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

Ação da insulina na liberação de citocinas por macrófagos residentes de
camundongos diabéticos estimulados com lipopolissacarídeo

Fernando Henrique Galvão Tessaro

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientador:
Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

São Paulo
2014

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

Ação da insulina na liberação de citocinas por macrófagos residentes de
camundongos diabéticos estimulados com lipopolissacarídeo

Fernando Henrique Galvão Tessaro

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientador:
Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

São Paulo
2014

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

T338a Tessaro, Fernando Henrique Galvão
Ação da insulina na liberação de citocinas por macrófagos residentes
de camundongos diabéticos estimulados com lipopolissacarídeo /
Fernando Henrique Galvão Tessaro. -- São Paulo, 2014.
63p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Martins, Joilson de Oliveira

1. Imunologia : Farmacologia 2. Imunologia celular I. T. II.
Martins, Joilson de Oliveira, orientador.

615.37 CDD

Fernando Henrique Galvão Tessaro

Ação da insulina na liberação de citocinas por macrófagos residentes de
camundongos diabéticos estimulados com lipopolissacarídeo

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
orientador/presidente

Marco Aurelio Ramirez Vinolo

Prof. Dr. Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes

São Paulo, 17 de outubro de 2014.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e à minha família, por
ensinarem o melhor caminho e por serem
meus melhores exemplos na vida.
Com amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, à Luz, ao Amor e ao Agora.

Aos meus pais, pelo incentivo, pelo amor, pela confiança e por todos os momentos em que nunca hesitaram em me dar suporte e carinho. Na distância ou não: obrigado por agirem sempre com sapiência e sagacidade. Hoje, dedico tudo de bom e melhor que eu vivi neste período aos dois: vocês merecem cada elogio e cada conquista que tive e terei, pois somos uma só luz, um só coração hoje.

Ao Prof. Joilson, um muito obrigado especial, por me ajudar a realizar este sonho. Mesmo sem me conhecer, aceitou-me de braços abertos em seu laboratório. É, hoje, um grande amigo, que admiro muito – pela competência e pela dedicação ao seu trabalho e, também, aos seus alunos. Agradeço, principalmente, pelas nossas conversas, pois, quando estive a ponto de desistir de muitas coisas, o senhor não deixou que isto tomasse conta de mim e me deu forças para chegar aqui com confiança e conquistar muitas coisas.

A minha querida namorada Thais, hoje uma amiga e um exemplo de determinação. Pretendo agradecer você por muitos momentos ainda. Hoje, uma pessoa essencial para compartilhar os meus momentos no presente: você é muito especial. Obrigado por participar da minha vida e não ter desistido de nós.

A minha amiga Clarice, por ter me guiado e ensinado, a mim, o que é tão valioso: hoje você também faz parte desta conquista. Muito obrigado.

Obrigado a todos do laboratório, pela ajuda no dia a dia, pela amizade e, claro, na realização dos trabalhos. Agradeço, também, a todos os professores das disciplinas que cursei, por todo o conhecimento transmitido para nós, alunos.

À Flávia, agradeço por ter sido paciente em ensinar-me os cuidados e o respeito com os animais.

Aos amigos da república.

Agradeço também, especialmente, às agências de fomento, CNPq, FAPESP e PROEX/CAPES, por darem o apoio necessário à realização desse projeto.

“Look at every path closely and deliberately, then ask ourselves this crucial question: Does this path have a heart? If it does, then the path is good. If it doesn't then it is of no use to us”.

Carlos Castaneda

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 Programa Jovem Pesquisador 2010/02272-0.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 O <i>Diabetes mellitus</i>	13
1.2 O SISTEMA IMUNE NO PULMÃO E NO PERITÔNIO	14
1.2.1 Imunidade inata, macrófagos alveolar e peritoneal	15
1.2.2 A via do TLR-4.....	18
1.3 O <i>Diabetes mellitus</i> E O PAPEL DA INSULINA NO SISTEMA IMUNE.....	21
2 OBJETIVOS	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 ANIMAIS.....	25
3.2 Indução do <i>Diabetes mellitus</i>	25
3.3 Obtenção dos macrófagos e da cultura.....	25
3.4 Tratamento dos macrófagos alveolar e peritoneal	26
3.5 Reação de Griess.....	27
3.6 Quantificação de citocinas por ensaio imunoenzimático	27
3.7 Análise estatística	28
4 RESULTADOS	29
4.1 Caracterização do modelo.....	29
4.2 Condições do tratamento	30
4.3 Evolução temporal da produção de NO	31
4.4 Evolução temporal da produção do TNF- α	32
4.5 Evolução temporal da produção de IL-10.....	34
4.6 Dosagem das citocinas IL-4, IFN- γ e IL-6	36
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO	49
7 REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO I.....	62

RESUMO

TESSARO, F. H. G. **Ação da insulina na liberação de citocinas por macrófagos residentes de camundongos diabéticos estimulados com lipopolissacarídeo.** 2014. 63f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Indivíduos diabéticos apresentam incidência elevada de doenças infecciosas. Isto pode estar relacionado às alterações na capacidade da resposta destes indivíduos aos agentes agressores. Em animais diabéticos, algumas destas alterações já foram descritas, assim como sua reversão pela administração de insulina. Este hormônio regula o metabolismo celular, modulando a atividade de proteínas e mediadores inflamatórios envolvidos neste processo. Sabemos que o lipopolissacarídeo (LPS) estimula, em macrófagos alveolares (MA) de animais não-diabéticos, a liberação do fator de necrose tumoral (TNF)- α e do óxido nítrico (NO). O pré-tratamento deste MA com insulina inibiu todos estes efeitos. Assim, neste projeto, avaliamos o papel da insulina em MA e macrófagos peritoneais (MP) de camundongos, tornados diabéticos pela indução com aloxana (60 mg/kg, i.v.). Uma suspensão contendo 1×10^6 células foi estimulada com LPS (100 ng/mL) na presença ou não de insulina (1mU/mL). Realizamos a evolução temporal (0,5; 1; 3; 6; 24 horas) para a dosagem de NO, TNF- α e interleucina (IL)-10. Nos tempos de maior produção destas citocinas (0,5 e 3 horas), também quantificamos IL-6, *interferon* (IFN)- γ e IL-4. Nossos resultados mostram que a produção/liberação dos mediadores imunes por MA e MP estimulados por LPS, quando tratados simultaneamente com insulina, tiveram uma redução. Assim, a produção/liberação de NO foi reduzida durante 0,5; 1; 3; 6, 24 horas, em MA e em MP; a liberação de TNF- α foi reduzida durante 0,5 hora, em MP; a liberação de IL-6 foi reduzida durante 3 horas, em MA, e 0,5 hora, em MP. Estes dados mostram que a insulina reduziu a liberação destes mediadores inflamatórios, tanto para os MA quanto para os MP, durante o estímulo com LPS, de animais diabéticos já nos primeiros minutos de estímulo com LPS, com um pico de redução, na maioria das vezes, em 3 horas.

Palavras-chave: diabetes, aloxana, macrófago, LPS

ABSTRACT

TESSARO, F. H. G. **Insulin actions on release of cytokines by resident macrophages of diabetic mice stimulated with lipopolysaccharide.** 2014. 63f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Diabetic patients exhibit high incidence of infectious diseases, at least in part, by due impaired immune response against aggressive agents. Lipopolysaccharide (LPS) triggers the releasing of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and nitric oxide (NO) by alveolar macrophages (AM) of non-diabetic animals. The pretreatment using insulin inhibited of these cytokine release. The aim in the present study was to evaluate the insulin role on releasing of cytokines by MA and peritoneal macrophages (MP) of diabetic mouse. Resident AM and MP from diabetic (alloxan 60 mg/kg, i.v.) male C57BL/6 mice (CEUA/FCF/USP-339) stimulated by LPS (100 ng/mL). Insulin (1 mU/mL) insulin treatment was simultaneously with stimulus by LPS. Cytokines were measured by ELISA, and NO by Griess reaction. We performed a time course (0,5; 1; 3; 6; 24 hours), and measured NO, TNF-alpha and interleukin (IL)-10. We also measured IL-6, interferon (IFN)- γ , and IL-4 in 0.5 and 3 hours. Results were evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by multiple comparison Tukey-Kramer or the nonparametric Kruskal-Wallis test. P value were considered when <0.05 . Before the induction of diabetes by alloxan injection in day 0 animals showed: weight ($26\pm0,3$ g) and blood glucose concentration ($164\pm2,6$ mg/dL) - and 10 days after the onset of the disease, diabetic mice presented a lower weight gain ($24 \pm 0,4$ g*) and elevated blood glucose concentration ($546\pm9,7$ mg/dL*). An increase was seen NO release levels and TNF-alpha in the time course (Figure 1); an increase of IL-6 in 3 hours (Figure 3), and a decrease of IL-4 in 3 hours (Figure 5) after LPS stimulation of MA in diabetic animals. In MP, there was an increase of NO levels, and TNF-alpha in the time course (Figure 2); in 3 hours increased IL-6 levels (Figure 4) - under the same conditions. Insulin treatment under stimulation by LPS in MA reduced the levels of NO, IL-6, and TNF-alpha compared to the group stimulated by LPS. Regarding MP, insulin treatment also decreased NO levels, TNF-alpha, and IL-6. IL-4 levels produced by MP, and IFN- γ levels were not be detected in MA and MP under stimulation by LPS, or in the presence of hormone. These findings suggest that insulin reduce the release of these inflammatory mediators by both resident macrophages of diabetic animals concomitantly stimulation by LPS.

Keywords: diabetes, alloxan, macrophage, LPS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sistema fagocitário mononuclear	17
Figura 2 - Representação esquemática das etapas de reconhecimento do LPS pela cascata de reconhecimento padrão extracelular da ligação dos receptores de LPS.....	20
Figura 3 - Delineamento experimental do trabalho desenvolvido.....	26
Figura 4 - Evolução corpórea do peso	29
Figura 5 - Evolução corpórea da glicemia	30
Figura 6 - Evolução temporal da produção de NO por macrófagos alveolares	31
Figura 7 - Evolução temporal da produção de NO por macrófagos peritoneais...	32
Figura 8 - Evolução temporal da produção do TNF- α por macrófagos alveolares....	33
Figura 9 - Evolução temporal da produção do TNF- α por macrófagos peritoneais...	34
Figura 10 - Evolução temporal da produção da IL-10 por macrófagos alveolares	35
Figura 11 - Evolução temporal da produção da IL-10 por macrófagos peritoneais...	36
Figura 12 - Produção de IL-6 por macrófagos alveolares	37
Figura 13 - Produção da IL-6 por macrófagos peritoneais	38
Figura 14 - Produção da IL-4 por macrófagos alveolares	40
Figura 15 - Papel da insulina na ativação por LPS em MA e MP durante 0,5 e 3 horas de estímulo.....	48
Quadro 1 - Grupos utilizados no desenvolvimento do trabalho.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AP	<i>Activator Protein</i> (Proteína ativadora)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Proteína sérica bovina)
CINC	<i>Cytokine induced neutrophil chemoattractant</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Grupo de diferenciação)
COX	Ciclo-oxigenase
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DM1	<i>Diabetes Mellitus</i> do tipo 1
DM2	<i>Diabetes Mellitus</i> do tipo 2
GLUT	<i>Glucose Transporter</i> (Transportador de Glicose)
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IG	<i>Imunoglobulin</i> (Imunoglobulina)
IKK	<i>IkB kinase</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)
IRAK	<i>IL-1 receptor associated kinase</i>
ISGs	<i>Interferon stimulated genes</i>
LBA	Lavado broncoalveolar
LBP	<i>Lipopolysaccharide-Binding Protein</i> (Proteína ligante de LPS)
LPe	Lavado peritoneal
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i> (Lipopolisacarídeo)
MA	Macrófagos alveolares
Mal	<i>MyD88 adapter-like</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MP	Macrófagos peritoneais
MyD88	<i>Myeloid Differentiation factor 88</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i> (Óxido Nítrico)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMP	<i>Pathogens Associated Molecular Pattern</i> (Padrões Moleculares)

	Associados a Patógenos)
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> (Tampão fosfato salina)
PG	<i>Prostaglandin</i> (Prostaglandina)
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i> (Receptores que reconhecem padrões)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécies reativas de oxigênio)
sCD14	<i>Soluble cluster of differentiation 14</i>
SP	<i>Surfactante pulmonar</i>
TAK	<i>Transforming growth factor β activated kinase 1</i>
TICAM	<i>TIR domain-containing adapter molecule 2</i>
TIR	<i>Toll interleukin-1 receptor</i> (Receptor <i>Toll</i> -IL-1)
TLR	Toll-LikeReceptors (Receptores do tipo <i>Toll</i>)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
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>)
UI	Unidade Internacional

1 INTRODUÇÃO

1.1 O *Diabetes mellitus*

O *Diabetes mellitus* (DM) é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam, em comum, a hiperglicemia, a qual é resultado de defeitos na ação da insulina, na secreção da insulina ou de ambos. A classificação atual baseia-se na etiologia da doença. A Sociedade Brasileira de Diabetes utiliza a classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA), dividindo-o em quatro classes clínicas: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2012-2013). O DM1 é resultado da destruição das células beta-pancreáticas, levando à deficiência da insulina. O DM2 é resultado da secreção defeituosa e progressiva de insulina, causada pela resistência insulínica periférica. Outros tipos específicos de DM (devido a outras causas): defeito genético no funcionamento das células beta-pancreáticas; defeito genético na ação da insulina; doenças do pâncreas exócrino; diabetes induzida por drogas ou quimioterápicos; e diabetes causada pela destruição do pâncreas. O DM gestacional relaciona-se ao diagnóstico durante a gravidez (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2012-2013).

O DM, por muito tempo, foi tido como uma doença sem importância para a saúde mundial; entretanto, em 2000, já se pensava no DM como um grande risco para a população global (ZIMMET, 2000). Atualmente, o DM é considerado uma epidemia mundial; segundo a *International Diabetes Federation* (2013), mais de 371 milhões de pessoas têm DM. O Brasil ocupa o quarto lugar no ranking dos países com maior prevalência, tendo 13,4 milhões de pessoas com DM. A OMS estima que, até 2030, o DM seja a sétima principal causa de morte entre a população no planeta (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

A incidência dos casos de DM1 tem aumentado nas últimas décadas. Em 2005, na Europa, havia 15.000 casos/ano, que foram reunidos em três grupos, de acordo com a faixa etária: 0-4 anos com 24%, 5-9 anos com 35% e 10-14 anos com 41%. Para 2020, estima-se o número de novos casos em 24.400/ano, com distribuição mais uniforme, embora duplicado em crianças menores do que 5 anos. A nova previsão sugere que a incidência em crianças de 0 a 4 anos seja de 29%, entre 5 e 9 anos de 37% e 10-11 anos de 34%. A prevalência total nos indivíduos

com menos de 15 anos está prevista para aumentar de 94.000, em 2005, para 160.000 até 2020 (DIAMOND STUDY GROUP, 2006; PATTERSON *et al.*, 2009). Segundo a *International Diabetes Federation* (2013), há cerca de 500 mil indivíduos com DM1 na faixa etária de 0 a 14 anos, sendo que o número de novos casos por ano é de 79,1 mil, com taxa de crescimento anual de 3%. No Brasil, o número é de 8,5-14 novos casos/ano para 100 mil crianças.

Especificamente, o DM1 é uma doença autoimune, possui perfil crônico e acomete, na maioria das vezes, indivíduos geneticamente susceptíveis. A fisiopatologia da doença está relacionada com a destruição das células beta presentes no pâncreas e que são responsáveis pela produção de insulina. A destruição ocorre pelo sistema imune, causando danos, ocasionando a morte das células e chegando à redução e/ou eventualmente à eliminação da produção de insulina. O DM1 é responsável por cerca de 5 a 10% de todos os casos de DM em todo o mundo (ATKINSON; EISENBARTH, 2001; VAN BELLE *et al.*, 2011). Embora com grande aumento dos casos de DM1, o DM2 é o mais frequente, dentre as variações da doença, sendo responsável por cerca de 90% dos casos (SCHNEIDER *et al.*, 2009).

1.2 O SISTEMA IMUNE NO PULMÃO E NO PERITÔNIO

O pulmão possui a maior superfície epitelial do corpo e é continuamente exposto à significativa variedade de agentes potencialmente patogênicos, como microrganismos nocivos, alérgenos e partículas poluentes; por conta disso, por meio dos componentes inatos e adaptativos do sistema imune, o pulmão desenvolveu um complexo mecanismo de proteção e manutenção fisiológica (WHITSETT, 2002; ZAAS & SCHWARTZ, 2005; SUZUKI *et al.*, 2005). A porção celular presente no sistema inato e adaptativo na defesa pulmonar inclui células estruturais, como as epiteliais, os fibroblastos e as células de origem hematopoiética que migram e/ou residem no pulmão. As principais células hematopoiéticas são os neutrófilos, os monócitos/macrófagos, os mastócitos, as células dendríticas e os linfócitos (ABRAHAM; THANKAVEL, 1997; WHITSETT, 2002; ZAAS; SCHWARTZ, 2005). Os pulmões possuem, também, os fluidos alveolares, que são os componentes solúveis das vias aéreas que possuem papel importante na imunidade inata. Há presença de

lisozima, que atua lisando a membrana bacteriana; lactoferrina, que exclui o ferro do metabolismo bacteriano; imunoglobulina (Ig) A, IgG e defensinas (BECKER *et al.*, 2000; LEHRER, 2004). Em particular, há outro grupo de moléculas, as proteínas surfactantes pulmonares (SP)-A e SP-D, que são membros da família das colectinas e promovem a fagocitose de partículas por macrófagos alveolares (MA). Além disso, o fluido alveolar contém altas concentrações da proteína ligante de LPS (LBP) e *cluster of differentiation* solúvel 14 (sCD14), que são as moléculas que participam do reconhecimento do lipopolissacarídeo (LPS) por MA (MARTIN *et al.*, 1992; MARTIN *et al.*, 1997; MARTIN; FREVERT, 2005).

O peritônio é a maior membrana serosa do corpo, sendo composto por três camadas: o mesotélio, a membrana basal e o tecido conjuntivo submesotelial (YOUNG *et al.*, 2013). O peritônio é um ambiente estéril e reage a vários estímulos patológicos, com resposta inflamatória uniforme (PAVLIDIS, 2003). O fluido peritoneal contém uma variedade de células em circulação, incluindo macrófago peritoneal (MP), células mesoteliais, linfócitos, eosinófilos e mastócitos. Os granulócitos normalmente estão presentes em baixa quantidade no estado basal, porém, na inflamação, há aumento no número destas células (HILL *et al.*, 1988).

1.2.1 Imunidade inata e macrófagos (alveolar e peritoneal)

Os macrófagos são componentes importantes na defesa do organismo, tanto na imunidade inata quanto na adquirida; seu papel é manter o hospedeiro livre de estímulos que possam prejudicar o organismo, como as injúrias ambientais ou congênitas. O macrófago age como célula apresentadora de antígeno e célula efetora e participa na imunidade mediada por células (GEISSMANN *et al.*, 2010). Dessa forma, os macrófagos são considerados importantes para a manutenção da homeostasia dos tecidos e sua variedade de funções é atribuída à sua notável plasticidade (MOSSER; EDWARDS, 2008; BISWAS; MANTOVANI, 2010). As células precursoras dos macrófagos são geradas a partir de células-tronco hematopoiéticas comprometidas na medula óssea, que são liberadas para a corrente sanguínea como monócitos e diferenciam-se em macrófagos, na migração para os tecidos (Figura 1). Os macrófagos podem ser divididos em dois grupos: os macrófagos recrutados e os macrófagos tecido-residentes. Os macrófagos tecido-

residentes formam subpopulações especializadas, de acordo com sua localização anatômica e com os fatores produzidos localmente (POLLARD, 2009; GEISSMANN *et al.*, 2010; MURRAY, WYNN, 2011). Os macrófagos tecido-residentes incluem os osteoclastos, presentes nos ossos, as células de Kupffer, no fígado, e os MA, nos pulmões, formando um conjunto de células que são parte integrante da homeostasia do tecido (POLLARD, 2009; MURRAY; WYNN, 2011). Macrófagos tecido-residentes expressam grande variedade de receptores para o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) e padrões moleculares associados ao dano (DAMP), tais como receptores do tipo Toll (TLR), receptores do tipo NOD (NOD), lectinas e receptores *scavenger* (Revisado por DAVIES *et al.*, 2013).

Na presença de infecção ou lesão tecidual, os macrófagos ativam as funções de defesa do hospedeiro, que incluem, principalmente, a produção de citocinas e quimiocinas e a morte microbiana. Quando ativados, os macrófagos polarizam para vários fenótipos funcionais, dependendo, inicialmente, do agente patogênico e das citocinas presentes no microambiente (MOSSER; EDWARDS, 2008; GORDON, S.; MARTINEZ, 2010). A polarização melhor caracterizada é a ativação clássica, também denominada M1, induzida por *interferon* (IFN)- γ , Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF), LPS e outros produtos microbianos, que estimulam os TLR. Outra polarização descrita é a ativação alternativa, conhecida também por M2, induzida por célula T auxiliar 2 e citocinas, como interleucina (IL)-4, IL-13, fator de transformação de crescimento (TGF)- β , glicocorticoides e complexos imunes (LAWRENCE; NATOLI, 2011). Os macrófagos M1 são eficazes na defesa do hospedeiro e eliminam os patógenos, mas podem causar toxicidade colateral e danos nos tecidos; estas células possuem expressão elevada de moléculas efetoras, como a fator de necrose tumoral (TNF)- α , a IL-1, a IL-12, as moléculas antimicrobianas, as espécies reativas de oxigênio (ROS) e o nitrogênio (NOS) (SICA; MANTOVANI, 2012). Os macrófagos M2 são importantes por promover a função do tecido em condições fisiológicas, preservando a função durante períodos de estresse, contendo e resolvendo a inflamação após a infecção ou lesão e atuando na reparação e na cicatrização de feridas (IVASHKIV, 2013).

Figura 1 – Sistema fagocitário mononuclear. Os fagócitos mononucleares são gerados a partir de células-tronco hematopoiéticas comprometidas localizadas na medula óssea. Precursores de macrófagos são liberados na circulação como monócitos e rapidamente migram para quase todos os tecidos do corpo, onde se diferenciam em macrófagos. Várias populações de macrófagos teciduais estão estrategicamente localizadas em todo o corpo e realizam importantes ações de vigilância do sistema imunológico, incluindo fagocitose, apresentação de antígenos e imunossupressão. O esquema representa um indivíduo adulto.

Os MA são a primeira célula do sistema imune que entra em contato com as partículas e, também, com os microrganismos patogênicos ou não, quando inalados (ARREDOUANI *et al.*, 2004; 2005). Os MA são responsáveis pela vigilância do órgão e pela regulação homeostática da função do tecido; são células com habilidade excelente na fagocitose, sendo fagócitos capazes de rápido escoamento quando há grande número de bactérias do pulmão (FELS; COHN, 1986; KIRBY; COLES; KAYE, 2009); e são células com capacidade imunossupressoras, suprimindo respostas das células T e das células dendríticas (DC) *in vitro* (THEPEN; VAN ROOIJEN; KRAAL, 1989; BILYK; HOLT, 1993; HOLT *et al.*, 1993; BLUMENTHAL *et al.*, 2001) e também de outras células *in vivo* (THEPEN; VAN ROOIJEN; KRAAL, 1989; KNAPP *et al.*, 2003; KIRBY; COLES; KAYE, 2009). Quando fagocitam, os MA ingerem todos os tipos de partículas inaladas que atingem os espaços alveolares, porém são células apresentadoras de antígenos não tão especializadas, carregam o antígeno microbiano para o interstício e para os

linfonodos regionais, onde são absorvidos por células dendríticas e apresentados aos linfócitos para iniciar a resposta adaptativa (MARTIN; FREVERT, 2005; HUSSELL; BELL, 2014). Durante a inflamação pulmonar, os MA possuem função na ativação (e no recrutamento) de neutrófilos e na manutenção no balanço de citocinas pró e anti-inflamatórias (CHOPRA *et al.*, 2009). Em situações normais, os MA compõem 95% dos leucócitos do espaço aéreo, sendo 1 a 4% de linfócitos e apenas 1% de neutrófilos.

Os MP podem ser encontrados na superfície das células do mesotélio peritoneal, em tecidos próximos à membrana basal peritoneal e em regiões vasculares (SUASSUNA *et al.*, 1994). Os macrófagos são a fonte principal de citocinas liberadas após lesões no peritônio e participam na regulação da inflamação (TOPLEY *et al.*, 1996). As funções principais são a vigilância imunológica, a regulação homeostática do ambiente e a limpeza de restos celulares, além de induzir a proliferação de fibroblastos. Ao receberem estímulos, há aumento da produção de citocinas (DMOWSKI, 1995; DAVIES *et al.*, 2013).

Quando estimulados, os macrófagos geram eventos na sinalização que culminam na ativação das suas funções, incluindo a produção de citocinas, quimiocinas e outras moléculas de comunicação, importantes para a coordenação da resposta inflamatória (BODE *et al.*, 2012). Diferentemente de outras células do sistema imune, os macrófagos não se dividem logo após o contato com o antígeno. A ativação dos macrófagos está ligada ao crescimento e ao aprimoramento da capacidade de realizar funções especializadas no sistema imunológico (VALLEDOR *et al.*, 2000).

1.2.2 A via do TLR-4

Quando em contato com um antígeno, uma das formas com que o sistema imune inicia o reconhecimento ou a resposta contra os componentes microbianos é mediada pela porção inata via expressão de uma categoria de receptores transmembrânicos do tipo I, ou seja, TLR (MEDZHITOV *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 1998; MEDZHITOV; JANEWAY, 2002). Os TLR são considerados receptores de reconhecimento padrão (PRR), devido a sua habilidade em detectar uma variedade de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP), como lipídeos,

proteínas, lipoproteínas e ácidos nucleicos (MEDZHITOV *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 1998; MEDZHITOV; JANEWAY, 2002). Em humanos, foram identificados 10 tipos de TLR, cada um com seu grupo de ligante específico (KAWAI; AKIRA, 2007; KUMAR *et al.*, 2009a, b). A ativação do TLR leva à síntese e à liberação de mediadores endógenos, como citocinas, radicais reativos do oxigênio e do nitrogênio, e de mediadores lipídicos (GALANOS *et al.*, 1993). Os mediadores inflamatórios promovem recrutamento e migração celular, vasodilatação, agregação plaquetária e aumento da permeabilidade vascular (CAMUSSI *et al.*, 1991; SHIMIZU *et al.*, 1992; GROSS, 1995; GIRAL *et al.*, 1996; LU; YEH, OHASHI, 2008).

O TLR4 reconhece o LPS, um dos principais constituintes das bactérias Gram-negativas. O LPS consiste em três partes: lipídeo A, um núcleo oligossacarídeo e a cadeia lateral O, sendo que o lipídeo A é o principal PAMP do LPS (RAETZ; WHITFIELD, 2002; MILLER *et al.*, 2005). A produção de citocinas inflamatórias através da ativação de TLR tem papel importante na mediação da resposta inicial do organismo contra os patógenos invasores (KAWAI; AKIRA, 2007; KUMAR *et al.*, 2009a, b). A estimulação das células do sistema imune pelo LPS ocorre por meio das interações de várias proteínas: LBP, *cluster of differentiation* (CD)14, MD-2 e TLR-4 (Figura 2) (GIOANNINI *et al.*, 2007; MIYAKE, 2007). Inicialmente, o LPS se liga ao LBP, uma proteína de fase aguda sintetizada pelo fígado, associando-se diretamente com o LPS, em sua porção imunogênica, à região do lipídeo A, formando o complexo LPS-LPB (TOBIAS *et al.*, 1986; WRIGHT, *et al.*, 1989). De fato, o LBP aumenta a atividade do LPS, transferindo o LPS para CD14, uma vez que CD14 é uma proteína desprovida de domínio citoplasmático. Estudos em camundongos nocautes para LBP demonstraram que o LBP aumenta a sensibilidade ao LPS em cerca de 300 vezes (WURFEL; WRIGHT, 1997). A transdução da sinalização do LPS depende da associação e do recrutamento de quatro moléculas: myeloid differentiation factor (MyD) 88, *MyD88 adapter-like* (Mal)/TIRAP, *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon β* (TRIF)/TICAM-1 e *TIR domain-containing adapter molecule 2* (TICAM-2) TRAM/TIRP para o domínio intracitoplasmático presente no TLR-4, levando à associação das moléculas adaptadoras. Essas moléculas fornecem estrutura para o recrutamento de várias quinases, bem como na propagação da sinalização intracelular (FITZGERALD, 2004). A transferência do sinal via TLR-4/MD2, induzida pelo complexo LPS-LBP,

junto ao CD14, possui duas vias bem esclarecidas: a via dependente de MyD88 e a via dependente de TRIF, também conhecida como via independente de MyD88.

Figura 2 - Representação esquemática das etapas de reconhecimento do LPS pela cascata de reconhecimento padrão extracelular da ligação dos receptores de LPS. O LBP se liga às bactérias Gram-negativas ou aos agregados de LPS, aumentando a energia de ligação dos monômeros de LPS. A molécula de LPS é transferida para o CD14 (via ativação). A interação entre LBP e CD14 é importante para a transferência. O CD14 transfere o LPS para MD-2. A ligação do lipídeo A ao MD-2 faz com que haja um rearranjo do TLR4, levando à associação produtiva dos seus domínios intracelulares, recrutando proteínas adaptadoras.

Fonte: JERALA, 2007.

Uma vez recrutado, o MyD88 interage com *IL-1 receptor associated kinase* (IRAK)-4, formando o complexo MyD88-IRAK4, que recruta e ativa os outros membros da família IRAK: IRAK-1 e IRAK-2 (CAO *et al.*, 1996; MUZIO *et al.*, 1997; LI *et al.*, 2000, 2002). Quando IRAK é oligomerizada em IRAK4/IRAK1/2, esse complexo se autofosforila, ativando sua atividade quinase, e também ativa o *tumor necrosis factor receptor-associated factor* (TRAF)-6, que recruta e ativa um complexo contendo o *transforming growth factor- β -activated kinase* (TAK)-1 e a proteína ligadora de TAK (TAB) 1, TAB2 e TAB3. A ativação do complexo TAK1/TAB desencadeia as vias de sinalização do *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) e, também, da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (CHEN, 2005).

A família da MAPK é composta por p38, ERK 1/2 e JNK1/2, que, quando recrutados, ativam fatores de transcrição como *activator protein* (AP)-1, entre outros

(WANG *et al.*, 2001). A liberação do NF- κ B necessita das proteínas *I κ B kinase* (IKK)- β , IKK- α e IKK- γ . Esse complexo medeia a fosforilação da I κ B- α , proteína inibidora de NF- κ B. Após a fosforilação, a I κ B- α é degradada, liberando o NF- κ B, que é translocado para o núcleo, iniciando a transcrição de citocinas inflamatórias (GHOSH *et al.*, 1998). Em contraste com o *interferon* do tipo II (IFN- γ), que exige a sinalização dependente de MyD88 para a sua síntese, a sinalização independente de MyD88 sintetiza principalmente IFN tipo I. Essa via está relacionada à ativação do fator de transcrição do fator regulador de *interferon* IRF-3 e com a *late phase* da ativação de NF- κ B e MAPK (CAO *et al.*, 1996; HÄCKER *et al.*, 2006).

1.3 O *Diabetes mellitus* E O PAPEL DA INSULINA NO SISTEMA IMUNE

O DM está associado com altas taxas de mortalidade e morbidade, parcialmente atribuídas ao aumento da suscetibilidade de infecções secundárias e reincidentes, quando comparado aos pacientes não diabéticos (SHAH; HUX, 2003). Recentemente, o diabetes foi considerado o maior fator de risco, como causa de morte pré-matura, em mais de 800 mil participantes (SESHASAI *et al.*, 2012). Um estudo Cohort retrospectivo, realizado no Canadá, mostrou que pacientes diabéticos possuem maior taxa de infecção do que pacientes não diabéticos e que as infecções são, principalmente, em: ossos, rins, bexiga, pulmões, sepse e peritonite (SHAH; HUX, 2003). Dentre os agentes etiológicos, as bactérias Gram-negativas são responsáveis por 25% das infecções causadas nos pacientes diabéticos (ESPER; MOSS; MARTIN, 2008). Explicações são sugeridas para explicar este evento: uma maior aderência os microrganismos as células do paciente diabético, o grande número de intervenções médicas e também a presença de falhas no sistema imunológico, seja na porção inata ou na adquirida (GEERLINGS; HOEPELMAN, 1999; ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014).

Na literatura científica, existem vários trabalhos demonstrando resposta imunológica insuficiente dos animais diabéticos quando comparado aos animais normais, principalmente nos mecanismos efetores dos macrófagos como capacidade fagocítica e atividade de *killing*, na produção de citocinas após estímulos, na resposta vascular aos mediadores imunes, na quimiotaxia dos polimorfonucleares e, também, na aderência e migração destas células para o foco

inflamatório (GEERLINGS; HOEPELMAN, 1999; DE OLIVEIRA MARTINS *et al.*, 2006; ALBA-LOUREIRO *et al.*, 2007; PELEG *et al.*, 2007; GUPTA *et al.*, 2007; SHILING, 2008; MARTINS *et al.*, 2009; CASQUEIRO; CASQUEIRO; ALVES, 2012).

Os fagócitos de animais diabéticos possuem uma migração reduzida para o foco inflamatório, devido à menor interação leucócito-endotélio, à baixa expressão de *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1 e aos baixos níveis de TNF- α e IL-1 β (ANJOS-VALOTA *et al.*, 2006; DE OLIVEIRA MARTINS *et al.*, 2006; DELAMAIRE *et al.*, 1997). Alba-Loureiro e colaboradores (2006) mostraram que a fagocitose de partículas de zymosan e a produção de peróxido de hidrogênio estimulado por *phorbol myristate acetate* (PMA), por neutrófilos de ratos diabéticos, eram menores. Adicionalmente a estas condições, há diminuição de 50% na produção de íons superóxidos por leucócitos presentes no lavado broncoalveolar (LBA) (BOICHOT *et al.*, 1999), redução da produção/liberação de PGE₂ (ALBA-LOUREIRO *et al.*, 2006), redução da concentração de TNF- α , IL-1 β e IL-10, no sobrenadante deste lavado, e redução da expressão de ICAM-1 e E-selectina no endotélio (DE OLIVEIRA MARTINS *et al.*, 2006). Estes trabalhos mostraram que com a utilização da insulina em dose única houve restauração da diminuição destes mediadores e da efetividade do sistema imune mesmo sem a normalização da glicemia.

Estudos experimentais contribuíram para que se compreendesse porque os pacientes diabéticos descompensados são mais susceptíveis a infecções, de modo geral, e porque, poucos anos após a introdução da insulina em terapêutica, constatou-se que decrescera a mortalidade decorrente de processos infecciosos, no paciente diabético (BELL; HOCKADAY, 1996). A insulina é um hormônio importante no controle do metabolismo corporal, no entanto, nas últimas décadas, outras importantes características desse peptídeo têm sido elucidadas, especialmente, em leucócitos (DANDONA *et al.*, 2007). Além disto, foi observado que as células do sistema imune possuem receptores para a ação da insulina, como mononucleares, os polimorfonucleares e os linfócitos (BECK-NIELSEN *et al.*, 1977; COSTA ROSA *et al.*, 1996).

Em MA de animais não diabéticos, coletados *ex vivo*, Martins e colaboradores (2008a) realizaram o tratamento *in vitro* com insulina por 10 minutos nestas células, com concentrações de 0,1, 1 e 10 mU. Os tratamentos aconteceram previamente a estimulação com LPS (100 ng/mL), simultaneamente, e 10 minutos após o estímulo

com LPS. O estímulo com LPS durou 30 minutos. Através da quantificação do TNF- α , os autores demonstraram que 1 mU/mL representa a concentração ideal para inibição da liberação desta citocina pró-inflamatória e utilizada previamente à estimulação com LPS. A partir deste tratamento, os autores mostraram que a insulina regulou negativamente a ERK e a p38 MAPK, a PI3K, a PKC e a liberação de TNF- α . Em outro trabalho, do mesmo grupo, a insulina inibiu importantes fatores presentes na sinalização do LPS para produção de componentes inflamatórios, como a expressão de enzimas, a (ciclo-oxigenase) COX-2, o óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e a ativação do NF- κ B (MARTINS *et al.*, 2008b), mostrando que a insulina interfere na ativação do MA de animais não diabéticos, por um mecanismo ainda não determinado. No sistema imune, MA, bem como os macrófagos residentes possuem papel fundamental durante a progressão da inflamação através da liberação de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos que fazem o recrutamento de outras células imunológicas e também modificam o ambiente para que ocorra o combate ao antígeno, e mais tardiamente o reparo tecidual (GEISSMANN *et al.*, 2010).

Conhecendo o fato que a insulina possui ação moduladora no sistema imune de animais diabéticos, e que o tratamento *in vitro* da insulina mostrou alterar a liberação de mediadores imunes por MA de animais não diabéticos. Neste trabalho, utilizamos animais diabéticos, induzidos por aloxana, e investigamos a ação da insulina na estimulação por LPS e, conseqüentemente, liberação dos mediadores inflamatórios por MA e MP.

2 OBJETIVOS

O objetivo foi avaliar o papel da insulina em MA e MP de camundongos tornados diabéticos pela indução com aloxana sob o estímulo com LPS. Para tanto, realizamos a evolução temporal desta resposta, buscando determinar o pico da produção/liberação e a ação da insulina nessa produção de mediadores inflamatórios.

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 (CEUA/FCF/339 – anexo I). Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, com peso médio inicial de 25 gramas e idade de, aproximadamente, 9 semanas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, onde foram acondicionados em gaiolas coletivas, contendo, no máximo, cinco animais, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, à temperatura ambiente constante de 22°C. Os suprimentos de água e alimento ficaram disponíveis todo o tempo.

3.2 Indução do *Diabetes mellitus*

Para indução do *Diabetes mellitus* tipo I, os animais foram deixados em jejum de 12 horas antes de receberem uma injeção endovenosa de aloxana (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA), na concentração de 60 mg/kg, dissolvida em solução salina fisiológica. A glicemia foi determinada através de 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 300 mg/dL (SPILLER *et al.*, 2012).

3.3 Obtenção dos macrófagos e da cultura

Após 10 dias da indução do diabetes, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina associado ao cloridrato de xilasina. Os MA foram obtidos pelo LBA (MARTINS *et al.*, 2008a) e os MP (NUNES *et al.*, 2007) pelo LPe com tampão fosfato salina (PBS) (137 mMNaCl, 2,7 mMKCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gelado. Para a coleta do LBA, os pulmões foram lavados *ex vivo* e massageados com 8 lavagens de 1 mL de PBS, utilizando-se um cateter intravenoso

(BD Angiocath 16G x 1,88”, Minas Gerais, Brasil), inserido na traqueia. Para o LPe, foram injetados 5 mL de PBS, o abdômen foi massageado e as amostras de LPe foram coletadas – este procedimento foi realizado 3 vezes. Durante a coleta, as amostras foram despejadas em tubos do tipo Falcon de 15 mL mantidos em gelo. Após a coleta, o material foi centrifugado a 1.500 rpm por 10 min a 4 °C, ressuspensão em meio RPMI-1640 (Vitrocell, São Paulo, Brasil) e a concentração de células foi determinada em câmara de Neubauer. O volume da suspensão, contendo 1×10^6 de células, foi distribuído em quatro poços (de placas com seis poços) e incubados na estufa a 37°C, 5% CO₂ para adesão. Após o processo de adesão, Serezani e colaboradores (2005) mostraram que mais de 99% destas células são MA. Então, RPMI 1640 foi retirado e as células foram incubadas a 37 °C/5% CO₂ com RPMI 1640 + Soro Fetal Bovino (10%) por 12 horas (MARTINS *et al.*, 2008a).

3.4 Tratamento dos macrófagos alveolar e peritoneal

O delineamento experimental está resumido na Figura 3. Para o desenvolvimento deste projeto, 1×10^6 MA e MP obtidos do LBA e LPe, respectivamente, foram distribuídos em quatro grupos (Quadro 1), destacando que a adição do LPS, 100 ng/mL, (*Escherichia coli* 055:B5, Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA) e da insulina, 1 um/mL, (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA) foi concomitante.

Figura 3 – **Delineamento experimental do trabalho desenvolvido.**

As células permaneceram em contato com o LPS e insulina durante 0,5; 1; 3; 6 e 24 horas. Para a construção da evolução temporal foram utilizados 3 animais para cada tempo analisado e, posteriormente, foram utilizados 7 animais para as demais dosagens.

Grupos	RPMI 1640	Lipopolissacarídeo	Insulina
Controle	X		
LPS	X	X	
Insulina	X		X
LPS + Insulina	X	X	X

Quadro 1 - Grupos utilizados no desenvolvimento do trabalho.

3.5 Reação de Griess

O óxido nítrico (NO) é um gás produzido pelas células e decompõe-se em nitritos e nitratos. A dosagem de nitritos é feita pelo método de ensaio colorimétrico baseado na reação de Griess (GIOVANNONI *et al.*, 1997). Após a incubação das células, o sobrenadante foi coletado e centrifugado. Na placa com 96 poços, foram adicionados 50 µL/poço da amostra e mais 50 µL/poço da solução de NEED (*N*-(1-Naphthyl) ethylene diamine dihydrochloride) 0,1% (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA), sulfanilamida 1% (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA) e solução de ácido fosfórico. Como curva padrão, utilizou-se nitrito de sódio (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA), nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 µM. A leitura foi realizada em 540 nM.

3.6 Quantificação de citocinas por ensaio imunoenzimático

A quantificação das citocinas TNF- α , IL-10, IL-6, IFN- γ e IL-4 foi realizada em amostras do sobrenadante da cultura celular pela técnica de ensaio imunoenzimático (R&D Systems, Minneapolis, EUA). Inicialmente, na placa com 96 poços, foram adicionados 100 µL/poço do anticorpo de captura, anti-TNF- α e anti-IL-10, anti-IL-6, anti-IFN- γ ou anti-IL-4. Após incubação por uma noite, a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e a placa foi lavada 3 vezes com o tampão de lavagem (aproximadamente 300 µL/poço). Em seguida, foi realizada a reação de bloqueio, adicionando-se 300 µL/poço de albumina sérica bovina a 1% em PBS, com

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 µL/poço do padrão ou das amostras, procedendo-se à incubação da placa por 2 horas, à temperatura ambiente. Para a curva padrão, utilizaram-se concentrações de 15,625; 31,25; 62,50; 125; 250; 500; 1.000; e 2.000 pg/mL (apenas IFN-γ). Após repetir o procedimento de lavagem da placa, foram adicionados 100 µL/poço do anticorpo e a placa foi 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 µL/poço da enzima estreptoavidina peroxidase, na proporção 1:200 de enzima PBS com 1% de *bovine serum albumin* (BSA), incubados por 1 hora, à temperatura ambiente, e protegida da luz. Em seguida, o ciclo de lavagem da placa foi repetido e a reação foi revelada pela adição de 100 µL/poço de tetrametilbenzidina: H₂O₂, incubação (20 minutos), à temperatura ambiente, e protegida da luz. A reação foi bloqueada adicionando-se 50 µL/poço de H₂SO₄ (2N) e avaliando-se a densidade óptica das amostras a 450 nm, imediatamente após o bloqueio da reação.

3.7 Análise estatística

Os resultados foram avaliados por teste t de Student e análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey-Kramer ou do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando-se significativo $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização do modelo

Após jejum de 12 horas, o diabetes foi induzido em camundongos C57BL/6 machos, com idade de 9 semanas, através da administração de dose única da aloxana (60 mg/dL) e utilizando a via peniana. Após, o jejum perdurou por mais 5 horas.

Inicialmente, os animais, no dia zero, apresentaram nível de glicemia de $164 \pm 2,6$ mg/dL. No dia 10, o nível estava em $546 \pm 9,7$ mg/dL, havendo aumento no nível de glicose após a administração da aloxana (Figura 4).

Figura 4 - Evolução corpórea da glicemia. O *diabetes mellitus* foi induzido pela injeção de aloxana (60 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da coleta dos macrófagos. Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Dia 0. $n=32$.

Foi realizada, também, a pesagem destes animais: no dia 0, pesavam $26 \pm 0,3$ g, e, no dia 10, $24 \pm 0,4$ g, demonstrando que houve redução no peso corpóreo dos animais (Figura 5).

Figura 5 - Evolução corpórea do peso. O *diabetes mellitus* foi induzido pela injeção de aloxana (60 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da coleta dos macrófagos. Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p=0,0037$ vs. Dia 0. $n=32$.

Os animais foram considerados diabéticos quando os níveis de glicemia, por mais de duas medições pela manhã, em estado de não jejum, estavam acima de 300 mg/dL. Sendo assim, os animais tornados diabéticos exibiram características do estado insulinopênico: redução do peso corpóreo e hiperglicemia.

4.2 Condições do tratamento

Para estudar o efeito da insulina, na ativação dos macrófagos alveolares e peritoneais, por LPS - 100 ng/mL, primeiramente, os macrófagos foram divididos de acordo com o tratamento recebido (Quadro 1), destacando que a adição do LPS e da insulina, 1 μ m/mL, foi concomitante. Em seguida, analisamos, a partir do sobrenadante da cultura celular, a liberação de TNF- α , IL-10 e NO. Os mediadores imunológicos foram quantificados nos tempos de 0; 0,5; 1; 3; 6 e 24 horas. As demais dosagens, IL-4, IL-6 e IFN- γ , foram realizadas nos tempos de 0,5 e 3 horas.

4.3 Evolução temporal da produção de NO

A liberação de NO por MA, após estimulação com LPS ocorreu durante 0,5; 1; 3; 6 e 24 horas, em relação ao grupo Controle (Figura 6). O tratamento com insulina nos MA acarretou em valores semelhantes ao grupo Controle, não liberando NO apenas com a presença do hormônio.

Figura 6 - Evolução temporal da produção de NO por macrófagos alveolares. Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,01$ vs. CON. ** $p < 0,01$ vs. LPS. $n = 3$.

Os MP estimulados com LPS por 0,5; 1; 3; 6 e 24 horas mostraram maior liberação de NO, quando comparados ao grupo Controle (Figura 7). O tratamento com insulina nos MP implicou em valores semelhantes ao grupo Controle; logo, não contribuiu para a liberação de NO.

O tratamento com insulina, concomitantemente à estimulação com LPS, implicou em menor liberação de NO por MA e MP nos tempos 0,5; 1; 3; 6 e 24 horas, quando comparada à do grupo estimulado com LPS.

Os resultados mostram que o tratamento de insulina levou à redução da liberação de NO quando os MA e MP foram estimulados com o LPS, durante 0,5; 1; 3; 6 e 24 horas.

Figura 7 - Evolução temporal da produção de NO por macrófagos peritoneais. Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. CON. ** $p < 0,05$ vs. LPS. $n = 3$.

4.4 Evolução temporal da produção do TNF- α

Quando estimulados por LPS, os MA, durante 6 horas tiveram liberação desta citocina, em relação ao grupo Controle (Figura 8). O tratamento com insulina não promoveu a liberação do mediador imune.

Figura 8 - Evolução temporal da produção do TNF- α por macrófagos alveolares. Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs CON. $n=3$.

Os MP estimulados com LPS durante 0,5 e 6 horas, apresentaram liberação da citocina, quando comparados ao grupo Controle (Figura 9). Os grupos Controle e Insulina tiveram, ambos, valores semelhantes para os MP, mostrando que a insulina *per si* não é capaz de provocar a liberação deste mediador.

O tratamento com insulina realizado nos MA durante a estimulação com o LPS não apresentou diferença quando comparado ao grupo LPS. Na mesma condição, os MP, durante 0,5 hora, tiveram diminuição na liberação da citocina.

Os resultados mostraram que o tratamento da insulina teve diferença na liberação deste mediador, quando estimulado por LPS, por MP, durante 0,5 hora; enquanto que, nos demais resultados não houve diferença.

Figura 9 - Evolução temporal da produção do TNF- α por macrófagos peritoneais. Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. CON. ** $p < 0,05$ vs. LPS. $n = 3$.

4.5 Evolução temporal da produção de IL-10

Em nosso estudo, os MA produziram IL-10 apenas durante as 24 horas independente do estímulo (Figura 10). Os resultados mostram que a presença de insulina ou LPS ou de ambos não foram capazes de provocar a liberação de IL-10 durante 0,5; 1; 3 e 6 horas. Não houve diferença entre os grupos analisados durante 24 horas.

Figura 10 - Evolução temporal da produção da IL-10 por macrófagos alveolares. Os valores representam a média $\pm$ EPM n= 3.

Os MP estimulados com o LPS, durante 3; 6 e 24 horas, liberaram IL-10. O grupo Controle teve liberação durante 24 horas, sem estímulos e tratamentos (Figura 11). Os resultados mostram que o tratamento de insulina não promoveu a liberação de IL-10 durante 0,5; 1; 3 e 6 horas.

Nossos resultados mostram não haver diferença estatística no tratamento da insulina durante a estimulação por LPS na liberação de IL-10 por MA e MP.

Figura 11 - Evolução temporal da produção da IL-10 por macrófagos peritoneais. Os macrófagos peritoneais foram estimulados com LPS e tratados com insulina *in vitro*. Os valores representam a média $\pm$ EPM $n=3$.

4.6 Dosagem das citocinas IL-4, IFN- γ e IL-6

Através do perfil apresentado durante a estimulação com LPS, do tratamento com insulina e da adição concomitante de ambos em MA e MP, durante a evolução temporal da produção de NO e das citocinas TNF- α e IL-10, quantificamos outros mediadores imune: IL-4, IL-6 e IFN- γ . Os tempos selecionados foram 0,5 e 3 horas.

Figura 12 – Produção de IL-6 por macrófagos alveolares. Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,001$ vs. CON. ** $p < 0,001$ vs LPS.. $n = 7$.

Os MA, durante 0,5 hora de incubação, quando tratados com insulina, estimulados com LPS ou na ausência e na presença de ambos, não contribuíram com a liberação de IL-6 (Figura 12). Os grupos Controle e Insulina durante 3 horas não tiveram níveis de citocina quantificáveis, o que mostra que apenas o tratamento com insulina não foi suficiente para que as células liberassem IL-6.

Os MA estimulados durante 3 horas com LPS apresentaram maior liberação em relação ao grupo Controle. Na presença do tratamento com insulina na estimulação com o LPS, os MA tiveram redução na liberação da IL-6.

Figura 13 - Produção da IL-6 por macrófagos peritoneais. Os macrófagos peritoneais foram estimulados com LPS e tratados com insulina *in vitro*. Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. CON. $n=7$.

Os MP estimulados com LPS, durante 0,5 hora, tiveram maior liberação em relação ao grupo Controle (Figura 13). Na presença do tratamento com insulina na estimulação com LPS, houve redução na liberação da citocina. O que sinaliza que o tratamento, por si só, não foi capaz de alterar a liberação da IL-6, quando comparado ao grupo Controle.

Durante 3 horas, os MP, estimulados com LPS, tiveram maior liberação de IL-6, quando comparados ao grupo Controle. O tratamento com insulina, nos MP, acarretou na liberação da IL-6, semelhantemente ao grupo Controle. O tratamento com insulina, na estimulação com LPS não promoveu diferenças quando comparado ao grupo LPS.

A presença do tratamento com insulina durante a estimulação com LPS implicou na reduziu da liberação desta citocina durante 0,5 hora; entretanto, o mesmo evento não foi observado durante 3 horas.

Os MA, durante 0,5 e 3 horas, quando expostos ao estímulo com LPS e ao tratamento com insulina, não foram suficientes para que houvesse liberação do IFN- γ . A presença ou a ausência de ambos também resultou na não liberação do IFN- γ . A mesma situação ocorreu com os MP, ou seja, durante 0,5 e 3 horas, não detectamos IFN- γ , quando estimulados com LPS, tratados com insulina ou na presença ou ausência de ambos pela técnica utilizada. A presença do tratamento com insulina na estimulação com o LPS não causou diferenças quando comparado ao grupo contendo apenas LPS.

Em relação à liberação de IL-4, os MA, durante 0,5 hora, quando tratados com insulina, tiveram aumento na liberação da IL-4 em relação ao grupo Controle (Figura 14). Os MA estimulados com LPS não apresentaram diferenças em relação grupo Controle. Quando em conjunto, a insulina e o LPS acarretaram em liberação menor do que os MA estimulados com insulina. Em 3 horas, não detectamos níveis de IL-4 no sobrenadante da cultura celular dos grupos analisados pela técnica utilizada.

Em relação aos MP, durante 0,5 e 3 horas, não detectamos IL-4 pela técnica utilizada, quando estimulados com LPS, tratados com insulina ou na presença ou ausência de ambos.

Figura 14 - Produção da IL-4 por macrófagos alveolares. Os macrófagos peritoneais foram estimulados com LPS e tratados com insulina *in vitro*. Os valores representam a média $\pm$ EPM. *p < 0,05 vs CON. **p < 0,05 vs. INS. n = 7.

5 DISCUSSÃO

Entre as doenças pediátricas, o DM1 foi considerado a doença mais comum (DABELEA, 2009). O trio clássico dos sintomas no início do diabetes é a polidipsia, a polifagia e a poliúria que, em conjunto com a hiperglicemia e o tratamento com insulina exógena, são os principais pontos para estabelecer o diagnóstico em crianças e adolescentes (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014). A partir do conhecimento da fisiopatologia e dos sintomas do DM1, modelos experimentais foram desenvolvidos e propostos para o estudo da doença, tais como o modelo animal do DM1, utilizando estreptozotocina e aloxana, que se acumulam nas ilhotas pancreáticas, causando lesão irreversível das células β , e, também, o modelo animal que adquire a doença de forma espontânea, conhecido por camundongos diabéticos não obesos (NOD) (REES; ALCOLADO, 2004). A ação citotóxica de ambos agentes diabetogênicos é mediada por espécies reativas do oxigênio (RERUP, 1970; GAULTON; SCHWARTZ; EARDLEY, 1985; WELLHAUSEN, 1986; SZKUDELSKI, 2001). A aloxana é uma droga hidrofílica e instável, sua meia-vida é de apenas 90 segundos. Apesar de curto, quando administrada por via endovenosa, o tempo é suficiente para permitir que a droga destrua as células β , agindo entre 12 e 48 horas após a administração (LENZEN; MUNDAY, 1991). Ambas as drogas exibem efeitos tóxicos. A aloxana determina, particularmente em altas doses, necrose da célula tubular renal (LENZEN *et al.*, 1996; LENZEN *et al.*, 2008). Por outro lado, a estreptozotocina apresenta toxicidade para células linfóides do baço e do timo (GAULTON *et al.*, 1985). O modelo do diabetes induzido por aloxana tem sido utilizado pelo nosso grupo como um modelo animal de diabetes insulín dependente (SUNAHARA, SANNOMYIA, MARTINS, 2012). Camundongos tornados diabéticos exibem perda de peso corpóreo durante o período de estabelecimento da doença, 10 dias, e concentrações plasmáticas elevadas de glicose, caracterizando o estado insulínopênico (SPILLER *et al.*, 2012).

A primeira etapa de nosso trabalho foi avaliar, na forma de evolução temporal, a liberação dos mediadores imunes NO, TNF- α e IL-10 por MA e MP em animais tornados diabéticos. Os macrófagos, quando estimulados com LPS, são modificados, tendo seu perfil de resposta modificado, que é caracterizado pela ativação clássica, que consiste no aumento da liberação das citocinas pró-

inflamatórias e NO (GORDON; TAYLOR, 2005). Quando estimulado por LPS, o NO possui função específica na atividade microbicida, agindo também na síntese e na função de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e na destruição tecidual (BODGAN, 2001). Esta molécula é produzida através da enzima óxido nítrico sintetase (NOS), sendo que o nível do óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) está substancialmente correlacionado com o grau de inflamação (KIMURA *et al.*, 1998). Estudos recentes têm demonstrado que a inflamação é seguida pela regulação positiva de NO e iNOS (SAWA; OHSHIMA, 2006). Assim, a inibição de NO e iNOS sobre a produção pode proporcionar uma medida para avaliar os efeitos anti-inflamatórios (KIM *et al.*, 2013).

Em nosso experimento, a produção de NO por MA e MP de animais diabéticos aconteceu durante 0,5; 1; 3; 6 e 24 horas após estímulo com LPS, mostrando que estas células responderam ao estímulo. O tratamento com insulina nos MA e MP reduziu a produção deste mediador na estimulação por LPS. Em MA, ocorreu nos tempos 0,5; 1, 3, 6 e 24 horas. O mesmo evento ocorreu nos MP, porém nos tempos 0,5; 1; 3; 6 e 24 horas. Martins e colaboradores demonstraram que, em MA, de animais não diabéticos, tratados *in vitro* com insulina (1 mU/mL) por dez minutos e, então, estimulados por 30 minutos com LPS (100ng/mL), houve inibição na expressão das enzimas iNOS e na liberação de seu produto, NO (MARTINS *et al.*, 2008b). Em outro estudo, de Souza e colaboradores (2007), utilizando ratos wistar tornados diabéticos, estimularam os MP *in vitro* com LPS e demonstraram haver menor liberação de NO, quando comparados aos MP dos animais não diabéticos. Ptak e colaboradores (1998), ao utilizarem MP de camundongos normoglicêmicos e diabéticos mantidos com glicemia média de 300 mg/dL e 500 mg/dL, quando estimulados durante 24 horas com LPS, encontraram que os MP dos animais com 300 mg/dL produziram duas vezes mais NO em relação aos MP de animais com a glicemia de 500 mg/dL. Entretanto, nos animais que receberam a insulina ultralenta de 15 UI, apenas os MP dos animais com 500 mg/dL apresentaram maior liberação de NO, quando comparado apenas com os MP estimulados com LPS, 1,4 vezes. Porém, em outro experimento, de Souza e colaboradores (2007) realizaram o cultivo de células RAW 264.7 em meios hiperglicêmico (500 mg/dL) e normoglicêmico (200 mg/dL), durante 15 horas de incubação, e mostraram não existir diferença na produção de NO entre os grupos.

Utilizando outro tipo celular, neutrófilos peritoneais de ratos wistar diabéticos, Cerchiaro e colaboradores (2001) mostraram que essas células possuem atividade de iNOS superior em relação aos animais não diabéticos. Após a administração da insulina (NPH - 2 UI/dia) durante 3 dias, pela noite, os valores da enzima em animais diabéticos foram restaurados, diminuindo valores próximos ao grupo não diabético. Nossos resultados e estes ensaios demonstram que a presença da insulina possui ação sobre a síntese de NO *in vitro*.

Além de NO, quantificamos TNF- α e IL-10, por serem as duas principais citocinas envolvidas no equilíbrio das funções dos macrófagos. A citocina pró-inflamatória TNF- α é considerada um importante mediador precoce da resposta inflamatória, agindo principalmente na liberação de outras citocinas (MOLLER, 2000; SETHI *et al.*, 2008). A produção de TNF- α por MA ocorreu durante 3, 6 e 24 horas de estímulo com LPS e por MP durante 0,5, 1, 3 e 6 horas. Nossos resultados demonstram que há grande diferença na liberação de TNF- α por MA e MP, quando estimulados por LPS. Os dados mostram que houve maior liberação do TNF- α , por MA do que por MP; isto pode estar relacionado com a grande habilidade destas células para produzirem TNF- α e IL-1 β no ambiente pulmonar (THORLEY *et al.*, 2007). Em MA humanos estimulados com LPS, Thorley e colaboradores (2007) mostraram que, em 24 horas de estímulo, há grande quantidade de TNF- α . Este mesmo perfil de resposta foi encontrado em nossos resultados. Entretanto, os MP mostraram perfil diferente de liberação de TNF- α , durante uma hora de estímulo com LPS, quando houve maior taxa de liberação. Segundo Srinivasan e colaboradores (2010), a evolução temporal do TNF- α , mostrada por eles, coincide com a nossa, o que confirma nossos achados; porém, em animais não diabéticos. Ptak e colaboradores (1998) demonstraram, em MP de camundongos diabéticos, com glicemia de 300 mg/dL e estimulados por LPS durante 8 horas, que a produção do TNF- α foi 4,3 vezes maior quando comparado aos animais com glicemia de 500 mg/dL. Ao administrarem diariamente insulina ultralenta de 15 UI, eles observaram que os MP dos animais com glicemia de 300 mg/dL produziram 41% a menos desta citocina, em relação ao grupo estimulado com LPS, enquanto que, nos animais com glicemia de 500 mg/dL, a produção do TNF- α aumentou duas vezes, comparada aos MP estimulados com LPS. Martins e colaboradores mostraram que a insulina inibiu a liberação de TNF- α , com tratamento prévio de 10 minutos e concomitante à

estimulação com LPS de 30 minutos em MA de animais não diabéticos (MARTINS *et al.*, 2008a). Em nossos resultados, em sua maior parte, a insulina não alterou o perfil de liberação desta citocina por MA e MP de animais diabéticos; apenas no tempo de 0,5 hora houve redução da produção de TNF- α por MP.

A presença de componentes anti-inflamatórios, como a IL-10, influencia as três funções importantes dos macrófagos: a liberação de mediadores imunes, a apresentação de antígeno e, também, a fagocitose (SABAT, 2010). Além disso, a citocina suprime todas as funções do macrófago e inibe a liberação de mediadores pró-inflamatórios; consequentemente, inibindo a estimulação por LPS e os produtos desta estimulação, como: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, G-CSF e GM-CSF (FIORENTINO, 1991; MALEFYT, 1991; SABAT, 2010). Mostramos que, em 24 horas de incubação, os MA produziram traços de IL-10, ainda sendo a maior produção em nossa evolução temporal desta citocina, quando estimulados com LPS. Sabe-se que os MA não são uma ótima fonte de IL-10; apesar de serem influenciados por esta citocina, dentro do ambiente pulmonar, as fontes potenciais produtoras deste mediador são células T e B, células NK e células epiteliais do pulmão (BONFIELD *et al.*, 1995). Salez e colaboradores (2000) mostraram que, em 24 horas, mesmo com o estímulo do LPS, os MA de animais não diabéticos produziram pequenas quantidades de IL-10, em experimentos *in vitro* e *in vivo*, quando comparados com os MP. Utilizando MA humanos, Chanteux e colaboradores (2007) mostraram não haver liberação de IL-10 até 6 horas de estímulo com LPS, o que condiz com nossos dados. Os MP produziram IL-10, após 3 horas de estímulo com LPS, quando comparado ao grupo Controle. Até as 24 horas, houve redução na produção da citocina. Vimos, também, que o tratamento da insulina acarretou não ter ação na liberação da IL-10 por MA e por MP.

Observamos que a liberação de TNF- α e IL-10 foi diferente quando comparados entre as duas populações de macrófagos. Uma explicação, proposta por Meisel e colaboradores (1996), é que a liberação de citocinas resulta de duas ondas de indução. A primeira onda acontece devido a um efeito direto do LPS sobre os receptores na célula, o que provoca uma formação de TNF- α e, em menor parte, de IL-10. A segunda onda é principalmente pela presença do TNF- α : este mecanismo secundário seria responsável pela maior produção de IL-10 pelos macrófagos. Em questão, o equilíbrio de TNF- α e IL-10 é o resultado de um controle

autócrino, em que o TNF- α ativa a síntese e a secreção de IL-10 (WANIDWORANUN, STROBER, 1993; VAN DER POLL, 1994, SALEZ *et al.*, 2000.), enquanto IL-10 regula negativamente a formação de TNF- α por *feedback* negativo (FIORENTINO *et al.*, 1991; GERARD *et al.*, 1993; SALEZ *et al.*, 2000).

Após a evolução temporal, observamos que a insulina possui efeito na liberação de LPS durante 0,5 e 3 horas; por isso, quantificamos a presença da IL-6, IFN- γ e IL-4, nestes tempos, em nosso estudo. A IL-6 possui papel na imunidade inata e adquirida, sendo o mediador predominante da resposta de fase aguda, que pode ser desencadeada na presença da infecção e/ou inflamação (GRAEVE; BAUMANN; HEINRICH, 1993; GRIMBLE, 1998; CHEN *et al.*, 2006). Além disso, a IL-6 também desempenha vários papéis durante o desenvolvimento da imunidade adquirida contra patógenos, na regulação da expressão de citocinas e quimiocinas, quando atua na regulação da diferenciação dos macrófagos e das células dendríticas (GRAEVE; BAUMANN; HEINRICH, 1993; GRIMBLE, 1998; CHEN *et al.*, 2005). Altos níveis desta citocina estão relacionados a doenças crônicas inflamatórias, como o diabetes (KRISTIANSEN; MANDRUP-POULSEN, 2005). Srinivasan e colaboradores (2010) mostraram, em evolução temporal, que a IL-6 possui seu pico de produção durante 4 horas de estímulo com LPS em MP de animais não diabéticos. Nossos achados sugerem o mesmo resultado, já que encontramos menor liberação deste mediador durante 0,5 hora e aumento significativo na liberação em 3 horas de estímulo com LPS, porém em animais diabéticos. Ptak e colaboradores (1998) mostraram que os MP de animais com aumento da glicemia (normoglicêmicos, 300 e 500 mg/mL) possuem diminuição gradativa na liberação de IL-6 após estímulo com LPS. Em nosso experimento, os animais doadores dos MP possuíam o nível de glicemia em torno de 500 mg/dL, o tratamento com insulina *in vitro*, concomitante ao estímulo com o LPS, provocou diminuição na liberação da IL-6 durante 0,5 hora, mas não tendo mais ação em 3 horas de estímulo com o LPS. Em comparação, Ptak e colaboradores (1998) mantiveram o nível de glicemia dos animais na faixa de 450 a 550 mg/dL (média de 500 mg/dL), utilizando o tratamento com insulina 15U por 7 dias; após coleta, os MP destes animais foram mantidos por 24 horas com estímulo de LPS *in vitro* e, ao contrário dos nossos achados, o valor de liberação da citocina foi restaurado, chegando a níveis próximos aos dos animais não diabéticos não tratados com

insulina. Há várias evidências sugerindo que a IL-6 tem papel importante na transição da resposta imune inata para a adquirida (SCHELLER *et al.*, 2011). Em relação aos mononucleares, os MP são grandes produtores de IL-6 (STOUT; SUTTLES, 2004); nossos resultados sugerem isto, uma vez que os MA, quando estimulados durante 3 horas com LPS, liberaram IL-6; entretanto, durante 0,5 hora, os grupos não tiveram liberação do mediador. O tratamento com insulina implicou na diminuição da liberação desta citocina. Martins e colaboradores (2010), estudando o modelo de inflamação pulmonar de 6 horas, mostraram que a insulina (NPH - 4UI), administrada duas horas antes da instilação por LPS, restaurou os valores de IL-6, que estavam diminuídos na presença do diabetes sem tratamento com insulina. Deve-se considerar que, em 6 horas, a maior população celular no pulmão são os polimormonucleares e não os mononucleares (DE OLIVEIRA MARTINS *et al.*, 2006).

Encontramos que a citocina IL-4 foi produzida em baixas concentrações por MP de animais diabéticos, mostrando maior liberação em 0,5 hora e decaindo durante 3 horas de estímulo. Resultados semelhantes foram encontrados por Srinivasan e colaboradores (2010), utilizando MP de animais não diabéticos. Além desta semelhança, outra característica em comum: encontramos baixas concentrações desta citocina no sobrenadante da cultura celular. Pouco se sabe sobre a influência da IL-4 nos macrófagos. Porém, sabe-se que a IL-4 tem ação direta na inibição da liberação da IL-6 e que a presença de altos níveis desta citocina resultaria na inibição do perfil pró-inflamatório dos macrófagos (YANAGAWA *et al.*, 1991). Isto pode ser evidenciado pela presença da IL-4 e pela ausência de IL-6, durante 0,5 hora, produzidos por MA. Sendo assim, a presença de IL-4 é característica do outro perfil de macrófagos, conhecidos como M2, justificando a baixa liberação quando estimulados com LPS, M1 (AGGARWAL; KING, D'ALESSIO, 2014). Além disto, observamos que MP e MA de animais diabéticos, quando estimulados com LPS, não foram capazes de liberar IFN- γ . Srinivasan e colaboradores (2010) mostraram, em sua curva cinética de liberação de IFN- γ , que os MP de animais não diabéticos estimulados com LPS somente após 8 horas são capazes de liberar a citocina.

Os macrófagos residentes no paciente diabético possuem uma menor liberação dos mediadores imunes quando estimulados. Nosso trabalho mostrou que

a insulina adicionada concomitante ao estímulo com LPS, diminuiu a liberação de NO, TNF- α e IL-6.

A ativação por LPS em macrófagos é dependente principalmente do TLR-4. Dandona e colaboradores (2013) mostraram que a insulina, em pacientes com DM1, reduziu a expressão do TLR-4 em células mononucleares. Essa menor expressão do TLR-4 pode estar relacionada com a diminuição na liberação dos mediadores. O tratamento com insulina *in vitro* mostrou ser diferente quando comparado com os resultados *in vivo* durante o estímulo com LPS, foi demonstrado em outros tipos celulares, a presença de duas isoformas para o receptor de insulina, evidenciando que dependendo do receptor no qual atua, a isoforma A ou B, a célula se comporta de forma diferente (LEIBIGER *et al.*, 2001). O mecanismo que a insulina age nos macrófagos quando estimulados com LPS permanece oculto, porém nossos resultados contribuem para algumas hipóteses.

Em resumo, utilizando o tratamento de insulina concomitante ao estímulo com LPS em MA e MP de animais diabéticos, observamos que a produção/liberação de NO foi reduzida durante 0,5; 1; 3; 6, 24 horas, em MA e em MP. A liberação de TNF- α foi reduzida durante 0,5 hora, em MP. A liberação de IL-6 foi reduzida durante 3 horas, em MA, e 0,5 hora, em MP. Na figura 15, apresentamos um resumo destes resultados.

Figura 14 - Papel da insulina na ativação por LPS em MA e MP de animais diabéticos durante 0,5 e 3 horas de estímulo. O tratamento com insulina (1 mU/mL), simultâneo à estimulação com LPS (100 ng/mL), durante 0,5 hora, resultou na redução da liberação de NO; durante 3 horas, houve redução da liberação de NO e IL-6 produzidos por MA. Em MP, a insulina reduziu a liberação dos mediadores NO, TNF- α e IL-6, durante 0,5 hora de estímulo com LPS, ao passo que, durante 3 horas, houve a redução apenas do NO.

6 CONCLUSÃO

Os dados mostram que a insulina reduziu a produção/liberação dos mediadores NO e IL-6, para os MA, e NO, IL-6 e TNF- α , para os MP, de animais diabéticos já nos primeiros minutos de estímulo com LPS, com um pico de redução, na maioria das vezes, em 3 horas.

7 REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. N.; THANKAVEL, K.; MALAVITA, R. Mast cells as modulators of host defense in the lung. **Frontiers Biosciences**, n. 2, p. 78-87, 1997.
- AGGARWAL, N. R.; KING, L. S.; D'ALESSIO, F. R. Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution. **Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 306, p. L709-L725, 2014.
- ALBA-LOUREIRO, T. C.; MARTINS, E. F.; LANDGRAF, R. G.; JANCAR, S.; CURI, R.; SANNOMIYA, P. Role of insulin on PGE₂ generation during LPS-induced lung inflammation in rats. **Life Sciences**, v. 78, n. 6, p. 578-585, 2006.
- ALBA-LOUREIRO, T. C.; MUNHOZ, C. D.; MARTINS, J. O.; CERCHIARO, G. A.; SCAVONE, C.; CURI, R.; SANNOMIYA, P. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 8, p. 1037-1044, 2007.
- ANJOS-VALOTTA, E. A.; MARTINS, J. O.; OLIVEIRA, M. A.; CASOLARI, D. A.; BRITTO, L. R. G.; TOSTES, R. C.; FORTES, Z. B.; SANNOMIYA, P. Inhibition of tumor necrosis factor- α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression in diabetic rats: role of insulin. **Inflammation Research**, v. 55, p. 16-22, 2006.
- ARREDOUANI, M.; YANG, Z.; NING, Y.; QIN, G.; SOININEN, R.; TRYGGVASON, K.; KOBZIK, L.. The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, p. 267-272, 2004.
- ARREDOUANI, M. S.; PALECANDA, A.; KOZIEL, H.; HUANG, Y. C.; IMRICH, A.; SULAHIAN, T. H.; NING, Y. Y.; YANG, Z.; PIKKARAINEN, T.; SANKALA, M.; VARGAS, S. O.; TAKEYA, M.; TRYGGVASON, K.; KOBZIK, L. MARCO is the major binding receptor for unopsonized particles and bacteria on human alveolar macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 175, p. 6058-6064, 2005.
- ATKINSON, M. A., EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **The Lancet**, v.358, p. 221-229, 2001.
- ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v.383, p. 69-82, 2014.
- BECK-NIELSEN, H.; PEDERSEN, O.; KRAGBALLE, K.; SORENSEN, N. S. The monocyte as a model for the study of insulin receptors in man. **Diabetologia**, v. 13, p. 563-9, 1977.
- BELL, J. I.; HOCKADAY, T. D. R. Diabetes mellitus. In **Oxford Textbook of Medicine (3rd edn)**, WETHERALL, D. J.; LEDINGHAM, J. G. G; WARRELL, D. A. (eds). Oxford University Press: Oxford, pp. 1448–1504, 1996.

BILYK, N.; HOLT, P. G. Inhibition of the immunosuppressive activity of resident pulmonary alveolar macrophages by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 177, p. 1773-1777, 1993.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature Immunology**, v. 11, n. 10, p. 889-896, 2010.

BLUMENTHAL, R. L.; CAMPBELL, D. E.; HWANG, P.; DEKRUYFF, R. H.; FRANKEL, L. R.; UMETSU, D. T. Human alveolar macrophages induce functional inactivation in antigen-specific CD4 T cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, vol. 107, p. 258-264, 2001.

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

BONFIELD, T. L.; KONSTAN, M. W.; BURFEIND, P.; PANUSKA, J. R. ; HILLIARD, J. B.; BERGER, M. Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 13, p. 257-261, 1995.

BODE, J. G.; EHLTING, C.; HAUSSINGER, D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38MAPK–STAT3 axis. **Cellular Signalling**, v. 24, p. 1185-1194, 2012.

BODGAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.

BONFIELD, T. L.; KONSTAN, M. W.; BURFEIND, P.; PANUSKA, J. R.; HILLIARD, J. B.; BERGER, M. Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 13, p. 257-261, 1995.

CAMUSSI, G.; ALBANO, E.; TETTA, C.; BUSSOLINO, F. The molecular action of tumor necrosis factor- α . **European Journal of Biochemistry**, v. 202, p. 3-14, 1991.

CAO, Z.; XIONG, J.; TAKEUCHI, M.; KURAMA, T.; GOEDEL, D. V. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. **Nature**, v. 383, p. 443-446, 1996.

CASQUEIRO, J.; CASQUEIRO, J.; ALVES, C. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, 16 (Suppl1): S27–S36, 2012

CERCHIARO, G. A.; SCAVONE, C.; TEIXEIRA, S.; SANNOMIYA, P. Inducible nitric oxide synthase in rat neutrophils: role of insulin. **Biochemical Pharmacology**, v. 62(3), p. 357-62, 2001.

CHEN, Z. J. Ubiquitin signalling in the NF-kappa B pathway. **Nature Cell Biology**, v. 7, p. 758-765, 2005.

CHEN, B. C.; LIAO, C. C.; HSU, M. J.; LIAO, Y. T.; LIN, C. C.; SHEU, J. R.; LIN, C. H. Peptidoglycan-Induced IL-6 Production in RAW 264.7 Macrophages Is Mediated by Cyclooxygenase-2, PGE2/PGE4 Receptors, Protein Kinase A, Ikb Kinase, and NF- κ B. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 681-693, 2006.

CHOPRA, M.; REUBEN, J. S.; SHARMA, A. C. Acute Lung Injury: Apoptosis and Signaling Mechanisms. **Experimental, Biology and Medicine**, v. 234, p. 361-71, 2009.

COSTA ROSA, L. F. B. P.; SAFI, D. A.; CURY, Y.; CURI, R. The effect of insulin on macrophage metabolism and function. **Cell Biochemistry and Function**, v. 14, p. 33-42, 1996.

DABELEA, D. The accelerating epidemic of childhood diabetes. **The Lancet**, v. 373, p. 1999-2000, 2009.

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.; GHANIM, H.; GREEN, K.; SIA, C. L.; ABUAYSHEH, S.; KUHADIYA, N.; BATRA, M.; DRINDSA, S.; CHAUDHURI. Insulin infusion suppresses while glucose infusion induces Toll-like receptors and high-mobility group-B1 protein expression in mononuclear cells of type 1 diabetes patients. **Endocrinology and Metabolism - American Journal of Physiology**, v. 304, p. 810-818, 2013.

DAVIES, L. C.; ROSA, M.; JENKINS, S. J.; LIAO, C. T.; SCURR, M. J.; BROMBACHER, F.; FRASER, D. J.; ALLEN, J. E.; JONES, S. A.; TAYLOR, P. R. Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. **Nature Communications**, v. 4, p. 1886, 2013.

DAVIES, L. C.; JENKINS, S. J.; Allen, J. E.; Taylor, P. R. Tissue-resident macrophages. **Nature Immunology**, v. 14, p. 986-995, 2013.

DE OLIVEIRA, M. J.; MEYER-PFLUNG, 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, p. 260-266, 2006.

DE SOUZA, L. F.; BARRETO, F.; da SILVA, E. G.; ANDRADES, M. E.; GUIMARAES, E. L. M.; BEHR, G. A.; MOREIRA, J. C. F.; BERNARD, E. A. Regulation of LPS stimulated ROS production in peritoneal macrophages from alloxan-induced diabetic rats: involvement of high glucose and PPARgamma. **Life Sciences**, v. 81, p. 153-192, 2007.

DELAMAIRE, M.; MAUGENDRE, D.; MORENO, M.; LE GOFF, M.C.; ALLANNIC, H.; GENETET, B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. **Diabetic Medicine**, v. 14(1), p. 29-34, 1997.

DIAMOND STUDY GROUP. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990–1999. **Diabetic Medicine**, v. 23, p. 857-866, 2006.

DMOWSKI, W. P. Immunological aspects of endometriosis. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 50, p. 3-7, 1995.

ESPER, M. A.; MOSS, M.; MARTIN, G. S. The effect of diabetes mellitus on organ dysfunction with sepsis: an epidemiological study. *Critical Care*, 13: R18, 2008.

FELS, A. O.; COHN, Z. A. The alveolar macrophage. **Journal of Applied Physiology**, v. 60, p. 353-359, 1986.

FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.; O’GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 147, p. 3815-3822, 1991.

FITZGERALD, K. A.; ROWE, D. C.; GOLENBOCK, D. T. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD-2 complex. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 1361-1367, 2004.

GALANOS, C.; FREUDENBERG, M. A. Mechanism of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity. **Immunobiology**, v. 187, p.346-356, 1993.

GAULTON, G. N.; SCHWARTZ, J. L.; EARDLEY, D. D. Assessment of the diabetogenic drugs alloxan and streptozotocin as model for the study of immune defects in diabetic mice. **Diabetologia**, v. 28, p. 769-775, 1985.

GERARD, C.; BRUYNS, C.; MARCHANT, A.; ABRAMOWICZ, D.; VANDENABEELE, P.; DELVAUX, A.; FIERIS, W.; GOLDMAN, M.; VELU, T. Interleukin-10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 177, p. 547-550, 1993.

GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; JUNG, S.; SIEWEKE, M. H.; MERAD, M.; LEY, K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, p. 656-661, 2010.

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.

GIOANNINI, T. L.; WEISS, J. P. Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. **Immunology Research**, v. 39, p. 249-6, 2007.

GIOVANNONI, G; LAND, J. M.; KEIR, G.; THOMPSON, E. J.; HEALES, S. J. Adaptation of the nitrate reductase and Griess reaction methods for the

measurement of serum nitrate plus nitrite levels. **Annals of Clinical Biochemistry**, v.34 (Pt 2), p. 193-8, 1997.

GIRAL, M.; Balsa, D.; Ferrando, R.; Merlos, M.; Garcia-Rafanell, J.; Forn, J. Effects of UR-12633, a new antagonist of platelet-activating factor, in rodent models of endotoxic shock. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 1223-1231, 1996.

GHOSH, S.; May, M. J.; Kopp, E. B. NF- κ B and rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 225-260, 1998.

GRAEVE, L.; Baumann, M.; Heinrich, P. C. Interleukin-6 in autoimmune disease: role of IL-6 in physiology and pathology of the immune defense. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 71, p. 664-671, 1993.

GRIMBLE, R. F. Nutritional modulation of cytokine biology. **Nutrition**, v. 14, p. 634-640, 1998.

GROSS, S. S. Nitric oxide: Pathophysiological mechanisms. **Annual Review of Physiology**, v. 57, p. 737-769, 1995.

GORDON, S.; Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 953, 2005.

GORDON, S.; Martinez, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, p. 593-604, 2010.

GUPTA, S.; Koirala, J.; Khardori, R.; Khardori, N. Infections in diabetes mellitus and hyperglycemia. **Infectious Disease Clinics of North America**, vol. 21, no. 3, pp. 617-38, 2007.

HäCKER, H.; Redecke, V.; Blagoev, B.; Kratchmarova, I.; Hsu, L. C.; Wang, G. G.; Kamps, M. P.; Raz, E.; Wagner, H.; HäCKER, G.; Mann, M.; Karin, M. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. **Nature**, v. 439, p. 204-207, 2006.

HILL, J. A.; Faris, H. M. P.; Schiff, I.; Anderson, D. J. Characterization of leucocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 50, p. 216-222, 1988.

HOLT, P. G.; Oliver, J.; Bilyk, N.; McMEnamin, C.; McMEnamin, P. G.; Kraal, G.; Thepen, T. Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 177, p. 397-407, 1993.

HUSSELL, T.; Bell, T. J. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, 2014.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes: Facts and Figures**. IDF. 2013. Disponível em: <http://www.idf.org/worlddiabetesday/toolkit/gp/facts-figures>). Acesso em: 30 de junho de 2014.

IVASHKIV, L. B. Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. **Trends in Immunology**, v. 34, p. 216-223, 2013.

JANEWAY, C. A. Jr.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JERALA, R. Structural biology of the LPS recognition. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, p. 353-363, 2007.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Seminars in Immunology**, v. 19; p. 24-32, 2007.

KIM, K. S.; LEE, D. S.; BAEC, G. S.; PARK, S. J.; KANG, D. G.; LEE, H.S.; OH, H.; KIM, Y. C. The inhibition of JNK MAPK and NF- κ B signaling by tenuifolside A isolated from *Polygala tenuifolia* in lipopolysaccharide-induced macrophages is associated with its anti-inflammatory effect. **European Journal of Pharmacology**, v. 721, p. 267-276, 2013.

KIMURA, H.; HOKARI, R.; MIURA, S.; SHIGEMATSU, T.; HIROKAWA, M.; AKIBA, Y.; KUROSE, I.; HIGUCHI, H.; FUJIMORI, H.; TSUZUKI, Y.; SERIZAWA, H.; ISHII, H. Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. **Gut**, v. 42, p. 180-187, 1998.

KIRBY, A. C.; COLES, M. C.; KAYE, P. M. Alveolar macrophages transport pathogens to lung draining lymph nodes. **The Journal of Immunology**, v. 183, p. 1983-1989, 2009.

KNAPP, S.; LEEMANS, J. C.; FLORQUIN, S.; BRANGER, J.; MARIS, N. A.; PATER, J.; VAN ROOIJEN, N.; VAN DER POLL, T. Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.167, p. 171-179, 2003.

KRISTIANSEN, O. P.; MANDRUP-POULSEN, T. Interleukin-6 and Diabetes The Good, the Bad, or the Indifferent? **Diabetes**, vol. 54, S114-S124, 2005.

KUMAR, H; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition in the innate immune response. **Biochemical Journal**, v. 420, p. 1-16, 2009a.

KUMAR, H; KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 388, p. 621-625, 2009b.

LAWRENCE, T.; NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 750-761, 2011.

LEHRER, R. I. Primate defensins. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 727-738, 2004.

LENZEN, S. & MUNDAY, R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its *N*-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, p. 1385-1391, 1991.

LENZEN, S.; TIEDGE, M.; JORNS, A.; MUNDAY, R. Alloxan derivatives as a tool for the elucidation of the mechanism of the diabetogenic action of alloxan. In: **Lessons from Animal Diabetes**, Birkhauser, Boston, E SHAFRIR (ed): v. 113-122, p. 1996.

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

LEIBIGER B.; LEIBIGER, I. B.; MOEDE, T.; KEMPER, S.; KULKARNI, R. N.; KAHN, C. R.; DE VARGAS, L. M.; BERGGREN, P. O. Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells. **Molecular Cell**, p. 559-70, 2001.

LI, L; COUSART, S.; HU, J.; MCCALL, C. E. Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 23340-23345, 2000.

LI, S.; STRELOW, A.; FONTANA, E. J.; WESCHE, H. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 5567-5572, 2002.

LU, Y. C.; YEH, W. C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, p. 145-155, 2008.

MALEFYT, R. W.; ABRAMS, J.; BENNETT, B; Figdor, C. G.; de VRIES, J. E. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 174, p. 1209-1220, 1991.

MARTIN, T. R.; FREVERT, C. W. Innate immunity in the lungs. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 2, n. 5, p. 403-411, 2005.

MARTIN, T. R.; MATHISON, J. C; TOBIAS, P. S.; LETURCQ, D. J.; MORIARTY, A. M.; MAUNDER, R. J.; ULEVITCH, R. J. Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial polysaccharide: implications for cytokine production in normal and injured lungs. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 90, p. 2209-2219, 1992.

MARTIN, T. R.; RUBENFELD, G. D.; RUZINSKI, J. T.; GOODMAN, R. B.; STEINBERG, K . P.; LETURCQ, D. J.; MORIARTY, A. M.; RAGHU, G., BAUGHMAN, R. P.; HUDSON, L. D. Relationship between soluble CD14, lipopolysaccharide binding protein, and the alveolar inflammatory response in

patients with acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.155 p. 937-944, 1997.

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-kB Activation In Alveolar Macrophages. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 22, p. 279-286, 2008b.

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

MARTINS, J. O.; ZANONI, F. L.; MARTINS, D. O.; COIMBRA, R.; KRIEGER, J. E.; JANCAR, S.; SANNOMIYA, P. Insulin regulates cytokines and intercellular adhesion molecule-1 gene expression through nuclear factor-kappaB activation in LPS-induced acute lung injury in rats. **Shock**, v. 31, p. 404-9, 2009.

MEDZHITOV, R; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, p. 394-397, 1997.

MEDZHITOV, R; JANEWAY, C. Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunology Review**, v. 173, p. 89-97, 2000.

MEISEL, C.; VOGT, K.; PLATZER, C.; RANDOW, F.; LIEBENTHAL, C.; VOLK, H. D. Differential regulation of monocytic tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 expression. **European Journal of Immunology**, v. 26, p. 1580-1586, 1996.

MILLER, S. I.; ERNST, R. K.; BADER, M. W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. **Nature Review Microbiology**, v. 3, p. 36-46, 2005.

MIYAKE, K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. **Seminars in Immunology**, v. 19, p. 3-10, 2007.

MOLLER, D. E. Potential role of TNF- α in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 11, p. 212-217, 2000.

MOSSER, D. M.; EDWARDS; J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Review Immunology**, v. 8, p. 958-969, 2008.

MURRAY P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Review Immunology**, v. 11, p. 723-737, 2011.

MUZIO, M.; NI, J.; FENG, P.; DIXIT, V. M. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. **Science**, v. 278, p. 1612-1615, 1997.

NUNES, F. P. B. ; SAMPAIO, S. C.; SANTORO, M. L. ; SOUZA-e-SILVA, M. C. C. S. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. **Toxicon**, v. 49, p. 1090-1098, 2007.

PATTERSON, C. C.; DAHLQUIST, G. G.; GYURUS, E; GREEN, A.; SOLTESZ, G.; GROUP, E. S. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989–2003 and predicted new cases 2005–20: a multicentre prospective registration study. **Lancet**, v. 373, p. 2027–2033, 2009.

PAVLIDIS, T. E. Cellular changes in association with defense mechanisms in intra-abdominal sepsis. **Minerva Chirurgica**, v. 58, p. 777-781, 2003.

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**, vol. 23, p. 3–13, 2007.

POLLARD, J. W. Trophic macrophages in development and disease. **Nature Review Immunology**, v. 9, p. 259-270, 2009.

PTAK, W.; KLIMEK, M.; BRYNIARSKI, K.; PTAK, M.; MAJCHER, P. Macrophage function in alloxan diabetic mice: expression of adhesion molecules, generation of monokines and oxygen and NO radicals. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 114, p. 13-18, 1998.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, p. 71, v. 635-700, 2002.

REES, D. A.; ALCOLADO, J. C., 2004. Animal models of diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**, v. 22, p. 359-370, 2005.

RERUP, C. C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. **Pharmacological Reviews**, v. 22, p. 485-518, 1970.

SABAT, R.; GRÜTZ, G.; WARSZAWSKA, K.; KIRSCH, S.; WITTE, E.; WOLK, L; GEGINAT, J. Biology of interleukin-10. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 21, p. 331-44, 2010.

SALEZ, L.; SINGER, M.; BALLOY, V.; CREMINON, C.; CHIGNARD, M. Lack of IL-10 synthesis by murine alveolar macrophages upon lipopolysaccharide exposure. Comparison with peritoneal macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 67, 2000.

SAWA, T.; OHSHIMA, H. Nitritive DNA damage in inflammation and its possible role in carcinogenesis. **Nitric Oxide**, v. 14, p. 91-100, 2006.

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.

SCHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, p. 878-888, 2011.

SHILING, A. M.; RAPHAEL, J. Diabetes, Hyperglycemia, and Infections. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, vol. 22, no. 3, pp. 519–535, 2008.

SETHI, G; SUNG, B.; AGGARWAL, B. B. TNF: a master switch for inflammation to cancer. **Frontiers in Bioscience**, v.13, p. 5094-5107, 2008.

SESHASAI, S. R.; KAPTOGE, S.; THOMPSON, A.; DI ANGELANTONIO, E.; GAO, P.; SARWAR, N.; WHINCUP, P. H.; MUKAMAL, K. J.; GILLUM, R. F.; HOLME, I.; NJOLSTAD, I.; FLETCHER, A.; NILSSON, P.; LEWINGTON. S.; COLLINS. R.; GUDNASON, V.; THOMPSON, S. G.; SATTAR, N.; SELVIN, E.; HU, F. B.; DANESH, J. Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, p. 829-841, 2011

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

SHIMIZU, T.; HONDA, Z.; NAKAMURA, M.; BITO, H.; IZUMI, T. Platelet-activating factor receptor and signal transduction. **Biochemical Pharmacology**, 44: 1001-1008, 1992.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo veritas*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, p. 787-795, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. São Paulo, SP, 2012-2013.

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 decreases susceptibility to sepsis in diabetic mice. **Diabetes**, v. 61, p. 1584-1591. 2012.

SRINIVASAN, S; LEEMAN, S. E.; AMAR, S. Beneficial Dysregulation of the Time Course of Inflammatory Mediators in Lipopolysaccharide-Induced Tumor Necrosis Factor Alpha Factor-Deficient Mice. **Clinical and vaccine immunology**, p. 699-704 v. 17, n. 5, 2010.

STOUT, R. D.; SUTTLES, J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, p. 509-513, 2004.

SUASSUNA, J. H.; DAS NEVES, F. C.; HARTLEY, R. B.; OGG, C. S.; CAMERON, J. S. Immunohistochemical studies of the peritoneal membrane and infiltrating cells in normal subjects and in patients on CAPD. **Kidney International**, v. 46, p. 443-454, 1994.

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.

SUZUKI, T.; MORAES, T. J.; VACHON, E.; GINZBERG, H. H.;HUANG, T.T.; MATTHAY, M. A.; HOLLENBERG, M. D.; MARSHALL, J.; McCULLOCH, C. A.; ABREU, M. T.; CHOW, C. W.; DOWNEY, G. P. Proteinase-activated receptor-1 mediates elastase-induced apoptosis of human lung epithelial cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**,v.33, n. 3, p. 231-247, 2005.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, 50: 536-46, 2001.

THEPEN, T.; VAN ROOIJEN, N.; KRAAL, G. Alveolar macrophage elimination in vivo is associated with an increase in pulmonary immune response in mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 170, p. 499-509, 1989.

THORLEY, A. J.; FORD, P. A.; GIEMBYCZ, M. A. GOLDSTRAW, P.; YOUNG, A.; TETLEY, T. D. Differential Regulation of Cytokine Release and Leukocyte Migration by Lipopolysaccharide-Stimulated Primary Human Lung Alveolar Type II Epithelial Cells and Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 463-473, 2007.

TOBIAS, P. S.; SOLDAU, K.; ULEVITCH, R. J. Isolation of a lipopolysaccharide binding acute phase reactant from rabbit serum. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 164, p. 777-93, 1986.

TOPLEY, N.; MACKENZIE, R. K.; WILLIAMS, J. D. Macrophages and mesothelial cells in bacterial peritonitis. **Immunobiology**, v. 195, p. 563-573, 1996.

VALLEDOR, A. F.; COMALADA, M.; XAUS, J.; CELADA, A. The Differential Time-course of Extracellular-regulated Kinase Activity Correlates with the Macrophage Response toward Proliferation or Activation. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275, N. 10, p. 7403-7409, 2000.

VAN BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M. G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiology Review**, v. 91, n. 1, p. 79-118, 2011.

VAN DER POLL, T.; JANSEN, J.; LEVI, M.; TEN CATE, H.; TEN CATE, J. W.; VAN DEVENTER, S. J. H. Regulation of interleukin-10 release by tumor necrosis factor in humans and chimpanzees. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, p. 1985-1988, 1994.

WRIGHT, S. D.; TOBIAS, P. S.; ULEVITCH, R. J; RAMOS, R. A. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 170, p. 1231-41, 1989.

WURFEL, M. M.; WRIGHT, S. D. Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 transfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers: preferential interaction

with particular classes of lipid. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 8, p. 3925-3934, 1997.

WANIDWORANUN, C., STROBER, W. Predominant role of tumor necrosis factor- α in human monocyte IL-10 synthesis. **The Journal of Immunology**, v. 151, p. 6853-6861, 1993.

WANG, C.; DENG, L.; HONG, M.; AKKARAJU, G. R.; INOUE, J.; CHEN, Z. J. TAK1 is an ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. **Nature**, v. 412, p. 346-351, 2001.

WHITSETT, J. A. Intrinsic and innate defenses in the lung: intersection of pathways regulating lung morphogenesis, host defense, and repair. **Journal of Clinical Investigation**, v.109, n. 5, p. 565-569, 2002.

WELLHAUSEN, S. R. Definition of streptozocin toxicity for primary lymphoid tissues. **Diabetes**, 35: 1404-1411, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on noncommunicable diseases 2010**, 2011.

YANAGAWA, H.; SONE, S.; SUGIHARA, K.; TANAKA, K.; OGURA, T. Interleukin-4 Downregulates Interleukin-6 Production by Human Alveolar Macrophages at Protein and mRNA Levels. **Microbiology and Immunology**, v. 35, p. 879-93, 1991.

YANG, R. B.; MARK, M. R.; GRAY, A.; HUANG, A. XIE, M. H.; ZHANG, M; GODDARD, A.; WOOD, W. I.; GURNEY, A. L.; GODOWSKI, P. J. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. **Nature**, v. 395, p. 284-288, 1998.

YOUNG, V. J.; BROWN, J. K.; SAUNDERS, T. K.; HORNE, A. W. The role of the peritoneum in the pathogenesis of endometriosis. **Human Reproduction Update**, v.0, p. 1-12, 2013.

ZAAS, A. K.; SCHWARTZ, D. A. Innate immunity and the lung: defense at the interface between host and environment. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 15, n. 6, p. 195-202, 2005.

ZIMMET, P. Globalization, coca-colonization and the chronic disease epidemic: can the doomsday scenario be averted? **Journal of Internal Medicine**, v. 247, p. 301–310, 2000.

ANEXO I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF 92013

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo CERTIFICA que o projeto de pesquisa **"Efeito da insulina na ativação de seu gene, de seus receptores e de vias de sinalização induzidas por LPS em macrófagos alveolares de camundongos diabéticos"** (Protocolo CEUA/FCF/339), submetido pelo(a) **Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins**, foi APROVADO em reunião de 7 de novembro de 2011, por estar de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Certifica, também, que, em 18 de fevereiro de 2013, foi aprovada a inclusão do(a) aluno(a) **Fernando Henrique Galvão Tessaro** como pesquisador(a) responsável.

São Paulo, 20 de fevereiro de 2013.

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Vice-Coordenadora da CEUA/FCF/USP