KAREN KRIST SARY SUNAHARA

**Influência da insulina sobre a autofagia em modelo
experimental de diabetes**

São Paulo
2014

KAREN KRIST SARY SUNAHARA

**Influência da insulina sobre a autofagia em modelo
experimental de diabetes**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção de título de
Doutor em Ciências

Programa de Fisiopatologia
Experimental

Orientador: Prof. Dr. Joilson de
Oliveira Martins

Coorientadora: Prof. Dra. Paulina
Sannomiya

São Paulo
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sunahara, Karen Krist Sary
Influência da insulina sobre a autofagia em modelo experimental de diabetes /
Karen Krist Sary Sunahara. -- São Paulo, 2014.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Joilson de Oliveira Martins.
Coorientadora: Paulina Sannomiya.

Descritores: 1.Diabetes Mellitus 2.Macrófagos 3.Imunidade inata
4.Insulina 5.Autofagia 6.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-258/14

Agradecimentos

*Se tiver que amar, ame hoje,
Se tiver que sorrir, sorria hoje,
Se tiver que chorar, chore hoje,
Pois o importante é viver hoje,
O ontem já foi e o amanhã talvez não venha.
Chico Xavier*

Gostaria de iniciar dizendo que meus agradecimentos não são formais. Eu não me reconheceria se os escrevesse seguindo algum formato. Consciente de que é impossível listar todas as pessoas que contribuíram na aquisição de conhecimentos e receosa por deixar de acrescentar algum nome importante, (afinal de contas, sempre nos esquecemos de alguém), quero iniciar agradecendo a todos que, direta ou indiretamente, participaram da elaboração deste trabalho. Para aqueles com quem eu gritei e contra quem disparei $\# \$ \# @ \& \sim \# \% \& \# \% \$ \# \% *$, minhas sinceras desculpas; para aqueles que me viram de “cara amassada e de sorriso amarelo”, acreditem: sou melhor após oito horas de sono; e para aqueles que trabalharam comigo até o sol raiar, mesmo vendo a neve cair lá fora, minha sincera gratidão.

Aos macrófagos, parceiros de longa data, tenho um desabafo: ainda não desvendei grande parte do que fazem, não entendi muito bem para o que foram programados, só percebi que têm um grande potencial, o qual espero um dia usar a favor do ser humano. Na verdade, minha primeira tentativa de trabalhar com macrófagos foi em Birmingham e foi frustrada, pois como o chefe do Departamento já havia tentado me alertar: “Karen, a pipeta tem dois estágios. No primeiro, você terá a quantidade escolhida, no segundo, você terá a capacidade total da ponteira”. Mas foi assim que fiz meu primeiro ELISA, ou seja, refazendo! Imaginem quanto de amostra precisei para preencher placas de 96 poços... No entanto, gostaria de agradecer imensamente o Dr. Stephen Young, na época coordenador do hoje extinto programa MSc Immunology da Universidade de Birmingham, pela paciência e pelo incentivo. Para o meu mentor e supervisor Dr. Graham Wallace, que assim me definia: “Your English is just.... rubbish!”, que me convenceu a trabalhar com exosomos derivados de macrófagos (que eu gentilmente alterei para células dendríticas), muito obrigada e um abraço ENORME! Obrigada por acreditar que EU valia a pena, pelas horas de “tutorial one-to-one”, pelos puxões de orelha, e pelos “READ!”. Graham, foi contigo que aprendi a gostar de ciência e a ter perseverança (vide meus Western Blotting, que, comparados ao do meu amigo Sven, ah.... dão até desgosto!). Aproveito para agradecer o Dr. Sven Petersen, na época doutorando da Universidade de Birmingham, por abrir a porta do Cancer Studies toda vez que precisei fazer o *spin* (“extração”) de exosomos. Obrigada ao Prof. Rafal Sadej (na época doutorando) pelos capuccinos e mokkas, e perdão pelos *e-mails* não respondidos.

Preciso agradecer veementemente a Prof. Susanne Gabrielsson, sem a qual meu mestrado não teria sido concluído; por me fazer crer nos invisíveis *pellets*. Sim, eles estão lá grudados no tubo, mesmo que você não os enxergue; vire o sobrenadante de uma vez, sem medo!. Sem o “Exosome group”, eu jamais teria a desenvoltura que hoje tenho (apesar de não muita) com biologia molecular (mas já sei pilotar multipipetas).

Não posso deixar de agradecer meu grupo “anti-party”, a Dra. Carina Strell, as doutorandas Marisa Alexandra Pereira Baptista e Nathalie Acevedo do Karolinska Institutet, por todas as festas a que deixamos de ir, pela companhia, pelos chás e bolos tarde da noite, pelas aulas de sueco, pelas discussões, por desvendar o Fiji comigo, pela senha da máquina de café.

Eu também não teria aprendido microscopia confocal se não fosse pela Prof. Lisa Westerberg, pelos reagentes, pelo Fortessa, pelo confocal, pela recepção calorosa e pelo grupo de colegas WASP (Marton, Carin, Liliana, Magda-Liz e Joana).

Um agradecimento especial ao meu grupo de imunoendocrinologia da FCF-USP, em especial à Mariana, Fernanda e Irene. Minhas sinceras desculpas pelos longos pedidos de última hora.

Agradecer a família pode ser piegas, mas um beijo enorme aos meus pais, que me incentivaram e me “paitrocinaram” quando meu dinheiro ficou curto! Às priminhas Ivy e Priscila, peço perdão pela ausência. Aos tios, primos, à Helen e à Penny em especial, desculpem-me por pular as festas de aniversário, por ficar devendo as visitas no berçário, pelas ausências nas festas de família. Dedico a todos vocês, de coração, este trabalho. Tias Cris e Gina, era esta a tese que “eu estava aprontando”!

Aos colegas de trabalho de todas as clínicas, da prefeitura de Jandira e a todos os meus chefes, em especial Dr. Marivaldo Castro de Oliveira e Dra. Rosangela Simoceli, que sempre serviram de inspiração e que me ensinaram a investigar. Muito obrigada por compreender as faltas e as mudanças no horário das agendas. Às minhas amigas Rose e Kiko, obrigada por ficarem me “ouvindo” e por me arranjam as marmitas de algum lugar nas horas mais inesperadas.

À equipe da Shiozawa, obrigada por manter meu “ying e yang” sob controle, e a Marcia Ortiz, por manter meus parafusos apertados!

Não poderia deixar de agradecer e homenagear meus orientadores Prof. JO Martins e Prof. Paulina Sannomiya pelos conhecimentos a mim transmitidos, pela paciência, pelas revisões e correções, pela colaboração, que espero manter para sempre.

À secretaria da fisiopato, à Tania e, recentemente, à Vanda, muito obrigada por todos os “corre-corres”!

Finalmente, agradeço o apoio financeiro: Jovem Pesquisador FAPESP (2010/02272-0), Projeto CNPq Edital Universal 2013 (470523/2013-1), Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo (Projeto 1) e CAPES.

*Tudo tem o seu tempo determinado, e,
há tempo para todo o propósito debaixo do céu...
há tempo de nascer, e tempo de morrer;
tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou.
há tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras;
tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;
Eu disse no meu coração: Deus julgará o justo e o ímpio;
porque há um tempo para todo o propósito e para toda a obra.
Eclesiastes 3*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Autofagia e formação de autolisossomo.	2
Figura 2	Via dos genes relacionados à autofagia (ATG).	3
Figura 3	Via da proteína-alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR).	9
Figura 4	Modelo experimental.	14
Figura 5	Peso e nível glicêmico comparativo dos animais (dia 0).	19
Figura 6	Leucócitos dos animais (dia 0).	19
Figura 7	Variação de peso (Peso final/Peso Inicial) dos animais (dia 10-dia 0).	21
Figura 8	Nível glicêmico dos animais (dia 10).	21
Figura 9	Leucócitos dos animais (dia 10).	22
Figura 10	Contagem de células do lavado broncoalveolar (LBA) (dia 10).	23
Figura 11	Perfil de citocinas no lavado broncoalveolar (LBA) de ratos.	23
Figura 12	Expressão do marcador para sistema fagocítico mononuclear (Ki2MR) em macrófagos alveolares.	24
Figura 13	Expressão do complexo maior de histocompatibilidade tipo II (MHCII) em macrófagos KiM2R.	24
Figura 14	Expressão da cadeia leve 3 da proteína associada a microtúbulos (LC3) nos macrófagos do lavado broncoalveolar.	26
Figura 15	População de células positivas para cadeia leve 3 da proteína associada a microtúbulos (LC3) no lavado broncoalveolar (LBA).	26
Figura 16	<i>Integrated density</i> (ID) da cadeia leve 3 da proteína associada a microtúbulos (LC3) no lavado broncoalveolar (LBA).	27
Figura 17	Expressão de LC3 em macrófagos derivados da medula óssea.	28
Figura 18	<i>Integrated density</i> do LC3 em macrófagos derivados da medula óssea.	29
Figura 19	Imuno-histoquímica do baço.	30
Figura 20	Autofagia em macrófagos da polpa vermelha do baço.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Proteínas da via autofágica e funções	4
Tabela 2	Infecções comuns em pacientes diabéticos	6
Tabela 3	Esquema de tratamento	14
Tabela 4	Caracterização do modelo do animal diabético	20

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

4EBP1	Fator de iniciação eucariótica 4E ligante da proteína1
ADA	Associação Americana de Diabetes
ATG	Gene ou proteína relacionado(a) à autofagia
BD	Becton Dickson
Beclin	Proteína codificada pelo gene BECN
BECN	<i>Coiled-coil myosin-like BCL2-interacting protein</i>
BMM	Macrófagos diferenciados da medula óssea
CD	Cluster differentiation
CINC	<i>Cytokine-induced neutrophil chemoattractant</i>
db/db	Diabetes (gene que codifica leptina)
DEP	<i>Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin domain</i>
DEPTOR	Proteína interadora a mTOR, contendo domínio DEP
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPM	Erro padrão da média
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetalcalf serum</i>
FMO	<i>Fluorescence minus one</i>
Foxp	<i>Forkhead transcription factor</i>
Glut	Transportador de glicose
GM-CSF	<i>Granulocyte and macrophage colony-stimulating factor</i>
HMBG	<i>High-mobility group</i>

ICAM	Molécula de adesão intercelular
IFN γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IRS1	Substrato do receptor da insulina 1
KiM2R	<i>Pan macrophage marker</i>
LBA	Lavado broncoalveolar
LC3	Proteína de cadeia leve associada a microtúbulo
LPS	Lipopolissacarídeo
MA	Macrófagos alveolares
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mLST8	Proteína associada a mTOR, homóloga à STL8 em <i>S. cerevisiae</i>
MSF	<i>Macrophage stimulating factor</i>
mSIN1	Proteína interadora da proteína cinase dos mamíferos ativada por estresse
mTOR	Proteína-alvo da ação da rapamicina em mamíferos
mTORC1	Complexo 1 da proteína-alvo da rapamicina em mamíferos
MVB	Corpo multivesicular
OCT	<i>Optimum cutting temperature</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OVA	Ovalbumina
p70S6K	p70 S6 ribossomo quinase
PDK	Fosfatidilinositol dependente de quinase 1
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PI3P	Fosfatidilinositol 3 fosfato
PKB/Akt	Proteína quinase B

PKC	Proteína quinase C
PMN	Polimorfonucleares
PRAS40	Substrato rico em prolina Akt de 40 kDa
Protor-1	Proteína observada com Rictor-1
P-selectin	Selectina plaquetária
Raptor	Proteína reguladora associada a mTOR
RE	Retículo endoplasmático
Rho GTPases	Família de proteínas G sinalizadoras relacionadas a Ras
Rictor	Companheiro de mTOR insensível à rapamicina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Sakura	<i>Tissue Tek compound</i>
SIRT1	Sirtuína 1
TLR	Receptores dos tipos <i>toll</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral
ULK	<i>unc 51 like kinase (homólogo ao ATG 1)</i>
Vps	<i>Vacuolar protein sorting</i>
WB	Western blotting
WIPI	Proteína interadora 1 do fosfatidilinositol (ou ATG 18)

RESUMO

Sunahara KKS. *Influência da insulina sobre a autofagia em modelo experimental de diabetes* [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2014.

O diabetes mellitus (DM) é caracterizado por hiperglicemia associada à falta ou à ineficiência da insulina. DM também é marcado por alterações em diversos processos celulares que precisam ser mais bem entendidos. Estudou-se a via da autofagia em diferentes macrófagos, verificando se o tratamento com insulina é capaz de modular esse processo. Foram estudados macrófagos derivados da medula óssea (BMM), do lavado broncoalveolar (LBA) e do tecido esplênico de ratos Wistar, machos, diabéticos (aloxana, 42 mg/kg, i.v., 10 dias), ratos diabéticos tratados (insulina 4UI, s.c.) e respectivos controles. Para caracterização do modelo e avaliação do efeito da insulina sobre o processo autofágico, as seguintes análises foram realizadas: (a) glicemia, número de leucócitos no sangue periférico, número de células do LBA; (b) concentrações de citocinas: interleucina (IL)-1 β , fator de necrose tumoral (TNF)- α , IL-6, IL-4, IL-10, *cytokine-induced neutrophil chemoattractant* (CINC)-1 e CINC-2 no sobrenadante do LBA pela técnica de ELISA; (c) caracterização de macrófago alveolar (MA) do LBA quanto a antígenos de superfície (MHCII, pan-macrophage KiM2R, CD11b) e marcadores autofágicos (proteína de cadeia leve associada a microtúbulo (LC)3, gene/proteína relacionado à autofagia (ATG) pela técnica de citometria de fluxo e microscopia confocal; (d) estudo dos macrófagos diferenciados, a partir da medula óssea, por citometria de fluxo e microscopia confocal; (e) estudo da arquitetura do baço pela técnica de imuno-histoquímica associada à microscopia confocal. Avaliando os resultados em conjunto, a via autofágica parece ser de extrema importância e de capacidade inovadora para alvo terapêutico. Observou-se que a insulina exerceu efeitos antagônicos sobre os macrófagos de tecidos diferentes: aumentou a expressão LC3 nos macrófagos recuperados por LBA e não conseguiu alterar a atividade autofágica em macrófagos da polpa vermelha do baço em ratos diabéticos. Os BMM originários de ratos diabéticos comportaram-se de maneira contrária aos do animal controle: os BMM tipo M1 tiveram o conteúdo de LC3 diminuído, enquanto os M2 tiveram o conteúdo autofágico aumentado. O tratamento com insulina nos ratos diabéticos não alterou o nível do conteúdo LC3 dos BMM, mesmo após uma semana de cultura *in vitro*. Concluimos, assim, que o tratamento com dose única de insulina foi capaz de induzir a autofagia em macrófagos alveolares, mas insuficiente para resgatar os níveis basais da autofagia em macrófagos da medula óssea e da polpa vermelha do baço.

Descritores: Diabetes; Macrófagos; Imunidade inata; Insulina; Autofagia; Ratos Wistar

ABSTRACT

Sunahara KKS. *Insulin influence upon autophagy in experimental model of diabetes* [PhD Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2014.

Diabetes mellitus (DM) is characterized by hyperglycemia associated to a lack or ineffectiveness of insulin. DM is marked by changes in several cellular processes that need to be better understood. Autophagy pathway in macrophages from different tissues was studied with the purpose to verify whether treatment with insulin is capable of modulating this process. Bone marrow derived macrophages (BMM), bronchoalveolar lavage (BAL), and splenic tissue macrophages from Wistar rats, diabetic (alloxan, 42 mg/kg, iv, 10 days) and diabetic rats treated with insulin were studied. To characterize the model and evaluate the effect of insulin upon the autophagic process, the following analyzes were performed: (a) glucose levels, number of leukocytes in peripheral blood, BAL cell number; (b) concentrations of cytokines (interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-6, IL-4, IL-10, cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1 and CINC-2 in the supernatant of BAL fluid by ELISA; (c) characterization of BAL alveolar macrophage (AM) surface antigens (MHCII, pan macrophage marker KiM2R, CD11b) and autophagic markers (microtubule-associated protein light chain (LC)3, gene/protein associated to autophagy (ATG) by flow cytometry and confocal microscopy (d) study of macrophages differentiated from bone marrow by flow cytometry and confocal microscopy; (e) the architecture of spleen and macrophages from red pulp by immunohistochemical techniques associated to confocal microscopy. Evaluating these results together, the autophagic pathway appears to be innovative for therapeutic target. In this study, it was observed that insulin exerted diverse effects on macrophages from different tissues: increased expression of LC3 in AM recovered from BAL and was unable to change the autophagic activity of macrophages from the red pulp of the spleen in diabetic rats. BMM from diabetic rats behaved in an antagonistic way compared to control animals: BMM M1 type decreased their autophagy content while M2 macrophages increased autophagic levels and insulin treatment did not alter the level of LC3 expression. In conclusion, treatment with a single dose of insulin was able to induce autophagy in alveolar macrophages, but insufficient for recovering baseline levels of autophagy in bone marrow derived macrophages and macrophages from the red pulp of the spleen.

Descriptors: Diabetes; Macrophages; Innate immunity; Insulin; Autophagy; Wistar rats

Esta tese está de acordo com as seguintes normas:

Referências:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3. ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos:

De acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
1.1	Autofagia	1
1.2	Diabetes mellitus I e autofagia	5
1.3	Inflamação, insulina e metabolismo celular	7
1.4	Autofagia e resposta imune	10
2.	Justificativa	11
3.	Objetivos	12
4.	Materiais e métodos	13
4.1	Modelo experimental	13
4.2	Tratamento com insulina	13
4.3	Eutanásia	14
4.4	Estudo das células do lavado broncoalveolar	15
4.5	Estudo de macrófagos alveolares do lavado broncoalveolar	15
4.6	Estudo das citocinas do lavado broncoalveolar	16
4.7	Estudo do sangue periférico	16
4.8	Estudo da medula óssea	16
4.9	Estudo da arquitetura do baço	17
5.	Estatística	18
6.	Resultados	19
6.1	Caracterização inicial dos animais	19
6.2	Caracterização do modelo experimental	20
6.3	Estudo do lavado broncoalveolar	22
6.4	Estudo da autofagia em macrófagos alveolares	25
6.5	Influência da hiperglicemia sobre o processo autofágico	25
6.6	Estudo da arquitetura do baço	30
7.	Discussão	32
8.	Conclusão	38
9.	Anexos	39
10.	Referências	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 Autofagia

Autofagia é um processo por meio do qual ocorrem a transferência e a disponibilização de nutrientes de processos prescindíveis para outros vitais. Trata-se de processo catabólico em que ocorrem degradação e reciclagem de componentes celulares, por meio da via lisossomal, permitindo a adaptação do organismo a períodos de privação nutricional¹. O metabolismo autofágico também é responsável pela degradação de organelas deterioradas ou supérfluas². Além da privação nutricional, vários sinais são capazes de deflagrar o processo autofágico, como a presença de proteínas danificadas e compostos citotóxicos. Dessa forma, a autofagia está envolvida em diversos processos fisiológicos, como desenvolvimento e diferenciação celular, e patológicos, como infecção e câncer^{3,4}.

A primeira descrição de autofagia ocorreu há aproximadamente cinquenta anos, por microscopia eletrônica, durante estudos morfológicos⁵ realizados para identificação de lisossomos. Os vacúolos autofágicos foram observados como corpúsculos que abrigavam, em seu interior, um excesso de hidrolases. Na época, não se afirmava tratar-se de entidade distinta dos lisossomos, sendo denominados *corpúsculos densos*. Posteriormente, os corpúsculos densos foram identificados como estruturas diferentes de lisossomos, passando a ser denominados *vacúolos autofágicos*⁵.

O processo autofágico é também considerado um mecanismo adaptativo em resposta ao estresse metabólico, que permite a sobrevivência em ambientes adversos⁶, sendo encontrado em organismos variados, desde unicelulares eucariotas até mamíferos. Muitos estudos foram realizados em leveduras e evidenciaram que a autofagia é regulada por vários genes, denominados, individualmente, *gene relacionado à autofagia* (ATG), incluindo genes humanos ortólogos⁷. As deleções dos ATG, por sua vez, podem resultar em câncer, doenças neurodegenerativas e aumento da susceptibilidade a infecções^{6,7}.

Para entender melhor o processo autofágico, apresentamos um esquema resumido na **Figura 1**. O processo de autofagia inicia-se quando parte do citoplasma é englobada por uma estrutura membranácea denominada *fagóforo*, resultando no autofagossomo. O autofagossomo funde-se ao lisossomo, formando o autolisossomo, que terá, posteriormente, seu conteúdo degradado por enzimas. O retículo endoplasmático (RE) parece ser crucial à formação do autofagossomo, estando a via autofágica em estreita relação ao compartimento endossomal e corpo multivesicular (MVB) e à via de reciclagem do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II².

Figura 1 – Autofagia e formação de autolisossomo.

No processo autofágico, parte do citoplasma é inicialmente englobada por uma membrana de isolamento, o fagóforo, formando o autofagossomo. O autofagossomo funde-se ao lisossomo, formando o autolisossomo, e seu conteúdo é degradado por enzimas (adaptado de Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, 2011 jan. 20; 469(7330): 323-35)².

Passadas cinco décadas, os mecanismos de ação do processo autofágico ainda não foram inteiramente compreendidos. Maiores avanços no entendimento da autofagia foram feitos após o estudo do recrutamento dos ATG à via metabólica autofágica em leveduras⁸. Em presença de nutrientes, fatores de crescimento e insulina, o fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) classe I é ativado; em seguida, por meio da proteína quinase B (PKB/Akt), o PI3K ativa

a proteína-alvo da ação da rapamicina em mamíferos (mTOR), que, por sua vez, bloqueia a autofagia. Na ausência de nutrientes ou na presença de inibidores de mTOR, o ATG 1 recruta outros ATG⁸, que formam um complexo sinalizador à autofagia (**Figura 2**). Nos organismos em que há falha na produção de insulina ou estado de resistência insulínica, a autofagia pode estar aumentada não só porque essa substância inibe a deflagração da autofagia, mas também pelo desenvolvimento de resistência insulínica consequente ao estresse oxidativo de ácidos graxos livres, secundário à inadequação alimentar⁸.

Figura 2 – Via dos genes relacionados à autofagia (ATG).

Na presença de nutrientes, fatores de crescimento e insulina, o fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) classe I é ativado, e, através da proteína cinase B (PKB/Akt), ativa a proteína-alvo da ação da rapamicina em mamíferos (mTOR), que, por sua vez, bloqueia a autofagia. Na ausência de nutrientes, ou presença de inibidores de mTOR, o ATG 1 recruta outros ATG, que formam um complexo sinalizador à autofagia. Ao final, o ATG 9, com o complexo ATG 2 e 18, desacopla as proteínas do fagossomo maduro (adaptado de Fujitani et al. The role of autophagy in pancreatic beta-cell and diabetes. *Autophagy*, 2009 fev.; 5(2);280-2)⁸.

Os ATG 12 e 5 formam um complexo multimérico com o complexo ATG 16L e controlam as reações de conjugação da proteína de cadeia leve associada a microtúbulo (LC) 3 a um fosfolípide no fagossomo: a fosfatidiletanolamina. Durante a formação do autofagossomo, apenas a forma

lipidada da LC3, LC3 II, é recrutada. A forma da LC3 I não lipidada permanece no citoplasma. Posteriormente, o ATG 9 e os complexos ATG 2 e 18 desacoplam as proteínas codificadas pelos ATG do fagossomo maduro⁸. Para melhor entendimento, listamos na **Tabela 1** os ATG e suas funções descritas até o momento⁷.

Tabela 1 – Proteínas da via autofágica e funções

		Levedura	Mamíferos	
FASE DE INICIAÇÃO	Complexo ULK	Atg 1	ULK 1/2	Complexo regulado diretamente por mTORC1 dependente da presença de nutrientes formam um complexo estável que transloca para o local de indução da autofagia.
		Atg 13	Atg 13	
		Atg 17	-	
		-	FIP 200	
		-	Atg 101	
	Complexo PI3K	Vps 34	Vps 34	Produz PI3P no pré-autofagossomo ou no reticulo endoplasmático
		Vps 15	Vps 15	
		Atg 6	Beclin 1	
		Atg 14	Atg 14/Barkor	
FASE DE PROLONGAMENTO	Complexo de Conjugação 12-5	Atg 12	Atg 12	Complexo presente na parte externa da dupla membrana, sendo importante para a conjugação correta do LC3 (Atg8)
		Atg 5	Atg 5	
		Atg 10	Atg 10	
		Atg 7	Atg 7	
		Atg 16	Atg 16L	
	Atg 8/LC3	Atg 8	LC 3	Atg 8/LC3 está presente na porção externa e interna do autofagossomo. O Atg 4 é importante para prolongamento, isolamento e fechamento completo do autofagossomo.
		Atg 4	Atg 4	
		Atg 7	Atg 7	
		Atg 3	Atg 3	
OUTROS	Complexo Desacoplador			Agem em fase tardia da formação do autofagossomo. O Atg 9 é uma proteína transmembrânica que auxilia no desacoplamento de proteínas (Atg) do autofagossomo maduro.
		Atg 2	Atg 2	
		Atg 18	WIPI	
		Atg 9	Atg 9	

Adaptado de Fujitani et al.⁸ e Mizushima⁷.

1.2 Diabetes mellitus I e autofagia

O *diabetes mellitus* (DM) é uma doença crônica decorrente da produção insuficiente ou do aproveitamento ineficaz da insulina pelo organismo, o que leva ao estado de hiperglicemia^{9,10}. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, atualmente, 347 milhões de pessoas no mundo têm DM e que, em 2004, 3,4 milhões de pessoas morreram em consequência do estado hiperglicêmico crônico. Ainda segundo a OMS, o número de mortes em decorrência do diabetes dobrará no período de 2005 a 2030⁹⁻¹¹. Nos Estados Unidos, a prevalência da DM é de 25,8 milhões e acredita-se que 79 milhões de pessoas são pré-diabéticas¹². No Brasil, 13,5 milhões de pessoas são

portadoras de diabetes, sendo o quarto país de maior prevalência da doença, correspondendo a 6,5% da população entre 20 e 79 anos de idade¹³.

Apesar da alta incidência de DM I, os mecanismos moleculares e gênicos dessa síndrome ainda não estão completamente esclarecidos. Recentemente, a autofagia mostrou estar relacionada à fisiopatogênese do DM^{14,15}. A autofagia, como já referido, pode ser desencadeada por privação nutricional ou mesmo por deficiência insulínica. Consequentemente, o paciente diabético é um organismo em potencial no qual as vias autofágicas estão ativadas. Em células β de camundongos C57BL/6, demonstrou-se que, em estado de homeostasia fisiológica, há pouca formação de autofagossomos⁸. No entanto, em camundongo diabético (db/db), há formação ativa de autofagossomos, relacionando, assim, a resistência insulínica e o aumento da autofagia⁸. Entretanto, ainda é necessário melhor entendimento do processo autofágico nos tecidos e órgãos de indivíduos diabéticos, bem como de sua influência sobre o sistema imunológico.

Pesquisas vêm demonstrando que no paciente com DM I existe um perfil sistêmico pró-inflamatório¹⁶. Estudo feito em crianças e jovens diabéticos bem controlados mostrou que a interleucina (IL)-6 e o fibrinogênio estão aumentados no sangue periférico, se comparados a pacientes saudáveis¹⁶. Numerosos estudos evidenciam a presença de infiltrados de células inflamatórias em ilhotas de Langerhans em pacientes com DM I. O estudo da histologia do pâncreas de pacientes DM I revelou que as células T citotóxicas são as mais numerosas durante o processo de insulite, sendo os macrófagos e os linfócitos B também recrutados durante o processo inflamatório¹⁷. Acredita-se que nesse cenário, na ausência de macrófagos pancreáticos, não ocorre o DM I¹⁸. Entretanto, a maneira como o organismo tenta controlar a destruição das células β ainda não foi completamente esclarecida. Os infiltrados inflamatórios nas ilhotas pancreáticas parecem incluir células T regulatórias, o que indica uma tentativa de controlar a inflamação local. A comprovação dessa incapacidade regulatória vem de outro modelo experimental, no qual o camundongo *knock-out* para o *forkhead transcription factor* (Foxp) 3 demonstrou rápida evolução da doença¹⁹.

Sabe-se também que o paciente de DM I pode apresentar inúmeras complicações, como cardiopatia, neuropatia, retinopatia e nefropatia, estando

mais propenso a apresentar infecções¹⁰ (**Tabela 2**). Em estudo prospectivo, observou-se que pacientes diabéticos apresentaram risco de 30% a 40% maior de apresentar infecções do trato respiratório, urinário, pele e mucosas se comparados com controles hipertensos e não diabéticos²⁰.

Tabela 2 – Infecções comuns em pacientes diabéticos

Infecções pulmonares	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Tuberculose
Infecções do trato urinário	Bacteriúria assintomática Cistite fúngica Pielonefrite
Infecções do trato gastrointestinal	<i>Helicobacter pylori</i> Candidíase Colecistite Enterovírus Hepatites B e C
Pele, tecido subcutâneo e osso	Infecção de extremidades inferiores Gangrena de Fournier Osteomielite
Cabeça e pescoço	Candidíase Otite externa Mucormicose

Adaptado de Casqueiro J, Casqueiro J, Alves C. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. *Indian J Endocrinol Metab*, 2012 mar²¹.

Uma das hipóteses expõe que o risco elevado de infecções deve estar ligado aos defeitos imunológicos apresentados pelas células do paciente diabético²². Em diversos modelos experimentais, a habilidade fagocítica de polimorfonucleares (PMN), por exemplo, encontra-se comprometida no estado hiperglicêmico e pode ser revertida com administração de insulina²³.

Em modelo experimental, foram estudados alguns aspectos da imunidade inata na resposta inflamatória pulmonar a patógenos²³⁻²⁶. Após indução do diabetes por aloxana em ratos Wistar, foi observado que o recrutamento de células inflamatórias ao pulmão foi deficiente se comparado à resposta do animal não diabético, após estímulo por lipopolissacarídeo (LPS)²³⁻²⁵ ou ovalbumina (OVA)²⁷. Essa deficiência pode ser parcialmente explicada pela expressão anormal de moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular (ICAM)-1 e da selectina plaquetária (P-selectin), bem

como pela ineficácia dos macrófagos alveolares (MA) em liberar citocinas e quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de outras células imunes para o sítio inflamatório. Esse estudo também sugeriu que a administração de dose única de insulina pode reverter os parâmetros citados de deficiência à resposta inflamatória²⁴. Estudos demonstraram²³⁻²⁶ ainda que, quando a inflamação pulmonar é induzida por LPS, leucócitos do lavado broncoalveolar apresentam redução na produção e/ou na liberação de citocinas²⁴, e também apresenta-se diminuída a capacidade de destruição do agente invasor pelos leucócitos²².

1.3 Inflamação, insulina e metabolismo celular

A inflamação é uma resposta fisiológica do organismo a uma agressão que, ao evoluir de maneira inapropriada, pode causar lesão tecidual e doenças inflamatórias²⁸. Estudos recentes têm demonstrado que a insulina pode exercer função anti-inflamatória no organismo, uma vez que interfere na expressão dos receptores dos tipos *toll* (TLR) e *high-mobility group* (HMBG)-I, expressos em células mononucleares circulantes²⁹.

A insulina tem como função primordial a regulação do metabolismo da glicose, podendo ser considerada um hormônio anabólico, pois inibe vários mecanismos de degradação proteica. Apesar de estudos discutirem a capacidade da insulina em induzir ou não a síntese proteica *in vivo*, essa substância, na presença de aminoácidos (leucina), parece maximizar o metabolismo proteico muscular^{30,31}. Uma das características da leucina é sua habilidade de estimular a síntese proteica por meio da mTOR³¹, serina/treonina proteína cinase envolvida em inúmeros processos celulares fisiológicos e patológicos, como crescimento, proliferação, senescência e câncer^{3,32}.

Embora a via de sinalização seja redundante e não completamente elucidada, a mTOR parece ser importante reguladora da síntese e da degradação proteica. Em condições fisiológicas, induz a biossíntese ribossômica, estabiliza permeases de alta afinidade a aminoácidos e bloqueia alguns processos celulares, como a autofagia e a transcrição gênica induzida por privação nutricional³². O resumo das vias de sinalização de mTOR é apresentado na **Figura 3**, indicando que a insulina ativa o complexo 1 da

proteína-alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC1), por meio da via PI3-K e da pKB/Akt. O complexo mTORC1 é formado pela proteína reguladora associada a mTOR (Raptor), substrato rico em prolina Akt de 40 kDa (PRAS40), a *mammalian lethal* com Sec13 e proteína 8 (mLST8) e o domínio DEP de interação de proteínas contendo mTOR (DEPTOR).

A insulina pode estimular a ativação da PI3K e o subsequente recrutamento de Akt para a membrana plasmática, por meio de ativação pela fosfatidilinositol dependente de quinase 1 (PDK)1. Uma vez ativa, Akt pode levar à ativação do complexo mTORC1, por uma série de vias de sinalização. A Akt pode fosforilar diretamente o PRAS40, que se desliga de Raptor, liberando imediatamente o complexo mTORC1 da inibição sofrida por PRAS40. Após ativação, mTORC1 fosforila seus dois principais alvos: a p70 S6 ribossomo quinase (p70S6K) e o fator de iniciação eucariótica 4E ligante da proteína 1 (4EBP1), o que induz o crescimento, a proliferação e a sobrevivência celulares. Por fim, mTOR pode levar à inibição de fosforilação do substrato do receptor da insulina 1 (IRS1). O complexo mTORC2 contém Rictor, mTOR, mLST8, DEPTOR, proteína interadora da proteína cinase dos mamíferos ativada por estresse (mSIN1) e proteína observada com Rictor-1 (Protor-1). A sirtuína (SIRT1) pode regular a transcrição do gene que codifica o companheiro de mTOR insensível à rapamicina (Rictor), promovendo a ativação de mTORC2. O mTORC2, por sua vez, regula a organização do citoesqueleto e a sobrevivência celular, por meio de ativação de Akt e da proteína quinase C (PKC). Além disso, mTORC2 pode ativar a via das Rho GTPases que controla o contato entre as células^{33,34}.

Figura 3 – Via da proteína-alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR).

A insulina, por meio da via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K)/Akt, ativa o complexo 1 da proteína-alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC1). O complexo mTORC1 é formado pela proteína reguladora associada a mTOR (Raptor), pelo substrato rico em prolina Akt de 40 kDa (PRAS40), pela proteína associada a mTOR análoga à STL8 em *S. cerevisiae* (mLST8) e pelo domínio a DEP de interação de proteínas, contendo mTOR (DEPTOR). O mTORC1 fosforila seus dois principais alvos: a p70 S6 ribossomo quinase (p70S6K) e o fator de iniciação eucariótica 4E ligante da proteína 1 (4EBP1). O complexo mTORC2 contém Rictor, mTOR, mLST8, DEPTOR, a proteína interadora da proteína-quinase dos mamíferos ativada por estresse (mSIN1) e a proteína observada com Rictor-1 (Protor-1). A sirtuína (SIRT1) regula a transcrição do gene que codifica o parceiro de mTOR insensível à rapamicina (Rictor), promovendo a ativação de mTORC. (adaptado de Chong et al. Mammalian target of rapamycin signaling in diabetic cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol.* 2012 July; 16:11-45)^{33,34}.

1.4 Autofagia e resposta imune

Como já referido, a autofagia está imbricada na fisiopatologia de diversas doenças, como diabetes, câncer e Alzheimer, não obstante, em conexão com inúmeras vias de sinalização inter e intracelulares, contribuindo para a homeostase celular. Pouco ainda foi desvendado sobre como o processo autofágico contribui para uma resposta imune adequada e qual o grau de redundância dessa via. Sabe-se que, durante uma resposta imune, as células têm que se modificar de maneira drástica e repentina, sendo obrigadas a sair desse chamado “estado homeostático” para solucionar uma agressão³⁵, uma vez que as células imunes necessitam reconhecer, fagocitar um agente externo ou eliminar células alteradas que estejam iniciando processo tumoral. Um denominador comum entre as vias de sinalização da resposta imune e da autofagia é a fagocitose dependente de LC3, na qual a lipidação do LC3 deve ocorrer, de modo a suprir ambas. Ou seja, quando há engajamento do receptor do tipo *toll* e reconhecimento de um patógeno, uma das possibilidades é o recrutamento imediato de LC3 ao fagossomo, dependente de ATG 5 e 7, para que haja rápida digestão do invasor após fusão com um lisossomo³⁶.

A Associação Americana de Diabetes (ADA) referenda que indivíduos com diabetes têm o triplo do risco de morrer por gripe ou pneumonia, sendo também mais suscetíveis a infecções secundárias³⁷. Estudos prévios em ratos diabéticos (diabetes induzido por aloxana) mostraram que os leucócitos do sangue periférico apresentavam diminuição da atividade fagocitária^{38,39}. No entanto, não se sabe ao certo se no DM I há alteração dos níveis basais da lipidação do LC3 em macrófagos diabéticos, induzindo o recrutamento de outros ATG, e se isso pode contribuir para a deficiência da fagocitose nos macrófagos.

2. JUSTIFICATIVA

O *diabetes mellitus* é uma doença de importante prevalência no mundo todo. Por existirem componentes genéticos e ambientais intransponíveis no DM, é de suma importância que se desenvolvam novas ferramentas para minimizar as complicações e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. O mecanismo autofágico é um processo fisiológico presente em todas as células do corpo humano e potencialmente ineficaz em indivíduos diabéticos^{3,4}. Estudos de diversos tecidos têm mostrado que a alteração da autofagia pode acometer processos celulares vitais, interferir no desfecho de infecções e contribuir para o desenvolvimento de Alzheimer e de câncer³⁻⁵. Acreditamos que a alteração no mecanismo autofágico esteja relacionada também à incapacidade do paciente diabético de montar um processo inflamatório capaz de controlar infecções. Portanto, o estudo da autofagia em animais diabéticos pode nos levar ao melhor entendimento dos mecanismos pelos quais a resposta inflamatória é ineficaz no diabetes.

3. OBJETIVOS

Comparar marcadores do processo autofágico em macrófagos de pulmão, medula óssea e baço de animais saudáveis, diabéticos e diabéticos tratados com insulina e correlacionar, se possível, a modulação desse processo pela insulina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelo experimental

Foram utilizados ratos Wistar de aproximadamente 220 g, machos, de 8 semanas, procedentes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/USP) e do Instituto de Química da Universidade São Paulo. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCF/USP (**Anexo A**) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP (**Anexo B**). Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas e tiveram livre acesso a água e alimento.

Para indução do DM, os animais, divididos em três grupos, de acordo com esquema da **Figura 4**, foram deixados em jejum de 12 horas antes de receberem injeção endovenosa de aloxana (42 mg/kg) dissolvida em solução salina fisiológica. Animais controle receberam volume equivalente de solução salina pela mesma via. A glicemia foi determinada por meio de um monitor de glicose (Advantage, Lilly), utilizando amostras de sangue obtidas da extremidade da cauda dos animais. Foram utilizados somente animais com glicemia acima de 200 mg/dL (11,2 mM). Todos os animais foram analisados no dia inicial (dia 0) e no 10º dia após a indução do diabetes.

4.2 Tratamento com insulina

Animais diabéticos receberam dose única de 4 UI de insulina NPH (Humulin® Eli Lilly São Paulo, Brasil), por via subcutânea, 8 horas antes do experimento²³⁻²⁵. Os níveis glicêmicos foram determinados antes do tratamento de insulina e 8 horas depois. Os grupos de animais controle e diabéticos não tratados receberam solução salina subcutânea (**Tabela 3**). A dose de insulina usada foi baseada em estudos prévios publicados pelo grupo^{23,24,27}, sendo suficiente para restaurar parâmetros inflamatórios alterados em ratos diabéticos. Apesar de a dose ser insuficiente para fazer a glicemia retornar a parâmetros normais em ratos Wistar, o nível sérico de

insulina permaneceu detectável e acima do normal durante todo o experimento²³.

4.3 Eutanásia

Após 10 dias da indução do diabetes, foi realizada anestesia, pela associação de cloridrato de cetamina (10 mg/kg) e cloridrato de xilazina (90 mg/kg), por via intraperitoneal. De acordo com a necessidade, a anestesia foi complementada. A eutanásia foi realizada sob anestesia, por exsanguinação (Figura 4).

Figura 4 – Modelo experimental.

Diabetes induzida em ratos Wistar machos, com 8 semanas de vida, por meio de injeção de aloxana (dose 42 mg/kg, e.v.). No 10º dia, ocorreu a eutanásia dos animais.

Tabela 3 – Esquema de tratamento

	Dia 0	Dia 10
Grupos	Após 12 horas de jejum	8 horas antes do experimento
Controle	salina	solução salina
Diabetes	aloxana	solução salina
Diabetes + insulina	aloxana	insulina

4.4 Estudo das células do lavado broncoalveolar

Células em suspensão do LBA foram lavadas em RPMI (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA), 400 xg por 10 minutos (2x). O número de células foi determinado por contagem em câmaras de Neubauer. A viabilidade celular foi analisada por meio do teste de exclusão por solução de azul de Trypan.

4.5 Estudo de macrófagos alveolares do lavado broncoalveolar

Os MA dos ratos foram obtidos do LBA, com outras células pulmonares. O LBA foi recolhido com o auxílio de uma cânula inserida na traqueia. As vias aéreas foram lavadas uma vez com 10 mL de PBS (10 mM; pH 7,4) e três lavagens subsequentes com 5 mL de PBS cada uma^{23,24}. Células foram fenotipadas por citometria de fluxo e comparadas quanto à expressão de MHC II, CD11b/c, KiM2R, bem como quanto à expressão do marcador autofágico: LC3. As amostras para citometria de fluxo (LSR Fortessa, Becton Dickson) foram aliqüotadas na concentração de 10^6 células/100 μ L cada uma, lavadas com tampão para *fluorescence activated cell sorting* (FACS) e ressuspensas. Foram preparados os controles *unstained* (branco) e *single color* (coloração única) para cada marcador (para *set up* do aparelho), *fluorescence minus one* (FMO) e a marcação multicolorida para fenotipagem⁴⁰. Para preparação das amostras, as células foram lavadas e centrifugadas. Adicionaram-se 25 μ L dos anticorpos previamente diluídos às amostras, as quais foram deixadas para incubar por 30 min no gelo e no escuro. Amostras foram lavadas duas vezes com 150 μ L de tampão FACS, centrifugando a 400 x g por 5 min. Quando a amostra incluiu marcação intracelular, células foram fixadas com formaldeído a 4% (em temperatura ambiente por 10 minutos), lavadas com saponina a 0,1% e coradas intracelularmente. Anticorpos foram diluídos em saponina a 0,1% e incubados por 30 min com as células. Ao final, após centrifugação e eliminação do sobrenadante, a amostra foi ressuspensa com 250 μ L de tampão FACS.

4.6 Estudo das citocinas do lavado broncoalveolar

A determinação dos níveis de IL1 β , IL-6, TNF- α , das quimiocinas CINC 1, CINC 2, IL-10 e do IFN γ foi realizada no LBA por ensaios ELISA, utilizando-se *kits* comerciais (R & D Systems, Inc., Mineapolis, MN, USA).

4.7 Estudo do sangue periférico

Amostras de sangue foram obtidas da extremidade da cauda dos animais para contagem de leucócitos, que foi realizada em microscópio óptico, com auxílio de câmara de Newbauer.

4.8 Estudo da medula óssea

Dez dias após a indução do DM, a medula óssea foi processada, após filtragem em *cell strainers* de *nylon* de 100 μ m (BD Biosciences), e posteriormente reconstituída em meio de cultura RPMI com 10% de soro fetal bovino (FCS). Células da medula óssea foram mantidas em cultura por 7 dias, e a diferenciação para macrófagos foi induzida usando *granulocyte and macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) e *macrophage stimulating factor* (MSF) (peprotech, Princeton, NJ, USA)⁴⁰. No 3º dia de cultura, as células suspensas foram centrifugadas com RPMI 400 x g, sendo reconstituídas em meio RPMI, adicionado a 10% de FCS e a penicilina/estreptomicina, mantendo a mesma concentração de fatores de crescimento. No 7º dia, macrófagos foram fenotipados, e foram verificados os marcadores de superfície (CD11b, CD11c, KiM2R, MHC II) e o marcador intracelular LC3 de autofagia.

Os macrófagos também foram observados por microscopia confocal⁴⁰, sendo fenotipados com fluorocromos da mesma forma descrita.

4.9 Estudo da arquitetura do baço

Dez dias após a indução do diabetes, o baço foi retirado e imediatamente preparado para criosecção. O excesso de gordura do tecido linfóide foi retirado, o órgão foi colocado imediatamente em *cryomold* com *optimum cutting temperature* (OCT), *tissue Tek compound* (Sakura) e mergulhado em gelo seco. Secções de 8 µm foram realizadas e sobrepostas em *slides*. Após 12 horas, as secções foram fixadas com acetona por 3-5 minutos, sendo posteriormente guardadas a -80 °C. No momento do exame ao microscópio confocal, foi aplicado *DAKO pen* ao redor do tecido no *slide*. O espécime foi bloqueado por 30 minutos com soro caprino a 5% e depois avidina (Vector-cat SP 2001), sendo adicionadas 4 gotas/mL diluídas em PBS. A lâmina foi lavada quatro vezes com PBS. Após bloqueio com biotina (1 gota por lâmina) por 30 minutos, as amostras foram novamente lavadas com PBS. Adicionou-se o anticorpo primário diluído em 0,5% de soro de cabra em PBS. Após 30 minutos, realizaram-se três lavagens com FCS a 5% e *tween* a 0,3%, diluídos em PBS. Em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário diluído em soro de cabra a 5% em PBS. A lâmina foi montada em 90% de glicerol e a lamínula, adicionada. Os seguintes fluorocromos foram utilizados: KiM2R, CD45 e LC3.

5. ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e analisados por ANOVA e *student t-test*, utilizando o *software graphpad prism* 6.0 (La Jolla, CA, USA), com intervalo de confiança de 95% e $p < 0,05$ considerado significativo.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterização inicial dos animais

Os animais foram avaliados quanto ao peso, à glicemia (**Figura 5**) e à contagem periférica de leucócitos (**Figura 6**) antes da indução do diabetes, não apresentando diferença estatística dos parâmetros citados quando tabulados por grupos. A escolha de animais por grupo foi realizada aleatoriamente.

Figura 5 – Peso e nível glicêmico comparativo dos animais (dia 0).

Animais foram avaliados quanto ao peso e à glicemia antes da indução do diabetes e distribuídos em três grupos de maneira aleatória. Dados expressos em média do peso em gramas ou glicemia em mg/dL $\pm$ EPM ($n = 6$ animais por grupo).

Figura 6 – Leucócitos dos animais (dia 0).

Contagem de leucócitos obtidos por meio de esfregaço de amostra de sangue periférico dos animais antes da indução do diabetes. Dados expressos em média do número de leucócitos/mm³ $\pm$ EPM ($n = 6$ animais por grupo).

6.2 Caracterização do modelo experimental

A determinação do peso e da glicemia foi realizada em todos os animais nos dias 0 e 10 após a indução do diabetes. O peso foi verificado antes do tratamento de insulina ou solução salina. O modelo demonstrou ganho de peso (**Figura 7 e Tabela 4**) menor nos animais diabéticos do que nos animais controle. A glicemia também foi medida nos dias 0 e 10 após a indução do diabetes e 8 horas após injeção subcutânea de solução salina ou insulina (4 UI). Como mostram a **Tabela 3** e a **Figura 8**, a glicemia dos animais diabéticos foi, em média, quatro vezes maior do que a dos animais controle. Os animais do grupo tratado com insulina tiveram a glicemia diminuída ao redor de 240 mg/dL (**Figura 8**).

A contagem dos leucócitos do sangue periférico dos animais, após 8 horas de injeção de insulina ou solução salina, não revelou diferença estatística entre os grupos (**Figura 9**).

Tabela 4 – Caracterização do modelo do animal diabético

	Peso (gramas)		Glicemia (mg/dL)		Leucócitos/mm ³	
	Dia 0	Dia 10	Dia 0	Dia 10	Dia 0	Dia 10
Controle	232 ±11	331±6*	94 ±7	76 ± 3	7633±1162	7500 ± 416
Diabético	217±7	229±9	97 ± 8	418 ± 22**	6900 ± 808	8750 ± 557
Diabético + insulina	224±4	240±8	99 ± 6	249 ± 9	7925±1066	9275 ± 487

Valores constituem média e erro padrão da média (EPM) * p < 0,01; ** p < 0,0001; por comparação com os demais grupos (n = 6 animais).

Figura 7 – Variação de peso (Peso final/Peso Inicial) dos animais (dia 10-dia 0)

Representação da diferença no ganho de peso após 10 dias da indução do diabetes. Dados expressos em média da diferença de peso em gramas $\pm$ EPM (* $p < 0,01$ por comparação com demais grupos; $n = 6$ animais).

Figura 8 – Nível glicêmico dos animais (dia 10).

Glicemia periférica 10 dias após a indução do diabetes e 8 horas após o tratamento com solução salina ou insulina subcutânea. Dados expressos em média de glicemia em mg/dL $\pm$ EPM (* $p < 0,001$ por comparação entre animais diabéticos e os outros dois grupos; $n = 6$ animais).

Figura 9 – Leucócitos dos animais (dia 10).

Número de leucócitos do sangue periférico dos animais, 8 horas após o tratamento com insulina ou solução salina subcutânea. Dados expressos em média do número de leucócitos/mm³ ± EPM ($n = 6$ animais).

6.3 Estudo do lavado broncoalveolar

No 10º dia após a indução do diabetes, LBA foi realizado em todos os animais 8 horas após tratamento com solução salina (grupos controle e diabético) ou insulina subcutânea (grupo tratado). Observou-se que o número de células recuperadas por meio do LBA foi maior no grupo dos animais diabéticos se comparado aos grupos controle e tratado com insulina (**Figura 10**). Os níveis de IL-6, TNF α , IL-10, IFN γ , IL 4, IL1- β , CINC 1 e 2 no LBA foram dosados, mas apenas o nível da CINC-2 apresentou diferenças estatísticas entre os grupos. O nível de CINC-2 apresentou-se elevado no grupo de animais diabéticos, sendo restaurado após administração de insulina (**Figura 11**).

Entre os macrófagos do LBA, encontrou-se uma subpopulação positiva para o KiM2R (**Figura 12**). Ao se comparar essa subpopulação nos três grupos, verificou-se que a expressão da MHC II está aumentada nos animais diabéticos e, após tratamento de insulina, seus níveis retornam ao do grupo controle (**Figura 13**).

Figura 10 – Contagem de células do lavado broncoalveolar (LBA) (dia 10).

Número de leucócitos recuperados após LBA. Dados expressos em número total de células x10⁶ ± EPM (* p < 0,01 por comparação aos demais grupos; n = 6 animais).

Figura 11 – Perfil de citocinas no lavado broncoalveolar (LBA) de ratos.

Lavado broncoalveolar realizado com 10 mL de PBS e dosagem de citocinas pelo método de ELISA. (A) Níveis de citocina induzida quimiotática de neutrófilos (CINC) 1. (B) Níveis de CINC 2 no LBA. Dados expressos em média da concentração (pg/mL) ± EPM (* p < 0,0001 por comparação aos demais grupos (n = 6 animais)).

Figura 12 – Expressão do marcador para sistema fagocítico mononuclear (KiM2R) em macrófagos alveolares.

Dados expressos em porcentagem de células que expressam marcador KiM2R $\pm$ EPM ($n = 6$ animais).

Figura 13 – Expressão do complexo maior de histocompatibilidade tipo II (MHCII) em macrófagos KiM2R.

Expressão do MHC II nos macrófagos, em média geométrica da intensidade em unidade arbitrária do marcador KiM2R $\pm$ EPM (* $p < 0,05$ em comparação aos demais grupos; $n = 5$ ou 6 animais).

6.4 Estudo da autofagia em macrófagos alveolares

O estudo do marcador de autofagia LC3 no LBA mostrou que sua expressão não diferiu entre os grupos diabético e controle. Nos animais tratados com insulina, houve importante aumento na expressão do marcador de autofagia (**Figura 14**).

Quando estudamos a linhagem monocítica do LBA, que apresenta expressão da molécula de histocompatibilidade (MHC) II elevada, diferenciamos os macrófagos em duas subpopulações distintas: uma que apresenta níveis elevados e outra com baixos níveis de CD11 (CD11b *high* e *low*, respectivamente). A porcentagem de células que expressou o marcador de autofagia LC3 nos fagócitos de ambos os grupos foi maior nas populações diabéticas tratadas e não tratadas com insulina, se comparadas às células normais (**Figura 15**). A expressão do LC3 dos MA também foi estudada por meio da microscopia confocal (**Figura 16**), a qual confirmou os achados por meio da citometria de fluxo.

6.5 Influência da hiperglicemia sobre o processo autofágico

Para estudar se a hiperglicemia interfere no processo autofágico, retiramos as células da medula óssea de ratos normais e diabéticos e as mantivemos *in vitro*. Após 7 dias em cultura, macrófagos diferenciados da medula óssea (BMM) em M1 e M2 foram caracterizados quanto à expressão do marcador intracelular LC3. Verificou-se que os M1 e M2 apresentam comportamento antagônico: em macrófagos tipo M1, nos quais os animais controle apresentaram o dobro do conteúdo de LC3 se comparados os macrófagos tipo M2, os animais diabéticos tiveram seu conteúdo de LC3 diminuído – e esse aspecto não foi alterado nem mesmo no animal tratado com insulina (**Figura 17A**). Já os macrófagos M2, em animais diabéticos tratados ou não, apresentaram níveis de autofagia maiores do que os dos animais controle (**Figura 17B**). O estudo dos mesmos tipos celulares BMM, M1 e M2, por microscopia confocal (**Figura 18**), apresentou o mesmo padrão mostrado nas **Figuras 17A e 17B**, quando a técnica usada foi a citometria de fluxo.

Figura 14 – Expressão da cadeia leve 3 da proteína associada a microtúbulos (LC3) nos macrófagos do lavado broncoalveolar.

Dados expressos em média geométrica da intensidade (em unidade arbitrária) do LC3 em macrófagos alveolares EPM (* $p < 0,01$ por comparação aos demais grupos; $n = 6$ animais).

Figura 15 – População de células positivas para cadeia leve 3 da proteína associada a microtúbulos (LC3) no lavado broncoalveolar (LBA).

(A) Células LC3 positivas no grupo positivo para MHC II e elevada expressão de CD11b (*high*).
 (B) Células LC3 positivas no grupo positivo para MHC II e baixa expressão de CD11b (*low*).
 Dados expressos em porcentagem de células que expressam marcador LC3 em macrófagos alveolares $\pm$ EPM (* $p < 0,01$ por comparação aos demais grupos; $n = 6$ animais).

Figura 16 – *Integrated density* (ID) da cadeia leve 3 da proteína associada a microtúbulos (LC3) no lavado broncoalveolar (LBA).

(A) Níveis de expressão de LC3 em unidades arbitrárias de ID do LC3 em macrófagos alveolares $\pm$ EPM (* $p < 0,01$ por comparação aos demais grupos; $n = 6$ animais). Figuras de microscopia confocal apresentando marcação do LC3 (em verde) em macrófagos alveolares de ratos (B) normais, (C) diabéticos e (D) diabéticos tratados com insulina. Barras brancas representam 20 micrômetros.

Figura 17 – Expressão de LC3 em macrófagos derivados da medula óssea.

Estudo por citometria de fluxo de macrófagos diferenciados da medula óssea em (A) macrófagos tipo I (M1) e (B) macrófagos tipo II (M2) após uma semana de cultura *in vitro*. Dados expressos em intensidade (média geométrica da intensidade em unidade arbitrária) do marcador LC3 em macrófagos derivados da medula óssea EPM (* $p < 0,05$ por comparação aos demais grupos; $n = 5$ animais).

Figura 18 – Integrated density do LC3 em macrófagos derivados da medula óssea.

Estudo por microscopia confocal em macrófagos tipos M1 (A) e (A1-6) e M2 (B) e (B1-6) em animais controle (A1,2 e B1,2), diabéticos (A3,4 e B3,4) e diabéticos tratados com insulina (A5,6 e B5,6). Em verde, o marcador LC3 e, em vermelho, o marcador KiM2R. Dados expressos em unidades arbitrárias de ID do LC3 em macrófagos alveolares $\pm$ EPM (* $p < 0,05$ por comparação aos demais grupos; $n = 6$ animais). Barras brancas representam 20 micrômetros.

6.6 Estudo da arquitetura do baço

Um estudo imuno-histoquímico do baço mostrou que na polpa branca dos animais de todos os grupos não houve formação de centro germinativo (**Figura 19**). Ao estudar a polpa vermelha, verificou-se que os macrófagos dos animais diabéticos têm seu conteúdo autofágico diminuído e não recuperado após o animal receber tratamento com insulina (**Figura 20**).

Figura 19 – Imuno-histoquímica do baço.

Corte histológico de baço após congelamento em OCT e estudo por microscopia confocal. Em azul, delimitação dos folículos (polpa branca); em vermelho, polpa vermelha. Figura em RGB (vermelho, verde e azul). CD 45 em azul, KiM2R em vermelho e ATG 12 em verde. (* $p < 0,05$ por comparação aos demais grupos; $n = 6$ animais). Barras brancas representam 400 micrômetros.

Figura 20 – Autofagia em macrófagos da polpa vermelha do baço.

Em (A) representação gráfica da *integrated density* do ATG12 da polpa vermelha. Nas imagens, corte histológico de baço, após congelamento em OCT, e estudo por microscopia confocal da polpa vermelha de animais (B) controle, (C) diabético e (D) diabético tratado com insulina. Figura em RGB (vermelho, verde e azul). CD 45 em azul, KiM2R em vermelho e ATG 12 em verde. (* $p < 0,05$ por comparação aos demais grupos; $n = 6$ animais). Barras brancas representam 20 micrômetros.

7. DISCUSSÃO

Em conjunto, os resultados apresentados sugerem que o tratamento dos animais diabéticos com dose única de insulina resgata, pelo menos em parte, o fenótipo dos macrófagos nesses animais; no entanto, isso parece não interferir em todos os processos celulares, principalmente naqueles que, ao serem deflagrados, levam ao acúmulo de estruturas intracelulares, como os autofagossomos.

O modelo diabético experimental foi escolhido pela necessidade de estudar células imunes e, ao mesmo tempo, verificar a capacidade ou a incapacidade da insulina de modular o processo autofágico nessas células. Dessa maneira, os animais não poderiam apresentar alterações em órgãos do sistema imunológico, tampouco complicações da doença. Assim, foram tornados diabéticos pela aloxana e analisados no 10º dia após a indução. A aloxana é um composto hidrofílico que tem estrutura análoga à da glicose, o que explica sua rápida e seletiva captação pelas células β das ilhotas pancreáticas. Devido a essa semelhança, pode ser levada para o citoplasma pelo mesmo transportador da glicose, o Glut 2. O efeito da aloxana ocorre pela inibição da glicoquinase, que, por sua vez, bloqueia a secreção de insulina⁴². A citotoxicidade da aloxana sobre as células β é decorrente da produção de compostos reativos de oxigênio (ROS), ânions superóxidos e indução de ciclos redox^{42,43}. Os ROS levam à fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA) das células β das ilhotas pancreáticas, culminando com a destruição celular⁴⁴. Assim, a aloxana é um composto que pode induzir diabetes em modelos animais, de maneira reprodutível e seletiva, sem interferir em órgãos do sistema imunitário, ao contrário de outros compostos, como a estreptozotocina, que é tóxica para as células linfoides do timo e do baço⁴⁵.

Dez dias após a indução do diabetes por aloxana, verificou-se, pelos níveis glicêmicos aumentados e pelo ganho de peso reduzido dos animais tratados com a substância, que o diabetes foi induzido com êxito. A inexistência de diferença numérica de leucócitos nos três grupos sugere que, apesar de alguns estudos evidenciarem que o DM I causa inflamação nos pacientes⁴⁶,

nesse modelo de curta duração, se houve inflamação, esta não foi suficiente para provocar alteração do leucograma.

Experimentos realizados com ratos Wistar mostraram que cerca de 14% a 35% dos MA presentes no pulmão são recuperados pelo LBA e que a temperatura da solução usada para realizar a lavagem interfere no resultado⁴⁷. A solução a 37 °C parece ser capaz de auxiliar a retirada do MA do lavado, uma vez que aumenta sua motilidade⁴⁸. Quando os macrófagos são ativados, a capacidade de recolhimento por meio do LBA aumenta. Esse aumento deve-se mais à diminuição da capacidade de aderência dos MA à superfície alveolar do que ao aumento do número celular total⁴⁷. Assim, o número aumentado de células recolhidas dos animais diabéticos do LBA, nesse estudo, deve estar relacionado a seu estado de ativação, e não ao aumento do extravasamento celular no tecido pulmonar pela presença de inflamação. Esse estado de ativação pode ser explicado, em parte, pelo fato de uma subpopulação de MA apresentar nível aumentado de expressão de MHC II. Tal ativação, aparentemente inapropriada, foi recuperada pelo tratamento com insulina.

Segundo Celsus (42 a.C. a 37 d.C.), o processo inflamatório é caracterizado por rubor, tumor, calor e dor. Galeno (século II d.C.) introduziu a perda da função como outro fator associado à inflamação⁴⁹. Sendo a inflamação uma entidade heterogênea, não pode ser classificada apenas em aguda ou crônica. Consequentemente, para uma mesma doença, há indivíduos que respondem com processos inflamatórios de diferentes intensidades e características. Como qualquer processo biológico, a inflamação não ocorre de maneira congênere e nem sempre é benéfica. Como recentemente relatado, o importante é avaliar ambos os lados – *ying* e *yang* – da inflamação para que seu efeito seja dissipado rapidamente, evitando o surgimento de doenças deletérias⁵⁰.

Além disso, por meio do estudo genômico, foi possível identificar a cadeia de citocinas e genes que determinam a inflamação⁵¹. Não podemos afirmar que haja inflamação aguda no modelo em estudo, que é caracterizada pela produção de IL-6, TNF α , infiltrado leucocitário e migração de neutrófilos⁵². Podemos somente sugerir que nos animais diabéticos pode existir um processo inflamatório pulmonar em fase inicial, uma vez que a CINC-2 foi detectada em níveis expressivos. Em modelo animal experimental infeccioso

por *Pseudomonas aeruginosa*, no grupo de ratos não diabéticos, a CINC 2 mostrou-se importante fator para quimiotaxia de neutrófilos, sendo produzida por MA e, em menor escala, pelo epitélio broncoalveolar⁵³, ratificando os resultados obtidos com nosso modelo.

Os macrófagos do LBA apresentam fenótipo diferenciado. Ao estudar o marcador KiM2R nos MA, verificou-se que, nos animais diabéticos, a subpopulação de MA positiva para esse marcador sofre ativação pelo aumento da expressão de MHC II⁵⁴. Os macrófagos fazem parte de um *pool* celular, com células dendríticas e linfócitos B, que expressam o MHC II constitutivamente⁵⁵. Para que o antígeno processado migre para a superfície celular e seja apresentado para o linfócito T, é preciso haver um *turnover* contínuo do MHC II do citoplasma para essa superfície⁵⁶. Estudos têm demonstrado que há uma constante interação entre o processo de reciclagem do MHC II e a autofagia^{56,57}, e uma contribuição da autofagia para o *pool* de peptídeos apresentados aos linfócitos T⁵⁸. Assim, é possível especular que a autofagia interfira diretamente no *priming* das células T, orquestrando a resposta celular. Além disso, o receptor KiM2R foi descrito como específico de macrófagos teciduais e está presente em 50% dos macrófagos alveolares⁵⁹. No nosso estudo, entretanto, ou uma pequena população expressou esse receptor, ou, por meio do LBA, foi recuperada justamente a população de MA que apresentava a população mais negativa para tal receptor. Um estudo em ratos demonstrou que macrófagos positivos para KiM2R presentes na adventícia de vasos, quando ativados, estão relacionados à manutenção de inflamação crônica⁶⁰. Já quando o receptor KiM2R e o marcador CD11b são expressos, estão relacionados a mau prognóstico em transplantes de córnea, por induzirem a angiogênese⁶¹. Vale ressaltar que, no nosso estudo, grande parte dos macrófagos KiM2R apresentou-se também positivo a CD11b.

A autofagia é um processo homeostático que apresenta-se alterado em várias condições: inflamação, privação nutricional e estresse^{32,33,37}. No modelo utilizado, a hiperglicemia está presente tanto nos ratos diabéticos como naqueles que foram tratados com insulina. A hiperglicemia, por sua vez, é uma condição que induz o estresse celular pelo aumento de ROS^{62,63}, com consequente complicação do DM I por ativação de diversas vias contrarregulatórias^{63,64}. O estresse metabólico decorrente da hiperglicemia

parece afetar de maneira diferente populações celulares distintas. Se levarmos em conta a população total de MA recuperada pelo LBA, verificamos que o marcador autofágico não mostrou diferença na expressão dos animais normais. Nos animais diabéticos tratados com insulina, o nível de autofagia nos MA apresentou-se mais elevado. No entanto, há uma subpopulação de MA em animais diabéticos que sofre maior influência no processo autofágico, que parece coincidir com a que expressa o marcador CD11b e está mais “ativada”, ou seja, apresenta também níveis de expressão de MHC II mais elevados. A insulina, quando adicionada ao sistema, parece não resgatar a subpopulação celular que sofreu indução da autofagia.

Para estudar melhor o comportamento da autofagia em macrófagos de animais diabéticos, retiramos as células da medula óssea de ratos dos três grupos e as mantivemos em cultura por 7 dias, recebendo nutrientes e fatores de crescimento, para diferenciação em macrófagos tipos 1 (M1) e 2 (M2). Percebeu-se, ao fim de uma semana, que o processo autofágico em M1 sofre influência antagônica da população M2. Quanto à nomenclatura M1 e M2, para macrófagos, esta vem sendo largamente usada e está relacionada à plasticidade inerente ao tipo celular. A ativação tipo M1 está relacionada ao $TNF\alpha$, IL-6, IL-12, ou seja, apresenta fenótipo pró-inflamatório. Já a ativação M2 tem um fenótipo regulatório ou anti-inflamatório, sendo expressos os genes para IL-10⁶⁵.

Alguns métodos foram validados para monitorar o processo autofágico. Um dos métodos que permitem quantificar e visualizar a autofagia é o uso da citometria de fluxo, por meio da “extração” do LC3 I, versão citoplasmática do LC3. Com o uso de saponina a 0,01%, é possível induzir a abertura de microporos na membrana plasmática celular, necessária para a saída do LC3 citoplasmático, mensurar o LC3 II que se manteve ligado ao autofagossomo e quantificar a autofagia⁶⁶. Ressaltamos que a citometria de fluxo foi preferencialmente usada por possibilitar o estudo mais dinâmico da autofagia, por permitir o estudo concomitante em diferentes tipos celulares e ser quantitativa, o que não se verifica na microscopia eletrônica, que possibilita estudar número limitado de células, e no Western blotting (WB), no qual a quantificação é feita apenas de maneira indireta. Foram utilizados marcadores

para ATG 8, ATG 7 e proteína codificada por BECN (Beclin) 1, mas os experimentos não se mostraram reprodutíveis (resultados não mostrados).

Não conseguimos estabelecer o motivo pelo qual M1 e M2 sofrem influência diferente no processo autofágico, mas, após uma semana em cultura, ainda observou-se que os macrófagos oriundos de animais diabéticos têm performance diferente da apresentada pelos animais controle, mesmo sendo mantidos em meio de cultura com mesma concentração de glicose (RPMI). A expressão do marcador autofágico foi comprovada por meio do uso de duas técnicas diferentes: a citometria de fluxo e a microscopia confocal.

Como a maioria dos estudos publicados de autofagia foi desenvolvida em linhagem celular, não há consenso quanto à melhor metodologia para o estudo em tecidos⁶⁶. No baço, usamos os marcadores para as proteínas LC3 e os ATG 8, ATG 7, ATG 5, ATG 12, Beclin, sendo o ATG 12 o que melhor permitiu estudar os macrófagos da polpa vermelha. A fluorescência dos ATG e do LC3 é distribuída em todo o tecido, não permitindo a distinção entre os tipos celulares se outros marcadores não forem usados concomitantemente. Ainda no tecido, mesmo após corte de material criopreservado, pôde-se verificar diferença nos níveis do marcador autofágico.

A autofagia é uma importante via metabólica que se encontra alterada no DM I. Essa via tem sido estudada como causa coadjuvante para a morte das células β das ilhotas pancreáticas. Neste estudo, a autofagia mostrou-se também capaz de interferir na resposta imune, por induzir o acúmulo de vacúolos autofágicos intracelulares que necessitam de mesmo componente a ser usado na fagocitose. Como a autofagia se inter-relaciona com outras vias importantes, se sobrecarregada, pode alterar a expressão superficial de outras moléculas, como MHC II, que é determinante para o *priming* de células T CD4⁺. Entendemos que seria importante visualizar a autofagia como alvo para o desenvolvimento de um fármaco que pudesse recuperar a sinalização. A insulina, por sua vez, mostrou-se incapaz de recuperar o funcionamento da via autofágica, ou, se o faz, pode estar mascarada pela ativação concomitante de outras vias que ainda se mostram obscuras ao nosso entendimento. Em estudos futuros, seria importante considerar o tratamento do animal com doses de insulina subsequentes, ou mesmo o uso de insulina *in vitro*.

Um estudo em modelo animal por aloxana ressaltou que a introdução de metformina parece recuperar vários parâmetros farmacocinéticos do animal diabético⁶⁸. Há trabalhos que mostram que essa substância inibe a autofagia em células cancerígenas, por meio do bloqueio da via mTOR, impedindo o crescimento do tumor e sendo coadjuvante na terapia de pacientes com linfoma e endometriose^{69,70}. Alguns estudos reforçam que a metformina e outros hipoglicemiantes orais são importantes no tratamento do DM I, por melhorarem a eficácia da insulina e da função endotelial e também o bem-estar do paciente⁷¹⁻⁷³. Por fim, novos estudos e ensaios são necessários para que possamos desvendar as várias faces do diabetes e entender qual papel a autofagia desempenha nessa tão intrincada síndrome.

Concluimos assim que os dados obtidos sugerem que a insulina influencia, de forma multifacetada, macrófagos de origens distintas. Apesar de a hiperglicemia e a carência de insulina não alterarem os níveis de autofagia dos AM no LBA, diminuem o conteúdo LC3 nos macrófagos da polpa vermelha do baço, mesmo após curto período de diabetes induzido por aloxana em ratos. Quando a insulina é adicionada ao sistema, os níveis de autofagia elevam-se nos MA, enquanto os macrófagos da polpa não têm seus níveis de LC3 alterados. Quando as células foram diferenciadas em macrófagos M1, tipo pró-inflamatórias, os macrófagos diabéticos reduziram seu conteúdo LC3. Em contrapartida, nas células diferenciadas em M2, tipo regulatório, os macrófagos apresentaram aumento do marcador autofágico. Nos BMM M1 e M2, mesmo com o animal recebendo tratamento insulínico, essa dose foi insuficiente para recuperar as alterações desencadeadas em sua ausência.

8. CONCLUSÃO

O tratamento com insulina aumentou a expressão do marcador autofágico LC3 nos macrófagos alveolares. Nos macrófagos derivados da medula óssea e nos macrófagos da polpa vermelha do baço, dose única de insulina, nesse modelo, não foi capaz de alterar a expressão dos marcadores autofágicos.

9. ANEXOS

Anexo A – Comissão de Ética no Uso de Animais – FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Unico: CEUA/FCF/08/2012

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "A influência da insulina em processos autofágicos em ratos diabéticos e saudáveis" (Protocolo CEUA/FCF/351), de responsabilidade do Prof. Dr. Jaitson de Oliveira Martins, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 06 de fevereiro de 2012.

São Paulo, 07 de fevereiro de 2012.

Prof. Dr. Marco Antônio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/93/2012

São Paulo, 10 de setembro de 2012.

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
FBC

Senhor Professor,

A Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF/USP, em reunião realizada em 10 de setembro de 2012, aprova a inclusão da pesquisadora **Karen Krist Sary Sunahara** na equipe que irá realizar o projeto "A influência da insulina em processos autofágicos em ratos diabéticos e saudáveis" (Protocolo CEUA nº 351).

Atenciosamente,

Profa. Dra. Vladí Olga Consiglieri
Vice-Cóordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

Anexo B – Comitê de Ética em Pesquisa – FM/USP

CIÊNCIA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **28.05.12** tomou ciência do Projeto nº **173/12** intitulado “**A INFLUÊNCIA DA INSULINA EM PROCESSOS AUTOFÁGCOS EM RATOS DIABÉTICOS E SADIOS**”, vinculado à pós-graduação do Programa de Fisiopatologia Experimental que não envolverá atividade prática e/ou experimental no âmbito da Faculdade de Medicina ou Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e que conta com prévia aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Pesquisador(a) Responsável: Joilson Oliveira Martins
Pesquisador(a) Executante : Karen Krist Sary Sunahara

CEP-FMUSP, 28 de maio de 2012.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo C – Briefs on Insulin and Innate Immune Response

Review

Cellular Physiology and Biochemistry

Cell Physiol Biochem 2012;29:01-08

Accepted: November 21, 2011

Briefs on Insulin and Innate Immune Response

Karen K. S. Sunahara¹, Paulina Sannomiya² and Joilson O. Martins¹

¹Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, São Paulo, ²Institute of Heart (InCor), LIM-11, University of São Paulo Medical School, São Paulo

Key Words

Insulin • Diabetes Mellitus • Alveolar macrophages • Innate immune system • Leukotrienes • Sepsis • Phagocytosis • Cytokines • NF- κ B • MAPK • Akt • PKC

Abstract

Insulin is a pivotal regulator of glucose metabolism and exerts an important anabolic function throughout the body. Insulin commands the glucose uptake by the cells and might control the processes in which there is need for energy such as mitogenesis and gene transcription. In certain conditions, diabetes mellitus for example, when insulin is diminished, the homeostasis of many tissues and organs are broken what can lead to a higher mortality due to an enhanced susceptibility to infections. This vulnerability to infections can partially be explained by a change in response to inflammation. In fact, diabetic animals and patients show a deficient inflammatory response. Many animal models have shown that neutrophils chemotaxis and recruitment are dampened and macrophages from diabetic patients have low phagocytic and microbicidal activities. In most cases, once insulin therapy is introduced, clinical symptoms and signs can be reverted. In addition, there are a

number of studies trying to demystify pathways under insulin command. Researchers are also trying to understand how insulin is able to keep inflammatory response under control, restores innate immune cells ability to fight against pathogens and harmlessly activates adaptive immunity response. This review provides an overview on how inflammatory response is driven in the absence of insulin in diabetes and discusses recent findings on the influence of insulin on innate immune response. At the end, some signaling pathways are also highlighted and important enzymes and proteins that control DNA transcription are presented.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

Diabetes and Inflammation

Diabetes mellitus (DM) is a complex syndrome characterized by the loss of the homeostasis of glucose metabolism. It is associated to high mortality and morbidity rates, partially attributed to an enhanced susceptibility to secondary infections, when compared to non-diabetic patients [1]. Gram-positive bacteria are responsible for

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2012 S. Karger AG, Basel
1015-8987/12/0292-0001\$38.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/cpb

Joilson O. Martins, PhD
Laboratory of Immunocytology, Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University
Av. Prof. Lineu Prestes 580 - Bloco 17, 05508-900, São Paulo, SP (Brazil)
Tel. +55-11-3091-3662, Fax +55-11-3813-2197, E-Mail martinsj@usp.br

most cases of superficial infections that affect the extremities of the limbs. Severity of lesions can be attributed to a failure in the clearance of pathogens by what may lead to amputation of a foot or leg [2]. Diabetic women are more frequently affected by urinary infections. It has been shown that almost two thirds of the women with pyelonephritis are diabetic and had three times higher amounts of bacteriuria when compared to non-diabetic ones. Moreover, upper urinary tract infection, which can lead to sepsis and death, is also more common among diabetic patients [3]. Pneumonia caused by Gram-negative bacteria and *Mycobacterium tuberculosis* are more frequent in diabetic patients, despite higher mortality and morbidity rates are related to those caused by *Streptococcus pneumoniae* and influenza virus. In some other cases, DM is considered a predisposition factor for bacteremia [2-4].

Many type I diabetes animal models were launched and we would like to emphasize those that use diabetogenic drugs such as alloxan and streptozotocin. These drugs are cytotoxic and mediate enhanced production of reactive oxygen species (ROS) that accumulate in the pancreatic islets causing an irreversible lesion of the cells responsible for insulin synthesis, the β cells [5]. Alloxan is an unstable hydrophilic compound, with half-life of 90 seconds. This is also enough time to allow it to destroy the β cells when administered intravenously [6]. In higher doses, these drugs may have adverse effects: alloxan can cause necrosis of the renal tubular cells [5] and streptozotocin can be toxic to lymphoid cells of the spleen and thymus [7].

Anjos-Valota et al. [8] showed that rats with alloxan-induced DM present deficient cell adhesion and migration and lower expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in the internal spermatic fascia after stimulation by tumor necrosis factor (TNF)- α and that these parameters are reverted by insulin treatment. In the same model of DM, it was found that intratracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS) induces lower migration of neutrophils and lower levels of TNF- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6 and IL-10 to the bronchoalveolar space when compared to non-diabetic rats. [9, 10].

Phagocytes from diabetic patients present low phagocytic and microbicidal activities, which can partially explain their higher susceptibility to infection [11]. Using the experimental model of alloxan-induced DM, it was shown that neutrophils from diabetic rats have a diminished capacity to phagocytose *Candida albicans* [11]. Phorbol myristate acetate (PMA)-induced phagocytosis of zymosan and production of hydrogen

peroxide by neutrophils and macrophages from diabetic rats are also lower when compared to cells from healthy rats [12]. The deficient function of phagocytes in diabetic patients is due to lower synthesis of pro-inflammatory mediators what contribute to their higher susceptibility to infection and worse prognosis [11, 12]. However, comprehensible mechanisms responsible for the deficient response of these cells are not entirely elucidated.

Other important acute inflammatory mediators, the leukotrienes (LTs), are also hindered in diabetes [13-15]. Many essential functions are attributed to LTs, which are synthesized at early stages of infection, being crucial stimulators of phagocytosis and inducers of microbicidal activity. LTs have been reported to increase resistance to *Leishmania amazonensis* [13], *Trypanosoma cruzi* [14] and HIV [15]. They are generated from the metabolism of the arachidonic acid (AA) which is abundant in different tissues such as liver, muscles and brain [16]. Free AA is oxygenated at its C-5 position by 5-lipoxygenase (LO) in concert with 5-LO-activating protein (FLAP) to generate the epoxide intermediate LTA $_4$, which can subsequently be hydrolysed to form LTB $_4$ or conjugated with reduced glutathione to form cysteinyl-LTs (cys-LTs), LTC $_4$, LTD $_4$, and LTE $_4$ [16]. LTs act on different types of G-protein-coupled receptors. LTB $_4$ can act on high (BLT1) or low affinity (BLT2) receptors and the cys-LTs on cys-LT1 or cys-LT2 receptors with distinct affinities [16, 17].

It has been demonstrated that LTs are capable of potentiate phagocytic and microbicidal activity of alveolar macrophages (AMs), vital line of defense in the lungs against infection [16]. Mancuso et al. [18] showed that the phagocytic capacity of AMs in rats is significantly increased by LTs production during phagocytosis of IgG-opsonised targets and that inhibition of LT synthesis reduces the phagocytic ability of these cells. LTs also increase phagocytosis and killing of IgG-opsonised *Klebsiella pneumoniae* [19].

Since LTs stimulate phagocytosis and killing activity of AMs, and insulin deficiency is associated with a reduction of phagocytic function, Ferracini et al. [20] investigated the role of LTs on phagocytosis using AMs from diabetic rats. AMs from diabetic and non-diabetic rats were compared for phagocytosis of IgG-opsonised targets and intracellular signaling elicited by Fc γ R engagement. The effects of LT synthesis inhibitors or receptor antagonists, and insulin addition to AMs *in vitro* were also investigated [20]. In this study it has been shown that the phagocytic capacity of AMs from diabetic rats is significantly impaired compared to AMs from non-dia-

betics. The inhibition of LT synthesis in AMs from non-diabetic rats decreases the phagocytic capacity of these cells, whereas the phagocytic capacity of AMs from diabetic rats is not affected by LT synthesis inhibition [20], suggesting that AMs from diabetic rats lack this LT-dependent potentiating effect, which is not related to a deficient production of LTs or to the capacity to respond to LTs. However, lung homogenates from diabetic rats have been shown to produce less cys-LTs when stimulated with calcium ionophore than lungs from non-diabetic rats [21]. AMs from diabetic rats produce similar amounts of LTB₄ and LTD₄ as AMs from non-diabetics upon the engagement of FcγR [20].

The interaction of an IgG-opsonised particle with FcγR that is linked to immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) sequences activates a variety of signaling pathways [22] that promote phagocytosis, trigger microbicidal mechanisms [23] and induce the release of cytokines and lipid mediators, such as LTs [22, 23]. Campos et al. [24] showed that among the molecules activated in rat AMs during phagocytosis via FcγR, protein kinase B (Akt), which is a downstream target of phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K), protein kinase C (PKC) and mitogen-activated protein kinases (MAPK) are upregulated by LTs. However, in AMs from diabetic rats, upregulation of the FcγR signaling by LTs seems not to occur, because similar levels of LTs are produced by non-diabetic and diabetic AMs upon FcγR engagement [20]. In addition, LTs inhibition by zileuton does not affect the phosphorylation of signaling molecules, which strengthens the hypothesis that, in AMs from diabetic rats, the coupling of LTs to FcγR signaling does not occur [20]. At which level this coupling occurs is a matter of speculation, but Serezani et al. [25] showed that in AMs a proportion of FcγR localizes within lipid raft membrane microdomains and upon engagement of this receptor, there is a redistribution of these receptors and triggering of signaling cascade that culminates with PKC activation. It has been suggested that in AMs from diabetic rats the dynamics of cell membrane could be altered in such a way that these receptors redistribution might not occur [20, 25]. Moreover, the addition of insulin to AMs culture increases phagocytosis in both non-diabetic and diabetic cells without changes in the levels of LTs in cultures of AMs with IgG opsonised sheep red blood cells (IgG-SRBC) [20]. At the molecular level, insulin increases the phosphorylation of PKC-δ in both groups, which might explain the upregulation of phagocytosis caused by insulin addition [20]. In conclusion, these abnormalities in the course of the inflammatory response in DM might con-

tribute to increased susceptibility and severity of infections in the diabetic host. In agreement with these findings, critical evaluations of the topic show that infection can be more serious and possibly more difficult to eradicate in the diabetic host [26-28].

Another important advance in understanding the pathogenesis of phagocyte dysfunction and inflammatory disorders in diabetes is the observation that glucose or its analogues interacts with proteins or lipids. Since neutrophil function requires energy, metabolic changes (i.e., glycolytic and glutaminolytic pathways) may be involved in the reduction of neutrophil function observed in diabetic states [28]. Metabolic routes by which hyperglycemia is linked to neutrophil dysfunction include the advanced protein glycosylation reaction, the polyol pathway, oxygen free radical formation, the nitric oxide-cyclic guanosine-3'-5'-monophosphate pathway, and the glycolytic and glutaminolytic pathways [28]. Neutrophils from diabetic rats present impaired metabolism of glucose and glutamine. On the other hand, increased fatty acid oxidation may compensate for the reduction in glucose and glutamine utilization to maintain the ATP supply for these cells [28].

Insulin and the Inflammatory Response

Insulin through direct or indirect effects regulates leukocyte behavior in inflammation (Fig. 1) [28]. For example, intensive insulin therapy reduces morbidity and mortality among critically ill patients, even among those who are not diabetic [29]. The authors showed in a study conducted in an intensive care unit (ICU) that strict control of blood glucose levels with insulin reduces morbidity and mortality. Nevertheless, in contrast to the results of this study, others have established that the benefit of insulin therapy is inconsistent and may increase the risk of hypoglycemic episodes [30-31]. Thus the role of intensive insulin therapy in critically ill patients is uncertain as well as whether the beneficial effects are due to insulin per se or to tight glycemic control. This issue has been extensively discussed in the Editorial of *The New England Journal of Medicine* [32].

Insulin regulates many cellular processes, such as glucose transport [33], glycogen synthesis [34], mitogenesis [35], and gene transcription [36]. Throughout different signaling pathways insulin exerts a negative effect on the transcription of a subset of genes, and for other genes the effect is positive [36]. Downregulation of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-1

Fig. 1. Insulin and Neutrophils - in normal individuals (controls), when a pathogen, represented by lipopolysaccharide (LPS), enters the tissue neutrophils, the first line of defense, through adhesion molecules expression, such as intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, reach the inflammatory site. During inflammation, polymorphonuclear phagocyte pathogens, produce leucotriens (LTs) and reactive oxygen species (ROS). Neutrophils also produce interleukin (IL)-8 and tumor necrosis factor (TNF)- α , which recruit other cells to the site of injury. Matrix metalloproteinases (MMPs) are also important mediators of inflammation produced by these cells from innate immunity. When an individual become diabetic, neutrophils fail to exert their function. Phagocytosis is dampened and immune cells produce lower amounts of ROS and LTs. All these factors added to lower production of cytokines and MMPs making the diabetic individual prone to opportunistic infections. When diabetic individuals are treated with insulin, all hindered functions are recovered.

gene [37], insulin receptor substrate (IRS)-2 gene [38] and LPS-induced signaling pathways in AMs [39-40], and upregulation of insulin-like growth factor (IGF)-1 gene [41] and insulin receptor (IR) gene [42] are some examples of insulin action on gene transcription. In fact, Martins et al [10] demonstrated that alloxan-induced diabetic rats exhibit reduced IL-1 β and TNF- α mRNA levels in the lungs and mesenteric lymph nodes after instillation with LPS, when compared to non-diabetic rats. The expression of these cytokine genes is normalized after treatment of diabetic rats with insulin. So, the presence of IL-1 β and TNF- α in the BAL fluid is associated with increased expression of their transcripts in lung and mesenteric lymph nodes [9-10]. These early-response cytokines amplify the inflammatory response by stimulating the release of chemoattractant factors by AMs and lung epithelial cells, and the expression of adhesion

molecules by leukocytes and the endothelium [43].

Survival depends on the ability of the host to respond appropriately to pathogenic challenges. A dysregulation of the mechanisms that trigger the innate immune response against bacterial pathogens contributes to the pathogenesis of bacterial sepsis [26]. It has long been recognized that certain infections occur almost exclusively in diabetic patients, and many of these patients have a worse prognosis once infection occurs [26-28]. Adequate concentrations of insulin are essential for normal function of endothelial cells and neutrophils during the course of the inflammatory process [8-10].

PKC plays a central role in signal transduction and participates in diverse biological and biochemical functions [44-46]. For example, PKC may participate in glycogen metabolism, release of neurotransmitters, and protein transactivation by phosphorylation [44-47]. Akt is

implicated on PI3K-mediated regulation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) [48] an important transcription factor for pro-inflammatory mediators. Previous studies from our group have established a protocol for alloxan-induced diabetic rats treatment, in which the dose of insulin was chosen based on its ability to reverse inflammatory parameters that were reduced in diabetic rats [9-10, 49-51]. Although this dose of insulin only partially reduces hyperglycemia, it maintains blood insulin levels elevated during the time of the experiment [9-10, 49-51]. It is plausible that the observed effects would be primarily due to the increased levels of insulin rather than to the reduction of glycemia. Using this protocol, we showed that relative to LPS-treated control rats, LPS-treated diabetics exhibit reduced phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38, Akt, PKC- α and PKC- δ [50] and that treatment of diabetic rats with insulin completely or partially restores all parameters [50]. In addition, insulin regulates MAPK, PI3K, PKC and NF- κ B pathways in the allergic lung inflammation in diabetic rats [51], which suggests that insulin is required for optimal transduction of the intracellular signals that follow inflammatory processes.

Protective Effect of Insulin

Hyperglycemia and insulin resistance are common in severe illness and are associated with adverse outcomes [52-54]. It has been discussed that in critically ill patients a single drug is unlikely to be of significant benefit. However, in some particular situations or, in some patients, insulin is beneficial. Das [55] suggested that a combination of naturally occurring endogenous anti-inflammatory molecules is one additional tool that can be used in the management of patients with sepsis, a condition that any adequate therapy is not available at present.

Another important event that triggers sepsis/septic shock is the nuclear translocation of NF- κ B and induction of NF- κ B-dependent effector genes [56]. Böhrer et al. [57] observed that all patients with septic shock show increased NF- κ B binding activity in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), but mortality is higher when the binding activity exceeds 200% of the initial values. They also showed that somatic gene transfer with an expression of plasmid coding for I- κ B α reduces LPS-mediated NF- κ B activation and increases mice survival after LPS administration [57]. This suggests that NF- κ B mediates mortality in animal models of sepsis. They also

reported that gene transfer with I- κ B α is not effective when given simultaneously with or after LPS, suggesting that gene transfer has to be done before the cells are stimulated to release crucial mediators for the pathophysiology of sepsis [57]. The central role of NF- κ B in mediating inflammatory processes is evident from both the importance of its target genes and from the phenotypes of mice lacking the NF- κ B p65 subunit [58, 59]. Therefore, compounds that inhibit NF- κ B are of great interest for the development of therapeutic agents for the treatment of acute and chronic inflammation purposes. In other study, LPS activation of AMs induces alterations in the activation of NF- κ B p65 subunit and I- κ B α phosphorylation. These alterations induced by LPS are reversed by insulin [40]. Indeed, insulin might have a potent acute anti-inflammatory effect including a reduction in the intranuclear NF- κ B and an increase in I- κ B in mononuclear cells from obese subjects [60].

It has been shown that insulin inhibits LPS-induced ERK 1/2, p38, Akt, PKC α and PKC δ phosphorylation and TNF release in AMs *in vitro* [39]. This inhibitory effect of insulin on signaling molecules corroborates previous findings *in vivo* showing a protective effect of insulin on systemic inflammation related to sepsis [61]. Taken together, these studies suggest that the protective effect of insulin in sepsis could be, at least partially, attributed to inhibition of signaling pathways and synthesis of mediators released by the lungs during this condition.

In addition, insulin exerts an anti-inflammatory effect at the cellular and molecular levels *in vitro* and *in vivo* [39, 40, 60-62]. A low dose infusion of insulin (2.5 IU/h) reduces ROS generation by PBMCs, suppresses NADPH oxidase expression and intranuclear NF- κ B binding, induces I- κ B expression and suppresses plasma ICAM-1 levels, and monocyte chemotactic protein (MCP)-1 concentrations [60, 63]. Finally, insulin suppresses the proinflammatory transcription factor early growth response gene (Egr)-1, plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 and MCP-1 concentrations [60, 63].

Conclusion

Insulin has a pivotal importance on controlling the inflammatory response in diabetic patients [9, 10, 28, 49-51]. It is true that much effort is still necessary to determine the ideal doses and concentration to treat diabetic patients mainly when hyperglycemia is out of control due to infection or other adverse conditions such as stress and surgery. Being regulator of many cellular

processes and capable of activating gene transcription, it is crucial to demystify clear pathways that are able to keep inflammatory response under control, restore innate immune cells ability to fight against pathogens and harmlessly activate adaptive immunity response. Although insulin treatment was introduced almost 100 years ago, there is still a lot to improve and to find out. It has been shown that insulin can restore neutrophils migration in a LPS-induced inflammation environment [9, 10, 28]. However the shortcoming here is that most of the work was settled based on a single dose of insulin what differs from a type I diabetic patient, who needs insulin at least once a day. Interestingly, it seems that AMs do not show impaired phagocytic capacities when blockage of LTs was induced what could be an important pathway to target, once LTs seem to be an important acute inflammatory mediator [20].

AKT and PKC are crucial molecules on lymphocyte survival and proliferation cascades [47, 48, 64]. In the other words, would it be possible to extrapolate and use the anabolic effect of insulin to revert apoptotic processes inducing immune cells to last for longer periods and control this pathway in order to improve diabetic responses to inflammation? Another important point to check out is

the set of the genes that are up or down regulated by insulin. Would the upregulation of IR gene also occur in type II patients treated with insulin? Is insulin treatment for some periods beneficial and able to partially restore insulin resistance developed by these patients?

Far from being cleared, the mist that hovers over the topic insulin and inflammation is dense and sometimes impenetrable. Hopefully with new insights and better understanding of molecular pathways on how insulin exerts its function, new perspectives will be brought up in favor of many patients facing complications and improving life expectancy.

Acknowledgements

We apologize to the many researchers whose work we have not been able to discuss in this limited review. The authors are supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Projeto Universal), and Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo (Projeto I and Novos Docentes), Brazil.

References

- Shah B R, Hux JE: Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. *Diabetes Care* 2003;26:510-513.
- Peleg AY, Weeraratna T, McCarthy JS, Davis TM: Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev* 2007;23:3-15.
- Gregg EW, Gu Q, Cheng YJ, Narayan KM, Cowie CC: Mortality trends in men and women with diabetes, 1971 to 2000. *Ann Intern Med* 2007;147:149-155.
- Kornum JB, Thomsen RW, Riis A, Lervang HH, Schonheyder HC, Sorensen HT: Diabetes, glycaemic control, and risk of hospitalization with pneumonia: a population-based case-control study. *Diabetes Care* 2008;31:1541-1545.
- Sekudelski T: The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50:537-546.
- Lenzen S, Munday R: Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochem Pharmacol* 1991;42:1385-1391.
- Gaulton GN, Schwartz JL, Eardley DD: Assessment of the diabetogenic drugs alloxan and streptozotocin as models for the study of immune defects in diabetic mice. *Diabetologia* 1985;28:769-775.
- Anjos-Valotta EA, Martins JO, Oliveira MA, Casolari DA, Brito LR, Tostes RC, Fortes ZB, Sannomiya P: Inhibition of tumor necrosis factor- α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression in diabetic rats: role of insulin. *Inflamm Res* 2006;55:16-22.
- De Oliveira Martins J, Meyer-Pflug AR, Alba-Loureiro TC, Melbostad H, Costa Da Cruz JW, Coimbra R, Curi R, Sannomiya P: Modulation of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation: Role of insulin. *Shock* 2006;25:260-266.
- Martins JO, Zanoni FL, Martins DO, Coimbra R, Krieger JE, Jancar S, Sannomiya P: Insulin regulates cytokines and intercellular adhesion molecule-1 gene expression through nuclear factor- κ B activation in LPS-induced acute lung injury in rats. *Shock* 2009;31:404-409.
- Panneerselvam S, Govindasamy S: Sodium molybdate improves the phagocytic function in alloxan-induced diabetic rats. *Chem Biol Interact* 2003;145:159-163.
- Costa Rosa LF, Safi DA, Cury Y, Curi R: The effect of insulin on macrophage metabolism and function. *Cell Biochem Funct* 1996;14:33-42.
- Serezani CH, Perrella JH, Russo M, Peters-Golden M, Jancar S: Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *J Immunol* 2006;177:3201-3208.
- Wirth JJ, Kierszenbaum F: Stimulatory effects of leukotriene B₄ on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 1985;134:1989-1993.
- Flamand L, Borgeat P, Lalonde R, Gosselin J: Release of anti-HIV mediators after administration of leukotriene B₄ to humans. *J Infect Dis* 2004;189:2061-2069.
- Peters-Golden M, Henderson WR Jr: Leukotrienes. *N Engl J Med* 2007;357:1841-1854.

Alveolar macrophages in diabetes: friends or foes?

Karen K. S. Sunahara and Joilson O. Martins¹

Laboratory of Immunocytology, Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences of São Paulo University (FCF/USP), São Paulo, Brazil

RECEIVED SEPTEMBER 30, 2011; REVISED FEBRUARY 24, 2012; ACCEPTED FEBRUARY 27, 2012 DOI: 10.1189/jlb.0911488

ABSTRACT

AMs constitute an important bridge between innate and adaptive immunity. AMs patrol the lungs against pathogens, remove senescent cells, and help repair tissue. AM function is altered in many diseases, including DM, where AM abnormal immune responses may worsen infections or lead to exacerbation of inflammatory reactions. In vivo experimental models have greatly contributed to our knowledge of AM function. Studies have shown that during hyperglycemic states, the phagocytic function of AMs and the expression of adhesion molecules may be altered, interfering with the recruitment of immune cells to the inflammatory site. Insulin treatment seems to recover the normal function of impaired AMs. However, much research is still needed to characterize AMs and to better understand their role in inflammation and infection, particularly in diabetic patients. In this review, we attempt to explore recently accumulated knowledge about AM function and how this function is deficient in DM. Additionally, AM polarization is compared briefly with that of T cells, and this may interfere with how immune response is driven. This review discusses how impaired AMs lead to an aberrant immune response that contributes to worsening infection and autoimmunity, opening up discussion for future work in the field. *J. Leukoc. Biol.* **91**: 871–876; 2012.

Introduction

Macrophage patrolling protects the body against invaders and foreign bodies. Since the first description in phylogenetic studies in 1892, various tissue-specific functions have been attributed to macrophages [1]. They are believed to carry out important functions, such as phagocytosis, antigen processing, and presentation, which are key mechanisms by the interaction between the innate and adaptive immune systems.

Using their PRRs, AMs are able to recognize molecules carrying repetitive, patterned moieties. This recognition is fundamental for initiating an immune response against mammal-

infesting pathogens. Following phagocytosis, the pathogen is degraded within the macrophages. Next, it may be presented on the cell surface, usually via the MHC II. During antigen processing and presentation, cytokines are released with the main purpose of recruiting to the inflammatory site other immune cells, such as neutrophils, DCs, NK cells, and lymphocytes.

In many diseases, the inflammatory response can be abnormal. In AIDS, for example, the patient may not be able to build an appropriate immune response because of the destruction of circulating lymphocytes [2, 3]. In systemic lupus erythematosus, organs may be targeted by autoreactive antibodies [4] as a result of an abnormal immune response. In DM, many functions in immune cells are deficient, possibly leading to recurrent infections in patients who maintain a chronic hyperglycemic state. Pulmonary infections may lead to septicemia, which requires intensive care treatment and in most cases, is fatal. Our review focuses on recent knowledge regarding AMs and possible molecular pathways in DM that can contribute to a failure of AM responsiveness to infection.

AMs: IMPORTANCE, ORIGIN, AND FUNCTION

AMs are important for the maintenance of lung homeostasis. Specifically, they are responsible for the clearance of senescent cells and also contribute to tissue repair after infection or tissue injury. As the human respiratory tract is in constant contact with pathogens, host-defensive strategies, such as coughing, cilia movement, and mucus lining the bronchi and bronchioles, are required to trap the pathogen and to prevent it from reaching the alveoli. If the pathogen does reach the alveoli, it can easily circulate in the body through pulmonary capillaries. Thus, AMs in the alveoli represent a vital defense mechanism for the host [5].

Studies have shown that AMs derive from bone marrow [6], but little is known about them. A clear distinction has still not been made between mononuclear cells that enter the lungs

Abbreviations: AM=alveolar macrophage, BALF=BAL fluid, DM=diabetes mellitus, TAM=tumor-associated macrophage, U-PM=urban particulate matter

1. Correspondence: Laboratory of Immunocytology, Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, Av. Prof. Lineu Prestes 580–Bloco 17, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: martinsj@usp.br

during an infection to become AMs and AMs that differentiate from pulmonary resident monocytes. Moreover, the stimulus for macrophage migration to the lungs and the stimuli driving AM differentiation are still unknown. An additional question regarding AMs is whether differentiated AMs retain any plasticity. Answers to these questions could help the physician toward better treatment and promote faster healing of lung infection or injury.

Many conditions can lead to altered macrophage function. In lung cancer, AMs show impaired phagocytosis [7], but the cytokine profile and the adhesion molecule expression seem to vary according to histological characteristics of the tumor. Levels of secreted TNF- α and IL-1 from AMs of patients with small, squamous, or large cell undifferentiated carcinoma are lower when compared with those of the controls [7]. Conversely, AMs from adenocarcinoma patients show similar levels of IL-10, IL-6, IL-1, and TNF- α when compared with those of the controls [7]. In cancer, monocytes from blood circulation can also be recruited to the tumor site and may represent ~50% of the tumor mass [8]. Macrophages that infiltrate the tumor are called TAMs, and their antitumor function in lung cancer has not yet been elucidated [9]. When present at high levels, these infiltrating macrophages are associated with poor prognosis [8]; as such, they can induce tumor angiogenesis and metastasis [10]. Animal models have also suggested that conditions of modern life can contribute to the configuration of macrophages. For example, AMs, exposed *in vitro* to U-PM SRM1648, showed dose-dependent cytotoxic effects [11].

MACROPHAGES AND THEIR POLARIZATION

As with T cell differentiation, macrophages can polarize into classical (M1) or alternative (M2) types. Experimental animal

models have shown that a stimulus is essential to determine which pathway macrophages should follow. Generally, M1 cells tend to develop under an IFN- γ microenvironment and are capable of inducing resistance to viral or intracellular bacterial infection, as well as to cancerous cells [12]. They produce more reactive oxygen and nitrogen intermediates [13] than M2 macrophages, and they present IL-12^{high}, IL-23^{high}, and IL-10^{low} phenotypes. An acute pancreatitis-associated lung injury model suggests that AMs associated with classical [14] differentiation can also increase in number, 24 h after induction, can express inflammatory cytokines, and can activate NF- κ B.

Conversely, M2 cells seem to depend on an IL-4 or IL-13 environment and on other transcription factors, such as STAT-6 and peroxisome proliferator-activated receptor- γ [15]. Moreover, they show high expression of arginase 1, mannose receptor 1, or CD206 [15], anti-inflammatory cytokine IL-1R antagonist, and IL-10 [16]. It has also been suggested that PI3K activation and SHIP, a PI3K-negative regulator, are requirements for M2 skewing [13].

Plasticity is another important feature of mononuclear phagocytes. In an experimental arthritis mouse model, for instance, liposomal glucocorticoid treatment is likely to inhibit M1 differentiation toward M2 polarization [17], causing mononuclear phagocytes to acquire a more regulatory phenotype. This capability of configuring and reprogramming themselves in response to a stimulus is a unique characteristic of phagocytes. Even though a precise characterization of macrophages does not seem plausible, efforts should be made toward a better understanding of what functions they are capable of exerting and how they can modulate the host immune response. Therefore, we list in Table 1 some of the markers that we believe are expressed on AMs.

TAMs are still under thorough investigation. Although it seems reasonable to think that TAMs would differentiate ac-

TABLE 1. AMs: Receptors and Phenotype

Macrophage receptor	Function
F4/80 ^{low} -CD11b	F4/80: murine—pan macrophage marker—biological ligand for F4/80 has not been identified, but it is believed that F4/80 is required for induction of CD8 T cell-mediated peripheral tolerance [18] CD11b: human—inflammation marker on macrophages, complement receptor [19, 20]
CD68	Scavenger receptor that binds to LDL [21, 22]
Dectin-1/CD63	Murine and human, respectively: in cooperation with TLR2, induces proinflammatory cytokines [23]
Sialoadhesin (Siglecs)	Binds to sialic acid ligands, expressed on resident and inflammatory macrophages [24]
Mannose receptor (CD206)	Binds to mannose, fucose, and endogenous glycoproteins [25]
Tissue factor	Seems to be directly related to macrophage maturation; initiates the extrinsic coagulation pathway [25]
Scavenger receptor (collagenous)	Important nonopsonic receptor for modified LDL, acetylated LDL, and other polyanions, including lipid A; possible role in atherogenesis [23]
CD69	Activation marker after microbial stimuli; physiological ligands are unknown [25, 26]
CD14	Receptor for LPS, recognition of apoptotic cells [27]
Phosphatidyl serinereceptor	Binds to ICAM-3 on the surface of apoptotic cells [28]
Scavenger receptor (noncollagenous) CD36	Phagocytic marker [28]

cording to the IFN- γ microenvironment, they present a M2 phenotype [29]. There is some evidence that macrophages co-cultured with tumor cells can release substances that stimulate tumor growth [8]. TAMs produce CCL2, a chemokine that acts by recruiting monocytes and that is related to autoimmune pathogenesis [30].

AMs IN DIABETES: WHICH GOD DO THEY FOLLOW?

DM is a metabolic state in which insulin is not produced in sufficient amounts, or insulin function is altered, causing a hyperglycemic state. Since 1923, when a Nobel Prize was awarded to Banting and Macleod, there has been strong evidence that insulin is more than a polypeptide that regulates glucose uptake by cells and prevents or controls the onset of DM [31–33]. Insulin can act as an immunomodulatory compound, as well as a facilitator of the coagulation cascade, and it may also attenuate catabolic states [34]. Studies have found that microvascular and neurologic dysfunctions are common complications associated with DM and that their severity might be correlated directly with the duration of the hyperglycemic state [35]. A wide range of immune cell function is also deficient in diabetic patients [36, 37]. From chemotaxis and adherence to intracellular destruction of pathogens, many processes that are normally performed by leukocytes and that are vital to the normal clearance of a "microinvader" are impaired in the absence of insulin [34–37].

Studies have also demonstrated that phagocytic abilities against fungi are weakened in polymorphonuclear cells (neutrophils) of diabetic rats [38]. Phagocytosis is also impaired in AMs and restored after insulin administration [39]. Moreover, some adhesion molecules, such as ICAM-1, and the production of proinflammatory cytokines, such as TNF- α , seem to be impaired in neutrophils from the BALF of diabetic rats [40–43]. Using diabetic Wistar rats, another study has suggested that asthmatic diabetic animals show altered concentrations of IL-1 β and TNF- α in BALF, along with altered platelet-selectin expression on lung microvessels when compared with controls [44]. In addition, U-PM exposure seems to affect AM function in diabetic rabbits [11]. In this particular study, diabetic AMs are suggested to generate more ROS and to have higher levels of cytokine expression compared with normal AMs.

There is additional evidence indicating that DM can change TLR expression. Monocytes purified from the peripheral blood of diabetic patients show increased expression of TLR2 and -4 compared with controls [45]. In a mouse experimental model, the hyperglycemic state also changes TLR expression in bone marrow-derived macrophages [46]. There is a lot of controversy regarding TLR expression in diabetic cells [45–48]. In diabetic lungs, however, the exact mechanisms underlying AM and pathogen recognition through TLRs remain unclear.

Although macrophages can have their functions changed according to the situation, the mechanisms behind these changes need to be elucidated. In an experiment with human AMs from smoker and nonsmoker volunteers, results suggested that TLR expression of AMs from smokers is slightly

lower than that from nonsmokers, although no significant difference regarding cytotoxic activity in smokers was detected when stimulated with LPS [47]. This result was based on superanion production capacity and tumoricidal activity in smokers, but the mechanism underlying the enhancement of proinflammatory activity in smokers and recruitment of immune cells to the site was not elucidated. LPS is also present in various bacterial cell walls. As such, infection with *Pseudomonas aeruginosa* provokes severe complication in patients in intensive care units and seems to trigger TLR4 recognition in murine AMs [48] through the MyD88 pathway. It has also been suggested that two ligand/receptor pairs are needed to trigger the MyD88 pathway.

In asthma, an important immune-mediated inflammation [44, 49, 50], it has been suggested that the pathway that ameliorates the crisis in experimental models through the transferring of AMs resembles the GM-CSF-dependent pathway [50]. These results need to be investigated further. Conversely, diabetic patients seem to be protected from acute lung injury/acute respiratory distress syndrome, but the mechanisms underlying this decreased risk are not well understood [34].

How other hormones may affect AMs is still unclear. In vivo studies have been performed in animal models with insulin and in others lacking insulin, as well as in animal models having corticosteroids and in others lacking them. Corticosteroids seem to cause an imbalance that leads to oxidative stress and consequently, results in a dose-dependent inhibition of TNF- α and IL-8 secretion by a human monocytic cell line, which could be a problem when treating patients, as those with pulmonary infections are commonly treated with antibiotics and dexamethasone [51]. Insulin, on the other hand, seems to protect the patient against an over-reactive inflammation, which might be more destructive to the tissue than contributing to clear infection.

In fact, insulin is an anabolic hormone, which like glucagon, is fundamental for regulating blood and tissue glucose levels. Considering that the brain metabolism seems to be insulin-independent, one wonders how cerebral glucose is controlled [52]. It would be of great relevance to understand this "insulin-free milieu", as this microenvironment is highly dependent on the presence of glucose and is not vulnerable to blood insulin oscillations [52] or to a lack of insulin, as occurs in DM1.

In chronic diseases, such as DM, it is important to find biomarkers, which indicate the disease state and can be used for patient prognosis. Moreover, it is essential to understand which cells and functions are defective at each state. It is important to point out that infection is not an invariant state and that the infectious agent can also drive the way the organism responds to the aggression. Suppose that a diabetic patient is infected with *Mycobacterium tuberculosis*, a highly subversive intracellular bacterium that can manipulate the host immune system to act on its behalf. Almost 10% of the infected patients keeps the bacilli in a latent state and does not develop active tuberculosis. Some strains are highly resistant to nitrogen intermediates, protecting them from being degraded by the host immune system. Others are capable of interfering with the machinery involved with phagolysosome tethering and fusion [53]. Considering that the diabetic patient already

has a phagocytic deficiency, how does this patient deal with tuberculosis? Would a phagocytic incapacity be enough to promote sepsis, or would the phagocytic inability allow the bacteria to spread and to have "metastatic" foci in other organs, leading to renal or genitourinary tuberculosis?

As a facultative intracellular organism, *M. tuberculosis* might survive for some time, circulating in the peripheral blood. When entering the lungs, it can be recognized by AMs and by other innate immune cells through TLR2, which can recognize peptidoglycan displayed on bacilli walls. If the expression of TLR2 is altered [46] in DM1 cells, how does this benefit the patient? The molecular mechanisms underlying the relationship between DM1 and TLR expression in the lungs have not been clarified, but we predict a role for IFN- γ in this relationship. IFN- γ is known to be up-regulated in intracellular infection [54] and to increase MHC II expression in macrophages.

The well-known association between DM and tuberculosis is alarming. Many studies have reported that DM negatively affects tuberculosis control. Thus, in endemic areas of tuberculosis, different strategies should be adopted for better control of DM. It has been proposed that active searching for DM cases may help detect latent cases of tuberculosis and that treatment of these patients may have a positive impact on tuberculosis control [55]. In India, DM is an aggravating factor for infectious tuberculosis [56], especially in urban areas. Thus, DM treatment is important for blocking tuberculosis dissemination in endemic areas.

DM is believed to be a TH1 cell-mediated disease [57]. Diabetogenic macrophages are supposed to help with the "priming of pathogenic T cells", which infiltrate the pancreas [57]. It is suggested that *M. tuberculosis* inhibits IFN- γ up-regulation, leading to reduced priming of naive T cells. A 15-month follow-up of diabetic patients showed that IFN- γ -producing cells are deficient in diabetic patients. Authors of the study suggested that these deficient cells may travel to the pancreas and

that years later, they make the β cells highly susceptible to viral infections [58]. In the lungs, however, it is not known how this altered priming interferes with cell recruitment and cytokine release. The association between DM and tuberculosis may be explained partially by an IFN- γ deficiency, but whether these defective T cells can influence AMs is uncertain. Although insulin treatment can recover adhesion molecule expression, phagocytic cell recruitment, and the production of IFN- γ , whether or not the function of AMs is restored, remains unclear. Furthermore, the lack of IFN- γ -producing cells in the lungs can lead to inefficient AM activity, which may explain the failure of the innate and adaptive immune responses, transforming the pulmonary infection into septicemia or even leading to the appearance of autoimmune diseases. Many hypotheses might be constructed regarding diabetic AMs and related infection control failures. What we have tried to describe here is the relationship among TLR expression, failure to destroy pathogens, and the burden of an autoimmune disease or even septicemia (Fig. 1).

FINAL REMARKS

It has been shown recently that autophagy is associated with DM pathogenesis. As such, this pathway modification can explain hyperglycemic states and insulin deficiency [59]. The autophagy pathway is associated with β cell apoptosis and decreased proliferation, which lead to a reduced mass of pancreatic β cells. Imbalanced cytokine production and distorted cell signaling may promote altered gene expression and regulation in AMs. In addition, the fact that lymphocytes are incapable of releasing the proper number of immune modulators or are unable to prime the proper cells might create a continual loop of deficient immunity, which may result in sepsis or cancer. Finally, the function of AMs in patients with lung infec-

Figure 1. AMs and lung infection. (A) AMs, in normal circumstances, are able to phagocyte pathogens and clear the infection. (B) In diabetic patients, AMs fail to control infection as a result of many factors, such as phagocytic impairment, cytokine profile changes, and ROS activity failure. In this case, pathogens inside macrophages are unlikely to be processed entirely, and either burden of pathogens might incur in sepsis or autoimmune diseases.

tions is impaired, resulting in an ineffective inflammatory process and aberrant communication between innate and adaptive immunity. The role of AMs needs to be considered in the search for an effective treatment for lung infection. Moreover, AMs should be seen as paramount to the immune response in DM patients.

In conclusion, AMs are a key factor in the maintenance of lung homeostasis. Although it is not possible to say that AMs are solely responsible for the unsuccessful control of lung infection, they most likely worsen an existing infection. It is possible that "foe" AMs in diabetic patients are configured to become "friendly", although the molecular mechanism underlying this potential phenomenon still needs to be elucidated.

ACKNOWLEDGMENTS

We apologize to the many researchers whose work we have not been able to discuss in this limited review. The authors are supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Projeto Universal), and Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo (Projeto I and Novos Docentes), Brazil.

REFERENCES

- Takahashi, K. (2000) Development and differentiation of macrophages and related cells: historical review and current concepts. *J. Clin. Exp. Immunopathol.* **41**, 1–33.
- Gonzalez, G., Neumann, A. U. (1998) Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell responses during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiretroviral therapy. *Nat. Med.* **4**, 215–221.
- Flata, F., Auzan, B., Martins, L. P., Wain-Holton, S., Raphael, M., Maynaud, C., Denis, M., Guillou, J. M., Delbecq, P. (1987) AIDS virus-specific cytotoxic T lymphocytes in lung disorders. *Nature* **328**, 348–351.
- Costa, C. A., Oliveira de Castro Jr., D., Jecker, S., Santiago, M. (2004) Shrinking lung syndrome in systemic lupus erythematosus. *J. Res. Pneumol.* **50**, 260–263.
- Boudien, D. H. (1984) The alveolar macrophage. *Exonim. Health Perspect.* **55**, 327–341.
- Redente, E. F., Higgins, D. M., Dwyer-Nickel, L. D. (2010) Differential polarization of alveolar macrophages and bone derived monocytes following chemically and pathogen induced chronic lung inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 159–168.
- Ponniot, D. S., Plebanski, M., Apostolopoulos, V., McDonald, C. F. (2006) Alveolar macrophage function is altered in patients with lung cancer. *Clin. Exp. Immunol.* **143**, 563–572.
- Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., Allavena, P. (2009) Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 1065–1073.
- Takao, S., Yasumoto, K., Nagashima, A., Nakahashi, H., Sugimachi, K., Nomoto, K. (1986) Role of tumor-associated macrophages in lung cancer. *Cancer Res.* **46**, 5179–5182.
- Shih, J. H., Yuan, A., Jeremy, J., Chen, W., Yang, P. C. (2006) Tumor-associated macrophage: its role in cancer invasion and metastasis. *J. Cancer Mol. Biol.* **2**, 101–106.
- Mo, Y., Wan, R., Wang, J., Chien, S., Tollern, D. J., Zhang, Q. (2009) Diabetes is associated with increased sensitivity of alveolar macrophages to urban particulate matter exposure. *Toxicology* **262**, 130–137.
- Mantovani, A., Locati, M. (2009) Orchestration of macrophage polarization. *Blood* **114**, 5135–5136.
- Mantovani, A., Sica, A., Locati, M. (2005) Macrophage polarization comes of age. *Immunology* **23**, 344–346.
- Gras-Soll, S., Guillou, R., Semano-Mollari, A., Glosa, D. (2001) Activation of lung macrophage subpopulations in experimental acute pancreatitis. *J. Pathol.* **225**, 417–424.
- Saito, T., Takeuchi, O., Vandenbor, A., Yasuda, K., Tanaka, Y., Kumagai, Y., Miyake, T., Matsushita, K., Okazaki, T., Saitoh, T., Honma, K., Matsuyama, T., Yui, K., Tsujimura, T., Soudley, D. M., Nakanishi, K., Nakai, K., Akira, S. (2010) The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat. Immunol.* **11**, 936–944.
- Gunderscher, J. O., Liu, Y., Derouge, N., Noel, W., Beys, L., Hamann, G. H. G., Rues, G., Geldhof, A., Beschta, A., Revets, H., De Baetselier, P. (2008) Classical and alternative activation of macrophages: different pathways of macrophage mediated tumor promotion. In *Selected Aspects of Cancer Progression, Metastasis, Apoptosis and Immune Response* (Kaiser, H. E., Nasir, eds.), A. Springer Science Business Media, Germany, 139–156.
- Hofkens, W., Storm, G., Van Den Berg, W., Van Lent, P. (2011) Inhibition of M1 macrophage activation in favor of M2 differentiation by liposomal targeting of glucocorticoids to the synovial lining during experimental arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, A30.
- Lin, H. H., Fainne, D. E., Stacey, M., Terjesen, A., Nakamura, T., Zhang-Hoover, J., Kerley, M., Mucinski, M., Gordon, S., Stein-Streilein, J. (2005) The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific effector regulatory T cells in peripheral tolerance. *J. Exp. Med.* **201**, 1615–1625.
- Davis, H. M., Carpenter, D. C., Stahl, J. M., Zhang, W., Hynick, W. P., Grissold, D. E. (2000) Human granulocyte CD11b expression as a pharmacodynamic biomarker of inflammation. *J. Immunol. Methods* **240**, 125–132.
- Lundahl, J., Haldén, G., Skold, C. M. (1996) Human blood monocytes, but not alveolar macrophages, reveal increased CD11b/CD18 expression and adhesion properties upon receptor-dependent activation. *Eur. Respir. J.* **9**, 1188–1194.
- Künisch, E., Fuhrmann, R., Roth, A., Winter, R., Langenshausen, W., Künne, R. W. (2004) Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry. *Ann. Rheum. Dis.* **63**, 774–784.
- Therappan, T., Ankush, G., Glenn, M., Fang, Y.-H., Zhang, H. J., Toth, P., Kajimoto, H., Hong, Z., Jonathan, P., Wierholt, C., Pogoriler, J., Pan, L., Rehman, J., Archer, S. L. (2011) A central role for CD68(+) macrophages in hepatopulmonary syndrome: reversal by macrophage depletion. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**, 1080–1091.
- Taylor, P. R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.-H., Brown, G. D. (2005) Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 901–944.
- Crocker, P. R., Vark, A. (2001) Siglecs in the immune system. *Immunology* **103**, 137–145.
- Rothberger, H., McGee, M. P., Lee, T. K. (1984) Tissue factor activity: a marker for alveolar macrophages in rabbits. Effects of granulomatous pneumonitis. *J. Clin. Invest.* **73**, 1524–1531.
- Sancho, D., Gómez, M., Viedma, F., Esquivel, E., Gordón-Alonso, M., García-López, M. A., Fuente, H., Martínez, C., Lázaro, P., Sánchez, Madrid, F. (2005) CD69 downregulates autoimmunity reaction through active transforming growth factor- β production in collagen-induced arthritis. *J. Clin. Invest.* **115**, 872–882.
- Dobrowska, M. A., Vogel, S. N. (2002) Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect.* **4**, 905–914.
- Falok, V. F., Warner, M. L., Bratton, D. L., Henson, P. M. (1998) CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (av β). *J. Immunol.* **161**, 6250–6257.
- Sica, A., Mantovani, A. (2009) Macrophage fusion cuisine. *Blood* **114**, 4609–4610.
- Xia, M., Sui, Z. (2009) Recent developments in CCR2 antagonists. *Expert Opin. Ther. Pat.* **19**, 295–303.
- Martins, J. O., Ferracini, M., Ravanello, N., Landgraf, R. G., Jancar, S. (2008) Insulin inhibits LPS-induced signaling pathways in alveolar macrophages. *Cell. Physiol. Biochem.* **21**, 297–304.
- Martins, J. O. (2011) Can PKC δ be a novel therapeutic target? *J. Leukoc. Biol.* **89**, 1–2.
- Martins, J. O., Ferracini, M., Ravanello, N., Landgraf, R. G., Jancar, S. (2008) Insulin suppresses LPS-induced iNOS and COX-2 expression and NF- κ B activation in alveolar macrophages. *Cell. Physiol. Biochem.* **22**, 279–286.
- Honiden, S., Gong, M. N. (2009) Diabetes, insulin, and development of acute lung injury. *Crit. Care Med.* **37**, 2455–2464.
- Ljubic, S., Balachandran, A., Pavlic-Renar, I., Barada, A., Matelko, Z. (2004) Pulmonary infections in diabetes mellitus. *Diabetol. Croat.* **33**, 115–125.
- Alba-Loureiro, T. C., Munhoz, C. D., Martins, J. O., Cerchiaro, G. A., Scavone, C., Curi, R., Sannomiya, P. (2007) Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **40**, 1037–1044.
- Samalunga, K. K. S., Sannomiya, P., Martins, J. O. (2012) Effects on insulin and innate immune response. *Cell. Physiol. Biochem.*, doi:10.1159/000337579 [Epub ahead of print].
- Panneerselvam, S., Gokuldasan, S. (2003) Sodium molybdate improves the phagocytic function in alloxan induced diabetic rats. *Chem. Biol. Interact.* **145**, 159–165.
- Ferracini, M., Martins, J. O., Campos, M. R. M., Anger, D., Jancar, S. (2010) Impaired phagocytosis by alveolar macrophages from diabetic rats is related to the deficient coupling of LTx to the Fc γ R signaling cascade. *Mol. Immunol.* **47**, 1974–1980.

40. Angos-Valotta, F. A., Martins, J. O., Oliveira, M. A., Casolari, D. A., Brito, L. R., Tostes, R. C., Fortes, Z. B., Sannomiya, P. (2006) Inhibition of tumor necrosis factor- α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression in diabetic rats: role of insulin. *Inflamm. Res.* **55**, 16–22.
41. De Oliveira Martins, J., Meyer-Pflug, A. R., Alfa-Loureiro, T. C., McL-bostad, H., Cruz, J. W. M. G., Coimbra, R., Curi, R., Sannomiya, P. (2006) Modulation of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation: role of insulin. *Shock* **25**, 260–266.
42. Martins, J. O., Zanoni, F. L., Martins, D. O., Coimbra, R., Krieger, J. E., Jancar, S., Sannomiya, P. (2009) Insulin regulated cytokines and intercellular adhesion molecule-1 gene expression through nuclear factor κ B activation in LPS-induced acute lung injury in rats. *Shock* **31**, 404–409.
43. Martins, J. O., Ferracini, M., Anger, D. B., Martins, D. O., Ribeiro, L. F., Sannomiya, P., Jancar, S. (2010) Signaling pathways and mediators in LPS-induced lung inflammation in diabetic rats: role of insulin. *Shock* **33**, 76–82.
44. Martins, J. O., Campos, C. A., Cruz, J. W., Mazzilli, S., Alves, V. A., Viana, E. O., Jancar, S., Sannomiya, P. (2010) Insulin modulates cytokine release and selectin expression in the early phase of allergic airway inflammation in diabetic rats. *BMC Publ. Med.* **10**, 39.
45. Desraj, S., Dasu, M. R., Rockwood, J., Winter, W., Griffen, S. C. (2008) Increased Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of proinflammatory state. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 578–583.
46. Mohammad, M. K., Morran, M., Slotterbeck, B. (2006) Deregulated Toll-like receptor expression and signaling in bone marrow derived macrophages at the onset of diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Int. Immunol.* **18**, 1101–1113.
47. Thomassen, M. J., Barna, B. P., Wiedemann, H. P., Farmer, M., Ahmad, M. (1988) Human alveolar macrophage function: differences between smokers and nonsmokers. *J. Leukoc. Biol.* **44**, 313–318.
48. Raoult, E., Balloy, V., Garcia-Verdugo, I., Touquill, L., Ramphal, R., Chignar, M. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* LPS or Flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells. *PLoS One* **4**, 1–9.
49. Martins, J. O., Wintlus, B. M., Anger, D. B. C., Martins, D. O., Sannomiya, P., Jancar, S. (2010) Early phase of allergic airway inflammation in diabetic rats: role of insulin on the signaling pathways and mediators. *Cell. Physiol. Biochem.* **26**, 739–748.
50. Bang, B. R., Chinn, E., Shinn, E. J., Lee, H. S., Lee, S. Y., Cho, S. H., Min, K. U., Kim, Y. Y., Park, H. W. (2011) Alveolar macrophages modulate allergic inflammation in a murine model of asthma. *Exp. Mol. Med.* **43**, 275–280.
51. Milara, J., Navarro, A., Almundéver, P., Lluch, P., Morcillo, E. J., Cortijo, J. (2011) Oxidative stress-induced glucocorticoid resistance is prevented by dual PDE3/PDE4 inhibition in human alveolar macrophages. *Clin. Exp. Allergy* **41**, 535–546.
52. Sequist, E. R., Damber, G. S., Tkac, I., Gruetter, R. (2001) The effect of insulin on in vivo cerebral glucose concentrations and rates of glucose transport metabolism in humans. *Diabetes* **50**, 2203–2209.
53. Flynn, J. L., Chan, J. (2003) Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis* living with the enemy. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 450–455.
54. Oliveira, S. C., Harris, J. S., Rech, E. L., Rodarte, R. S., Bocca, A. L., Goes, A. M., Splinter, G. A. (1998) The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**, 77–84.
55. Jeon, C. Y., Murray, M. B. (2008) Diabetes mellitus increases risk of active tuberculosis: a systematic review of 15 observational studies. *PLoS Med.* **5**, 1091–1101.
56. Stevenson, C. R., Forough, N. G., Roglic, G., Williams, B. G., Lauer, J. A., Dyr, C., Unwin, N. (2007) Diabetes and tuberculosis: the impact of the diabetes epidemic on tuberculosis incidence. *BMC Public Health* **7**, 254.
57. Lehuen, A., Julien, D., Zaccane, P., Conke, A. (2010) Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat. Rev.* **10**, 501–513.
58. Avanzini, M. A., Gardelli, L., Lenta, E., Castellazzi, A. M., Derosa, G., Vos Santos, C., Oliveri, M., Pistone, A., Luzzini, R., D'Amico, G. (2005) IFN- γ low production capacity in type 1 diabetes mellitus patients at onset of disease. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **113**, 313–317.
59. Hui, K. Y., Jung, H. S., Lee, M. S. (2010) Role of autophagy in β cell function and mass. *Diabetes Obesit. Metab.* **12** (Suppl. 2), 20–26.

KEY WORDS:

insulin · diabetes mellitus · innate immunity · adaptive immunity · phagocytosis · cytokines · macrophage polarization · M1 · M2

Anexo E – Insulin influences autophagy response distinctively in macrophages of different compartments

Insulin Influences Autophagy Response Distinctively in Macrophages of Different Compartments

Karen K. S. Sunahara^{a,b} Fernanda P. B. Nunes^a Marisa A. P. Baptista^c Carina Strelli^d
Paulina Sannomiya^a Lisa S. Westerberg^e Joilson O. Martins^a

^aLaboratory of Immunoendocrinology, Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences of University São Paulo (FCF/USP), São Paulo, ^bExperimental Physiopathology, Department of Sciences/Experimental Physiopathology, Medical School, University of São Paulo, Brazil; ^cDepartment of Microbiology Tumor and Cell biology, Karolinska Institutet, Stockholm, ^dDepartment of Oncology Pathology, Karolinska Institutet, Stockholm Sweden; ^eInstitute of Heart (InCor), LIM-11, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

Key Words

Insulin • Diabetes Mellitus • Alveolar macrophages • Innate immunity • Autophagy • Bone Marrow Macrophages • Macrophages polarization

Abstract

Background/Aims: Diabetes mellitus (DM) is characterized by hyperglycemia, associated to a lack or inefficiency of the insulin to regulate glucose metabolism. DM is also marked by alterations in a diversity of cellular processes that need to be further unraveled. In this study, we examined the autophagy pathway in diabetic rat macrophages before and after treatment with insulin. **Methods:** Bone marrow-derived macrophages (BMM), bronchoalveolar lavage (BAL) and splenic tissue of diabetic male Wistar rats (alloxan, 42 mg/kg, i.v., 10 days) and control rats (physiological saline, i.v.). Some diabetic rats were given neutral protamine Hagedorn insulin (4 IU, s.c.) 8 h before experiments. For characterization of the model and evaluation of the effect of insulin on the autophagic process, the following analyzes were performed: (a) concentrations of cytokines: interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-6, IL-4, IL-10, cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1 and CINC-2 in the BAL supernatant was measured by ELISA; (b) characterization of alveolar macrophage (AM) of the BAL as surface antigens (MHCII, pan-macrophage KiM2R, CD11b) and autophagic markers (protein microtubule-associated light chain (LC)3, autophagy protein (Atg)12 by flow cytometry and confocal microscopy (c) study of macrophages differentiated from the bone marrow by flow cytometry and confocal microscopy (d) histology of the spleen by immunohistochemistry associated with confocal microscopy. **Results:** Interestingly, insulin exerted antagonistic effects on macrophages from different tissues. Macrophages from bronchoalveolar lavage (BAL) enhanced their LC3 autophagosome bound content after treatment with insulin whereas splenic macrophages from red pulp in diabetic rats failed to enhance their Atg 12 levels compared to control animals. Insulin treatment in diabetic rats did not change LC3 content in bone marrow derived macrophages (BMM). M1 and M2 macrophages behaved accordingly to the host they were derived from. Diabetic M1 BMM had their LC3 vesicle-bound

Joilson O. Martins, PhD

Laboratory of Immunoendocrinology, Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, São Paulo, Brazil
Av. Prof. Lineu Prestes 580 - Bloco 17, 05508-900, São Paulo, SP (Brazil)
Tel. +55-11-3091-3662, Fax +55-11-3813-2197, E-Mail martinsj@usp.br

content diminished and M2 BMM enhanced their LC3 levels and insulin treatment failed to rescue autophagy to control levels. Insulin normalizes CINC-2 level but does not modulate autophagy markers. **Conclusion:** Taking these results together, diabetic macrophages derived from different compartments show different levels of autophagy markers compared to healthy animals, therefore, they suffer distinctively in the absence of insulin.

Copyright © 2014 S. Karger AG, Basel

Introduction

During treatment and follow up of patients with diabetes mellitus (DM), hyperglycemia has for long been an undesirable element. Polyuria, polyphagia and polydipsia, three cardinal symptoms induced by hyperglycemia, have always blurred signs of insulin absence, such as enhanced muscle destruction and lower utilization of glucose by myocytes. Muscle destruction might induce loss of weight, which can normally be observed in type I diabetic patients, since insulin is a key factor for muscle eutrophy maintenance [1]. Moreover, the absence of insulin itself may change other physiologic cell pathways. The internalization of glucose transporters [2], abrogating the availability of glucose intracellularly, is just one of the alterations in cell metabolism induced by lack of insulin. Recently, type I diabetes mellitus (DM1) has been associated to autophagy-lysosome pathway (ALP) dysfunction, which among other defects, contributes for pancreatic β cells destruction [3]. Important for cell and tissue homeostasis maintenance, ALP dysfunction has also been associated to other disorders, such as Alzheimer [4], cancer and autoimmunity [5]. Moreover, autophagy has also been associated to microbial resistance. It has been suggested that some pathogens escape host defense, hijack the autophagy pathway and may establish a persistent infection [6]. Infection is of particular concern for DM patients and according to the American Diabetes Association (ADA) website, individuals with diabetes have three times higher risk of dying from flu or pneumonia since they are more susceptible to secondary infections [7]. Styes, folliculitis and other skin complications are also more common in people with diabetes. Experiments using Komeda diabetes-prone (KDP) rats infected with *Mycobacterium tuberculosis* (Mt), have shown that the burden of the bacilli observed in lungs and spleens of rats was more common when compared to healthy controls. In infected KDP rats, bacteremia impaired the production of nitric oxide (NO) by alveolar macrophages (AM) [8] that constitute an important entry barrier. Studies in alloxan-induced diabetic rats have also shown impairment in peripheral blood leukocyte phagocytic activities [9, 10]. Using the same model, it was published that diabetic AM have impaired phagocytosis [11]. In patients, diabetic neutrophils have shown dysfunction on their chemotactic and phagocytic abilities [12] and some of these alterations are reversible after insulin treatment [13]. How autophagy and phagocytosis are associated to each other is uncertain. Upon infection, AM from mice lacking autophagy gene 7 (*Atg 7^{-/-}*) sheltered higher amount of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) and Mt compared to normal mice. [14]. After autophagy induction, macrophages phagocytosed more BCG, although showing lower survival [15].

In this work, using a well established rat model for type I diabetes, we would like to investigate if there is any difference on autophagy phenotype in macrophages derived from bone marrow, BAL fluid and spleens in diabetic rats. Furthermore, verify if there is any influence of insulin treatment upon autophagy pathway.

Material and Methods

Animal diabetes model

Wistar male rats 8 weeks of age, weighing approximately 200 g at the beginning of the experiments were housed in a 12h/12h light/dark cycle and allowed standard pellet diet and tap water ad libitum throughout the observation period. All experiments were in accordance with the Brazilian National Council

for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and approved by the Ethical Committee on Animal Use (CEUA) of the Faculty of Pharmaceutical Sciences (FCF) and Medical School (FM), University of São Paulo, before initiating the experiments.

Animals were divided in three groups: control (C), diabetic (D) and diabetic rats treated with insulin (DI) and followed protocol published previously [16]. Briefly, diabetes mellitus was induced by the intravenous injection of 42mg/kg of alloxan (ALX) (Sigma Chemical Co, St Louis, Mo) dissolved in physiological saline (0.9% NaCl). Control rats were injected with physiological saline alone. Ten days after diabetes induction, peripheral blood glucose (from the rat tail) was determined using blood glucose monitor Accu-Chek Advantage II (Roche Diagnostica, São Paulo, SP, Brazil). Animals were considered diabetic if glucose was above 200 mg/dL. Insulin treated group, received 4 IU of neutral protamine Hagedorn insulin (Eli Lilly, São Paulo Brazil) s.c., 8 hours before the experiment and other groups received saline solution.

Bronchoalveolar lavage

Animals were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride 90 mg/kg (Ceva Santé Animale, Paulínia-SP, Brazil) and xylazine hydrochloride (Ceva Santé Animale, Paulínia-SP, Brazil) 10mg/kg. After being anesthetized, trachea was exposed through a midline ventral incision of approximately 0.5 cm length in the neck. Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed by instillation of 10 mL of PBS, at room temperature, through a polyethylene tube (1 mm in diameter) inserted into the trachea, as published previously [16]. First 10 mL instilled into the lungs was withdrawn and reinjected twice. After centrifugation (500g for 10 min), the supernatant was kept at -70°C until cytokine measurements. The lungs were further lavaged with 15 mL PBS (3 x 5 mL) to obtain remaining leukocytes. The BAL fluid was not used if the retrieved volume was less than 85% of the 25 mL instilled [16].

Enzyme immunoassay for cytokines and chemokines

The concentrations of tumor necrosis factor (TNF)- α , interferon (INF)- γ , cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) and CINC-2, interleukin (IL)-1 β , IL-10 and IL-6 in the BAL supernatant were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercially available kits according to the manufacturer's instructions (R&D Systems Inc, Minneapolis, USA). The sensitivity of the assay was 15 pg/mL [16].

Bone Marrow derived Macrophages

Bone marrow macrophages (BMM) were generated as published previously [17-19]. In summary, femur and tibia from rats were flushed with RPMI 1640 medium, centrifuged and resuspended (10^6 cells/mL) in RPMI, enriched with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) either with rat recombinant macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (both from Peprotech, Princeton, NJ, USA). On the 4th day of incubation in 5% CO₂, 37°C, nonadherent cells (BMM precursors) were collected and further incubated for 3 days with fresh medium enriched with the same growth factor (same as above). On day 7, adherent cells from the plates were harvested by vigorous pipetting and used for experiments. Some of the cultures were also performed on the top of coverslips (for microscopy).

Histology and flow cytometry

Spleens were either fixed in formaldehyde or snap frozen in Tissue-Tek OCT (Sakura, Torrance, CA, USA). Sections (8-10 μ m) were cut, air dried overnight and those not fixed with formaldehyde were fixed in cold acetone. Immunohistochemistry was performed as previously published [20]. Images were acquired using a Leica confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Germany) equipped with 1 argon and 2 HeNe lasers, using magnification lens at 20 $\times$ /0.70 CS and 63 $\times$ /1.32 immersion oil and 90% glycerol (MP Biomedicals). The pictures are representative of at least 3 analysed spleen sections per rat and for BAL, triplicates from the same sample was performed. To quantify fluorescence, Integrated Density was determined by Fiji (Image J, NIH, USA). For flow cytometry analysis, single cell suspensions from BAL, BMM and spleens were prepared and erythrocytes lysed. Cells were immunolabelled and acquired using LSR Fortessa (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA). Analyses were made using FlowJo software (version X.0 TreeStar Inc.) [20].

Antibodies

The following antibodies were used for flow cytometry and/or immunohistochemistry: CD11b/c-PE-Cy7, Tcell $\alpha\beta$ PerCP (BD Bioscience, NJ, USA); MHCII PE, anti-rabbit IgG FitC, CD45-APC, (eBioscience, San Diego CA); anti-rabbit alexa555, anti-rabbit-Cy3, Anti-rat pan macrophage marker (KIM2R) (Abcam, Cambridge, UK); Live/Dead-AmCyan (Invitrogen), anti-rabbit APC-Cy7 (Santa Cruz Biotechnology); anti-autophagy related protein (Atg) 3, 5, 7, 12, LC3A, B (Cell Signaling).

Data and statistical analysis

Data shown was analyzed by ANOVA or unpaired t-test using GraphPad Prism 6.0 software (La Jolla, CA, USA) and a two-tailed *p* value with 95% confidence interval was acquired. Data is presented as mean (and $\pm$ SEM) and *P*<0.05 was considered significant.

Results

Higher expression of LC3 in macrophages from bronchoalveolar lavage in diabetic rats treated with insulin

Consistently with previous studies [16], ALX treated rats showed typical DMI signs, including elevated blood glucose and lower rate of weight gain (data not shown). LC3 is a soluble protein ubiquitously distributed in mammalian cells and tissues. Using a validated flow cytometry technique that excludes cytoplasmic form of LC3, we examined macrophages from BAL and screened for their LC3 autophagosomal membrane bound content (Fig. 1D). While AM from both control and diabetic rats did not show LC3 expression differences, AM from diabetic animals treated with insulin showed 5 fold enhanced LC3 autophagosomal membrane bound expression (Fig. 1D). Confocal studies were also performed (Fig. 2) and analysis of BAL cells integrated density showed higher accumulation of LC3 on cells derived from diabetic animal treated with insulin (Fig. 2 A). Cytokines from BAL were determined but only CINC-1 (Fig. 3A) and CINC-2 (Fig. 3B) expressions were detected. Interestingly,

Fig. 1. Autophagosome expression of LC3 in alveolar macrophages: BAL was performed by instillation of 10 mL of PBS, at room temperature and extra 3 times of 5mL for total cell recovery. Fig. A, B and C show flow cytometry gatings. In A, BAL cells gated. In B, live cells were discriminated and in C, macrophages were determined as being double positive for MHC II and CD 11bc. In D, LC3 geometric mean expression was measured on macrophages obtained from control, diabetic and insulin treated rats. Graph represents geometric mean fluorescence of LC3 $\pm$ SEM. (* and ** *p*< 0.005) Representative of 3 independent experiments, 5 animals each group.

Fig. 2. Insulin enhances granularity of autophagosome LC3 in bronchoalveolar (BAL) macrophages: BAL was performed by instillation of PBS, at room temperature. BAL cells were recovered and LC3 integrated density measured on alveolar macrophages (AM) in (A). Graph representing Integrity density of LC3 $\pm$ SEM. Below, 3 pictures of confocal microscopy showing LC3 staining (green channel) of AM from control (B), diabetic (C) and insulin treated (D) rats. Bars = 15 μ m. Magnification 63x, zoom 2. (* $p < 0.002$).

Fig. 3. CINC 1 and 2 in bronchoalveolar lavage (BAL): BAL was performed by instillation of PBS, at room temperature and levels of CINC 1 (A) and 2 (B) was measured in BAL from control, diabetic and insulin treated rats. Graphs represents concentration of the cytokines $\pm$ SEM. * $p < 0.001$. Representative of 3 independent experiments, 6 animals each group.

treatment with insulin was able to restore CINC 2 to that of control rats. IL1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 and INF- γ were measured, but their presence was below detectable values.

Distinct phenotypes in bone marrow derived macrophages from control and diabetic rats

To determine if environment can modulate LC 3 uptake in AM precursor cells, two lineages of macrophages called as M1 and M2 macrophage-like were generated from bone marrow progenitors. Bone marrow progenitor cells from control, diabetic and diabetic rats treated with insulin were isolated and cultured in RPMI with normal glucose concentration media. To assess activation of the autophagy pathway we determined the LC3 autophagosome bound content by flow cytometry. After one week in culture, M1-like macrophages from diabetic and diabetic rats treated with insulin showed lower LC3 contents, compared to control animals (Fig. 4D). Conversely, M2-like macrophages from both diabetic groups

Fig. 4. Insulin influence upon LC3 on Bone Marrow derived macrophages (BMM). Bone marrow from femur and tibia was processed and cultured for one week either with GM-CSF or M-CSF, generating both types Type I (M1), or Type 2 (M2)-like macrophages. Autophagy marker LC 3 content was screened by flow cytometry on (D) M1-like BMM and on (E) M2-like BMM derived from control, diabetic and insulin treated animals. Graphs represent geometric values of LC3 $\pm$ SEM. 6 animals per group, representative of 3 independent experiments. (* and ** $p < 0.05$ on both graphs).

Fig. 5. M1 and M2 LC3 Integrated density: Bone marrow extracted from femur and tibia was cultured for one week either with GM-CSF or M-CSF, generating both: Type I (M1) and Type 2 (M2)-like macrophages. Confocal microscopy of M1 ($A_{1,2,3,4,5,6}$) and M2 ($B_{1,2,3,4,5,6}$) macrophages was performed. Odd numbers show grayscale pictures of the green channel (LC3) and even numbers show RGB pictures (red is KiM2R macrophage marker; green is LC3, and blue is CD45). Integrated density was calculated on both types of macrophages M1 (A) and M2 (B)-like macrophages, differentiated from control (1,2), diabetic (3,4) and insulin treated (5,6) rats. Analysis of 6 animals in each group, at least 3 pictures of each culture per animal. One representative picture per animal from each group. Graphs represent mean integrated density values of LC3 ($\pm$ SEM). (* and ** $p < 0.05$) Bars=15 μ m. Magnification 63x, zoom 2x.

Fig. 6. Spleen autophagy levels: Splens from normal, diabetic and insulin treated rats were frozen in OCT and sectioned. Confocal microscopy showing spleen histology (with follicles) in A, B, C (bar=400µm magnification 20x) and red pulp macrophages in D,E,F (bar= 25µm magnification 63x zoom 1) from control (A,D), diabetic (B,E) and insulin treated (C,F) rats. Data presented as RGB pictures (red is KiM2R macrophage marker; green is LC3, and blue is CD45 Integrated density from Atg 12 content in spleen (G) red and (H) white pulp (*p< 0.05; ** p< 0.001) was measured.

exhibited higher LC3 autophagosome bound levels (Fig. 4E) than healthy animals. When M1 and M2 BMM were screened by confocal microscopy and integrated density of LC3 measured, the same trend was found (Fig. 5 C, D). In Fig. 5 A and B we show images in RGB (red, green, blue) and gray scale of the green channel in BMM from control (Fig. 5 A1, B1); diabetic (Fig. 5 A3, B3); and diabetic animals treated with insulin (Fig. 5 A5, B5).

Diabetic Macrophages in spleen showed lower levels of autophagy

Splens from control, diabetic and diabetic animals treated with insulin were examined for autophagy activation using Atg 12 (Fig. 6). When integrated density of red and white pulp was compared, macrophages showed higher autophagic content compared to other leucocytes (Fig. 6). After diabetic rats were treated with insulin, autophagy related marker did not recover basal levels (Fig. 6 G, H).

Discussion

Data presented herein suggest that expression of the LC3 bound to autophagosomes, varies depending on the type of macrophage. Insulin seems to influence in multifaceted ways macrophages from distinct origins. In ALX induced diabetes in rats, hyperglycemia and absence of insulin did not change autophagosome LC 3 levels in BAL. When bone marrow cells were differentiated into M1-like macrophages, those cells derived from diabetic animals have lowered their autophagosome LC3 content. Conversely, cells differentiated into M2-like macrophages, have their autophagic LC3 content enhanced. When one of the proteins (Atg12) responsible for conjugating LC3 into the phagosome was screened, it was diminished in the splenic macrophages (SM) from red pulp of the diabetic animals, compared to healthy control. When diabetic rats were treated with insulin, SM failed to restore Atg 12 content.

Higher prevalence of infection contributes to an elevated mortality in diabetic patients [21, 22]. Many mechanisms can relate predisposition to infection in diabetes and dysfunction of the innate immunity is considered one of the major explanations [23]. Important for antigen processing, AM are responsible for respiratory infections associated to DMI [11, 24]. Most of the experimental literature has suggested that phagocytosis in macrophages and antigen presentation to T cells is impaired [11, 25]. The autophagy pathway has been less studied in diabetic macrophages. Being important to maintain homeostasis, autophagy pathway imbalance in macrophages has been associated to non-infectious [26, 27] and infectious [5, 28] diseases. Manipulation of defects in autophagic signalling has been shown to attenuate glomerular damage [29] and ameliorate cardiac injury in mice [30]. Since insulin is a modulator of the phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) and mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway [5], DMI is a natural model for autophagy pathway imbalance. Here, with the ALX induced rat model, we studied autophagy markers in different sources of macrophages from a non-infectious perspective.

Previous studies of our group have suggested that using this animal model, AM showed impaired phagocytosis [11] and the treatment with insulin restored their function. Also, some inflammatory parameters such as cytokines expression (IL-6, CINC-1 and CINC-2) were restored by insulin [13]. Since phagocytic pathway also requires LC3 recruitment, we have chosen to study the LC3 expression in these cells. LC3 as shown recently, counteracts in both processes: phagocytosis [31] and autophagy [31, 32]. It has been also demonstrated that LC3 can be recruited to the phagosome, constituted by a single membrane in a process named LC3 associated phagocytosis (LAP) [33]. LAP is a process distinct from autophagy and is always related to pathogen engulfment. During autophagy, a lipidated form of the LC3, required for membrane elongation, is not necessarily dependent on the presence of a pathogen. Autophagy is a continuous process needed for turnover of proteins and organelles [5]. There are many LC3 isoforms and the autophagy hallmark indicator is the lipidated membrane-bound form LC3II [32]. Most of previous studies have used Western blotting to determine levels of LC3II expression. Unfortunately this method is not the best to use, since BAL is constituted by an assortment of cells. Recently, the Autophagy journal has accepted the use of LC3 II as an autophagy marker [34]. Therefore, we used a flow cytometry protocol for autophagy [35] and combined the usage of LC3B with markers for macrophages. Our results showed that LC3 protein is less expressed on AM vesicles from diabetic rats compared to those treated with insulin. Intriguingly, levels of LC3 from diabetic AM were the same as found in control rats. It was not possible to affirm if diabetic AM fail to upregulate autophagy or the absence of insulin and associated hyperglycemia induce AM to protect the host by not enhancing the autophagy as a beneficial adaptive process [30]. When insulin was added to the system, AM started to enhance LC3 content. Despite not having developed functional assays, this result suggested that AM are not impaired, they are able to perform autophagy, but they refrain themselves probably, as inferred previously, to self protecting. A recent published review about autophagy in skeletal muscle suggested that in glycogen storage diseases, the accumulation of autophagosomes along the myofibers indicated a pathologic phenotype [36] and this is in accordance to previous phenomena observed in cardiomyocytes.

Spleen macrophages and cells from white pulp of the diabetic rats showed lower Atg 12 protein expression. When insulin was administrated, these cells did not restore previous levels of Atg 12. It is intriguing because insulin was capable of restoring AM phagocytosis [11]. Why insulin enhanced LC3 levels in AM but not in SM remains unclear. However, if AM have their phagocytic function restored by insulin and are capable of increasing LC3 levels, maybe AM have not impaired function. Up to date, it is not known whether there is a hierarchy relating triggering stimulus and AM response. Also, all macrophages types were not screened and certainly one type of macrophage may suffer from the absence of insulin more than the others. What we would like to highlight here is that there might exist a signaling hierarchy that was not fully understood. During inflammation, in diabetic hosts, when insulin cannot exert its function, some immune cells may have a shut down system to protect the host. However, the protection turns against the organism, if sustained for long

time. Maybe, the inflammatory and infectious signaling cannot overcome the absence of insulin during a certain period. A review by Rabinowitz and White, 2010, mentioned that the energy consumption with autophagy is approximately 1% of the total amount of energy necessary for protein synthesis each hour [37]. Probably, this amount of energy cannot be lost for performing autophagy when there is a lack of insulin, and difficulty in bringing glucose from the outside to the inner part of the cell. Therefore, immune cells may fail to enhance turn over of self-damaged organelles in order to save energy. Low autophagy levels in diabetic AM are in accordance with the concomitant diminished phagocytosis, since phagocytosis and autophagy although different, are related pathways.

Regarding BMM, hyperglycemia and insulin absence acts antagonistically in M1 and M2 macrophages. Pro inflammatory M1 macrophages had their LC3 content decreased in the absence of insulin, while M2 macrophages exhibited higher amount of LC3. M1 and M2 nomenclature was adopted in analogy to Th1 and Th2 T cell responses. As Sica and Mantovani described [38], the better understanding of the polarization M1-M2 provides knowledge for macrophage-centered diagnosis, helping to develop treatment based on innate immunity as a target.

Since autophagy is related to the origin of energy production and expenditure, a better understanding of the whole pathway is required. We strongly believe that discovering an alternative to manipulate the autophagy pathway in favor of diabetic patients, it will be possible to control many of the infections since it might recover phagocytic function although functional assays should be performed in diabetic patients.

Acknowledgments

The authors would like to sincerely thank Irene M. Gouveia, Iger Bodin and Mariana C.F. Silva for their expert technical help. The authors are supported by grant 2010/02272-0 from São Paulo Research Foundation (FAPESP), grant 470523/2013-1 from National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq, Projeto Universal 2013) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo (PRP/USP, Projeto I and Novos Docentes), Brazil. The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

References

- 1 Wolfe RR: Effects of insulin on muscle tissue. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000;3:67-71.
- 2 Zeigerer A, Lampson MA, Karylowski O, Sabatini DD, Adesnik M, Ren M, McGraw TE: GLUT4 retention in adipocytes requires two intracellular insulin-regulated transport steps. *Mol Biol Cell* 2002;13:2421-2435.
- 3 Gonzalez CD, Lee MS, Marchetti P, Pietropaolo M, Towns R, Vaccaro MJ, Watada H, Wiley JW: The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Autophagy* 2011;7:2-11.
- 4 Nixon RA: Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci* 2007;120:4081-4091.
- 5 Levine B, Mizushima N, Virgin HW: Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011;469:323-335.
- 6 Yuk JM, Yoshimori T, Jo EK: Autophagy and bacterial infectious diseases. *Exp Mol Med* 2012;44:99-108.
- 7 American Diabetes association, 2014, last visit june 19 2014, <http://www.diabetes.org/living-with-diabetes/treatment-and-care/medication/other-treatments/flu-and-pneumonia-shots.html>. Last Reviewed: June 7, 2013 Last Edited: April 7, 2014.
- 8 Sugawara I, Mizuno S: Higher susceptibility of type 1 diabetic rats to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 2008;216:363-370.
- 9 Wertman KF, Henney MR: The effects of alloxan diabetes on phagocytosis and susceptibility to infection. *J Immunol* 1962;89:314-317.
- 10 Kane WC: Phagocytosis and Its Relationship to Infection in Diabetes Mellitus. *Diabetes* 1964;13:424.
- 11 Ferracini M, Martins JO, Campos MR, Anger DB, Jancar S: Impaired phagocytosis by alveolar macrophages from diabetic rats is related to the deficient coupling of LTs to the Fc gamma R signaling cascade. *Mol Immunol* 2010;47:1974-1980.

- 12 Mowat A, Baum J: Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1971;284:621-627.
- 13 Sunahara KK, Sannomiya P, Martins JO: Briefs on insulin and innate immune response. *Cell Physiol Biochem* 2012;29:1-8.
- 14 Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V: Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* 2004;119:753-766.
- 15 Bonilla DL, Bhattacharya A, Sha Y, Xu Y, Xiang Q, Kan A, Jagannath C, Komatsu M, Eissa NT: Autophagy regulates phagocytosis by modulating the expression of scavenger receptors. *Immunity* 2013;39:537-547.
- 16 Martins JO, Zanon FL, Martins DO, Coimbra R, Krieger JE, 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* 2009;31:404-409.
- 17 Lari R, Fleetwood AJ, Kitchener PD, Cook AD, Pavasovic D, Hertzog PJ, Hamilton JA: Macrophage lineage phenotypes and osteoclastogenesis—complexity in the control by GM-CSF and TGF-beta. *Bone* 2007;40:323-336.
- 18 Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol* 2007;178:5245-5252.
- 19 Weischenfeldt J, Porse B: Bone Marrow-Derived Macrophages (BMDM): Isolation and Applications. *CSH Protoc* 2008;2008:prot5080.
- 20 Westerberg LS, Dahlberg C, Baptista M, Moran CJ, Detre C, Keszei M, Eston MA, Alt FW, Terhorst C, Notarangelo LD, Snapper SB: Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) and N-WASP are critical for peripheral B-cell development and function. *Blood* 2012;119:3966-3974.
- 21 Roglic G, Unwin N, Bennett PH, Mathers C, Tuomilehto J, Nag S, Connolly V, King H: The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care* 2005;28:2130-2135.
- 22 Samak MJ, Jaber BL: Mortality caused by sepsis in patients with end-stage renal disease compared with the general population. *Kidney Int* 2000;58:1758-1764.
- 23 Lambrecht BN: Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity* 2006;24:366-368.
- 24 Ma H, Liu G, Ding W, Wu Y, Cai L, Zhao Y: Diabetes-induced alteration of F4/80+ macrophages: a study in mice with streptozotocin-induced diabetes for a long term. *J Mol Med* 2008;86:391-400.
- 25 Glass EJ, Stewart J, Weir DM: Altered immune function in alloxan-induced diabetes in mice. *Clin Exp Immunol* 1986;65:614-621.
- 26 Deretic V, Saitoh T, Akira S: Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2013;13:722-737.
- 27 Ryter SW, Cloonan SM, Choi AM: Autophagy: a critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. *Mol Cells* 2013;36:7-16.
- 28 Campbell GR, Spector SA: Vitamin D inhibits human immunodeficiency virus type 1 and *Mycobacterium tuberculosis* infection in macrophages through the induction of autophagy. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002689.
- 29 Fang L, Zhou Y, Cao H, Wen P, Jiang L, He W, Dai C, Yang J: Autophagy attenuates diabetic glomerular damage through protection of hyperglycemia-induced podocyte injury. *PLoS One* 2013;8:e60546.
- 30 Xu X, Kobayashi S, Chen K, Timm D, Volden P, Huang Y, Gulick J, Yue Z, Robbins J, Epstein PN, Liang Q: Diminished autophagy limits cardiac injury in mouse models of type 1 diabetes. *J Biol Chem* 2013;288:18077-18092.
- 31 Lai SC, Devenish RJ: LC3-Associated Phagocytosis (LAP): Connections with Host Autophagy. *Cells* 2012;1:396-408.
- 32 Klionsky et al.: Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012;8:445-544.
- 33 Florey O, Kim SE, Sandoval CP, Haynes CM, Overholtzer M: Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes. *Nat Cell Biol* 2011;13:1335-1343.
- 34 Pei J, Zhao M, Ye Z, Gou H, Wang J, Yi L, Dong X, Liu W, Luo Y, Liao M, Chen J: Autophagy enhances the replication of classical swine fever virus in vitro. *Autophagy* 2014;10:93-110.
- 35 Eng KE, Panas MD, Karlsson Hedestam GB, McInerney GM: A novel quantitative flow cytometry based assay for autophagy. *Autophagy* 2010;6:634-641.
- 36 Neel BA, Lin Y, Pessin JE: Skeletal muscle autophagy: a new metabolic regulator. *Trends Endocrinol Metab* 2013;24:635-643.
- 37 Rabinowitz JD, White E: Autophagy and metabolism. *Science* 2010;330:1344-1348.
- 38 Sica A, Mantovani A: Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012;122:787-795.

10. REFERÊNCIAS

1. Ebato C, Uchida T, Arakawa M, Komatsu M, Ueno T, Komiya K et al. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab*, 2008 Oct.;8(4):325-32.
2. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, 2011 Jan. 20;469(7330):323-35.
3. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, 2013 Sep. 25;13(10):722-37.
4. Nixon RA. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci*, 2007 Dec. 1;120(Pt 23):4081-91. Review.
5. Deretic V. *Autophagy in Immunity and Infection*. 1. ed. Hoboken: Wiley-VCH, 2006.
6. Jung HS, Lee MS. Macroautophagy in homeostasis of pancreatic beta-cell. *Autophagy*, 2009 Feb.;5(2):241-3.
7. 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. Epub 2011 Jul 18. Review.
8. Fujitani Y, Kawamori R, Watada H. The role of autophagy in pancreatic beta-cell and diabetes. *Autophagy*, 2009 Feb.;5(2):280-2.
9. Who. *Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation*. Disponível em: <www.who.int/diabetes/publications/diagnosis_diabetes2006/en/index.html>. Acesso em: 22 jun. 2014.
10. Brasil. Ministério da Saúde. *Diabetes mellitus: cadernos de atenção básica número 16*. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
11. Boyko EJ, Lipsky BA. In: Harris MI, Cowie CC, Stern MS, Boyko EJ, Reiber GE, Bennet PH. *Diabetes in America*. 2. ed. Bethesda: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 1995.
12. Association AD. *Diabetes Statistics*. Disponível em: <www.diabetes.org/diabetes-basics/diabetes-statistics/>. Acesso em: 27 out. 2013.

13. International Diabetes Federation. *Diabetes atlas*. Disponível em <www.idf.org/diabetesatlas/5e/south-and-central-america>. Acesso em: 28 out. 2013.
14. Meijer AJ, Codogno P. Autophagy: a sweet process in diabetes. *Cell Metab*, 2008 Oct.; 8(4):275-6.
15. Meijer AJ, Codogno P. Macroautophagy: protector in the diabetes drama? *Autophagy*, 2007 Sep.-Oct.; 3(5):523-6.
16. Snell-Bergeon JK, West NA, Mayer-Davis EJ, Liese AD, Marcovina SM, D'Agostino RB Jr. et al. Inflammatory markers are increased in youth with type 1 diabetes: the search case-control study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010 Jun.; 95(6):2868-76.
17. Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*, 2009 Feb.;155(2):173-81.
18. Hutchings P, Rosen H, O'Reilly L, Simpson E, Gordon S, Cooke A. Transfer of diabetes in mice prevented by blockade of adhesion-promoting receptor on macrophages. *Nature*, 1990. Dec. 13;348(6302):639-42.
19. Bending D, Zacccone P, Cooke A. Inflammation and type one diabetes. *Int Immunol*, 2012 Jun.;24(6):339-46.
20. Diabetes SB. Infecções no paciente diabético. In: *Diabetes na prática clínica*. Disponível em <www.diabetesebook.org.br/>. Acesso em: 9 out. 2013.
21. Casqueiro J, Casqueiro J, Alves C. Infections in patients with diabetes mellitus. *Indian J Endocrinol Metab*, 2012 Mar.;16 Suppl 1:S27-36.
22. Ferracini M, Martins JO, Campos MR, Anger DB, Jancar S. Impaired phagocytosis by alveolar macrophages from diabetic rats is related to the deficient coupling of LTs to the Fc gamma R signaling cascade. *Mol Immunol*, 2010 Jul.;47(11-12):1974-80.
23. Martins JO, Meyer-Pflug AR, Alba-Loureiro TC, Melbostad H, Costa da Cruz JW, Coimbra R. et al. Modulation of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation: Role of insulin. *Shock*, 2006 Mar.;25(3):260-6.
24. Martins JO, Zanoni FL, Martins DO, Coimbra R, Krieger JE, 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*, 2009 Apr.;31(4):404-9.
25. Martins JO, Ferracini M, Anger DB, Martins DO, Ribeiro LF Jr, Sannomiya P, Jancar S. Signaling pathways and mediators in LPS-induced lung inflammation in diabetic rats: role of insulin. *Shock*, 2010 Jan.;33(1):76-82.

26. Pitocco D, Fuso L, Conte EG, Zaccardi F, Condoluci C, Scavone G. et al. The diabetic lung – a new target organ? *Rev Diabet Stud*, 2012 Spring;9(1):23-35.
27. Martins JO, Campos CA, Cruz JW, Manzolli S, Alves VA, Vianna EO, Jancar S, Sannomiya P. Insulin modulates cytokine release and selectin expression in the early phase of allergic airway inflammation in diabetic rats. *BMC Pulm Med*, 2010 Jul. 28;10:39.
28. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol*, 2009 Apr.;5(4):219-26./ Pietropaolo M, Barinas-Mitchell E, Kuller LH. The heterogeneity of diabetes: unraveling a dispute: is systemic inflammation related to islet autoimmunity? *Diabetes*, 2007 May; 56(5):1189-97.
29. Dandona P, Ghanim H, Green K, Sia CL, Abuaysheh S, Kuhadiya N. et al. Insulin infusion suppresses while glucose infusion induces Toll-like receptors and high-mobility group-B1 protein expression in mononuclear cells of type 1 diabetes patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013 Apr. 15;304(8):e810-8.
30. Gordon CS, Serino AS, Krause MP, Campbell JE, Cafarelli E, Adegoke OA, et al. Impaired growth and force production in skeletal muscles of young partially pancreatectomized rats: a model of adolescent type 1 diabetic myopathy? *Plos One*, 2010 Nov. 17;5(11):e14032.
31. Balage M, Sinaud S, Prod'homme M, Dardevet D, Vary TC, Kimball SR. et al. Amino acids and insulin are both required to regulate assembly of the eIF4E. eIF4G complex in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001 Sep.;281(3):E565-74.
32. Raught B, Gingras AC, Sonenberg N. The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001 Jun. 19;98(13):7037-44.
33. Chong ZZ, Maiese K. Mammalian target of rapamycin signaling in diabetic cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol*, 2012 Jul. 16;11:45.
34. Chong ZZ, Shang YC, Maiese K. Cardiovascular disease and mTOR signaling. *Trends Cardiovasc Med*, 2011 Jul.;21(5):1515.
35. Martinez J, Verbist K, Wang R, Green DR. The relationship between metabolism and the autophagy machinery during the innate immune response. *Cell Metab*, 2013 Jun. 4;17(6):895-900. doi: 10.1016/j.cmet.2013.05.012. Review.
36. Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SW, Moshiah S, Dorsey F, Connell S, Komatsu M, Tanaka K, Cleveland JL, Withoff S, Green DR. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature*. 2007 Dec. 20;450(7173):1253-7.

37. American Diabetes association, 2014, last visit june 19 2014, <http://www.diabetes.org/living-with-diabetes/treatment-and-care/medication/other-treatments/flu-and-pneumonia-shots.html>. Last Reviewed: Jun. 7, 2013 Last Edited: Apr. 7, 2014.
38. Wertman KF, Henney MR. The effects of alloxan diabetes on phagocytes and susceptibility to infection. *J Immunol*. 1962 Sep; 89:314-7.
39. Kane WC. Phagocytosis and Its Relationship to Infection in Diabetes Mellitus Diabetes. 1964 Jul.-Aug.;13:424.
40. Westerberg LS, Dahlberg C, Baptista M, Moran CJ, Detre C, Keszei M, Eston MA, Alt FW, Terhorst C, Notarangelo LD, Snapper SB. Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) and N-WASP are critical for peripheral B-cell development and function. *Blood*, 2012 Apr. 26;119(17):3966-74.
41. Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol*, 2007 Apr. 15;178(8):5245-52.
42. Lenzen S. The mechanisms of alloxan and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 2008 Feb.;51(2):216-26.
43. Lenzen S, Panten U. Alloxan: history and mechanism of action. *Diabetologia*, 1988 Jun.;31(6):337-42.
44. Rohilla A, Ali S. Alloxan induced diabetes: Mechanisms and effects. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2012 Apr.;3(2):819-23.
45. Gaulton GN, Schwartz JL, Eardley DD. Assessment of the diabetogenic drugs alloxan and streptozotocin as models for the study of immune defects in diabetic mice. *Diabetologia*, 1985 Oct.;28(10):769-75.
46. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol*, 1994 May;55(5):662-75.
47. Rehn B, Bruch J, Zou T, Hobusch G. Recovery of rat alveolar macrophages by bronchoalveolar lavage under normal and activated conditions. *Environ Health Perspect*, 1992 Jul.; 97:11-6.
48. Brain JD, Frank R. Alveolar macrophage adhesion: wash electrolyte composition and free cell yield. *J Appl Physiol*, 1973 Jan.;34(1):75-80.
49. Luengo MD. A historical revision of the main immunological events and pharmacology in the search of the understanding and treatment of inflammatory diseases. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 2005;2(2):64-72.

50. Mueller K. Inflammation's yin-yang, introduction. *Science*, 2013 Jan. 11;339(6116):155.
51. Swindell WR, Xing X, Stuart PE, Chen CS, Aphale A, Nair RP. et al. Heterogeneity of inflammatory and cytokine networks in chronic plaque psoriasis. *Plos One*, 2012;7(3):e 34594.
52. Liddiard K, Rosas M, Davies LC, Jones SA, Taylor PR. Macrophage heterogeneity and acute inflammation. *Eur J Immunol*, 2011 Sep.;41(9):2503-8.
53. Amano H, Oishi K, Sonoda F, Senba M, Wada A, Nakagawa H. et al. Role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2 (CINC-2) alpha in a rat model of chronic bronchopulmonary infections with *Pseudomonas aeruginosa*. *Cytokine*, 2000 Nov.;12(11):1662-8.
54. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*, 2003 Feb.;73(2):209-12.
55. Pieters J. MHC II class restricted antigen processing and presentation. *Adv Immunol*, 2000;75:159-208.
56. Mantegazza AR, Magalhaes JG, Amigorena S, Marks MS. Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic*, 2013 Feb.;14(2):135-52.
57. Münz C. Antigen processing for MHC class II presentation via autophagy. *Front Immunol*, 2012;3:9.
58. Strawbridge AB, Blum JS. Autophagy in MHC class II antigen processing. *Curr Opin Immunol*, 2007 Feb.;19(1):87-92.
59. Wacker HH, Radzun HJ, Parwaresch MR. KiM2R, a new specific monoclonal antibody, discriminates tissue macrophages from reticulum cells and monocytes in vivo and in vitro. *J Leukoc Biol*, 1985 Oct.;38(4):509-20.
60. Jahnke T, Karbe U, Schäfer FK, Bolte H, Heuer G, Rector L. et al. Characterization of a new double-injury restenosis model in the rat aorta. *J Endovasc Ther*, 2005 Jun.;12(3).
61. Bourghardt Peebo B, Fagerholm P, Traneus-Röckert C, Lagali N. Time-lapse in vivo imaging of corneal angiogenesis: the role of inflammatory cells in capillary sprouting. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011 May 10;52(6):3060-8.
62. Patel H, Chen J, Das KC, Kavdia M. Hyperglycemia induces differential change in oxidative stress at gene expression and functional levels in HUVEC and HMVEC. *Cardiovasc Diabetol*, 2013 Oct. 5;12(1):142.
63. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*, 2010 Oct. 29;107(9):1058-70.

64. McCowen KC, Malhotra A, Bistrian BR. Stress-induced hyperglycemia. *Crit Care Clin*, 2001 Jan.;17(1).
65. Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol*, 2007 Apr. 15;178(8):5245-52.
66. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 2012 Apr.;8(4):445-544.
67. Kumar R, Kumari A, Singh JK, Nath A, Sinha S, Kumar A. Protective effect of zingiber officinale on spleen of diabetic guinea pig. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, 2013 Mar.;2(3):32-7.
68. Lee MG, Choi YH, Lee I. Effects of diabetes mellitus induced by alloxan on the pharmacokinetics of metformin in rats: restoration of pharmacokinetic parameters to the control state by insulin treatment. *J Pharm Pharm Sci*, 2008;11(1):88-103.
69. Shi WY, Xiao D, Wang L, Dong LH, Yan ZX, Shen ZX, et al. Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy. *Cell Death Dis*, 2012 Mar. 1;3:e275.
70. Iglesias D, Yates MS, van der Hoeven D, Rodkey TL, Zhang Q, Co N. et al. Another surprise from metformin: novel mechanism of action via K-Ras influences endometrial cancer response to therapy. *Mol Cancer Ther*, 2013 Sep. 27.
71. Moon RJ, Bascombe LA, Holt RI. The addition of metformin in type 1 diabetes improves insulin sensitivity, diabetic control, body composition and patient well-being. *Diabetes Obes Metab*, 2007 Jan.;9(1):143-5.
72. Pitocco D, Zaccardi F, Tarzia P, Milo M, Scavone G, Rizzo P, Pagliaccia F, Nerla R, Di Franco A, Manto A, Rocca B, Lanza GA, Crea F, Ghirlanda G. Metformin improves endothelial function in type 1 diabetic subjects: a pilot, placebo-controlled randomized study. *Diabetes Obes Metab*, 2013 May;15(5):427-31.
73. Giampietro O, Giampietro C, Bartola LD, Masoni MC, Matteucci E. Sitagliptin as add-on therapy in insulin deficiency: biomarkers of therapeutic efficacy respond differently in type 1 and type 2 diabetes. *Drug Des Devel Ther*, 2013;7:99-104.