UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Estudo da sepse experimental em animais diabéticos e
sadios, tratados ou não com insulina

Eduardo Lima Nolasco

Dissertação para obtenção do grau de Mestre
em Farmácia

Orientador:

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

SÃO PAULO
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Estudo da sepse experimental em animais diabéticos e
sadios, tratados ou não com insulina**

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Eduardo Lima Nolasco

Dissertação para obtenção do grau de Mestre
em Farmácia

Orientador:

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

SÃO PAULO
2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

N789e Nolasco, Eduardo Lima
Estudo da sepse experimental em animais diabéticos e sadios,
tratados ou não com insulina / Eduardo Lima Nolasco. -- São
Paulo, 2013.
94p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Martins, Joilson de Oliveira

1. Diabetes 2. Insulina : Bioquímica animal 3. Sepses I. T. II.
Martins, Joilson de Oliveira, orientador.

616.462 CDD

Eduardo Lima Nolasco

Estudo da sepse experimental em animais diabéticos e sadios
tratados ou não com insulina

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Orientador/presidente

Prof. Dr. Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes

Profª Drª Eliana Hiromi Akamine

São Paulo, 04 de março de 2013.

DEDICATÓRIA

*Dedico o presente trabalho à minha **Mãe** e a minha **Vó Luzia**
pelo eterno apoio em tudo que eu faço; à **família**
Imunoendocrinologia pois sem eles nada disso seria possível;
e à **Minha Linda** que mesmo de longe sempre esteve tão perto*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço imensamente à professora Kioko Takei, que foi a primeira a me sugerir a idéia de ir pra São Paulo e me indicou ao meu orientador Joilson. Em segundo lugar agradeço ao professor Joilson, por ter me aceitado com seu aluno e por ter aberto as portas do seu laboratório pra mim sem me conhecer. Agradeço também pela orientação no desenvolvimento dessa dissertação e, além disso, agradeço pelos conselhos e pelas sugestões que sempre foram as certas no momento certo.

Agradeço muito a todos que ajudaram no desenvolvimento desse projeto, a todas as meninas do laboratório. À Mariana, Natália, Luisinha, Sabrina e Lorraine, sem elas nada disso seria possível.

Agradeço especialmente à Fernanda e ao Fernando que me auxiliaram e fizeram uma parte grande desse projeto de pesquisa, sem esses dois, não tenho a menor dúvida que nada disso sairia do papel. A vocês dois, meus sinceros MUITO OBRIGADO!!

À minha pequena família, que com grandes gestos me ajudam sempre e me apóiam em todas as minhas decisões.

Ao Meu Amor, á Minha Linda, À Minha Lindona, que mesmo longe sempre estará perto de mim, me apoiando, me ajudando....OBRIGADO POR TER CRUZADO SEU CAMINHO COM O MEU!!

Agradeço também especialmente às agências de fomento como a CNPq, FAPESP, CAPES e PROEX por darem o apoio necessário à realização desse projeto. Além disso, agradeço imensamente a todos os docentes que participaram na minha formação na graduação e na pós-graduação. Professores como Whotam e Rosa que auxiliaram na qualificação e aos professores Pedro e Eliana que participaram da banca final de defesa.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Jovem Pesquisador 2010/02272-0

NOLASCO, E. L. **Estudo da sepse experimental em animais diabéticos e sadios, tratados ou não com insulina.** 2013. 94 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

RESUMO

Sepse e choque séptico são causas frequentes de morte nas unidades de terapia intensiva, sendo responsável pelo alto custo global de internação, segundo DATA-SUS. Sabendo-se que o paciente diabético apresenta um maior risco de infecção e que 22% dos indivíduos com sepse apresentam diabetes, é de extrema importância o melhor entendimento da sua fisiopatologia no paciente diabético para que medidas intervencionistas sejam desenvolvidas, preservando vidas. O projeto buscou avaliar a sepse experimentalmente através do modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP – 2 perfurações) em ratos Wistar machos sadios e tornados diabéticos através da injeção endovenosa de aloxana (42 mg/kg, i.v., 10 dias). Além disso, buscamos avaliar se o tratamento com insulina alteraria as variáveis escolhidas. O trabalho avaliou parâmetros hematológicos e bioquímicos como uréia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FAL). Após 6 horas da realização da CLP foram coletados lavados broncoalveolares (LBA) e peritoneal (LPe) com o objetivo de estudar o perfil de citocinas através da dosagem das interleucinas (IL)-1 β , IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral (TNF)- α e *cytokine-induced neutrophil chemoattractant* (CINC)-1 e CINC-2, celularidade total e específica. Rim, pulmão e fígado foram coletados para análises morfológicas e da atividade da mieloperoxidase (MPO). Após 6 horas de CLP observamos que a hematimetria, hemoglobina, plaquetometria e celularidade do LBA não sofreram alterações nem após o tratamento com insulina. A sepse provocou diminuição da leucometria total nos animais diabéticos e controles, aumento da celularidade total do LPe com um predomínio de polimorfonucleares, que foi semelhante em ambos os grupos; aumento da concentração no LPe de IL-1 β , IL-6, CINC-1, CINC-2 e IL-10; as concentrações do TNF- α permaneceram idênticas em ambos os grupos. Em relação aos marcadores hepáticos, foram observados que os animais diabéticos possuem os maiores valores de ALT, AST e FAL em relação ao grupo controle e já apresentavam uma disfunção morfológica de hepatócitos, porém, sem infiltrado neutrofílico. O tratamento com insulina reduziu os valores dessas enzimas em níveis próximos aos do controle. Dos marcadores renais, apenas a uréia sofreu aumento significativo nos animais diabéticos em relação aos controles, sendo exacerbada pela CLP. Alterações glomerulares, como capilares dilatados e redução do espaço de Bowman foram observadas nos animais com sepse, os quais não sofreram influência após o tratamento com insulina. Estes dados sugerem que a insulina teve um efeito hepatoprotetor e que o padrão causado pela sepse nos animais controles e diabéticos não foi modificado pelo tratamento com insulina.

Palavras-chave: Diabetes, sepse, insulina, inflamação, CLP.

NOLASCO, E. L. **Study of experimental sepsis in diabetic and healthy rats, treated or not with insulin.** 2013. 94 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ABSTRACT

Sepsis and septic shock are common cause of death in intensive care units (ICU) and according to Brazilian DATA-SUS is one of the major causes of high cost hospitalization. Since diabetic patients have a higher risk of infection and represent approximately 22% of all the septic individuals, it is extremely important to understand the pathophysiology of sepsis in diabetic patients in order to develop interventional measure. The objective of this study is to evaluate the experimental sepsis model by cecal ligation and puncture (CLP – 2 punctures) in Wistar healthy males rendered diabetic by intravenous injection of alloxan (42 mg/kg, i.v., 10 days). The study analyzed hematological and biochemical parameters such as urea, creatinine, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP). Furthermore, we studied how insulin treatment could modulate these parameters. After 6 hours of CLP bronchoalveolar (BAL) and peritoneal lavages (PeL) were collected and a cytokine profile was accessed: interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- α , cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1, CINC-2. Samples from kidney, lung and liver were collected for morphological analysis and for the measurement of myeloperoxidase activity (MPO). After 6 hours of CLP, red blood cell count, hemoglobin, platelet count, cytokine profile and cellularity of the BAL did not change. In addition, insulin treatment did not change these parameters. CLP caused a decrease in total leukocyte count in both groups diabetic and control rats. Moreover, this model induced a rise in total PeL cellularity with a predominance of polymorfonuclear cells, which was similar in both groups control and diabetic rats. In the PeL, proinflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, CINC-1, CINC-2 and the antiinflammatory cytokine IL-10 were enhanced. The TNF- α concentrations remained similar in both groups. Hepatic markers inferring in hepatocyte dysfunction were higher in the diabetes-induced animals what was in part restored after insulin administration. Regarding renal markers, only urea levels were enhanced in diabetic rats and worsened after CLP induction. Morphological changes, such as capillary dilatation and reduced Bowman space was already observed in the kidney of animals with sepsis, insulin treatment did not corrected the values. These data suggest that insulin had a hepato-protective effect but further changes were not observed after insulin treatment.

Keywords: Diabetes, sepsis, insulin, inflammation, CLP.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	<i>American Diabetes Association</i>
ALT	Alanina Aminotransferase
AKI	<i>Acute Kidney Injury</i> (Lesão Aguda Renal)
ALI	<i>Acute Lung Injury</i> (Lesão Aguda Pulmonar)
AP	<i>Activator Protein</i> (Proteína ativadora)
AST	Aspartato Aminotransferase
BPM	Batimentos por minuto
CARS	<i>Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome</i> (Síndrome da Resposta Anti-inflamatória Compensatória)
CCL2	<i>Chemokine c-c Motif Ligand-2</i> (C-C quimiocina ligante 2)
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Grupo de diferenciação)
CLP	<i>Cecal Ligation and Puncture</i> (Ligadura e perfuração do Ceco)
COX	Cicloxigenase
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FAL	Fosfatase Alcalina
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
GLUT	<i>Glucose Transporter</i> (Transportador de Glicose)
ICAM	<i>Intracellular Adhesion Molecule</i> (Molécula de Adesão Intracelular)
IFN	<i>Interferon</i>
IL	<i>Interleukin</i> (Interleucina)
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> (Óxido Nítrico Sintetase Induzível)
IRF	<i>Interferon Regulatory Factors</i> (Fator Regulador de Interferon)
LBP	<i>Lipopolysaccharide-Binding Protein</i> (Proteína ligante de LPS)
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i> (Lipopolisacarídeo)
LTA	<i>Lipoteichoic Acid</i> (Ácido Lipoteicoico)
MA	Macrófagos Alveolares
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i> (Proteína Quimiotática de Monócito 1)
MHC-II	<i>Major Histocompatibility Complex Class II</i> (Complexo de Histocompatibilidade da Classe 2)

MODS	<i>Multiple Organs Dysfunction Syndrome</i> (Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos)
MyD88	<i>Myeloid Differentiation factor 88</i> (Fator de Diferenciação Mielóide 88)
MPO	Mieloperoxidase
NAFLD	<i>Nonalcoholic Fatty Liver Disease</i> (Esteatose Hepática Não-Alcoólica)
NF-κB	<i>Nuclear Factor-kappa B</i> (Fator de Transcrição Nuclear kappa B)
NO	<i>Nitric Oxide</i> (Óxido Nítrico)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	<i>Platelet Activator Factor</i> (Fator Ativador de Plaquetas)
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor type 1</i> (Inibidor do Ativador de Plasminogênio 1)
PAM	Pressão Arterial Média
PAMP	<i>Pathogens Associated Molecular Pattern</i> (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)
PaO ₂	Pressão Parcial de Oxigênio
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PcR	Proteína-C reativa
PMN	Polimorfonucleares
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i> (Receptores que reconhecem padrões)
RNI	Relação Normalizada Internacional
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica)
SREBP-1	<i>Sterol Response Element-Binding Protein-1c</i> (Proteína Ligadora do Elemento Regulado por Esteróis-1c)
TIR	<i>Toll interleukin-1 receptor</i> (Receptor <i>Toll</i> -IL-1)
TLR	Toll-Like Receptors (Receptores do tipo <i>Toll</i>)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)

TRAM	<i>TRIF-Related Adapter Molecule</i> (Molécula Adaptadora Relacionada ao <i>Trif</i>)
TRIF	<i>Toll interleukin-1 Receptor Domain-Containing Adapter Inducing IFN</i> (Adaptador Contendo o Domínio TIR induzindo <i>Interferon</i>)
TTP	Tempo de Tromboplastina Parcial
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estimulação da resposta inflamatória sistêmica I	25
Figura 2. Estimulação da resposta inflamatória sistêmica II	26
Figura 3. Ativação do TLR via LPS	28
Figura 4. Distribuição dos animais controle, segundo leucometria total após 6 horas do procedimento cirúrgico	53
Figura 5. Distribuição dos animais diabéticos, segundo leucometria total após 6 horas do procedimento cirúrgico	54
Figura 6. Perfil da citocina IL-1 β no Lavado Peritoneal	56
Figura 7. Perfil da citocina IL-6 no Lavado Peritoneal	57
Figura 8. Perfil da citocina TNF- α no Lavado Peritoneal	58
Figura 9. Perfil da citocina CINC-1 no Lavado Peritoneal	59
Figura 10. Perfil da citocina CINC-2 no Lavado Peritoneal	60
Figura 11. Perfil da citocina IL-10 no Lavado Peritoneal	60
Figura 12. Distribuição dos animais controle e diabéticos, segundo citometria total no Lavado Broncoalveolar após 6 horas do procedimento cirúrgico	61
Figura 13. Fotomicrografia do tecido pulmonar de animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais	62

Figura 14.	Distribuição dos animais controle e diabéticos, segundo valores da alanina aminotransferase no soro após 6 horas do procedimento cirúrgico	65
Figura 15.	Distribuição dos animais controle e diabéticos, segundo valores da aspartato aminotransferase no soro após 6 horas do procedimento cirúrgico	66
Figura 16.	Distribuição dos animais controle e diabéticos, segundo valores da fosfatase alcalina no soro após 6 horas do procedimento cirúrgico	67
Figura 17.	Fotomicrografia do tecido hepático de animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais	68
Figura 18.	Distribuição dos animais controle e diabéticos, segundo valores de uréia no soro após 6 horas do procedimento cirúrgico	69
Figura 19.	Fotomicrografia do tecido renal de animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais	70

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Critérios de diagnóstico da Seps	21
Tabela 2. Outros tipos específicos de <i>Diabetes mellitus</i>	31
Tabela 3. Delineamento experimental	43
Tabela 4. Distribuição dos ratos controles e diabéticos, segundo variação de peso e glicemia	50
Tabela 5. Distribuição de ratos controles e diabéticos, segundo a variação da glicose antes e após o procedimento cirúrgico	51
Tabela 6. Distribuição dos ratos controles e diabéticos, segundo parâmetros hematológicos	54
Tabela 7. Distribuição dos ratos controles e diabéticos, segundo citometria total e específica do Lavado Peritoneal	55
Tabela 8. Distribuição de ratos controles e diabéticos, segundo perfil de citocinas no Lavado Broncoalveolar	63
Tabela 9. Distribuição de ratos controles e diabéticos, segundo perfil de citocinas no Lavado Broncoalveolar	64

SUMÁRIO

	Pág
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 <i>Sepse: Definições, aspectos patofisiológicos e epidemiológicos</i>	19
1.2 <i>Diabetes mellitus, seps e insulina</i>	29
2 OBJETIVOS	38
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	39
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 <i>Animais</i>	41
3.2 <i>Indução do Diabetes Mellitus</i>	41
3.3 <i>Tratamento com Insulina</i>	42
3.4 <i>Modelo de ligadura e perfuração do ceco de seps e</i>	42
3.5 <i>Delineamento Experimental</i>	42
3.6 <i>Protocolo Experimental</i>	43
3.7 <i>Monitoramento da seps e</i>	44
3.8 <i>Determinação do número de células do Lavado Broncoalveolar e Peritoneal</i>	44
3.9 <i>Quantificação de citocinas e quimiocinas</i>	45
3.10 <i>Obtenção dos cortes de tecido pulmonar, renal e hepático</i>	46
3.11 <i>Análise histológica</i>	46
3.12 <i>Dosagem das concentrações de Mieloperoxidase em tecidos pulmonar, hepático e renal</i>	47
3.13 <i>Análise estatística</i>	48
4 RESULTADOS	49

4.1	<i>Caracterização das amostras quanto ao peso e variação da glicemia</i>	50
4.2	<i>Avaliação dos parâmetros hematológicos em animais diabéticos e controle</i>	52
4.3	<i>Avaliação da sepse e do diabetes na inflamação do peritônio</i>	55
4.4	<i>Efeitos de um modelo de ligadura e perfuração do ceco e do diabetes no pulmão</i>	61
4.5	<i>Efeitos de um modelo de ligadura e perfuração do ceco e do diabetes no rim e no fígado</i>	65
5	DISCUSSÃO	72
6	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	82
	ANEXO I – Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	91

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Sepse e choque séptico constituem causa frequente de morte nas unidades de terapia intensiva (UTI) afetando, particularmente, pacientes idosos, diabéticos, imunocomprometidos e gravemente enfermos (MOUTZOURI et al., 2008; SHAH; HUX, 2003). A sepsé é definida como uma síndrome clínica resultante da resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro devido a uma infecção, apresentando-se em graus variados de gravidade. O desfecho mais grave do paciente que desenvolve essa síndrome é o choque séptico e a falência de múltiplos órgãos e funções (LEVY et al., 2003; HOTCHKISS; KARL, 2003).

Dentro do perfil de pacientes que evoluem para sepsé, os diabéticos tem sido objetivo de vários estudos devido à maior susceptibilidade às infecções. Pesquisas em seres humanos demonstraram que o *diabetes mellitus* (DM) provoca disfunção imune, baixa secreção de citocinas próinflamatórias e da quimiocina interleucina (IL)-8, diminuindo a resistência às infecções (GEERLINGS; HOEPELMAN, 1999; GEERLINGS et al., 2000).

Uma das possibilidades para explicar esta maior susceptibilidade foi sugerida pelos trabalhos experimentais de PEREIRA e colaboradores (1987). Esses autores demonstraram que o infiltrado de neutrófilos na cavidade pleural inflamada encontra-se reduzido em ratos diabéticos comparado com animais sadios. Essa redução na migração de neutrófilos é acompanhada por uma menor liberação/produção e transcrição gênica das citocinas IL-1, fator de necrose tumoral (TNF)- α e IL-10 (De OLIVEIRA MARTINS et al., 2006; MARTINS et al., 2009). Assim, a insulina pode atuar direta ou indiretamente na regulação do comportamento dos leucócitos na inflamação, ao restaurar, no animal diabético, um perfil imunológico semelhante aos controles não diabéticos (ALBA-LOUREIRO et al., 2007; SUNAHARA; SANNOMIYA; MARTINS, 2012).

Além do aspecto imunomodulatório apresentado em modelos experimentais, a insulinoterapia foi indicada como uma das medidas para o tratamento de pacientes em estado crítico, baseado em estudos clínicos

(ANGUS; ABRAHAM, 2005). Até 2001, a hiperglicemia em pacientes não diabéticos era pouco avaliada nas UTI (MEYFROIDT; INGELS; VAN den BERGHE, 2011). A partir de um estudo envolvendo pacientes pós-cirúrgicos de uma UTI, os efeitos benéficos da manutenção da normoglicemia entre 80 – 110 mg/dL através do uso da insulina em comparação com pacientes hiperglicêmicos (glicemia > 200 mg/dL) passaram a ser analisados (VAN den BERGHE et al., 2001; MEYFROIDT; INGELS; VAN den BERGHE, 2011). Tradicionalmente, antes desse estudo, a insulina só era administrada quando os níveis glicêmicos excedessem 200 mg/dL, baseado no conceito de que discretos aumentos não eram tão deletérios e o rígido controle poderia levar a uma hipoglicemia (ANGUS; ABRAHAM, 2005).

No entanto, outro estudo concluiu que a normoglicemia *per se* não necessariamente beneficia pacientes em estado grave e ainda pode ter um efeito danoso. A manutenção da glicose sérica em valores menores que 180 mg/dL resultaram em uma menor mortalidade quando comparados com uma glicemia entre 81 e 108 mg/dL (THE NICE-SUGAR STUDY INVESTIGATORS, 2009). Além disso, outros estudos estabeleceram que os benefícios da insulinoterapia são inconsistentes e podem aumentar o risco de episódios hipoglicêmicos (VAN den BERGHE et al, 2006; INZUCCHI; SIEGEL, 2009).

1.1 Sepse: Definições, aspectos patofisiológicos e epidemiológicos

A sepse representa uma intensa resposta sistêmica com múltiplas anormalidades fisiológicas e imunológicas (MOHR et al., 2012) e em virtude disso ainda permanece como um grande desafio terapêutico. Devido a esse perfil heterogêneo do paciente séptico, uma enorme quantidade de recursos é investida no desenvolvimento e avaliação de métodos de diagnóstico precoce, tratamentos eficazes (ANGUS *et al.*, 2001) e medidas de controle da sua disseminação (MOHR et al., 2012). Além desse aspecto, os mecanismos que provocam a Síndrome da

Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), sepse, choque séptico e falência múltipla de órgãos, ainda necessitam de muitos esclarecimentos devido a um perfil terapêutico e clínico muito complexo (COELHO; MARTINS, 2012). Muito ainda necessita ser elucidado para entender a progressividade dessa complexa alteração do sistema imunológico e inflamatório (HOESEL; GAO; WARD, 2006).

A sepse pode ser definida como a SIRS decorrente de uma infecção documentada, apresentada em estágios de gravidade variados, que pode culminar com o choque séptico e a falência de múltiplos órgãos e funções (LEVY et al., 2003; HOTCHKISS; KARL, 2003). As manifestações clínicas e os critérios para diagnóstico estão representados na Tabela 1.

A sepse grave ocorre quando pelo menos um órgão falha ou apresenta alguma disfunção (RICE; BERNARD, 2005). Essas condições associada à hipotensão sistólica (pressão arterial menor que 90mmHg), mesmo após reposição volêmica e com o uso de fármacos vasoativos, caracteriza-se um choque séptico (KOURY; LACERDA; NETO, 2007). Esta situação culminará com a Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (MODS) (ENDO et al., 2008), que é a principal causa de morte nas UTI, principalmente, em pacientes sépticos (KOURY; LACERDA; NETO, 2007).

Estudos demonstraram que a mortalidade aumenta na escala de gravidade da síndrome quando se tem SIRS (7%), sepse (16%), sepse grave (20%) e choque séptico (46%). Isso demonstra o quanto é importante determinar precocemente o estado clínico em que o paciente se encontra para que o tratamento apropriado seja iniciado imediatamente (ENDO et al., 2008). Outros estudos epidemiológicos e evidências clínicas demonstram que pacientes diagnosticados com sepse possuem índice de mortalidade de aproximadamente 35% e, quando associado com doenças em estadiamento avançado ou choque séptico, esse valor se eleva para mais de 60% (COHEN, 2009). A incidência de infecção generalizada tem aumentado devido à maior expectativa de vida da população, o aparecimento de um maior número de usuários de imunossupressores, o

aumento dos procedimentos invasivos e o crescimento da resistência microbiana (RICE; BERNARD, 2005).

Tabela 1. Critérios de diagnóstico da Sepse após infecção documentada ou suspeitada

- Variáveis gerais:	
• Febre (temperatura central > 38,3°C)	
• Hipotermia (temperatura central < 36°C)	
• Frequência cardíaca > 90 bpm ou mais de 2 Desvios-padrões (DP) acima do valor normal	
• Taquipnéia	
• Alterações sensoriais	
• Edema significativo ou balanço hídrico positivo	
• Hiperglicemia na ausência de diabetes	
- Variáveis inflamatórias:	
• Leucocitose: contagem de leucócitos totais > 12.000 células/mm ³ sangue	
• Leucopenia: contagem de leucócitos totais < 4.000 células/mm ³ sangue	
• Contagem de leucócitos normais com mais de 10% de células imaturas	
• Proteína C reativa no plasma > 2DP acima dos valores normais	
• Procalcitonina plasmática > 2DP acima dos valores normais	
- Variáveis hemodinâmicas:	
• Hipotensão arterial (PAS < 90 mmHg, PAM < 70 mmHg, ou redução da PAS > 40 mmHg em adolescentes, ou PAS/PAM < 2 DP abaixo do normal para idade)	
• Saturação de oxigênio venoso misto > 70% (não válido para crianças)	
• Índice cardíaco > 3,5 l/min (não válido para crianças)	
- Variáveis de disfunção de órgãos:	
• Hipoxemia arterial (PaO ₂ / Fi O ₂ < 300 sem pneumonia)	
• Oligúria aguda (diurese < 0,5 ml/kg hora)	
• Creatinina com aumento > 0,5 mg/dl	
• Alterações de coagulação (RNI > 1,5 ou TTP > 60s)	
• Íleo (ausência de ruídos hidroaéreos)	
• Trombocitopenia (contagem de plaquetas < 100.000/mm ³ sangue)	
• Hiperbilirrubinemia (bilirrubina total > 4mg/dL)	
- Variáveis de perfusão tecidual:	
• Hiperlactatemia (> 1mmol/L)	
• Enchimento capilar ou moteamento	

BPM: Batimentos por minuto; DP: Desvio padrão; PAS: Pressão arterial sistólica; PAM: Pressão arterial média; PaO₂: Pressão parcial de oxigênio; FiO₂: Fração inspirada de oxigênio; RNI: Razão Normalizada Internacional; TTP: Tempo de tromboplastina parcial

Fonte: LEVY, M., 2003

No Brasil, segundo Silva e colaboradores (2004), dados sobre a incidência e o desenvolvimento da síndrome séptica são insuficientes,

uma vez que os registros locais de saúde identificam a sepse apenas no diagnóstico de admissão, omitindo-se de diagnosticar aqueles pacientes que a desenvolveram durante o período de internação. O Estudo Bases - Estudo Brasileiro de Epidemiologia da Sepse - realizado em cinco UTI encontrou uma incidência de sepse e sepse grave de 61,4 e 35,6 por 1000 pacientes-dia, respectivamente e taxas de mortalidade de 24,3% para pacientes com SIRS, 34,7% para sepse, 47,3% para sepse grave e 52,2% para os que desenvolvem choque séptico (SILVA et al., 2004).

Nos Estados Unidos, um estudo semelhante estimou um número de 750.000 casos por ano, o que representa cerca de três casos a cada 1.000 indivíduos (ENDO et al., 2008). Por essas razões, medidas para reduzir a prevalência de sepse e a mortalidade causada por essa síndrome deveriam se tornar medidas de saúde pública.

A resposta sistêmica a uma infecção é acompanhada por uma fase inicial de maciça liberação de mediadores proinflamatórios seguida de uma Síndrome da Resposta Anti-inflamatória Compensatória (CARS) ou imunoparalisia, que foi teorizada como uma resposta adaptativa devido ao excesso de citocinas proinflamatórias (LEWIS, et al., 2012).

A relevância clínica da CARS é evidenciada pela frequente ocorrência de infecções com patógenos que apresentam multirresistência aos fármacos antibióticos. Além disso, incapacitam vários aspectos da resposta imune do hospedeiro ao induzirem uma depleção apoptótica das células efectoras do sistema imune, suprimem a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade da classe 2 (MHC II), aumentam a expressão de moléculas coestimulatórias negativas, elevam os níveis de citocinas anti-inflamatórias e provocam o aumento dos níveis de células T regulatórias (HOTCHKISS; OPAL, 2010).

O balanço apropriado que ocorre na maioria das vezes em que os mecanismos de defesa são acionados é perdido durante a sepse, culminando com uma incontrolável reação proinflamatória que pode resultar na disfunção de órgãos bem como em uma resposta anti-inflamatória que irá comprometer o sistema imune permitindo, assim, infecções secundárias (MOHR, et al., 2012; LEWIS, et al., 2012).

As bactérias são as principais causadoras da sepse, respondendo por 90% dos casos, sendo que as gram-positivas e gram-negativas apresentam frequências semelhantes (BAPTISTE, 2007).

O mecanismo da patogênese da sepse envolve a iniciação de intrincadas reações estimuladas pelos patógenos microbianos (BAPTISTE, 2007). A análise da estrutura bacteriana responsável pelo início do processo séptico é de extrema importância, não só para compreender os mecanismos, mas também para determinar possíveis alvos terapêuticos (COHEN, 2002).

Existem pelo menos dois mecanismos que contribuem para o colapso hemodinâmico no paciente séptico. As reações extrínsecas, causadas por toxinas, lipopolissacarídeo (LPS) e partículas proteicas de bactérias gram-positivas e as reações intrínsecas ou endógenas que ocorrem por estimulação de mediadores inflamatórios liberados pelo próprio hospedeiro (BAPTISTE, 2007).

Na maioria dos casos de sepse por bactérias gram-negativas, os agentes causais são enterobactérias como a *Escherichia coli*, e espécies de *Klebsiella sp.* e são responsáveis por reações extrínsecas que ocorrem, usualmente, no pulmão, trato gastrintestinal, urinário, e corrente sanguínea (BOCHUD; GLAUSER; CALANDRA, 2001).

Nas bactérias gram-negativas, o LPS exerce um papel preponderante na ativação e amplificação da resposta inflamatória (MUNFORD, 2006) ao se ligar à glicoproteína de membrana CD14 e iniciar a ativação de uma cascata de sinalização celular pela fosforilação de diversos elementos (BAPTISTE, 2007; COHEN, 2002).

Resumidamente, o LPS liga-se a uma proteína de fase aguda, denominada proteína de ligação ao LPS (LBP) formando um complexo 1.000 vezes mais ativo que o LPS livre (MATHISON et al., 1992). Este complexo, por sua vez, liga-se ao CD14, expressa por macrófagos e outras células monocíticas (WRIGHT et al., 1990; TOBIAS et al., 1993). A ativação da célula é resultado da transferência do sinal do LPS dos receptores CD14 para estruturas denominadas *Toll-like Receptors* (TLR), receptores de reconhecimento de padrão (PRR) que identificam padrões

moleculares associados aos patógenos (PAMPs) (COHEN, 2002; ZANONI, et al., 2011).

Aparentemente, existem duas teorias que explicam a estimulação da resposta sistêmica pelas bactérias. A primeira possui duas hipóteses, uma postula que o microrganismo atravessa um tecido normal ou lesado e atinge a corrente sanguínea. Em resposta ao LPS e outros antígenos, leucócitos e células endoteliais liberam mediadores que são os elementos responsáveis pelos efeitos observados em pacientes com septicemia, como febre, coagulação intravascular, depressão miocárdica e hipotensão (HOTCHKISS & KARL, 2003). Estes mediadores incluem, por exemplo, TNF- α , fator ativador de plaquetas (PAF), IL-1 e IL-6, óxido nítrico (NO) e metabólitos do ácido araquidônico (BEUTLER, 2002). A sepse associa-se a SIRS, sendo que a resposta clínica de cada paciente dependerá da eficácia do sistema imunológico e da intensidade SIRS.

Em alguns casos pode ocorrer pequena reação inflamatória local, mas a consequência será encontrada nos vasos e órgãos distantes (Figura 1A) (MUNFORD, 2006). A segunda hipótese diz que as bactérias invadem uma superfície epitelial e entram no espaço subepitelial onde estimulam a resposta inflamatória e normalmente são contidas sem atingir a corrente sanguínea (Figura 1B). A disfunção de órgãos e o choque são causados por desregulação neuroendócrina e liberação de mediadores no sangue, pelo tecido infectado. A falha no mecanismo de inflamação permite que a bactéria posteriormente atinja a circulação (MUNFORD, 2006).

As duas hipóteses concordam que a primeira linha de defesa, quando a bactéria cruza a barreira epitelial, é a resposta inflamatória localizada. No entanto, as teorias divergem ao comparar a maneira como ocorre a resposta sistêmica. A primeira idéia teoriza que a resposta inflamatória local pode se estender do tecido para a corrente sanguínea e se espalhar pelo organismo. No entanto, essa hipótese sugere que o grau da inflamação sistêmica é uma resposta frequente de uma infecção local e que as reações intravasculares devido às bactérias circulantes e/ou endotoxina principiam às disfunções dos órgãos e o choque. Nessa visão,

mediadores da inflamação estimulam os mediadores anti-inflamatórios tanto no local da infecção como no sangue o que ajudaria a estabelecer a homeostase, lembrando que a alteração dessa homeostase vascular é o que provoca a ativação do complemento, coagulação, adesão leucocitária e outros processos vasculares, tão comuns no paciente séptico (MUNFORD, 2006; BAPTISTE, 2007).

Figura 1. (a) bactéria invade através de um epitélio normal ou danificado chegando à corrente sanguínea estimulando a produção de mediadores inflamatórios. (b) bactéria invade e entra no espaço subepitelial de onde estimula a resposta sistêmica.

Fonte: MUNFORD, 2006

A segunda teoria, em contraste com a primeira, preconiza que uma inflamação local é normalmente acompanhada de uma resposta anti-inflamatória sistêmica na corrente sanguínea e nos órgãos distantes. A bactéria ao invadir o organismo por uma barreira epitelial se encontrará com macrófagos tissulares residentes, células dendríticas que liberam mediadores, atraindo neutrófilos para o local da infecção, promovendo a adesão destes ao endotélio vascular local e facilitando a diapedese. Essa compartimentalização funcional promove um predomínio da resposta anti-inflamatória e pode contribuir para a imunossupressão a qual, posteriormente, deprimirá a resposta vascular aos agonistas bacterianos,

como o LPS (Figura 2) (MUNFORD, 2006).

Figura 2. Inflamação local acompanhada de uma resposta sistêmica.
Fonte: MUNFORD, 2006

As infecções por bactérias gram-positivas podem produzir uma síndrome séptica semelhante às provocadas pelas gram-negativas (BAPTISTE, 2007). A parede celular composta por peptidoglicanos que estão expostas na bactéria gram-positiva apresentam um mecanismo semelhante ao promovido pela endotoxina das gram-negativas (LPS). O ácido lipoteicóico (LTA), que está ligado aos peptidoglicanos, também se liga à glicoproteína CD14 e desencadeia a produção de citocinas. Porém, a substância C presente na parede celular pneumocócica, parte do antígeno de Forssman, ao se ligar a lípides pode se ligar à Proteína-C reativa (PcR) e ativar o complemento levando a eventos proinflamatórios que culminariam no choque (BAPTISTE, 2007; SRISKANDAN; COHEN, 1999).

Existem dois fatores que explicam a rapidez com a qual o sistema imune inato responde à incursão de um patógeno. A presença de receptores, como os TLR, que reconhecem alguns marcadores de microorganismos (LPS, por exemplo) e a vasta distribuição desses receptores no corpo. Além das células imunológicas (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos), existe também a presença em células epiteliais, endoteliais e miócitos (LEWIS, et al., 2012).

Os principais alvos desses PRRs são os PAMPs como o LPS e o

LTA (LEWIS, et al., 2012; TSUJIMOTO, et al., 2008). O primeiro PPR ativado durante qualquer interação patógeno-hospedeiro são os membros da família dos TLR que são responsáveis pelo reconhecimento de produtos microbianos e a indução da resposta inata e adaptativa (ZANONI, et al., 2011).

SALOMÃO e colaboradores (2008) demonstraram que a resposta celular no decorrer da sepse é dinamicamente regulada. Uma resposta diminuída ou aumentada pode ser encontrada dependendo da função, do tipo celular avaliado e o do percurso da sepse. Os TLRs são modulados e diferentemente regulados dependendo do grau de gravidade do paciente séptico. Em estudos clínicos, foi observada uma expressão aumentada de TLR-4 e TLR-2 em pacientes diagnosticados com sepse e uma expressão gênica diminuída em pacientes em estado de choque séptico. Além disso, essa variação parece ser mais dinâmica em neutrófilos do que em monócitos.

O complexo formado pelo CD14, TLR e o LPS inicia uma série de eventos intracelulares envolvendo proteínas e fatores de transcrição como *activator protein* (AP) -1, *interferon regulatory factors* (IRF) - 3 e *nuclear factor-kappa B* (NF-κB) que transcrevem diversos genes que codificam citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, enzimas como a ciclooxigenase (COX)-2 e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (AKIRA; TAKEDA; KAISHO, 2001; TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, 2003). Mais especificamente, a cascata de sinalização é feita por duas vias principais e distintas: *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) e a *toll interleukin-1 receptor domain-containing adapter-inducing IFN* (TRIF) (FILGUEIRAS, et al., 2012; HARGREAVES; MEDZHITOV, 2005).

Na primeira via, o domínio *Toll Interleukin-1 receptor* (TIR) se associa à molécula adaptadora MyD88, comum a quase todos os TLR, e numa sinalização análoga a do receptor de IL-1, leva à ativação denominada *early phase* (TAKEUCHI et al., 2000; KAWAI et al., 1999), com expressão de centenas de genes de resposta proinflamatória induzidos pelo fator de transcrição NF-κB. A segunda via se vale das moléculas adaptadoras (TRIF) e *TRIF-related adapter molecule* (TRAM),

lesão aguda pulmonar (ALI) (BHARGAVA; WENDT, 2012; SURATT; PARSONS, 2006) que é caracterizada por edema pulmonar e infiltração de células inflamatórias como os neutrófilos que, conseqüentemente, levam a uma redução das trocas gasosas. Na forma severa, o agravamento da hipóxia pode levar à falência múltipla de órgãos (HOTCHKISS; KARL, 2003; FILGUEIRAS et al, 2012). Além disso, existe a hipótese de que macrófagos alveolares (MAs) possam contribuir para a progressão da inflamação sistêmica decorrente da sepse com acometimento pulmonar, liberando uma segunda onda de mediadores inflamatórios, que amplificaria essa resposta. (MARTINS et al., 2008a, 2008b; SUNAHARA; MARTINS, 2012).

Portanto, interferir de forma inibitória ou modulatória nestes MAs na sepse com envolvimento pulmonar pode ter um efeito benéfico ao bloquear uma segunda onda de mediadores, evitar a ativação descontrolada de células imunológicas e endoteliais o que contribui para a disfunção de múltiplos órgãos.

1.2 Diabetes mellitus, sepse e insulina

O diabetes foi reconhecido como uma entidade clínica quando o *The New England Journal of Medicine and Surgery* foi fundado em 1812. Na época, não havia nenhum tratamento disponível e o diabetes era uniformemente fatal em semanas. Apesar de a doença estar ainda associada com uma menor expectativa de vida, a perspectiva dos pacientes diagnosticado foi melhorada drasticamente nos últimos 200 anos (POLONSKY, 2012).

A Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2009) recomenda a classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela *American Diabetes Association* (ADA) que preconiza que o grupo de doenças metabólicas resultantes de defeitos na secreção de insulina, da ação da mesma ou ambas, causando, principalmente, hiperglicemia seja caracterizada como *Diabetes Mellitus* (DM) (ADA, 2012).

A classificação do diabetes segundo a ADA (2012) inclui quatro classes:

- DM tipo 1: resulta da destruição das células beta pancreáticas que, geralmente, leva à deficiência total de insulina.
- DM tipo 2: resulta de uma secreção defeituosa e progressiva de insulina causada por uma resistência insulínica periférica.
- Outros tipos específicos de DM: Manifestações menos comuns cujos defeitos ou processos causadores podem ser identificados (SBD, 2009). Podem ser devido a: defeito genético no funcionamento das células beta pancreáticas, defeito genético na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino e outras condições descritas na Tabela 2
- DM gestacional: diabetes diagnosticado durante a gravidez.

Há 200 anos, a deficiência grave de insulina dominava as apresentações clínicas do diabetes. No entanto, o perfil da doença encontrado hoje é bem diferente. Apesar dessa grave deficiência ainda ocorrer, atualmente, ela corresponde a 10% de todos os casos e pode ser rapidamente tratada com a reposição insulínica (POLONSKY, 2012). A grande maioria dos pacientes diabéticos está acima do peso e possuem uma combinação de resistência à insulina e uma secreção deficiente da mesma (POLONSKY, 2012).

O DM causa um enorme impacto econômico nos países devido ao elevado número de internações, o tempo longo de permanência nos hospitais e os elevados gastos com produtos e serviços destinados a esses pacientes. Além disso, com o aumento da expectativa de vida, diminuição da atividade física e alimentação inadequada (DIAS; CAMPOS, 2012) estima-se que em 2010 o número pessoas com diabetes chegou a 285 milhões em todo o mundo (SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010). Dentre as variações da doença, o Diabetes do tipo 2 é mais frequentemente, sendo responsável por cerca de 90% dos casos (SCHNEIDER, et al., 2009).

Tabela 2: Outros tipos específicos de DM

-
- **Defeitos genéticos na função das células beta**
 - MODY 1 (defeitos no gene HNF-4 alfa)
 - MODY 2 (defeitos no gene glicoquinase)
 - MODY 3 (defeitos no gene HNF-1 alfa)
 - MODY 4 (defeitos no gene IPF-1)
 - MODY 5 (defeitos no gene HNF-1 beta)
 - MODY 6 (defeitos no gene Neuro D1)
 - DM mitocondrial
 - Outros
 - **Defeitos genéticos na ação da insulina**
 - Resistência à insulina do tipo A
 - Leprechaunismo
 - Síndrome de Rabson-Mendenhall
 - DM lipoatrófico
 - Outros
 - **Doenças do pâncreas exócrino**
 - Pancreatite
 - Pancreatectomia ou trauma
 - Neoplasia
 - Fibrose cística
 - Pancreatopatia fibrocalculosa
 - Outros
 - **Endocrinopatias**
 - Acromegalia
 - Síndrome de Cushing
 - Glucagonoma
 - Feocromocitoma
 - Somatostinoma
 - Aldosteronoma
 - Outros
 - **Infeções**
 - Rubéola congênita
 - Citomegalovírus
 - Outros
 - **Induzido por medicamentos ou agentes químicos**
 - Determinadas toxinas
 - Pentamidina
 - Ácido nicotínico
 - Glicocorticoides
 - Hormônio tireoidiano
 - Diazóxido
 - Agonistas betadrenérgicos
 - Tiazídicos
-

Tabela 2: Outros tipos específicos de DM**- Formas incomuns de DM autoimune**

- Síndrome stiff man
- Anticorpos antirreceptores de insulina
- Outros

- Outras síndromes genéticas por vezes associada a DM

- Síndrome de Down
- Síndrome de Klinefelter
- Síndrome de Turner
- Síndrome de Wolfram
- Ataxia de Friedreich
- Coreia de Huntington
- Síndrome de Laurence-Moon-Biedl
- Distrofia miotônica
- Síndrome de Prade-Willi
- Outros

HNF: *Hepatocyte Nuclear Factor*; IPF: *Insulin Promotor Factor*

Fonte: SBD, 2009

No Brasil, apesar da relevância do DM na saúde pública, existe uma escassez de estudos de base populacional para o desenvolvimento de um planejamento epidemiológico para a implantação de medidas assistenciais em saúde (MORAES, et al., 2010). No entanto, entre os anos de 1986 e 1989 foi realizado o primeiro estudo multicêntrico de base populacional que utilizou os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o diagnóstico da diabetes (TORQUATO, et al., 2003). Essa pesquisa foi realizada em nove capitais brasileiras e chegou à conclusão que a prevalência de diabetes no Brasil era de 7,4% (MALERBI; FRANCO, 1992). Estima-se que hoje a prevalência da doença no Brasil esteja em torno de 8% na população compreendida entre 30 e 69 anos, sendo que metade dessa população desconhece tal condição (DIAS; CAMPOS, 2012).

Além do impacto econômico e social causada pelo DM, essa doença tem sido associada com elevados índices de infecções recorrentes (MULLER, et al., 2005; SHAH; HUX, 2003), no entanto, os efeitos do diabetes na mortalidade são menos claros (YENDE, et al., 2010). Nesse contexto, pacientes diabéticos representam cerca de 22% de todos os pacientes sépticos (KOH, et al., 2012; STEGENGA et al.,

2010) e, a associação com condições médicas crônicas podem alterar o resultado da sepse e, assim, ter um importante papel na escolha do melhor tratamento (SCHUETZ, et al., 2011). Apesar disso, o mecanismo pelo qual existe esse aumento de susceptibilidade necessita de maiores elucidações. Na tentativa de buscar esses esclarecimentos, o sistema imune está sendo estudado em detalhes, especialmente, o sistema imune inato (PELEG, et al., 2007). O diabetes é associado com elevados índices de marcadores de inflamação, Pcr, TNF- α , IL-6 e IL-8 (KOH, et al., 2012). Além disso, existem algumas evidências que mostram que a resposta local pode estar reduzida no paciente diabético, índices reduzidos de IL-6 e IL-8 foram observados em mulheres portadores dessa condição associada à bacteriúria (GEERLINGS, et al., 2000).

Um aspecto importante para o controle de infecções é a transmigração de polimorfonucleares (PMN) e eliminação do patógeno no sítio da inflamação. Esse fenômeno depende da adesão ao endotélio mediada por moléculas como L-selectina e integrinas, seguido da transmigração pela parede do vaso, que depende de um gradiente quimiotático e a expressão de integrinas pelos neutrófilos (CD11a,/CD18 e CD11b/CB18) que se ligam às moléculas de adesão expressas pelo endotélio *intracellular adhesion molecule* (ICAM)-1. Apesar de ter sido demonstrado que há um aumento na adesão dos PMN ao endotélio, em pacientes diabéticos, o significado desse resultado em relação à susceptibilidade às infecções ainda não está claro (KOH, et al., 2012; STEGENGA et al., 2010).

Em relação à quimiotaxia, um estudo demonstrou a redução desse fenômeno em PMN e monócitos de pacientes diabéticos (PELEG, et al., 2007). A maior evidência de disfunção neutrofílica nesses indivíduos está relacionada com a capacidade de matar patógenos. Algumas das substâncias microbidas produzidas por PMN estão reduzidas no diabetes, como, por exemplo, o superóxido (PELEG, et al., 2007). Em resumo, no diabetes temos uma disfunção dos PMN concomitante com concentrações alteradas de citocinas tanto em um estado basal quanto em um estado inflamatório, e isso contribui para influenciar a resposta

imunológica do paciente diabético durante uma infecção local ou sistêmica (STEGENGA et al., 2010). Apesar do DM estar implicado em uma maior susceptibilidade às infecções, a influência no percurso clínico e desfecho subsequente, ainda necessitam de muitas elucidações (KOH, et al., 2012). Entretanto, pacientes sépticos com histórico médico de diabetes não possuem um índice de mortalidade elevado em relação aos pacientes não diabéticos (STEGENGA et al., 2010). Outro estudo buscou avaliar o impacto do DM no desenvolvimento da disfunção de órgãos secundária à sepse. Nessa avaliação, pacientes diabéticos com sepse grave quando comparados com pacientes não diabéticos, apresentaram um menor risco em desenvolver uma falha respiratória aguda (ESPER; MOSS; MARTIN, 2009).

Estudos clínicos e experimentais indicam que o diabetes exerce um efeito protetor contra o desenvolvimento de ALI/SDRA, talvez pelos efeitos da hiperglicemia na resposta inflamatória, anormalidades metabólicas da doença, carência relativa do hormônio e as interações dos agentes terapêuticos, como os fármacos diabetogênicos, utilizados nos pacientes diabéticos (HONIDEN; GONG, 2009; FILGUEIRAS et. al., 2012). No entanto, em outro estudo, foi mostrado que pacientes com DM possuíam índices elevados de mortalidade por pneumonia (KORNUN, et al., 2007), justamente em função desta maior susceptibilidade às infecções.

A insulina é considerada um hormônio importante no controle do metabolismo corporal, no entanto, nas últimas décadas, outras importantes características desse peptídeo têm sido elucidadas, especialmente, em relação às células endoteliais, plaquetas e leucócitos (DANDONA, et al., 2007)

Esse peptídeo regula vários processos celulares, como o transporte de glicose (KHAM; PESSIN, 2002), a síntese de glicogênio (SRIVASTAVA; PANDLEY, 1998), a mitogênese (ISH-SHALOM et. al., 1997) e a transcrição de vários genes (MOUNIER; POSNER, 2006). Atualmente, existem amplas evidências que suportam a idéia que os efeitos da insulina vão além do controle glicêmico (HONIDEN; GONG, 2009). Em ensaios clínicos e experimentais observou-se que esse

peptídeo tem mostrado um efeito imunomodulatório importante. Em um estudo clínico, foi demonstrado um forte efeito anti-inflamatório exercido pela terapia intensiva com insulina em pacientes críticos (HANSEN, et al., 2003). Além disso, efeitos como a vasodilatação, a supressão da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), efeito anti-agregante plaquetário, antitrombótico e profibrinolítico já foram demonstrados em humanos (DANDONA, et al., 2009).

Em estudos *in vitro*, o tratamento prévio de MAs ativados pelo LPS com insulina, diminui a expressão de *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) p38, *extracellular signal-regulated kinases* (ERK)1/2, *protein kinase* (PK)-B ou Akt, proteína kinase C (PKC)- α e PKC- δ , e a produção de TNF (MARTINS et al., 2008a). Estes dados sugerem que a administração de insulina na sepse com envolvimento pulmonar possa ter um efeito protetor por bloquear uma segunda onda de mediadores liberados pelos MAs (MARTINS et al., 2008a). Além disso, a administração de insulina após o desafio com LPS suprime a expressão de *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) e ciclo-oxigenase (COX)-2, diminui a produção de NO e prostaglandina (PG)-E₂, bem como inibir a ativação de p65NF- κ B nuclear. A insulina também foi capaz de diminuir a fosforilação de *inhibitory kappa-B* (I κ -B) α citoplasmático. Estes dados mostram que, em MAs estimulados por LPS, a insulina é capaz de inibir a translocação nuclear de NF- κ B, provavelmente por bloquear a degradação de I- κ B α e, assim, suprimir a produção de NO e PGE₂ — dois mediadores que contribuem para o choque séptico (MARTINS et al. 2008b).

Outro trabalho, mostrou que ratos wistar machos diabéticos ao serem instilados com LPS intratraqueal exibiam reduzida fosforilação de ERK, p38, Akt, PKC- α e pPKC- δ , além de uma reduzida expressão de iNOS e COX-2, concentração baixa de NO e IL-6 e aumento de CINC-2 no LBA. O tratamento com insulina, antes da instilação restaurou os padrões de fosforilação dessas moléculas sinalizadoras, a expressão de enzimas e os níveis de citocinas (MARTINS et. al., 2010)

Em estudos *in vivo*, observou-se que ratos diabéticos induzidos por aloxana possuíam menores níveis de RNAm para IL-1 β e TNF- α nos pulmões e em linfonodos mesentéricos, quando comparados com animais controle, 6 horas após a instilação de LPS. Após o tratamento desses animais com insulina, a expressão desses genes de citocinas foi restaurada aos níveis dos animais não-diabéticos (MARTINS, et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que hiperinsulinemia reduz fortemente a atividade fibrinolítica induzida pela inflamação devido a uma exagerada indução de PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor type 1*) (STEGENGA et al., 2008).

A insulina regula a atividade metabólica, a transcrição gênica e o crescimento de várias células pela modulação da atividade de diversas proteínas envolvidas na sinalização intracelular (KEETON et al., 2002). O NF- κ B é um dos fatores de transcrição mais estudados na expressão de citocinas, também importante na resposta imune às infecções pulmonares (FAN et al., 2001), sendo normalmente encontrado no citoplasma associado com uma proteína inibidora, o I κ -B. Após estímulos inflamatórios, o I κ -B é fosforilado e o NF- κ B é liberado, move-se para núcleo, onde favorece a transcrição de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. DANDONA e colaboradores (2001) verificaram um potencial efeito inibitório da insulina pela redução intracelular de NF- κ B e um aumento de I κ -B em monócitos obtido do sangue de pessoas obesas.

Estudos *in vitro* tem demonstrado que a insulina suprime a expressão das ICAM-1, das *Chemokine C-C Motif Ligand (CCL)*-2 também conhecidas como *Monocyte Chemotatic Protein (MCP)*-1 também impede a ligação do NF- κ B ao núcleo (KARAMITSOS, 2011). Além disso, em modelo murino, foi demonstrado uma redução na lesão de órgãos secundária à sepse após tratamento com insulina (BARKHAUSEN, et al., 2009).

Assim, o mecanismo da imunodeficiência e a suscetibilidade para o desenvolvimento de sepse no diabetes, bem como a ação da insulina em modular alguns parâmetros imunológicos e a sua importância no controle da glicemia em não diabéticos ainda necessitam de maiores elucidações.

Além disso, outros aspectos benéficos em relação à esse peptídeo já foram relatados e também necessitam de maiores esclarecimentos, como por exemplo, a redução na lesão de alguns órgãos.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do projeto é estudar a sepse experimental em animais diabéticos e sadios, tratados ou não com insulina.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliação do número de células no lavado broncoalveolar (LBA) e no lavado peritoneal (LPe).
- b) Avaliação das concentrações de citocinas (IL1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, CINC-1 e CINC-2) no LAB e no LPe.
- c) Avaliação dos efeitos do diabetes e do CLP em marcadores renais e hepáticos, dosagem sérica: uréia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FAL).
- d) Avaliação morfológica de pulmão, rins, e fígado.
- e) Atividade da Mioelperoxidase (MPO) em pulmão, rins e fígado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Anexo I).

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso inicial entre 200 - 220g, após um período de aclimação entre 250 – 300g. Idade de, aproximadamente, 2 meses procedentes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério, acondicionados em gaiolas coletivas, contendo no máximo cinco animais, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de 22°C e com suprimentos de água e alimento disponíveis todo o tempo.

3.2 Indução de *diabetes mellitus*

Para indução do diabetes mellitus os animais foram deixados em jejum de 12 horas antes de receberem uma 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 através de um monitor de glicose (Advantage, Lilly), utilizando-se amostras de sangue obtidas da extremidade da cauda dos animais. Somente foram utilizados animais com glicemia superior a 200 mg/dL (11,2 mM). Após dez dias da instalação da doença é que foram realizados os procedimentos (MARTINS, et al., 2009).

3.3 Tratamentos com insulina

Animais diabéticos e controle receberam dose única (4 UI e 1 UI, respectivamente) de insulina NPH, por via subcutânea, 8 horas antes do experimento. Os níveis glicêmicos foram determinados antes e 8 horas após do tratamento com insulina.

3.4 Modelo CLP de sepse

Os animais diabéticos e controle aguardaram dez dias para iniciar o procedimento cirúrgico.

Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal com cloridrato de cetamina (90 mg/kg) associado ao cloridrato de xilasina (10 mg/kg) e procedeu-se uma laparotomia mediana de aproximadamente 2 cm. O ceco foi exteriorizado e realizado uma ligadura abaixo da válvula íleo-cecal. Esta região foi duas vezes perfurada com agulha 22 gauge (NAKAGAWA *et al.*, 2006). A incisão abdominal foi suturada e o abdome fechado. Os animais foram recolocados em suas dependências e após 6 horas do procedimento cirúrgico foram realizados os experimentos.

3.5. Delineamento experimental

O diabetes mellitus foi induzido após uma injeção de aloxana e a sepse por CLP, como descrito anteriormente. Animais sham foram anestesiados, procedeu-se uma laparotomia, o ceco foi exteriorizado, porém não submetidos à ligadura e perfuração.

Os animais foram separados em 2 grupos (Controle e Diabético), dentro de cada um desses grupos existiam mais 3 grupos (Sham, CLP e CLP + insulina). No grupo nomeado de sham fizeram parte os animais falso operados, no CLP pertenciam os ratos que sofreram a indução da

sepsis e, um terceiro grupo compreendia os ratos com CLP e tratados com insulina (CLP + i).

Tabela 3: Delineamento experimental

GRUPOS DE ANIMAIS	QUANTIDADE DE ANIMAIS
Sham	08
Sepsis	08
Sepsis + insulina	08
Diabético (sham)	08
Diabético + Sepsis	07
Diabético + Sepsis + insulina	10
TOTAL	49

3.6 Protocolo experimental

Modelo de sepsis: ligadura e perfuração do ceco (CLP)

Experimentos: Infiltrado inflamatório, citocinas, parâmetros hematológicos, parâmetros bioquímicos e morfologia renal e hepática, MPO

3.7 Monitoramento da sepse

Foram analisados os seguintes parâmetros: hemograma completo, plaquetas e glicemia. Amostras de sangue periférico, coletadas da cauda do animal, foram utilizadas para a determinação da glicemia (monitor de glicose Advantage, Lilly, São Paulo, SP). Para o hemograma, plaquetas e determinações bioquímicas (uréia, creatinina, ALT, AST e FAL) foi utilizado a amostra coletada da aorta abdominal.

Os animais foram anestesiados pela via intraperitoneal com cloridrato de cetamina (90 mg/kg) associado ao cloridrato de xilasina (10 mg/kg). Após, anestesia, a pele da região abdominal foi removida, a cavidade peritoneal foi lavada com 5mL de tampão fosfato salina, pH 7.4 (PBS). Após a massagem do abdômen as amostras de lavado peritoneal (LPe) foram coletadas e devidamente armazenadas. Em seguida, a cavidade abdominal foi exposta para a coleta de sangue da aorta. Para a determinação do número de leucócitos no (LBA), os pulmões foram lavados com 25 mL de tampão fosfato salina (PBS), utilizando-se tubo de polietileno de 1 mm de diâmetro, inserido na traquéia. A primeira lavagem foi realizada com 10 mL de PBS (reinfundidos por 3 vezes) e as seguintes com 5 mL (infundidos uma única vez). O LBA só foi utilizado quando o volume recolhido atingiu, pelo menos, 85% do infundido. Após a coleta, o material foi centrifugado (500 g, 10 min, 4°C) e o sobrenadante da primeira lavagem foi mantido a -70°C, para a dosagem de citocinas e quimiocina. Para a determinação do número de células utilizamos as amostras recolhidas em todas as lavagens (25 mL no total).

3.8 Determinação do número de células dos lavados broncoalveolar e peritoneal

O LBA e LPe foram centrifugados (500 g, 10 min, 4°C) e as células ressuspensas em PBS. A suspensão de células do LPe e do LBA foi diluída na proporção 1/20 (v:v) com líquido de Turk e a contagem total de

células foi determinada em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada em amostras (Citocentrífuga CITOSPIN) coradas (Leishman). Em cada lâmina foram avaliadas 100 células, diferenciando-se os tipos celulares (células mononucleares, polimorfonucleares).

3.9 Quantificação de citocinas e quimiocina por ensaio imunoenzimático

A quantificação das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-10, e das quimiocinas CINC-1 e CINC-2 foi realizada em amostras do sobrenadante do LBA e do LPe 6 horas após o CLP, utilizando-se o método de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) por Duo-set (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). Inicialmente, na placa com 96 poços, foram adicionados 100 μ L/poço do anticorpo de captura, anti-IL-1 β (0,8 μ g/mL), anti-TNF- α (4 μ g/mL), anti-IL-10 (4 μ g/mL), anti-CINC-1 (100 μ g/mL) ou anti-CINC-2 (100 μ g/mL). Após incubação por uma noite a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e a placa lavada 3 vezes com o tampão de lavagem (aproximadamente 300 μ L/poço). Em seguida, foi realizada a reação de bloqueio adicionando-se 200 μ L/poço de albumina sérica bovina a 2% em PBS e incubação por 1 hora à temperatura ambiente (20 a 26°C). A placa foi novamente lavada 3 vezes com o tampão de lavagem. Adicionaram-se, em duplicata, 100 μ L/poço do padrão ou das amostras, procedendo-se à incubação da placa por 2 horas à temperatura ambiente. Para a curva padrão utilizaram-se IL-1 β , ou TNF- α , IL-10, ou CINC-1 recombinantes nas concentrações de 15,625; 31,25; 62,50; 125; 250; 500; 1000; e 2000 pg/mL. Após repetir o procedimento de lavagem da placa, foram adicionados 100 μ L/poço do anticorpo de detecção biotilado para IL-1 β (350 ng/mL), TNF- α (100 ng/mL), IL-10 (100 ng/mL), CINC-1 ou 2 (50 μ g/mL) e a placa incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Ao término da incubação, o ciclo de lavagem da placa foi repetido e, em seguida, adicionaram-se 100 μ L/poço da enzima estreptoavidina peroxidase na proporção 1:200 de enzima:PBS com 0,05% de tween₂₀, e

incubação por 1 hora à temperatura ambiente protegida da luz. Em seguida, o ciclo de lavagem da placa foi repetido e a reação revelada pela adição de 100 μL /poço de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina e incubação (30-60 minutos) à temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi bloqueada adicionando-se 50 μL /poço de H_2SO_4 (1N), avaliando-se a densidade óptica das amostras a 450 nm, imediatamente após o bloqueio da reação.

3.10 Obtenção dos cortes de tecido pulmonar, renal e hepático

Após 6 horas da indução da sepse por CLP, os animais sépticos e seus respectivos controles foram anestesiados como descrito anteriormente para a posterior realização de laparotomia e sangria total pela aorta abdominal. Na sequência, os rins, o fígado e o pulmão dos animais foram removidos e fixados em formaldeído para a análise histológica conforme descrito abaixo.

3.11 Análise histológica

Para a análise histológica, os tecidos pulmonar, hepático e renal foram fixados em formaldeído (3,7%), por aproximadamente 12 horas. Após a fixação, o material foi desidratado em etanol, utilizando-se concentrações crescentes (70% a 100%), diafanizado em xilol e incluído em parafina. Após a inclusão, foram obtidos cortes transversais, com aproximadamente 5 μm de espessura, os quais foram posteriormente corados com hematoxilina e eosina (H/E).

Diante da importância de se obter um preparado permanente, após a coloração, o material foi desidratado, diafanizado e montado com Entellan® entre lâmina e lamínula.

A análise histológica das lâminas contendo os tecidos foram observadas e fotografadas em microscópio de luz DM LS (Leika) com

captador de imagem DF420 (Leika) e programa de imagem Leika Application Suite, versão 3.1.0.

3.12 Dosagem das concentrações de Mieloperoxidase em tecidos pulmonar, hepático e renal.

As concentrações de mieloperoxidase (MPO) foram determinadas conforme a metodologia de Bradley e colaboradores (1982).

As amostras de pulmão, fígado e rins foram obtidas 6 horas após a indução da sepse por CLP, fixados em formaldeído 3,7% ou não fixados (material aliquoteado e congelado em freezer -80°C) foram homogeneizados em tampão fosfato potássico 50 mM pH=6.0 (3,20g KH_2PO_4 e 0,26g K_2HPO_4) contendo 1,93% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB, Sigma-Aldrich Company), com o auxílio de um homogeinizador (Politron). Todo esse material previamente processado em HTAB foi congelado e descongelado 3 vezes consecutivas e centrifugado a 13000g por 5 minutos. Amostras de 700µL de sobrenadante foram retiradas e adicionadas a 2,0mL de sulfato de amônio (3,6 M) e a 2,7mL de clorofórmio. Na sequência, esse material passou por uma nova centrifugação a 4000g por 10 minutos. Um volume de 20µL desse sobrenadante foi adicionado em 130µL de solução substrato (20 mg OPD e 20 µL de H_2O_2 , dissolvidos em tampão fosfato potássico 50 mM pH=6.0), em duplicata e em placas de ELISA. A reação foi interrompida com H_2SO_4 30% (50µL/ poço). A absorbância das amostras foi determinada em leitor de ELISA (Spectra Max 190, Molecular Devices) em comprimento de onda de 492 nm e as concentrações de MPO foram estimadas utilizando-se uma curva padrão específica com concentrações de peroxidase em U/mL.

3.13 Análise Estatística

Os resultados obtidos nos experimentos foram avaliados por média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) e por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey-Kramer. Os dados foram processados e analisados utilizando o programa GraphPad InStat 3, admitindo como significante um valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das amostras quanto ao peso e variações da glicemia

Os animais foram submetidos a pesagens antes e após os dez dias prévios ao procedimento cirúrgico para indução da sepse (CLP) (Tabela 4). Além disso, foram também avaliadas as glicemias antes e após o tratamento com insulina (Tabela 5). Os animais tornados diabéticos apresentaram uma perda de peso corporal e hiperglicemia em comparação com os respectivos controles após os dez dias de estabelecimento da doença.

Tabela 4. Distribuição de ratos controles e diabéticos, segundo variação de peso e glicemia

Animais	Peso (g)			Glicemia (mg/dL)
	Inicial	Final	Variação	
CT (n=24)	302.4 ± 7.9	361.7 ± 7.9	59,2 ± 0.5	110.8 ± 1.0
DM (n=25)	285.2 ± 6.8	273.8 ± 6.6 ^b	-11,4 ± 4.2 ^b	553.5 ± 8.6 ^b

O *diabetes mellitus* foi induzido através de uma injeção endovenosa de aloxana (42 mg/kg de animal) 10 dias antes da indução da sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP). A glicemia foi aferida após os mesmos dez dias antes do tratamento com insulina. Os valores representam a média ± e.p.m. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. ^bp<0,001 por comparação com os respectivos valores no grupo controle. Controle (CT) e Diabético (DM).

Após a caracterização dos animais em diabéticos (menor ganho ou perda de peso corporal e glicemia acima de 200 mg/dL) e controle (ganho de peso corporal e glicemia inferior a 200 mg/dL sem jejum), os ratos

foram separados para a caracterização do modelo de sepse induzido por CLP.

A Tabela 5 mostra as variações da glicemia no desenvolvimento da sepse e a ação da insulina sobre esse parâmetro bioquímico.

Tabela 5. Distribuição de ratos controles e diabéticos, segundo a variação da glicose antes e após o procedimento cirúrgico

		Glicemia (mg/dL)		
Animais		Antes do P.C.	Após P.C (6 hrs)	Variação
CT	Sham	110.6 ± 1.8	127.1 ± 1.8	16.5 ± 2.3
	CLP	112.8 ± 1.6	183.2 ± 17.6 ^a	70.2 ± 16.8 ^a
	CLP + i	108.8 ± 1.9	60.7 ± 4.6 ^b	-46.5 ± 6.1 ^b
DM	Sham	546.6 ± 17.2	418 ± 6.7	-128.6 ± 20
	CLP	556.4 ± 16.1	548 ± 20.3 ^b	-8.42 ± 16.6
	CLP + i	557 ± 13.6	253.6 ± 9.1 ^b	-303.4 ± 17.4

A glicemia dos animais foi aferida a partir de uma amostra de sangue obtido da cauda dos ratos antes e após 6 horas do procedimento cirúrgico (P.C). O tratamento com insulina foi realizado duas horas antes do início do P.C. Os valores representam a média ± e.p.m. ^ap<0,01, ^bp<0,001 por comparação com os respectivos valores no grupo controle (sham). Foram utilizados de 4 a 8 animais em cada grupo. Controle (CT) e Diabético (DM).

O tratamento dos animais diabéticos com insulina (NPH, 4 UI, dose única) foi feito 2 horas antes dos procedimentos cirúrgicos para indução da sepse (CLP). Esta dose de insulina foi escolhida com base em estudos anteriores de nosso grupo (MARTINS, 2006, 2009, 2010), como sendo uma dose capaz de restaurar parâmetros inflamatórios que estão diminuídos em animais diabéticos, mesmo sem normalizar a glicemia. A quantidade utilizada desse peptídeo, nos animais diabéticos, não normalizou os níveis plasmáticos da glicemia, mantendo-os acima de 200 mg/dL (Tabela 5). O grupo controle séptico ao receber a dose de insulina (1 UI, dose única) apresentaram uma discreta hipoglicemia (Tabela 5).

As glicemias dos animais controles e diabéticos antes do procedimento cirúrgico, não possuíam diferenças estatísticas significativas entre os grupos (sham, CLP e CLP + insulina) antes da indução da sepse (Tabela 5).

Após o procedimento cirúrgico para indução da sepse (CLP) e a manipulação do ceco dos ratos falso-operados (sham), observamos uma variação nos valores da glicemia. Uma redução esperada ocorreu no grupo de animais controle que receberam o tratamento com insulina (1 UI) duas horas antes da cirurgia. Além disso, alterações nos valores de glicose plasmática foram estatisticamente significantes entre os grupos CLP e CLP + i quando comparados com o controle sham. Isso ocorreu tanto entre os animais sadios como entre os diabéticos (Tabela 5).

4.2 Avaliação dos parâmetros hematológicos em animais diabéticos e controle

Após 6 horas da realização dos procedimentos cirúrgicos, sangue total dos animais diabéticos e controle foram coletados para a análise de 4 parâmetros hematológicos: hematimetria (HTM), hemoglobina (Hb), leucometria total (LG) e plaquetas (Pla). Esses índices foram avaliados individualmente dentro cada de grupo (sham, CLP e CLP + i) dos ratos designados para controle bem como para os animais tornados diabéticos

por aloxana. Os resultados que não tiveram variações estatísticas significantes encontram-se na Tabela 6.

Dentre os 4 parâmetros analisados apenas a leucometria total apresentou diferenças significativas. Animais controle com sepse e tratados com insulina apresentaram uma redução significativa no número total de leucócitos circulantes (Figura 4). Em relação aos animais diabéticos houve uma redução importante na leucometria tanto nos grupos com sepse sem insulina e nos animais que tiveram a sepse induzida e foram tratados com insulina (CLP + i) (Figura 5).

Figura 4. Distribuição dos animais controle, segundo leucometria total após 6 horas do procedimento cirúrgico (P.C). O valor foi determinado através de contador hematológico automatizado com amostra de sangue da aorta abdominal dos animais. As análises foram realizadas nos animais dos grupos sham, CLP e CLP + insulina. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. ^c $p < 0,05$. Foram utilizados de 4 a 8 animais em cada grupo.

Figura 5. Distribuição dos animais diabéticos, segundo leucometria total após 6 horas do procedimento cirúrgico (P.C). O valor foi determinado através de contador hematológico automatizado com amostra de sangue da aorta abdominal dos animais. As análises foram realizadas nos animais dos grupos sham, CLP e CLP + insulina. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. ^c $p < 0,05$. Foram utilizados de 4 a 8 animais em cada grupo.

Tabela 6. Distribuição dos ratos controles e diabéticos, segundo parâmetros hematológicos

Animais		Parâmetros Hematológicos		
		HTM	HB	Pla
CT	Sham	4.1 $\pm$ 0.1	12.9 $\pm$ 0,4	258 $\pm$ 64
	CLP	4.4 $\pm$ 1,2	9.9 $\pm$ 1,9	344 $\pm$ 87
	CLP + i	6.2 $\pm$ 0,2	13.5 $\pm$ 0,7	447 $\pm$ 83
DM	Sham	6.6 $\pm$ 0.1	13.1 $\pm$ 0,3	387 $\pm$ 11
	CLP	6.4 $\pm$ 0.2	12.7 $\pm$ 0,6	352 $\pm$ 48
	CLP + i	6.6 $\pm$ 0.2	12.8 $\pm$ 0,4	373 $\pm$ 12

A determinação dos parâmetros hematológicos (HTM=Hematimetria – nº de células $\times 10^6/\text{mm}^3$, Hb=Hemoglobina – g/dL, Pla=Plaquetas – nº de elementos celulares $\times 10^3/\text{mm}^3$) foi realizada 6 horas após os procedimentos cirúrgicos por meio de contador hematológico e os valores expressam a média $\pm$ e.p.m (erro padrão da média). ^c $p < 0,05$ por comparação com os respectivos valores no grupo controle (sham). Foram utilizados de 4 a 8 animais em cada grupo. Controle (CT) e Diabéticos (DM)

4.3 Avaliação da sepse e do diabetes na inflamação do peritônio

A peritonite foi avaliada através da citometria total e específica do LPe e do perfil de citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α , CINC-1, CINC-2 e IL-10) nos grupos controle e diabético. A Tabela 7 mostra os resultados das contagens total e específica das células encontradas no LPe.

Tabela 7. Distribuição dos ratos controles e diabéticos, segundo citometria total e específica do LPe

		Citometria total e específica		
Animais		Total	Polimorfonucleares	Mononucleares
CT	Sham	4.3 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 0.4	3.4 $\pm$ 0.5
	CLP	15 $\pm$ 1.9 ^b	12.6 $\pm$ 1.3 ^b	2.4 $\pm$ 0.6
	CLP + i	16.1 $\pm$ 1.9 ^b	12.1 $\pm$ 1.4 ^b	4.0 $\pm$ 0.7
DM	Sham	8.9 $\pm$ 0.6	3.5 $\pm$ 0.5	5.4 $\pm$ 0.8
	CLP	16.6 $\pm$ 1.9 ^a	13 $\pm$ 1.9 ^b	3.6 $\pm$ 0.5
	CLP + i	14 $\pm$ 1.0 ^c	10.9 $\pm$ 0.9 ^b	3.1 $\pm$ 0.5

O Lavado Peritoneal (LPe) foi centrifugado (500 g, 10 min, 4°C) e as células ressuspensas em PBS. A contagem total de células foi realizada imediatamente em câmara de Neubauer, e a contagem diferencial realizada em amostras coradas (Leishman). Em cada lâmina foram avaliadas 100 células, diferenciando-se os tipos celulares (células mononucleares, polimorfonucleares). LPe em número de células $\times 10^3/\text{mm}^3$. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. ^a<0,01; ^b<0,001; por comparação com os respectivos valores no grupo controle (sham). Foram utilizados de 4 a 8 animais em cada grupo. Controle (CT) e diabéticos (DM)

Após 6 horas de CLP, os animais dos grupos controle e diabéticos foram submetidos à eutanásia e as amostras coletadas. O LPe foi centrifugado e os sobrenadantes separados da camada celular. Após a separação das células, no sobrenadante do LPe foram dosadas por ELISA, as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α , CINC-1, CINC-2 e a citocina anti-inflamatória IL-10.

Assim como ocorreu na contagem total de células do LPe, as relações estatísticas significantes, no perfil de citocinas, ocorreram dentro dos grupos controle e diabético não existindo relação importante entre esses dois grupos em termos estatísticos como podemos observar nas Figuras 6, 7, 8, 9, 10 e 11.

Figura 6. Perfil da citocina IL-1 β no Lavado Peritoneal (LPe). As análises foram realizadas nos animais dos grupos sham, CLP e CLP + insulina. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. ^a<0,01; ^b<0,001. Foram utilizados de 4 a 8 animais em cada grupo.

Figura 7. Perfil da citocina IL-6 no Lavado Peritoneal (LPe). As análises foram realizadas nos animais dos grupos sham, CLP e CLP + insulina. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. ^b $<0,001$. Foram utilizados de 4 a 8 animais em cada grupo.

As interleucinas IL-1 β e IL-6 apresentaram um perfil semelhante conforme representado nas Figuras 6 e 7. As relações estatísticas significantes ocorreram entre os animais sépticos (CLP) e os sépticos tratados com insulina (CLP + i) em relação ao sham nos grupos controle e diabéticos. Não houve diferenças estatisticamente significante entre os grupos CLP e CLP + i, nos animais controle e diabéticos.

No o perfil da citocina proinflamatória TNF- α não foi observada nenhuma diferença com relação estatística significativa entre os grupos diabéticos e controle bem como dentro de cada um desses grupos, como pode ser observado na Figura 8.

Figura 8. Perfil da citocina TNF- α no Lavado Peritoneal (LPe). As análises foram realizadas nos animais dos grupos sham, CLP e CLP + insulina. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. Foram utilizados de 4 a 8 animais em cada grupo.

As duas últimas citocinas proinflamatórias analisadas foram a CINC-1 e a CINC-2. Em relação a primeira, o perfil apresentado foi semelhante aos das citocinas IL-1 β e IL-6 que demonstraram uma diferença estatística significativa entre os grupos CLP e CLP + i em relação ao grupo sham. Assim como com a IL-1 β e IL-6, na CINC-1 não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos controle e diabéticos, como pode ser observado na Figura 9.

Figura 9. Perfil da citocina CINC-1 no Lavado Peritoneal (LPe). As análises foram realizadas nos animais dos grupos sham, CLP e CLP + insulina. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. ^b $<0,001$. Foram utilizados de 4 a 8 animais em cada grupo.

Em relação à citocina CINC-2, apenas entre os animais diabéticos ocorreram diferenças estatísticas significantes em relação ao sham. No entanto, os ratos controles não apresentaram diferenças estatísticas importantes apesar de claramente ser observada uma tendência de elevação na concentração desta citocina dos animais sham para os animais CLP + i. No grupo dos ratos diabéticos, como ocorrido com as demais citocinas, não ocorreu diferenças entre os grupos CLP e CLP + i, apenas desses animais em relação ao sham.

A citocina anti-inflamatória avaliada foi a IL-10 (Figura 11) e na análise observamos um perfil semelhante ao encontrado nas demais citocinas pró-inflamatórias com exceção do TNF- α . No entanto, no grupo de animais controle só obtivemos diferença estatística significativa entre os grupos de ratos sépticos sob o tratamento com insulina (CLP + i), não ocorrendo essa variação importante no grupo dos animais apenas sépticos (CLP), como ocorreu com a IL-1 β , IL-6 e CINC-1.

Já no grupo de ratos diabéticos, as relações foram semelhantes a essas citocinas mencionadas. Não houve diferenças estatisticamente

significantes entre os grupos CLP e CLP + i e bem como entre os grupos de animais diabéticos e controle.

Figura 10. Perfil da citocina CINC-2 no Lavado Peritoneal (LPe). As análises foram realizadas nos animais dos grupos sham, CLP e CLP + insulina. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. ^a<0,01; ^c<0,05. Foram utilizados de 4 a 8 animais em cada grupo.

Figura 11. Perfil da citocina IL-10 no Lavado Peritoneal (LPe). As análises foram realizadas nos animais dos grupos sham, CLP e CLP + insulina. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. ^a<0,01; ^c<0,05. Foram utilizados de 4 a 8 animais em cada grupo.

4.4 Efeitos do modelo de CLP e do diabetes no pulmão

A resposta amplificada que ocorre na sepse afeta vários órgãos, inclusive o pulmão. Uma das manifestações comumente encontradas é a ALI, caracterizada por edema com um infiltrado de células inflamatórias que dificultam as trocas gasosas. Em formas mais severas de CLP (12 furos), o agravamento da hipóxia pode levar à falência de múltiplos órgãos (FILGUEIRAS, et. al., 2012).

No presente estudo buscamos avaliar se um modelo de CLP de seis horas com duas perfurações do ceco provocaria manifestações inflamatórias pulmonares e se existe diferenças entre animais controle e diabéticos. Essa avaliação foi feita através da contagem total e específica de células coletadas do LBA, perfil de citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α , CINC-1, CINC-2 e IL-10), morfologia do pulmão e atividade da mieloperoxidase (MPO).

A primeira análise realizada foi a contagem total de células presentes no LBA e caso, fosse uma quantidade indicativa de inflamação, a citometria específica seria realizada. A Figura 19 mostra a relação total de células no LBA dos grupos controle e diabético.

Figura 12. Distribuição dos animais controle e diabéticos, segundo citometria total no Lavado Broncoalveolar (LBA) após 6 horas do procedimento cirúrgico. A contagem total de células foi realizada imediatamente após a coleta em câmara de Neubauer. As análises foram realizadas nos animais dos grupos sham, CLP e CLP + insulina. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. Foram utilizados de 4 a 8 animais em cada grupo.

A contagem celular total obtida estava bem abaixo do que caracterizaria um infiltrado inflamatório e, além disso, de acordo com as análises, cerca de 90% das células eram mononucleares. Além disso, não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

A análise morfológica (Figura 13) mostrou a preservação do tecido pulmonar e a ausência de infiltrado neutrofílico. A avaliação da atividade da MPO também apresentou um resultado negativo (dados não mostrados).

Figura 13. Tecido pulmonar de ratos. Fotomicrografia do tecido pulmonar de animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais. A – tecido pulmonar de animal controle sham; B – tecido pulmonar de animal diabético sham; C – tecido pulmonar do animal controle que passou pelo processo de ligadura e perfuração do ceco (CLP); D – tecido pulmonar do animal diabético que passou pelo processo de ligadura e perfuração do ceco (CLP); E – tecido pulmonar do animal sadio que passou pelo processo de ligadura e perfuração do ceco pré-tratado com insulina (CLP + i); F – tecido pulmonar do animal diabético que passou pelo processo de ligadura e perfuração do ceco pré-tratado com insulina (CLP + i); Presença de brônquios (B), bronquíolos (Br), alvéolos pulmonares (setas) e vasos sanguíneos (V). Ausência de infiltrado neutrofílico. (barra = 100µm). Figuras representativas de 4 animais por grupo experimental. H/E.

Inicialmente, foram utilizadas amostras de pulmão fixadas sem formaldeído que foram os mesmos utilizados para a análise histológica. Uma vez que o resultado foi negativo, utilizamos o tecido pulmonar que foi congelado logo após a eutanásia dos animais, ou seja, sem nenhum interferente. O resultado obtido foi o mesmo, negativo (dados não mostrados).

A próxima análise foi feita no sobrenadante do LBA e buscou avaliar o perfil de citocinas presentes nessa amostra.

Tabela 8. Distribuição de ratos controles e diabéticos, segundo perfil de citocinas no Lavado Broncoalveolar (LBA)

Animais		Citocinas avaliadas		
		IL-1 β	IL-6	TNF- α
CT	Sham	161 $\pm$ 23	43 $\pm$ 9	35 $\pm$ 5
	CLP	207 $\pm$ 27	45 $\pm$ 14	47 $\pm$ 6
	CLP + i	110 $\pm$ 33	42 $\pm$ 4	30 $\pm$ 4
DM	Sham	156 $\pm$ 36	64 $\pm$ 16	35 $\pm$ 4
	CLP	118 $\pm$ 34	76 $\pm$ 27	34 $\pm$ 3
	CLP + i	186 $\pm$ 41	55 $\pm$ 5	30 $\pm$ 3

O lavado broncoalveolar (LBA) foi centrifugado e os sobrenadantes separadas da camada celular. Após a separação das células, foram dosadas por ELISA as citocinas proinflamatórias interleucina (IL)-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF)- α . Os dados representam o valor da média + e.p.m. em pg/mL. Foram utilizados de 4 a 8 animais em cada grupo. Controle (CT) e Diabéticos (DM).

Tabela 9. Distribuição de ratos controles e diabéticos, segundo perfil de citocinas no Lavado Broncoalveolar (LBA)

Animais		Citocinas avaliadas		
		CINC-1	CINC-2	IL-10
CT	Sham	125 ± 25	403 ± 47	53 ± 12
	CLP	172 ± 66	238 ± 75	82 ± 12
	CLP + i	130 ± 30	309 ± 68	57 ± 8
DM	Sham	131 ± 44	427 ± 51	57 ± 11
	CLP	91 ± 36	286 ± 36	45 ± 10
	CLP + i	99 ± 19	412 ± 54	56 ± 8

O lavado broncoalveolar (LBA) foi centrifugado e os sobrenadantes separados da camada celular. Após a separação das células, foram dosadas por ELISA as quimiocinas *cytokine-induced neutrophil chemoattractant* (CINC)-1, CINC-2 e a citocina antiinflamatória IL-10. Os dados representam o valor da média + e.p.m. em pg/mL. Foram utilizados de 4 a 8 animais em cada grupo. Controle (CT) e diabéticos (DM).

O perfil de citocinas apresentado pelas Tabelas 8 e 9 mostram que não houve nenhuma diferença estatística significativa entre nenhum dos grupos e, além disso, a baixa concentração tanto das citocinas proinflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , CINC-1, CINC-2) como da citocina anti-inflamatória (IL-10) indicam, assim como a contagem de células, que após 6 horas de CLP com dois furos, não ocorreu inflamação pulmonar.

4.5 Efeitos de um modelo de CLP e do diabetes no fígado e no rim

A disfunção múltipla de órgãos é um desfecho comum para os pacientes sépticos, sendo os rins e fígado afetados mais constantemente. Inicialmente realizamos as dosagens de marcadores de função hepática como as enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FAL).

Podemos observar na Figura 14 que os ratos do grupo diabéticos sépticos sem a administração de insulina possuem os maiores valores dos marcadores hepáticos avaliados em relação estatística significativa com os animais diabéticos sham. Com a indução da sepse nos animais diabéticos, o nível sérico da ALT foi bastante elevado em relação ao mesmo representante no grupo controle com sepse. Esse animal diabético com sepse quando tratado com insulina apresentou uma redução importante no valor desse marcador chegando a níveis próximos do valor do animal controle sem sepse (sham) (Figura 14).

Figura 14 Distribuição dos animais controle e diabéticos, segundo valores da alanina aminotransferase (ALT) no soro após 6 horas do procedimento cirúrgico. A diabetes foi induzida através da injeção de aloxana e a sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP). Após a indução do diabetes os ratos permaneceram por 10 dias sendo no décimo dia realizada a cirurgia para modelo de sepse. As amostras foram coletadas 6 horas após a realização da CLP. A determinação dos parâmetros bioquímicos foi realizada através de aparelho bioquímico automatizado e os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de ensaios realizados com soros obtidos de ambos os grupos (controle e diabético) bem como dos grupos (sham, CLP e CLP + insulina). ALT - Alanina aminotransferase. Os

valores representam a média $\pm$ e.p.m. ^a<0,01; ^b<0,001. Foram utilizados de 4 a 8 animais em cada grupo.

O próximo marcador hepático avaliado foi a AST e, assim como ocorrido com a ALT, o grupo de animais diabéticos com sepse apresentou os maiores valores séricos. Esses níveis apresentados tiveram uma relação estatística significativa com o grupo de animais do controle com sepse. E como ocorrido com a ALT, o tratamento dos ratos diabéticos com sepse com insulina, reduziu os valores sanguíneos da AST para níveis próximos do valor do controle sham do mesmo grupo. Esses dados estão melhores representados na Figura 15.

Figura 15. Distribuição dos animais controle e diabéticos, segundo valores da aspartato aminotransferase (AST) no soro após 6 horas do procedimento cirúrgico. A diabetes foi induzida através da injeção de aloxana e a sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP). Após a indução do diabetes os ratos permaneceram por 10 dias sendo no décimo dia realizada a cirurgia para modelo de sepse. As amostras foram coletadas 6 horas após a realização da CLP. A determinação dos parâmetros bioquímicos foi realizada através de aparelho bioquímico automatizado e os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de ensaios realizados com soros obtidos de ambos os grupos (controle e diabético) bem como dos grupos (sham, CLP e CLP + insulina). AST - Aspartato aminotransferase. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. ^a<0,01; ^b<0,001. Foram utilizados de 4 a 8 animais em cada grupo.

O último parâmetro bioquímico hepático avaliado foi a FAL. No caso desse marcador, os níveis séricos dessa enzima já eram superiores no animal diabético em relação aos animais controle. A diferença de concentração da FAL do animal controle sham para o animal diabético

sham é estatisticamente relevante. Além disso, assim como aconteceu com os demais marcadores, o animal diabético com sepse possui valores elevados e com diferença estatística significativa em relação ao mesmo animal controle com sepse. Também nesse caso, a utilização da insulina reduziu os valores de FAL a níveis próximos aos dos animais controle, como pode ser observado no gráfico presente na Figura 16.

Figura 16. Distribuição dos animais controle e diabéticos, segundo valores da fosfatase alcalina (FAL) no soro após 6 horas do procedimento cirúrgico. A diabetes foi induzida através da injeção de aloxana e a sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP). Após a indução do diabetes os ratos permaneceram por 10 dias sendo no décimo dia realizada a cirurgia para modelo de sepse. As amostras foram coletadas 6 horas após a realização da CLP. A determinação dos parâmetros bioquímicos foi realizada através de aparelho bioquímico automatizado e os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de ensaios realizados com soros obtidos de ambos os grupos (controle e diabético) bem como dos grupos (sham, CLP e CLP + insulina). FAL – Fosfatase Alcalina. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. ^a<0,01; ^b<0,001. Foram utilizados de 4 a 8 animais em cada grupo

A análise morfológica do tecido hepático dos animais mostrou que após 6 horas de CLP com dois furos já é possível observar discretas alterações citoplasmáticas nos hepatócitos e a ausência de infiltrado neutrofílico, como pode ser observado na Figura 17. Além disso, a

exemplo do ocorrido no pulmão, a análise da atividade da MPO foi negativa em todas as amostras avaliadas (dados não mostrados).

Figura 17. Tecido hepático dos ratos. Fotomicrografia do tecido hepático dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais. A – tecido hepático do animal controle sham; B – tecido hepático do animal diabético; C – tecido hepático do animal controle que passou pelo processo de ligadura e perfuração do ceco (CLP); D – tecido hepático do animal diabético que passou pelo processo de ligadura e perfuração do ceco (CLP); E – tecido hepático do animal controle que passou pelo processo de ligadura e perfuração do ceco pré-tratado com insulina (CLP + i); F – tecido hepático do animal diabético que passou pelo processo de ligadura e perfuração do ceco pré-tratado com insulina (CLP + i); Após 6 horas já é possível observar discretas alterações em citoplasma de hepatócitos (setas), e ausência de infiltrado neutrofílico (barras A, B, C, D E e F= 100µm; F=25µm; B1, C1, D1 e E1= 40µm). Figuras representativas de 4 animais por grupo experimental. H/E.

A análise da função renal foi feita através da dosagem sérica de uréia e creatinina e da avaliação morfológica do tecido. Os dados mostram que o grupo de ratos diabéticos apresenta níveis elevados de

uréia em relação ao grupo de ratos não diabéticos. Os animais com diabetes sépticos apresentam uma elevação dos níveis séricos de uréia, com uma relação estatística significativa com os animais sham desse mesmo grupo.

Pela análise da Figura 18, podemos observar que os níveis séricos de uréia são maiores no animal diabético do que no controle e, além disso, temos uma diferença estatística significante entre os valores de uréia dos ratos sham controle e diabéticos. Além dessa diferença importante, existe uma relação estatística significativa entre os animais sépticos controle e os diabéticos. Aparentemente, a sepse intensifica a lesão renal como pode ser observado na Figura 18. A utilização da insulina parece não melhorar esse parâmetro renal (Figura 18).

Figura 18. Distribuição dos animais controle e diabéticos, segundo valores de uréia no soro após 6 horas do procedimento cirúrgico. A diabetes foi induzida através da injeção de aloxana e a sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP). Após a indução do diabetes os ratos permaneceram por 10 dias sendo no décimo dia realizada a cirurgia para modelo de sepse. As amostras foram coletadas 6 horas após a realização da CLP. A determinação dos parâmetros bioquímicos foi realizada através de aparelho bioquímico automatizado e os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de ensaios realizados com soros obtidos de ambos os grupos (controle e diabético) bem como dos grupos (sham, CLP e CLP + i). Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. ^b $<0,001$; ^c $<0,05$. Foram utilizados de 4 a 8 animais em cada grupo.

O outro parâmetro renal avaliado foi a creatinina. Em ambos os grupos os valores estavam dentro da normalidade e nenhuma relação estatística significativa foi encontrada (dados não mostrados).

Figura 19: Tecido renal dos ratos. Fotomicrografia do tecido renal dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais. A – tecido renal do animal controle; B – tecido renal do animal diabético; C – tecido renal do animal controle que passou pelo processo de ligadura e perfuração do ceco (CLP); D – tecido renal do animal diabético que passou pelo processo de ligadura e perfuração do ceco (CLP); E – tecido renal do animal controle que passou pelo processo de ligadura e perfuração do ceco pré-tratado com insulina (CLP + i); F – tecido renal do animal diabético que passou pelo processo de ligadura e perfuração do ceco pré-tratado com insulina (CLP + i). Após 6 horas do processo de ligadura e perfuração do ceco é possível observar alterações glomerulares, como capilares glomerulares dilatados, redução do espaço de Bowman e ausência de infiltrado neutrofílico. (barras A -F = 100µm; G=25µm). Glomérulos (G); espaço de Bowman (setas); dilatação de capilares glomerulares (*). Figuras representativas de 4 animais por grupo experimental. H/E.

A análise histológica do tecido renal mostra a ausência de infiltrado neutrofílico, no entanto, já é possível observar alterações glomerulares, como capilares do glomérulo dilatados e redução do espaço de Bowman.

A Figura 19 mostra essas alterações em cada grupo avaliado. Além disso, a exemplo do ocorrido no pulmão e fígado, a análise da atividade da MPO apresentou-se negativa em todas as amostras (dados não mostrados).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O modelo de diabetes induzida por aloxana tem sido utilizado pelo nosso grupo como um modelo animal de diabetes insulino-dependente (Revisto por SUNAHARA, SANNOMYIA, MARTINS, 2012). Animais tornados diabéticos, exibiram perda de peso corpóreo durante o período de estabelecimento da doença (10 dias) e concentrações plasmáticas elevadas de glicose, por comparação com os respectivos controles, que são características do estado insulinopênico. Os animais do grupo controle apresentaram, após os dez dias, ganho de peso corporal e normoglicemia. Devido a esses resultados, foi possível separar os animais em grupo controle e diabético.

A sepse é um dos mais complicados modelos animais para representar as condições clínicas, portanto, diferentes modelos foram desenvolvidos desde a administração de toxinas exógenas como o zimosan ou o LPS, passando pela infusão de patógenos viáveis e chegando ao modelo de lesar a barreira intestinal que é o caso da CLP. Este modelo tem sido largamente utilizado no estudo da patofisiologia da sepse e comparado com outros, possui uma melhor representação da complexidade que é a sepse em humanos (DEJAGER, et al., 2011).

A lesão tecidual causada pela laparotomia, a necrose causada pela ligação do ceco e a infecção devido às perfurações que permitem o vazamento da microbiota para o peritônio, são os três pilares do modelo CLP. A peritonite causada evolui para a translocação das enterobactérias para a corrente sanguínea, ativando assim, a resposta inflamatória sistêmica que culminará, com o choque séptico. Esse modelo apresenta várias vantagens, pois se trata de um procedimento cirúrgico simples, possui a presença de um foco infeccioso, simula bem a progressão da sepse em humanos com fases hemodinâmicas e metabólicas semelhantes e, além disso, alterna fases hiper-inflamatórias como hipo-inflamatórias, assim como em humanos. Algumas desvantagens são a formação de abscesso e as variações da severidade da sepse, devido principalmente aos procedimentos experimentais (DEJAGER et al., 2011; ROCHA et al., 2007).

No presente estudo, após o tratamento cirúrgico dos animais, podemos observar que houve um aumento agudo na glicemia dos animais controle sham. Isso pode ser devido ao uso de anestésicos como a xilasina e cetamina, uma vez que, assim como o isoflurano, provocam efeitos profundos nos níveis sanguíneos de glicose (SAHA, et. al., 2005). A anestesia utilizando esses medicamentos provoca uma hiperglicemia aguda em ratos já alimentados, no caso de animais em jejum apenas discretas elevações da glicemia são observadas (SAHA, et. al., 2005). Além disso, outro estudo demonstrou que ao utilizar a combinação dessas substâncias anestésicas, houve uma elevação nos níveis plasmáticos de glicose em comparação com grupo controle e com outra substância para anestesia (RODRIGUES, et. al., 2006). Apesar disso, a hiperglicemia dos animais controle que foram submetidos à indução da sepse por CLP apresentou-se em níveis ainda mais elevados que os dos ratos controle sham. Isso pode ser explicado devido às alterações metabólicas causadas pela sepse (JESCHKE, et al., 2004).

A patogênese dessa hiperglicemia é multifatorial, em situações de estresse-induzido a elevação dos níveis de hormônios contrarregulatórios é bem comum, como é o caso de elevações na concentração de catecolaminas, glucagon, cortisol, hormônio de crescimento (GH) que promovem a glicogenólise hepática e aumentam a gliconeogênese (BRIERRE, et. al., 2004). Apesar disso, há também um aumento, simultâneo, na liberação de insulina. No entanto, uma resistência à insulina é induzida por citocinas próinflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF. Esses fatores combinados levam à um estado hiperglicêmico de animais ou pacientes sem diabetes (BRIERRE, et. al., 2004).

A dose para o tratamento com insulina foi escolhida baseada em estudos prévios do nosso grupo (De OLIVEIRA, et. al., 2006; MARTINS, et. al., 2009 e 2010) uma vez que a quantidade utilizada era suficiente para restaurar os parâmetros inflamatórios que estão suprimidos em ratos diabéticos. Além disso, o uso da insulina nos animais diabéticos foi o suficiente para reduzir a glicemia, porém, não em dose para normalizá-la. Dessa forma, podemos inferir que as alterações dos parâmetros

inflamatórios, se ocorrerem, são decorrentes mais em função do tratamento com insulina exógena do que em função da hiperglicemia, uma vez que ambos os animais permaneceram diabéticos com glicose sanguínea acima de 200 mg/dL. Por outro lado, o uso da insulina nos animais controle e sépticos produziu uma hipoglicemia moderada.

Em trabalho anterior, utilizando-se modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS, experimentos foram conduzidos 1, 2, 3 e 6 horas após a instilação com LPS (MARTINS, 2006). Observou-se no LBA dos animais que na 1ª hora as células mononucleares representaram 84% do total, mantendo-se, em número, até a 3ª hora e reduzindo-se à 7% na 6ª hora, enquanto os neutrófilos representaram apenas 16% do total de células na 1ª hora e 93% na 6ª hora aumentando, portanto, 18 vezes. As concentrações de IL-1 β e TNF- α também foram maiores na 6ª hora (De Oliveira, et. al., 2006). Assim, neste modelo optamos por realizar os experimentos 6 horas após a indução da sepse por CLP, na tentativa de comparar os resultados obtidos por esse trabalho. No entanto, não foi observado inflamação pulmonar secundária em nosso modelo.

No nosso modelo de sepse observamos que não houve alterações em parâmetros hematológicos como hematimetria, hemoglobina e plaquetas. No entanto, em relação à leucometria global, os animais sépticos tanto do grupo controle como do grupo diabético apresentaram uma leucopenia (leucócitos totais < 4000 células/mm³) estatisticamente significativa em relação aos animais sham. Essa diminuição pode ser explicada pela intensa migração neutrofílica para o foco primário da infecção, que nesse caso, é o peritônio. No entanto, não foi observada diferença entre os animais sépticos não-diabéticos com os animais diabéticos sépticos e, além disso, a utilização da insulina não modificou esse parâmetro em ambos os grupos.

Para avaliação da peritonite provocada pela sepse e de uma possível resposta inflamatória secundária no pulmão, foram coletados os lavados peritoneais e broncoalveolares para a realização da contagem total e diferencial de células.

A inflamação pulmonar não foi observada já que a citometria total do LBA se mostrou inalterada e, além disso, o perfil de citocinas mostrou que de fato não existe um processo inflamatório secundário ao CLP analisado 6 horas após duas perfurações, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de citocinas proinflamatórias e anti-inflamatória no LBA. A análise morfológica do pulmão também não evidenciou nenhuma alteração pulmonar nem a presença de infiltrado neutrofílico e a atividade da MPO também foi negativa. Essas características foram observadas em todos os grupos, talvez por se tratar de um modelo de sepse com 6 horas de duração, uma vez que para o estabelecimento da pneumonia, neste modelo seria necessário um tempo maior (MUENZER et al, 2006) ou então aumentar o número de perfurações do ceco (FILGUEIRAS et. al., 2012).

No peritônio a contagem celular do lavado dos animais submetidos à CLP apresentou valores elevados em relação aos animais sham tanto no grupo controle como no dos animais diabéticos, indicando um processo inflamatório no local da cirurgia. Nesse caso, não houve diferença estatística significativa entre os animais diabéticos CLP com os animais controle CLP e, além disso, a utilização da insulina não modificou o perfil desse parâmetro em ambos os grupos.

No LPe, o perfil de citocinas encontrado representa um modelo clássico de inflamação, com aumento de todas as citocinas analisadas dos animais submetidos à indução da sepse em relação aos controles. Nesse caso, tanto para o grupo diabético quanto para o controle a relação obtida foi mesma. Apenas o TNF- α que não apresentou diferenças entre nenhum dos grupos de animais. Também nesse caso, não houve diferença entre os animais diabéticos CLP para os animais controle CLP e, assim como as demais análises, o tratamento com insulina não alterou o perfil de citocinas em nenhum dos grupos analisados.

Na tentativa de rastrear alguma disfunção de órgãos no modelo de 6 horas após CLP, foram dosados marcadores de função renal (uréia e creatinina) e de função hepática (ALT, AST e FAL). Observou-se que os ratos do grupo diabéticos sépticos (CLP) possuem os maiores valores dos

marcadores hepáticos avaliados em relação estatística significativa com os animais diabéticos sham. Além disso, com a indução da sepse nos animais diabéticos, o nível sérico da ALT foi bastante elevado em relação ao mesmo representante no grupo controle com sepse (CLP). Esse animal diabético com sepse quando tratado com insulina apresentou uma redução importante no valor desse marcador chegando a níveis próximos do valor do animal controle sem sepse (sham). Resultados semelhantes foram encontrados para as dosagens de AST.

Isso pode ter ocorrido devido a um aumento da expressão de PRRs como TLR-4 e TLR-2, causada pela hiperglicemia persistente nos animais diabéticos. Já foi demonstrado que o consumo de glicose e outros macronutrientes induzem o estresse oxidativo e a inflamação em nível celular e molecular (DANDONA, et. al., 2013). Em virtude disso, quando se induz uma sepse polimicrobiana em um animal que já apresenta uma elevada expressão desses receptores, os danos são intensificados, tanto por vias dependentes de TLRs (DANDONA, et. al., 2013) como de vias não dependentes (DEAR, et. al., 2006). Dentro desse contexto de ativação da inflamação, a insulina atua suprimindo a expressão de alguns PRRs como TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-7 e TLR-9 (GHANIM, et. al., 2008) e, além disso, DANDONA e colaboradores (2001) verificaram um potencial efeito inibitório da insulina pela redução intracelular de NF- κ B. Estudos *in vitro* têm demonstrado que a insulina suprime a expressão das ICAM-1, das CCCL-2 também impede a ligação do NF- κ B ao núcleo (KARAMITSOS, 2011). Além disto, em modelo murino, foi demonstrado uma redução na lesão de órgãos secundária à sepse após tratamento com insulina (BARKHAUSEN, *et al.*, 2009).

No caso da FAL, os ratos diabéticos já apresentavam valores elevados dessa enzima em relação ao grupo de animais controle antes da indução da sepse (CLP). Após o procedimento cirúrgico de perfuração do ceco os valores dessa enzima permaneceram inalterados nos animais diabéticos bem como no controle. No entanto, a utilização da insulina provocou uma diminuição significativa em relação aos animais diabéticos sépticos.

Uma das explicações para a disfunção de órgãos localizados longe do foco da infecção pode ser atribuída à ativação inapropriada, o acúmulo de neutrófilos dentro da microcirculação próxima a determinados órgãos e à migração neutrofílica para regiões diferentes do foco primário (BROWN, *et al.*, 2006). Nesse caso, como não houve a presença de infiltrado neutrofílico no tecido hepático, essas alterações podem ser devido a um aumento na quantidade dos *glucose transportes* (GLUT)-2 e a indução da expressão gene *sterol response elemento-binding protein* (SREBP)-1 provocado pela hiperglicemia (IM, *et. al.*, 2005). Este fator de transcrição ativa diretamente a expressão de inúmeros genes responsáveis pela síntese, através de metabólitos da glicose, e captação de colesterol, ácidos graxos, triglicerídeos e fosfolipídios (HORTON; GOLDSTEIN; BROWN, 2002). Esse cenário pode gerar a *Nonalcoholic Fatty Liver Disease* (NAFLD) que é a retenção de triglicerídeos nos hepatócitos causado por qualquer outra fator que não seja a ingestão de álcool (REGNELL; LERNMARCK, 2011). A presença da FAL elevada no animal diabético sham é um indicador de uma obstrução hepática inicial e, quando, a sepse é induzida a persistente elevação dessa enzima concomitante com as aminotransferases (ALT/AST) é um forte indicador dessa doença (REGNELL; LERNMARCK, 2011). No presente estudo, após 6 horas de CLP já foi possível observar discretas alterações no citoplasma dos hepatócitos. A utilização da insulina, além da modulação inflamatória já mencionada, reduz a gliconeogênese hepática, aumenta a síntese de glicogênio e reduz a expressão de GLUT-2 (REGNELL; LERNMARCK, 2011). Esses mecanismos reduzem a disponibilidade de glicose no hepatócito para a via lipogênica, melhorando assim a NAFLD.

Em relação aos marcadores renais, o grupo de ratos diabéticos sham apresentam níveis elevados de uréia em relação ao grupo controle sham. Após o procedimento cirúrgico de ligadura e perfuração do ceco, os animais diabéticos com sepse sofrem uma elevação ainda maior dos níveis séricos de uréia, com uma relação estatística significativa com os ratos sham diabéticos. Além dessa diferença importante, existe uma

relação estatística significativa entre os animais controle com sepse e os ratos diabéticos sépticos.

Aparentemente, a sepse intensifica uma lesão renal que já estava acontecendo devido ao diabetes. A hiperglicemia persistente, além de induzir o estresse oxidativo e a inflamação (DANDONA, et. al., 2013) induz também uma disfunção mitocondrial renal que só é corrigida com a normoglicemia. No presente estudo a utilização da insulina parece não melhorar esse parâmetro renal uma vez que a concentração tóxica de glicose é mantida, causando uma sobrecarga no córtex renal e provocando o mau funcionamento da mitocôndria, que culmina com a disfunção do órgão (VANHOREBEEK, et. al., 2009).

A análise histológica do tecido renal mostra a ausência de infiltrado neutrofílico, confirmado pela atividade de MPO negativa. No entanto, já é possível observar alterações glomerulares, como capilares do glomérulo dilatados e redução do espaço de Bowman.

Nesse contexto, foi observado certo grau de disfunção hepática e renal no modelo de CLP de 6 horas com duas perfurações. As análises morfológicas confirmaram essas alterações, no entanto, não foi observado infiltrado neutrofílico em nenhum dos órgãos avaliados. A insulina não alterou a migração celular para o foco de infecção, não alterando também o perfil de citocinas no peritônio. No entanto, foi evidenciada uma melhora nos parâmetros hepáticos com a utilização desse peptídeo nos animais diabéticos.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

No modelo experimental de sepse por CLP com duas perfurações com as análises sendo realizadas após 6 horas do procedimento cirúrgico em animais saudáveis e diabéticos observou-se que:

- a) Animais do grupo diabético e controle após o procedimento cirúrgico para indução da sepse (CLP) apresentaram leucopenia, aumento da contagem celular, elevação dos níveis das citocinas IL-1 β , IL-6, CINC-1 e CINC-2 e IL-10, no LPe;
- b) Parâmetros como hematimetria, hemoglobina, plaquetometria, creatinina, contagem celular total e perfil de citocinas no LBA, análise morfológica e MPO no tecido pulmonar não apresentaram nenhuma alteração tanto no grupo de animais diabético como no grupo controle;
- c) Animais diabéticos quando submetidos à CLP apresentam uma elevação dos níveis séricos das enzimas hepáticas AST e ALT quando comparados ao animal controle com CLP. A FAL já possui valores elevados nos animais diabéticos independente do procedimento cirúrgico. Além disso, já foi possível observar discretas alterações nos hepatócitos pela análise morfológica, porém, sem infiltrado neutrofílico;
- d) Animais diabéticos apresentam valores elevados de uréia quando comparados aos ratos sham do grupo controle. No entanto, após a indução da sepse por CLP, esses níveis aumentam consideravelmente. Em uma CLP de 6 horas já foi possível observar alterações morfológicas nos glomérulos, porém, sem infiltrado neutrofílico;
- e) O tratamento com insulina reduziu os níveis das enzimas hepáticas para valores próximos do normal. O mesmo efeito não foi observado nos demais parâmetros avaliados;

Em conjunto, os resultados obtidos neste modelo de sepse por CLP com duas perfurações, sugerem que a insulina possui um efeito protetor apenas em relação ao fígado e que o padrão causado pela sepse nos controles e nos animais diabéticos não foi modificado pelo tratamento com insulina.

REFERÊNCIAS

AKIRA S.; TAKEDA K.; KAISHO T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature Immunology**. v. 2, p. 675-680, 2001.

ALBA-LOUREIRO, T. C; MUNHOZ, C. D; MARTINS, J. O; CERCHIARO, G. A; SCAVONE, C; CURI, R; SANNOMYIA, P. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 40, p. 1037 – 1044, 2007.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes – 2012. **Diabetes Care**. v. 35, s.1, p. S11 – S63, 2012.

ANGUS, D. C; LINDE-ZWIRBLE, W. T; LIDICKER, J; CLERMONT, G; CARCILLO, J; PINSKY, M.R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**. v. 27, n. 7, p. 1303-1310, 2001.

ANGUS, D. C; ABRAHAM, E. Intensive insulin therapy in critically illness – When is the evidence enough? **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 172, p. 1358 – 1359, 2005.

BAPTISTE, E. J. Cellular Mechanism in Sepsis. **Journal of Intensive Care Medicine**. v. 22, p. 63 – 72, 2007.

BARKHAUSEN, T; PROBST, C; HILDEBRAND, F; PAPE, H. C; KRETTEK, C; van GRIENSVEN, M. Insulin therapy induces changes in the inflammatory response in a murine 2-hit-model. **Injury**. v.40, p. 806 – 814, 2009.

BHARGAVA, M; WENDT, C. H. Biomarkers in acute lung injury. **Translational Research**. v. 159, n.4, p. 205 – 217, 2012.

BLEUTER, B. Toll-like receptors: how they work and what they do. **Current Opinion in Hematology**. v. 9, p. 2-10, 2002.

BOCHUD, P. Y; GLAUSER, M. P; CALANDRA, T. Antibiotics in sepsis. **Intensive Care Medicine**. v. 27, p. S33 – S48, 2001.

BRADLEY, P. P; PRIEBAT, D. A; CHRISTENSEN, R. D; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of Investigative Dermatology**. v, 78, p. 206 – 209, 1982.

BRIERRE, S; KUMARI, R; DEBOISBLANC, B. P. The endocrine system during sepsis. **The American Journal of the Medical Science**. v. 328, n. 4, p. 238 – 247, 2004.

BROWN, K. A; BRAIN, S. D; PEARSON, J. D; EDGEWORTH, J. D; LEWIS, S. M; TREACHER, D. F. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. **The Lancet**. v. 368, p. 157 – 169, 2006.

COELHO, F. R; MARTINS, J. O. Diagnostic methods in sepsis: the need of speed. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 58, n. 4, p. 498 – 504, 2012.

COHEN, J. Non-antibiotic strategies for sepsis. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 15, n. 4, p. 302 - 307, 2009.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**. v. 420 n. 19, p. 885 – 891, 2002.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; MOHANTY, P.; GHANIM, H.; HAMOUDA, W.; ASSIAN, E.; AHMAD, S. Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kB and stimulates IkB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 86, p. 3257-3265, 2001.

DANDONA, P; CHAUDHURI, A; GHANIM, H; MOHANTY, P. Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effect of insulin: relevance to cardiovascular disease. **The American Journal of Cardiology**. v. 99, n. 4A, p. 16B – 26B, 2007.

DANDONA, P; CHAUDHURI, A; GHANIM, H; MOHANTY, P. Insulin as an anti-inflammatory and antiatherogenic modulator. **Journal of The American College of Cardiology**. v. 53, n. 5, s. S, p. S14 – S20, 2009.

DANDONA, P; GHANIM, H; GREEN, K; SIA, C. L; ABUAYSHEH, S; KUHADIYA, N; BATRA, M; DHINDSA, S; CHAUDHURI, A. Insulin infusion suppresses while glucose infusion induces toll like receptors and high mobility group-B1 protein expression in mononuclear cells of type 1 diabetics. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**. New York, 2013. In press. Disponível:<http://ajpendo.physiology.org/content/early/2013/02/08/ajpendo.00566.2012.full.pdf>.

DEAR, J. W; YASUDA, H; HU, X; HIENY, S; YUEN, P. S. T; HEWITT, S. M; SHER, A; STAR, R. A. Sepsis-induced organ failure is mediated by different pathways in the kidney and liver: acute renal failure is dependent on MyD88 but not renal cell apoptosis. **Kidney International**. v. 69, p. 832 – 836, 2006.

DEJAGER, L; PINHEIRO, I; DEJONCKHEERE, E; LIBERT, C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends in Microbiology**. v. 19, n.4, p. 198 – 208, 2011.

De OLIVEIRA MARTINS, J; MEYER-PFLUG, A. R; ALBA-LOUREIRO, T. C; MELBOSTAD, H; COSTA DA CRUZ, J. W; COIMBRA, R; CURI, R; SANNOMIYA, P. Modulation of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation: Role of insulin. **Shock**. v. 25, n. 3, p. 260-266, 2006.

DIAS, J. C. R; CAMPOS, J. A. D. B. Diabetes mellitus: razão de prevalências nas diferentes regiões geográficas no Brasil, 2002 – 2007. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 17, n.1, p. 239 – 244, 2012.

ENDO, S; AIKAWA, N; FUJISHIMA, S; SEKINE, I; KOGAWA, K; YAMAMOTO, Y; KUSHIMOTO, S; YUKIOKA, H; KATO, N; TOTSUKA, K; KIKUCHI, K; IKEDA, T; IKEDA, K; YAMADA, H; HARADA, K; SATOMURA, S. Usefulness of procalcitonin serum level for the discrimination of severe sepsis from sepsis: a multicenter prospective study. **Journal of Infection and Chemotherapy**. v. 14, p. 244–249, 2008.

ESPER, A. M; MOSS, M; MARTIN, G. S. The effect of diabetes mellitus on organ dysfunction with sepsis: an epidemiological study. **Critical Care**. v. 13, n. 1, p. 1 – 6, 2009.

FAN, J.; YE, R. D.; MALIK, A. B. Transcriptional mechanisms of acute lung injury. **American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology**. v. 281, p. L1037-L1050, 2001.

FILGUEIRAS, L. R. Jr; MARTINS, J. O; SEREZANI, C. H; CAPELOZZI, V. L; MONTES, M. B. A; JANCAR, S. Sepsis-induced acute lung injury (ALI) is milder in diabetic rats and correlates with impaired NF κ B activation. **Plos One**. v. 7, l. 9, p. 1 – 9, 2012.

GEERLINGS, S. E.; HOEPELMAN, A. I. M. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 26, p. 259-265, 1999.

GEERLINGS, S. E; BROUWER, E. C; VAN KESSEL, K. C; GAASTRA, W; STOLK, R. P; HOEPELMAN, A. L. Cytokine secretion is impaired in women with diabetes mellitus. **European Journal of Clinical Investigation**. v. 30, p. 995-1001, 2000.

GHANIM, H; MOHANTY, P; DEOPURKAR, R; SIA, C. L; KORZENIEWSKI, K; ABUAYSHEH, S; CHAUDHURI, A; DANDONA, P. Acute modulation of toll-like receptors by insulin. **Diabetes Care**. v. 31, p. 1827 – 1831, 2008.

GROSS, J. L; SILVEIRO, S. P; CAMARGO, J. L; REICHELT, A. J; AZEVEDO, M. J. Diabetes melito: diagnostico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v. 66, n. 1, p. 16 – 26, 2002.

HANSEN, T. K; THIEL, S; WOUTERS, P. J; CHRISTIANSEN, J. S; VAN den BERGHE, G. Intensive insulin therapy exerts anti-inflammatory effects in critically ill patients and counteracts the adverse effect of low mannose-binding lectin levels. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 88, n. 3, p. 1082 – 1088, 2003.

HARGREAVES, D. C; MEDZHITOV, R. Innate sensors if microbial infection. **Journal of Clinical Immunology**. v. 25, n. 6, p. 503 – 510, 2005.

HOESEL, L. M.; GAO, H.; WARD, P. A. New Insights into Cellular Mechanisms During Sepsis. **Immunologic Research**. v. 34, n. 2, p.133–141, 2006.

HONIDEN, S; GONG, M. N. Diabetes, insulin, and development of acute lung injury. **Critical Care Medicine**. v. 37, n. 8, p. 2455 – 2464, 2009.

HORTON, J. D; GOLDSTEIN, J. L; BROWN, M. S. SREPBs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 109, n. 9, p. 1125 – 1131, 2002.

HOTCHKISS R. S; KARL I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. **The New England Journal of Medicine**. v. 348, p. 138-150, 2003.

HOTCHKISS R, S; OPAL, S. Immunotherapy for sepsis – a new approach against an ancient foe. **The New England Journal of Medicine**.v. 363, n. 1, p. 87 – 89, 2010.

IM, S. S; KANG, S. Y; KIM, S. Y; KIM, H. K. I; KIM, J. W; KIM, K. S; A, Y. H. Glucose-stimulated upregulation of glut-2 gene is mediated by sterol response element-binding protein-1c in the hepatocytes. **Diabetes**. v. 54, p. 1684 – 1691, 2005

INZUCCHI, S. E; SIEGEL, M. D. Glucose control in the icu – how tight is too tight? **The New England Journal of Medicine**. v. 360, n. 13, p. 1346 - 1349, 2009.

ISH-SHALOM, D; CHRISTOFFERSEN, C. T; VORWERK, P; SACERDOTI-SIERRA, N; SHYMKO, R. M; NAOR, D; De MEYTS, P. Mitogenic properties of insulin analogues mediated by the insulin receptor. **Diabetologia**. v. 40, p. S25 – S31, 1997.

JESCHKE, M. G; KLEIN, D; BOLDER, U; EINSPANIER, R. Insulin attenuates the systemic inflammatory response in endotoxemic rats. **Endocrinology**. v. 145, n. 9, p. 4084 – 4093.

KARAMITSOS, D. T. Antiatheromatic effects of insulin. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v. 93S, p. S105 – S108, 2011.

KAWAI T; ADACHI, O; OGAWA, T; TAKEDA, K; AKIRA, S. Unresponsivness of MyD88-deficient maice to endotoxin. **Immunity**. v. 11, p. 115 - 122, 1999.
KEETON, A. B.; AMSLER, M. O.; VENABLE, D. Y.; MESSINA, J. L. Insulin signal transduction pathways and insulin-induced gene expression. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 227, n. 50, p. 48565-48573, 2002.

KHAM, A. H; PESSIN, J. E. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signaling pathways. **Diabetologia**. v. 45, p. 1475 – 1483.

KOH, G. C; PEACOCK, S. J; van der POLL, T; WIERSINGA, W. J. The impact of diabetes on the pathogenesis of sepsis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious**. v. 31, p. 379 – 388, 2012.

KORNUN, J. B; THOMSEN, R. W; RIIS, A; LERVANG, H; SCHONEYDER, H. C; SORENSEN, H. T. Type 2 diabetes and pneumonia outcomes. **Diabetes Care**. v. 30, n. 9, p. 2251 – 2257, 2007.

KOURY, J. C. A.; LACERDA, H. R; NETO, A. J. B. Fatores de risco associados à mortalidade em pacientes com sepse em unidade de terapia intensiva de hospital privado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. V.19 n.1 p. 23-30. 2007.

LEVY, M. M; FINK, M. P; MARSHALL, J. C; ABRAHAM, E; ANGUS, D; COOK, D; COHEN, J; OPAL, S. M; VINCENT, J. L; RAMSAY, G; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions conference. **Critical Care Medicine**. v. 31, n. 4, p. 1250 – 1256, 2003.

LEWIS, D. H; CHAN, D. L; PINHEIRO, D; CHAN-ARMITAGE, E; GARDEN, O. A. The imunopathology of sepsis: pathogen recognition, systemic inflammation, the compensatory anti-inflammatory response, and regulatory t cells. **Journal of Veterinary Internal Medicine**.v. 26, p. 457 – 482, 2012.

MALERBI, D. A; FRANCO, L. J. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban brazilian population aged 30 – 69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. **Diabetes Care**. v. 15, n. 11, p. 1509 – 1516, 1992.

MARTINS, J. O. **Papel da insulina na produção e liberação de citocinas na vigência da inflamação induzida por lipopolissacarídeo e na inflamação alérgica pulmonar em ratos**. São Paulo. Universidade de São Paulo, 2006.

MARTINS J. O; ZANONI, F. L; MARTINS, D. O; COIMBRA, R; KRIEGER, J. E; JANCAR, S; SANNOMIYA, P. Insulin regulates cytokines and intercellular adhesion molecule-1 gene expression through Nuclear Factor-κB activation in LPS-induced acute lung injury in rats. **Shock**. v. 31, n. 4, p. 404-409, 2009.

MARTINS, J. O; FERRACINI, M; RAVANELLI, N; LANDGRAF, R. G; JANCAR, S. Insulin inhibits LPS-induced signaling pathways in alveolar macrophages. **Cellular Physiology and Biochemistry**. v. 21, p. 297-304, 2008a.

MARTINS, J. O; FERRACINI, M; RAVANELLI, N; LANDGRAF, R. G; JANCAR, S. Insulin Suppresses LPS-Induced iNOS and COX-2 Expression and NF-κB Activation In Alveolar Macrophages. **Cellular Physiology and Biochemistry**. v. 22. p. 279-86, 2008b.

MARTINS, J.O, FERRACINI, M; ANGER, D.B.C; MARTINS, D. O; FILGUEIRAS, L.R. Jr; SANNOMIYA, P; JANCAR, S. Signaling pathways and mediators in LPS-induced lung inflammation in diabetic rats: role of insulin. **Shock**. v. 33, n. 1, pp. 76 – 82, 2010.

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

MEYFROIDT, G; INGELS, C; VAN den BERGHE, G. Glycemic control in the icu. **The New England Journal of Medicine**. v. 364, n. 13, p. 1280, 2011.

MOHR, A; POLZ, J; MARTIN, E. M; GRIEßL, S; KAMMLER, A; PÖTSCHKE, C; LECHNER, A; BRÖKER, B. M; MOSTBÖCK S; MÄNNEL, D. N. Sepsis leads to a reduced antigen-specific primary antibody response. **European Journal of Immunology**. v. 42, p. 341 – 352, 2012.

MORAES, S. A; de FREITAS, I. C; GIMENO, S. G; MONDINI, L. Prevalência de diabetes mellitus e identificação de fatores associados em adultos residentes em área urbana de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 2006: Projeto OBEDIARP. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 26, n. 5, p. 929 – 941, 2010.

MOUNIER, C; POSNER, B. I. Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. v.84, p. 713 – 724, 2006.

MOUTZOURI A. G; ATHANASSIOU G. A; DIMITROPOULOU D; SKOUTELIS A. T; GOGOS C. A. Severe sepsis and diabetes mellitus have additive effects on red blood cell deformability. **Journal of Infection**. v.57, p.147-51, 2008.

MUENZER, J. T; DAVIS, C. G; DUNNE, B. S; UNSINGER, J; DUNNE, W. M; HOTCHKISS, R. S. Pneumonia after cecal ligation and puncture: a clinically relevant “two-hit” model of sepsis. **Shock**. v. 26, n. 6, p. 565 – 570, 2006.

MULLER, L. M. A. J; GORTER, K. J; GOUDZWAARD, W. L; SCHELLEVIS, F. G; HOEPELMAN, A. I. M; RUTTEN, G. E. H. Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Clinical Infectious Diseases**. v. 41, p. 281 – 288, 2005.

MUNFORD, R. S. Severe sepsis and septic shock: The role of gram-negative bacteremia. **Annual Review of Pathology: Mechanism of Disease**. v. 1, p. 467 – 496. 2006.

NAKAGAWA, N. K; NOGUEIRA, R. A; CORREIA, C. J; SHIWA, S. R; COSTA CRUZ, J. W; POLI DE FIGUEIREDO, L. F; ROCHA E SILVA, M; SANNOMIYA, P. Leukocyte-endothelium interactions after hemorrhagic shock/reperfusion and cecal ligation/puncture: an intravital microscopic study in rat mesentery. **Shock**. v. 26, n. 2, p. 180 – 186, 2006.

NOVO NORDISK A/S (Denmark). **Levemir**. US 5750497; 5866538; 6011007; 6869930, 16 may. 2007.

PELEG, A. Y; WEERARATHNA, T; MCCARTHY, J. S; DAVIS, T. M. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**. v. 23, p. 3 – 13, 2007.

PEREIRA, M. A. A; SANNOMIYA, P; GARCIA-LEME, J. Inhibition of leukocyte chemotaxis by factor in alloxan-induced diabetic rat plasma. **Diabetes**. v. 36, p. 1307-1314, 1987.

POLONSKY, K. The past 200 years in diabetes. **The New England Journal of Medicine**. v. 367, n. 14, p. 1332 – 1340, 2012.

REGNELL, S. E; LERNMARK, A. Hepatic steatosis in type 1 diabetes. **The Review of Diabetic Studies**. v. 8, n. 4, p. 454 – 467, 2011.

RICE, T. W; BERNARD, G. R. Therapeutic intervention and targets for sepsis. **Annual Review of Medicine**. V.56, p.225-248, 2005.

ROCHA, S. L; de SOUZA, G. R. M. R; ABUJAMRA, K. B; OSTROWSKY, M. A. B; de SOUZA, M. C. M. R. Gasometria arterial e inflamação pulmonar de ratos com diferentes tempos de sepse abdominal. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**. v. 20, n. 1, p. 28 – 33, 2007.

RODRIGUES, S. F; de OLIVEIRA, M.A; MARTINS, J. O; SANNOMIYA, P; TOSTES, R. C; NIGRO, D; CARVALHO, M. H. C; FORTES, Z. B. Differential effects of chloral hydrate – and ketamine/xylazine-induced anesthesia by the s. c. route. **Life Science**. v. 79, p. 1630 – 1637, 2006.

SAHA, J.K; XIA, J; GRONDIN, J. M; ENGLE, S. K; JAKUBOWSKI, J. A. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. **Experimental Biology and Medicine**. v. 230, p. 777 – 784, 2005.

SALOMÃO R; MARTINS, P. S; BRUNIALTI, M. K; FERNANDES, M. L; MARTOS, L. S; MENDES, M. E; GOMES, N. E; RIGATO, O. TLR signaling pathway in patients with sepsis. **Shock**. v. 30, p. 73-79, 2008.

SCHNEIDER, C; MOSSMANN, F; COLETTI, F; POSSAS, M; DAUDT, M. Taxa de mortalidade e morbidade por diabetes mellitus. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 41, n. 4, p. 287 – 288, 2009.

SCHUETZ, P; YANO, K; SORASAKI, M; NGO, L; HILAIRE, M. St; LUCAS, J. M; AIRD, W; SHAPIRO, N. I. Influence of diabetes on endothelial cell response during sepsis. **Diabetologia**. v. 54, p. 996 – 1103, 2011.

SHAH B. R.; HUX J. E. Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. **Diabetes Care**. v. 3, p. 26:510, 2003.

SHAW, J.E; SICREE, R.A.; ZIMMET, P.T. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v. 87, p. 4 – 14, 2010.

SILVA, E; PEDRO, M. A; SOGAYAR, A. C; MOHOVIC, T; SILVA, C. L; JANISZEWSKI, M; CAL, R. G; de SOUZA, E. F; ABE, T. P; de ANDRADE, J; de MATOS, J. D; REZENDE, E; ASSUNÇÃO, M; AVEZUM, A; ROCHA, P. C; de MATOS, G. F; BENTO; A. M; CORRÊA, A. D; VIEIRA, P. C; KNOBEL, E; BRAZILIAN SEPSIS EPIDEMIOLOGICAL STUDY. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**. v. 8, p.R251-R260. 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. São Paulo, SP, 2009.

SPILLER, F; CARLOS, D; SOUTO, F. O; de FREITAS, A; SOARES, F. S; VIEIRA, S. M; PAULA, F. J; ALVES-FILHO, J. C; CUNHA, F. Q. α 1-Acid Glycoprotein decreases neutrophil migration and increases susceptibility to sepsis in diabetic mice. **Diabetes**. v. 61, p. 1584 – 1591. 2012.

SRISKANDAN, S.; COHEN, J. Gram – Positive Sepsis. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 13, n. 2, p. 397 – 412, 1999.

SRIVASTAVA, A. K; PANDLEY, S. K. Potential mechanism (s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 182, p. 135 – 141, 1998

STEGENGA, M. E; van der CRABEN, S. N; BLÜMER, R. M. E; LEVI, M; MEIJERS, J. C. M; SERLIE, M. J; TANCK, M. W. T; SAUERWEIN, H. P; van der POLL, T. Hyperglycemia enhances coagulation and reduces neutrophil degranulation, whereas hyperinsulinemia inhibits fibrinolysis during human endotoxemia. **Blood**. v. 112, p. 82 – 89, 2008.

STEGENGA, M. E; VINCENT, J. L; VAIL, G. M; XIE, J; HANEY, D. J; WILLIAMS, M. D; BERNARD, G. R; van der POLL, T. Diabetes does not alter mortality or hemostatic and inflammatory responses in patients with severe sepsis. **Critical Care Medicine**. v. 38, n. 2, p.539 – 545, 2010.

SUNAHARA, K. K. S; SANOMIYA, P; MARTINS, J. O. Briefs on insulin and innate immune response. **Cellular Physiology and Biochemistry**. v. 29, p. 01 – 08, 2012.

SUNAHARA, K. K; MARTINS, J. O. Alveolar macrophages in diabetes: friends or foes? **Journal of Leukocyte Biology**. v. 91, n. 6, p. 871 – 876, 2012.

SURATT, B. T; PARSONS, P. E. Mechanisms of acute lung/injury acute respiratory distress syndrome. **Clinics in Chest Medicine**. v. 27, p. 579 – 589, 2006.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual Review of Immunology**. v. 21, p. 335-376, 2003.

TAKEUCHI O; TAKEDA, K; HOSHINO, K; ADACHI, O; OGAWA, T; AKIRA, S. Cellular response to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. **International Immunology**. v. 12, n. 1, p. 113 - 117, 2000.

THE NICE-SUGAR STUDY INVESTIGATORS. Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients. **The New England Journal of Medicine**. v. 360, n. 13, p. 1283 – 1297, 2009.

TOBIAS O. S; SOLDAU, K; KLINE, L; LEE, J. D; KATO, K; MARTIN, T. P; ULEVITCH, R. J. Crosslinking of lipopolysaccharide to CD14 on THP-1 cells mediated by lipopolysaccharide binding protein. **The Journal of Immunology**. v. 150, p. 3011-3021, 1993.

TORQUATO, M. T; MONTENEGRO JÚNIOR, R. M; VIANA, L. A; de SOUZA, R. A; LANNA, C. M; LUCAS, J. C; BIDURIN, C; FOSS, M. C. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30 – 69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil. **São Paulo Medical Journal**. v. 121, n. 6, p. 224 – 230, 2003.

TSUJIMOTO, H; ONO, S; EFRON, P. A; SCUMPIA, P. O; MOLDAWER, L. L; MOCHIZUKI, H.. Role of toll-like receptors in the development of sepsis. **Shock**.v. 29, n. 3, p. 315 – 321, 2008.

VAN den BERGHE, G; WOUTERS, P; WEEKERS, F; VERWAEST, C; BRUYNINCKK, F; SCHETZ, M; VLASSELAERS, D; FERDINANDE, P; LAUWERS, P; BOUILLON, R. Intensive insulin therapy in critically ill patients. **The New England Journal of Medicine**. v. 345, n. 19, p. 1359 – 1367, 2001.

VAN den BERGHE, G; WILMER, A; HERMANS, G; MEERSSEMAN, W; WOUTERS, P. J; MILANTS, I; WIJNGAERDEN, E. V; BOBBAERS, H; BOUILLON, R. Intensive insulin therapy in the medical icu. **The New England Journal of Medicine**. v. 354, n. 5, p. 449 – 461, 2006.

VONHOREBEEK, I; GUNST, J; ELLGER, B; BOUSSEMAERE, M; LERUT, E; DEBAVEYE, Y; RABBANI, N; THORNALLEY, P. J; SCHETZ, M; VAN den BERGHE, G. Hyperglycemic kidney damage in an animal model of prolonged critical illness. **Kidney International**. v. 76, p. 512 – 520, 2009.

WRIGHT, S. D; RAMOS, R. A; TOBIAS, P. S; ULEVITCH, R. J; MATHISON, J. C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding proteins. **Science**. v. 249, p. 1431-1433, 1990.

YAMAMOTO M; SATO, S; HEMMI, H; HOSHINO, K; KAISHO, T; SANJO, H; TAKEUCHI, O; SUGIYAMA, M; OKABE, M; TAKEDA, K; AKIRA, S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. **Science**. v. 301, p. 640-643, 2003.

YENDE, S; VAN der POLL, T; LEE, M; HUANG, D. T; NEWMAN, A. B; KONG, L; KELLUM, J. A; HARRIS, T. B; BAUER, D; SATTERFIELD, S; ANGUS, D. C. The influence of pre-existing diabetes mellitus on the host immune response and outcome of pneumonia: analysis of two multicenter cohort studies. **Thorax**. v. 65, p. 870 – 877, 2010.

ZANONI, I; OSTUNI, R; MAREK, L. R; BARRESI, S; BARBALAT, R; BARTON, G. M; GRANUCCI, F; KAGAN, J. C. CD14 Control the LPS-induced endocytosis of toll-like receptor 4. **Cell**. v. 147, p. 868 – 880, 2011.

ZARJOU, A; AGARWAL, A. Sepsis and acute kidney injury. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 22, p. 999 – 1006, 2011.

ANEXO I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF/166/2011

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "A intervenção da Insulina na expressão de moléculas de adesão em modelo experimental de Sepsis." (Protocolo CEUA/FCF/337), de responsabilidade do **Prof. Dr. Jilson de Oliveira Martins**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi **APROVADO** em reunião de 07 de novembro de 2011.

São Paulo, 17 de novembro de 2011.

Prof. Dr. Marco Antonio 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/46/2012

São Paulo, 6 de junho de 2012.

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

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF/USP, em reunião realizada em 4 de junho de 2012, aprovou a inclusão do mestrando Eduardo Lima Nolasco e da graduanda Luiza Alba Freitas no projeto "A intervenção da Insulina na expressão de moléculas de adesão em modelo experimental de Sepsis." (Protocolo CEUA nº 337).

Atenciosamente,

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS**
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUAOfício CEUA/FCF/92/2012

São Paulo, 10 de setembro de 2012.

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Jollison 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, **aprovou** as alterações do projeto "A intervenção da Insulina na expressão de moléculas de adesão em modelo experimental de Sepsis." (Protocolo CEUA nº 337) de Vossa responsabilidade.

Atenciosamente,

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