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

Papel da insulina no remodelamento na vigência da inflamação pulmonar
alérgica em camundongos diabéticos e saudáveis.

Sabrina de Souza Ferreira

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

SÃO PAULO

2015

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

F383p Ferreira, Sabrina de Souza
Papel da insulina no remodelamento na vigência da inflamação
pulmonar alérgica em camundongos diabéticos e sadios / Sabrina
de Souza Ferreira. -- São Paulo, 2015.
78p.

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

Orientador: Martins, Joilson de Oliveira

1. Imunologia 2. Endocrinologia I. T. II. Martins, Joilson de
Oliveira, orientador.

615.37 CDD

Papel da insulina no remodelamento na vigência da inflamação pulmonar alérgica em
camundongos diabéticos e sadios

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Sabrina de Souza Ferreira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

SÃO PAULO

2015

Sabrina de Souza Ferreira

Papel da insulina no remodelamento na vigência da inflamação pulmonar alérgica em camundongos diabéticos e sadios

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
orientador/presidente

Prof.^a Dra. Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério

Prof.^a Dra. Maria Lucia Bueno Garcia

São Paulo, 26 de fevereiro de 2015.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Antônio e Iolanda,

Meus “alicerces”, meus exemplos.

Meus agradecimentos eternos, por me apoiarem sempre em todas minhas decisões, e se orgulharem por minhas conquistas. Por me mostrarem que eu era capaz.

Amo os.

Aos meus irmãos, Jefferson, Wellington, Jessica e Vanessa,

Não tenho palavras para agradecer o apoio, as inúmeras conversas, risadas, o companheirismo.

“Percebe e entende que os melhores amigos são aqueles que estão em casa” .

Meus melhores e eternos amigos.

Ao amor meu, Victor,

Obrigada por estar presente em todos os momentos da minha vida, por me erguer quando eu caí, por me mostrar uma luz, quando só via escuridão, por acreditar e me apoiar, por me colocar “para cima”, quando queria desistir.

Obrigada por me mostrar que sonhos são possíveis.

Meu amigo, meu confidente, meu companheiro, minha vida, amor meu,

Sem você nada seria possível.

As minhas eternas amigas, Danti, Sula, Naty,

“Quem tem amigos tem tudo”, e eu posso dizer que tenho tudo, obrigada por ouvirem tantos desabafos, pela grande torcida, por acreditarem em mim. Obrigada pela amizade de tantos anos, e quero estar com vocês por pelo menos, mais 200 anos.

A “culpada” por eu dar início ao meu mestrado, Fernanda,

Agradeço, imensamente, por ter acreditado em mim, por ter me envolvido nessa parte de pesquisa, por ter “abraçado” meu trabalho. Agradeço pela amizade.

Aos formandos de biologia 2010, Mayara, Jaqueline, Everton, Graziela e Hugo,

Meus biólogos favoritos, que estão comigo desde o início da minha caminhada, meus primeiros passos na vida acadêmica. E hoje ainda me acompanham sempre torcendo por mim. Obrigada.

As minhas queridas Karine, Karla e Milena,

Das risadas diárias, para as risadas esporádicas. Sempre muito divertidas e muito sinceras.

Obrigada pelo carinho, pelo apoio, e por essa amizade tão sincera.

Ao meu professor Joílson

Obrigada pela oportunidade, e por acreditar no meu trabalho, e por me ajudar a crescer profissionalmente.

Aos animais utilizados nesse experimento

Meu respeito, e agradecimento, sem eles esse trabalho não seria realizado.

“Mas sua busca não era fácil. Sua dificuldade era ser o que ela era, o que de repente se transformava numa dificuldade intransponível”.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Fernanda P.B. Nunes, pela colaboração total em todo o trabalho, pela ajuda com as figuras presentes nesse trabalho.

Ao professor Joilson pela orientação, crítica, estímulo, pela colaboração pela minha formação.

Ao Felipe Beccaria Casagrande, pela ajuda com a leitura das lâminas, pela amizade, pelas risadas diárias.

A Paula, pela ajuda com a estatística e com a finalização desse trabalho, pela amizade, e pelos ensinamentos.

A todos os colegas do laboratório de imunoendocrinologia, que me ajudaram na realização desse trabalho.

A Mariana Cristina Ferreira Silva, pelo suporte técnico.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À FAPESP, ao CNPq, à CAPES e à PROEX pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

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) Projeto 2012/06617-7 e do Programa Jovem Pesquisador 2010/02272-0.

RESUMO

FERREIRA, S.S. **Papel da insulina no remodelamento na vigência da inflamação pulmonar alérgica em camundongos diabéticos e sadios.** 2015. 78f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O *diabetes mellitus* (DM) e a asma são doenças de elevada incidência mundial. Embora ambas as doenças sejam comuns, há uma correlação negativa entre elas, uma vez que o aparecimento de DM, em pacientes previamente asmáticos, determina uma melhora do quadro asmático, em contrapartida, a insulina agrava a asma. O presente estudo avaliou o papel da insulina na vigência da inflamação alérgica crônica pulmonar em camundongos diabéticos e sadios. Para tanto, foram utilizados camundongos machos, da linhagem BALB/C, tornados diabéticos (aloxana, 50 mg/kg, i.v., 10 dias). Os animais foram sensibilizados com ovalbumina (OVA - 20 µg, e Al(OH)₃ -2 mg) 10 dias após a injeção de aloxana e receberam a mesma dose após 12 dias, após 6 dias da última sensibilização os animais foram expostos a nebulização durante 7 dias, com solução de OVA (5 mg/mL), ou salina (SAL). Os animais diabéticos e asmáticos foram separados em dois diferentes grupos, para receberem dois tratamentos distintos de insulina, um tratamento com uma única dose de insulina e outro tratamento com doses consecutivas de insulina, sempre antes dos desafios. Após 24h do último desafio foram feitas as seguintes análises: a) o número de células no fluido de lavado broncoalveolar (LBA), leucograma e a glicemia (monitor de glicose); b) quantificação das concentrações de citocinas (IL1 β , TNF- α , IL-6, IL-4, IL-10, VEGF, TGF- β) no sobrenadante do fluido de LBA pela técnica de ELISA; c) análise morfológica do tecido pulmonar através de cortes histológicos e coloração em hematoxilina e eosina (H/E) e d) deposição e quantificação de colágeno e muco no tecido pulmonar através de análise morfométrica em cortes histológicos corados com Tricômico de Masson e ácido periódico de Schiff (PAS), respectivamente. Comparados aos controles, camundongos diabéticos apresentaram redução de infiltrado inflamatório (34%) no fluido de LBA e de IL-1 β (87%). Ambos os grupos apresentaram leve marcação de colágeno e ausência de muco. Os animais não diabéticos desafiados com OVA, apresentaram um aumento de infiltrado inflamatório (44%) no fluido de LBA com presença de eosinófilos (25%), presença de eosinófilos (34%) no sangue periférico, aumento das concentrações de IL-4 (70%) , deposição de colágeno (72%), e presença de muco, quando comparado ao animal controle. Os animais diabéticos desafiados com OVA apresentaram parâmetros similares aos animais diabéticos que receberam nebulização com SAL. O tratamento dos animais diabéticos com dose única de insulina corrigiu completamente os níveis de celularidade no fluido de LBA, a presença de eosinófilos no sangue periférico, e os níveis de concentrações de IL-4 e IL-1 β , mas não corrigiu a deposição de colágeno ao redor das vias aéreas e secreção de muco. Já o tratamento com doses consecutivas corrigiu completamente os níveis de infiltrado inflamatório do LBA, presença de eosinófilos tanto no fluido de LBA como no sangue periférico, os níveis de concentrações de IL-1 β , deposição de colágeno e secreção de muco. A concentração de IL-10 não diferiu entre os grupos e as demais citocinas analisadas não foram detectadas no ensaio de enzima-imunoensaio utilizado. Em conjunto estes dados sugerem que a insulina deva regular o remodelamento das vias aéreas em modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar em camundongos diabéticos controlando o infiltrado inflamatório, a produção de IL-1 β , e consequentemente, a deposição de colágeno e secreção de muco.

Palavras chave: asma, *diabetes mellitus*, insulina, remodelamento, eosinófilos.

ABSTRACT

FERREIRA, S.S. Role of insulin on the presence of the remodeling induced by allergic airway inflammation in healthy and diabetic mice. 2015. 78f. Thesis (Master's Degree) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2015.

Diabetes mellitus (DM) and asthma are diseases of high incidence worldwide. Although both diseases are common, there is a negative correlation between them, since the appearance of DM in asthmatic patients previously determines an improvement in asthma profile, however, insulin exacerbates asthma. This study evaluated the role of insulin in the presence of chronic pulmonary allergic inflammation in diabetic mice and healthy. To this end, male mice were used in BALB / C strain, made diabetic (alloxan, 50 mg / kg, i.v., 10 days). Animals were sensitized with ovalbumin (OVA - 20 mcg, and Al (OH) 3 -2 mg) 10 days after the injection of alloxan and received the same dose at 12 days after 6 days after the last sensitization animals were exposed to nebulized for 7 days with OVA solution (5 mg / ml) or saline (SAL). Diabetics and asthmatic animals were divided in two different groups to receive two different insulin treatment, a treatment with a single dose of treatment with insulin and other insulin consecutive doses of ever before challenge. 24 hours after the last challenge the following analysis: a) the number of cells in the bronchoalveolar lavage (BAL), white blood cell count and blood sugar (glucose monitor); b) quantifying the concentrations of cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-4, IL-10, VEGF, TGF- β) in the BAL supernatant by ELISA; c) morphological analysis of lung tissue by histological sections and stained with hematoxylin and eosin (H / E) and d) deposition and quantification of collagen and mucus in the lung tissue by morphometric analysis of histological sections stained with trichrome of Massom and periodic acid Schiff (PAS), respectively. Compared to controls, diabetic mice showed a reduction of inflammatory infiltrate (34%) in the BAL, IL-4 concentrations (54%) and IL-1 β (87%). Both groups showed slight marking of collagen and no mucus. Non-diabetic mice challenged with OVA had an increased inflammatory inflammatory infiltration (44%) in the presence of BAL eosinophils (25%), eosinophils (34%) in peripheral blood, increase in IL-1 β (44%), collagen deposition (72%) and presence of mucus compared to control animals. Diabetic animals challenged with OVA showed similar patterns to those diabetic animals given nebulization with SAL. Treatment of diabetic rats with a single dose of insulin completely corrected the cellularity levels in BAL eosinophils in peripheral blood and the levels of IL-1 β concentrations, but did not correct deposition of collagen around airways and mucus secretion. Since treatment with consecutive doses completely corrected levels of the inflammatory infiltrate of the BAL eosinophils in both the peripheral blood and BAL, the levels IL-1 β concentrations, deposition of collagen and mucus secretion. The IL-10 concentration did not differ between groups and other cytokines analyzed were not detected in the test enzyme-immunoassay used. Together these data suggest that insulin is to regulate airway remodeling in an experimental model of allergic lung inflammation in diabetic mice controlling the inflammatory infiltration, IL-1 β , and therefore, deposition of collagen and secretion mucus.

Key words: asthma, diabetes mellitus, insulin, remodeling, eosinophils.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração de brônquio normal e brônquio asmático.....	03
Figura 2: Ilustração das diferentes fases da asma.....	08
Figura 3: Protocolo experimental I: Dose única de insulina.....	21
Figura 4: Protocolo experimental II: 14 doses de insulina.....	22
Figura 5: Determinação dos níveis glicêmicos (10 e 36 dias).....	26
Figura 6: Determinação da variação de peso (10 e 36 dias).....	26
Figura 7: Determinação da variação de peso após o tratamento com 14 doses de insulina.....	28
Figura 8: Determinação da variação de glicemia após o tratamento com 14 doses de insulina.....	28
Figura 9: Contagem de leucócitos em lavado broncoalveolar (LBA).....	29
Figura 10: Contagem de leucócitos em sangue periférico.....	31
Figura 11: Fotomicrografia do parênquima pulmonar.....	33
Figura 12: Fotomicrografias das vias aéreas de camundongos corados para análise de colágeno.....	35
Figura 9: Fotomicrografias das vias aéreas de camundongos corados para análise de muco.....	36
Figura 10 Quantificação de deposição de colágeno.....	38
Figura 11: Quantificação de deposição de muco	39
Figura 12: Efeito da insulina sobre a secreção de IL-4 em lavado broncoalveolar de camundongos.....	40
Figura 13: Efeito da insulina sobre a secreção de IL-1 β em lavado broncoalveolar de camundongos.....	40
Figura 14: Efeito da insulina sobre a secreção de IL-10 em lavado broncoalveolar de camundongos.....	41

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Representação dos grupos utilizados no trabalho.....	19
Tabela 2: Cinética da glicemia.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS E FÓRMULAS

Al(OH) ₃	- Hidróxido de Alúmen
APC	- Células apresentadoras de antígeno
CD	- Células dendríticas
DM	- <i>Diabetes mellitus</i>
DM1	- <i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM2	- <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
FGF2	- Fator de crescimento de fibroblastos
HE	- Hematoxilina e eosina
IL	- Interleucina
i.p.	- Intraperitoneal
IFN- γ	- Interferon gama
LB	- Linfócito B
LBA	- Lavado broncoalveolar
MEC	- Matriz extracelular
MHC II	- Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
NK	- <i>Natural killer</i>
OVA	- Ovalbumina
PAF	- Fator de ativação plaquetária
PAS	- Ácido periódico de Schiff
PBS	- <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PG	- Prostaglandina
SAL	- Salina
Th	- Linfócitos T <i>helper</i>
TGF- β	- Fator de crescimento transformador beta
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	- Fator de crescimento de endotélio vascular

LISTA DE SIMBOLOS

>	maior que
%	porcento
/	dividido por
±	mais ou menos
μ	mi
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrometro
dL	decilitro
g	grama
Kg	kilograma
L	litro
mg	miligrama
mL	mililitro
°C	graus celcius
rpm	rotação por minuto
U	unidade
UI	unidade internacional
α	alfa
β	beta
γ	gama
I	um
II	dois
III	três
IV	quatro

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações sobre hipersensibilidade.....	1
1.2 Asma.....	2
1.2.1 Fase aguda.....	4
1.3.2 Fase crônica.....	5
1.3.3 Remodelamento.....	7
1.3 Diabetes Mellitus	8
1.3.1 Diabetes Mellitus tipo 1	10
1.3.2 Diabetes experimental	11
1.3.3 Aloxana.....	12
1.4. Correlação entre diabetes mellitus e Asma	14
2. OBJETIVO.....	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Animais.....	19
3.2 Indução de diabetes mellitus	20
3.3. Modelo de inflamação alérgica pulmonar	20
3.3.1 Sensibilização	20
3.3.2 Desafio.....	20
3.4 Tratamento com insulina	20
3.5 Cinética de glicemia com o tratamento de insulina.....	21
3.6. Protocolo experimental.....	21
3.6.1 Protocolo experimental I: Dose única de insulina.....	21
3.6.2 Protocolo experimental II: 14 doses de insulina.	22
3.7 Lavado broncoalveolar (LBA).....	22
3.8 Leucograma	23
3.9. Contagem celular do LBA	23
3.10. Morfologia e Morfometria para análise de colágeno e muco nos pulmões.....	23
3.11. Quantificação de deposição de muco e colágeno.....	24
3.12 Quantificação de citocinas por enzima-imunoensaio	24
3.13. Análise estatística.....	24

4. RESULTADOS	26
4.1 Caracterização do modelo de DM	26
4.2. Cinética da Glicemia dos animais diabéticos e controles	27
4.3. Tratamento com 14 doses de insulina	27
4.4. Caracterização do modelo de asma	28
4.5. Migração celular induzida pela insulina no tecido pulmonar	31
4.6. Deposição de colágeno no tecido pulmonar	33
4.7. Deposição de muco no tecido pulmonar	35
4.8. Efeito da insulina sobre a secreção de citocinas	38
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS.....	59

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre hipersensibilidade

A hipersensibilidade pode ser definida como uma resposta imune adaptativa prejudicial contra antígenos não associados a agentes infecciosos, resultando em reação inflamatória e/ou dano tecidual. A hipersensibilidade pode ser dividida em quatro tipos: I, II, III, IV. Essa divisão é baseada nos mecanismos envolvidos e no início do processo. Uma doença pode envolver mais de um tipo de reação (ABBAS, 2012). Resumidamente, a hipersensibilidade tipo I é mediada por IgE, ativando mastócitos. A hipersensibilidade do tipo II é mediada por IgG, fagócitos e sistema complemento. Já a hipersensibilidade do tipo III mediada também por IgG, fagócitos, e complexos imunes (ligação entre antígeno e anticorpo). Enquanto que a hipersensibilidade do tipo IV mediada por linfócitos T (ABBAS, 2012; LOPES & PIVATO, 2012).

Particularmente a hipersensibilidade do tipo I também é conhecida como hipersensibilidade imediata, causada por IgE específicos para antígenos ambientais e mastócitos (MUR *et al.*, 2008; LOPES & PIVATO, 2012).

As doenças de hipersensibilidades imediatas são normalmente chamadas de alergias ou desordens atópicas (termo utilizado para definir a hereditariedade do indivíduo a produzir IgE contra alérgenos ambientais, ou seja, é o sinônimo de alergia). A hipersensibilidade do tipo I é causada pela ativação das células Th2, dando início a secreção de IgE, e consequentemente levam a um processo inflamatório (MUR *et al.*, 2008; LOPES & PIVATO, 2012).

O processo inflamatório, mediado por IgE, se inicia devido a uma sensibilização alérgica. Essa sensibilização ocorre por consequência de um primeiro contato do organismo a um agente sensibilizante ou alérgeno, tais como, pólen, pelo de animais, poluição entre outros. (HOLGATE, 2008; SCHOFIELD & CALHOUN, 2011).

Diversos fatores podem afetar o desenvolvimento de sensibilização, como, por exemplo, tipo de alérgeno, concentração do alérgeno, e se a exposição ocorre em conjunto com agentes que podem potencializar o processo de sensibilização (GALLI *et al.*, 2008).

É importante destacar que alguns indivíduos têm pré-disposição para se tornarem sensibilizados e passar a responder sinais e sintomas inflamatórios contra determinado fator ambiental, normalmente, não nocivo (GALLI *et al.*, 2008; HOLGATE, 2008).

A sensibilização, do indivíduo atópico, é caracterizada pela presença de algumas células do sistema imune, como células dendríticas (CDs), linfócitos Th2, linfócitos B (LB), mastócitos, e produção de IgE (MACKAY & ROSEN, 2001).

As CDs, consideradas, células apresentadoras de antígenos (APCs), se caracterizam por sua grande capacidade de capturar e processar antígenos, e são, consideradas, essenciais na resposta Th2 (LAMBRECHT, 2000; HAMMAD *et al.*, 2010; DECKERS *et al.*, 2013). No pulmão a principal função dessas células é capturar alérgenos inalados, do ambiente externo, e transportá-los para órgãos linfoides e apresentá-los para uma célula T inativa dando início a resposta imune (van RIJT *et al.*, 2005; HAMMAD *et al.*, 2010; SCHOFIELD & CALHOUN, 2011).

Sendo assim as CDs, apresentam o antígeno para as células T inativas através do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II), essas células se diferenciam em células Th2, que por sua vez, secretam IL-13 e IL-4, essas citocinas, ativam LB. Os LBs produzem anticorpos específicos tipo IgE para determinado agente sensibilizante (HAMMAD *et al.*, 2010; DECKERS *et al.*, 2013). A IgE normalmente, está presente, em níveis muito baixos no plasma, com exceção de pacientes atópicos que apresentam níveis séricos elevados dessa imunoglobulina (MANISE *et al.*, 2013). Na sensibilização, a IgE se liga, ao receptor FcεRI do mastócito, o mastócito por sua vez, secreta uma grande variedade de mediadores químicos, envolvidos na reação alérgica, entre os grânulos podemos citar a histamina, serotonina. Já os neoformados, incluem leucotrienos e prostaglandinas, PAF, e citocinas (HOLGATE, 2008; SCHOFIELD & CALHOUN, 2011).

Resumidamente, a sensibilização ocorre, pela capacidade do alérgeno induzir uma resposta Th2. Durante essa resposta IL-4 e IL-13, conduzem a secreção de IgE, por LB.

1.2 Asma

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, que está relacionada à exposição a alérgenos. É caracterizada por vários sintomas como: sibilância (chiado no peito), falta de ar, aperto no peito, tosse e limitação do fluxo de ar (GINA,2014) (Figura 1).

Figura.1: Ilustração de brônquio normal e brônquio asmático. A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, é caracterizada por produção de muco, vasoconstrição e edema, o que dificulta a passagem de ar pelos brônquios.

A asma é uma doença com alta incidência e há evidências que a prevalência dessa doença aumentou consideravelmente nos últimos 20 anos, principalmente em crianças. Dados mostram que quase 300 milhões de pessoas no mundo, sofrem de asma (GINA, 2014).

Estima-se que no Brasil, a prevalência de asmáticos seja de 20 milhões, ou seja, é considerada uma prevalência global de 10% (SBPT, 2012). As taxas de hospitalizações, pelo SUS, registradas foram de 160 mil em 2011, segundo o DATASUS. Esses dados mostram que a asma é a quarta causa de internações (SBPT, 2012).

Como principais manifestações da asma podem ser observadas sibilância (chiado ao respirar), dispneia, tosse seca e sensação de aperto torácico (STUMM *et al.*, 2011; SBPT, 2012).

A asma é um processo multicelular, caracterizado por aumento, principalmente, de eosinófilos, como também de neutrófilos, linfócitos T CD4+, linfócito B, ativação de

mastócito, entre outras células (HOLGATE, 2008; STUMM *et al.*, 2011; SCHOFIELD & CALHOUN, 2011; DECKERS *et al.*, 2013).

A asma pode ser classificada como hipersensibilidade do tipo I, uma atopia imediata, que está associada com linfócito Th2 e secreção de IgE específicos. Indivíduos atópicos produzem níveis elevados de IgE em defesa a alérgenos ambientais, ao contrário de indivíduos não atópicos que, sintetizam outros tipos de imunoglobulinas, como IgG e IgM e, apenas, poucas quantidades de IgE (GALLI *et al.*, 2008; SCHOFIELD & CALHOUN, 2011).

O desenvolvimento da asma acontece devido a um processo de sensibilização alérgica das vias aéreas, que ocorre, por consequência, de um primeiro contato do organismo a um agente sensibilizante, como citado anteriormente (SCHOFIELD & CALHOUN, 2011).

Assim os principais fatores etiológicos na asma atópica consistem em predisposição genética à hipersensibilidade de tipo I e exposição de gatilhos ambientais que ainda são pouco definidos (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2008; COHEN *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2012)

A asma é classificada em duas fases: aguda e fase crônica. A fase inicial se caracteriza por obstrução rápida das vias aéreas, mediada por mastócitos e mediadores químicos. A reação pode acontecer minutos após a exposição ao alérgeno (GALLI *et al.*, 2008; LEE & YANG, 2013). Por outro lado, a fase crônica, geralmente, se desenvolve de 2-6 horas com picos de 6-9 horas, após a exposição ao alérgeno é caracterizada por infiltrado leucocitário, principalmente de eosinófilos. (GALLI *et al.*, 2008).

1.2.1 Fase aguda

Essa fase inicial se caracteriza pela secreção de mediadores químicos, pré-formados, por mastócitos, no local afetado. Ocorre após minutos de exposição ao alérgeno (PEPYS & HUTCHCROFT, 1975).

Após a sensibilização, toda vez que o antígeno, entrar em contato com o organismo, os mastócitos já sensibilizados, (ou seja, mastócitos ligados a IgE específica), liberam os mediadores inflamatórios, causando, broncoespasmos (contração da musculatura lisa), edema, e obstrução de ar (HOLGATE & POLOSA, 2008).

Nesta fase, a histamina, a PGD₂ e o LTC₄, liberados pelos mastócitos, atuam sobre os vasos sanguíneos e sobre a musculatura lisa dos brônquios contribuindo, portanto, para o aumento do broncoespasmo associado à asma. Os efeitos espasmogênicos da histamina determinam o início da broncoconstrição, enquanto a PGD₂ e o LTC₄, juntamente com seus metabólitos, ampliam a reação em intensidade e duração, estendendo-a por até duas horas

após o estímulo (HOLGATE *et al.*, 1991, 1999). Nesta fase, a contração da musculatura lisa é o principal fator de obstrução (JEFFRIES *et al.*, 1981).

A IL-4, citocina secretada pelo mastócito na fase aguda, tem múltiplas ações, como direcionar a maturação dos linfócitos T, para a subpopulação Th2, assim aumentando a produção de IL-4, a secreção de outras citocinas, como IL-5 IL-13, entre outras. Essa citocina auxilia, também na ativação de linfócito B e secreção de IgE com consequente ligação dos mesmos em receptores Fc de mastócitos ou basófilos (HOLGATE & POLOSA, 2008; SCHOFIELD & CALHOUN, 2008) (Figura 2A).

1.3.2 Fase crônica

Entretanto, a fase crônica da asma, que acontece após a fase aguda, implica em sintomas mais prolongados, geralmente, se desenvolve de 2-6 horas com picos de 6-9 horas, após a exposição ao alérgeno. (BARNES, 2004)

A característica marcante desta fase é o recrutamento, principalmente de eosinófilos, como também de linfócitos T, resultante da ação dos mediadores quimiotáticos tais como: o LTB₄, o PAF, a IL-5 e o fator quimiotático do linfócito. É importante destacar a ação do PAF que além de ser um fato quimiotático, tem significativa ação broncoconstritora, além de induzir aumento da permeabilidade vascular e estimular a secreção de muco (PEARLMAN, 1999).

Atualmente sabe-se que a presença de linfócitos T e eosinófilos é de fundamental importância no desenvolvimento da asma (DECKERS *et al.*, 2013).

Os eosinófilos, granulócitos que se desenvolvem na medula óssea, são células proeminentes em doenças alérgicas. Essas células estão presentes nos pulmões, como característica que define a asma, tanto em humanos quanto em modelos animais (DECKERS *et al.*, 2013).

A associação entre eosinófilos e a hiper-reatividade das vias aéreas na asma tem sido extensivamente investigada. Estudos iniciais revelaram uma importante associação entre infiltrado eosinofílico e aumento da reatividade das vias aéreas, constatada tanto em humanos como em diferentes modelos experimentais de asma. Eosinófilos liberam proteínas que podem romper a barreira epitelial, causando degradação enzimática de mediadores ou prejudicando o efeito broncoprotetor. (De BOER *et al.*, 1996, MEHTA *et al.*, 1997, MEURS *et al.*, 1999; DECKERS *et al.*, 2013) (Figura 2B).

Diversas populações linfocitárias estão envolvidas no estabelecimento e evolução da resposta inflamatória na asma. Em camundongos, células NK1.1 representam uma pequena população de células *natural killer* que expressam receptores de células T (BENDELAC *et al.*, 1997). Foi demonstrado que estes linfócitos NK T atuam em sinergismo com os linfócitos T $\alpha\beta$ na patogênese da asma alérgica, pois animais deficientes nestas células apresentaram redução da eosinofilia pulmonar, hiper-reatividade das vias aéreas e, além disso, diminuição na concentração de citocinas do tipo Th2 quando comparados com seus controles (LISBONNE *et al.*, 2003). Resultados semelhantes foram obtidos em camundongos deficientes de células T $\gamma\delta$ que também apresentaram diminuição da eosinofilia pulmonar além de níveis reduzidos de IgG1, IgE e IL-5 (ZUANY-AMORIM *et al.*, 1998). Já foi sugerido que células T $\gamma\delta$ e NK T podem regular a diferenciação dos linfócitos para o perfil Th1 ou Th2 (MEDZHITOV & JANEWAY, 1997) e, desta forma, modular o desenvolvimento de doenças alérgicas das vias aéreas. Dentre as populações de células TCD4⁺ as de padrão Th2 são fundamentais visto que a eliminação desta subpopulação por anticorpos causou redução da hiper-reatividade brônquica e do infiltrado eosinofílico pulmonar (GAVETT *et al.*, 1994, SILVA, 2008).

Linfócitos TCD8⁺ também parecem participar no desenvolvimento da asma alérgica, entretanto, as poucas informações encontradas na literatura relacionadas a esta célula são conflitantes. Alguns autores associam estas células à diminuição da hiper-reatividade e produção de baixos níveis de IgE, enquanto outros autores sugerem que estas células têm papel crucial na indução da inflamação pulmonar (HAMELMANN *et al.*, 1996). Este papel conflitante foi discutido por Martin *et al.*, (2004) que demonstraram que estas células poderiam apresentar papel anti-inflamatório ou pró-inflamatório de acordo com a sub população observada.

Portanto, embora esteja bem estabelecida a participação dos eosinófilos na fase crônica da asma, pouco se sabe sobre o papel destas células na fase de remodelamento. Até recentemente, pouca atenção foi dada a um possível papel dos eosinófilos no processo de remodelamento tecidual, apesar da associação bem documentada entre eosinofilia tecidual com várias síndromes fibróticas. Estas células são fonte de vários fatores fibrogênicos e fatores de crescimento, incluindo os fatores de crescimento TGF- α , TGF- β , fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2), VEGF, metaloproteinase de matriz (MMP) -9, IL-4, IL-5, IL-13 entre outras (GLEICH, 2000, KAY, 2005).

1.3.3 Remodelamento

O termo remodelamento é utilizado, para alterações estruturais normais do pulmão, como ocorre no desenvolvimento embrionário e também para alterações anormais, devido a lesões nas vias aéreas (BUSSE *et al.*, 1999).

Em alguns asmáticos, o desenvolvimento da doença acompanha alterações irreversíveis da estrutura das vias aéreas, que culmina em remodelamento brônquico (PASCUAL & PETERS, 2005; BRANNAN & LOUGHEED, 2012).

O remodelamento é caracterizado por aumento de deposição de colágeno ao redor dos brônquios, fibrose subepitelial, hipertrofia (aumento do tamanho dos miócitos) e hiperplasia (aumento da divisão celular, que resulta em maior número de célula) do músculo liso, hiperplasia e metaplasia das células caliciformes epiteliais, e aumento da secreção do muco, (BARNES, 2004; STTUM *et al.*, 2011) (Fig.3).

Os mecanismos que levam o remodelamento das vias aéreas da asma ainda não estão totalmente compreendidos. Mas já se sabe que os mediadores inflamatórios presentes no processo alérgico estão diretamente relacionados com as mudanças estruturais anormais das vias aéreas no processo asmático (MAUAD *et al.*, 2007; BOULE & STERK, 2007).

O aumento nos níveis de TGF- β é um evento precoce no remodelamento, precedendo as mudanças morfológicas mensuráveis (LLOYD & HESSEL, 2010). Em animais sensibilizados e desafiados, a expressão de TGF- β aumenta poucas horas depois do estímulo e, dependendo do mesmo, tem seu ponto máximo alcançado já após 7 dias. Depois disso os níveis de TGF- β começam a declinar e aumenta a expressão de proteínas da matriz extracelular (BARTRAM & SPEER, 2004). O TGF- β é o mais potente estimulador direto da produção de colágeno conhecido, induzindo a síntese de fibronectina, proteoglicanos e colágeno por fibroblastos em quaisquer estágios de maturação (MAUVIEL, 2005, BOXALL *et al.*, 2006).

Outra característica, importante, do remodelamento das vias aéreas, é a fibrose das vias aéreas, caracterizada por deposição de componentes da matriz extracelular (MEC), como colágeno tipo I, III, V, fibronectina, tenascina, lumican e proteoglicanos. Essa fibrose contribui para o espessamento da parede, subsequente redução da distensibilidade das vias aéreas e limitação do fluxo de ar (STUUM *et al.*, 2011). (Figura 2C).

Figura. 2. Ilustração das diferentes fases da asma: (A) A asma é classificada como hipersensibilidade do tipo I, que está relacionada à resposta Th2, ativação de linfócitos B (LB), secreção de IgEs específicos e consequentemente ativação dos mastócitos. É dividida em fase aguda e fase crônica. A fase aguda é mediada por mediadores primários, secundários e citocinas. (B) Já a fase crônica é mediada por infiltrado leucocitário, principalmente de eosinófilos. Após repetidas exposições ao alérgeno, pode ocorrer alterações estruturais nas vias aéreas, denominadas remodelamento. (C) O remodelamento é caracterizado por aumento de deposição de colágeno e muco, hiperplasia do músculo liso e ativação de fibroblastos.

1.3 Diabetes Mellitus

Atualmente, o *diabetes mellitus* (DM) é considerado um dos principais problemas de saúde em todo o mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 347 milhões de pessoas no mundo tem DM. Em 2004 cerca de 3,4 milhões de pessoas morreram por consequência de hiperglicemia sérica em jejum (WHO, 2014). Em 2000, o Brasil estava entre os seis países com maior índice de pacientes diabéticos, contabilizando aproximadamente 12 milhões de pessoas com DM. No Brasil, cerca de 50% das pessoas com

diabetes não sabem da sua condição mórbida, sendo que aproximadamente de 5% a 10% dessas pessoas são portadoras da *diabetes mellitus* tipo 1 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O DM tem alta morbidade e mortalidade, o paciente diabético apresenta perda importante da qualidade de vida. Uma das principais causas de morte de pacientes com *diabetes* é insuficiência renal, cegueira, amputação dos membros inferiores, e doença cardiovascular (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Mundialmente, os custos diretos para o atendimento ao paciente diabético variam de 2,5% a 15% dos gastos nacionais em saúde, dependendo da prevalência local de *diabetes* e da complexidade do tratamento disponível. O *diabetes* representa também carga adicional à sociedade, em decorrência da perda de produtividade no trabalho, aposentadoria precoce e mortalidade prematura (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Diabetes mellitus é classificada como um grupo de doenças metabólicas heterogêneas, que apresenta em comum hiperglicemia. A hiperglicemia pode ser um resultado de defeitos na ação de insulina ou defeitos na secreção de insulina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, SBD, 2014).

Segundo a OMS existem hoje, quatro classes clínicas de DM, que são: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), DM gestacional e outros tipos específicos de DM.

DM1 é predominantemente considerada uma doença autoimune, resulta na destruição das células beta pancreáticas. Pacientes com DM1 são, necessariamente, insulínos dependentes. Já DM2 é o DM com maior incidência, é caracterizada por defeitos na ação e secreção de insulina, pacientes com DM2, não são, necessariamente, insulínos dependentes. A causa da DM2, geralmente, é desconhecida. A DM gestacional é caracterizada pela intolerância à glicose, seu início se dá durante a gestação. Outros tipos específicos de DM são formas menos comuns de DM, sua causa pode ser identificada, tendo características bastante variadas, podendo ser resultados de defeitos genéticos da função das células beta pancreáticas, ou defeitos genéticos na ação da insulina, efeitos colaterais de medicamentos, doenças no pâncreas exócrino, pancreatite, infecções e outras síndromes genéticas associadas ao *diabetes* (SBD, 2014).

Dentre os principais sintomas do DM, podemos destacar poliúria (aumento do volume urinário), polidipsia (aumento excessivo de sede), e perda ponderal de glicemia casual (aferir a glicemia a qualquer hora do dia) acima de 200mg/dl, e glicemias em jejum igual ou superior a 126 mg/dL (SBD,2014).

A incidência de infecções em pacientes com DM é maior do que pacientes não diabéticos. Esses pacientes apresentam uma maior probabilidade de apresentar complicações

em processos infecciosos. Estudos em humanos mostraram que o DM induz uma redução da secreção de citocinas e quimiocinas, provocando assim uma disfunção imune, diminuindo a resistência a infecções (GEERLINGS & HOEPELMAN, 1999; GEERLINGS *et al.*, 2000).

O desenvolvimento de complicações do *diabetes* está associado tanto com o déficit de controle dos níveis de glicose no sangue quanto com uma longa duração de *diabetes*. As alterações em processos inflamatórios são perceptíveis já em estágios iniciais em pacientes com DM mal controlada. Essas alterações contribuem para uma capacidade reduzida de montar uma resposta adequada à lesão (JOSHI *et al.*, 1999; PELEG *et al.*, 2006., SUNAHARA *et al.*, 2012).

Como citado anteriormente, as células endoteliais e leucócitos são integrantes de suma importância durante o desenvolvimento da resposta inflamatória. A literatura relata que pacientes diabéticos apresentam defeitos na interação leucócito endotélio, que culminam com a redução do *rolling* de leucócitos sobre endotélio, quando comparados a um paciente não diabético. Esta redução pode explicar o aumento de infecções em pacientes diabéticos (FORBES & COOPER, 2013).

1.3.1 Diabetes Mellitus tipo 1

Segundo a OMS o DM1 é uma das mais importantes doenças crônicas na infância em todo o mundo. O DM1, anteriormente conhecido como *diabetes* juvenil, compreende cerca de 5% a 10% do total de casos de DM, e sua prevalência está aumentando.

O DM1 é uma doença complexa, que envolve uma combinação de fatores. Para entender a base desta doença, é preciso compreender os eventos que levam ao desenvolvimento da doença autoimune. Até o momento três causas que levam DM1: predisposição genética, desregulação imunológica e exposição a causas ambientais (van BELLE *et al.*, 2011).

Estudos epidemiológicos mostram uma maior incidência de DM1 entre familiares. Entre irmãos essa incidência é de 6% contra 0,4% na população geral (REWERS & KLINGENSMITH, 1997).

O DM1 ocorre a partir da destruição das células beta pancreáticas, resultando na deficiência total de produção e secreção de insulina. O DM1 é caracterizado, por uma extensa resposta imune, devido à presença de um infiltrado de células nas ilhotas pancreáticas sobre a progressão temporal da insulite (inflamação das ilhotas de Langerhans do pâncreas). Essa

infiltração de linfócitos pode resultar na destruição de células beta produtoras de insulina (WILLCOX *et al.*, 2008; van BELLE *et al.*, 2011).

Na maioria dos casos, a destruição das células beta pancreáticas dos pacientes diabéticos tipo 1 é mediada por uma doença autoimune, porém em um menor índice, alguns pacientes DM1 não apresentam evidências de processo de autoimunidade. Geralmente o DM1 ocorre em pessoas que também sofrem de outras doenças autoimunes (MORDES *et al.*, 2004).

Apesar da riqueza de informações, o DM1 ainda permanece resistente à prevenção (PHARM *et al.*, 2013).

1.3.2 Diabetes experimental

Os modelos animais de diabetes têm sido usados extensivamente na obtenção do esclarecimento sobre esta doença. Eles têm fornecido inúmeros benefícios para os humanos, incluindo o tratamento de complicações oculares ou vasculares, e o desenvolvimento das técnicas de transplante de pâncreas, evidenciando o aumento ao entendimento do início de uma base imune no DM1, entre outros (MORDES, *et al.*, 2004; KIRSTEN, 2006).

A indução de diabetes experimental em animais utilizando produtos químicos, que destroem, por seleção, as células beta pancreáticas, e são efetivos e simples (KIRSTEN, 2006).

Diversos modelos de animais foram desenvolvidos, a fim de estudar a fundo o DM. A indução de DM experimental induzida por aloxana, é um modelo largamente utilizado para a indução experimental de DM1 (LERCO *et al.*, 2003; MORDES *et al.*, 2004).

Camundongos, como animais de experimentação, apresentam diversas vantagens em relação a outros animais de porte maior, como: fácil manuseio, possibilidade de trabalhar simultaneamente com vários grupos, sem ocupação de grandes espaços, facilidade para remoção dos diversos órgãos estudados, e redução de gastos com o projeto (KIRSTEN, 2006). Os camundongos também apresentam semelhanças clínicas, histopatológicas e laboratoriais com o ser humano diabético. Estudos mostram que animais diabéticos têm características comportamentais muito semelhantes com o diabético humano, como anorexia, polidipsia, polifagia, e altos volumes de débito urinário. Outras alterações vistas em modelos experimentais de diabetes são apatia, alterações na pelagem, odor forte da urina, queda dos pelos e catarata bilateral (LERCO *et al.*, 2003; MORDES *et al.*, 2004).

Além disso, o DM provoca disfunção imune, decréscimo na secreção de citocinas, e diminuição da resistência do homem a infecções. Uma das possibilidades para explicar a susceptibilidade do paciente diabético à infecção são modelos experimentais estudados, a fim de explicar a fisiopatologia do DM (LERCO *et al.*, 2003). Estudos demonstraram que o infiltrado leucocitário da cavidade pleural inflamada de ratos, encontrava-se reduzido em ratos diabéticos, quando comparados com animais inflamados não diabéticos (PEREIRA *et al.*, 1987). Outros estudos mostraram também que animais diabéticos apresentam deficiência de adesão e migração celular, devido a uma baixa expressão de ICAM-1 intimamente envolvida no processo de migração leucocitária (ANJOS-VALLOTA *et al.*, 2006).

1.3.3 Aloxana

A aloxana (2,4,5,6-tetraoxypyrimidine; 2,4,5,6-pyrimidinetetrone) foi descrita, primeiramente em 1818 por Brugnatelli. O modelo de indução de DM por aloxana em coelhos foi descrito pela primeira vez por Dunn, Sheehan and McLetchie em 1943, desde então a aloxana tem sido utilizada para induzir o *diabetes* experimental em animais. A droga é capaz de exercer uma ação diabetogênica quando administrada pelas vias, intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea (ROHILLA & ALI, 2012).

A aloxana é hidrofílica e uma substância instável. Sua meia vida é de 90 segundos, quando o pH é neutro e em temperatura de 37°C (DUNN & McLETCHE, 1943; SZKUDELSKI, 2001).

A injeção de aloxana induz um modelo de DM insulín dependente. Assim, a indução de DM experimental induzida por aloxana, é um modelo largamente utilizado para a indução de DM1 para modelos experimentais com animais (ROHILLA & ALI, 2012).

A dose de aloxana necessária para induzir DM no animal depende da espécie do animal, administração da via e se o animal está de jejum (LERCO *et al.*, 2003).

A via endovenosa tem sido a de escolha na maioria das espécies animais, o efeito da aloxana fica mais evidente nessa via, é a via mais utilizada devido à velocidade de infusão da droga. Doses efetivas de aloxana não induzem diabetes se as mesmas são injetadas lentamente. Estudos mostraram que as vias intraperitoneal e subcutânea, são satisfatórias no rato, e em coelhos doses maiores devem ser aplicadas somente por essas vias. Já, quando administrada por via oral, aloxana não apresenta efeito diabetogênico (MORDERS, *et al.*, 2004).

O jejum também tem um papel importante na resposta da aloxana. Lerco *et al.* (2003), mostraram que 95% dos animais tratados com aloxana, em jejum prolongado, tornaram-se diabéticos.

A aloxana tem uma seletiva ação tóxica sobre as células beta pancreáticas, causando necrose, das mesmas, nas ilhotas pancreáticas. Esta droga se acumula nas células betas do pâncreas, como os análogos da glicose (SZKUDELSKI, 2001; ROHILLA & ALI, 2012).

Quando injetada, a aloxana induz uma resposta multifásica de glicose no sangue dos animais. Esta resposta também altera a concentração de insulina no plasma, altera sequências estruturais de células beta e em última instância conduzem à morte celular, por necrose (ROHILLA & ALI, 2012).

Estudos mostraram que, após administração da aloxana, somente as células beta pancreáticas apresentam necrose, todos os outros tipos de células, endócrinas e não endócrinas, assim como o parênquima extra pancreático, não apresentavam mudanças. A ação citotóxica da aloxana é mediada, principalmente, por geração de espécies reativas do oxigênio. Contudo, trabalhos mostram que a aloxana não tem atividade tóxica para as células beta pancreáticas do ser humano, uma explicação para isso, é o fato dos mecanismos de captação de glicose entre humanos e roedores serem diferentes (ROHILLA & ALI, 2012).

Após os primeiros minutos de injeção de aloxana, uma hipoglicemia transitória, caracteriza a primeira fase. Esta hipoglicemia pode durar até 30 minutos, após a injeção. Nessa fase também há um aumento da concentração de insulina no plasma. A segunda fase, que ocorre depois de 1 hora após a administração de aloxana leva a um aumento de níveis glicêmicos no sangue, e ao mesmo tempo a um decréscimo de concentração de insulina. Na terceira fase novamente uma hipoglicemia, após 4 a 8h da administração de aloxana, é observada. Esta terceira fase é caracterizada também pelo início da necrose das células beta pancreáticas. A quarta fase se caracteriza pelo *diabetes* permanente, o animal apresenta hiperglicemia, e há degranulação e perda da integridade das células beta pancreáticas, essa fase ocorre de 24 a 48 horas após a administração de aloxana via endovenosa (WEAVER *et al.*, 1978; GORUS *et al.*, 1982).

Os mecanismos da ação da aloxana foram extensivamente estudados e hoje estão bem caracterizados, sendo um modelo amplamente utilizado para a indução de *diabetes mellitus* experimental em animais.

1.4. Correlação entre diabetes mellitus e Asma

A asma e o *diabetes* são doenças comuns, com grande incidência em todo o mundo. Dados clínicos e experimentais sugerem que a resposta imune é prejudicada em indivíduos diabéticos. (DOUEK *et al.*, 1999). No entanto, existe uma correlação negativa entre asma e DM. A coexistência de ambas as patologias num mesmo indivíduo é incomum, fato não esperado levando-se em conta a alta incidência de cada doença isolada na população geral. Aspectos diversos desta associação já foram descritos: o desencadeamento de DM, em pacientes previamente asmáticos, determina uma melhora do quadro asmático; o tratamento de paciente diabético com insulina agrava a asma, ocorrendo o mesmo em paciente asmático não diabético que recebe a insulina; na maioria dos casos em que ocorre a associação, a gravidade de ambas as doenças é leve. Em suma, asma e diabetes parecem apresentar certo tipo de antagonismo (HELANDER, 1958; DOUEK *et al.*, 1999).

Sabe-se que hormônios e outros fatores endócrinos, como glicocorticoides e agentes adrenérgicos, desempenham um papel modulatório na inflamação alérgica. Empregando modelo de inflamação alérgica pulmonar em ratos, Vianna & Garcia-Leme (1995) demonstraram que a insulina modula o componente inflamatório da reação asmática. Neste estudo verificou-se que animais, tornados diabéticos pela injeção de aloxana, exibem redução do infiltrado inflamatório pulmonar. O tratamento dos animais diabéticos com insulina corrige esta situação, sugerindo um papel importante da insulina na asma. Além disto, a insulina tem um papel importante na regulação da inflamação (SINGH *et al.*, 2013). Assim é possível especular que a asma é suprimida pelo diabetes, pois há uma relativa falta de insulina, que permite a manifestação clínica da mesma (VIANNA & GARCIA-LEME, 1995; SINGH *et al.*, 2013).

Em outros estudos com animais apenas na fase de sensibilização, o tratamento com a insulina em ratos diabéticos restaurou o número de degranulação de mastócitos e liberação de histamina e também a reatividade da ovalbumina. O tratamento, relativamente prolongado (12 dias), dos animais com insulina resulta na recuperação gradual da quimiotaxia avaliada *in vivo* (pleurisia, microscopia intravital) e *in vitro* (câmara de Boyden). Tratamentos agudos com insulina (3 dias) são inefetivos (PEREIRA *et al.*, 1987; SANNOMIYA *et al.*, 1990). Estes estudos contribuíram para que se compreendesse porque os pacientes diabéticos descompensados são mais susceptíveis a infecções, de um modo geral, e porque, poucos anos após a introdução da insulina em terapêutica, constatou-se que a mortalidade decorrente de processos infecciosos, no paciente diabético, decrescera.

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, utilizando modelo de inflamação pulmonar demonstraram que a insulina modula a produção/liberação de citocinas como TNF- α e IL-1 β , além de expressão de moléculas de adesão, como P e E-selectina, e também a migração de neutrófilos no pulmão durante a fase inicial da reação inflamatória alérgica (MARTINS *et al.*, 2010a). Considerando os dados previamente obtidos com o modelo experimental da fase inicial, e sabendo que a insulina tem um papel modulatório importante na reação alérgica inflamatório, direcionamos o estudo à percepção de que a insulina poderia modular o remodelamento na vigência da inflamação pulmonar alérgica em camundongos diabéticos e saudáveis.

OBJETIVOS

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel da insulina na vigência da fase crônica da inflamação alérgica pulmonar em camundongos diabéticos e saudáveis. Para tanto foram feitos:

- a) cinética celular tanto no lavado broncoalveolar e no sangue;
- b) avaliação de ativadores inflamatórios (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-4, IL-10, VEGF, TGF- β) no sobrenadante do LBA;
- c) avaliação de alterações estruturais no tecido pulmonar, através de cortes histológicos e coloração de H/E.
- d) avaliação de alterações estruturais ao redor das vias aéreas do pulmão pela deposição e quantificação de colágeno;
- e) avaliação de alterações estruturais dentro das vias aéreas do pulmão pela deposição e quantificação da presença de muco nos brônquios;

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O presente estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA/FCF/340; anexos I e II). Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/C, com idade entre 8 e 12 semanas, pesando entre 20-25 gramas procedentes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério, acondicionados em gaiolas coletivas, contendo no máximo cinco animais, em ciclo claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de 22°C e com livre acesso à água e alimento. Foram utilizados um total de 64 animais, sendo 5 animais por grupo dos animais que foram utilizados para a retirada do lavado broncoalveolar (LBA), técnica utilizada para contagem total e diferencial de células, e quantificação de citocinas e 3 animais por grupo dos animais que não foram realizados LBA, ou seja, esses animais foram utilizados para avaliação de quantificação de muco. Os animais foram divididos em 8 grupos, conforme descrito na tabela abaixo (Tabela 1).

Grupos	Injeção com aloxana	Desafio com OVA	Tratamento com insulina
Controle sensibilizado (OVA+SAL)	X	X	X
Controle asmático (OVA+OVA)	X	✓	X
Controle asmático com uma única dose de insulina (OVA+OVA+INS1)	X	✓	✓
Controle asmático com 14 doses de insulina (OVA+OVA+INS14)	X	✓	✓
Diabético sensibilizado (ALO+SAL)	✓	X	X
Diabético asmático (ALO+OVA)	✓	✓	X
Diabético asmático com uma única dose de insulina (ALO+OVA+INS1)	✓	✓	✓
Diabético asmático com 14 doses de insulina (ALO+OVA+INS14)	✓	✓	✓

Tabela 1: Representação dos grupos utilizados no trabalho. O X representa que os animais não receberam o tratamento apontando. E o ✓ representa que os animais receberam o tratamento apontado.

3.2 Indução de diabetes mellitus

Para indução do DM os animais foram deixados em jejum de 12 horas antes de receberem uma injeção endovenosa de aloxana (50 mg/kg) dissolvida em solução salina fisiológica. Animais controle receberam volume equivalente de solução salina, pela mesma via. A glicemia foi determinada através de um monitor de glicose (Accu-Check Active - Roche Diagnosis®), 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. Modelo de inflamação alérgica pulmonar

3.3.1 Sensibilização

Os animais foram imunizados com uma mistura contendo 20µg de ovalbumina (OVA) grau III (Sigma, USA) e 2 mg de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃, Reheis Inc, USA), injetada intra-peritonealmente (i.p.) Após 12 dias os animais receberam esta mesma dose, como reforço. (STUMM, *et al.*, 2011).

3.3.2 Desafio

Após 18 dias da primeira sensibilização, os animais receberam o primeiro desafio antigênico através da exposição por via respiratória a uma solução de OVA grau III, 25 mg/mL em solução salina, durante 20 minutos e o mesmo procedimento foi repetido durante 7 dias (dias 28-33 e 35). A nebulização da OVA foi realizada por um aparelho ultrassônico (ICEL US-800, São Paulo, Brasil) que fornece partículas de 0,5-10µm de diâmetro, em aproximadamente 0,75 cc/min. Os experimentos foram realizados 24 horas após o último desafio antigênico (STUMM, *et al.*, 2011).

3.4 Tratamento com insulina

Um grupo de animais diabéticos asmáticos e um grupo de animais asmáticos não diabéticos receberam dose única de insulina NPH (2UI para animais diabéticos e 1UI para animais controles), por via subcutânea, 8 horas antes do experimento. Os níveis glicêmicos foram determinados antes e 8 horas após do tratamento com insulina (modificado de MARTINS, *et al.*, 2010a; 2010b). Um segundo grupo de diabéticos asmáticos receberam 2UI

de insulina NPH via subcutânea, 12h antes de cada desafio (19:00 horas) e 1UI (07:00 horas) de insulina NPH via subcutânea 2 horas antes dos desafios. No total foram 7 dias de desafios. As análises foram feitas 1 hora após a última dose de insulina. Outro grupo de animais-controle recebeu uma única dose 1UI de insulina NPH 2 horas antes do experimento (modificado de ANJOS-VALLOTA *et al.*, 2006; Di PETTA *et al.*, 2011).

3.5 Cinética de glicemia com o tratamento de insulina

Foi realizada uma cinética da glicemia dos animais antes de iniciar o tratamento, de doses diárias de insulina, para determinar quanto tempo depois do tratamento de insulina iniciáramos os desafios. Os animais diabéticos receberam 2UI de insulina NPH via subcutânea e os animais controle receberam 1UI de insulina NPH pela mesma via. Os níveis glicêmicos foram determinados em 1 hora, 2 horas, 3 horas, 6 horas, 8 horas após o tratamento com insulina.

3.6. Protocolo experimental

3.6.1 Protocolo experimental I: Dose única de insulina

Figura 3. Protocolo experimental I: Dose única de insulina. Após uma semana de adaptação, os animais receberam uma injeção endovenosa de aloxana (50 mg/Kg), e os animais controles receberam volume equivalente de salina pela mesma via (dia 0). Dez dias após a injeção de aloxana os animais diabéticos e controle receberam a primeira injeção intraperitoneal de OVA (20µg) e 2mg de Al(OH)₃, para a sensibilização. Doze dias após a primeira sensibilização os animais receberam uma dose reforço de sensibilização (dia 22). Após 6 dias da última sensibilização (dia 28) os animais foram 7 vezes desafiados com OVA (5 mg) via nebulização, e os animais controles receberam pela mesma via, salina (dias 28-33, 35). Após 24h do último desafio (dia 36), os animais diabéticos receberam uma única dose de insulina NPH (2UI) e os animais controle receberam uma única dose de insulina NPH (2UI). Após 8h da injeção de insulina os animais foram submetidos aos experimentos.

3.6.2 Protocolo experimental II: 14 doses de insulina.

Figura 4. Protocolo experimental II: 14 doses de insulina. Após uma semana de adaptação, os animais receberam uma injeção endovenosa de aloxana (50 mg/Kg), e os animais controles receberam volume equivalente de salina pela mesma via (dia 0). Dez dias após a injeção de aloxana os animais diabéticos e controle receberam a primeira injeção intraperitoneal de OVA (20µg) e 2mg de Al(OH)₃, para a sensibilização. Doze dias após a primeira sensibilização os animais receberam uma dose reforço de sensibilização (dia 22). Após 6 dias da última sensibilização (dia 28) os animais foram 7 vezes desafiados com OVA (5 mg) via nebulização, e os animais controles receberam pela mesma via, salina (dias 28-33, 35). O tratamento de insulina para os animais diabéticos foi realizado antes de cada desafio, 12h antes de cada desafio (19h) os animais receberam 2UI de insulina NPH, e 2h antes de cada de desafio (7h) os animais receberam 1UI de insulina NPH. E 24h após o último desafio os animais foram submetidos ao experimento. Os animais controle receberam uma única dose de insulina 2h antes do experimento.

3.7 Fluído do lavado broncoalveolar (LBA)

Os animais foram anestesiados utilizando-se de uma mistura de cloridrato de quetamina (90 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10mg/kg). Em seguida, a traqueia foi devidamente canulada com o auxílio de um cateter periférico (24G x 3/4). Após a traqueia ser canulada, foi realizada lavagem do espaço aéreo com 3 x 1,0 mL de solução PBS (pH 7,4) para obtenção do fluído do LBA. As amostras dos diferentes grupos experimentais foram centrifugadas (1500rpm/10 minutos) a 4°C e o sedimento celular obtido, foi ressuspensão em 1 mL de PBS (pH 7,4). Os fluídos do LBA foram armazenados e mantidos em -80°C até o momento do uso (TOLEDO *et al*, 2011).

3.8 Leucograma

Amostras de sangue periférico coletadas por via intracardíaca foram utilizadas para a determinação da contagem total de leucócitos. O valor foi determinado através de contador hematológico automatizado (ABC Vet – Horiba ABX). Extensões sanguíneas foram coradas pelo método pancrômico de Rosenfeld (ROSENFELD, 1947). Um total de 100 células foi contado por microscopia de luz, utilizando-se objetiva de 1000x.

3.9. Contagem celular do LBA

Para contagem do número total de células no LBA, a suspensão celular, foi diluída na proporção 1:2 (v:v) com líquido de Turk e a contagem total de células foi determinada em câmara de Neubauer. Além disso, mediante a utilização de uma citocentrífuga, a contagem diferencial foi realizada por meio de esfregaços corados pelo método pancrômico de Rosenfeld (ROSENFELD, 1947). Um total de 100 células foi contado por microscopia de luz, utilizando-se objetiva de imersão (1000x).

3.10. Morfologia e Morfometria para análise de colágeno e muco nos pulmões

Para a análise histológica, os pulmões foram retirados e fixados em formol a 10% até inclusão em parafina. Após a inclusão, foram obtidos cortes transversais, com aproximadamente 5µm de espessura, os quais foram posteriormente corados com hematoxilina e eosina (H/E), para observação da morfologia do parênquima pulmonar, enquanto que para a observação das fibras de colágeno foi utilizada a coloração de Tricômico de Masson, já o ácido periódico de Schiff (PAS) foi utilizado para a avaliação da produção de muco.

Com o objetivo de se obter um preparado permanente, logo após a coloração, o material foi novamente desidratado, diafanizado e montado com Entellan® entre lâmina e lamínula. Para a análise histológica, as lâminas contendo os tecidos foram observadas e fotografadas em microscópio de luz Nikon Eclipse 80i com o auxílio do programa de imagem NIS-Elements AR.

3.11. *Quantificação de deposição de muco e colágeno*

Após a análise morfológica, utilizando o software NIS-Elements AR. A área positiva foi medida em (μm^2). O número máximo de bronquíolos por lâmina foi fotografado, foi padronizado uma medida de diâmetros similares, para descartar a influência do calibre do bronquíolo. Os resultados são expressos como a média do total /área de diâmetro para cada animal (STUMM *et al*, 2014).

3.12 *Quantificação de citocinas por enzima-imunoensaio*

A dosagem de citocinas (IL1 β , TNF- α , IL-6, IL-4, IL-10, VEGF, TGF- β) foram realizadas em amostras do sobrenadante de LBA, utilizando-se kits comerciais (R&D Systems, Inc., Mineapolis, MN, USA).

3.13. *Análise estatística*

Os resultados foram expressos como media $\pm$ E.P.M. Para análise estatística, foi realizado o teste ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey. Diferenças com $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização do modelo de DM

No presente estudo, durante os experimentos realizados com camundongos machos da linhagem BALB/C, observou-se que administração endovenosa de aloxana (50mg/kg), exibiu características do estado insulino-pênico: perda de peso corporal e concentrações plasmáticas elevadas de glicose (>300 mg/dL), após 10 dias e se mantiveram até o experimento final (36 dias). No mesmo período, o grupo controle apresentou normoglicemia (100-170 mg/dL), bem como ganho de peso corporal normal (Figura 5 e 6).

Figura 5. Determinação dos níveis glicêmicos (10 e 36 dias). A glicemia foi determinada através de um monitor de glicose (Advantage, Lilly) 10 e 36 dias após a injeção endovenosa de aloxana (50mg/kg), utilizando-se amostras de sangue obtidas da extremidade da cauda dos animais. Animais controle receberam injeção de salina pela mesma via. Os valores representam a média da glicemia $\pm$ E.P.M. (10 animais por grupo). # $p < 0.05$ versus grupo controle.

Figura 6. Determinação da variação de peso (10 e 36 dias). O peso dos animais, pertencentes ao grupo controle e animais diabéticos foram avaliados antes, 10 dias e 36 após a injeção endovenosa de aloxana ou salina (50mg/kg). Os valores representam a média de peso $\pm$ E.P.M. (10 animais por grupo). # $p < 0.05$ versus grupo controle.

4.2. Cinética da Glicemia dos animais diabéticos e controles

Os animais diabéticos (10 dias) receberam uma única dose de insulina NPH (2UI), nota – se que com 1 hora após o tratamento com insulina a glicemia dos animais reduz por quase a metade, e com 2h já começa a aumentar, sendo considerando o animal hiperglicêmico novamente. O mesmo ocorre com os animais controles (1UI). Em ambos os grupos após 6 horas da administração da insulina, os valores da glicemia são similares aos valores antes do tratamento, o que mostra que após 6 horas da administração os valores da glicemia normalizam.

Animais	Glicemia					
	Antes da insulina	Depois da insulina				
		1h	2h	3h	6h	8h
Diabético	500±19	285±38*	372±20	342±95	501±44	568±15
Controle	149±11	68±8 [#]	67±2	62±2	134±13	153±15

Tabela 2. Cinética de Glicemia. Os animais receberam tratamento com aloxana ou SAL, como descrito acima. Os animais diabéticos receberam 2UI de insulina NPH, e os animais controles receberam 1UI de insulina NPH. Amostras de sangue foram obtidas por um corte na extremidade da cauda do animal, e a glicose determinada com um glicosímetro (Accu-Check Active, Roche Diagnosis®). Os valores representam a média da glicemia ± E.P.M. (6 animais por grupo). * p<0.005 versus glicemia antes do tratamento com a insulina; * p<0.005 versus glicemia antes do tratamento com a insulina; # p<0.005 versus glicemia antes do tratamento com a insulina.

4.3. Tratamento com 14 doses de insulina

No dia 36 os animais diabéticos que não receberam o tratamento com insulina apresentavam características do estado insulínopênico. Os animais que receberam o tratamento de 14 doses de insulina exibiram um aumento de peso corpóreo quando comparado aos animais diabéticos que não receberam o tratamento com insulina, esse aumento de peso foi de 50%, quando comparado aos animais asmáticos não diabéticos (OVA+OVA, OVA+OVA+INS1 e OVA+OVA+INS14). Uma única dose de insulina (ALO+OVA+INS1) não recuperou o peso corpóreo dos animais. (Figura 7). Em relação à glicemia, tanto os animais diabéticos que receberam o tratamento de 14 doses de insulina, como os animais diabéticos que não receberam o tratamento com insulina, no dia 36 apresentavam concentrações plasmáticas elevadas de glicose (Figura 8).

Figura 7. Determinação da variação de peso entre animais diabéticos tratados e não tratados com insulina. O peso dos animais diabéticos e dos diabéticos tratados e não tratados com insulina foram avaliados no dia 36 antes do experimento. Os valores representam a média de peso $\pm$ E.P.M. (5 animais por grupo). * $p < 0.05$ versus grupo ALO+OVA; # $p < 0.05$ versus grupo ALO+OVA+INS1.

Animais	Glicemia
ALO+OVA	551 $\pm$ 20
ALO+OVA+INS14	467 $\pm$ 27

Tabela 3. Determinação da variação de glicemia entre animais diabéticos tratados e não tratados com insulina. A glicemia foi determinada através de um monitor de glicose (Advantage, Lilly) 36 dias após a injeção endovenosa de aloxana (50mg/kg), utilizando-se amostras de sangue obtidas da extremidade da cauda dos animais. Animais controle receberam injeção de salina pela mesma via. Os valores representam a média da glicemia $\pm$ E.P.M. (5 animais por grupo).

4.4. Caracterização do modelo de asma

Em experimentos conduzidos após o último desafio com OVA ou SAL determinou-se o número total e diferencial de células presentes no LBA dos animais. Comparando-se aos valores obtidos nos animais desafiados com salina (OVA+SAL), os valores de celularidade observados no LBA dos animais desafiados com OVA (OVA+OVA) foram cerca de 2 vezes maior. Os eosinófilos, ausentes em condições basais, se apresentavam em aproximadamente 25% após o último desafio com OVA. Após a administração de uma única dose de insulina (OVA+OVA+INS1), os animais apresentaram um aumento leucocitário em aproximadamente 30% e mantiveram a proporção em relação à presença de eosinófilos (26%). O tratamento dos animais com 14 doses de insulina (OVA+OVA+INS14) não modificou esta resposta (Figura 9).

Comparando aos animais controles (OVA+SAL), a indução do diabetes (10 dias) promoveu marcada redução da resposta broncoalveolar (3 vezes). Além disto, os animais diabéticos não conseguem responder ao desafio com OVA (ALO+OVA),

mantendo os valores de celularidade inalterados. Comparando com os animais não-diabéticos desafiados com OVA (OVA+OVA), o tratamento dos animais diabéticos com dose única de insulina (ALO+OVA+INS1) é suficiente para restaurar a celularidade total, sem entretanto, recrutar eosinófilos. No entanto, o tratamento com 14 doses de insulina (ALO+OVA+INS14), amplificou a celularidade total e a migração eosinofílica em relação ao grupo não diabético (Figura 9).

Figura 9: Contagem de leucócitos em fluido de lavado broncoalveolar (LBA). O DM1 foi induzido pela injeção de aloxana (50mg/kg) 22 dias antes do primeiro desafio com OVA ou salina. Os animais foram sensibilizados com OVA + Al(OH)₃ (i.p.) 12 dias antes do primeiro desafio. Os animais receberam tratamento com insulina 8h antes dos experimentos e doses consecutivas antes do desafio. O fluido de LBA foi realizado 24h depois do último desafio. Os valores representam a média do número de leucócitos $\pm$ E.P.M. (5 animais por grupo). * $p < 0.005$ versus grupo OVA+SAL; ♠ $p < 0,05$ versus grupo OVA+OVA; # $p < 0.05$ versus grupo ALO+OVA; ♣ $p < 0,05$ versus grupo ALO+OVA+INS1.

Em experimentos conduzidos após o último desafio com OVA ou SAL determinou-se o número total e diferencial de células presentes no sangue periférico dos animais. Comparando-se aos valores obtidos nos animais desafiados com salina (OVA+SAL), os valores de celularidade observados no sangue periférico dos animais desafiados com OVA (OVA+OVA) foram similares. Os eosinófilos, ausentes em condições basais, se apresentavam em aproximadamente 34% após o último desafio com OVA. A administração de uma única dose de insulina (OVA+OVA+INS1), e de 14 doses de insulina não modificou esta resposta (Figura 10).

Comparando aos animais controles (OVA+SAL), a indução do *diabetes* (ALO+SAL) (10 dias) não alterou os valores de celularidade. Além disto, os animais diabéticos desafiados com OVA (ALO+OVA) apresentaram a mesma resposta, mantendo os valores de celularidade inalterados. Embora o desafio com OVA não tenha alterado a migração eosinófilos, mantendo a ausência dessas células. Comparando com os animais não-diabéticos desafiados com OVA (OVA+OVA), o tratamento dos animais diabéticos com dose única de insulina (ALO+OVA+INS1) é suficiente para restaurar o recrutamento de eosinófilos, assim como tratamento com 14 doses de insulina (ALO+OVA+INS14) (Figura 10).

Figura 10: Contagem de leucócitos em sangue periférico. O DM1 foi induzido pela injeção de aloxana (50mg/kg) 22 dias antes do primeiro desafio com OVA ou salina. Os animais foram sensibilizados com OVA + Al(OH)₃ (i.p.) 12 dias antes do primeiro desafio. Os animais receberam tratamento com insulina 8h antes dos experimentos e doses consecutivas antes de cada desafio. O valor foi determinado através de contador hematológico automatizado com amostra de sangue coletada por via intracardíaca. Os valores representam a média do número de leucócitos $\pm$ E.P.M. (5 animais por grupo). * $p < 0,001$ versus grupo OVA+SAL; # $p < 0,05$ versus grupo OVA+OVA; # $p < 0,05$ versus grupo ALO+OVA; ♦ $p < 0,001$ versus grupo ALO+OVA.

4.5. Migração celular induzida pela insulina no tecido pulmonar

Em experimentos conduzidos após o último desafio com OVA ou SAL, analisou-se o tecido pulmonar dos camundongos.

Comparando-se os tecidos dos animais desafiados com salina (OVA+SAL) com os animais desafiados com OVA (OVA+OVA), pode se observar células inflamatórias em torno dos vasos e vias aéreas, nos animais que receberam desafio com OVA, além da presença de infiltrado de polimorfonucleares. A administração de uma única dose de insulina (OVA+OVA+INS1), ou de 14 doses de insulina (OVA+OVA+INS14) não modificou esta resposta, quando comparado aos animais que receberam o desafio com OVA (Figura 11). Comparando aos animais controles (OVA+SAL), a indução do diabetes (10 dias) não promoveu alterações no tecido pulmonar, sem presença de infiltrado inflamatório. Além disto, os animais diabéticos não conseguem responder ao desafio com OVA (ALO+OVA), mantendo a ausência de células inflamatórias no tecido do pulmão. Comparando com os animais não-diabéticos desafiados com OVA (OVA+OVA), observamos que o tratamento dos animais diabéticos com dose única de insulina (ALO+OVA+INS1) não foi suficiente para restaurar a presença de células no tecido, entretanto, restaurou as células no interior de vasos sanguíneos. Esses resultados corroboram com os resultados apresentados no leucograma. No entanto, o tratamento com 14 doses de insulina (ALO+OVA+INS14), restaurou a presença de infiltrado inflamatório tanto no tecido pulmonar como nos vasos sanguíneos. Esses resultados corroboram com os resultados apresentados no fluído de LBA (Figura 11).

Fig 11: Fotomicrografia do parênquima pulmonar: constituído por brônquios (B) e vasos (V). Notar OVA+SAL, ALO+SAL, ALO+OVA, apresentaram tecido preservado. OVA+OVA, OVA+OVA+INS1, OVA+OVA+INS14, e ALO+OVA+INS14 apresentaram infiltrado inflamatório com presença de polimorfonucleares (seta). ALO+OVA+INS1, apresentou presença de infiltrado inflamatório com predominância de polimorfonucleares dentro dos vasos. Já, o grupo ALO+OVA+INS14 apresentou a presença de polimorfonucleares ao redor das vias aéreas (seta). Aumento de 10x (H/E).

4.6. Deposição de colágeno no tecido pulmonar

Em experimentos conduzidos após o último desafio com OVA ou SAL, analisou-se a deposição de colágeno no tecido pulmonar dos camundongos. Esses resultados estão expostos da Figura 12.

Comparando-se a deposição de colágeno dos animais desafiados com salina (OVA+SAL) com os animais desafiados com OVA (OVA+OVA), em condições basais, pode ser observada uma leve marcação de colágeno ao redor das vias aéreas. Em animais desafiados com OVA pode se observar acentuada marcação de colágeno ao redor das vias aéreas. Após a administração de uma única dose de insulina (OVA+OVA+INS1), ou de 14 doses de insulina (OVA+OVA+INS14) a deposição de colágeno se mostra acentuada ao redor das vias, quando comparado aos animais que receberam o desafio com OVA. Comparando aos animais controles (OVA+SAL), a indução do *diabetes* (10 dias) não promoveu alterações na deposição de colágeno. Além disto, os animais diabéticos não conseguem responder ao desafio com OVA (ALO+OVA), mantendo uma leve marcação de colágeno ao redor das vias aéreas.

Comparando com os animais não-diabéticos desafiados com OVA (ALO+OVA), o tratamento dos animais diabéticos com dose única de insulina (ALO+OVA+INS1) não foi suficiente para restaurar a acentuada marcação de deposição de colágeno ao redor das vias aéreas. No entanto, o tratamento com 14 doses de insulina (ALO+OVA+INS14), restaurou de forma marcante, a deposição de colágeno ao redor das vias aéreas. Corroborando com esses resultados, a quantificação de colágeno, mostra que, os valores em μm^2 observados ao redor das vias aéreas do grupo asmático (OVA+OVA), foi 3.6 vezes maior quando comparado ao grupo controle (OVA+SAL). Após a administração de uma única dose de insulina (OVA+OVA+INS1) e com 14 doses de insulina (OVA+OVA+INS14) não modificou esta resposta. Comparando aos animais controles (OVA+SAL), a indução do *diabetes* (10 dias) não promoveu alterações na quantidade de colágeno. Além disto, os animais diabéticos não conseguem responder ao desafio com OVA (ALO+OVA), mantendo os valores, em μm^2 , de colágeno similar aos valores de (ALO+SAL), o tratamento dos animais diabéticos com dose única de insulina (ALO+OVA+INS1) não foi suficiente para restaurar os níveis de deposição de colágeno. No entanto, o tratamento com 14 doses de insulina (ALO+OVA+INS14), amplificou, cerca de 5 vezes o valor de colágeno ao redor das vias aéreas em relação ao grupo diabético (Figura 13).

Fig 12: Fotomicrografias das vias aéreas de camundongos corados para análise de colágeno: constituído por brônquios (B). O grupo asmático (OVA+OVA) apresenta acentuada deposição de colágeno (seta) ao redor das vias aéreas. Diferente do grupo controle (OVA+SAL) e grupo diabético (ALO+OVA) que apresenta discreta marcação de colágeno. O tratamento de 14 doses de insulina (ALO+OVA+INS14) restaurou o colágeno ao redor das vias aéreas. Tricômico de Masson. (10x).

Figura 13. Quantificação de colágeno. Foram fotografados em média 10 campos por lâmina. A quantificação foi determinada pelo software NIS-Elements AR. Os valores representam a média do número de leucócitos $\pm$ E.P.M. (5animais por grupo). * $p < 0,001$ versus grupo OVA+SAL; ♠ $p < 0,001$ versus grupo OVA+OVA; ♣ $p < 0,001$ versus grupo OVA+OVA+INS1; ♦ $p < 0,001$ versus grupo OVA+OVA+INS1; # $p < 0,001$ versus grupo ALO+OVA; • $p < 0,001$ versus grupo ALO+OVA+INS1.

4.7. Deposição de muco no tecido pulmonar

Em experimentos conduzidos após o último desafio com OVA ou SAL, analisou-se a deposição de colágeno no tecido pulmonar dos camundongos. Esses resultados estão expostos da figura 13.

Comparando-se a deposição de muco dos animais desafiados com salina (OVA+SAL) com os animais desafiados com OVA (OVA+OVA), em condições basais, pode ser observada ausência de muco dentro das vias aéreas. Em animais desafiados com OVA observou-se acentuada marcação de muco dentro das vias aéreas. Após a administração de uma única dose de insulina (OVA+OVA+INS1), ou de 14 doses de insulina (OVA+OVA+INS14) a deposição de muco se mostrou acentuada dentro das vias, quando comparado aos animais que receberam o desafio com OVA. Comparando aos animais controles (OVA+SAL), a indução do *diabetes* (10 dias) não promoveu alterações na deposição de muco. Além disto, os animais diabéticos não conseguem responder ao desafio com OVA (ALO+OVA), mantendo ausência de muco dentro das vias aéreas. Comparando com os animais não-diabéticos desafiados com OVA (ALO+OVA), o tratamento dos animais diabéticos com dose única de insulina (ALO+OVA+INS1) não foi suficiente para restaurar a presença de muco. No entanto, o tratamento com 14 doses de insulina (ALO+OVA+INS14) restaurou, mesmo que em partes, a deposição de muco dentro das vias aéreas (Figura 14).

Corroborando com esses resultados, a quantificação de muco, mostra que, os valores em μm^2 observados ao redor das vias aéreas do grupo asmático (OVA+OVA) foi de 312 vezes maior. Após a administração de uma única dose de insulina (OVA+OVA+INS1) e com 14 doses de insulina (OVA+OVA+INS14) não modificou esta resposta. Comparando aos animais controles (OVA+SAL), a indução do *diabetes* (10 dias) não promoveu alterações. Além disto, os animais diabéticos não conseguem responder ao desafio com OVA (ALO+OVA), mantendo os valores, em μm^2 , de colágeno similar aos valores de (ALO+SAL), o tratamento dos animais diabéticos com dose única de insulina (ALO+OVA+INS1) não foi suficiente para restaurar os níveis de deposição de muco. No entanto, o tratamento com 14 doses de insulina (ALO+OVA+INS14), amplificou, em aproximadamente 169 vezes o valor de muco dentro das vias aéreas em relação ao grupo diabético (Figura 15).

Fig 14: Fotomicrografias das vias aéreas de camundongos corados para análise de muco: Observar o muco (seta) dentro das vias aéreas do grupo asmático (OVA+OVA). O grupo controle (OVA+SAL) e o grupo diabético (ALO+OVA) não tiveram produção de muco. O tratamento com 14 doses de insulina (ALO+OVA+INS14) restaurou a presença de muco. Aumento de 10x coloração PAS.

Fig.15 . Quantificação de muco. Foram fotografados em média 10 campos por lâmina. A quantificação foi determinada pelo software NIS-Elements AR. Os valores representam a média do número de leucócitos $\pm$ E.P.M. (5animais por grupo). * $p<0,001$ versus grupo OVA+SAL; ♠ $p<0,001$ versus grupo OVA+OVA; ♣ $p<0,001$ versus grupo OVA+OVA+INS1; ♦ $p<0,001$ versus grupo OVA+OVA+INS14; # $p<0,001$ versus grupo ALO+OVA; • $p<0,001$ versus grupo ALO+OVA+INS1.

4.8. Efeito da insulina sobre a secreção de citocinas

Em experimentos conduzidos após o último desafio com OVA ou SAL determinou-se a concentração das citocinas IL-4 (Figura 16), IL-1 β (Figura 16), e IL-10 (Figura 17) no fluído de LBA. As citocinas IL-6, VEGF, TGF- β e TNF- α não foram detectadas pelo kit.

Os resultados ilustrados, indicam que o desafio dos animais não diabéticos com OVA determinou um aumento de 3 vezes nas concentrações de IL-4, e cerca de 2 vezes nas concentrações de IL-1 β , sem apresentar alterações significativas nos níveis de IL-10 não alterou a resposta. A administração de uma única dose de insulina (OVA+OVA+INS1), ou 14 doses de insulina (OVA+OVA+INS14) não modificou a resposta de nenhuma das 3 citocinas. Comparando aos animais controles (OVA+SAL), a indução do *diabetes* (10 dias) promoveu marcada redução da secreção de IL-4 (50%), IL-1 β (8 vezes) e IL-10 não alterou a resposta. Além disto, os animais diabéticos não conseguem responder ao desafio com OVA (ALO+OVA), mantendo os valores de secreção de IL-4, IL-1 β e IL-10. Comparando com os animais não-diabéticos desafiados com OVA (OVA+OVA), o tratamento dos animais diabéticos com dose única de insulina (ALO+OVA+INS1) e com 14 doses (ALO+OVA+INS14), é suficiente para restaurar, em partes a secreção de IL-1 β , restaurar totalmente a secreção de IL-4, já a secreção de IL-10 permaneceu inalterada.

Figura 16. Efeito da insulina sobre a secreção de IL-4 em lavado broncoalveolar de camundongos. Os animais receberam uma única injeção de aloxana (50mg/kg) e depois foram sensibilizados com OVA e hidróxido de alumínio, e depois desafiados com OVA ou salina. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (5 animais por grupo). Não houve significância.

Figura 17. Efeito da insulina sobre a secreção de IL-1β em lavado broncoalveolar de camundongos. Os animais receberam uma única injeção de aloxana (50mg/kg) e depois foram sensibilizados com OVA e hidróxido de alumínio, e depois desafiados com OVA ou salina. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (5 animais por grupo). * $p < 0,01$ versus grupo OVA+OVA.

Figura 18. Efeito da insulina sobre a secreção de IL-10 em lavado broncoalveolar de camundongos. Os animais receberam uma única injeção de aloxana (50mg/kg) e depois foram sensibilizados com OVA e hidróxido de alumínio, e depois desafiados com OVA ou salina. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (5 animais por grupo). Não houve significância.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesse trabalho sugerem que a insulina modula o desenvolvimento da reação inflamatória alérgica pulmonar crônica, na fase do remodelamento dos brônquios, em modelo murino diabético, pela sua capacidade de restaurar: a) o infiltrado inflamatório no fluído de LBA; b) a eosinofilia; c) aparentemente, produção/liberação de IL-1 β ; d) a deposição de colágeno ao redor das vias aéreas; e e) parcialmente a secreção/deposição de muco dentro das vias aéreas.

Como visto anteriormente, o DM é uma doença com grande incidência mundial (ADA, 2015). O DM1 compreende cerca de 5% a 10% do total de casos do DM e sua prevalência está aumentando (WHO, 2014). Segundo o IDF (2013), aproximadamente 79 mil casos são diagnosticados em crianças com menos de 15 anos de idade, a cada ano. O DM1 é considerado uma doença autoimune, que tem como característica a destruição das células beta pancreáticas, que são as células produtoras de insulina. (WILLCOX, et al, 2008; van BELLE et al., 2011). Assim o paciente com DM1, é necessariamente insulínodpendente (SBD, 2014). Modelos experimentais utilizando drogas diabetogênicas como aloxana e a estreptozotocina são muito eficientes para estudar o DM (MARTINS *et al.*, 2010a; CAVALHER-MACHADO *et al.*, 2008). Essas drogas diabetogênicas, como a aloxana e a estreptozotocina, se acumulam nas ilhotas pancreáticas causando lesão irreversível das células β . A ação citotóxica de ambos agentes diabetogênicos é mediada por espécies reativas do oxigênio (RERUP, 1970; GAULTON *et al.*, 1985; WELHAUSEN, 1986; SZKUDELSKI, 2001). Diante da toxicidade apresentada pela estreptozotocina em células linfóides do baço e do timo (GAULTON *et al.*, 1985), acredita-se que a aloxana seja o agente mais apropriado para a indução do DM (GAULTON *et al.*, 1985; WELHAUSEN, 1986). Desta forma, neste estudo optamos pela utilização da aloxana.

A administração endovenosa de aloxana induziu de maneira característica o DM experimental, indicando: aumento de glicemia e redução de peso corpóreo, após o período de estabelecimento da doença, de aproximadamente 10 dias. Este estado insulínopênico foi mantido até o dia do experimento (36º dia). Cabe destacar que a padronização do modelo demorou cerca de um semestre inteiro. A indução de DM, utilizada anteriormente em nosso grupo, era de ratos da linhagem WISTAR (MARTINS, *et al.*, 2010a; 2010b), ou camundongos da linhagem C57BL/6 (SPILLER *et al.*, 2012). O nosso grupo de pesquisa, particularmente, padronizou a indução de DM

em camundongos da linhagem C57BL/6, utilizando a dose de 60mg/kg de aloxana por via endovenosa (BELLA, 2014). Por outro lado, a linhagem BALB/C é a escolhida em estudos envolvendo o modelo experimental de asma, porém, ao induzirmos o DM nestes camundongos (BALB/C) utilizando a dose padronizada de aloxana, foi possível observar uma alta mortalidade dos animais (STUMM *et al.*, 2011 e 2014). Cerca de 30% dos animais vinham a óbito antes dos 10 dias de estabilização da doença, e aproximadamente 50% do total de animais, antes dos 36 dias de experimento. Devido a esta alta mortalidade, e segundo Carlos e colaboradores (2013), passamos a utilizar uma dose de 50 mg/kg de aloxana por via endovenosa. Após a padronização da dose, a taxa de mortalidade baixou para quase 0%.

Assim como o DM, outra doença com grande epidemiologia mundial é a asma. A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, que está relacionada à produção de muco dentro das vias aéreas, vasodilatação, broncoconstrição, resultando em passagem de ar estreita pelas vias aéreas (GALLI *et al.*, 2008; SBPT, 2012). O modelo animal de inflamação pulmonar alérgica crônica é extensivamente utilizado para os estudos dos mecanismos reguladores do remodelamento pulmonar (GALLI, 2008). Além disto, a OVA, juntamente com seu adjuvante Al(OH)₃, tem sido utilizada como modelo experimental para estudo de inflamação alérgica pulmonar (VIANNA & GARCIA-LEME, 1995; MARTINS *et al.*, 2010a; 2010b). Conforme relatado na literatura uma maior quantidade de desafios alérgicos culmina em remodelamento, que é caracterizado por mudanças estruturais das vias aéreas, neste estudo, utilizamos um modelo de asma crônica, induzido por duas sensibilizações de OVA e hidróxido de alumínio seguido por 7 desafios com OVA via nebulização (STUMM *et al.*, 2011; 2014). Dessa maneira e de acordo com a literatura após este período os animais apresentaram um característico remodelamento das vias aéreas, com aumento da deposição de colágeno e secreção de muco.

A padronização do modelo de asma também demorou, pois no início do trabalho o modelo de indução de asma se baseou no protocolo descrito por Hogan *et al.*, 1997, porém, nesse modelo foram feitos apenas 2 desafios, o que é insuficiente para um modelo de asma com remodelamento, por isso mudamos para o modelo de STUMM *et al.*, 2011, com 7 desafios diários, o modelo de asma com remodelamento foi bem caracterizado.

A asma e o DM são doenças comuns e há uma correlação negativa entre elas (DOUEK *et al.*, 1999). A coexistência de ambas as doenças em um mesmo indivíduo é

incomum, fato não esperado levando-se em conta a alta incidência de cada doença isolada na população geral (DOUEK *et al.*, 1999). Uma das teorias para essa correlação negativa é o paradigma entre as resposta Th1 e Th2. As células T *helper* têm um papel importante na fisiopatologia das doenças autoimunes e atópicas, essas células, são classificadas em subgrupos, de acordo com as citocinas secretadas. As células Th1 produtoras de INF- γ , IL-2 e IL-12 estão envolvidas com doenças autoimunes, como, DM1. Em contraste, as células Th2, produzem IL-4, IL-13 e IL-5 ativando, eosinófilos, mastócitos e linfócitos B, e estão associados com doenças atópicas, como a asma. Aparentemente a resposta Th1 tende a inibir a resposta Th2. O DM1 não tem um papel de proteção contra a sensibilização de alérgenos, mas tem influência na frequência e gravidade das manifestações da asma (GAZIT *et al.*, 2008; TOSCA *et al.*, 2009). A asma clínica parece ser menos grave quando o DM está sobreposto. Dados epidemiológicos, sobre crianças com DM1 (DOUEK, 1999) são consistentes com estudos anteriores, mostrando certo tipo de antagonismo entre DM e atopias. O aparecimento de DM em pacientes previamente asmáticos, determina uma melhora no quadro asmático (HELANDER, 1958).

O tratamento padronizado para pacientes com DM1 é o uso diário de injeções de insulina (SBD, 2014). A insulina participa de uma variedade de processos, regulando a atividade metabólica na transcrição de genes pela modulação de proteínas envolvidas na sinalização intracelular. Além disso, a insulina é de extrema importância para a função normal de células endoteliais durante o processo inflamatório (revisto por SUNAHARA *et al.*, 2012).

Existem vários tipos de insulina, neste estudo utilizamos a insulina NPH que atinge seu pico máximo entre 6 a 8 horas após sua administração subcutânea (LEVEMIR[®], 2007; MARTINS *et al.*, 2010a; 2010b). Em outros trabalhos do grupo, em camundongos da linhagem C57BL/6, a glicemia dos animais tratados com insulina NPH, reduzia após 8 horas do tratamento com dose única de insulina NPH, porém no presente trabalho, a glicemia dos animais da linhagem BALB/C, após 8 horas do tratamento com insulina se mantinha em níveis elevados. Dessa forma, realizamos a cinética da glicemia em animais diabéticos sensibilizados com OVA (ALO+SAL) (2UI de insulina NPH) e dos animais não diabéticos sensibilizados com OVA (OVA+SAL) (1UI de insulina NPH).

Observamos que após 1 hora da administração de insulina, a glicemia tanto dos animais diabéticos, como dos animais não diabéticos, diminuiu pela metade,

mantendo-se estável até terceira hora e retornando aos valores iniciais a partir da sexta hora da administração do hormônio.

Segundo a SBD (2014) no tratamento clássico intensivo, são utilizadas duas doses de insulina NPH, de manhã (antes do café da manhã) e a noite (antes de dormir). Além disto, Di PETTA e colaboradores (2011) e Anjos-Vallota e colaboradores (2006), observaram que o tratamento com múltiplas doses de insulina, em modelo murino, é mais eficaz para inflamações crônicas em animais diabéticos. Nesse estudo foram feitos dois tratamentos diários, devido aos hábitos noturnos e do metabolismo mais acelerado dos camundongos, optamos por uma maior dosagem de insulina NPH à noite, e a menor dosagem pela manhã. É importante ressaltar que, no nosso estudo, os animais diabéticos tratados com doses diárias de insulina apresentaram, inclusive, recuperação da massa corporal no período analisado, mesmo sem normalização da glicemia no momento da dosagem.

Vale lembrar também que a deficiência e ou ausência de insulina durante o DM induz importantes alterações no metabolismo de glicídios, proteínas, lipídeos, água e minerais, causando complicações em diversos órgãos (SILVERSTEIN, *et al.*, 2005). O tratamento com insulina, restabelecendo os níveis glicêmicos tende a corrigir essas alterações metabólicas. No presente trabalho, observamos que os animais tornados diabéticos e asmáticos após o tratamento com 14 doses consecutivas de insulina apresentaram ganho de massa corporal, diferentemente do observado em animais diabéticos e asmáticos não tratados, cuja perda de peso é bem acentuada. Esse resultado nos permite sugerir que possivelmente a insulina controla de forma parcial o estado metabólico destes animais.

Pacientes diabéticos apresentam uma importante disfunção imune (LERCO *et al.*, 2003), também observada em modelos experimentais (PANNEERSELVAM & GOVINDASAMY, 2003; KIRSTEN, 2006; ALBA-LOUREIRO, *et al.*, 2007; FERRACINI *et al.*, 2010). Dados do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a insulina restaurou vários parâmetros inflamatórios que se encontravam reduzidos em ratos tornados diabéticos não tratados com insulina, mesmo sem completa normalização da glicemia. Assim, ratos tornados diabéticos e sensibilizados exibem marcada redução do infiltrado inflamatório celular, principalmente de neutrófilos, no fluído de LBA, 6 horas após o desafio com OVA (MARTINS *et al.*, 2010a). O tratamento destes animais diabéticos com dose única de insulina (NPH, 4UI, s.c.) 2 horas antes do desafio antigênico corrigiu esta resposta, mesmo sem normalizar a glicemia. Por outro lado o

jejum de 15 horas normaliza a glicemia, mas não modifica as características do fluído de LBA dos ratos diabéticos sensibilizados e desafiados, indicando que a simples correção da glicemia não é suficiente para restaurar a resposta de hipersensibilidade mediada por IgE (VIANNA & GARCIA-LEME, 1995).

No presente trabalho os animais tornados diabéticos e asmáticos (ALO+OVA) também apresentaram evidente redução de infiltrado inflamatório, e com ausência de eosinófilos, quando comparados aos animais não diabéticos e asmáticos (OVA+OVA). Os animais que apresentaram 5 vezes mais células no fluído de LBA, sendo que do total de 25% de eosinófilos. Além disto, apresentaram 34% de eosinófilos no sangue periférico. O tratamento, dos animais diabéticos asmáticos, com uma única dose de insulina (ALO+OVA+INS1), restaurou o infiltrado inflamatório do fluído de LBA sem restaurar a migração de eosinófilos no fluído de LBA mesmo com aumento da eosinofilia. Após o tratamento com 14 doses de insulina, tanto o infiltrado inflamatório quanto a presença de eosinófilos no sangue foram restabelecidas no fluído de LBA, quando comparados aos animais diabéticos não tratados com insulina. Os dados da morfologia confirmam os dados encontrados na celularidade, onde podemos ver que os animais diabéticos tratados com uma única dose de insulina apresentam presença de eosinófilos nos vasos sanguíneos, o que nos sugerem que esses eosinófilos tendem a migrar para o tecido. E após o tratamento de 14 doses de insulina os animais diabéticos asmáticos, apresentam eosinófilos no tecido.

Com o objetivo de se investigar a intervenção da insulina na produção/liberação das citocinas envolvidas na inflamação pulmonar crônica e no remodelamento das vias aéreas, procedeu-se a quantificação das citocinas no sobrenadante do fluído de LBA dos animais.

A IL-4, secretada por células T, mastócitos e basófilos, é importante na expansão clonal de células B, na produção de anticorpos, na proliferação de células T e na indução de células Th2. Está intimamente ligada a sensibilização do indivíduo (GREGHI, 2011). Já a IL-1 β induz a síntese e secreção de proteínas da fase aguda (BOGDAN, 2001) e é particularmente importante em processos inflamatórios crônicos. Em nosso estudo feito pelo fluído de LBA, houve um aparente aumento de IL-4 no grupo asmático, porém sem diferença estatística. Em modelo agudo de inflamação alérgica pulmonar observou-se que a insulina restaurou a liberação/produção de IL-1 β , em ratos diabéticos sensibilizados e desafiados com OVA (MARTINS *et al.*, 2010a). No nosso estudo, observamos que a exposição dos animais sensibilizados a OVA

determinou um aumento expressivo da concentração de IL-1 β , no fluído de LBA de animais não diabéticos, comparando com os animais apenas sensibilizados. No entanto, nos animais diabéticos, verificou-se redução, bastante significativa destas citocinas sob o mesmo desafio. O tratamento dos animais diabéticos com dose única de insulina e com 14 doses de insulina mostrou um aumento aparente das concentrações de IL-4 e IL-1 β na vigência da inflamação crônica pulmonar, induzida por OVA, quando comparados aos animais diabéticos e diabéticos asmáticos.

A citocina IL-10 é pleiotrópica, podendo exercer efeitos estimulatórios e inibitórios em vários tipos celulares (BARNES *et al.*, 1998). Em monócitos e macrófagos inibe a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias, inclusive TNF- α e IL-1 β (SEITZ *et al.*, 1995; De WALL MALEFYT *et al.*, 1991; FIORENTINO *et al.*, 1991) e em linfócitos inibe a produção de IL-4 e IFN- γ (FIORENTINO *et al.*, 1989; MOORE *et al.*, 1993; SCHANDENE *et al.*, 1994). Spatz e colaboradores (2003) constataram que a produção de IL-10 e IL-6 estão aumentadas em monócitos, isolados de pacientes com DM1. No entanto, no presente estudo, os níveis de IL-10 não se mostraram alterados em nenhum dos grupos. Já os níveis de IL-6 e TNF- α não foram detectáveis durante os experimentos.

Diante da importância da fase do remodelamento no desenvolvimento da asma. O remodelamento, fase investigada neste estudo, é caracterizado por alterações das vias aéreas como: hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, hiperplasia das células caliciformes e, conseqüentemente, aumento da secreção de muco (STUMM *et al.*, 2011 e 2014). Assim, analisamos a deposição de colágeno e muco, qualitativa e quantitativamente. Os animais asmáticos (OVA+OVA), quando comparados aos animais controles (OVA+SAL), exibiram marcada presença de deposição de colágeno, ao redor das vias aéreas. Já os animais diabéticos nebulizados com SAL e com OVA apresentam níveis de colágeno ao redor das vias aéreas similares com os animais não diabéticos e não asmáticos, mostrando que a OVA não alterou essa deposição de colágeno em animais diabéticos. O tratamento com dose única de insulina não restaurou a deposição de colágeno ao redor das vias aéreas, mas o tratamento prolongado restaurou completamente essa deposição de colágeno em animais diabéticos. Efeito similar foi observado em relação à secreção/deposição de muco dentro das vias aéreas. Ou seja, os animais asmáticos apresentam exacerbada produção de muco, quando comparados aos animais controles. Animais diabéticos apresentaram ausência de muco no interior das vias aéreas e o desafio com OVA destes animais não surtiu efeito, assim

como o tratamento com dose única de insulina. Já o tratamento prolongado restaurou parcialmente a deposição de muco no interior das vias aéreas dos animais asmáticos e diabéticos, quando comparados aos animais asmáticos e não diabético. É importante ressaltar que pelos efeitos lipossolúveis do formol, pode-se subestimar os resultados obtidos do acúmulo de muco no interior das vias aéreas dos animais.

O aumento de deposição de colágeno ao redor dos brônquios e ativação dos fibroblastos culmina em fibrose, causando espessamento da parede, e consequentemente redução da distensibilidade das vias aéreas e limitação do fluxo de ar (STUMM, 2011 e 2014). Além disto, o TGF- β é a chave para o evento crônico na asma, induzindo a ativação de fibroblastos, Stumm e colaboradores (2014) mostraram que as concentrações de TGF- β , são elevados tanto na fase crônica como na fase aguda da asma, porém nesse presente estudo não foi possível detectar níveis de TGF- β durante os experimentos.

O VEGF- β , é um potente indutor de angiogênese, e promover cicatrização de ferimentos (FATIMA & PAPA, 2010). No entanto, os níveis destas citocinas não foram detectáveis em nossos ensaios, Kivela e colaboradores (2006), mostraram que o DM diminui as concentrações de RNA de muitos genes envolvidos na regulação de angiogênese, como o VEGF- β , porém nesse estudo não foi possível detectar níveis de VEGF- β nos nossos ensaios.

Assim os resultados apresentados nesse estudo durante esse período, nos permitem sugerir que a insulina regula o remodelamento das vias aéreas em modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar em camundongos diabéticos, controlando o infiltrado inflamatório, a produção de IL-1 β , a deposição de colágeno ao redor das vias aéreas e secreção de muco no interior das vias aéreas.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Na vigência da inflamação alérgica pulmonar crônica verificou-se que os camundongos diabéticos apresentaram:

- a) Redução de infiltrado inflamatório e da presença de eosinófilos, tanto no fluído de LBA e no sangue;
- b) Redução das concentrações de IL-1 β no fluído de LBA;
- c) Redução de deposição de colágeno ao redor das vias aéreas e redução de muco no interior das vias aéreas.

O tratamento destes animais com dose única de insulina corrigiu, o infiltrado inflamatório no fluído de LBA, mas não a presença de eosinófilos; o infiltrado inflamatório do sangue; e as concentrações das citocinas no fluído de LBA. Enquanto que o tratamento com 14 doses de insulina, o estado metabólico dos animais evidenciado pela recuperação de peso, o infiltrado inflamatório no fluído de LBA, com presença de eosinófilos; o infiltrado inflamatório do sangue; as concentrações das citocinas no fluído de LBA e a deposição de colágeno e muco nas vias aéreas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 592p. 426-431. 2011.

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**. 55:16-22, 2006.

BARNES, P.J. New drugs for asthma. **Nat Rev Drug Discov**. 3: 831-844, 2004.

BARTRAM, U. & SPEER, C.P. The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. **Chest**. 125: 754-765, 2004.

BELLA, L.M., **Estudo da suplementação de vitamina D em modelo experimental de Diabetes mellitus**. 2014. 98f.. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014

BENDELAC, A.; RIVERA, M.N.; PARK, S.H.; ROARK, J.H. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. **Annu Rev Immunol**. 15: 535-562, 1997.

BRANNAN, J.D & LOUGHEED, M.D. Airway hyperresponsiveness in asthma: mechanisms, clinical significance, and treatment. **Frontiers in Physiology**. 3 (460), 2012.

BOGDAN, C. Macrophages. **In Encyclopedia of Life Sciences**. p.1-9, 2001.

BOULET, L-P., & STERK, P.J., Airway remodeling: the future. **Eur Respir J**. 30: 831-834, 2007.

BOXALL, C.; HOLGATE, S.T.; DAVIES, D.E. The contribution of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor signalling to airway remodelling in chronic asthma. **Eur Respir J**. 27: 208-229, 2006.

BUSSE, W., ELIAS, J., SHEPPARD, D., BANKS-SCHLEGEL, S., Airway remodeling and repair. **Am J Respir Crit Care Med**. 160: 1035-1042, 1999.

CAVAILLON, J.M. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. **Cell Mol Biol**. 47 (4): 695-702, 2001.

CAVALHER-MACHADO, S. C.; DE LIMA, W. T.; DAMAZO, A. S.; FRIAS DE CARVALHO, V. MARTINS, M. A.; SILVA, P. M. R.; SANNOMIYA, P. Down-regulation of mast cell activation and airway reactivity in diabetic rats: role of insulin. **Eur. Respir. J.**, 24: 552-558, 2004.

COHEN, R.T.; RABY, B.A.; VAN STEEN, K.; FUHLBRIGGE, A.L.; CELEDON, J.C.; ROSNER, B.A.; STRUNK, R.C.; ZEIGER, R.S; WEISS, S.T. In Utero Smoke Exposure and Impaired Response to Inhaled Corticosteroids in Children with Asthma. **Journal allergy clin Immunol**. 126 (3): 491-497, 2010.

DE BOER, J.; MEURS, H.; COERS, W.; KOOPAL, M.; BOTTONE, A.E.; VISSER, A.C.; TIMENS, W.; ZAAGSMA, J. Deficiency of nitric oxide in allergen-induced airway hyperreactivity to contractile agonists after the early asthmatic reaction: an ex vivo study. **Br Journal Pharmacol.** 119: 1109-1116, 1996.

DI PETTA, A., GRECO, O.E., LOPES F.F.T.Q.S., MARTINS, M.A., CAPELLOZI, V.L., MOREIRA, L.F.P., SANNOMIYA, P., Insulin modulates inflammatory and repair responses to elastase-induced emphysema in diabetic rats. **International Journal of Experimental Pathology.** 92, 392-399, 2011

DECKERS, J., MADEIRA, F.B., HAMMAD, H. Innate immune cells in asthma. **Trends in Immunology.** 1-8. 2013.

DE WAAL MALEFYT, R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C. G.; DE VRIES, J. E. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an auto regulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med.**, 179: 1209-1220, 1991.

DOUEK, I. F.; LEECH, N. J.; GILLMOR, H. A.; BINGLEY, P. J.; GALE, E. A. M. Children with type-1 diabetes and their unaffected siblings have fewer symptoms of asthma. **The Lancet.** 353: 1850, 1999.

DUNN, J. S.; McLEITCHIE, N. G. B. Experimental alloxan diabetes in the rat. **The Lancet.** v: 245, p.384–387, 1943.

FATIMA L.A. & PAPA, P.C. Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF): Regulação transcricional e pós-transcricional. **Revista de Biologia.** 4, 2010.

FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse helper T cells VI Th2 secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J. Exp. Med.**, 170: 2081-2095, 1989.

FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J. Immunol.**, 147: 3815-3822, 1991.

FORBES, J.M. & COOPER., M.E. Mechanisms os diabetic complications. **Pysiol Rev.** 93: 137-188, 2013.

GALLI, S.J., TSAI, M., PILIPONSKY, A.M. The development of allergic inflammation. **Nature.** 454, 2008.

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.** 28: 769-775, 1985.

GAVETT, S.H.; CHEN, X.; FINKELMAN, F.; WILLS-KARP, M. Depletion of murine CD4+ T lymphocytes prevents antigen-induced airway hyperreactivity and pulmonary eosinophilia. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 10: 587-593, 1994.

GAZIT, V., TASHER D., HANUKOGLU A., LANDAU Z., BEN-YEHUDA., SOMEKH, E., DALAL I., Atopy in Children and Adolescents with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **Allergy and Clinical Immunology**. 10, 2008.

GEERLINGS, S. E. & HOEPELMAN, A. I. M. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immun. and Med. Microb.* 26: 259-265, 1999.

GEERLINGS, S. E.; BROUWER, E. C.; VAN KESSEL, K. C. P. M.; GAASTRA, W.; STOLK, R. P.; HOEPELMAN, A. I. M. Cytokine secretion is impaired in women with diabetes mellitus. **Eur. J. Clin. Invest.**, 30: 995-1001, 2000.

GINA. GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA. **Global Initiative for asthma**. 2012.

GLEICH, G.J, Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. **J Allergy Clin Immunol**. 105: 651-663, 2000.

GRECHI, S.B.L.A, Avaliação quantitativa das citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, e do TGF- β , presentes na saliva de pacientes com periodontite, antes e após a submissão à psicoterapia – análise comparativa com pacientes controles. **Tese livre docência**. 2011.

GORUS, F. K.; MALAISSE, W. J.; PIPELEERS, D. G. Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells. **Biochemical Journal**. v: 208, p. 513–515, 1982.

HAMMAD, H. PLANTINGA, M.; DESWARTE, K.; POULIOT, P.; WILLART, M.A.M., KOOL, M.; MUSKENS F.; LAMBRECHT B.N. Inflammatory dendritic cells – not basophils – are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. **The journal of experimental medicine**. Vol. 207.10: 2097-2111. 2010.

HAMELMANN, E.; OSHIBA, A.; PALUH, J.; BRADLEY, K.; LOADER, J.; POTTER, T.A.; LARSEN, G.L.; GELFAND, E.W. Requirement for CD8+ T cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. **J Exp Med**. 183: 1719-1729, 1996.

HELANDER, E. Asthma and diabetes. **Acta Med. Scand.** 162: 165-174, 1958.

HOLGATE, S. T.; DJUKANOVIC, R.; WILSON, J.; ROCHE, W.; BRITTEN, K.; HOWARTH, P. H. Allergic inflammation and its pharmacological modulation in asthma. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, 94: 210-217, 1991.

HOLGATE, S. T.; LACKIE, P. M.; DAVIES, D. E.; ROCHE, W. R.; WALLS, A F. The bronchial epithelium as a key regulator of airway inflammation and remodelling in asthma. **Clinical and experimental allergy**, 29: 90-95, 1999.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). Diabetes Atlas. 6º Edição. 2013.

JEFFRIES, E.; PARÉ, P. D.; HOGG, J. C. Measurements of airway oedema in allergic bronchoconstriction in the guinea pig. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 123: 687-688, 1981.

HOLGATE, S.T., Pathogenesis of asthma. **Clinical and Experimental Allergy**. 2008.
HOLGATE, S.T & POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature**. 8, 2008.

HOLLINGSWORTH, J.W.; MARUOKA, S.; BOON, K.; GARANTZIOTIS.; LI Z.; TOMFOHR, J.; BAILEY, N.; WHITEHEAD, G.; BRASS, D.M.; SCHWARTZ, D.A. In utero supplementation with methyl donors enhances allergic airway disease in mice. **The Journal of Clinical Investigation**. 118 (10), 2008.

JOSHI, N.; CAPUTO, G.M.; WEITEKAMP, M.R.; KARCHMER, A.W. Infections in patients with diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**. 341(25):1906-12, 1999.

KAY, A.B. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. **Trends Mol Med**. 11: 148-152, 2005.

KIRSTEN, V.R. Caracterização do modelo experimental NOD (nonobese diabetic) em ambiente convencional. **Dissertação de Mestrado**. 2006.

LAMBRECHT, B.N.; DE VEERMAN, M.; COYLE, A.J.; GUITIERREZ-RAMOS, J-C.; THIELEMANS, K.; PAUWELS R. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**. 106 (4), 2000.

LEE, I-T & YANG, C-M. Inflammatory singalings involved in airway and pulmonar diseases. **Hindawi**. 2013

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): 113-122, 1996.

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

LERCO, M.M; SPADELLA, C.T; MACHADO, J.L.M; SCHELLINI, S.A; PADOVANI, C.R. Caracterização de um modelo experimental de diabetes mellitus, induzido pela aloxana em ratos. **Estudo clinic e laboratorial**. 18 (2), 2003.

LISBONNE, M.; DIEM, S.; DE CASTRO KELLER, A.; LEFORT, J.; ARAUJO, L.M.; HACHEM, P.; FOURNEAU, J.M.; SIDOBRE, S.; KRONENBERG, M.; TANIGUCHI, M.; VAN ENDERT, P.; DY, M.; ASKENASE, P.; RUSSO, M.; VARGAFTIG, B.B.; HERBELIN, A.; LEITE-DE-MORAES, M.C. Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. **J Immunol**. 171: 1637-1641, 2003.

LLOYD, C.M.; HESSEL, E.M., Functions of T cells in asthma: more than just Th2 cells. **Nat Rev Immunol**. 2010.

- LOPES, R.A & PIVATO, L. S.P. Hipersensibilidade imediata: uma revisão sobre anafilaxia. **Revista Saúde e Pesquisa**. 5 (1): 147- 160, 2012.
- MANISE, M.; HOLTAPPELS, G. CROMBRUGGEN, K.V.; SCHLEICH, F.; BACHERTZ.; LOUIS, R. Sputum IgE and Cytokines in Asthma: Relationship with Sputum Cellular Profile. **Plos one**. 8 (3), 2013.
- MARTIN, J.G.; SUZUKI, M.; RAMOS-BARBON, D.; ISOGAI, S. T cell cytokines: animal models. **Paediatr Respir Rev**. 5 Suppl A: S47-51, 2004.
- MARTINS, J.O; CAMPOS C.A.L; CRUZ, J.W.M.C; MANZOLLI, S; ALVES, V.A.F; VIANNA, E.O; JANCAR, S; SANNOMIYA, P. Insulin modulates cytokine release and selectin expression in the early phase of allergic airway inflammation in diabetic rats. **BMC Pulmonary Medicine**, 10:39, 2010a.
- MARTINS, J. O.; MEYER-PFLUG, A. R.; ALBA-LOUREIRO, T. C.; MELBOSTAD, H.; CRUZ, J. W. M. C.; COIMBRA, R.; CURI, R.; SANNOMIYA, P. Modulation of Lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation: role of insulin. **Shock**. 33.1:76-82. 2010b.
- MAUAD, T., BEL.,E.H., STERK, P.J. Asthma therapy and airway remodeling. **J Allergy Clin Immunol**. 2007.
- MAUVIEL, A. Transforming growth factor-beta: a key mediator of fibrosis. **Methods Mol Med**. 117: 69-80, 2005.
- MACKAY I.R & ROSEN F.S. Allergy and Allergic Diseases. **N Engl J Med**. 344(1), 2001.
- MEDZHITOV, R. & JANEWAY, C.A., JR. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. **Curr Opin Immunol**. 9: 4-9, 1997.
- MEHTA, S.; LILLY, C.M.; ROLLENHAGEN, J.E.; HALEY, K.J.; ASANO, K.; DRAZEN, J.M. Acute and chronic effects of allergic airway inflammation on pulmonary nitric oxide production. **Am J Physiol**. 272: L124-131, 1997. 18
- MEURS, H.; SCHUURMAN, F.E.; DUYVENDAK, M.; ZAAGSMA, J. Deficiency of nitric oxide in polycation-induced airway hyperreactivity. **Br J Pharmacol**. 126: 559-562, 1999.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ministério da Saúde**. 2006.
- MOORE, K. W.; O'GARRA, A.; DE WAAL MALEFYT, R.; VIEIRA, P. MOSMANN, T. R. Interleukin-10. **Annu. Rev. Immunol.**, 11: 165-195, 1993
- MORDES, J.P; BORTELL, R; BLANKENHORN E.P; ROSSINI, A.A; GREINER. Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity. **ILAR Journal**. 45, 4, 2004.

MUR, L.A.J.; KENTON, P.; LLOYD, A.J.; OUGHAM, H.; PRATS, E.; The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?. **Journal of experimental botany**. 59 (3): 501-520, 2008.

PASCUAL, R.M & PETERS, S.P. Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: An overview. **J Allergy Clin Immunol**. 2005.

PEARLMAN, D. S. Pathophysiology of the inflammatory response. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 104 (4 Pt 1): S132-137, 1999.

PELEG A.Y.; WEERARATHNA, T.; MACCARTHY, J.S.; DAVIS, T.M.E. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**. 23:3-13, 2006.

PEPYS, J. & HUTCHCROFT, B. J. Bronchial provocation tests in etiologic diagnosis and analysis of asthma. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 112: 829-859, 1975.

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

PEREIRA, L.C.; MARTINS, G.B. Expressão do Fator de Crescimento Transformador-Beta em Mucosa Oral Submetida à Radioterapia. Uma Revisão Crítica da Literatura. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**. 2(1): 26 - 30, 2010.

PHARM., S.A.M., GHOSH. B., AL-DHUBIAB, B.E., NAIR, A.B., Understanding type 1 diabetes: etiology and models. **Can J Diabetes**. 37: 269-276, 2013.

REWERS M. & KLINGENSMITH GJ. Prevention of Type 1 Diabetes. **Diabetes Spectrum**. 10(4): 282-292, 1997.

ROHILLA, A & ALI, S. Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effect. **International J of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**. 3 (2), 2012.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudos de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantan**. 20: 315-28, 1947.

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

SCHANDENE, L.; ALONSO-VEGA, C.; WILLEMS, F.; GERARD, C.; DELVAUX, A.; VELU, T.; DEVOS, R.; DE BOER, M.; GOLDMAN, M. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. **J. Immunol.**, 152: 4368-4374, 1994.

SCHOFIELD, M., & CALHOUN K.H. Immunology of asthma. **Otolaryngol Clin N Am**. 44:591-601, 2011.

SPATZ, M.; EIBL, N.; HINK, S.; WOLF, H. M.; FISCHER, G. F.; MAYR, W. R.; SCHERNTHANER, G.; EIBL, M. M. Impaired primary immune response in type-1 diabetes. Functional impairment at the level of APCs and T-cells. **Cellular Immunology**, 221: 15-16, 2003.

SEITZ, M.; LOETSCHER, P.; DEWALD, B.; TOWBIN, H.; GALLATI, H.; BAGGIOLINI, M. IL-10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts. **Eur. J. Immunol.**, 25: 1129-1132, 1995.

SILVA, J.R.L. Inflamação crônica na asma brônquica. **Pulmão RJ**. 2008

SINGH S, PRAKASH, Y.S, LINNEBERG, A. AGRAWAL, A. Insulin and the lung connecting asthma and metabolic syndrome. **Hindawi**. 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. São Paulo, SP. 2014

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMONIA E TISIOLOGIA. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**. 2012.

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

SUNAHARA KK, SANNOMIYA P, MARTINS JO. Briefs on insulin and innate immune response. **Cell Physiol Biochem**. 29 (1-2):1-8, 2012.

STUMM, C.L., WETTLAUER, S.H., JANCAR, S., PETERS-GOLDEN, M., Airway remodeling in murine asthma correlates with a defect in PGE₂ synthesis by lung fibroblasts. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 10.1152, 2011.

STUMM, C.L., HAKCSIK E., LANDGRAF, E.H., CAMARA, N.O.S., SOGAYAR C., JANCAR S. Lung Remodeling in a Mouse Model of Asthma Involves a Balance between TGF- β 1 and BMP-7. **Plos one**. 9 (4), 2014.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res**. 50:536-546, 2001.

TOSCA M.A, VILLA E., SILVESTRI M, DANNUZIO G, PISTORIO A, AICARDI M., MINICUCCI L., LORINI R, ROSSI GA. Discrepancy between sensitization to inhaled allergens and respiratory symptoms in pediatric patients with type 1 diabetes mellitus. **Pediatr Allergy Immunol**. 20: 385–391, 2009.

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 RIJT, L.S; JUNG, S.;KLEINJAN, A.; VOS N.; WILLART, M.; DUEZ C.; HENK, C.H.; LAMBRECHT, B.N. In vivo depletion of lung CD11c⁺ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. **JEM**. 201 (6): 981-991, 2005.

VIANNA, E. S. O. & GARCIA-LEME, J. Allergen-induced airway inflammation in rats. Role of insulin. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 151: 809-814, 1995.

YANG, I.V.; SCHWARTZ, D.A. Epigenetic mechanisms and the development of asthma. **J Clin Immunol**. 130 (6), 2012.

WILLCOX, A; RICHARDSON, S.J., BONE, A.J; FOULIS, A.K, MORGAN, N.G; Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. **Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology**. 155:173-181, 2008.

WEAVER, D. C.; MCDANIEL, M. L.; LACY, P. E. Alloxan uptake by isolated rat islets of Langerhans. **Endocrinology**. 102, 1847–1855, 1978.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION DIRECTOR - GENERAL'S OFFICE, COMMUNICATIONS OFFICE. **World diabetes day: too many people are losing lower limbs unnecessarily to diabetes. World Health Organization**, 2005. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/press_release/2005/PR_61.pdf>. Acessado em 15 de janeiro de 2014.

ZUANY-AMORIM, C.; RUFFIE, C.; HAILE, S.; VARGAFTIG, B.B.; PEREIRA, P.; PRETOLANI, M. Requirement for gammadelta T cells in allergic airway inflammation. **Science**. 280: 1265-1267, 1998.

ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF 102013

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 "**Papel da insulina na vigência da inflamação alérgica pulmonar em camundongos diabéticos e sadios**" (Protocolo CEUA/FCF/340), 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) **Sabrina de Souza Ferreira** como pesquisador(a) responsável.

São Paulo, 20 de fevereiro de 2013.

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