-1 Diabetes

The experimental type 1 diabetes state was induced by intravenous injection of streptozotocin (65 mg/kg b.w.) dissolved in citrate buffer, pH 4.2. Control rats were injected with citrate buffer. Forty-eight hours after streptozotocin injection, blood glucose levels above 200 mg/dL confirmed the diabetic state. Blood was taken from the tail and glucose measured by using a glucose meter (Roche Diagnostics Corporation, IN, USA). Alba-Loureiro et al. (3, 11, 12) used a similar protocol.

Experimental Protocol of the Study

After 2 weeks of diabetes induction, fed rats were euthanized between 9:00 and 10:00 a.m. Neutrophils were obtained 4 h after the intraperitoneal injection of 10 mL 1% (w/v) glycogen solution (oyster glycogen type II) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) in phosphate-buffered saline (PBS) by intraperitoneal lavage with 20 mL PBS. The cell suspension was centrifuged at 4°C ($500 \times g$ for 10 min). Rimele et al. (42) and Sturm et al. (43) used similar procedure.

Cell Culture

Neutrophils were cultured for 1 h, with or without PMA (20 nM), in endotoxin-free RPMI 1640 medium containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere.

Analysis of Plasma Membrane Integrity

Neutrophils (1×10^6) were centrifuged at $1,000 \times g$ for 15 min at 4°C , and the pellet obtained was re-suspended in 500 μL PBS and incubated with propidium iodide (PI) (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 5 min. After incubation at room temperature, the cells were analyzed in a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Juan, CA, USA) using the Cell Quest software (Becton Dickinson). The equipment was set to analyze live and dead cells, and the debris were identified but not quantified. Fluorescence was

measured as described above using the FL2 channel (Orange-red fluorescence—585/42 nm). Martins de Lima et al. (44) and Levada-Pires et al. (45) used similar procedure.

DNA Fragmentation Assay

Neutrophils (1×10^6) were suspended in a solution containing 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide, 0.1% sodium citrate, and 0.1% Triton X-100 that permeabilizes the cells and allows the incorporation of the dye in the DNA. The cells were then incubated for 30 min at room temperature. Fluorescence was measured and analyzed by flow cytometry as described by Nicoletti et al. (46).

Mitochondrial Transmembrane Potential ($\Delta\Psi\text{m}$) Measurement

Neutrophils (3×10^6 cells/mL) were re-suspended in RPMI 1640 medium and incubated with 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolycarbocyanine iodide (JC-1) at 3.5 μM (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) at 37°C for 15 min. A control experiment was performed by incubation with carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) at 10 nM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) for 15 min at 37°C. Cells were then washed and re-suspended in 500 μL PBS and analyzed immediately afterward. JC-1 fluorescence was assessed by flow cytometry using FL1 (Green fluorescence—530/30 nm) and FL2 (Orange-red fluorescence—585/42 nm) channels. Distributions of red and green fluorescences from JC-1 were displayed as two-color contour plot analysis. The data are expressed as the ratio of the mean fluorescence intensity.

Luminol-Enhanced Chemiluminescence Assay of ROS Production

Luminol (500 μM) was added to neutrophil (1×10^6 cells/mL) in Hank's balanced salt solution supplemented with $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.26 M), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.81 mM), and glucose (5.5 mM), at 37°C, in a final volume of 0.2 mL. Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindione) is a chemical light amplifier. The chemiluminescence response was monitored in the presence or absence of PMA (160 nM) for 45 min, at 37°C, in a microplate luminometer (Synergy HT, Biotek, USA). NADPH oxidase complex inhibitor, diphenylene iodonium (DPI) at 10 μM and a PKC inhibitor, GF109203x (GFX) at 0.625 μM were used.

Determination of ATP Content

Neutrophils (1×10^7) were re-suspended in 100 μL trichloroacetic acid, and the intracellular ATP levels were determined using the ATP determination kit according to manufacturer's instructions (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

Western Blot Analysis

Cells (1×10^7) were re-suspended in 60 μL Triton X100 lysis buffer containing protease and phosphatase inhibitors. Proteins were resolved in SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked for 1 h at room temperature with 5% skim milk and incubated with the specific primary antibodies overnight. Following incubation with secondary antibody

conjugated to horseradish peroxidase, the bands were identified using the enhanced chemiluminescence system (Amersham Biosciences). Ponceau staining was used as the inner control (47, 48). Immunoblots were scanned and quantified using the ImageJ® software. Caspase 3, pS6, S6, and LC3BII polyclonal antibodies were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA, USA).

Immunofluorescence Assays

Neutrophils (2×10^4) were left to adhere to slides with the aid of a FANEM centrifuge (Excelsa Flex 3400). Treatment with paraformaldehyde (at 4%), for 30 min, was used to fix the cells. Neutrophils were permeabilized with 3% BSA–0.05% saponin solution for 30 min. After permeabilization, cells were blocked with 10% FBS for 1 h. Cells were incubated with LC3BI/II primary antibody (1:200) (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) in a humidified chamber overnight. After overnight labeling with the primary antibody, neutrophils were incubated with fluorescent secondary antibody (1:10,000) (Donkey anti-Rabbit Alexa Fluor 488, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) for 1 h. Slides were then mounted with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ProLong® Gold Mountant (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, USA). Slides were evaluated in a multiphoton microscope LSM 780 NLO (Zeiss, Oberkochen, Germany). Analysis was performed in FIJI Image J software, cell by cell (at least 30 cells per condition per animal), and results represent the mean of three independent experiments. The control group Mean Intensity of Fluorescence (MIF) normalized the MIF of studied groups.

Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA was obtained from 1×10^7 neutrophils by the guanidine isothiocyanate extraction method using TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (49) followed by isolation using RNeasy mini kit (Qiagen). The purity was assessed by the 260/280 nm ratio and the quantity measured at 260 nm. The cDNA was synthesized from total RNA (1.0 μg) using the High Capacity kit (Invitrogen). The following primers were used: Atg14 (5'-TGCCGAACAATGGGGACTAC-3' and 5'-AGGCAGGGTTGTTATGCTCC-3'), Atg5 (5'-CTCAGCTCTGCCTTGAACA-3' and 5'-GTGAGCCTCAACTGCATCCT-3'), Beclin (5'-AGCACGCCATGTATAGCAAAGA-3' and 5'-GGAAGAGGGAAA GGACAGCAT-3'), LC3II (5'-CCAAGCCTTCTTCCTCCTGG-3' and 5'-TCTCCTGGGAGGCATAGACC-3'), and Rab9 (5'-CCAATGTTGCTGCTGCCTTT-3' and 5'-GAGTTTGGCTTGGGCTTTCG-3'). Real-time PCR analysis was performed using the SyBR Green JumpStart kit (Sigma Aldrich) in a Rotor Gene 6000 equipment (Corbett Research, Mortlake, Australia). Gene expression was performed by $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ using RPL37a gene (5'-CGCTAAGTACACTTGCTCCTTCTG-3' and 5'-GCCACTGTTTCA TGCAGGAAC-3') as inner control.

Data Analysis

Results are presented as mean \pm SEM. Statistical significance was assessed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test. $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

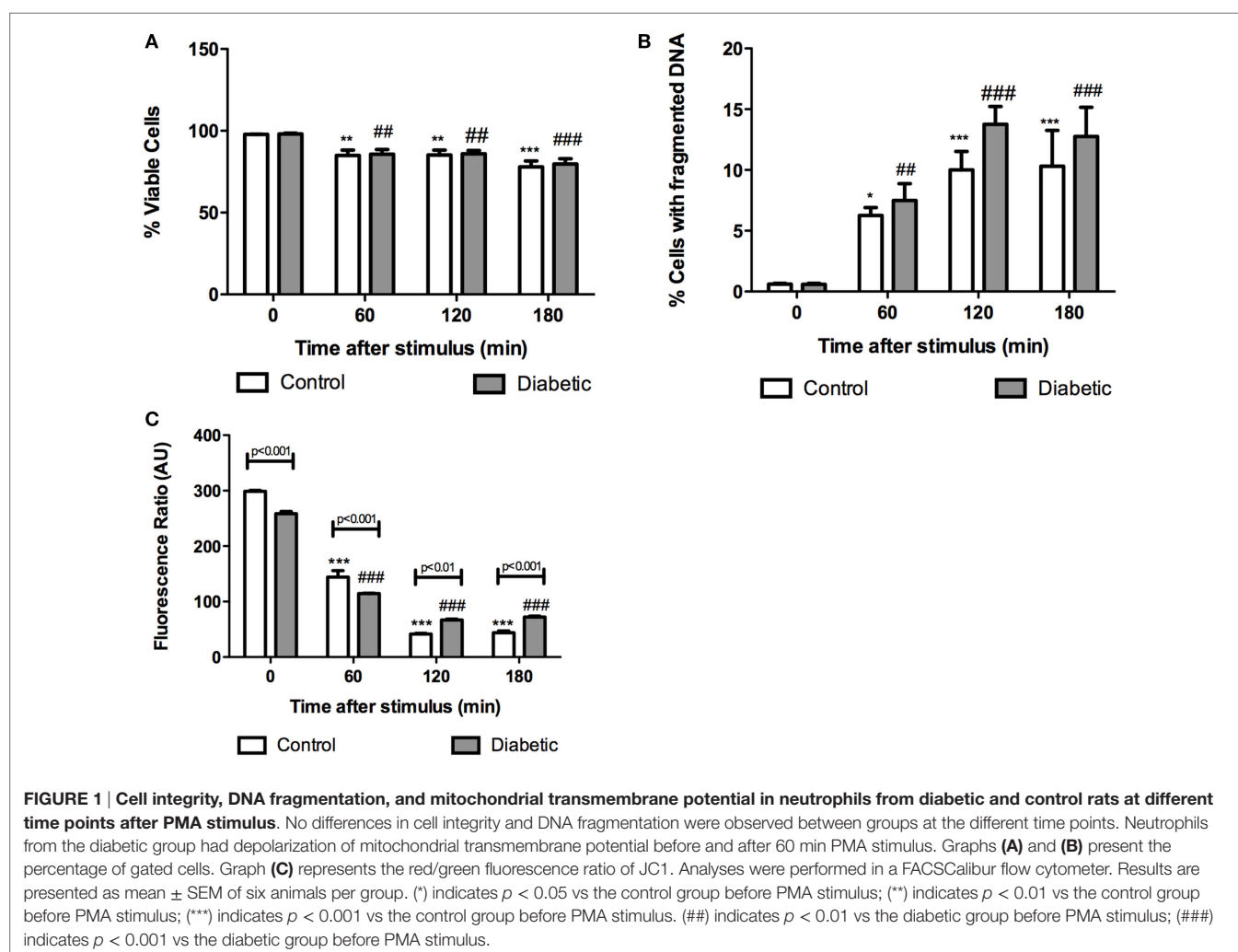
RESULTS

As compared to controls, diabetic rats exhibited a significant reduction in body weight gain during the experimental period as expected, 67 ± 4 g for the control vs 12 ± 6 g for the diabetic groups ($p < 0.0001$); and the blood glucose levels were significantly elevated: 113 ± 3 mg/dL for the control and 457 ± 21 mg/dL for the diabetic groups ($p < 0.0001$). Neutrophil counts were performed 4 h after intraperitoneal injection of 10 mL (1%, w/v) oyster glycogen type II solution. The number of cells that migrated to the peritoneal cavity ($\times 10^7$; mean \pm SEM) was: 12.3 ± 2.7 for the control group and 6.7 ± 1.8 ($p < 0.0001$) for the diabetic group.

We, first, investigated the time course feature of neutrophil death after PMA (20 nM) treatment. The 60-minute period was then established as the time point in which the cell was not yet dead but the cell death process had possibly already been triggered. In this time point, neutrophils from both groups had decreased plasma membrane integrity (Figure 1A), increased DNA fragmentation (Figure 1B), and mitochondrial membrane depolarization (Figure 1C). Neutrophils from the diabetic group had significant mitochondrial membrane depolarization even in

the absence of PMA (basal) and higher degree of depolarization after 60-min PMA stimulus as compared to the control group (Figure 1C). PMA is a strong pharmacological agent that acts *via* PKC to promote NADPH oxidase complex assembly and oxidative burst. Reduced ROS production in neutrophils from STZ diabetic rats was observed (Figure 2). GFX and DPI, inhibitors of NADPH oxidase, fully inhibited ROS production in neutrophils from both groups, indicating that this enzyme complex is the main site of ROS production during PMA stimulation.

Mitochondria depolarization has been associated with mitochondrial membrane pore opening and release of Cytochrome *c*, which activates caspase-3 in the cytosol. Caspase-3 cleavage (activation) was increased in neutrophils from diabetic rats (Figure 3). Intracellular ATP content was measured before and after PMA stimulation (Figure 4). Neutrophils from diabetic rats had 35% lower ATP content before PMA stimulus (μ M, as mean \pm SEM of four animals; 55.8 ± 5.42 for control, and 36.4 ± 6.31 for diabetic) and 74% decrease in ATP content after PMA stimulus (μ M, as mean \pm SEM of four animals; 1.30 ± 0.49 for control, and 0.34 ± 0.14 for diabetic) when compared to cells of the control group.



Neutrophils from diabetic rats had lower expression of LC3B before and after PMA stimulus when compared to the control group (Figure 5C). The expression of Rab9 (Figure 5D) and Atg14 (Figure 5A) was increased in response to PMA in the control group but did not have any difference in neutrophils from diabetic rats as compared with non-stimulated cells. The expressions of Atg5 (Figure 5E) and Beclin1 (Figure 5B) remained unchanged in the experimental conditions herein reported. Autophagy involves cytosolic LC3BI proteolytic cleavage and lipidation to form the membrane-bound LC3BII. The content of LC3BII (an autophagy marker) was measured

by immunoblot analysis. The content of LC3BII was lowered in neutrophils from diabetic rats (Figure 6). The activation of autophagy was also investigated by the intracellular localization of LC3B using immunofluorescence. This protein is redistributed from a diffuse cytoplasmic pattern to form punctate structures that label pre-autophagosomal and autophagosomal membranes when autophagy is triggered (50). Neutrophils from diabetic rats with or without stimulus did not present punctate staining whereas it can be seen in PMA-stimulated neutrophils from control rats (Figure 7). Neutrophils from diabetic rats had higher content of phosphorylated S6 (pS6) when compared

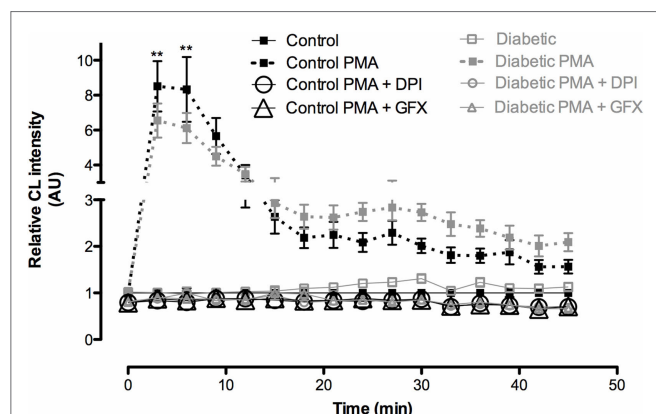


FIGURE 2 | Reactive oxygen species (ROS) production by neutrophils after PMA stimulus. Neutrophils from diabetic rats produced less ROS than the ones from controls. No difference was observed between groups without PMA stimulus. GFX and DPI abolished the production of ROS. Results represent relative chemiluminescence intensity \pm SEM from 12 animals per group. (**) indicates $p < 0.01$.

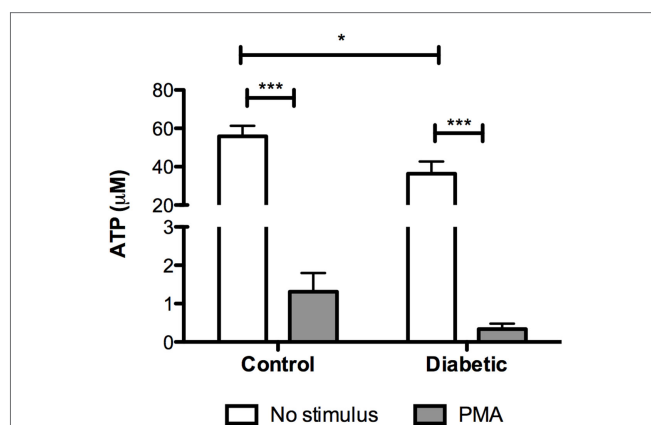


FIGURE 4 | ATP content in neutrophils before and after PMA stimulus. Neutrophils from diabetic had lower content of ATP. PMA decreased the content of ATP in both groups. Results presented as concentration of ATP (μM) \pm SEM from four animals per group. (*) indicates $p < 0.05$; (***) indicates $p < 0.001$.

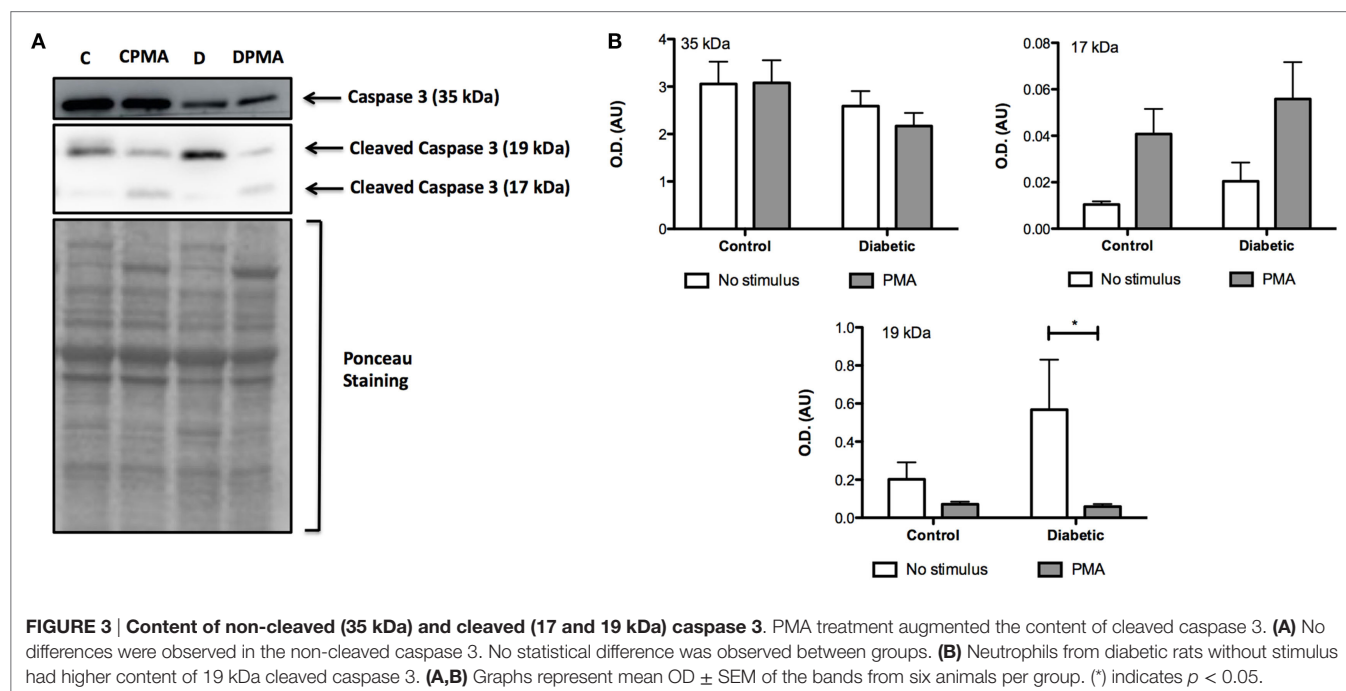


FIGURE 3 | Content of non-cleaved (35 kDa) and cleaved (17 and 19 kDa) caspase 3. PMA treatment augmented the content of cleaved caspase 3. (A) No differences were observed in the non-cleaved caspase 3. No statistical difference was observed between groups. (B) Neutrophils from diabetic rats without stimulus had higher content of 19 kDa cleaved caspase 3. (A,B) Graphs represent mean OD \pm SEM of the bands from six animals per group. (*) indicates $p < 0.05$.

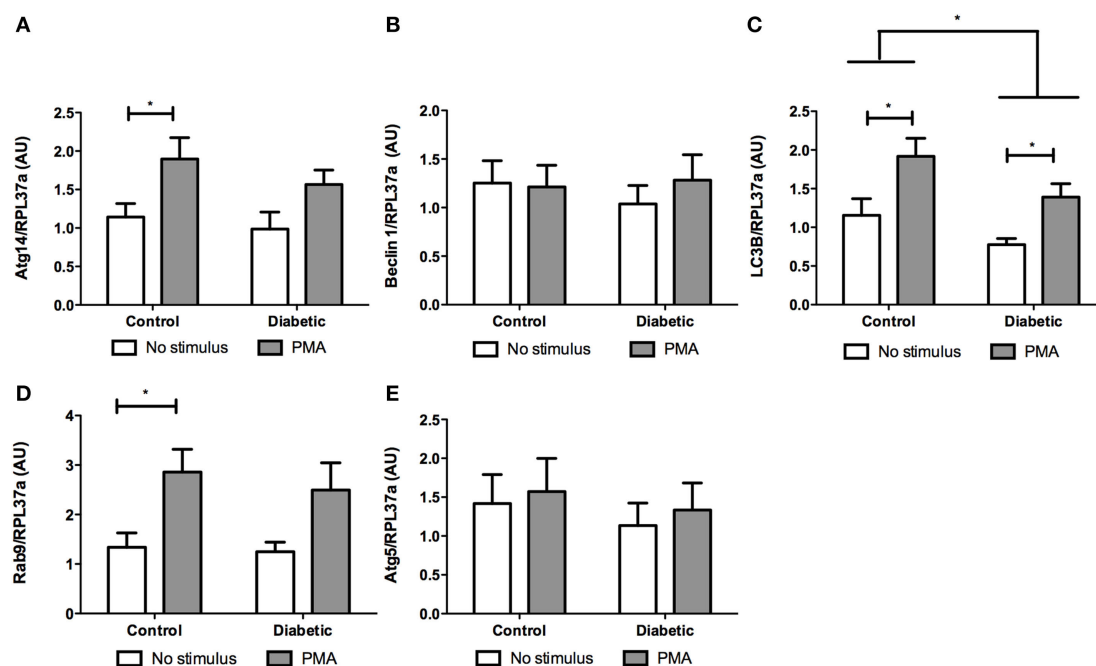


FIGURE 5 | Effect of reactive oxygen species on expression of genes related to autophagy. PMA augmented the expression of Atg14 (A) and Rab9 (D) in the control group and no statistic difference was observed in neutrophils from diabetic rats. LC3B expression was lower in the diabetic group (C). There were no differences in Beclin 1 (B) and Atg5 (E) expression. Results represent the relative expression of the genes \pm SEM from 12 animals per group. RPL37a was used as a reference control gene. (*) indicates $p < 0.05$.

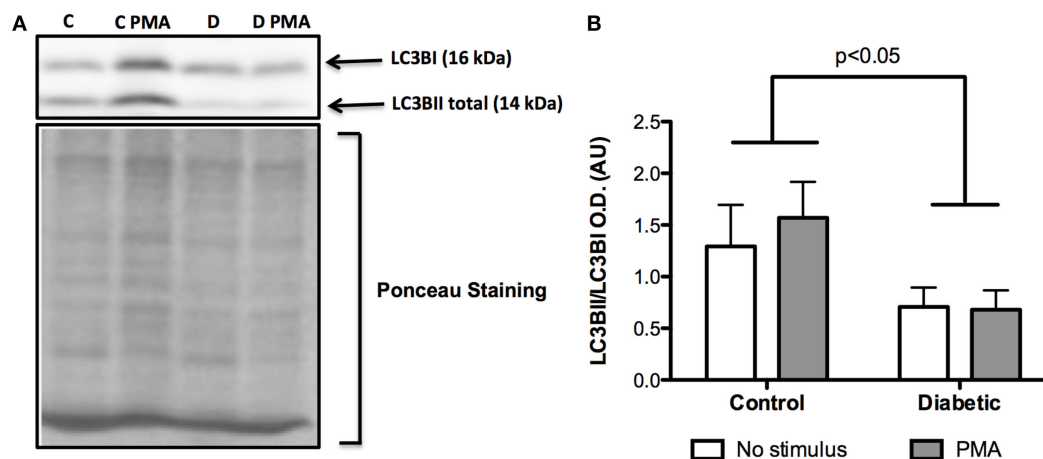


FIGURE 6 | Contents of LC3BI and LC3BII in neutrophils before and after PMA stimulus. Neutrophils from diabetic rats had low cleavage of LC3BI to LC3BII when compared to the control group (A). Graph (B) presents mean OD \pm SEM of the bands from six animals per group.

with neutrophils from controls (Figure 8), evidencing mTOR activation.

DISCUSSION

Evidence is presented, herein, that autophagy is impaired in neutrophils from diabetic rats. Malfunctioning mitochondria and decreased ATP content have been associated with impairment in autophagy and shortened neutrophil life span as

indicated by the increased content of cleaved caspase 3. This feature of neutrophils from diabetic rats is probably a consequence of the apoptotic process activation through autophagy suppression (51).

NADPH oxidase-derived ROS are involved in the phagocytosis and autophagy pathways during the recruitment of LC3B to phagosomes in phagocytic cells (52, 53). PMA has been reported to induce autophagy in neutrophils due to increased oxidative burst *via* NADPH oxidase (41). We described, herein, that

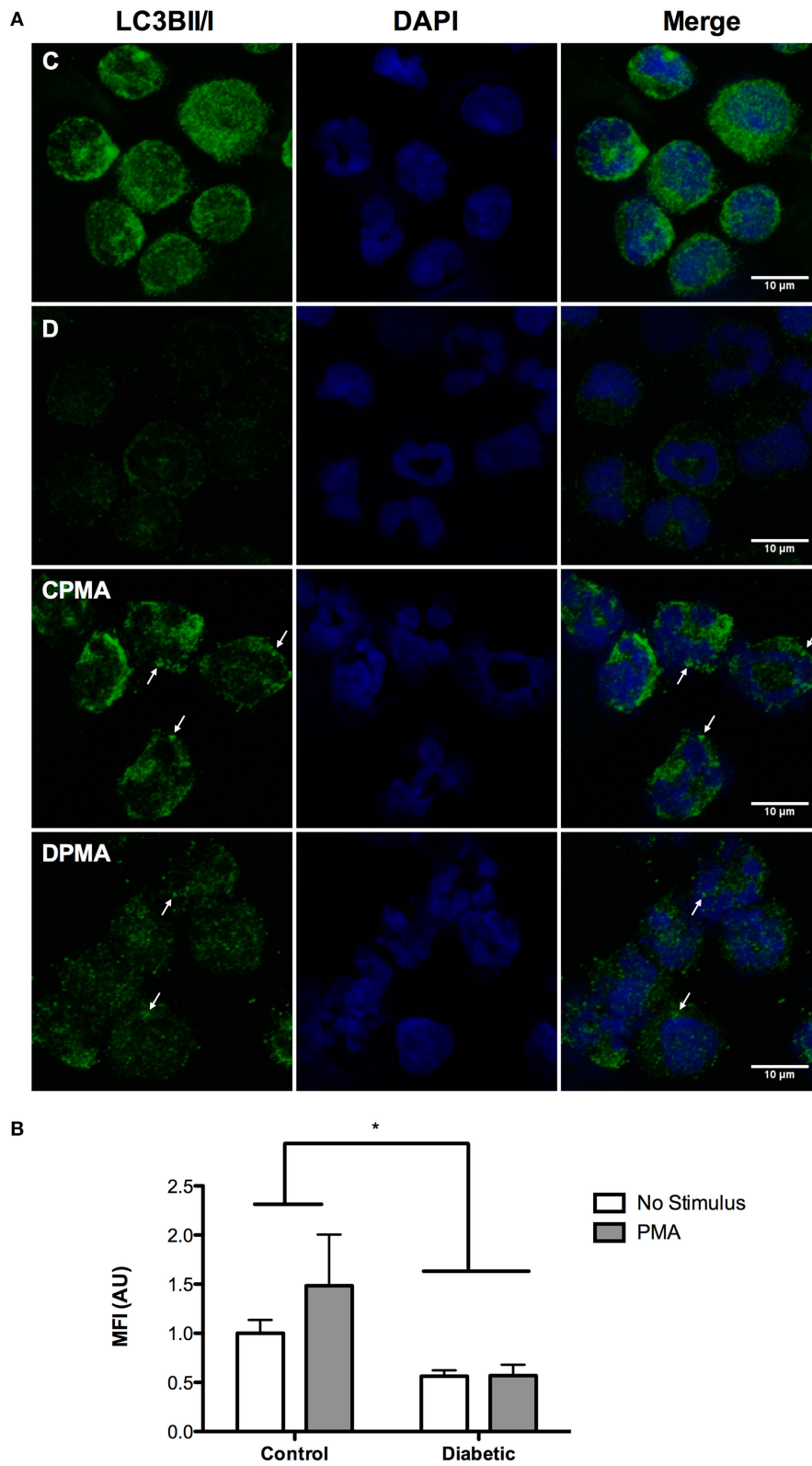
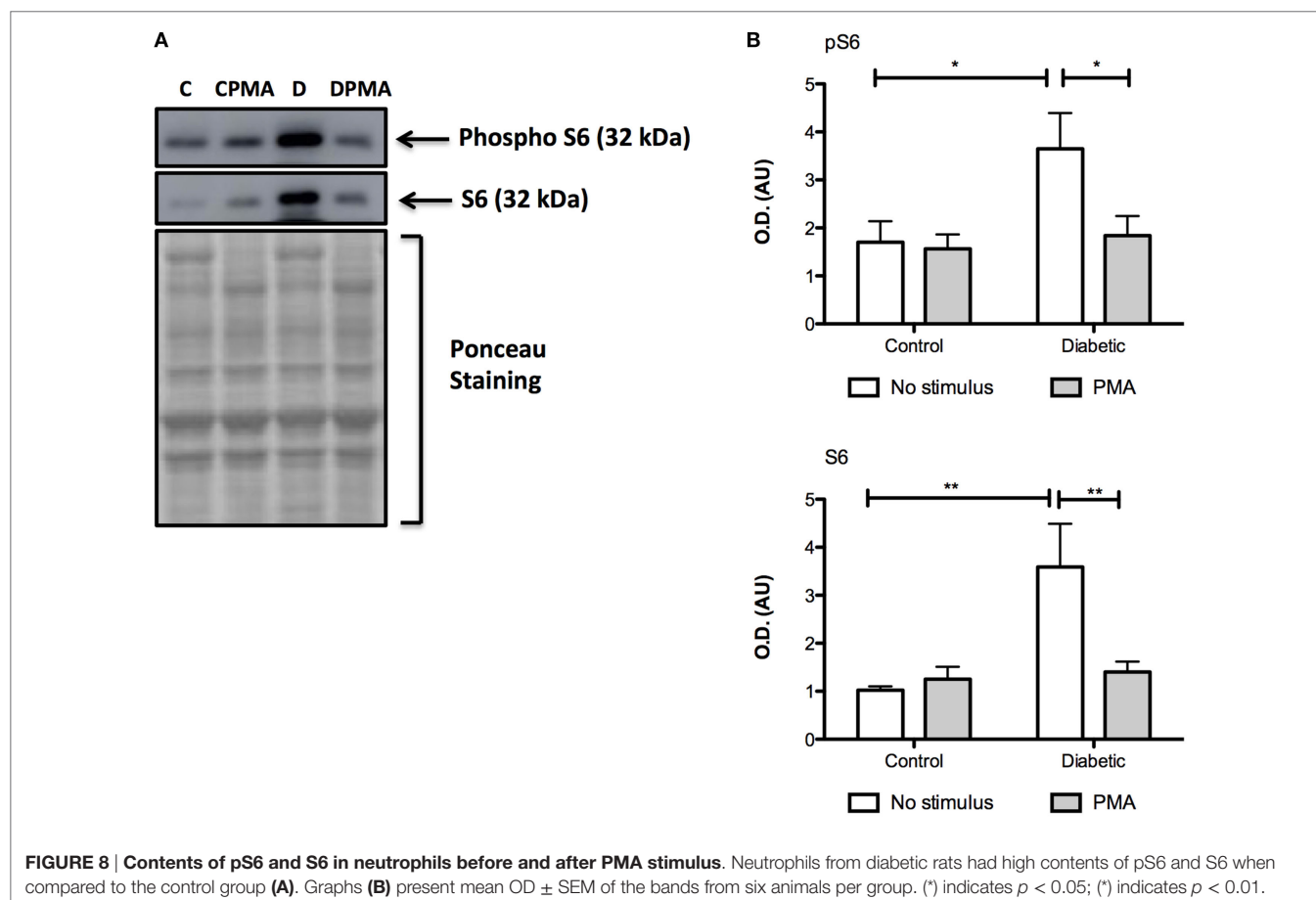


FIGURE 7 | Immunofluorescence of LC3BII/I in neutrophils before and after PMA stimulus. Neutrophils from diabetic rats had low content of LC3BII/I before and after PMA stimulus when compared to the control group (A). Graph (B) presents MFI ± SEM of at least 30 cells per group. Analysis was performed cell by cell. The values were normalized by the control group. Green: LC3BII/I; blue (nucleus): DAPI. (*) indicates $p < 0.05$.



neutrophils from diabetic rats produce less ROS that leads to a decrease in microbial killing capacity, activation of ion channels, and protein modifications (54, 55). In fact, autophagy-deficient mice have reduced inflammatory potential of neutrophils as consequence of reduced myeloperoxidase (MPO) activity and ROS production through NADPH oxidase (56).

Low levels of ATP in neutrophils from diabetic rats might be a consequence of the respiratory chain loss-of-function induced by mitochondrial membrane depolarization. Mitochondrial dysfunction in PBMC and endothelial cells has been described in diabetic states (57–60). Alba-Loureiro et al. reported decreased glutamine consumption, unchanged glucose uptake, and augmented oxidation of FFAs in neutrophils from STZ-induced diabetic rats (11). FFAs easily cross plasma membrane and are oxidized in the mitochondria. However, FFA overload, particularly saturated FFA, promotes mitochondrial uncoupling and inhibition of the respiratory chain leading to organelle dysfunction (61). The increase of FFA oxidation in neutrophils from diabetic rats might then be associated with mitochondrial dysfunction (depolarization) and so decreased intracellular ATP content. Low levels of ATP increase the DNA fragmentation susceptibility and so cell death through increased oxidative stress (62). FFAs also increase inner mitochondrial membrane permeability with consequent release of pro-apoptotic proteins to cytosol (61) that then prompt apoptosis in neutrophils from diabetic rats.

Autophagy is inhibited by mTOR during the condition of nutrient surplus (63). Neutrophils from diabetic rats are constantly exposed to an overload of nutrients that exist in the plasma of the diabetic individuals, mainly composed by glucose and FFA (64–66). FFAs cross the plasma membrane freely due to their hydrophobicity and activate mTOR as observed in other cell types (32). Glucose also activates mTOR (29, 32). However, glucose has limited entry into leukocytes since these cells present the glucose transporter 1 (GLUT1). GLUT1 has low K_m (1–2 mM), and so, once the transport is saturated, there is no further glucose entry into the cells despite its levels increase in plasma (67).

Reactive oxygen species are known to inhibit mTOR in different cell types (68, 69). After PMA stimulus, a decrease of pS6 levels was observed in neutrophils from the diabetic group. This evident decrease was not observed in neutrophils from the control group, mainly because, differently from diabetic rats, there is no overload of nutrients in plasma of fasted healthy animals.

Neutrophils from diabetic rats fail to trigger autophagy as indicated by low expression of the LC3B and reduced cleavage of LC3BI to LC3BII. Bhattacharya et al. (70) described an important role of autophagy for neutrophil functions in inflammation and autoimmune diseases. Bone marrow-derived neutrophils from Atg7 and Atg5 knockout mice have reduced degranulation of primary, secondary, and tertiary granules, mainly due to decreased neutrophil granule fusion to phagosomes (56). Macrophages from Atg5 knockout mice have increased susceptibility to death

indicating that autophagy reduces advanced atherosclerosis induction of macrophage death (71).

In conclusion, we can speculate that changes observed in neutrophils (e.g., increased apoptosis and ROS production) from diabetic rats could be associated with suppressed autophagy by mTOR over activation leading to cell death.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

WK: experiments design and development and article writing; RC: article review; TA-L: experiments design and development, article writing, and article review.

REFERENCES

- Mowat AG, Baum J. Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* (1971) 284:621–7. doi:10.1056/NEJM197103252841201
- Boichot E, Sannomiya P, Escofier N, Germain N, Fortes ZB, Lagente V. Endotoxin-induced acute lung injury in rats. Role of insulin. *Pulm Pharmacol Ther* (1999) 12:285–90. doi:10.1006/pupt.1999.0212
- Alba-Loureiro TC, Martins EF, Landgraf RG, Jancar S, Curi R, Sannomiya P. Role of insulin on PGE₂ generation during LPS-induced lung inflammation in rats. *Life Sci* (2006) 78:578–85. doi:10.1016/j.lfs.2005.05.057
- Andrews T, Sullivan KE. Infections in patients with inherited defects in phagocytic function. *Clin Microbiol Rev* (2003) 16:597–621. doi:10.1128/CMR.16.4.597-621.2003
- Tan JS, Anderson JL, Watanakunakorn C, Phair JP. Neutrophil dysfunction in diabetes mellitus. *J Lab Clin Med* (1975) 85:26–33.
- Naghibi M, Smith RP, Baltch AL, Gates SA, Wu DH, Hammer MC, et al. The effect of diabetes mellitus on chemotactic and bactericidal activity of human polymorphonuclear leukocytes. *Diabetes Res Clin Pract* (1987) 4(1):27–35. doi:10.1016/S0168-8227(87)80030-X
- Markert M, Cech P, Frei J. Oxygen metabolism of phagocytosing human polymorphonuclear leukocytes in diabetes mellitus. *Blut* (1984) 49:447–55. doi:10.1007/BF00320487
- Nielsen CB, Hindson DA. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte respiratory burst by elevated glucose concentrations in vitro. *Diabetes* (1989) 38:1031–5. doi:10.2337/diab.38.8.1031
- Tennesser SD, Finkenauer R, Dwivedi A. Absence of lipopolysaccharide-induced inhibition of neutrophils apoptosis in patients with diabetes. *Arch Surg* (1999) 134:1229–33. doi:10.1001/archsurg.134.11.1229
- Alba-Loureiro TC, Martins EF, Miyasaka CK, Lopes LR, Landgraf RG, Jancar S, et al. Evidence that arachidonic acid derived from neutrophils and prostaglandin E₂ are associated with the induction of acute lung inflammation by lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. *Inflamm Res* (2004) 53:658–63. doi:10.1007/s00011-004-1308-7
- Alba-Loureiro TC, Hirabara SM, Mendonça JR, Curi R, Pithon-Curi TC. Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils. *J Endocrinol* (2006) 188:295–303. doi:10.1677/joe.1.06438
- Alba-Loureiro TC, Pithon-Curi TC, Curi R. Reduced cytokine production by glycogen-elicited peritoneal cells from diabetic rats. *Shock* (2008) 30:308–10. doi:10.1097/SHK.0b013e318164e834
- Savill J, Haslett C. Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Semin Cell Biol* (1995) 6(6):385–93. doi:10.1016/S1043-4682(05)80009-1
- Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* (1993) 14:131–6. doi:10.1016/0167-5699(93)90215-7
- Altzner F, Conus S, Cavalli A, Folkers G, Simon HU. Calpain-1 regulates Bax and subsequent Smac-dependent caspase-3 activation in neutrophil apoptosis. *J Biol Chem* (2004) 279:5947–57. doi:10.1074/jbc.M308576200
- Andina N, Conus S, Schneider EM, Fey MF, Simon HU. Induction of Bim limits cytokine-mediated prolonged survival of neutrophils. *Cell Death Differ* (2009) 16:1248–55. doi:10.1038/cdd.2009.50

FUNDING

This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 163439/2013-3) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2010/12818-0; 2015/03175-1).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00024/full#supplementary-material>.

- Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, et al. Functional and physical interaction between bcl-x(l) and a bh3-like domain in beclin-1. *EMBO J* (2007) 26:2527–39. doi:10.1038/sj.emboj.7601689
- Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* (2004) 12:1221–8. doi:10.1038/ncb1192
- Lindqvist LM, Heinlein M, Huang DC, Vaux DL. Prosurvival Bcl-2 family members affect autophagy only indirectly, by inhibiting Bax and Bak. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111:8512–7. doi:10.1073/pnas.1406425111
- Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* (2005) 169:425–34. doi:10.1083/jcb.200412022
- Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo AM. Oxidative stress and autophagy. *Antioxid Redox Signal* (2006) 8:152–62. doi:10.1089/ars.2006.8.152
- Yorimitsu T, Nair U, Yang Z, Klionsky DJ. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem* (2006) 281:30299–304. doi:10.1074/jbc.M607007200
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* (2010) 90:1383–435. doi:10.1152/physrev.00030.2009
- Eskelinen EL. Maturation of autophagic vacuoles in mammalian cells. *Autophagy* (2005) 1:1–10. doi:10.4161/auto.1.1.1270
- Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* (1993) 333:169–74. doi:10.1016/0014-5793(93)80398-E
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2011) 27:107–32. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154005
- Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2013) 14:759–74. doi:10.1038/nrm3696
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* (2000) 19:5720–8. doi:10.1093/emboj/19.21.5720
- Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* (2010) 584(7):1287–95. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.017
- Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* (2009) 122:3589–94. doi:10.1242/jcs.051011
- Codogno P, Meijer AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* (2005) 12(Suppl 2):1509–18. doi:10.1038/sj.cdd.4401751
- Mir SU, George NM, Zahoor L, Harms R, Guinn Z, Sarvetnick NE. Inhibition of autophagic turnover in β -cells by fatty acids and glucose leads to apoptotic cell death. *J Biol Chem* (2015) 290(10):6071–85. doi:10.1074/jbc.M114.605345
- Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2009) 10:307–18. doi:10.1038/nrm2672
- Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leever S, et al. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab* (2008) 8:224–36. doi:10.1016/j.cmet.2008.07.007

35. Kim JE, Chen J. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes* (2004) 53:2748–56. doi:10.2337/diabetes.53.11.2748
36. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* (2009) 20:1992–2003. doi:10.1091/mbc.E08-12-1249
37. Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* (2009) 284:12297–305. doi:10.1074/jbc.M900573200
38. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* (2009) 20:1981–91. doi:10.1091/mbc.E08-12-1248
39. Yano T, Kurata S. Induction of autophagy via innate bacterial recognition. *Autophagy* (2008) 4:958–60. doi:10.4161/auto.6802
40. Huang J, Canadien V, Lam GY, Steinberg BE, Dinuer MC, Magalhaes MA, et al. Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) 106:6226–31. doi:10.1073/pnas.0811045106
41. Mitroulis I, Kourtzelis I, Kambas K, Rafail S, Chrysanthopoulou A, Speletas M, et al. Regulation of the autophagic machinery in human neutrophils. *Eur J Immunol* (2012) 40:1461–72. doi:10.1002/eji.200940025
42. Rimele TJ, Sturm RJ, Adams LM, Henry DE, Heaslip RJ, Weichman BM, et al. Interaction of neutrophils with vascular smooth muscle: identification of a neutrophil-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther* (1988) 245:102–11.
43. Sturm RJ, Holloway DA, Buckley S, Osborne MC, Grimes D, Weichman BM, et al. Potential regulatory role of inflammatory cells on local vascular smooth muscle tone. *Agents Actions* (1989) 27:414–7. doi:10.1007/BF01972838
44. Martins de Lima T, Cury-Boaventura MF, Giannocco G, Nunes MT, Curi R. Comparative toxicity of fatty acids on a macrophage cell line (J774). *Clin Sci (Lond)* (2006) 111:307–17. doi:10.1042/CS20060064
45. Levada-Pires AC, Fonseca CE, Hatanaka E, Alba-Loureiro T, D'Angelo A, Velhote FB, et al. The effect of an adventure race on lymphocyte and neutrophil death. *Eur J Appl Physiol* (2010) 109(3):447–53. doi:10.1007/s00421-010-1363-4
46. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* (1991) 139(2):271–9. doi:10.1016/0022-1759(91)90198-O
47. Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT, Weiler IJ. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J Neurosci Methods* (2008) 172:250–4. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.05.003
48. Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem* (2010) 15:318–20. doi:10.1016/j.ab.2010.02.036
49. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* (1987) 162:156–9. doi:10.1006/abio.1987.9999
50. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* (2016) 1:1–222. doi:10.1080/15548627.2015.1100356
51. Oral O, Akkoc Y, Bayraktar O, Gozuacik D. Physiological and pathological significance of the molecular cross-talk between autophagy and apoptosis. *Histol Histopathol* (2016) 31:479–98. doi:10.14670/HH-11-714
52. Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SW, Moshiah S, Dorsey F, Connell S, et al. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* (2007) 450:1253–7. doi:10.1038/nature06421
53. Lamb FS, Hook JS, Hilkin BM, Huber JN, Volk AP, Moreland JG. Endotoxin priming of neutrophils requires endocytosis and NADPH oxidase-dependent endosomal reactive oxygen species. *J Biol Chem* (2012) 287:12395–404. doi:10.1074/jbc.M111.306530
54. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* (2007) 87:245–313. doi:10.1152/physrev.00044.2005
55. Lam GY, Huang J, Brumell JH. The many roles of NOX2 NADPH oxidase-derived ROS in immunity. *Semin Immunopathol* (2010) 32:415–30. doi:10.1007/s00281-010-0221-0
56. Abdel Fattah E, Bhattacharya A, Herron A, Safdar Z, Eissa NT. Critical role for IL-18 in spontaneous lung inflammation caused by autophagy deficiency. *J Immunol* (2015) 194:5407–16. doi:10.4049/jimmunol.1402277
57. Widlansky ME, Wang J, Shenouda SM, Hagen TM, Smith AR, Kizhakekuttu TJ, et al. Altered mitochondrial membrane potential, mass, and morphology in the mononuclear cells of humans with type 2 diabetes. *Transl Res* (2010) 156:1. doi:10.1016/j.trsl.2010.04.001
58. Shenouda SM, Widlansky ME, Chen K, Xu G, Holbrook M, Tabit CE, et al. Altered mitochondrial dynamics contributes to endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation* (2011) 124:444–53. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.014506
59. Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM, Vita JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord* (2010) 11:61–74. doi:10.1007/s11154-010-9134-4
60. Hartman ML, Shirihai OS, Holbrook M, Xu G, Kocherla M, Shah A, et al. Relation of mitochondrial oxygen consumption in peripheral blood mononuclear cells to vascular function in type 2 diabetes mellitus. *Vasc Med* (2014) 19(1):67–74. doi:10.1177/1358863X14521315
61. Di Paola M, Lorusso M. Interaction of free fatty acids with mitochondria: coupling, uncoupling and permeability transition. *Biochim Biophys Acta* (2006) 1757(9–10):1330–7. doi:10.1016/j.bbabi.2006.03.024
62. Aretz S, Auffarth GU, Kopitz J. Moderately reduced ATP levels promote oxidative stress and debilitate autophagic and phagocytic capacities in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2012) 53:5354–61. doi:10.1167/iov.12-9845
63. Bartolomé A, Kimura-Koyanagi M, Asahara S, Guillén C, Inoue H, Teruyama K, et al. Pancreatic β cell failure mediated by mTORC1 hyperactivity and autophagic impairment. *Diabetes* (2014) 63:2996–3008. doi:10.2337/db13-0970
64. Boden G. Free fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Proc Assoc Am Physicians* (1999) 111:241–8. doi:10.1046/j.1525-1381.1999.99220.x
65. Kelley DE, Mandarino LJ. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes* (2000) 49:677–83. doi:10.2337/diabetes.49.5.677
66. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* (1996) 97:2859–65. doi:10.1172/JCI118742
67. Kuwabara WM, Zhang L, Schuiki I, Curi R, Volchuk A, Alba-Loureiro TC. NADPH oxidase-dependent production of reactive oxygen species induces endoplasmic reticulum stress in neutrophil-like HL60 cells. *PLoS One* (2015) 10(2):e0116410. doi:10.1371/journal.pone.0116410
68. Chen L, Xu B, Liu L, Luo Y, Yin J, Zhou H, et al. Hydrogen peroxide inhibits mTOR signaling by activation of AMPK α leading to apoptosis of neuronal cells. *Lab Invest* (2010) 90(5):762–73. doi:10.1038/labinvest.2010.36
69. Liu L, Wise DR, Diehl JA, Simon MC. Hypoxic reactive oxygen species regulate the integrated stress response and cell survival. *J Biol Chem* (2008) 283(45):31153–62. doi:10.1074/jbc.M805056200
70. Bhattacharya A, Wei Q, Shin JN, Abdel Fattah E, Bonilla DL, Xiang Q, et al. Autophagy is required for neutrophil-mediated inflammation. *Cell Rep* (2015) 12:1731–9. doi:10.1016/j.celrep.2015.08.019
71. Liao X, Sluimer JC, Wang Y, Subramanian M, Brown K, Pattison JS, et al. Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis. *Cell Metab* (2012) 15(4):545–53. doi:10.1016/j.cmet.2012.01.022

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Kuwabara, Curi and Alba-Loureiro. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Goto-Kakizaki versus High Fat Diet: Two different approaches to study the development of Type 2 Diabetes Mellitus

Wilson M. Kuwabara^{1*}, Ana C. Panveloski-Costa¹, Caroline N. Yokota¹, Joice N. Pereira^{1, 2}, Jorge M. Filho³, Rosangela P. Torres³, Sandro M. Hirabara², Rui Curi^{1, 2}, Tatiana C. Alba-Loureiro¹

¹Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil, ²Universidade Cruzeiro do Sul, Brazil, ³Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil

Submitted to Journal:
Frontiers in Physiology

Specialty Section:
Integrative Physiology

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
296171

Received on:
18 Jul 2017

Frontiers website link:
www.frontiersin.org

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

Author contribution statement

WK - Study design, Experimental Procedures, Writing, Article Review
 CY - Experimental Procedures
 AP-C - Experimental Procedures
 JP - Experimental Procedures
 JF - Article Review
 RT - Experimental Procedures
 SH - Study Design, Experimental Procedures, Article review
 RC - Article Review
 TA-L - Study design, Experimental Procedures, Writing, Article Review

Keywords

Diabetes Mellitus, Type 2, Obesity, Insulin Resistance, Goto-Kakizaki rats, high fat diet induced obesity

Abstract

Word count: 276

Type 2 Diabetes mellitus (T2DM) is an evident growing disease that affects different cultures throughout the world. The development and progression of this disease may occur differently among societies due to the various factors that influence the genesis of this pathology. T2DM occurs under the influence of three main factors: the genetic background, environmental and behavioral components. Obesity is strongly associated to the development of T2DM in the occident, while in the orient most of the diabetic patients are considered lean. Genetics may be a key factor in the development of T2DM in societies where obesity is not a recurrent public health problem. Herein, two different experimental models were used to understand the differences in the pathophysiology of T2DM due to different factors: the genetic background (Goto-Kakizaki (GK) rats) and the environmental influence (High fat diet (HFD) inducing obesity). Our results showed that the genesis and progression of the disease occurs differently between the studied groups. GK rats presented deficiency in the production/secretion of insulin after glucose challenge, insulin resistance without white adipose tissue (WAT) expansion, hyperglycemia and fasting increased levels of insulin; plasma increased levels of triglycerides, total cholesterol and LDL. On the other hand, HFD fed rats showed a great expansion of WAT, in which was observed immune infiltration and inflammation. This inflammatory state caused insulin resistance in this tissue and was probably the main cause of the impaired insulin sensitivity in this model. We conclude, herein, that both experimental models are important physiologic tools to understand the development of T2DM and that is of great importance to consider and explore the etiology of the disease in T2DM studies before drawing the correct conclusions.

Funding statement

This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 163439/2013-3) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2015/03175-1).

Ethics statements

(Authors are required to state the ethical considerations of their study in the manuscript, including for cases where the study was exempt from ethical approval procedures)

Does the study presented in the manuscript involve human or animal subjects: Yes

Please provide the complete ethics statement for your manuscript. Note that the statement will be directly added to the manuscript file for peer-review, and should include the following information:

- Full name of the ethics committee that approved the study
- Consent procedure used for human participants or for animal owners
- Any additional considerations of the study in cases where vulnerable populations were involved, for example minors, persons with

disabilities or endangered animal species

As per the Frontiers authors guidelines, you are required to use the following format for statements involving human subjects: This study was carried out in accordance with the recommendations of 'name of guidelines, name of committee' with written informed consent from all subjects. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the 'name of committee'.

For statements involving animal subjects, please use:

This study was carried out in accordance with the recommendations of 'name of guidelines, name of committee'. The protocol was approved by the 'name of committee'.

If the study was exempt from one or more of the above requirements, please provide a statement with the reason for the exemption(s).

Ensure that your statement is phrased in a complete way, with clear and concise sentences.

All the experimental procedures of this study were approved by The Animal Ethical Committee of the Institute of Biomedical Sciences of the University of Sao Paulo (number 109/2013).

In review

Goto-Kakizaki *versus* High Fat Diet:

Two different approaches to study the development of Type

2 Diabetes Mellitus

Wilson Mitsuo Tatagiba Kuwabara^{*1}; Ana Carolina Panveloski-Costa¹; Caroline Naomi Fukusawa Yokota¹; Joice Naiara Bertaglia Pereira^{1, 2}; Jorge Mancini Filho³; Rosangela Pavan Torres³; Sandro Massao Hirabara²; Rui Curi^{1, 2}; Tatiana Carolina Alba Loureiro¹

¹Department of Physiology and Biophysics

Institute of Biomedical Sciences

University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

²Cruzeiro do Sul University, São Paulo,

³Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo,

* Corresponding author:

Wilson Mitsuo Tatagiba Kuwabara

Department of Physiology and Biophysics

1524 Professor Lineu Prestes Avenue, ICB1, 105

University of São Paulo

São Paulo-SP, Brazil

E-mail: wilsonk@icb.usp.br

Phone: +55 11 941422841

+55 11 30917245

Abstract

25
26
27

28 Type 2 Diabetes mellitus (T2DM) is an evident growing disease that affects
29 different cultures throughout the world. The development and progression of this
30 disease may occur differently among societies due to the various factors that influence
31 the genesis of this pathology. T2DM occurs under the influence of three main factors:
32 the genetic background, environmental and behavioral components. Obesity is
33 strongly associated to the development of T2DM in the occident, while in the orient
34 most of the diabetic patients are considered lean. Genetics may be a key factor in the
35 development of T2DM in societies where obesity is not a recurrent public health
36 problem. Herein, two different experimental models were used to understand the
37 differences in the pathophysiology of T2DM due to different factors: the genetic
38 background (Goto-Kakizaki (GK) rats) and the environmental influence (High fat diet
39 (HFD) inducing obesity). Our results showed that the genesis and progression of the
40 disease occurs differently between the studied groups. GK rats presented deficiency in
41 the production/secretion of insulin after glucose challenge, insulin resistance without
42 white adipose tissue (WAT) expansion, hyperglycemia and fasting increased levels of
43 insulin; plasma increased levels of triglycerides, total cholesterol and LDL. On the
44 other hand, HFD fed rats showed a great expansion of WAT, in which was observed
45 immune infiltration and inflammation. This inflammatory state caused insulin
46 resistance in this tissue and was probably the main cause of the impaired insulin
47 sensitivity in this model. We conclude, herein, that both experimental models are
48 important physiologic tools to understand the development of T2DM and that is of
49 great importance to consider and explore the etiology of the disease in T2DM studies
50 before drawing the correct conclusions.

51 **Introduction**

52

53 By 2030, *diabetes mellitus* (DM) will be the 7th leading cause of death
54 worldwide, staying behind only of ischemic heart diseases, cerebral disease,
55 HIV/AIDS, Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), lower respiratory
56 infections, and trachea, bronchus and lung cancer (1). The incidence of DM has risen
57 vertiginously and, in 2014, as claimed by the World Health Organization (WHO),
58 reached the hallmark of 422 million individuals (2). This augmentation is mainly
59 because of unhealthy dietary habits, like increased intake of sugar, fats, processed
60 foods, and sweetened beverages, related to low consumption of fruits and vegetables,
61 as well as sedentary lifestyle. DM is associated with complications that affect
62 patient's quality of life, for example, more than 50% of diabetic patients present other
63 physiological disorder, such as cardiovascular diseases (heart attacks and strokes) (3),
64 higher susceptibility to infections (4), kidney failure (5), and retinopathy (6).

65 DM is a syndrome characterized by carbohydrate, lipid, and protein
66 metabolism disorders. DM occurs as a result either from deficiency/absence of insulin
67 secretion or resistance to the action of this hormone. There are three main types of
68 DM, based on etiology and clinical features. Type 1 DM (T1DM) is characterized by
69 the deficiency of insulin, mainly because of pancreatic β -cell loss (7) due to
70 autoimmune attack (8). The cause of T1DM is still not completely understood and the
71 physiopathology of this disease is better reviewed elsewhere (9). Type 2 DM
72 (T2DM), the most common type of DM, is characterized by insulin resistance of
73 peripheral tissues, such as skeletal muscle, adipose tissue, and liver. β -cell failure, loss
74 of function and death are also hallmarks of T2DM (10). Development of T2DM is due
75 to a combination of genetic, environmental and behavioral factors (11). The third
76 major type of DM is the gestational DM, characterized by glucose intolerance during

77 the pregnancy, mainly because of the hormones produced by the placenta and the
78 environmental influence on the mother's metabolism (overeating and sedentary
79 lifestyle). Gestational DM is well reviewed in Chiefari et al. (12). In this study, we
80 aim to compare two of the components that interfere in T2DM: genetic *versus*
81 environmental (diet) factors.

82 Goto Kakizaki (GK) rat, a non-obese and spontaneous (genetic) T2DM
83 experimental model, has been widely used to investigate the development of T2DM
84 and its complications (13-18). These animals were obtained by repetition of selective
85 breeding of glucose intolerant Wistar rats (19). Males and females rats are similarly
86 affected by the diabetic condition and differences are observed even before birth. In
87 uterus, GK fetus shows reduced pancreatic β -cell mass; however, right after birth, rats
88 present normal blood glucose. When GK rats are 28 days of age, basal
89 hyperglycemia, impaired insulin secretion by pancreatic β -cells and increased hepatic
90 glucose production are observed (20-22). Only after 56 days of life, GK rats develop
91 peripheral insulin resistance (23). Considering that the genetic factor contributes to
92 etiology and progression of T2DM, various studies have been developed to identify
93 susceptible genes in GK model. Recently, more than 150 genes involved in multiple
94 pathways that may be associated with T2DM phenotype were observed in GK rats.
95 (24-26).

96 High-fat diet (HFD) is commonly used as experimental strategy to develop
97 obesity and T2DM in rodents, simulating an environmental influence on the
98 metabolism of these animals. HFD feeding was first described in C57BL/6 mice by
99 Surwit et al (27), showing that HFD containing 58% of energy derived from fat leads
100 to obesity, initial hyperinsulinaemia, impaired glucose homeostasis due to insulin
101 resistance, and late insufficient insulin production due to β pancreatic cell failure (28).

127 Male rats were fed with standard rodent chow (Nuvilab®, Curitiba, PR, Brazil) until 8
 128 weeks of age. Then, the animals were randomly allocated into three groups: control
 129 and GK groups fed a control diet, and Wistar group fed a HFD (60%) (Table 1).
 130 Animals received the specific diets for eight weeks (36; 37). Diets were obtained from
 131 Rhooster Company (Araçoiaba da Serra, SP, Brazil) and their composition was
 132 established based on Research Diets, Inc (New Brunswick, NJ, USA): D12450B
 133 (control) and D12492 (HFD). The Animal Ethical Committee of the Institute of
 134 Biomedical Sciences of the University of Sao Paulo (number 109/2013) approved all
 135 experimental procedures of this study. Body weight gain was evaluated weekly and
 136 food intake was measured three times a week.

137

138 Table 1. Composition of Rodent Diets

Ingredients	Control Diet (10 % Kcal of fat)	Hyperlipidic Diet (60 % Kcal of fat)
Casein (80 mesh)	200 g (800 Kcal)	200 g (800 Kcal)
L-Cystein	3 g (12 Kcal)	3 g (12 Kcal)
Corn starch	315 g (1260 Kcal)	0 g (0 Kcal)
Maltodextrin 10	35 g (140 Kcal)	125 g (500 Kcal)
Sucrose	350 g (1400 Kcal)	68.8 g (275,2 Kcal)
Cellulose (BW200)	50 g (0 kcal)	50 g (0 kcal)
Soybean oil	25 g (225 Kcal)	25 g (225 Kcal)
Lard	20 g (180 Kcal)	245 g (2205 Kcal)
Mineral mix S10026	10 g (0 Kcal)	10 g (0 Kcal)
DiCalcium Phosphate	13 g (0 Kcal)	13 g (0 Kcal)
Calcium Carbonate	5.5 g (0 Kcal)	5.5 g (0 Kcal)
Potassium Citrate	16.5 g (0 Kcal)	16.5 g (0 Kcal)
Vitamin Mix V10001	10 g (40 Kcal)	10 g (40 Kcal)
Choline Bitartrate	2 g (0 Kcal)	2 g (0 Kcal)
Total	1055 g (4057 Kcal)	773.8 g (4057 Kcal)

139 2. Metabolic Assays

140 2.1. Glucose tolerance test (GTT) and insulin levels

141 After 12 h fasting, animals were injected (i.p.) with a 50% glucose solution,
142 using a dose of 2 g/Kg (b.w.). Blood glucose concentration was determined using a
143 blood glucose monitor (AccuCheck, Roche, SP, Brazil). Blood samples were obtained
144 from a tail tip cut before (0 min) and at the following time points after glucose
145 injection: 15, 30, 60, 90, and 120 min. Insulin level was measured by ELISA,
146 according to the manufacture's instructions (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

147

148 2.2. Insulin tolerance test (ITT)

149 After 12 h fasting, animals were injected (i.p.) with insulin (Humulin R; Eli
150 Lilly, Indianapolis, USA), using a dose of 0.5 IU/Kg (b.w.). Blood samples were
151 obtained from a tail tip cut before (0 min) and at the following time points after
152 insulin injection: 4, 8, 12, 15, 20 and 30 min. The constant rate for the insulin
153 tolerance test (kITT) was calculated based on the linear regression of blood glucose
154 concentrations obtained from 0 to 30 min of the ITT curve (38; 39).

155

156 2.3. Measurement of plasma metabolites

157 Plasma FFA levels were determined using the enzymatic colorimetric assay
158 (NEFA C) from Wako Chemicals GmbH, according to the manufacturer's instruction.
159 Plasma levels of triglycerides, total cholesterol, and HDL were determined using
160 enzymatic colorimetric assays from BioClin (Minas Gerais, Brazil), according to the
161 manufacturer's instructions. LDL values were obtained by Friedewald equation (40).
162 HOMA-IR and HOMAb were calculated as described by Matthews et al. (41).

163

164 3. *Lipid extraction and determination of plasma fatty acids composition by gas*
165 *chromatography*

166 Derivatization of plasma lipids was performed according to AOAC Official
167 Methods 996.06 (42), with some modifications. Aliquots of plasma (150 μ L) were
168 added to a screw-cap test tube with 0.1 mL standard (5 mg/mL tritridecanoin C13:0 in
169 chloroform) and 0.5 M NaOH in methanol. The tubes were placed in a water bath at
170 100 °C, for 5 min. Methylation was performed by addition of 2 mL BF₃-methanol
171 (14%) and subsequent boiling at 100 °C for 30 min. After cooling at room
172 temperature, 1.5 mL isooctane and saturated NaCl were added to allow organic and
173 watery phase separation. The organic phase with fatty acids was evaporated under N₂
174 and 0.2 mL hexane was added to each sample. Samples were analyzed using gas
175 chromatography on a GC 2012 plus (Shimadzu) equipped with a flame-ionization
176 detector (FID), automatic injector AOC-20 and a Workstation Class GC10. Fatty acid
177 separation was achieved using a fused-silica column SP-2560 (bis-cyano-propyl
178 polysiloxane) [100 m (length) and 0.25 mm (diameter)]; Supelco, Bellefonte, USA).
179 The column temperature was programmed as follows: 140 °C for 5 min; heating at 4
180 °C/ min until 240 °C; and 240 °C for 30 min. The injector and detector were at 250
181 °C, and helium was used as the carrier gas at a 1 mL/min flow rate. The split ratio was
182 1/50. Two microliters of derivatized lipid extract were injected and the fatty acid
183 methyl ester peaks identified by comparison of retention times of fatty acid methyl
184 ester standards and the chromatograms viewed in the Ce 1 h-05 methods (43).

185

186 4. *Glutamyl oxaloacetic transaminase (GOT) and Glutamyl pyruvic transaminase*
187 *(GPT) determination*

188 GOT and GPT were measured in the plasma of 12 h fasted animals, using the
189 colorimetric assay from LabTest (Minas Gerais, Brazil), according to the

190 manufacturer's instructions.

191

192 *5. Insulin signaling in soleus skeletal muscle*

193 After 4 h fasting, rats were anaesthetized with xilasine hydrochloride and
194 ketamine solution by i. p. injection at 8 and 80 mg/kg b.w, respectively (Virbac do
195 Brasil, São Paulo, Brazil). Soleus muscle was removed, carefully and rapidly isolated,
196 and incubated as described previously by Crettaz et al. (44) and Challiss et al. (45)
197 and routinely performed by our group (46; 47) Briefly, soleus muscles were
198 preincubated at 35°C in Krebs-Ringer bicarbonate buffer, pH 7.4, and maintained for
199 30 min with 95% O₂ and 5% CO₂ containing 5.5 mM glucose, at 90 oscillations/min.
200 After 30 min, muscles were transferred to vials containing Krebs buffer in the
201 presence or absence of insulin (7 nM) and incubated for 20 min. After incubation,
202 muscles were immediately homogenized in RIPA buffer (Thermo Scientific,
203 Rockford, IL, USA) containing protease inhibitor cocktail (Roche, Basel,
204 Switzerland), at 4°C, using a Polytron PT-MR 3100 (Kinematica AG, Luzern,
205 Switzerland), operated at maximum speed, for 30 s. Tissue extracts were centrifuged
206 at 10,000 x g at 4° C for 10 min, and the supernatants collected for western blotting
207 analysis.

208

209 *6. Insulin signaling in liver and adipose tissue*

210 After 4 h fasting, rats were anaesthetized as described above. The abdominal
211 cavity was accessed and a slice of the liver and portion of the retroperitoneal adipose
212 tissue were removed and immediately homogenized in RIPA buffer (Thermo
213 Scientific, Rockford, IL, USA), containing protease inhibitor cocktail (Roche, Basel,
214 Switzerland) at 4°C, using a Polytron, as described above. After initial tissue removal

215 (basal condition), the portal vein was accessed and 0.5 mL of insulin solution
216 (prepared in 0.9% NaCl), containing a dose of 2 IU/Kg (b.w) was injected. After 60 s
217 and 120 s, another slice of the liver and another portion of the retroperitoneal adipose
218 tissue were removed (insulin-stimulated condition), respectively, and homogenized as
219 described above. All tissue extracts were centrifuged at 10,000 x g, at 4° C, for 10
220 min, and the supernatants collected for western blotting analysis.

221

222 *7. Western blot analysis*

223 Protein content was determined in the supernatant of tissue extracts using
224 BCA kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) and 4x Laemmli Sample Buffer (48)
225 was added to the samples. Equal amounts of proteins (20 µg) were resolved in SDS-
226 PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked for 1h
227 at room temperature with 5% skim milk and incubated with the specific primary
228 antibodies overnight. Following incubation with secondary antibody conjugated to
229 horseradish peroxidase. Bands were detected with the enhanced chemiluminescence
230 system (Amersham Biosciences). Immunoblots were quantified using ImageJ®
231 software and Ponceau staining was used as an inner control (49; 50). Phospho-AKT,
232 phospho-GSK-3β, GSK-3β polyclonal antibodies were purchased from Cell Signaling
233 (Danvers, MA, USA); AKT polyclonal antibody was purchased from Santa Cruz
234 Biotechnology (Dallas, TX, USA); IL-1 β, TNF-α, IL-6 and IL-10 polyclonal
235 antibodies were purchased from Abcam (Cambridge, MA, USA).

236

237 *8. Histological analyzes of liver slices*

238 8.1. Morpho-quantitative evaluation

239 After collection and pre-fixation in 4% buffered paraformaldehyde, liver from

240 the three experimental groups were dehydrated by a growing series of alcohols,
241 diaphanized in xylol, embedded in paraffin and 4 μm liver sections were obtained and
242 mounted onto silanized slides. Sections were stained by Hematoxylin & Eosin (HE)
243 technique and used in the morphometric and quantitative evaluation of liver cells. The
244 area (μm^2) of the hepatocytes' cellular and nuclear profiles were determined by
245 measuring 50 cells and nuclei/animal, randomly selected, summing 250 cells/group.
246 Cell density (cells/ mm^2) was determined as described by Mandarin-de-Lacerda (51),
247 using 5 semi-serial sections/animal and 2 fields/section were analyzed, totalizing 10
248 photomicrographs/animal. Morpho-quantitative analyzes were performed using a
249 computerized imaging device (Axio Vision 4.5 Zeiss $\text{\textcircled{R}}$) coupled to a 40x objective
250 trinocular microscope (Zeiss Axiovert 40; Camera: Zeiss AxioCam ERc 5s).

251

252 8.2. Hepatic Fat Accumulation

253 Liver was included in Tissue-Tek $\text{\textcircled{R}}$ medium, frozen in liquid nitrogen and 10
254 μm sections were obtained and adhered onto silanized slides. Slides were fixed in 4%
255 buffered paraformaldehyde, washed in distilled water and stained with Oil Red O and
256 hematoxylin for lipid analysis. The qualitative evaluation of the slides was performed
257 using photomicrographs captured by Zeiss Axiovert 40 microscope, with a 40x
258 objective (Camera: Zeiss AxioCam ERc 5s).

259

260 8.3. Hepatic glycogen content

261 Liver slides from frozen sectioning (10 μm) were stained with Periodic Acid-
262 Schiff (PAS) and hematoxylin for the detection of hepatic glycogen. The qualitative
263 evaluation of the slides was performed using photomicrographs captured by Zeiss
264 Axiovert 40 microscope, with a 40x objective (Camera: Zeiss AxioCam ERc 5s).

265 9. *Histological analyzes of inflammatory infiltrate in the retroperitoneal adipose*
266 *tissue*

267 Retroperitoneal adipose tissue was included in Tissue-Tek[®] medium, frozen in
268 liquid nitrogen and 5 µm sections were obtained and adhered onto silanized slides.
269 Slides were stained with HE. Evaluation of leukocyte infiltrate was also performed by
270 immunohistochemistry. Slides were blocked with 3% BSA and incubated overnight
271 with mouse anti-rat CD11b/c mouse antibody (BD Pharmingen[™], 1:1000).
272 Subsequently, the tissue was incubated with biotinylated anti-mouse IgG (Jackson
273 ImmunoResearch, 1:200) secondary antibody for 2 hours, washed with 0.1M
274 phosphate buffer and incubated with VectaStain ABC kit (Vector Laboratories, 1:100)
275 for 2 hours. Detection of the antigen-antibody complex was performed through the
276 chromogen 3,3'-diaminobenzidine (DAB) for 5 minutes at room temperature. Sections
277 without the primary antibody (Cd11b/c) were used as negative control of the
278 immunolabeling process. The qualitative evaluation of the slides was performed using
279 photomicrographs captured by Zeiss Axiovert 40 microscope, with a 40x objective
280 (Camera: Zeiss AxioCam ERc 5s).

281

282 10. *Data analysis*

283 Results are presented as mean ± S.E.M. Statistical significance was assessed
284 by one-way or two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test. $p \leq 0.05$ was
285 considered statistically significant.

286

287

288 **Results**

289

290 HFD induced obesity in Wistar rats. GK rats were resistant to weight gain,
291 showing, after 8 week treatment, 28% and 42% less gain when compared to the

292 control group and HFD fed animals, respectively (Figure 1A; 1B). However, when
293 energy consumption was measured, GK rats consumed more energy per day per Kg
294 than the control and HFD groups (Figure 1F). Even though HFD fed animals
295 presented higher weight gain, HFD and control groups had equal amounts of energy
296 consumption per day (Figure 1C-F).

297 GK rats had decreased nose-to-tail length (Figure 2A), less adipose tissue and
298 lower muscle humid weight when compared to control and HFD fed rats (Figure 2D-
299 K). Interestingly, brown adipose tissue was hypertrophied in GK rats (Figure 2G).
300 Weight gain in the HFD group was mainly by the accumulation of fat in the
301 retroperitoneal and epididymal adipose tissue (Figure 2D; 2E). No differences in liver
302 weight were observed in the studied groups (Figure 2C).

303 When animals were glucose challenged (2 g/kg b.w), GK rats reached a
304 glycemic peak after 60 min and maintained high plasma glucose concentration until
305 the end of the experiment (120 min) (Figures 3A; 3B). Control and HFD fed rats
306 reached a glycemic peak at 15 min and glucose plasma concentration decreased
307 gradually until 120 min (Figure 3A; 3B). Before the glucose challenge, GK rats
308 presented fasting hyperglycemia and hyperinsulinemia when compared to the other
309 groups (Figure 3A; 3C). Also, these animals failed to secrete/produce insulin after
310 glucose stimulus (Figure 3B). On the other hand, HFD fed rats secreted a great
311 amount of insulin after glucose challenge (Figure 3C; 3D). In the insulin tolerance test
312 (ITT), GK rats didn't respond to insulin, maintaining high glucose plasma
313 concentration after insulin stimulus (Figure 3E). HFD fed animals presented
314 decreased insulin sensitivity (kITT) when compared to the control group and GK rats
315 showed insulin resistance of greater magnitude (Figure 3F). HOMA-IR and HOMA-
316 B is clearly altered in the GK group (Figure 3G; 3H).

317 Fasting cholesterol, LDL and triglycerides were increased in GK plasma and
318 HFD didn't alter these parameters (Figure 4). Gas chromatography (GC) showed
319 higher contents of fat in plasma from GK rats (Figure S1A) and different fat profiles
320 between the groups: HFD fed rats presented more saturated and less monounsaturated
321 fats when compared to the control group (Figures S1B; S1C) and GK animals had
322 higher contents of monounsaturated and lower contents of polyunsaturated fats when
323 compared to the control group (Figure S1C; S1D). No difference was observed in
324 plasma leptin and adiponectin among the studied groups (Figure S2). GOT and GPT
325 levels were higher in the plasma of GK rats (Figure S3).

326 Soleus muscle, retroperitoneal adipose tissue and liver were analyzed before
327 and after insulin stimulus in order to verify the integrity of insulin response. In soleus
328 muscle, after *in vitro* insulin stimulus, the content of pAKT augmented in all groups
329 (Figure 5A). Total AKT content was similar in all studied groups and pAKT/AKT
330 ratio was lower in the HFD group (Figure 5B; 5C). The pGSK-3 β content didn't
331 increase after insulin stimulus in GK rats. pGSK-3 β content, before insulin stimulus,
332 in this group was already higher when compared to the other groups (Figure 6A).
333 pGSK-3 β /GSK-3 β ratio was altered in the HFD and GK groups, not showing an
334 increase after insulin stimulus as observed in the control group (Figure 6C).

335 In the liver, HFD group didn't show difference in pAKT content after *in vivo*
336 insulin challenge (Figures 7A; 7C). Liver of the GK group responded equally to the
337 control group (Figures 7A; 7C). pGSK-3 β content and pGSK-3 β /GSK-3 β ratio was
338 statistically similar among all groups (Figures 8A-C).

339 Retroperitoneal adipose tissue from GK and HFD fed rats presented lower
340 pAKT content and lower pAKT/AKT ratio, after *in vivo* insulin challenge, when
341 compared to the control group (Figures 9A; 9C). Accordingly to this result, pGSK-3 β

342 content did not increase after insulin stimulus in WAT of GK and HFD groups.
343 pGSK-3 β / GSK-3 β ratio were similar among all groups (Figures 10A-C).

344 In order to verify if these alterations in insulin response was due to an
345 inflammatory process, cytokines were measured in the same tissues. No differences in
346 TNF- α , IL1- β , IL-6 and IL-10 content were observed in soleus muscle among the
347 studied groups (Figure S4). In the liver, IL-10 and IL-6 content were increased in the
348 GK group (Figures 11B; 11C) and no difference was observed in the HFD group
349 when compared to the control group (Figures 11A-E). Morphologically, liver from
350 HFD fed rats had lower density of cells and higher hepatocytes area while liver from
351 GK rats presented lower nuclear area (Figure 12B). When stained with oil red,
352 hepatocytes from HFD group showed great accumulation of fat and hepatocytes from
353 GK rats didn't show any difference from the control group (Figure 12A).

354 HFD fed animals presented inflamed retroperitoneal adipose tissue, showing
355 increase in TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 content when compared to the other groups
356 (Figures 13A-E). IL-10 was increased in retroperitoneal adipose tissue from GK rats
357 (Figure 13E). Greater inflammatory infiltrate was observed in the adipose tissue from
358 HFD fed animals and no differences in the amount of immune infiltrate was observed
359 in GK rats (Figure 14).

360

361 **Discussion**

362 As obesity grows throughout the world, T2DM becomes one of the leading
363 causes of death, reaching different societies and cultures (1). As well described by the
364 scientific literature, obesity is strongly associated to the development of metabolic
365 complications leading to T2DM in the occident (52). However, not all type 2 diabetics
366 individuals are obese. In the orient, especially Japan, India and China, half of the

367 population that develops T2DM is considered lean (BMI < 25) (53; 54). Even though
368 obesity is a major cause of chronic inflammation associated to T2DM, patients that
369 present a chronic inflammatory condition, such as periodontal disease, obstructive
370 pulmonary disease, arthritis, myotonic dystrophy or chronic hepatitis C infection may
371 also develop T2DM (55). The difference in the genesis of this syndrome occurs
372 because it depends not only on genetic background, but also on behavioral and
373 environmental influence on the life of a certain population. The increase of T2DM
374 prevalence is attributed to a sedentary lifestyle and unhealthy diet consumption,
375 associated to genetic predisposition (56). Both behavioral and environmental factors
376 may be controlled to promote the reduction of obesity and associated comorbidities.
377 Genetics is the only cause that still cannot be permanently changed.

378 Two experimental models of T2DM were used to investigate the progression
379 of this disease driven by the two different main causes: genetic (GK rats) and
380 environmental (obese HFD-induced rats) factors. First, GK rats were used as a T2DM
381 genetic susceptible model. Various works have described the genetic differences of
382 this strain that lead them to the diabetic phenotype (24-26). These animals develop
383 T2DM spontaneously without the interference of obesity and have been widely used
384 to understand the mechanisms of pancreatic beta cell failure in producing insulin and
385 its short/long term complications (13-18). GK rats are also insulin resistant, but the
386 pathways responsible for this resistance are not completely elucidated yet.

387 Soleus muscles of GK responded equally to insulin stimulus to phosphorylate
388 AKT in the serine site. Skeletal muscle is the most important peripheral tissue that
389 controls glycaemia in mammal's organism. Even though our results did not indicate
390 any failure in AKT serine site phosphorylation in soleus of GK rats after insulin
391 stimulus, we observed impairment in the phosphorylation of GSK-3 β . pAKT

392 phosphorylate GSK-3 β to transmit insulin signal through the cell. Our result may
393 indicate that insulin signal is not well transmitted in the soleus of these animals. Other
394 mechanisms may be involved in the insulin resistance in skeletal muscle of these
395 animals. For example, defects in muscle microvasculature in GK rats can contribute
396 to an impairment of muscle cells metabolism and function (57). Moreover, previous
397 study by Dadke et al. reported that skeletal muscle of GK rats has augmented activity
398 of tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) before and after insulin stimulus. PTP1B is
399 known to cause dephosphorylation of tyrosine sites and consequently acts as negative
400 regulator of insulin signaling by inactivating insulin-signaling receptors (58).

401 Adipose tissue is also an important site that controls glucose homeostasis in
402 mammals. Retroperitoneal white adipose tissue (rWAT) of GK rats had lower
403 phosphorylation of AKT after insulin stimulus, indicating, again, the peripheral
404 resistance to insulin in this animal model.

405 GK rats have lower fat accumulation in the white adipose tissue depots. This
406 result may be explained due to impairment in differentiation of pre-adipocyte into
407 mature adipocyte, leading to a defect in triglycerides storage and increase in free fatty
408 acids release to the plasma (59-61). The impaired adipocyte differentiation observed
409 in GK rats may be a consequence of chronic inflammation observed in the WAT of
410 these animals (62). Our results confirmed an increase in IL-10 content in the rWAT of
411 GK rats, showing the establishment of a long-term inflammatory process at this site.
412 Other mechanisms can contribute to insulin resistance in rWAT and are being better
413 investigated by other researchers in our group. Furthermore, our results evidenced the
414 impediment that GK rats present to decrease plasma glucose concentration and
415 augment plasma insulin levels after a glucose stimulus, indicating deficiencies in the
416 production and secretion of insulin by pancreatic β cells. Impairment in insulin

417 production and secretion by pancreatic β cells from GK rats are also observed and
418 well established by other groups in the literature (13-18). Nevertheless, it is important
419 to consider that elevated basal hepatic glucose production as a consequence of
420 decreased insulin suppressive effect on hepatocytes, contribute to high glucose levels
421 in plasma from GK rats (20; 63; 64).

422 Hyperglycemia *per se* is capable to promote inflammation in GK liver by
423 altering the expression of genes that control pro and anti-inflammatory cytokines (65).
424 Our results confirmed an inflammatory state in the liver of GK rats by showing
425 augmented IL-6 and IL-10 content at this site. Also, higher content of glycogen and
426 no fat accumulation in liver from GK rats was observed in our histological analysis.
427 Accordingly to our findings, Almon et al demonstrated that chronic hyperglycemia
428 promotes deposition of glycogen and impedes excessive fat accumulation in the liver
429 of GK animals (65). Finally, all the results in this model confirmed its reliability to
430 investigate T2DM development due to an intrinsic trigger, the genetic background.

431 In order to investigate the influence of external factors without the internal
432 imprint in the development of T2DM, we used an obesity model induced by HFD.
433 Although HFD did not induce hyperglycemia, as also observed by others (66; 67), it
434 triggered a pre-diabetic state in Wistar rats. HFD induced obesity with expansion of
435 WAT depots. This WAT expansion was accompanied by an increase in leukocytes
436 infiltration and inflammation in this tissue. Accordingly to our results, other groups
437 also reported increase in the expression of inflammatory genes in WAT after HFD
438 feeding (29; 30). During obesity, leukocyte infiltration in WAT, composed mainly by
439 macrophages, enhances TNF- α and IL-6 production, to initiate and maintain the
440 inflammatory process (68; 69). Although Wernstedt Asterholm et al. (70) show that
441 adipose tissue inflammation is an adaptative response that is essential for storage of

442 excess nutrients and that it contributes to WAT expansion and remodeling during
443 HFD feeding, constant inflammatory stimulus may lead to insulin signaling
444 impairment and consequently insulin resistance (68, 71)

445 Cytokines promote serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1
446 (IRS-1) and impair insulin signaling by impeding the PI3K pathway (72; 73).
447 Inflammation was probably the main cause of insulin resistance in WAT in obesity
448 model induced by HFD, since a concomitant increase in cytokines content and
449 decrease in AKT phosphorylation in WAT was also observed in the present study.
450 Even though HFD fed animals did not present an established insulin resistance in
451 soleus skeletal muscle, WAT insulin resistance was punctually identified. HFD fed
452 rats did not present glucose intolerance, however, these animals showed a great
453 increase in insulin secretion after glucose stimulus, indicating that these animals
454 present lower insulin sensitivity. This data was confirmed when kITT was calculated
455 and corroborates with the WAT alterations.

456 Although Karpe et al (74) and our present work described that under fasted
457 condition, plasma FFA levels were not different between the control and the HFD
458 groups, Liu et al. reported that in the fed state, HFD promotes elevated circulating
459 FFA levels as a result of increased dietary intake of lipids and impaired ability of
460 postprandial insulin to effectively inhibit lipolysis (75). Furthermore, it is also
461 important to consider plasma FFA composition. Our results demonstrated that HFD
462 animals present high percentage of saturated fatty acids (SFA) and low of
463 monounsaturated fatty acids (MUFA) in plasma. This difference may be a
464 consequence of a decrease in enzyme SCD1 activity, predominantly expressed in the
465 liver, which converts SFA derived from dietary FA or from *de novo* lipogenesis into
466 MUFA, as described by Paton & Ntambi (76). Elevated SFA and decreased SCD1

467 activity in liver results in hepatocellular apoptosis, steatohepatitis and fibrosis (77).
468 Low TG levels observed in HFD fed animals may be explained by the higher
469 accumulation of fat in liver, as previously demonstrated by Pan et al. (78) and Liu et
470 al. (75).

471 Intrinsic versus extrinsic stimulus to the development T2DM was the main
472 subject in this work. The choice of an experimental model is crucial to draw reliable
473 conclusions and understand the correct pathophysiology of the disease, given the
474 correct scenario. Herein, we showed two completely different models to study T2DM.
475 The genetic model, GK rats, presented all the typically hallmarks of this syndrome,
476 which could be clearly observed after 2 months after birth. However, even before
477 birth these animals already demonstrate loss of β cell mass and islet microangiopathy
478 (16; 79-81), indicating that the main defect of this model is encountered in the insulin
479 production. Consequently to the impairment in the capacity to secrete and produce
480 insulin, the other characteristics follow up, such as hyperglycemia, increase in plasma
481 fat and TG, liver inflammation, glucotoxicity and so on. Contrary to that, our T2DM
482 extrinsic trigger, the HFD, showed a completely different scenario. In these animals,
483 liver and muscle responded well to insulin stimulus, even though liver was found to
484 have a great fat accumulation. However, we observed that HFD fed rats had lower
485 insulin sensitivity and had to produce a greater amount of insulin to maintain normal
486 glucose levels. This was mainly because the excessive fat accumulation in the WAT,
487 which caused leukocyte infiltration and inflammation at this site. This inflammatory
488 process was responsible to the impairment of insulin response in this tissue, as
489 observed by decreased AKT phosphorylation. Therefore, in this model, the beginning
490 of T2DM development occurs in the WAT. Expanded inflamed WAT requires more
491 insulin to maintain homeostasis. Finally, our results indicate that chronic exposure to

492 HFD diet would probably lead to β cell failure, decrease in insulin levels and finally
 493 to the establishment of T2DM (Figure 15).

494 In sum, we can conclude that both experimental models are suitable to
 495 understand the development of T2DM. In order to draw the correct conclusion,
 496 studies have to consistently consider the differences in the development of T2DM and
 497 the factors that influence the progression of this disease.

498

499 **Legends**

500

501 **Figure 1.** Body weight evaluation (A) and body weight gain (B) after 8 weeks of diet.
 502 Daily food intake (grams) (C); Daily energy intake (Kcal) (D); Food and energy
 503 consumption normalized by the animal's body weight (E; F). Results are presented as
 504 mean \pm S.E.M and n represents the number of animals used in each group. Studied
 505 groups: Control (n=28), HFD (n=22) and GK (n=34). (*) p <0.05 vs control; (**) p
 506 <0.01 vs control; (***) p <0.001 vs control; (###) p <0.001 vs HFD.

507

508 **Figure 2.** Nose-to-tail length (A); Tibia length (B); weight of Liver (C); Adipose
 509 tissues (D-G) and skeletal muscles (H-K). Adipose tissues and liver were normalized
 510 by the animal's nose-to-tail length. Muscles were normalized by the animal's tibia
 511 length. Results are presented as mean \pm S.E.M and n represents the number of animals
 512 used in each group. Studied groups: Control (n=9), HFD (n=12) and GK (n=21). (**)
 513 p <0.01 vs control; (***) p <0.001 vs control; (#) p <0.05 vs HFD; (###) p <0.001 vs
 514 HFD.

515

516 **Figure 3.** Glycemia measured during GTT (A); area under curve of glycemia
 517 measured during GTT (B); plasma insulin levels measured during GTT (C), area
 518 under curve of plasma insulin levels measured during GTT (D); glycemia measured
 519 during ITT (E); rate constant for ITT - kITT (F); HOMA IR (G) and HOMA B (H)
 520 indexes Results are presented as mean \pm S.E.M and n represents the number of
 521 animals used in each group. Studied groups: Control (n=24), HFD (n=17) and GK
 522 (n=31). (*) p <0.05 vs control; (**) p <0.01 vs control; (***) p <0.001 vs control; (#)
 523 p <0.05 vs HFD; (###) p <0.001 vs HFD; (ϕ) p <0.05 vs GK; ($\phi\phi\phi$) p <0.001 vs GK.

524

525 **Figure 4.** Total cholesterol (A); HDL (B); LDL (C); triglycerides (D); NEFA (E). Six
 526 hours after instillation of saline or LPS, animals were anesthetized and the blood was
 527 collected through the abdominal aorta. The dosages were carried out in the plasma by
 528 enzymatic-colorimetric method. Results are presented as mean \pm S.E.M and n
 529 represents the number of animals used in each group. Studied groups: Control (n =
 530 24); HFD (n = 20) and GK (n = 27). (*) p <0.05 vs control; (**) p <0.01 vs control;
 531 (###) p <0.001 vs HFD.

532

533 **Figure 5.** pAKT and AKT quantification in soleus muscle by WB (A-D). Positive
 534 stimulus: insulin (7 nM). Graphs present mean O.D. \pm S.E.M of the bands and n

535 represents the number of animals used in each group. Studied groups: Control (n = 5);
536 HFD (n = 3) and GK (n = 5). (\$) p <0.05; (**) p <0.01 as indicated in the graphs.

537

538 **Figure 6.** pGSK-3 β and GSK-3 β quantification in soleus muscle by WB (A-D).
539 Positive stimulus: insulin (7 nM). Graphs present mean O.D. \pm S.E.M of the bands
540 and n represents the number of animals used in each group. Studied groups: Control
541 (n = 5); HFD (n = 3) and GK (n = 5). (***) p <0.001 vs control; (###) p <0.001 vs
542 HFD; (\$) p <0.05; (***\$) p <0.001 as indicated in the graphs.

543

544 **Figure 7.** pAKT and AKT quantification in liver by WB (A-D). *In vivo stimulus:*
545 insulin 2IU/Kg (b.w) (i.v.). Graphs present mean O.D. \pm S.E.M of the bands and n
546 represents the number of animals used in each group. Studied groups: Control (n = 3);
547 HFD (n = 3) and GK (n = 3). (\$) p <0.05 as indicated in the graphs

548

549 **Figure 8.** pGSK-3 β and GSK-3 β quantification in liver by WB (A-D). *In vivo*
550 *stimulus:* insulin 2IU/Kg (b.w) (i.v.). Graphs present mean O.D. \pm S.E.M of the bands
551 and n represents the number of animals used in each group. Studied groups: Control
552 (n = 3); HFD (n = 3) and GK (n = 3).

553

554 **Figure 9.** pAKT and AKT quantification in retroperitoneal adipose tissue by WB (A-
555 D). *In vivo stimulus:* insulin 2IU/Kg (b.w) (i.v.). Graphs present mean O.D. \pm S.E.M
556 of the bands and n represents the number of animals used in each group. Studied
557 groups: Control (n = 3); HFD (n = 3) and GK (n = 3). (*) p<0.05 vs control (+); (**)
558 p<0.01 vs control (+); (***\$) p<0.001 as indicated in the graphs.

559

560 **Figure 10.** pGSK-3 β and GSK-3 β quantification in retroperitoneal adipose tissue by
561 WB (A-D). *In vivo stimulus:* insulin 2IU/Kg (b.w) (i.v.) (A-D). *In vivo stimulus:*
562 insulin 2IU/Kg (b.w) (i.v.). Graphs present mean O.D. \pm S.E.M of the bands and n
563 represents the number of animals used in each group. Studied groups: Control (n = 4);
564 HFD (n = 4) and GK (n = 4). (\$) p <0.05 as indicated in the graphs.

565

566 **Figure 11.** Content of IL-10, IL-6, TNF- α and IL-1 β in liver. Graphs present mean
567 O.D. \pm S.E.M of the bands and n represents the number of animals used in each
568 group. Studied groups: Control (n = 4); HFD (n = 4) and GK (n = 4). (**) p <0.01 vs
569 control; (***) p <0.001 vs control; (##) p <0.01 vs HFD; (####) p <0.001 vs HFD.

570

571 **Figure 12.** Histological analysis of the liver (A). HE and Oil Red staining revealed
572 micro and macro steatosis (arrows) in HFD fed rats. PAS revealed high concentration
573 of glycogen in liver from GK rats. Morpho-quantitative evaluations (B) considered
574 cell density, hepatocyte and nuclear areas. Results are presented as mean \pm S.E.M and
575 n represents the number of animals used in each group. Studied groups: Control (n =
576 6); HFD (n = 6) and GK (n = 6). (***) p <0.001 vs control; (#) p <0.05 vs HFD; (ϕϕϕ)
577 indicates p <0.001 vs GK. Calibration bar: 50 μ m.

578

579 **Figure 13.** Contents of IL-10, IL-6, TNF- α and IL-1 β in the retroperitoneal adipose
580 tissue. Graphs present mean O.D. \pm S.E.M of the bands and n represents the number
581 of animals used in each group. Studied groups: Control (n = 4); HFD (n = 4) and GK
582 (n = 4). (*) p <0.05 vs control; (**) p <0.01 vs control; (***) p <0.001 vs control; (ϕϕ)
583 indicates p <0.01 vs GK; (ϕϕϕ) indicates p <0.001 vs GK.

584

585 **Figure 14.** Histological analysis of retroperitoneal adipose tissue. Both HE staining
586 (A) and the immunohistochemistry to CD11b/c revealed mononuclear cell infiltrate
587 (arrows) around the adipocytes in the HFD group. Results are presented as
588 representative images and n represents the number of animals used in each group.
589 Studied groups: Control (n = 6); HFD (n = 6) and GK (n = 6). Calibration bar: 50µm.

590

591 **Figure 15.** GK rats versus Obese HFD induced rats. Two experimental models to
592 study the development of T2DM.

593

594 **Figure S1.** Percentage of total fat (A) and profile of fatty acids in the plasma of the
595 animals (B-D). The determinations were performed by gas chromatography after lipid
596 plasma extraction. Percentage of saturated fatty acids (B), monounsaturated fatty
597 acids (C) and polyunsaturated fatty acids (D). Results are presented as mean ± S.E.M
598 and n represents the number of animals used in each group. Studied groups: Control
599 (n = 5); HFD (n = 5) and GK (n = 5). (*) p <0.05 vs control; (**) p <0.01 vs control;
600 (##) indicates p <0.01 vs HFD; (###) p <0.001 vs HFD; (ϕϕ) indicates p <0.01 vs GK;
601 (ϕϕϕ) indicates p <0.001 vs GK.

602

603 **Figure S2.** Plasma adiponectin (A) and leptin (B) determination. Results are
604 presented as mean ± S.E.M and n represents the number of animals used in each
605 group. Studied groups: Control (n = 24); HFD (n = 20) and GK (n = 27).

606

607 **Figure S3.** Hepatic enzymes: PGT (A) and GOT (B). Quantification was carried out
608 in the animals' plasma by enzymatic-colorimetric method. Results are presented as
609 mean ± S.E.M and n represents the number of animals used in each group. Studied
610 groups: Control (n = 24); HFD (n = 20) and GK (n = 31). (*) p <0.05 vs control; (**) p
611 p <0.01 vs control; (#) p <0.05 vs HFD; (###) p <0.001 vs HFD.

612

613

614 **Figure S4.** Cytokines Content in Soleus Muscle

615

616 **Figure S5.** Soleus Muscle Content of pAKT and AKT

617

618 **Figure S6.** Soleus Muscle Content of pGSK-3β and pGSK-3β

619

620 **Figure S7.** Liver Content of pAKT and AKT

621

622 **Figure S8.** Liver Content of pGSK-3β and pGSK-3β

623

624 **Figure S9.** Retroperitoneal White Adipose Tissue Content of pAKT and AKT

625

626 **Figure S10.** Retroperitoneal White Adipose Tissue Content of pGSK-3β and pGSK-
627 3β

628

629 **Figure S11.** Cytokines Content in Liver

630

631 **Figure S12.** Cytokines Content in Retroperitoneal White Adipose Tissue

632

633

634

References

- 635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
1. Mathers CD, Loncar D. 2006. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 3(11): e442. doi:10.1371/journal.pmed.0030442
 2. Global report on diabetes. World Health Organization, Geneva, 2016.
 3. Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Ingelsson E, Lawlor DA, Selvin E, Stampfer M, Stehouwer CD, Lewington S, Pennells L, Thompson A, Sattar N, White IR, Ray KK, Danesh J. 2010. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*. 375 (9733):2215-22. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60484-9.
 4. Geerlings SE, Hoepelman AI. 1999. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol*. Dec;26(3-4):259-65. doi: 10.1111/j.1574-695X.1999.tb01397.x
 5. Tziomalos K, Athyros VG. 2015. Diabetic Nephropathy: New Risk Factors and Improvements in Diagnosis. *Rev Diabet Stud*. 12(1-2):110-8. doi: 10.1900/RDS.2015.12.110.
 6. Bourne RR, Stevens GA, White RA, Smith JL, Flaxman SR, Price H, Jonas JB, Keeffe J, Leasher J, Naidoo K, Pesudovs K, Resnikoff S, Taylor HR; Vision Loss Expert Group. 2013. Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: a systematic analysis. *Lancet Glob Health*. Dec;1(6):e339-49. doi: 10.1016/S2214-109X(13)70113-X.
 7. Gepts, W. 1965. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes*. 14:619–633. doi: 10.2337/diab.14.10.619
 8. Eisenbarth, G. S. 1986. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N. Engl. J. Med*. 314, 1360–1368. doi: 10.1056/NEJM198605223142106
 9. Katsarou A, Gudbjörnsdottir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, Jacobsen LM, Schatz DA, Lernmark Å. 2017. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. Mar 30;3:17016. doi: 10.1038/nrdp.2017.16.
 10. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. 2014. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet*. Mar 22;383(9922):1068-83. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62154-6.
 11. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. 2011. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol*.

- 685 Nov 8;8(4):228-36. doi: 10.1038/nrendo.2011.183.
686
- 687 12. Chiefari E, Arcidiacono B, Foti D2, Brunetti A. 2017. Gestational diabetes
688 mellitus: an updated overview. *J Endocrinol Invest.* doi: 10.1007/s40618-016-
689 0607-5.
690
- 691 13. Movassat J, Calderari S, Fernández E, Martín MA, Escrivá F, Plachot C,
692 Gangnerau MN, Serradas P, Alvarez C, Portha B. 2007. Type 2 diabetes—a
693 matter of failing beta-cell neogenesis? Clues from the GK rat model. *Diabetes*
694 *Obes Metab* 9(suppl 2):187–195. doi: 10.1111/j.1463-1326.2007.00786.x
695
- 696 14. Ehses JA, Perren A, Eppler E, Ribaux P, Pospisilik JA, Maor-Cahn R,
697 Gueripel X, Ellingsgaard H, Schneider MK, Biollaz G, Fontana A, Reinecke
698 M, Homo-Delarche F, Donath MY. 2007. Increased number of islet-associated
699 macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes*. 56(9):2356-70. doi: 10.2337/db06-
700 1650
701
- 702 15. Portha B, Lacraz G, Kergoat M, Homo-Delarche F, Giroix MH, Bailbé D,
703 Gangnerau MN, Dolz M, Tourrel-Cuzin C, Movassat J. 2009. The GK rat
704 beta-cell: a prototype for the diseased human beta-cell in type 2 diabetes? *Mol*
705 *Cell Endocrinol*. 297(1-2):73–85. doi:10.1016/j.mce.2008.06.013
706
- 707 16. Giroix MH, Irminger JC, Lacraz G, Noll C, Calderari S, Ehses JA, Coulaud J,
708 Cornut M, Kassis N, Schmidlin F, Paul JL, Kergoat M, Janel N, Halban PA,
709 Homo-Delarche F. 2011. Hypercholesterolaemia, signs of islet
710 microangiopathy and altered angiogenesis precede onset of type 2 diabetes in
711 the Goto–Kakizaki (GK) rat. *Diabetologia* 54(9):2451–2462. doi:
712 10.1007/s00125-011-2223-4.
713
- 714 17. Portha B, Lacraz G, Dolz M, Giroix MH, Homo-Delarche F, Movassat J.
715 2007. Issues surrounding beta-cells and their roles in type 2 diabetes. What tell
716 us the GK rat model. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2:785–795.
717
- 718 18. Portha B. 2005. Programmed disorders of beta-cell development and function
719 as one cause for type 2 diabetes? The GK rat paradigm. *Diabetes Metab Res*
720 *Rev*. 21(6):495–504. doi: 10.1002/dmrr.566
721
- 722 19. Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. 1976. Production of spontaneous diabetic rats
723 by repetition of selective breeding. *Tohoku J Exp Med*. May;119(1):85-90.
724
- 725 20. Picarel-Blanchot F, Berthelier C, Bailbé D, Portha B. 1996. Impaired insulin
726 secretion and excessive hepatic glucose production are both early events in the
727 diabetic GK rat. *Am J Physiol*. 271(4 Pt 1):E755–E762.
728
- 729 21. Movassat J, Saulnier C, Serradas P, Portha B. 1997. Impaired development of
730 pancreatic beta-cell mass is a primary event during the progression to diabetes
731 in the GK rat. *Diabetologia*. 40(8):916–925. doi:10.1007/s001250050768
732
- 733 22. Portha B, Giroix MH, Serradas P, Gangnerau MN, Movassat J, Rajas F,
734 Bailbé D, Plachot C, Mithieux G, Marie JC. 2001. Beta-cell function and

- 735 viability in the spontaneously diabetic GK rat. Information from the GK/Par
736 colony. *Diabetes* 50(suppl 1): A89–A93. doi:
737 <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.2007.S89>
738
- 739 23. Portha, B., Giroix, M.H., Toureel-Cuzin, C., Le-Stunff, H. and Movassat, J.
740 (2012). “The GK Rat: A prototype for the study of non-overweight type 2
741 diabetes,” in *Animal Models in Diabetes Research*, ed. HG. Joost, H Al-
742 Hasani, A Schurmann (Humana Press, New York: Springer), 125-160.
743
- 744 24. Gauguier D, Froguel P, Parent V, Bernard C, Bihoreau MT, Portha B, James
745 MR, Penicaud L, Lathrop M, Ktorza A. 1996. Chromosomal mapping of
746 genetic loci associated with non-insulin dependent diabetes in the GK rat. *Nat*
747 *Genet.* 12(1):38–43. doi:10.1038/ng0196-38
748
- 749 25. Galli J, Li LS, Glaser A, Ostenson CG, Jiao H, Fakhrai-Rad H, Jacob HJ,
750 Lander ES, Luthman H. 1996. Genetic analysis of non-insulin dependent
751 diabetes mellitus in the GK rat. *Nat Genet.* 12(1):31–37. doi:10.1038/ng0196-
752 31
753
- 754 26. Granhall C, Rosengren AH, Renström E, Luthman H. 2006. Separately
755 inherited defects in insulin exocytosis and beta-cell glucose metabolism
756 contribute to type 2 diabetes. *Diabetes.* 55(12):3494–3500. doi:10.2337/db06-
757 0796
758
- 759 27. Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. 1988. Diet-
760 induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* 37(9):1163–1167. doi:
761 <https://doi.org/10.2337/diab.37.9.1163>
762
- 763 28. Winzell MS, Ahrén B. 2004. The high-fat diet-fed mouse: a model for
764 studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2
765 diabetes. *Diabetes.* 53 (Suppl 3):S215-219. doi:
766 https://doi.org/10.2337/diabetes.53.suppl_3.S215
767
- 768 29. Moraes RC, Blondet A, Birkenkamp-Demtroeder K, Tirard J, Orntoft TF,
769 Gertler A, Durand P, Naville D, Bégeot M. 2003. Study of the alteration of
770 gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray
771 and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. *Endocrinology.*
772 144(11):4773-82. doi: <https://doi.org/10.1210/en.2003-0456>
773
- 774 30. Keller MP, Attie AD. 2010. Physiological insights gained from gene
775 expression analysis in obesity and diabetes. *Annu Rev Nutr.* 30:341-64. doi:
776 10.1146/annurev.nutr.012809.104747.
777
- 778 31. van der Heijden RA, Sheedfar F, Morrison MC, Hommelberg PP, Kor D,
779 Kloosterhuis NJ, Gruben N, Youssef SA, de Bruin A, Hofker MH1, Kleemann
780 R, Koonen DP, Heeringa P. 2015. High-fat diet induced obesity primes
781 inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *Aging (Albany*
782 *NY).* 7(4):256-68.
783
784

- 785 32. Meli R, Mattace Raso G, Irace C, Simeoli R, Di Pascale A, Paciello O, Pagano
786 TB, Calignano A, Colonna A, Santamaria R. 2013. High fat diet induces liver
787 steatosis and early dysregulation of iron metabolism in rats. *PLoS One*.
788 8(6):e66570. doi: 10.1371/journal.pone.0066570.
789
- 790 33. Golson ML, Misfeldt AA, Kopsombut UG, Petersen CP, Gannon M. 2010.
791 High Fat Diet Regulation of β -Cell Proliferation and β -Cell Mass. *Open*
792 *Endocrinol J*. 4. doi: 10.2174/1874216501004010066
793
- 794 34. Cerasi E. 1995. Insulin deficiency and insulin resistance in the pathogenesis of
795 type 2 diabetes: is a divorce possible. *Diabetologia* 38(8):992–997
796
- 797 35. Leibowitz G, Kaiser N, Cerasi E. 2011. Beta cell failure in type 2 diabetes. *J*
798 *Diabetes Invest*. 2(2):82–91. doi: 10.1111/j.2040-1124.2010.00094.x.
799
- 800 36. Jiang M, Zhang Y, Liu M, Lan MS, Fei J, Fan W, Gao X, Lu D. 2011.
801 Hypermethylation of hepatic glucokinase and L-type pyruvate kinase
802 promoters in high-fat diet-induced obese rats. *Endocrinol*. 152(4):1284–1289.
803 doi: 10.1210/en.2010-1162.
804
- 805 37. Pettersson US, Christoffersson G, Massena S, Ahl D, Jansson L, Henriksnäs J
806 & Phillipson M. 2011. Increased recruitment but impaired function of
807 leukocytes during inflammation in mouse models of type 1 and type 2
808 diabetes. *PloS One*. 6(7): e22480. doi: 10.1371/journal.pone.0022480.
809
- 810 38. Bonora, E., Moghetti, P., Zaccanaro, C., Cigolini, M., Querena, M.,
811 Cacciatori, V., Corgnati, A. & Muggeo, M. 1989. Estimates of in vivo insulin
812 action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and
813 hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 68(2):374–
814 378. doi: 10.1210/jcem-68-2-374
815
- 816 39. Panveloski-Costa AC, Silva Teixeira S, Ribeiro IM, Serrano-Nascimento C,
817 das Neves RX, Favaro RR, Seelaender M, Antunes VR, Nunes MT. 2016.
818 Thyroid hormone reduces inflammatory cytokines improving glycaemia
819 control in alloxan-induced diabetic wistar rats. *Acta Physiol (Oxf)*.
820 217(2):130-40. doi: 10.1111/apha.12647.
821
- 822 40. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the
823 concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of
824 the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 18(6):499-502. doi:
825 <http://clinchem.aaccjnls.org/content/clinchem/18/6/499.full.pdf>
826
- 827 41. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC.
828 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function
829 from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*
830 28(7):412-419.
831
- 832 42. Horwitz W, AOAC International. (2002). “Oils and Fats” in *Official Methods*
833 *of Analysis of AOAC (Association of Official Analytical Chemists)*, ed.
834 Kenneth Helrich; Association of Official Analytical Chemists. (Arlington),

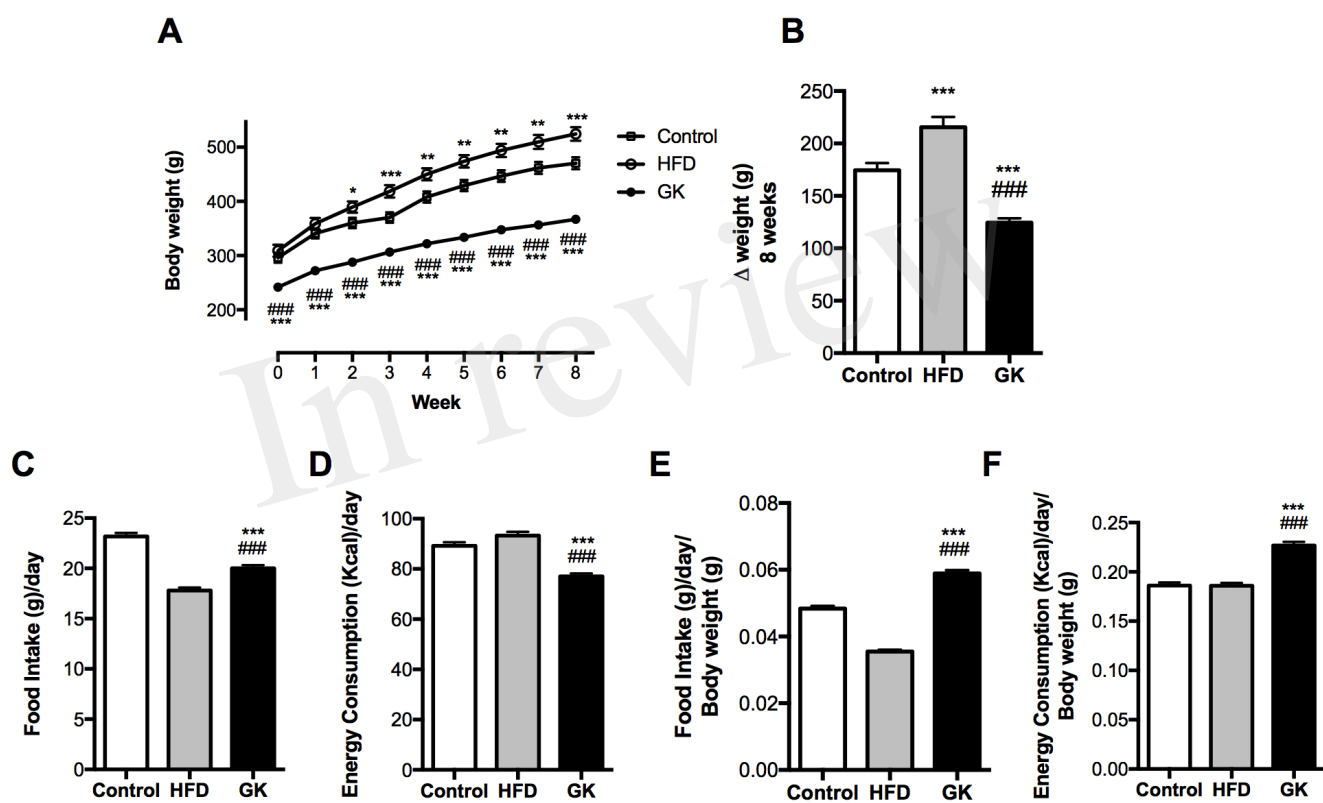
- 835 20-24A.
836
837 43. Shirai N, Suzuki H, Wada S. 2005. Direct methylation from mouse plasma
838 and from liver and brain homogenates. *Anal Biochem.* 343(1):48-53. doi:
839 10.1016/j.ab.2005.04.037
840
841 44. Crettaz M, Prentki M, Zaninetti D, Jeanrenaud B. 1980. Insulin resistance in
842 soleus muscle from obese Zucker rats. Involvement of several defective sites.
843 *Biochem J.* 186(2):525-34. doi:
844 [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1161605/pdf/biochemj00428-](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1161605/pdf/biochemj00428-0139.pdf)
845 [0139.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1161605/pdf/biochemj00428-0139.pdf)
846
847 45. Challiss RA, Espinal J, Newsholme EA. 1983. Insulin sensitivity of rates of
848 glycolysis and glycogen synthesis in soleus, stripped soleus, epitrochlearis,
849 and hemi-diaphragm muscles isolated from sedentary rats. *Biosci Rep.*
850 3(7):675-9. doi: 10.1007/BF01172878
851
852 46. Hirabara SM, Silveira LR, Alberici LC, Leandro CV, Lambertucci RH,
853 Polimeno GC, Cury Boaventura MF, Procopio J, Vercesi AE, Curi R. 2006.
854 Acute effect of fatty acids on metabolism and mitochondrial coupling in
855 skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.*1757(1):57-66. doi:
856 10.1016/j.bbabi.2005.11.007
857
858 47. Hirabara SM, Folador A, Fiamoncini J, Lambertucci RH, Rodrigues CF Jr,
859 Rocha MS, Aikawa J, Yamazaki RK, Martins AR, Rodrigues AC, Carpinelli
860 AR, Pithon-Curi TC, Fernandes LC, Gorjão R, Curi R. 2013. Fish oil
861 supplementation for two generations increases insulin sensitivity in rats. *J Nutr*
862 *Biochem.* (6):1136-45. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.08.014.
863
864 48. Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of
865 the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-685.
866
867 49. Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT, Weiler IJ. 2008. The use of
868 total protein stains as loading controls: an alternative to high abundance
869 single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J. Neurosci.*
870 *Methods.* 172(2):250-254. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.05.003
871
872 50. Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A,
873 Martínez-Augustin O, De Medina FS. 2010. Reversible Ponceau staining as a
874 loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem.*
875 15(2):318-320. doi: 10.1016/j.ab.2010.02.036.
876
877 51. Mandarim-De-Lacerda CA. 1995. Métodos quantitativos em morfologia. Rio
878 de Janeiro: Ed UDUERJ.
879
880 52. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. 2006. Mechanisms linking obesity to
881 insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 444(7121):840-846.
882 doi:10.1038/nature05482
883
884 53. Tanaka S, Honda M, Wu B, Kazumi T. 2011. Clinical features of normal

- 885 weight Japanese patients with type 2 diabetes who had formerly been obese. *J*
886 *Atheroscler Thromb* 2011;18(2):115–121. doi:
887 https://www.jstage.jst.go.jp/article/jat/18/2/18_5926/_pdf
888
- 889 54. Prato SD, LaSalle J, Matthaehi S, Bailey CJ, Global Partnership for Effective
890 Diabetes Management. 2010. Tailoring treatment to the individual in type 2
891 diabetes practical guidance from the Global Partnership for Effective Diabetes
892 Management. *Int J Clin Pract*. 64(3):295–304. doi: 10.1111/j.1742-
893 1241.2009.02227.x.
894
- 895 55. Xie W, Du L. 2011. Diabetes is an inflammatory disease: evidence from
896 traditional Chinese medicines. *Diabetes Obes Metab*. 13(4):289-301. doi:
897 10.1111/j.1463-1326.2010.01336.x.
898
- 899 56. Eckel RH, Kahn SE, Ferrannini E, Goldfine AB, Nathan DM, Schwartz MW,
900 Smith RJ, Smith SR. 2011. Obesity and type 2 diabetes: what can be unified
901 and what needs to be individualized? *J Clin Endocrinol Metab*. 96(6):1654-63.
902 doi: 10.1210/jc.2011-0585.
903
- 904 57. Padilla DJ, McDonough P, Behnke BJ, Kano Y, Hageman KS, Musch TI,
905 Poole DC. 2007. Effects of type II diabetes on muscle microvascular oxygen
906 pressures. *Respir Physiol Neurobiol*. 156(2):187–195. doi:
907 10.1016/j.resp.2006.08.008
908
- 909 58. Dadke SS, Li HC, Kusari AB, Begum N, Kusari J. 2000. Elevated expression
910 and activity of protein-tyrosine phosphatase 1B in skeletal muscle of insulin-
911 resistant type II diabetic Goto-Kakizaki rats. *Biochem Biophys Res Commun*.
912 274(3): 583-589. doi: 10.1006/bbrc.2000.3188
913
- 914 59. Xue B, Sukumaran S, Nie J, Jusko WJ, Dubois DC, Almon RR. 2011.
915 Adipose tissue deficiency and chronic inflammation in diabetic Goto-Kakizaki
916 rats. *PLoS One*. 6(2):e17386. doi: 10.1371/journal.pone.0017386.
917
- 918 60. Barbu A, Hedlund GP, Lind J, Carlsson C. 2009. Pref-1 and adipokine
919 expression in adipose tissues of GK and Zucker rats. *Mol Cell Endocrinol*.
920 299(2):163-171. doi: 10.1016/j.mce.2008.11.019.
921
- 922 61. Xue B, Nie J, Wang X, DuBois DC, Jusko WJ, Almon RR. 2015. Effects of
923 High Fat Feeding on Adipose Tissue Gene Expression in Diabetic Goto-
924 Kakizaki Rats. *Gene Regul Syst Bio*. 9:15-26. doi: 10.4137/GRSB.S25172.
925
- 926 62. Lacasa D, Taleb S, Keophiphath M, Miranville A, Clement K. 2007.
927 Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of
928 proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology*. 148(2):868-877. doi:
929 10.1210/en.2006-0687
930
- 931 63. Bisbis S, Bailbe D, Tormo MA, Picarel-Blanchot F, Derouet M, Simon J,
932 Portha B. 1993. Insulin resistance in the GK rat: decreased receptor number
933 but normal kinase activity in liver. *Am J Physiol*. 265(5 Pt 1):E807-E813.
934

- 935 64. Berthelie C, Kergoat M, Portha B. 1997. Lack of deterioration of insulin
936 action with aging in the GK rat: a contrasted adaptation as compared with
937 nondiabetic rats. *Metabolism*. 46(8):890-896. doi:
938 [http://dx.doi.org/10.1016/S0026-0495\(97\)90075-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0026-0495(97)90075-5)
939
- 940 65. Almon RR, DuBois DC, Lai W, Xue B, Nie J, Jusko WJ. 2009. Gene
941 expression analysis of hepatic roles in cause and development of diabetes in
942 Goto-Kakizaki rats. *J Endocrinol*. 200(3):331-46. doi: 10.1677/JOE-08-0404.
943
- 944 66. Sinitskaya N, Gourmelen S, Schuster-Klein C, Guardiola-Lemaitre B, Pévet P,
945 Challet E. 2007. Increasing the fat-to-carbohydrate ratio in a high-fat diet
946 prevents the development of obesity but not a prediabetic state in rats. *Clin Sci*
947 (Lond). 113(10):417-425. doi: 10.1042/CS20070182
948
- 949 67. Wongchitrat P, Klosen P, Pannengpetch S, Kitidee K, Govitrapong P,
950 Isarankura-Na-Ayudhya C. 2017. High-fat diet-induced plasma protein and
951 liver changes in obese rats can be attenuated by melatonin supplementation.
952 *Nutr Res*. 42:51-63. doi: 10.1016/j.nutres.2017.04.011.
953
- 954 68. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. 2006. Inflammation and insulin resistance.
955 *J Clin Invest*. 116(7):1793-1801. doi: 10.1172/JCI29069
956
- 957 69. Cawthorn WP, Sethi JK. 2008. TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett*.
958 582(1):117-131. doi: 10.1016/j.febslet.2007.11.051
959
- 960 70. Wernstedt Asterholm I, Tao C, Morley TS, Wang QA, Delgado-Lopez F,
961 Wang ZV, Scherer PE. 2014. Adipocyte inflammation is essential for healthy
962 adipose tissue expansion and remodeling. *Cell Metab*. 20(1):103-118. doi:
963 10.1016/j.cmet.2014.05.005.
964
- 965 71. Asghar A, Sheikh N. 2017. Role of immune cells in obesity induced low grade
966 inflammation and insulin resistance. *Cell Immunol*. 315:18-26. doi:
967 10.1016/j.cellimm.2017.03.001.
968
- 969 72. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. 2006. TLR4 links
970 innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*.
971 116(11):3015-3025. doi: 10.1172/JCI28898
972
- 973 73. Gallagher EJ, Leroith D, Karnieli E. 2010. Insulin resistance in obesity as the
974 underlying cause for the metabolic syndrome. *Mt Sinai J Med*. 77(5):511-523.
975 doi: 10.1002/msj.20212.
976
- 977 74. Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN. 2011. Fatty acids, obesity, and insulin
978 resistance: time for a reevaluation. *Diabetes*. 60(10):2441-2449. doi:
979 10.2337/db11-0425.
980
- 981 75. Liu TW, Heden TD, Matthew Morris E, Fritsche KL, Vieira-Potter VJ,
982 Thyfault JP. 2015. High-Fat Diet Alters Serum Fatty Acid Profiles in Obesity
983 Prone Rats: Implications for In Vitro Studies. *Lipids*. 50(10):997-1008. doi:
984 10.1007/s11745-015-4061-5.

- 985
986 76. Paton CM, Ntambi JM. 2009. Biochemical and physiological function of
987 stearyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297(1):E28-37.
988 doi: 10.1152/ajpendo.90897.2008.
989
- 990 77. Li ZZ, Berk M, McIntyre TM, Feldstein AE. 2009. Hepatic lipid partitioning
991 and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease role of stearyl-CoA
992 desaturase. *J Biol Chem* 284(9):5637–5644. doi: 10.1074/jbc.M807616200.
993
- 994 78. Pan M, Song YL, Xu JM, Gan HZ. 2006. Melatonin ameliorates nonalcoholic
995 fatty liver induced by high-fat diet in rats. *J Pineal Res.* 41(1):79-84. doi:
996 10.1111/j.1600-079X.2006.00346.x
997
- 998 79. Miralles F, Portha B. 2001. Early development of beta-cells is impaired in the
999 GK rat model of type 2 diabetes. *Diabetes.* 50(Suppl 1):S84–88. doi:
1000 <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.2007.S84>
1001
- 1002 80. Plachot C, Movassat J, Portha B. 2001. Impaired beta-cell regeneration after
1003 partial pancreatectomy in the adult Goto-Kakizaki rat, a spontaneous model of
1004 type 2 diabetes. *Histochem Cell Biol.* 116(2):131–139. doi:
1005 10.1007/s004180100302
1006
- 1007 81. Calderari S, Gangnerau MN, Thibault M, Meile MJ, Kassis N, Alvarez C,
1008 Portha B, Serradas P. 2007. Defective IGF-2 and IGFR1 protein production in
1009 embryonic pancreas precedes beta cell mass anomaly in Goto-Kakizaki rat
1010 model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 50(7):1463–1471. doi:
1011 10.1007/s00125-007-0676-2
1012
- 1013
1014
1015

Figure 1.TIFF



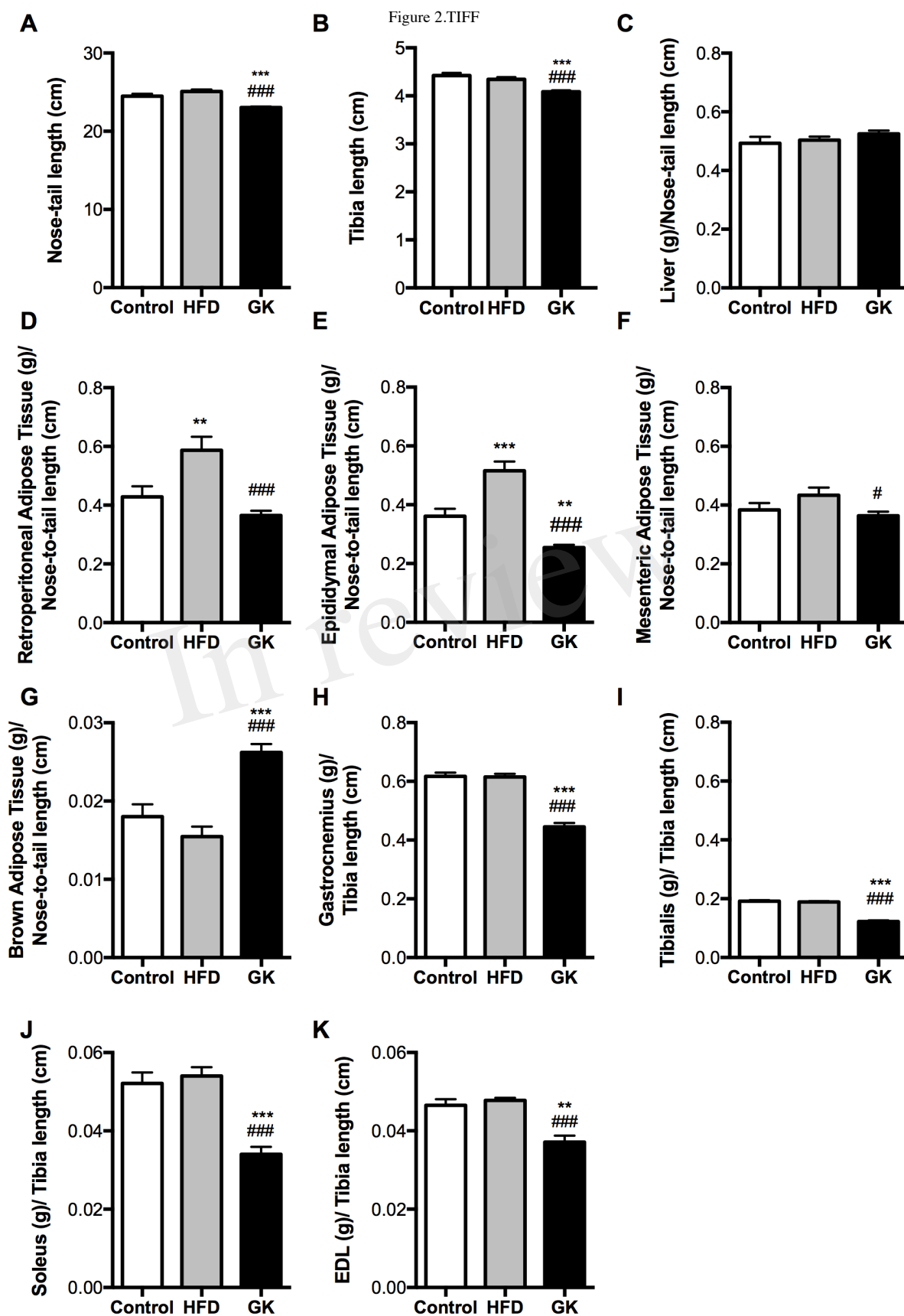


Figure 3.TIFF

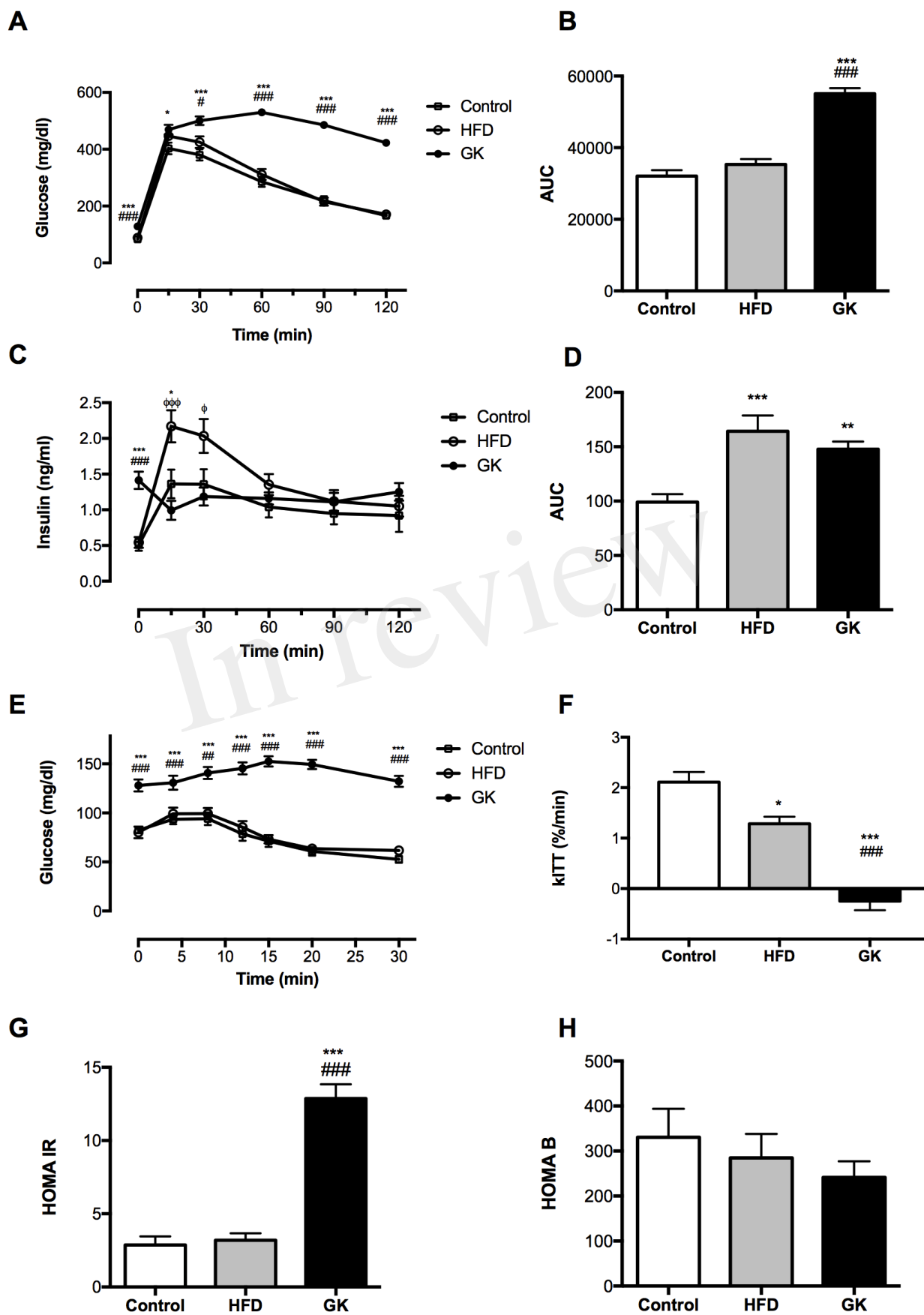


Figure 4.TIFF

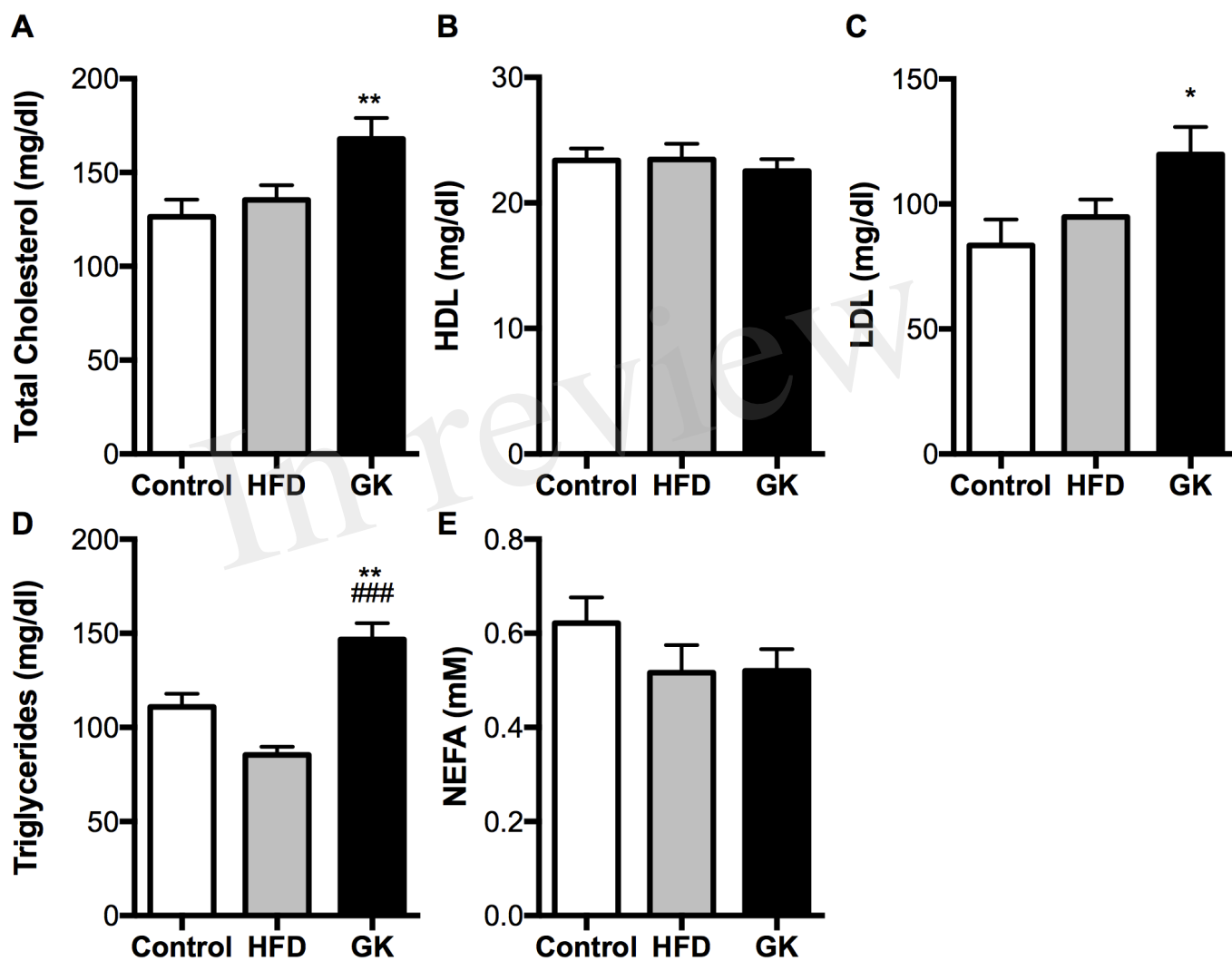


Figure 5.TIFF

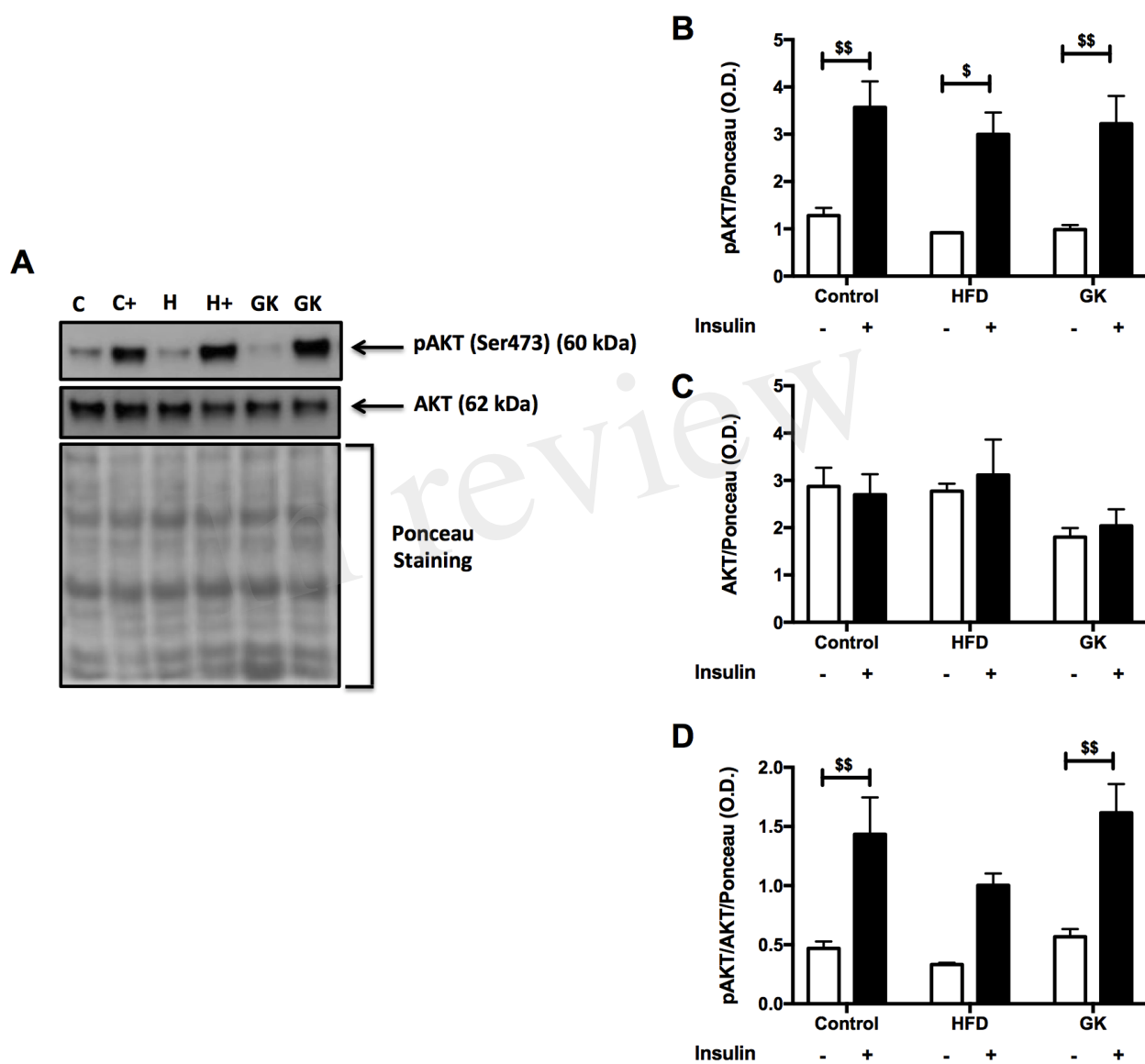


Figure 6.TIFF

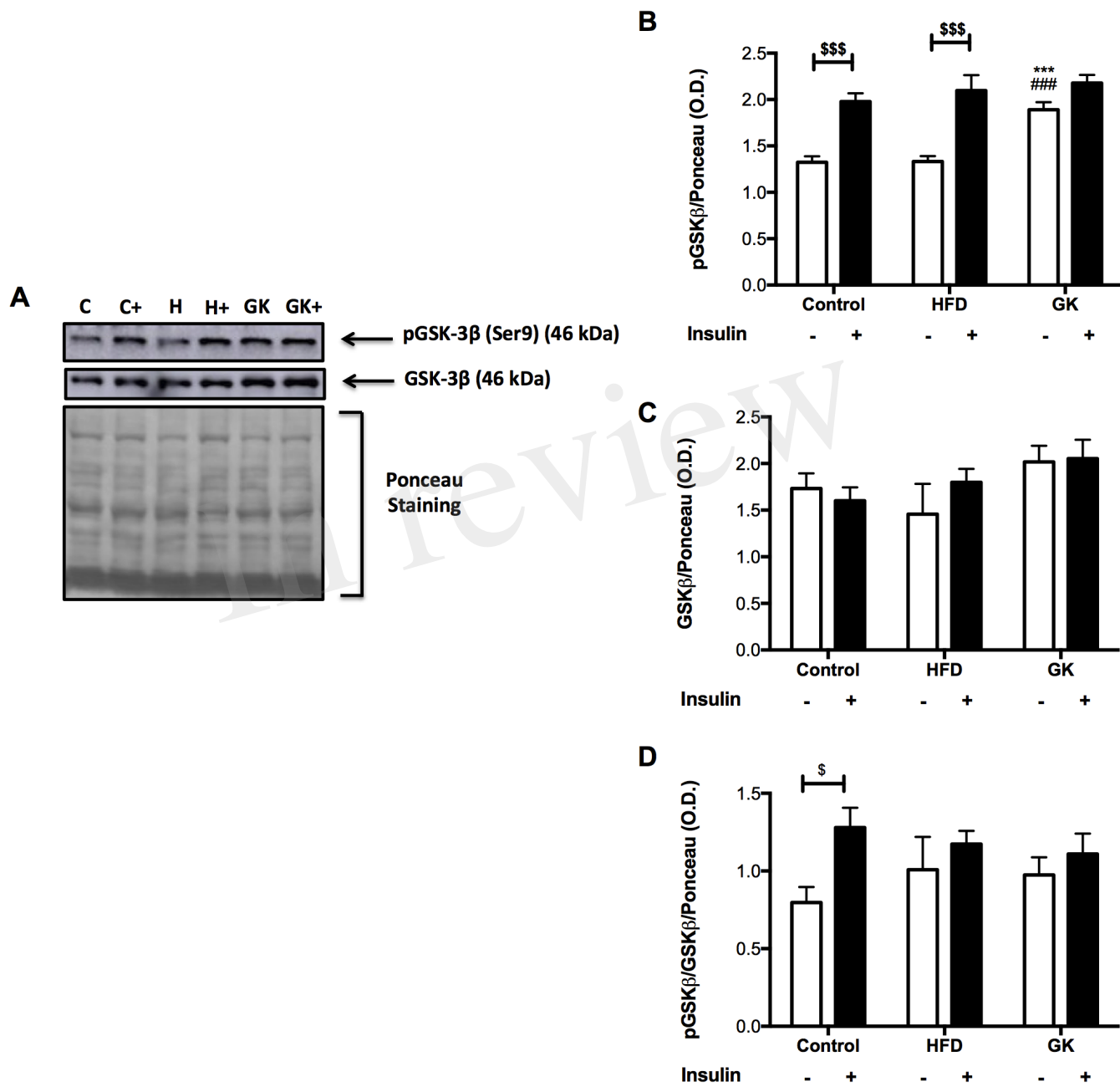


Figure 7.TIFF

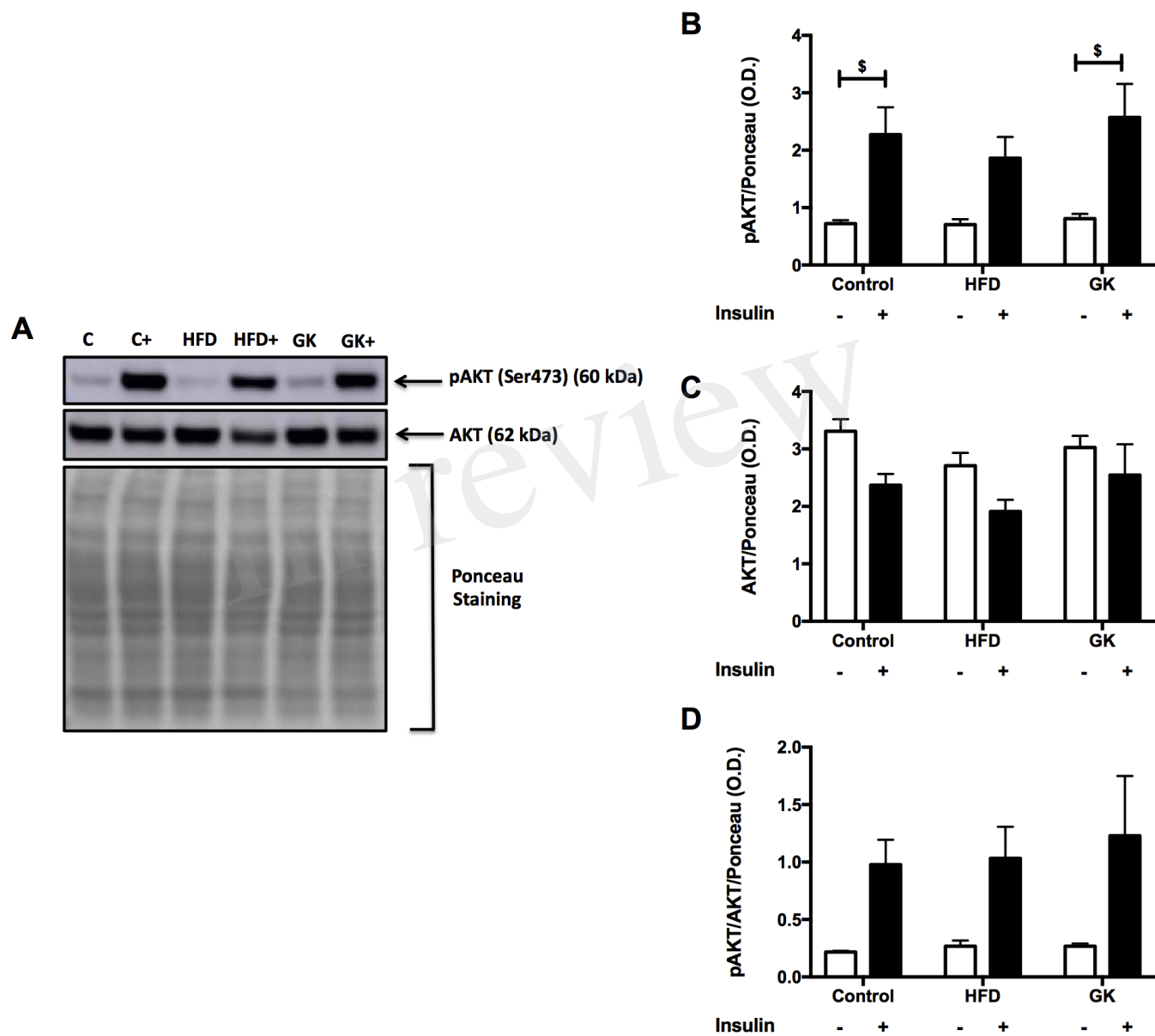


Figure 8.TIFF

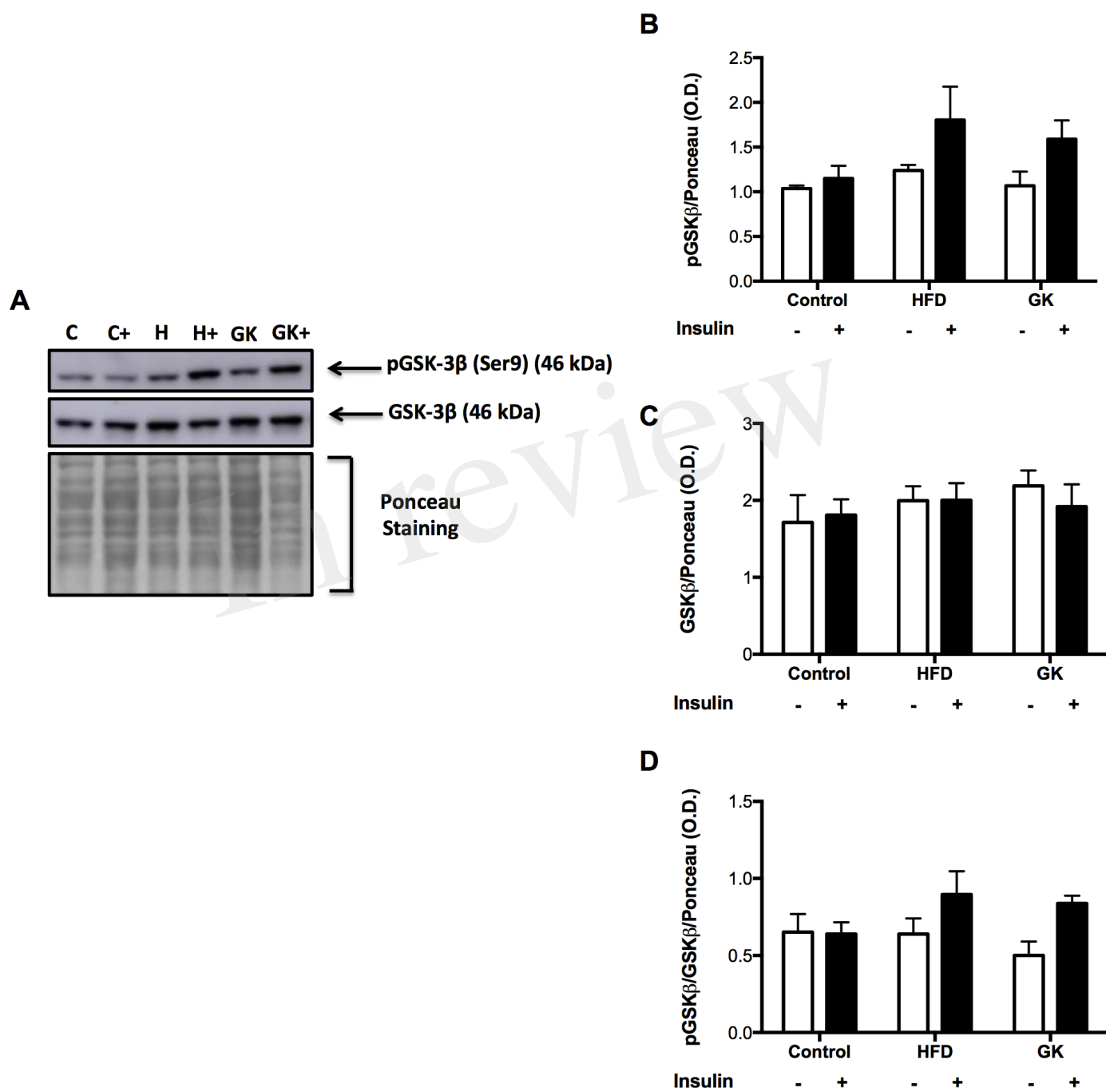


Figure 9.TIFF

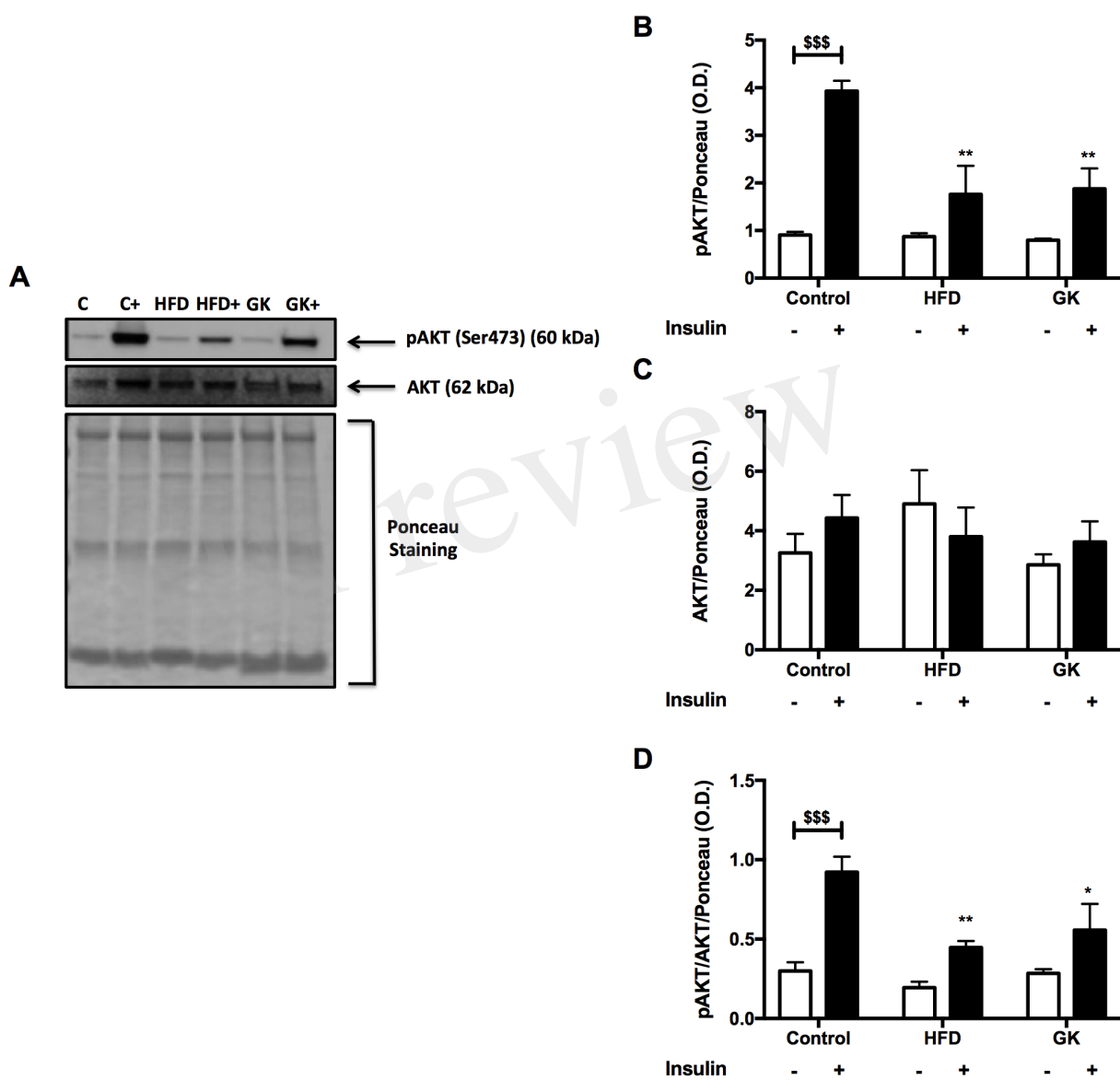


Figure 10.TIFF

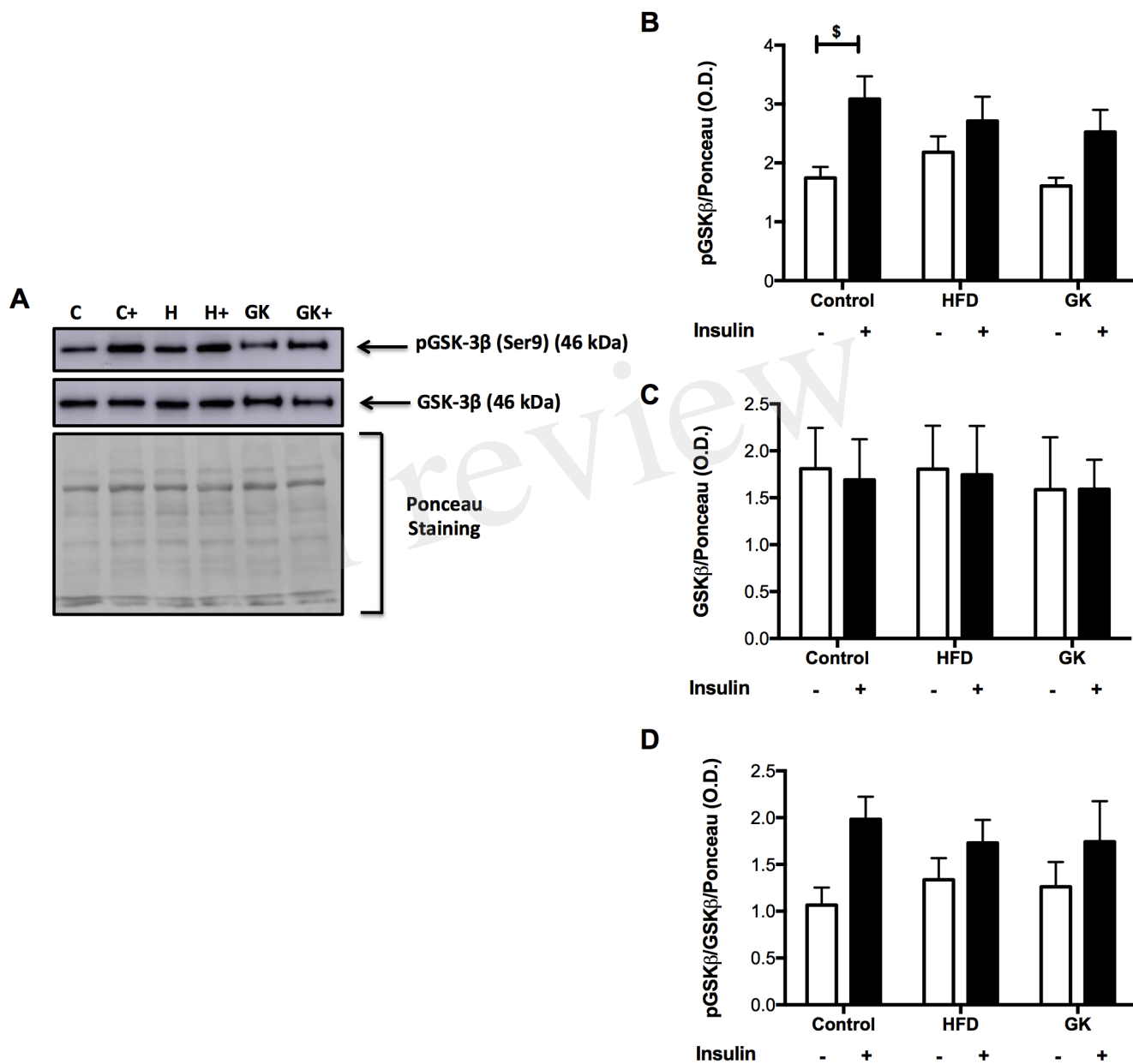


Figure 11.TIFF

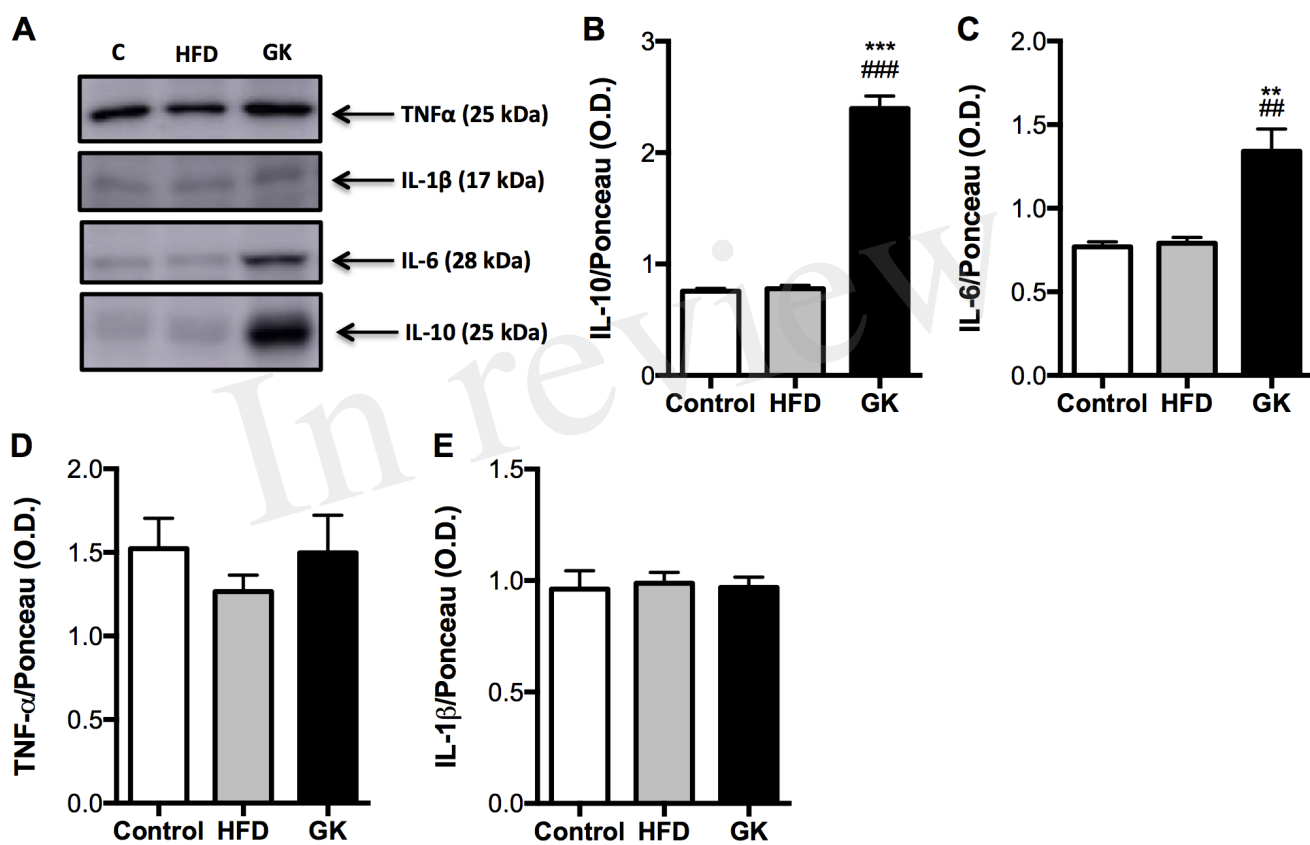


Figure 12.TIFF

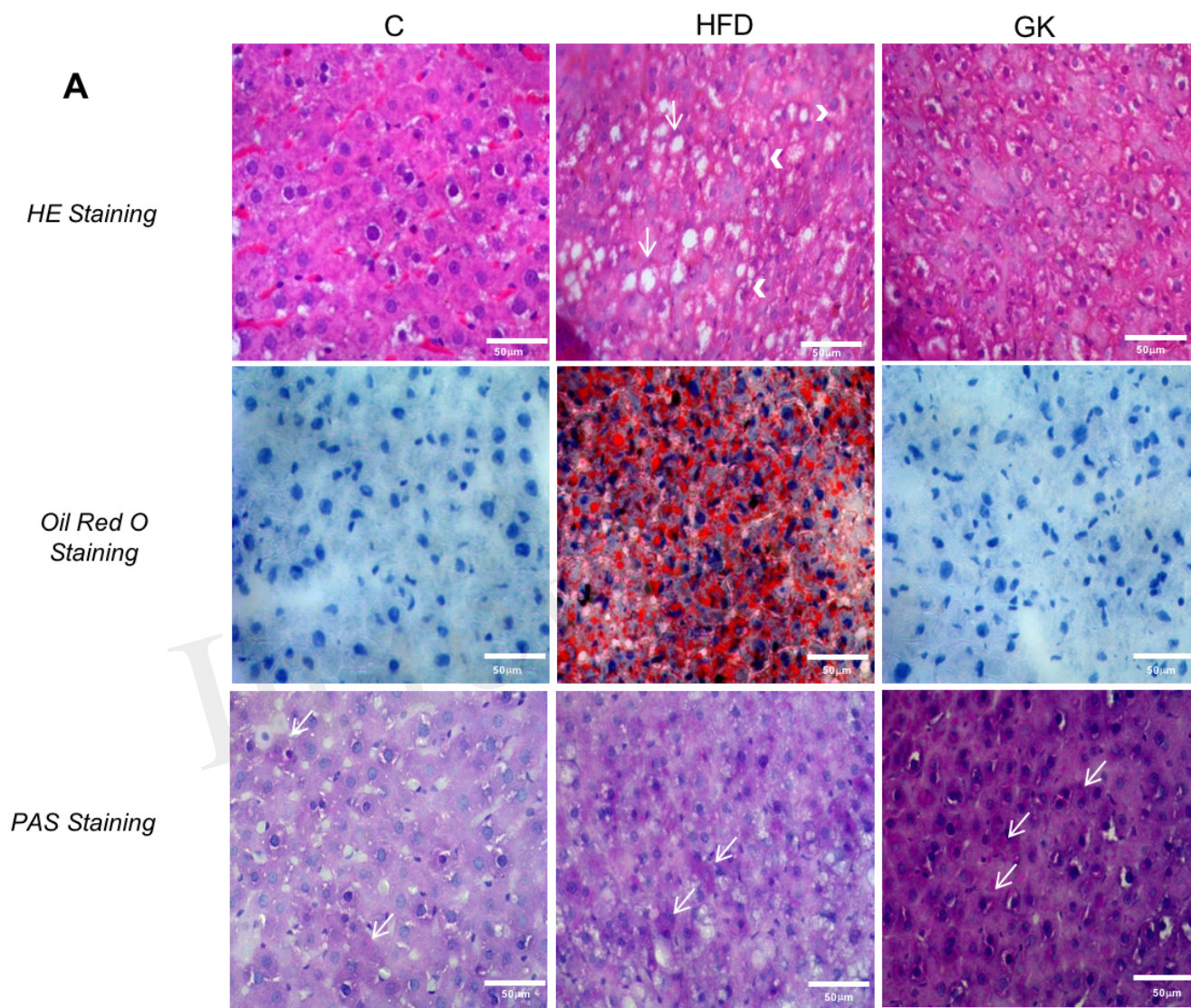
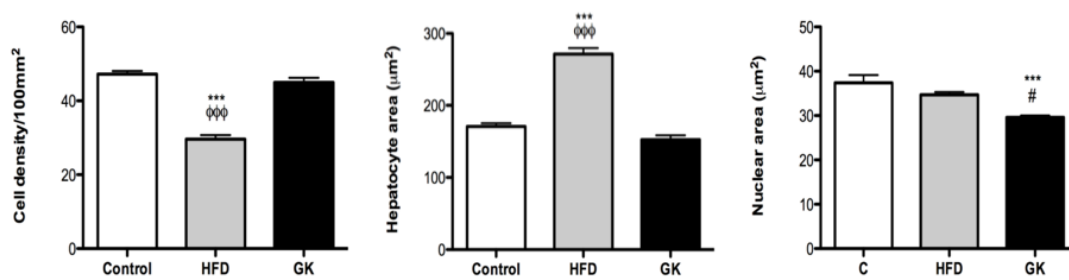
**B**

Figure 13.TIFF

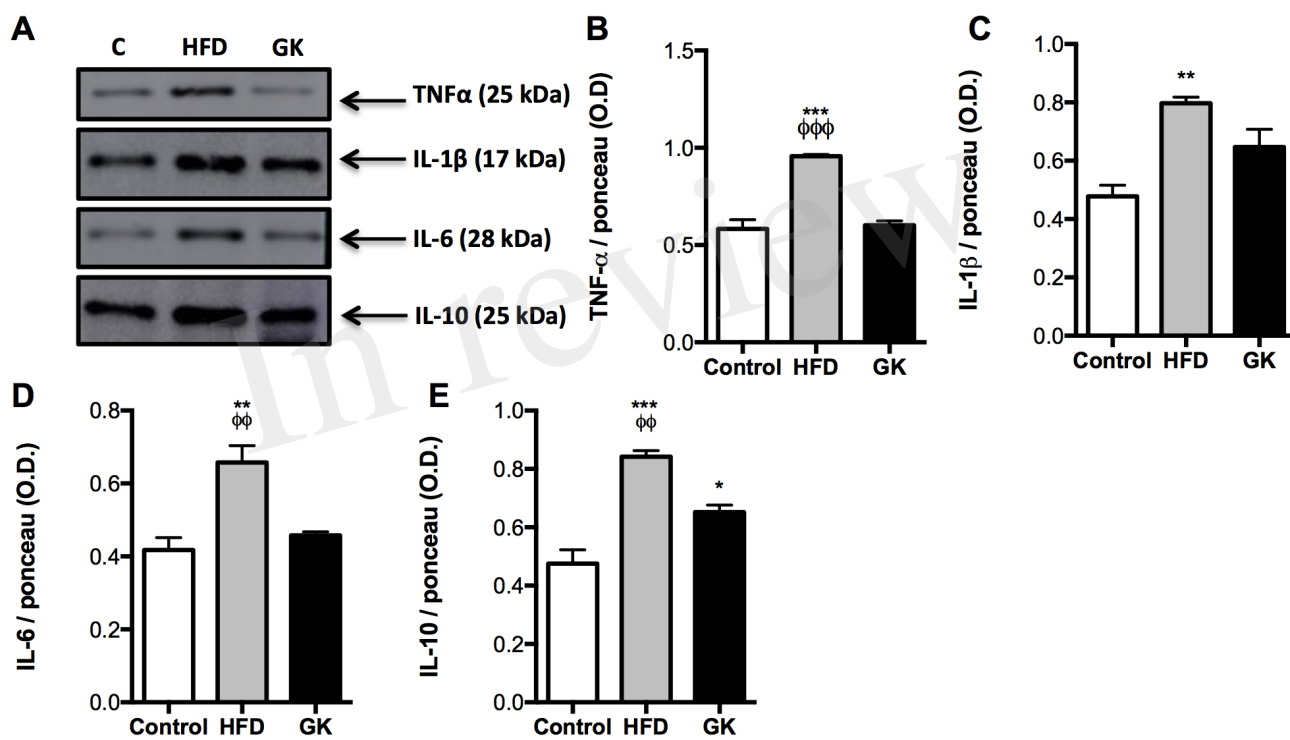


Figure 14.TIFF

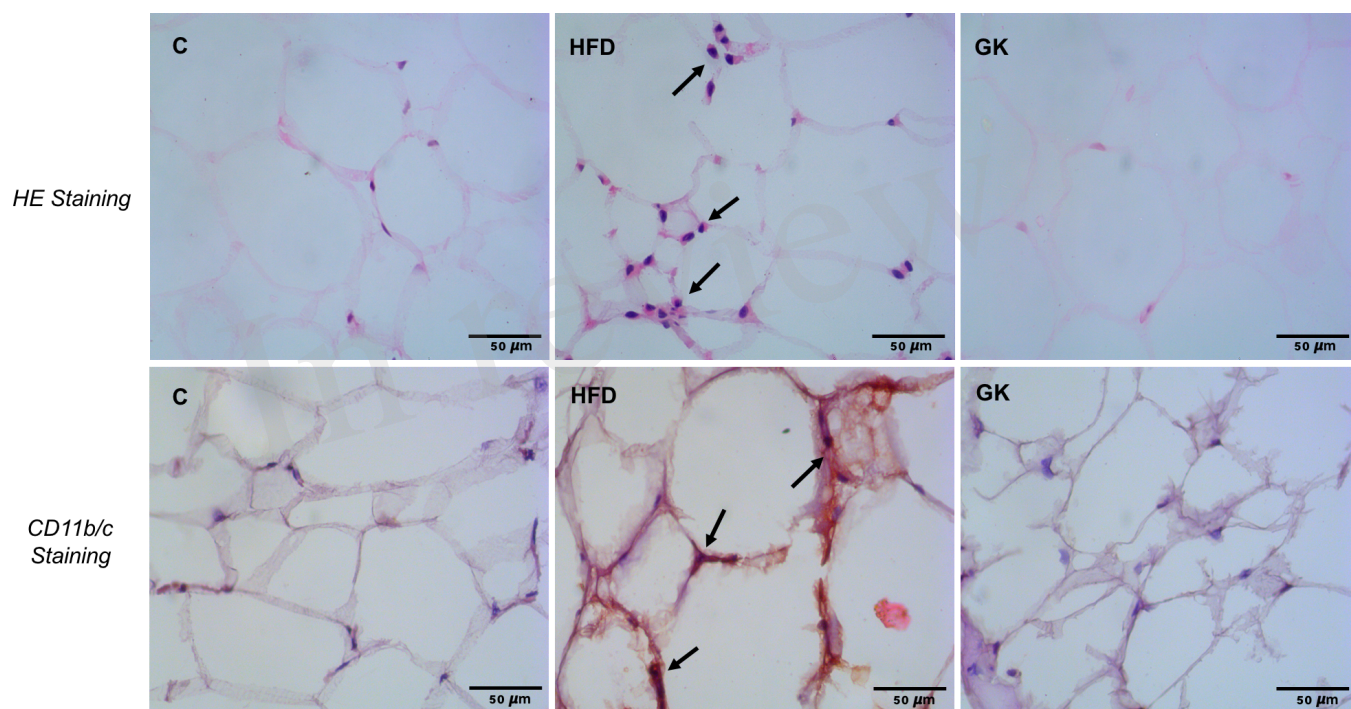
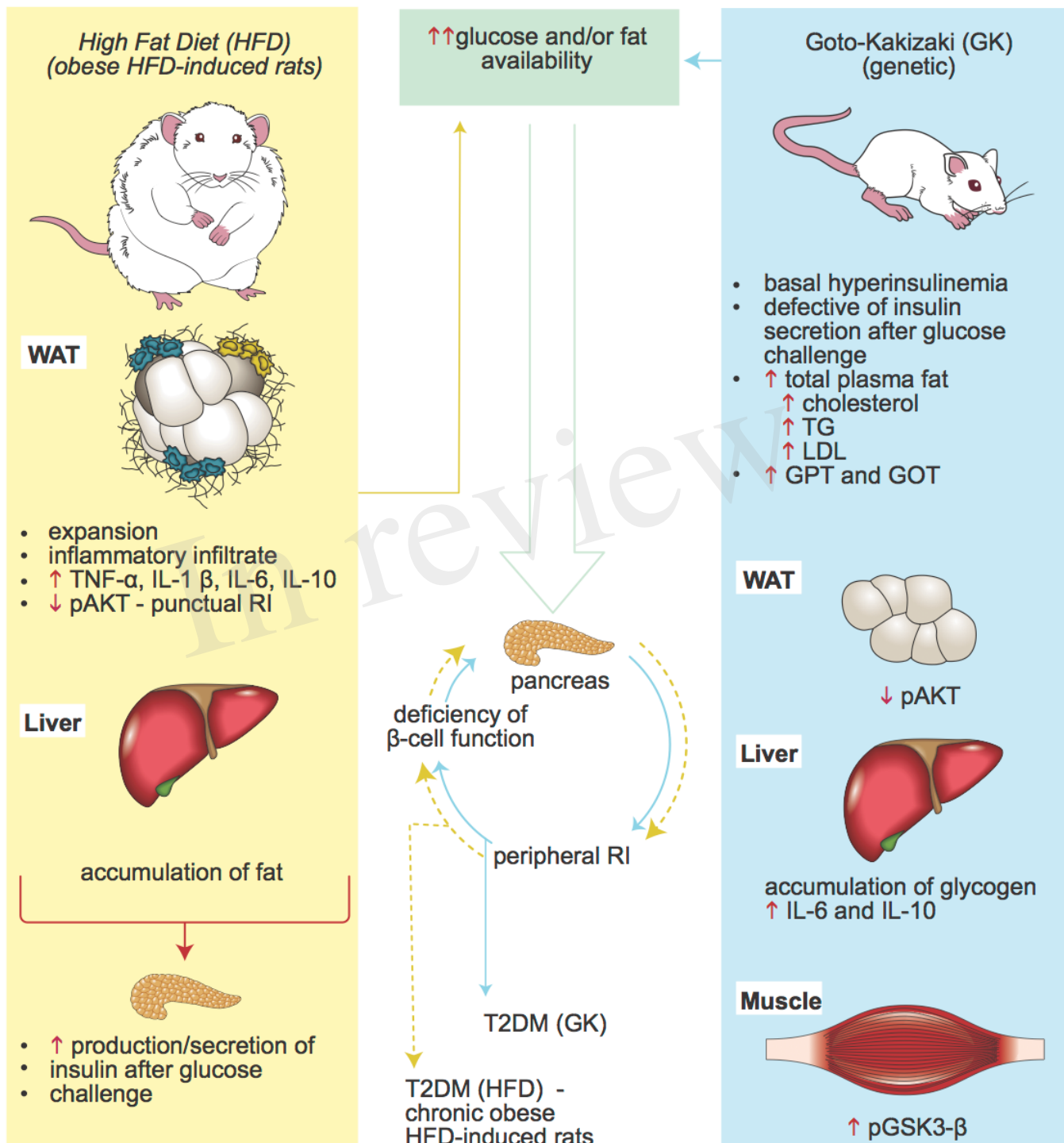


Figure 15.TIFF





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 880889 Animal: C14 (Controle 14) Data: 21/09/2015
 Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Linhagem Wistar** Sexo: **Indef.**
 Responsável : **Instituto De Ciencias Biomedicas** Dt. Nasc.: **20/09/2015** Idade: **0a 0m 2d**
 Requisitante : **Nao Referido**
 Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**
 Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**
 Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: SANGUE COM E.D.T.A.
 Equipamento: PENTRA 120 DX

Eritrograma

Eritrócitos.....	8,46 milhões/mm ³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	13,8 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	45 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	53,19 u ³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	16,31 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	30,67 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	7,60		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Leucograma

Leucócitos.....	6,60 mil/mm ³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	40,00 %	2640 /mm ³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	55,00 %	3630 /mm ³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Monócitos.....	5,00 %	330 /mm ³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm ³	

Observações série branca.... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... 0,84 milhões/mm³ 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: RICARDO DUARTE LOPES - CRMV: 17187

Unidade Aratás
 Av. Aratás, 1009 - Moema
 55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
 Av. Divino Salvador, 744 - Moema
 55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
 Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
 55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
 Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
 55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 881149 **Animal: Controle 15 (15)** **Data: 22/09/2015**

Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Mamífero Silvestre** Sexo: **Indef.**

Responsável : **Tatiana Carolina Alba** Dt. Nasc.: **21/09/2015** Idade: **0a 0m 2d**

Requisitante : **Nao Referido**

Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**

Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**

Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: **SANGUE COM E.D.T.A.**
 Equipamento: **PENTRA 120 DX**

Eritrograma

Eritrócitos.....	7,5 milhões/mm ³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	12,7 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	40 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	53,33 u ³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	16,93 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	31,75 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	6,40		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Leucograma

Leucócitos.....	5,60 mil/mm ³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	63,00 %	3528 /mm ³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	37,00 %	2072 /mm ³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Monócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm ³	

Observações série branca.... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... 0,95 milhões/mm³ 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: **LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087**

Unidade Aratás
Av. Aratás, 1009 - Moema
55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
Av. Divino Salvador, 744 - Moema
55 11 5055-9271

Unidade Jd. Anália Franco
Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 881154 Animal: Controle 16 (C16)

Data: 22/09/2015

Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana**

Raça: **Mamífero Silvestre**

Sexo: **Indef.**

Responsável : **Tatiana Carolina Alba**

Dt. Nasc.: **21/09/2015**

Idade: **0a 0m 2d**

Requisitante : **Nao Referido**

Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**

Endereço : **Av Professor Lineu Prestes**

Nº: **1524**

Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: **SANGUE COM E.D.T.A.**

Equipamento: **PENTRA 120 DX**

Eritrograma

Eritrócitos.....	8,06 milhões/mm³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	13,2 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	42 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	52,11 u³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	16,38 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	31,43 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	6,80		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **DISCRETA ANISOCITOSE.**

Leucograma

Leucócitos.....	6,70 mil/mm³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	55,00 %	3685 /mm³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	43,00 %	2881 /mm³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Monócitos.....	2,00 %	134 /mm³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm³	

Observações série branca.... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... **0,99 milhões/mm³** 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: **LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087**

Unidade Aratás
Av. Aratás, 1009 - Moema
55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
Av. Divino Salvador, 744 - Moema
55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 880891 Animal: C17 (Controle 17)

Data: 21/09/2015

Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana**

Raça: **Linhagem Wistar**

Sexo: **Indef.**

Responsável : **Instituto De Ciencias Biomedicas**

Dt. Nasc.: **21/09/2015**

Idade: **0a 0m 1d**

Requisitante : **Nao Referido**

Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**

Endereço : **Av Professor Lineu Prestes**

Nº: **1524**

Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: **SANGUE COM E.D.T.A.**

Equipamento: **PENTRA 120 DX**

Eritrograma

Eritrócitos..... **8,3**
 Hemoglobina..... **13,7**
 Hematócrito..... **44**
 V.c.m..... **53,01**
 H.c.m..... **16,51**
 C.h.c.m..... **31,14**
 Proteína total..... **6,80**

Observações série vermelha... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Leucograma

Leucócitos..... **5,50**
 Mielócitos..... **0,00 %** **0 /mm³**
 Metamielócitos..... **0,00 %** **0 /mm³**
 Bastonetes..... **0,00 %** **0 /mm³**
 Segmentados..... **51,00 %** **2805 /mm³**
 Eosinófilos..... **0,00 %** **0 /mm³**
 Basófilos..... **0,00 %** **0 /mm³**
 Linfócitos típicos..... **44,00 %** **2420 /mm³**
 Linfócitos atípicos..... **0,00 %** **0 /mm³**
 Monócitos..... **5,00 %** **275 /mm³**
 Outros (*)..... **0,00 %** **0 /mm³**

Observações série branca..... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... **0,88**

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: **RICARDO DUARTE LOPES - CRMV: 17187**

Unidade Aratás
Av. Aratás, 1009 - Moema
55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
Av. Divino Salvador, 744 - Moema
55 11 5055-9271

Unidade Jd. Anália Franco
Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 883662 **Animal: Controle 18 (C18)**

Data: 01/10/2015

Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana**

Raça: **Linhagem Wistar**

Sexo: **Macho**

Responsável : **Tatiana Carolina**

Dt. Nasc.: **01/06/2015**

Idade: **0a 4m 0d**

Requisitante : **Nao Referido**

Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**

Endereço : **Av Professor Lineu Prestes**

Nº: **1524**

Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: **SANGUE COM E.D.T.A.**

Equipamento: **PENTRA 120 DX**

Eritrograma

Eritrócitos.....	8,8 milhões/mm³		6,6 a 9,0 milhões/mm³
Hemoglobina.....	16,6 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	47 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	53,41 u³		52,6 a 65,4 u³
H.c.m.....	18,86 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	35,32 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	6,60		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **DISCRETA ANISOCITOSE E MODERADA POLICROMASIA.**

Leucograma

Leucócitos.....	6,50 mil/mm³		7,3 a 12,66 mil/mm³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 20 /mm³
Segmentados.....	58,00 %	3770 /mm³	400 a 2000 /mm³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm³	40 a 300 /mm³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 30 /mm³
Linfócitos típicos.....	41,00 %	2665 /mm³	5070 a 9070 /mm³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm³
Monócitos.....	1,00 %	65 /mm³	50 a 440 /mm³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm³	

Observações série branca.... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... **0,98 milhões/mm³** **0,84 a 1,24 milhões/mm³**

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA COM DIVERSOS AGREGADOS PLAQUETÁRIOS.**

Nota..... **AMOSTRA COM FIBRINA.**

Assinado eletronicamente por: **LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087**

Unidade Aratás
Av. Aratás, 1009 - Moema
55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
Av. Divino Salvador, 744 - Moema
55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
55 11 3740-1160



Nº OS: 894852 **Animal: Controle C19** **Data: 13/11/2015**
 Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Linhagem Wistar** Sexo: **Macho**
 Responsável : **Tatiana Carolina** Dt. Nasc.: **13/07/2015** Idade: **0a 4m 0d**
 Requirante : **Nao Referido**
 Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp** Nº: **1524**
 Endereço : **Av Professor Lineu Prestes**
 Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: **SANGUE COM E.D.T.A.**
 Equipamento: **PENTRA 120 DX**

Eritrograma

Eritrócitos.....	8,96 milhões/mm³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	15,6 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	43 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	47,99 u³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	17,41 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	36,28 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	7,00		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Leucograma

Leucócitos.....	6,00 mil/mm³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	52,00 %	3120 /mm³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	48,00 %	2880 /mm³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Monócitos.....	0,00 %	0 /mm³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm³	

Observações série branca.... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... **0,95 milhões/mm³** 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: **LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087**

Unidade Aratás
 Av. Aratás, 1009 - Moema
 55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
 Av. Divino Salvador, 744 - Moema
 55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
 Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
 55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
 Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
 55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 894853 **Animal: Controle C20** **Data: 13/11/2015**
 Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Linhagem Wistar** Sexo: **Macho**
 Responsável : **Tatiana Carolina** Dt. Nasc.: **13/07/2015** Idade: **0a 4m 0d**
 Requisitante : **Nao Referido**
 Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**
 Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**
 Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: SANGUE COM E.D.T.A.
 Equipamento: PENTRA 120 DX

Eritrograma

Eritrócitos.....	9,42 milhões/mm ³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	15,8 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	47 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	49,89 u ³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	16,77 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	33,62 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	7,20		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Leucograma

Leucócitos.....	6,30 mil/mm ³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	42,00 %	2646 /mm ³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	58,00 %	3654 /mm ³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Monócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm ³	

Observações série branca.... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... **0,87 milhões/mm³** 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087

Unidade Aratás
 Av. Aratás, 1009 - Moema
 55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
 Av. Divino Salvador, 744 - Moema
 55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
 Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
 55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
 Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
 55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 894855 **Animal: Controle C21** **Data: 13/11/2015**

Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Linhagem Wistar** Sexo: **Macho**

Responsável : **Tatiana Carolina** Dt. Nasc.: **13/07/2015** Idade: **0a 4m 0d**

Requisitante : **Nao Referido**

Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**

Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**

Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: SANGUE COM E.D.T.A.
Equipamento: PENTRA 120 DX

Eritrograma

Eritrócitos.....	9,27 milhões/mm ³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	15,6 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	46 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	49,62 u ³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	16,83 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	33,91 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	7,20		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Leucograma

Leucócitos.....	5,30 mil/mm ³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	67,00 %	3551 /mm ³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	33,00 %	1749 /mm ³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Monócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm ³	

Observações série branca.... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... **0,89 milhões/mm³** 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087

Unidade Aratás
Av. Aratás, 1009 - Moema
55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
Av. Divino Salvador, 744 - Moema
55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
55 11 3740-1160



Nº OS: 894861 **Animal: Hipertípica C22** **Data: 13/11/2015**

Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Linhagem Wistar** Sexo: **Macho**

Responsável : **Tatiana Carolina** Dt. Nasc.: **13/07/2015** Idade: **0a 4m 0d**

Requisitante : **Nao Referido**

Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**

Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**

Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: **SANGUE COM E.D.T.A.**
Equipamento: **PENTRA 120 DX**

Eritrograma

Eritrócitos.....	9,08 milhões/mm³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	16,2 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	47 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	51,76 u³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	17,84 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	34,47 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	7,00		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Leucograma

Leucócitos.....	7,20 mil/mm³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	89,00 %	6408 /mm³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	11,00 %	792 /mm³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Monócitos.....	0,00 %	0 /mm³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm³	
Observações série branca....	MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.		
Contagem plaquetária.....	0,98 milhões/mm³		0,84 a 1,24 milhões/mm ³
Avaliação plaquetária.....	NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.		

Assinado eletronicamente por: **LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087**

Unidade Aratás
Av. Aratás, 1009 - Moema
55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
Av. Divino Salvador, 744 - Moema
55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
55 11 3740-1160



Nº OS: 894858 **Animal: Controle C23** **Data: 13/11/2015**
 Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Linhagem Wistar** Sexo: **Macho**
 Responsável : **Tatiana Carolina** Dt. Nasc.: **13/07/2015** Idade: **0a 4m 0d**
 Requisitante : **Nao Referido**
 Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**
 Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**
 Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: SANGUE COM E.D.T.A.
 Equipamento: PENTRA 120 DX

Eritrograma

Eritrócitos.....	6,9 milhões/mm ³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	13,8 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	47 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	68,12 u ³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	20 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	29,36 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	7,00		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Leucograma

Leucócitos.....	9,10 mil/mm ³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	80,00 %	7280 /mm ³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	19,00 %	1729 /mm ³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Monócitos.....	1,00 %	91 /mm ³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm ³	

Observações série branca... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... **0,91 milhões/mm³** 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 894859 **Animal: Controle C24** **Data: 13/11/2015**
 Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Linhagem Wistar** Sexo: **Macho**
 Responsável : **Tatiana Carolina** Dt. Nasc.: **13/07/2015** Idade: **0a 4m 0d**
 Requisitante : **Nao Referido**
 Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**
 Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**
 Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: SANGUE COM E.D.T.A.
 Equipamento: PENTRA 120 DX

Eritrograma

Eritrócitos.....	9,92 milhões/mm ³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	16,4 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	48 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	48,39 u ³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	16,53 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	34,17 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	7,80		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Leucograma

Leucócitos.....	8,80 mil/mm ³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	85,00 %	7480 /mm ³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	12,00 %	1056 /mm ³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Monócitos.....	3,00 %	264 /mm ³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm ³	

Observações série branca.... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... 0,97 milhões/mm³ 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087

Unidade Aratás
 Av. Aratás, 1009 - Moema
 55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
 Av. Divino Salvador, 744 - Moema
 55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
 Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
 55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
 Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
 55 11 3740-1160



Nº OS: 894560 **Animal: Controle C25** **Data: 12/11/2015**
 Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Mamífero Silvestre** Sexo: **Macho**
 Responsável : **Tatiana** Dt. Nasc.: **12/07/2015** Idade: **0a 4m 0d**
 Requisitante : **Nao Referido**
 Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**
 Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**
 Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: SANGUE COM E.D.T.A.
 Equipamento: PENTRA 120 DX

Eritrograma

Eritrócitos.....	9,36 milhões/mm ³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	16,1 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	47 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	50,21 u ³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	17,2 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	34,26 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	7,80		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Leucograma

Leucócitos.....	5,20 mil/mm ³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	65,00 %	3380 /mm ³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	34,00 %	1768 /mm ³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Monócitos.....	1,00 %	52 /mm ³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm ³	

Observações série branca... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... **0,97 milhões/mm³** 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: **ELEIZA ARAGÃO D'ESTEFANO - CRMV: 7309**





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 894562 Animal: Controle C26 Data: 12/11/2015
 Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Mamífero Silvestre** Sexo: **Macho**
 Responsável : **Tatiana** Dt. Nasc.: **12/07/2015** Idade: **0a 4m 0d**
 Requisitante : **Nao Referido**
 Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**
 Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**
 Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: SANGUE COM E.D.T.A.
 Equipamento: PENTRA 120 DX

Eritrograma

Eritrócitos.....	9,2 milhões/mm ³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	15,2 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	45,3 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	49,24 u ³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	16,52 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	33,55 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	8,00		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Leucograma

Leucócitos.....	7,60 mil/mm ³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	46,00 %	3496 /mm ³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	1,00 %	76 /mm ³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	52,00 %	3952 /mm ³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Monócitos.....	1,00 %	76 /mm ³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm ³	

Observações série branca.... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... **0,95 milhões/mm³** 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA COM DIVERSOS AGREGADOS PLAQUETÁRIOS.**

Assinado eletronicamente por: LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087

Unidade Aratás
 Av. Aratás, 1009 - Moema
 55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
 Av. Divino Salvador, 744 - Moema
 55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
 Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
 55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
 Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
 55 11 3740-1160



Nº OS: 894564 **Animal: Controle C27** **Data: 12/11/2015**
 Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Mamífero Silvestre** Sexo: **Macho**
 Responsável : **Tatiana** Dt. Nasc.: **12/07/2015** Idade: **0a 4m 0d**
 Requisitante : **Nao Referido**
 Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**
 Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**
 Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: **SANGUE COM E.D.T.A.**
 Equipamento: **PENTRA 120 DX**

Eritrograma

Eritrócitos.....	9,57 milhões/mm³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	16,7 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	45,1 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	47,13 u³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	17,5 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	37 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	6,80		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **DISCRETA POLICROMASIA.**

Leucograma

Leucócitos.....	8,30 mil/mm³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	86,00 %	7138 /mm³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	14,00 %	1162 /mm³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Monócitos.....	0,00 %	0 /mm³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm³	
Observações série branca....	MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.		
Contagem plaquetária.....	1,1 milhões/mm³		0,84 a 1,24 milhões/mm ³
Avaliação plaquetária.....	NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.		

Assinado eletronicamente por: **LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087**

Unidade Aratás
 Av. Aratás, 1009 - Moema
 55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
 Av. Divino Salvador, 744 - Moema
 55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
 Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
 55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
 Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
 55 11 3740-1160



Nº OS: 894566 **Animal: Controle C28** **Data: 12/11/2015**
 Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Mamífero Silvestre** Sexo: **Macho**
 Responsável : **Tatiana** Dt. Nasc.: **12/07/2015** Idade: **0a 4m 0d**
 Requirante : **Nao Referido**
 Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**
 Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**
 Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: **SANGUE COM E.D.T.A.**
 Equipamento: **PENTRA 120 DX**

Eritrograma

Eritrócitos.....	8,81 milhões/mm³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	15,1 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	45 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	51,08 u³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	17,14 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	33,56 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	7,40		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **DISCRETA POLICROMASIA.**

Leucograma

Leucócitos.....	7,20 mil/mm³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	81,00 %	5832 /mm³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	18,00 %	1296 /mm³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Monócitos.....	1,00 %	72 /mm³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm³	
Observações série branca....	MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.		
Contagem plaquetária.....	0,98 milhões/mm³		0,84 a 1,24 milhões/mm ³
Avaliação plaquetária.....	NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.		

Assinado eletronicamente por: **LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087**





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 894862 **Animal: Goto Kakizaki C34** **Data: 13/11/2015**
 Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Linhagem Wistar** Sexo: **Macho**
 Responsável : **Tatiana Carolina** Dt. Nasc.: **13/07/2015** Idade: **0a 4m 0d**
 Requirante : **Nao Referido**
 Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**
 Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**
 Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: **SANGUE COM E.D.T.A.**
 Equipamento: **PENTRA 120 DX**

Eritrograma

Eritrócitos.....	9,13 milhões/mm³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	15,8 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	46 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	50,38 u³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	17,31 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	34,35 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	6,80		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **DISCRETAS ANISOCITOSE E POLICROMASIA.**

Leucograma

Leucócitos.....	10,10 mil/mm³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	77,00 %	7777 /mm³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	23,00 %	2323 /mm³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Monócitos.....	0,00 %	0 /mm³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm³	
Observações série branca....	MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.		
Contagem plaquetária.....	0,93 milhões/mm³		0,84 a 1,24 milhões/mm ³
Avaliação plaquetária.....	NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.		

Assinado eletronicamente por: **LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087**

Unidade Aratás
 Av. Aratás, 1009 - Moema
 55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
 Av. Divino Salvador, 744 - Moema
 55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
 Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
 55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
 Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
 55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 881157 **Animal: Hiperlítica 14 (14)** **Data: 22/09/2015**

Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Mamífero Silvestre** Sexo: **Indef.**

Responsável : **Tatiana Carolina Alba** Dt. Nasc.: **21/09/2015** Idade: **0a 0m 2d**

Requisitante : **Nao Referido**

Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**

Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**

Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: **SANGUE COM E.D.T.A.**
Equipamento: **PENTRA 120 DX**

Eritrograma

Eritrócitos.....	8,01 milhões/mm³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	13,2 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	43 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	53,68 u³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	16,48 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	30,7 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	6,00		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Leucograma

Leucócitos.....	5,10 mil/mm³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	66,00 %	3366 /mm³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	34,00 %	1734 /mm³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Monócitos.....	0,00 %	0 /mm³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm³	

Observações série branca.... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... **1,16 milhões/mm³** 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: **LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087**

Unidade Aratás
Av. Aratás, 1009 - Moema
55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
Av. Divino Salvador, 744 - Moema
55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 881160 **Animal: Hiperlipídica 15 (H15)** **Data: 22/09/2015**

Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Mamífero Silvestre** Sexo: **Indef.**

Responsável : **Tatiana Carolina Alba** Dt. Nasc.: **21/09/2015** Idade: **0a 0m 2d**

Requisitante : **Nao Referido**

Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**

Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**

Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: **SANGUE COM E.D.T.A.**
Equipamento: **PENTRA 120 DX**

Eritrograma

Eritrócitos.....	8,28 milhões/mm³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	13,4 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	45 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	54,35 u³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	16,18 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	29,78 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	6,60		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **DISCRETA POLICROMASIA.**

Leucograma

Leucócitos.....	7,80 mil/mm³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	71,00 %	5538 /mm³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	28,00 %	2184 /mm³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Monócitos.....	1,00 %	78 /mm³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm³	

Observações série branca.... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... **0,92 milhões/mm³** 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: **LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087**

Unidade Aratás
Av. Aratás, 1009 - Moema
55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
Av. Divino Salvador, 744 - Moema
55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 880895 **Animal: H16 (Hiperlipídica 16)** **Data: 21/09/2015**

Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Linhagem Wistar** Sexo: **Indef.**

Responsável : **Instituto De Ciencias Biomedicas** Dt. Nasc.: **20/09/2015** Idade: **0a 0m 2d**

Requisitante : **Nao Referido**

Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**

Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**

Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: **SANGUE COM E.D.T.A.**
Equipamento: **PENTRA 120 DX**

Eritrograma

Eritrócitos.....	8,23 milhões/mm³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	13,4 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	44 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	53,46 u³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	16,28 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	30,45 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	5,60		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **DISCRETA ANISOCITOSE.**

Leucograma

Leucócitos.....	6,70 mil/mm³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	59,00 %	3953 /mm³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	1,00 %	67 /mm³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	39,00 %	2613 /mm³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Monócitos.....	1,00 %	67 /mm³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm³	

Observações série branca.... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... **1,03 milhões/mm³** 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: **RICARDO DUARTE LOPES - CRMV: 17187**

Unidade Aratás
Av. Aratás, 1009 - Moema
55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
Av. Divino Salvador, 744 - Moema
55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 880898 **Animal: H17 (Hiperlipídica 17)** **Data: 21/09/2015**

Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Linhagem Wistar** Sexo: **Indef.**

Responsável : **Instituto De Ciencias Biomedicas** Dt. Nasc.: **20/09/2015** Idade: **0a 0m 2d**

Requisitante : **Nao Referido**

Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**

Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**

Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: **SANGUE COM E.D.T.A.**
Equipamento: **PENTRA 120 DX**

Eritrograma

Eritrócitos.....	7,89 milhões/mm³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	13 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	41 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	51,96 u³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	16,48 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	31,71 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	6,40		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Leucograma

Leucócitos.....	5,60 mil/mm³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	71,00 %	3976 /mm³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	26,00 %	1456 /mm³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Monócitos.....	3,00 %	168 /mm³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm³	

Observações série branca.... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... **1,03 milhões/mm³** 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: **RICARDO DUARTE LOPES - CRMV: 17187**

Unidade Aratás
Av. Aratás, 1009 - Moema
55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
Av. Divino Salvador, 744 - Moema
55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 883669 **Animal: Hiperlipídica 18 (H18)** **Data: 01/10/2015**

Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Linhagem Wistar** Sexo: **Macho**

Responsável : **Tatiana Carolina** Dt. Nasc.: **01/06/2015** Idade: **0a 4m 0d**

Requisitante : **Nao Referido**

Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**

Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**

Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: **SANGUE COM E.D.T.A.**
Equipamento: **PENTRA 120 DX**

Eritrograma

Eritrócitos.....	9 milhões/mm³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	15,6 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	48 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	53,33 u³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	17,33 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	32,5 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	7,00		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Leucograma

Leucócitos.....	6,60 mil/mm³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	85,00 %	5610 /mm³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	13,00 %	858 /mm³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Monócitos.....	2,00 %	132 /mm³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm³	

Observações série branca.... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... **0,93 milhões/mm³** 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: **ELEIZA ARAGÃO D'ESTEFANO - CRMV: 7309**

Unidade Aratás
Av. Aratás, 1009 - Moema
55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
Av. Divino Salvador, 744 - Moema
55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 894567 **Animal: Hiperlipídica H20** **Data: 12/11/2015**
 Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Mamífero Silvestre** Sexo: **Macho**
 Responsável : **Tatiana** Dt. Nasc.: **12/07/2015** Idade: **0a 4m 0d**
 Requisitante : **Nao Referido**
 Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**
 Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**
 Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: SANGUE COM E.D.T.A.
 Equipamento: PENTRA 120 DX

Eritrograma

Eritrócitos.....	9 milhões/mm ³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	16,3 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	46 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	51,11 u ³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	18,11 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	35,43 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	7,00		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Leucograma

Leucócitos.....	6,80 mil/mm ³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	65,00 %	4420 /mm ³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	32,00 %	2176 /mm ³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Monócitos.....	3,00 %	204 /mm ³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm ³	

Observações série branca.... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... **1 milhões/mm³** 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: **ELEIZA ARAGÃO D'ESTEFANO - CRMV: 7309**

Unidade Aratás
 Av. Aratás, 1009 - Moema
 55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
 Av. Divino Salvador, 744 - Moema
 55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
 Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
 55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
 Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
 55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 894569 **Animal: Hiperlipídica H21** **Data: 12/11/2015**
 Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Mamífero Silvestre** Sexo: **Macho**
 Responsável : **Tatiana** Dt. Nasc.: **12/07/2015** Idade: **0a 4m 0d**
 Requisitante : **Nao Referido**
 Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**
 Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**
 Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: SANGUE COM E.D.T.A.
 Equipamento: PENTRA 120 DX

Eritrograma

Eritrócitos.....	8,7 milhões/mm ³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	14,8 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	43 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	49,43 u ³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	17,01 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	34,42 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	6,60		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **DISCRETAS ANISOCITOSE E POLICROMASIA.**

Leucograma

Leucócitos.....	7,30 mil/mm ³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	83,00 %	6059 /mm ³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	17,00 %	1241 /mm ³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Monócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm ³	

Observações série branca.... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... 0,95 milhões/mm³ 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA COM ALGUNS AGREGADOS PLAQUETÁRIOS.**

Assinado eletronicamente por: LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087

Unidade Aratás
 Av. Aratás, 1009 - Moema
 55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
 Av. Divino Salvador, 744 - Moema
 55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
 Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
 55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
 Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
 55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 881163 **Animal: Goto Kakizaki 23 (Gk23)** **Data: 22/09/2015**

Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Mamífero Silvestre** Sexo: **Indef.**

Responsável : **Tatiana Carolina Alba** Dt. Nasc.: **21/09/2015** Idade: **0a 0m 2d**

Requisitante : **Nao Referido**

Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**

Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**

Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: **SANGUE COM E.D.T.A.**
Equipamento: **PENTRA 120 DX**

Eritrograma

Eritrócitos.....	7,69 milhões/mm³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	12,2 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	39 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	50,72 u³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	15,86 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	31,28 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	7,60		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **DISCRETA POLICROMASIA.**

Leucograma

Leucócitos.....	13,50 mil/mm³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	54,00 %	7290 /mm³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	46,00 %	6210 /mm³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Monócitos.....	0,00 %	0 /mm³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm³	

Observações série branca.... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... **0,93 milhões/mm³** 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: **LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087**

Unidade Aratás
Av. Aratás, 1009 - Moema
55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
Av. Divino Salvador, 744 - Moema
55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 880900 **Animal: Gk24(Goto Kakizaki 24)** **Data: 21/09/2015**

Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Linhagem Wistar** Sexo: **Indef.**

Responsável : **Instituto De Ciencias Biomedicas** Dt. Nasc.: **20/09/2015** Idade: **0a 0m 2d**

Requisitante : **Nao Referido**

Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**

Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**

Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: **SANGUE COM E.D.T.A.**
Equipamento: **PENTRA 120 DX**

Eritrograma

Eritrócitos.....	8,78 milhões/mm³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	13,9 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	42,6 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	48,52 u³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	15,9 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	32,7 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	7,60		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **DISCRETA ANISOCITOSE.PLASMA HEMOLISADO.**

Leucograma

Leucócitos.....	14,90 mil/mm³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	82,00 %	12218 /mm³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	17,00 %	2533 /mm³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Monócitos.....	1,00 %	149 /mm³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm³	
Observações série branca.....	MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.		
Contagem plaquetária.....	0,84 milhões/mm³		0,84 a 1,24 milhões/mm ³
Avaliação plaquetária.....	NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA COM DIVERSOS AGREGADOS PLAQUETÁRIOS.		

Assinado eletronicamente por: **RICARDO DUARTE LOPES - CRMV: 17187**

Unidade Aratás
Av. Aratás, 1009 - Moema
55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
Av. Divino Salvador, 744 - Moema
55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 884009 **Animal: Goto Kakizaki 25 (Gk 25)** **Data: 02/10/2015**

Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Linhagem Wistar** Sexo: **Indef.**

Responsável : **Nao Informado** Dt. Nasc.: **02/10/2014** Idade: **1a 0m 0d**

Requisitante : **Nao Referido**

Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**

Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**

Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: SANGUE COM E.D.T.A.
Equipamento: PENTRA 120 DX

		Vlr Ref. Absoluto	Vlr Ref. Relativo
Eritrograma			
Eritrócitos.....	8,86 milhões/mm³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	16,3 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	45 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	50,79 u³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	18,4 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	36,22 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	6,80		6,8 a 8,7 g/dl
Observações série vermelha...	DISCRETAS ANISOCITOSE E POLICROMASIA.		
Leucograma			
Leucócitos.....	11,90 mil/mm³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	68,00 %	8092 /mm³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	31,00 %	3689 /mm³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Monócitos.....	1,00 %	119 /mm³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm³	
Observações série branca.....	MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.		
Contagem plaquetária.....	0,88 milhões/mm³		0,84 a 1,24 milhões/mm ³
Avaliação plaquetária.....	NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.		

Assinado eletronicamente por: LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087

Unidade Aratás
Av. Aratás, 1009 - Moema
55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
Av. Divino Salvador, 744 - Moema
55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 884010 **Animal: Goto Kakizaki 26 (Gk 26)** **Data: 02/10/2015**

Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Linhagem Wistar** Sexo: **Indef.**

Responsável : **Nao Informado** Dt. Nasc.: **02/10/2014** Idade: **1a 0m 0d**

Requisitante : **Nao Referido**

Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**

Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**

Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: SANGUE COM E.D.T.A.
Equipamento: PENTRA 120 DX

		Vlr Ref. Absoluto	Vlr Ref. Relativo
Eritrograma			
Eritrócitos.....	9,12 milhões/mm ³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	15,8 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	46 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	50,44 u ³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	17,32 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	34,35 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	7,40		6,8 a 8,7 g/dl
Observações série vermelha...	DISCRETAS ANISOCITOSE E POLICROMASIA.		
Leucograma			
Leucócitos.....	5,50 mil/mm ³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	49,00 %	2695 /mm ³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	51,00 %	2805 /mm ³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Monócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm ³	
Observações série branca.....	MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.		
Contagem plaquetária.....	0,95 milhões/mm ³		0,84 a 1,24 milhões/mm ³
Avaliação plaquetária.....	NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.		

Assinado eletronicamente por: LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087

Unidade Aratás
Av. Aratás, 1009 - Moema
55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
Av. Divino Salvador, 744 - Moema
55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 884012 **Animal: Goto Kakizaki 27 (Gk 27)** **Data: 02/10/2015**

Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Linhagem Wistar** Sexo: **Indef.**

Responsável : **Nao Informado** Dt. Nasc.: **02/10/2014** Idade: **1a 0m 0d**

Requisitante : **Nao Referido**

Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**

Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**

Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: SANGUE COM E.D.T.A.
Equipamento: PENTRA 120 DX

	Vlr Ref. Absoluto	Vlr Ref. Relativo
Eritrograma		
Eritrócitos.....	8,47 milhões/mm ³	6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	14,7 g/dl	13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	41,1 %	41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	48,52 u ³	52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	17,4 pg	16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	35,8 g/dl	30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	7,00	6,8 a 8,7 g/dl
Observações série vermelha...	DISCRETAS ANISOCITOSE E POLICROMASIA.	
Leucograma		
Leucócitos.....	7,50 mil/mm ³	7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 % 0 /mm ³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 % 0 /mm ³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 % 0 /mm ³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	75,00 % 5625 /mm ³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 % 0 /mm ³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 % 0 /mm ³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	24,00 % 1800 /mm ³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 % 0 /mm ³	0 /mm ³
Monócitos.....	1,00 % 75 /mm ³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 % 0 /mm ³	
Observações série branca.....	MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.	
Contagem plaquetária.....	0,89 milhões/mm ³	0,84 a 1,24 milhões/mm ³
Avaliação plaquetária.....	NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.	

Assinado eletronicamente por: LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087

Unidade Aratás
Av. Aratás, 1009 - Moema
55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
Av. Divino Salvador, 744 - Moema
55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 883660 **Animal: Goto Kakizaki 28 (Gk28)** **Data: 01/10/2015**

Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Linhagem Wistar** Sexo: **Macho**

Responsável : **Tatiana Carolina** Dt. Nasc.: **01/06/2015** Idade: **0a 4m 0d**

Requisitante : **Nao Referido**

Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**

Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**

Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: SANGUE COM E.D.T.A.
Equipamento: PENTRA 120 DX

Eritrograma

Eritrócitos.....	8,67 milhões/mm ³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	15,4 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	46 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	53,06 u ³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	17,76 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	33,48 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	7,20		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **DISCRETAS ANISOCITOSE E POLICROMASIA.**

Leucograma

Leucócitos.....	4,80 mil/mm ³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	53,00 %	2544 /mm ³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	47,00 %	2256 /mm ³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Monócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm ³	
Observações série branca.....	MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.		
Contagem plaquetária.....	0,95 milhões/mm ³		0,84 a 1,24 milhões/mm ³
Avaliação plaquetária.....	NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.		

Assinado eletronicamente por: LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087

Unidade Aratás
Av. Aratás, 1009 - Moema
55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
Av. Divino Salvador, 744 - Moema
55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 883666 **Animal: Goto Kakizaki 29 (Gk 29)** **Data: 01/10/2015**
 Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Linhagem Wistar** Sexo: **Macho**
 Responsável : **Tatiana Carolina** Dt. Nasc.: **01/06/2015** Idade: **0a 4m 0d**
 Requisitante : **Nao Referido**
 Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**
 Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**
 Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: SANGUE COM E.D.T.A.
 Equipamento: PENTRA 120 DX

Eritrograma

Eritrócitos.....	8,6 milhões/mm³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	16 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	46 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	53,49 u³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	18,6 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	34,78 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	6,00		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **DISCRETA POLICROMASIA.**

Leucograma

Leucócitos.....	10,80 mil/mm³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	57,00 %	6156 /mm³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	37,00 %	3996 /mm³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Monócitos.....	6,00 %	648 /mm³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm³	

Observações série branca... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... **0,96 milhões/mm³** 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: **ELEIZA ARAGÃO D'ESTEFANO - CRMV: 7309**

Unidade Aratás
 Av. Aratás, 1009 - Moema
 55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
 Av. Divino Salvador, 744 - Moema
 55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
 Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
 55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
 Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
 55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 883667 **Animal: Goto Kakizaki 30 (Gk 30)** **Data: 01/10/2015**

Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Linhagem Wistar** Sexo: **Macho**

Responsável : **Tatiana Carolina** Dt. Nasc.: **01/06/2015** Idade: **0a 4m 0d**

Requisitante : **Nao Referido**

Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**

Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**

Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: SANGUE COM E.D.T.A.
Equipamento: PENTRA 120 DX

Eritrograma

Eritrócitos.....	9,03 milhões/mm ³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	16,1 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	44 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	48,73 u ³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	17,8 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	36,6 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	7,00		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **DISCRETAS ANISOCITOSE E POLICROMASIA.**

Leucograma

Leucócitos.....	5,10 mil/mm ³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	70,00 %	3570 /mm ³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	29,00 %	1479 /mm ³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm ³	0 /mm ³
Monócitos.....	1,00 %	51 /mm ³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm ³	

Observações série branca... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... 0,98 milhões/mm³ 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087

Unidade Aratás
Av. Aratás, 1009 - Moema
55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
Av. Divino Salvador, 744 - Moema
55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 894571 **Animal: Goto Kakizaki Gk31** **Data: 12/11/2015**
 Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Mamífero Silvestre** Sexo: **Macho**
 Responsável : **Tatiana** Dt. Nasc.: **12/07/2015** Idade: **0a 4m 0d**
 Requisitante : **Nao Referido**
 Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**
 Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**
 Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: SANGUE COM E.D.T.A.
 Equipamento: PENTRA 120 DX

Eritrograma

Eritrócitos.....	8,97 milhões/mm³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	16,1 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	46 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	51,28 u³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	17,95 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	35 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	7,40		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **MODERADAS ANISOCITOSE E POLICROMASIA.**

Leucograma

Leucócitos.....	7,00 mil/mm³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	38,00 %	2660 /mm³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	62,00 %	4340 /mm³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Monócitos.....	0,00 %	0 /mm³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm³	

Observações série branca.... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... **0,95 milhões/mm³** 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: **LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087**

Unidade Aratás
 Av. Aratás, 1009 - Moema
 55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
 Av. Divino Salvador, 744 - Moema
 55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
 Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
 55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
 Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
 55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 894573 **Animal: Goto Kakizaki Gk32** **Data: 12/11/2015**
 Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** Raça: **Mamífero Silvestre** Sexo: **Macho**
 Responsável : **Tatiana** Dt. Nasc.: **12/07/2015** Idade: **0a 4m 0d**
 Requisitante : **Nao Referido**
 Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**
 Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** Nº: **1524**
 Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: SANGUE COM E.D.T.A.
 Equipamento: PENTRA 120 DX

Eritrograma

Eritrócitos.....	8,66 milhões/mm³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	15 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	44 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	50,81 u³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	17,32 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	34,09 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	7,00		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **DISCRETA ANISOCITOSE E MODERADA POLICROMASIA**

Leucograma

Leucócitos.....	8,60 mil/mm³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	58,00 %	4988 /mm³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	42,00 %	3612 /mm³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Monócitos.....	0,00 %	0 /mm³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm³	
Observações série branca.....	MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.		
Contagem plaquetária.....	0,92 milhões/mm³		0,84 a 1,24 milhões/mm ³
Avaliação plaquetária.....	NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.		

Assinado eletronicamente por: LILIAN VIEIRA SOARES - CRMV: 25087

Unidade Aratás
 Av. Aratás, 1009 - Moema
 55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
 Av. Divino Salvador, 744 - Moema
 55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
 Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
 55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
 Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
 55 11 3740-1160





MEDICINA VETERINÁRIA DIAGNÓSTICA

Nº OS: 894575 **Animal: Goto Kakizaki Gk33** **Data: 12/11/2015**
Espécie : **Rattus Norvegicus - Ratazana** *Raça:* **Mamífero Silvestre** *Sexo:* **Macho**
Responsável : **Tatiana** *Dt. Nasc.:* **12/07/2015** *Idade:* **0a 4m 0d**
Requisitante : **Nao Referido**
Clínica : **Instituto De Ciencias Biomedicas- Universidade Sp**
Endereço : **Av Professor Lineu Prestes** *Nº:* **1524**
Fone : **(11) 3091-7245**

Hemograma

Material...: SANGUE COM E.D.T.A.
Equipamento: PENTRA 120 DX

Eritrograma

Eritrócitos.....	8,95 milhões/mm³		6,6 a 9,0 milhões/mm ³
Hemoglobina.....	14,8 g/dl		13,2 a 16,4 g/dl
Hematócrito.....	45 %		41,1 a 51,1 %
V.c.m.....	50,28 u³		52,6 a 65,4 u ³
H.c.m.....	16,54 pg		16,5 a 21,3 pg
C.h.c.m.....	32,89 g/dl		30,2 a 34,6 g/dl
Proteína total.....	7,00		6,8 a 8,7 g/dl

Observações série vermelha... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Leucograma

Leucócitos.....	12,00 mil/mm³		7,3 a 12,66 mil/mm ³
Mielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Metamielócitos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Bastonetes.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 20 /mm ³
Segmentados.....	64,00 %	7680 /mm³	400 a 2000 /mm ³
Eosinófilos.....	0,00 %	0 /mm³	40 a 300 /mm ³
Basófilos.....	0,00 %	0 /mm³	0 a 30 /mm ³
Linfócitos típicos.....	36,00 %	4320 /mm³	5070 a 9070 /mm ³
Linfócitos atípicos.....	0,00 %	0 /mm³	0 /mm ³
Monócitos.....	0,00 %	0 /mm³	50 a 440 /mm ³
Outros (*).....	0,00 %	0 /mm³	

Observações série branca.... **MORFOLOGIA CELULAR NORMAL.**

Contagem plaquetária..... **0,95 milhões/mm³** 0,84 a 1,24 milhões/mm³

Avaliação plaquetária..... **NORMAIS EM QUANTIDADE E MORFOLOGIA.**

Assinado eletronicamente por: ANDRE LOPES DE ALMEIDA - CRMV: 34650

Unidade Aratás
Av. Aratás, 1009 - Moema
55 11 3579-1427

Unidade Divino Salvador
Av. Divino Salvador, 744 - Moema
55 11 5055-9271

Unidade jd. Anália Franco
Rua Francisco Zicard, 16 - Jardim Anália Franco
55 11 2076-0102

Unidade Morumbi
Av. Giovanni Gronchi, 2080 - Morumbi
55 11 3740-1160

