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

Efeito da insulina em micose sistêmica causada por *Paracoccidioides
brasiliensis* em animais diabéticos e sadios

Felipe Beccaria Casagrande

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

São Paulo

2015

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

Efeito da insulina em micose sistêmica causada por *Paracoccidioides
brasiliensis* em animais diabéticos e sadios

Felipe Beccaria Casagrande

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.

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

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.

C334e	<p>Casagrande, Felipe Beccaria</p> <p>Efeito da insulina em micose sistêmica causada por <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> em animais diabéticos e sadios / Felipe Beccaria Casagrande. -- São Paulo, 2015.</p> <p>90p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.</p> <p>Orientador: Martins, Joilson de Oliveira</p> <p>1. Imunopatologia 2. Diabetes mellitus 3. Paracoccidioidomicose I. T. II. Martins, Joilson de Oliveira, orientador.</p> <p>616.079 CDD</p>
-------	---

Felipe Beccaria Casagrande

Efeito da insulina em micose sistêmica causada por *Paracoccidioides brasiliensis* em
animais diabéticos e sadios

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
orientador/presidente

Profa. Dra. Patrícia Xander Batista
1º. examinador

Profa. Dra. Jacqueline de Fátima Jacysyn
2º. examinador

São Paulo, 16 de setembro de 2015.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, cujos esforços incansáveis me permitiram estudar e cujos ensinamentos de ouro me acompanham aonde quer que eu vá.

AGRADECIMENTOS

A Deus, e Ele sabe o porquê.

Aos meus pais, Terezinha e Lincoln, por batalharem pela minha formação educacional e me imbuírem fundamentos morais que tornam possíveis quaisquer realizações que eu vier a ter.

Aos meus irmãos, Beatriz e Lucas, pelo grande apoio e por me darem suporte em dias que eu mesmo não o faço.

Ao Professor Doutor Joilson de Oliveira Martins, pela oportunidade de ingresso em seu grupo, pela grande ajuda e enorme paciência.

À minha amiga Paula Knox, agradeço pela indicação ao orientador e pela ajuda que esteve presente do início ao fim deste trabalho.

À Doutora Fernanda Nunes pela grande gentileza e boa-vontade. À Mariana Cristina Ferreira, técnica de laboratório e motorista dos dias de chuva. À Sabrina Ferreira, parceira de procedimentos e risadas. Aos amigos e colegas de laboratório, Leonardo Bella, Fernando Galvão, Thais Ayala, Eduardo Nolasco, pela ajuda e apoio.

Aos meus amigos de outros continentes pela grande ajuda no idioma.

Ao Professor Doutor Sandro Rogério de Almeida, à Lavínia Maria Dal'Mas Romera e ao grupo do Laboratório de Micologia pela colaboração e apoio que tornaram este trabalho possível.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP por ter possibilitado a execução deste trabalho.

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 - 2010/02272-0 e 2014/05214-1).

RESUMO

CASAGRANDE, F.B. **Efeito da insulina em micose sistêmica causada por *Paracoccidioides brasiliensis* em animais diabéticos e sadios.** 2015. 92f. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A paracoccidioidomicose é uma enfermidade sistêmica causada principalmente pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Recentemente, observou-se que a capacidade fagocítica dos macrófagos alveolares (MA) em animais diabéticos está diminuída em comparação aos MA de animais sadios, e que a insulina estimula a atividade fagocítica em MA oriundos de animais diabéticos e sadios por mecanismos diferentes. Neste projeto, usando um modelo de carência relativa de insulina (*diabetes mellitus* experimental), estudamos a intervenção da insulina em um modelo de infecção sistêmica. Após aprovação do comitê de ética (protocolo CEUA/FCF/421), camundongos machos da linhagem C57BL/6 (diabéticos, 60 mg/kg aloxana/10 dias, e seus respectivos controles) receberam injeção intratraqueal contendo suspensão de leveduras de *P. brasiliensis* ou volume equivalente de PBS estéril. Animais dos grupos de tratamento receberam insulina pela via subcutânea diariamente por 12 dias. Nas amostras, foram avaliados: a) o número de células dos lavados peritoneal (LPe) e broncoalveolar (LBA), o leucograma, e a glicemia (monitor de glicose); b) os níveis séricos de insulina no soro pela técnica de ELISA; c) as concentrações de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-4, IL-10, IL-12, CINC-1, CINC-2, CINC-3) nos LPe e LBA e nos homogenatos (ELISA). Após incubação de 55 dias, comparados aos controles (2.9 $\pm$ 0,4g e 192 $\pm$ 7.5 mg/dL), animais tornados diabéticos (0.87 $\pm$ 0,25 g e 570,1 $\pm$ 9,27mg/dL) apresentaram redução no ganho de massa corpórea durante o período de experimentação e elevados níveis de glicose sanguínea. O tratamento de insulina reduziu os níveis de glicose (547 $\pm$ 36,8mg/dL vs. 323,6 $\pm$ 36,9mg/dL), embora não o suficiente para tornar os animais normoglicêmicos. Comparados aos controles, animais diabéticos apresentaram número reduzido de leucócitos no LPe (2.2 $\times 10^6 \pm 0.2$ cells/mm³ vs 1.3 $\times 10^6 \pm 0.1$ cells/mm³) e, no LBA, reduzidas concentrações de CINC-2 (662,3 $\pm$ 73,8pg/mL vs 312,7 $\pm$ 114,7pg/mL), CINC-1 (115,5.0 $\pm$ 25,5pg/mL vs 88,3 $\pm$ 24,7pg/mL) e IL-10(320,9 $\pm$ 58,4pg/mL vs 161,0 $\pm$ 59,4pg/mL) depois da infecção. O tratamento com insulina restaurou a concentração de leucócitos nos LPe de animais diabéticos, mas não no LBA. Os dados sugerem que a insulina modula a produção/liberação de citocinas, sem alterar a migração de leucócitos para LBA e restaurando a migração destes para LPe durante o curso da paracoccidioidomicose.

Palavras chave: Paracoccidioidomicose, *diabetes mellitus*, insulina, citocinas, migração celular.

Apoio Financeiro: FAPESP (2010/02272-0; 2014/05214-1); CAPES, CNPq e Projeto I (PRP/USP).

ABSTRACT

CASAGRANDE, F.B. **Insulin effects on *Paracoccidioides brasiliensis*-induced systemic mycosis in healthy and diabetic mice.** 2015. 92p. Defense (Master) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2015.

Paracoccidioidomycosis is a systemic disease mainly caused by *Paracoccidioides brasiliensis* fungus that interact with antigen-presenting cells, changing its main biological functions. Recently it was observed that the phagocytic capacity of these cells in diabetic animals for IgG opsonized targets is decreased compared to healthy animals, and that insulin stimulates the phagocytic activity in alveolar macrophages in from diabetic and healthy animals, by different mechanisms. In this project, using a model of relative lack of insulin (experimental *diabetes mellitus*), we studied the intervention of insulin in a model of systemic infection. After approval by the committee of ethics (protocol CEUA/FCF/421), C57BL/6 male diabetic (60mg/kg aloxan/10days) mice and their respective controls were subjected to intratracheal injection of suspension of *P. brasiliensis* or an equivalent volume of TBS sterile. In the forty-third day, insulin-treated mice were treated subcutaneously daily with insulin for 12 days at 6 P.M. We evaluated: a) the number of cells of the peritoneal (PeL) and bronchoalveolar (BAL) fluids, the leucogram and the glucose levels; b) the levels of insulin on the serum by the technique of ELISA; c) the levels of cytokines (TNF- α , IL-6, IL-4, IL-10, IL-12, CINC-1, CINC-2, CINC-3) in the BAL and PeL fluid, and on organ homogenates. After 55 days, relative to controls (2.9 ± 0.4 g and 192 ± 7.5 mg/dL), mice rendered diabetic (0.87 ± 0.25 g and 570.1 ± 9.27 mg/dL) exhibited a reduction in body weight gain during the experimental period and sharply elevated blood glucose levels. Treatment of diabetic animals with insulin induced a reduction in blood glucose levels (547 ± 36.8 mg/dL vs. 323.6 ± 36.9 mg/dL), but it was not sufficient to reduce glycemia to control values. In addition, relative to controls, infected diabetic mice exhibited a reduction in the number of leukocytes into the PeL fluid ($2.2 \times 10^6 \pm 0.2$ cells/mm³ vs $1.3 \times 10^6 \pm 0.1$ cells/mm³) and reduced BAL concentrations of CINC-2 (662.3 ± 73.8 pg/mL vs 312.7 ± 114.7 pg/mL), CINC-1 ($115.5.0 \pm 25.5$ pg/mL vs 88.3 ± 24.7 pg/mL) and IL-10 (320.9 ± 58.4 pg/mL vs 161.0 ± 59.4 pg/mL) after *P. brasiliensis* infection. Treatment of diabetic mice with insulin restored concentrations of leukocytes in the PeL fluid but not in the BAL. Data presented suggest that insulin modulates the production/release of cytokines but not leukocyte migration to the BAL while restoring this parameter on the PeL during the course of *P. brasiliensis* fungus-induced PCM.

Keywords: Paracoccidioidomycosis, *diabetes mellitus*, insulin, cytokines, cell migration.

Financial Support: FAPESP (2010/02272-0; 2014/05214-1); CAPES, CNPq and Project 1 (PRP/USP).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática sobre o número de pessoas com diabetes por região segundo IDF, em 2014.	1
Figura 2 - Quadro de distribuição de grupos do experimento.	14
Figura 3 - Modelo de micose pulmonar em animais diabéticos: Injeção intratraqueal de <i>P. brasiliensis</i>	15
Figura 4 - Determinação dos níveis glicêmicos (10 dias).	23
Figura 5 - Variação da Massa Corpórea (10 dias).	23
Figura 6 - Determinação dos níveis glicêmicos (55 dias)	25
Figura 7 - Variação da Massa Corpórea (55 dias)	25
Figura 8 - Concentrações de insulina em soro.	26
Figura 9 - Contagem total de leucócitos.	29
Figura 10 - Contagem de leucócitos em lavado broncoalveolar.	31
Figura 11 - Contagem de leucócitos do exsudato peritoneal.	31
Figura 12 - Concentração de TNF- α em homogenato de pulmão.	37
Figura 13 - Concentração de CINC-1 em homogenato de pulmão.	38
Figura 14 - Concentração de CINC-1 em homogenato de fígado.	40
Figura 15 - Concentração de CINC-1 em homogenato de baço	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Projeções globais sobre o aumento do número de pessoas com diabetes (20-79 anos), de 2013 a 2035	2
Tabela 2 - Hemograma	27
Tabela 3 - Contagem diferencial de leucócitos.....	29
Tabela 4 - Dosagem de citocinas no lavado broncoalveolar	33
Tabela 5 - Dosagem de quimiocinas no lavado broncoalveolar	33
Tabela 6 – Dosagem de citocinas no lavado peritoneal.....	35
Tabela 7 – Dosagem de quimiocinas no lavado peritoneal.....	35
Tabela 8 - Dosagem de citocinas em homogenato de pulmão.....	37
Tabela 9 - Dosagem de quimiocinas em homogenato de pulmão	38
Tabela 10 - Dosagem de citocinas em homogenato de fígado.....	40
Tabela 11 - Dosagem de quimiocinas em homogenato de fígado	41
Tabela 12 - Dosagem de citocinas em homogenato de baço	43
Tabela 13 - Dosagem de quimiocinas em homogenato de baço	44

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

ADA	- <i>American Diabetes Association</i>
APC	- Células apresentadoras de antígenos
CINC	- <i>Cytokine Induced Neutrophil Chemoattractant</i>
DM	- <i>Diabetes mellitus</i>
DM1	- <i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM2	- <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
ICAM	- <i>Intracellular adhesion molecule</i>
IDF	- <i>International Diabetes Federation</i>
IFN	- <i>Interferon</i>
IL	- Interleucina
i.t.	- Intratraqueal
LBA	- Lavado broncoalveolar
LPe	- Lavado peritoneal
LPS	- Lipopolissacarídeo
MA	- Macrófago alveolar
MP	- Macrófago peritoneal
NO	- Óxido Nítrico
PAMP	- <i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
Pb	- <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Pb+i	- <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> + insulina
PBS	- <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCM	- Paracoccidioidomicose
PGE2	- Prostaglandina E2
SBD	- Sociedade Brasileira de Diabetes
Th	- <i>T helper</i>
TLR	- <i>Toll-like receptors</i>
TNF	- <i>Tumours Necrosis Factor</i>

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Diabetes mellitus no mundo	1
1.1.1. <i>Diabetes mellitus</i> e resposta imune	4
1.1.2 Modelos experimentais de <i>diabetes mellitus</i>	6
1.2. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	7
1.3. Justificativa.....	11
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Animais.....	14
3.2. Delineamento experimental	14
3.3. Indução de diabetes mellitus	15
3.4. Infecção por <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	16
3.4.1. Preparo do Inóculo	16
3.4.2. Infecção Intratraqueal.....	16
3.5. Tratamento com insulina	17
3.6. Monitoramento da instalação do diabetes e da infecção por <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	17
3.7. Determinação da concentração sérica de insulina	18
3.8. Lavados broncoalveolar e peritoneal.....	18
3.9. Contagem de células.....	19
3.10. Quantificação de citocinas e quimiocinas por enzima-imunoensaio	19
3.11. Preparo dos homogenatos de órgãos.....	20

3.12. Determinação de proteína total nos homogenatos	21
3.13. Análise estatística	21
4. RESULTADOS	22
4.1. Caracterização do modelo de DM de acordo com a variação de glicemia e peso	22
4.1.1. Tratamento de insulina	26
4.2. Modelo de infecção intratraqueal pelo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	27
4.2.1. Hemograma e Leucograma	27
4.2.2. Lavados peritoneal e broncoalveolar	30
4.3. Análises de citocinas	32
4.3.1. Lavado Broncoalveolar	32
4.3.2. Lavado Peritoneal	34
4.3.3. Homogenato de Pulmão.....	36
4.3.4. Homogenato de Fígado	39
4.3.5. Homogenato de Baço	42
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	61
APÊNDICE	63

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Diabetes mellitus* no mundo

O *diabetes mellitus* (DM) é um grupo de doenças complexas, crônicas e que necessita de cuidados médicos contínuos para a redução de riscos multifatoriais e para o controle glicêmico. Estas doenças são heterogêneas e apresentam como característica comum, a hiperglicemia que pode ser causada por defeitos tanto na ação quanto na secreção de insulina (*American Diabetes Association - ADA, 2015*).

Em 2013, segundo estimativas da Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation – IDF*), 8,35% dos adultos do mundo todo viviam com DM, ou seja, havia 382 milhões de pessoas portadoras de DM, sendo que, 46% destas não eram diagnosticadas. Neste mesmo período na América Latina existiam 24 milhões de pessoas, onde aproximadamente 25% destas não eram diagnosticadas, o que pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática sobre o número de pessoas com diabetes por região segundo IDF, em 2014. (IDF, 2014).

A maior parte dos 387 milhões de pessoas com DM tinha entre 40 e 59 anos, e 80% deles viviam em 2013 em países de renda baixa e média (IDF, 2014). Por outro lado, projeções do IDF afirmam que, em 2035, haverá um aumento de 55% número de pessoas entre 20 e 79 anos com DM, em relação a 2013. A distribuição da projeção deste aumento por região pode ser vista na Tabela 1.

Tabela 1 - Projeções globais sobre o aumento do número de pessoas com diabetes (20-79 anos), de 2013 a 2035 (IDF, 2013, modificado).

IDF Região	2013 Milhões	2035 Milhões	Aumento %
África	19.8	41.4	109%
Oriente Médio e Norte da África	34.6	67.9	96%
Sudeste da África	72.1	123	71%
América do Sul e Central	24.1	38.5	60%
Pacífico Ocidental	138.2	201.8	46%
América do Norte e Caribe	36.7	50.4	37%
Europa	56.3	68.9	22%
Mundo	381.8	591.9	55%

Além disso, a região composta por América do Sul e Central apresentará aumento de 60% no número de casos de DM em 2035. Isto é importante, pois em 2013 o Brasil era o quarto país em número de casos de DM entre 20 e 79 anos no mundo todo (IDF, 2014). Nota-se um aumento na estimativa do número de pacientes diabéticos no Brasil, uma vez que em 2012 estimava-se que a prevalência de DM no país estivesse em torno de 8% na população com idade entre 30 e 69 anos (DIAS, CAMPOS, 2012).

De acordo com a ADA, a DM pode ser classificada em diferentes tipos:

- DM tipo 1 (DM1): resulta da destruição das células beta pancreáticas que, geralmente, leva à deficiência total de insulina.
- DM tipo 2 (DM2): resulta de uma secreção defeituosa e progressiva de insulina causada por uma resistência insulínica periférica.
- DM gestacional: aumento da intolerância à glicose diagnosticado durante a gravidez.

- Outros tipos específicos de DM: Manifestações menos comuns cujos defeitos ou processos causadores podem ser identificados. Podem ser devido a: defeito genético no funcionamento das células beta pancreáticas, defeito genético na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino e outras condições descritas na literatura.

O aumento no número de pacientes diabéticos pode ser relacionado tanto ao número de pacientes com DM1, quanto ao número de pacientes com DM2 e de gestantes que apresentaram intolerância à glicose durante gestação (IMAYAMA et al., 2011; ADA, 2015; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES - SBD, 2014-2015). Estima-se que somente em 2013, 21 milhões de mulheres apresentaram hiperglicemia durante a gestação, o que corresponde a 17% dos nascimentos vivos (IDF, 2013).

Os tipos 1 e 2 de DM apresentam algumas características em comum, como, por exemplo, altos níveis de glicose no sangue e distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, que levam a várias complicações à saúde do portador. Os portadores são diagnosticados com DM quando há presença de seus sinais clínicos clássicos: polidipsia, polifagia e poliúria, resultados da hiperglicemia causada pela baixa concentração plasmática ou baixa funcionalidade da insulina. É considerado hiperglicêmico o paciente que apresenta glicemia de jejum igual ou superior a 126mg/dL (SBD, 2014-2015).

O DM1 é uma doença autoimune desencadeada por fatores ambientais que acontece em indivíduos geneticamente suscetíveis. Há a destruição seletiva das células-beta pancreáticas devido a um infiltrado de linfócitos T nas ilhotas de Langerhans, o que gera suspensão da produção de insulina, tornando os pacientes insulínodos. Por sua vez, o DM2 está associada com obesidade e envelhecimento, sendo resultado da resistência à insulina produzida pelas células-beta pancreáticas. Neste caso os pacientes não são necessariamente insulínodos (ADA, 2015; VAN BELLE *et al.*, 2011).

O DM está relacionado a efeitos deletérios na qualidade de vida dos pacientes (IMAYAMA et al., 2011), pois frequentemente se vê acompanhada de complicações microvasculares levando a disfunção de múltiplos órgãos (MOUTZOURI et al., 2008). Deste modo, várias complicações relacionadas ao DM podem se desenvolver nos pacientes como, por exemplo, doença cerebrovascular, retinopatia, infecções orais recorrentes, doença cardíaca coronariana, neuropatia periférica, doença

periférica vascular, ulceração em membros inferiores e nefropatia (IDF, 2013; SBD, 2013-2014).

1.1.1. *Diabetes mellitus* e resposta imune

A inflamação é caracterizada por eventos vasculares, celulares e linfáticos desenvolvidos a fim de eliminar o agente lesivo, restituir o tecido lesado e manter a homeostasia do organismo e pode ser considerada como uma resposta adaptativa do tecido conjuntivo contra uma agressão ao organismo (KVIETYS & GRANGER, 2012).

Os eventos vasculares da resposta inflamatória compreendem alterações hemodinâmicas seguidas por mudanças estruturais na parede do vaso, caracterizadas principalmente pela contração da célula endotelial, promovendo abertura de junções entre estas células que levam ao extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido intersticial, caracterizando o edema inflamatório. Observa-se então o aumento da viscosidade sanguínea e a redução do fluxo, e a estase sanguínea resultante permite a marginalização leucocitária e, como consequência, a migração de leucócitos para o espaço extra vascular (KUMAR et al., 2010).

O recrutamento dos leucócitos do sangue para o tecido ocorre devido à expressão de diversas famílias de moléculas de adesão tanto na superfície endotelial quanto na superfície leucocitária, como, por exemplo, selectinas, integrinas e moléculas pertencentes à superfamília das imunoglobulinas (MULLER, 2009).

Durante o processo inflamatório existe a ação de mediadores químicos e de citocinas que podem apresentar caráter pró e anti-inflamatório (BENSINGER & TONTONZOZ, 2008). As citocinas regulam a amplitude e duração da resposta inflamatória, são produzidas por diversos tipos de células e apresentam várias funções durante o processo inflamatório, incluindo a ativação do endotélio e leucócitos e indução de resposta na fase aguda (GREGHI, 2011).

Desse modo, o fator de necrose tumoral (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória que pode modular a permeabilidade vascular além de atuar na diferenciação, proliferação e ativação celular. Outros mediadores, como as

interleucinas (IL) IL-1 α , IL-1 β e IL-6, induzem a síntese e secreção de proteínas da fase aguda e atuam sobre o endotélio aumentando a expressão de moléculas de adesão. A IL-4 é importante na expansão clonal de células B, na produção de anticorpos, na proliferação de células T e na indução de células T auxiliador (Th 2). Por outro lado, a IL-10 é uma potente citocina anti-inflamatória que apresenta como principal função a supressão da resposta imune e inflamatória (OLIVEIRA et al, 2011).

Evidências sugerem que em pacientes com DM ocorre baixa interação leucócito-endotélio devido à baixa expressão de molécula de adesão intracelular (ICAM-1), além de baixos níveis de TNF- α e IL-1 β e reduzida migração de fagócitos para o foco inflamatório, levando ao aumento da suscetibilidade a infecções, uma vez que isto dificulta a eliminação de microrganismos presentes no tecidos (SUNAHARA, 2012).

Por este motivo, pacientes com DM apresentam maior risco de infecções que afetam mucosas e tecidos moles, trato urinário e respiratório e infecções nosocomiais (JOSHI et al., 1999; PELEG et al., 2006). Foi observado também que fagócitos de animais diabéticos apresentam capacidade fagocítica e microbicida reduzidas, enquanto neutrófilos de ratos diabéticos possuem atividade fagocítica sobre *Candida albicans* diminuída (PANNEERSELVAM, GOVINDASAMY, 2003, FERRACINI et al, 2010).

Alba-Loureiro e colaboradores (2006) mostraram que fagocitose de partículas de zymosan e a produção de peróxido de hidrogênio por neutrófilos de ratos diabéticos eram baixas, e que tais parâmetros eram restaurados por dose única de insulina sem a normalização da glicemia. Em macrófagos peritoneais de ratos diabéticos, Costa-Rosa e colaboradores (1996) mostraram baixa capacidade fagocítica sobre partículas de zymosan e baixa produção de peróxido de hidrogênio, e que a adição de insulina na cultura destas células restaurou tais valores. Estes trabalhos evidenciam um importante papel da insulina na atividade fagocítica de neutrófilos e macrófagos.

Uma das possibilidades para explicar esta maior susceptibilidade foi sugerida por trabalhos experimentais que demonstraram que o infiltrado de neutrófilos na cavidade pleural inflamada encontra-se reduzido em ratos diabéticos comparado com os não diabéticos (PEREIRA et al, 1987). Esta redução na migração de neutrófilos é acompanhada por uma menor liberação, produção e transcrição gênica

das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-10 (DE OLIVEIRA MARTINS et al., 2006; MARTINS et al., 2009, SUNAHARA et al., 2012; SUNAHARA, MARTINS, 2012).

1.1.2 Modelos experimentais de *diabetes mellitus*

A indução experimental de DM em modelos animais é essencial para a compreensão de sua patogênese. Estudos experimentais em animais apresentam a vantagem de eliminar fatores que limitam drasticamente os estudos clínicos como, por exemplo, etnia, variáveis geográficas e econômicas, interações medicamentosas, dieta, diferenças de gênero e de idade (KUMAR et al, 2012).

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

Vários métodos têm sido utilizados para induzir DM em animais de laboratório nos quais são utilizadas drogas diabetogênicas, principalmente, aloxana e estreptozotocina, análogos citotóxicos de glicose que atuam por vias diferentes, mas que apresentam mecanismo semelhantes de ação sobre as células-beta pancreáticas (LENZEN, 2008).

A aloxana (2,4,5,6-*tetraoxyoyrimidine*; 2,4,5,6-*pyrimidinetetrone*) é uma pirimidina sintetizada em 1838, começou a ser utilizada em pesquisas relacionadas ao DM, quando, em 1943, Dunn e McLetchie demonstraram que podia induzir o DM em animais, como resultado da necrose destas células produtoras de insulina (PESCHKE *et al.*, 2000). A dose necessária para indução de diabetes depende da espécie de animal utilizada no estudo, do estado nutricional dos animais e de qual

via de administração parenteral é utilizada, intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea (SZKUDELSKI, 2001).

A aloxana é largamente utilizada para a indução de DM em modelos animais, induzindo um modelo insulino-dependente (ROHILLA, ALI, 2012). A via endovenosa tem sido a mais escolhida na maioria das espécies de animais devido à velocidade de infusão da droga, uma vez que a aloxana é hidrofílica e instável, com meia-vida de apenas 90 segundos. Estudos mostram que as vias intraperitoneal e subcutânea são satisfatórias no rato e exclusivas em coelhos, embora em doses maiores. Administrada por via oral, a aloxana não apresenta efeito diabetogênico (MORDES *et al.*, 2004)

O jejum também apresenta um papel importante na resposta à aloxana. Lerco e colaboradores (2003) mostraram que 95% dos animais tratados com aloxana em jejum prolongado tornaram-se diabéticos.

Em sua ação, a aloxana se acumula nas células beta pancreáticas como análogos de glicose. Sua ação citotóxica é mediada principalmente pela geração de espécies reativas de oxigênio, alterando sequências estruturais das células e culminando com a morte celular por necrose. Estudos mostram que, após administração da aloxana, apenas células beta pancreáticas apresentaram necrose, sendo que outros tipos de células, endócrinas e não endócrinas, assim como o parênquima externo pancreático, não apresentaram mudanças. Além disso, a aloxana não apresenta efeito citotóxico em seres humanos, possivelmente devido às diferenças entre os mecanismos de captação de glicose de humanos e roedores (ROHILLA & ALI, 2012)

Os mecanismos de ação da aloxana foram extensivamente estudados e hoje se encontram bem caracterizados, sendo um modelo amplamente utilizado para a indução de DM experimental em animais.

1.2. *Paracoccidioides brasiliensis*

Micoses sistêmicas são infecções causadas por fungos patogênicos ou com patogenicidade intrínseca usualmente pequena, mas que acaba sendo aumentada em pacientes em que o estabelecimento da doença é permitido por algum comprometimento do sistema imunológico. A paracoccidioidomicose (PCM) é uma

micose sistêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, descrita por Adolf Lutz, em 1908, quando conseguiu cultivá-lo a partir de lesões de indivíduos infectados. Após sua descoberta, iniciaram-se inúmeros registros de casos e tentativas de isolamento do fungo para a sua caracterização, o que possibilitou melhor compreensão de sua biologia celular (LACAZ, 1994).

Mais recentemente, a linhagem Pb01-like do *P. brasiliensis* foi proposta como uma nova espécie do fungo, baseando-se em dados filogenéticos, análises de recombinação e características morfológicas. A nova espécie foi denominada *Paracoccidioides lutzii* (TEIXEIRA et al., 2014).

Tanto o *P. brasiliensis* quanto o *P. lutzii* apresentam dimorfismo térmico, podendo ser encontrados na forma de micélio à temperatura ambiente, habitando solo de áreas endêmicas (MARQUES, 2003; THEODORO, 2005). Ao ser inalado pelo hospedeiro, o fungo atinge o pulmão e interage com os macrófagos alveolares (MA). A 37°C, o fungo assume a forma de levedura, podendo parasitar o tecido hospedeiro de acordo com a virulência da cepa e com a imunidade do hospedeiro. Assim, a sobrevivência dos fungos no interior das células hospedeiras depende da capacidade de responderem a fatores externos, que vão desde mudanças de temperatura ao estresse oxidativo (HERNANDEZ RUIZ et al, 2011).

Após a inalação dos conídios infectantes, o fungo pode desenvolver um foco primário pulmonar ou pode disseminar-se por via linfo-hematogênica para diferentes órgãos ou sistemas (RESTREPO, 1984).

Como o desenvolvimento da PCM depende da interação entre o fungo e hospedeiro, a adesão às células e à superfície da mucosa do hospedeiro torna-se um passo importante para o estabelecimento da infecção. Assim, o *P. brasiliensis* pode penetrar ativamente à superfície mucocutânea e parasitar as células epiteliais, escapando assim, das defesas do hospedeiro, e atingir os tecidos mais profundos por via linfo-hematogênica (BRITTO et al., 1973).

Uma regulação apropriada resulta na resolução do foco primário de inflamação; entretanto, resposta inapropriada leva à sepse, inflamação crônica, doenças autoimunes e câncer (LIEW et al., 2005; HERTZOG, 2008), por este motivo, a regulação da sinalização via TLR é extremamente importante para o controle da resposta inflamatória.

A PCM é endêmica em países da América Latina, desde o México até a Argentina, com prevalência em países da América do Sul, onde afeta principalmente

trabalhadores rurais. No Brasil, as micoses sistêmicas são a décima causa de morte por doença infecciosa (MAGALHÃES et al, 2012).

No território brasileiro, a incidência dessa micose é maior nas regiões Sul, Sudeste e Centro – Oeste (WANKE et al., 1994), sendo que o Estado do Paraná apresenta a maior taxa de mortalidade por PCM do Sul e Sudeste, ela corresponde à quinta causa de óbitos por doenças infecciosas (COUTINHO, 2002).

O Brasil é o país onde se registra o maior número de casos de PCM. Há incidência em vários estados, sendo a maioria descrita nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país. A estimativa da incidência anual está entre 1 e 3 casos para cada 100.000 habitantes, e apresentando uma mortalidade de 0,14:100.000 (LAZERA et al., 1998).

Restrepo e colaboradores demonstraram em 1984 que a ação do hormônio feminino β -estradiol inibe *in vitro* a conversão da forma micelial para a forma de levedura, sugerindo um efeito protetor do hormônio, gerando resistência na infecção pelo fungo que corrobora com a prevalência que chega a uma taxa de 78 pacientes homens para cada paciente mulher (RESTREPO et al., 1984).

A infecção geralmente ocorre na infância ou na adolescência e sua evolução depende da virulência do fungo, da quantidade de conídios inalados e da integridade do hospedeiro. Após período de latência do fungo em um nódulo fibrótico pulmonar, um desequilíbrio na relação entre hospedeiro e parasita pode causar evolução da doença fazendo com que o paciente passe a apresentar sinais e sintomas da doença (BISINELLI & FERREIRA, 2002).

Quando a doença se estabelece, é caracterizada por um largo espectro de manifestações clínicas, agrupadas em duas formas principais: a forma adulta ou crônica e forma juvenil ou aguda. A forma crônica apresenta evolução mais lenta e menos agressiva, assim, as lesões podem ser localizadas (unifocais) ou podem ser encontradas em mais de um órgão ou sistema (multifocais) (FRANCO, 1986). A forma juvenil ou aguda é mais grave e afeta predominantemente jovens de ambos os sexos comprometendo preferencialmente o sistema fagocítico mononuclear (baço, fígado, linfonodos, medula óssea) (GIRALDO et al., 1976).

Em ambos os casos a imunidade celular apresenta-se comprometida, e a ausência de terapia leva a altas taxas de mortalidade, principalmente em crianças (BERNARD et al., 1996).

A defesa imunológica do hospedeiro contra as micoses sistêmicas é complexa e multifatorial, dependendo de mecanismos inatos e adaptativos (HUFFNAGLE & DEEPE, 2003). Os elementos inatos incluem as barreiras naturais (pele e mucosas), sistema complemento e anticorpos naturais, que fazem opsonização, facilitando a fagocitose por células dendríticas, neutrófilos e macrófagos (MEDZHITOV & JANEWAY, 1997; ROMANI, 2004).

Os macrófagos integram o sistema de fagócitos mononucleares pertencentes a uma família de células que tem uma linhagem comum, que se originam da medula óssea, circulam no sangue como monócitos e, que, quando migram para os tecidos, tornam-se macrófagos teciduais especializados (FUJIWARA & KOBAYASHI, 2005).

Desse modo, os macrófagos participam na imunidade inata e adquirida, e sua ativação é fundamental para controlar o crescimento do patógeno. A atividade fungicida de macrófagos mostrou-se mediada pela produção de óxido nítrico, bem como pela depleção de metabólitos fundamentais para o crescimento de fungos (GONZALEZ et al., 2004; CANO et al., 1994; BRUMMER et al., 1988; BRUMMER et al., 1989; ALMEIDA et al., 2011).

A indução de uma resposta imune no hospedeiro determina a natureza e a severidade do curso da doença. Na maioria das micoses, monócitos/macrófagos são críticos em funções imunes efetivas, implicados em mecanismos inatos contra infecções fúngicas (LOUIE, et al., 1994; SMITH, et al., 1990).

Estas células têm um papel importante na regulação de produção de citocinas, funcionando como mediadores de resposta inflamatória. Como observado em outras micoses sistêmicas, a defesa mais relevante do hospedeiro contra a PCM é a imunidade celular mediada principalmente por IFN- γ durante a ativação de macrófagos (CAVASSANI, 2011; KASHINO et al., 2000).

Após a inalação, os MA residentes e células dendríticas presentes no parênquima pulmonar entram em contato com o fungo (CANO et al., 1992; ARISTIZIBAL, 1998; GONZALEZ et al., 2000). Apesar dos MA estarem em maior número do que as células dendríticas (TWIGG, 2004) e de participarem da apresentação antigênica, sua maior contribuição para a defesa antifúngica é a fagocitose seguida da destruição desses organismos (ROMANI, 2004).

Múltiplas vias de sinalização existentes em macrófagos estão envolvidas na regulação dos receptores do tipo Toll (TLR), importante para o desencadeamento da resposta inflamatória contra diversos patógenos (ZHANG, et al., 2011).

Os TLR pertencem à família de receptores de reconhecimento padrão (PRR) do sistema imune inato, responsáveis pelo reconhecimento de patógenos. Estes receptores são peça fundamental na resposta inata e na consequente ativação da resposta adaptativa (HERTZOG, 2008).

Estes receptores conseguem detectar múltiplos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), incluindo lipopolissacarídeo (LPS) (detectado por TLR4), lipoproteína bacteriana e ácido lipoteicóico, além de padrões encontrados em fungos (detectado por TLR2), flagelina (detectado por TLR5), DNA de bactérias e vírus (detectado por TLR9). A ativação de macrófagos via TLR permite a produção de citocinas inflamatórias como TNF, IL-1, IL-6 e IL-12, regulando também, a diferenciação celular (HERTZOG, 2008).

A expressão de IL-12 leva à ativação de células Th1 produtoras de IFN- γ , enquanto a falta de IL-12 através de ativação limitada de TLR durante a resposta inflamatória/imune induz uma resposta do tipo Th2, sugerindo que esse tipo de resposta é um desvio da sinalização que ocorre na ausência de IL-12.

Na PCM, as células TCD8 são também fundamentais para o controle da doença pulmonar, podendo apresentar-se sob os padrões do tipo 1 (secretora IFN- γ) ou tipo 2 (secretor IL-4) de ativação; sendo que também estão relacionadas ao controle da carga fúngica pulmonar (CALICH & BOLTTA, 2005; CHIARELLA, et al., 2007; ARRUDA et al., 2007).

Sabemos que uma resposta imunológica efetiva contra *P. brasiliensis* é baseada na ativação de linfócitos TCD8 em presença de concentrações ideais de citocinas pró-inflamatórias, como, por exemplo, IFN- γ , secretadas pelos linfócitos Th1 (CALICH & BOLTTA, 2005; CHIARELLA, et al., 2007; ARRUDA et al., 2007). Apesar de sua importância epidemiológica a doença não é classificada como de notificação compulsória, de modo que não se dispõe de dados precisos sobre sua incidência no país.

1.3. Justificativa

A defesa imunológica do hospedeiro contra as micoses sistêmicas é complexa e multifatorial, dependendo de mecanismos inatos e adaptativos, os primeiros envolvendo elementos inatos incluem as barreiras naturais (pele e

mucosas), sistema complemento e anticorpos naturais, que fazem opsonização, facilitando a fagocitose por células dendríticas, neutrófilos e macrófagos (MEDZHITOV & JANEWAY, 1997; HUFFNAGLE & DEEPE, 2003; ROMANI, 2004).

Os macrófagos integram o sistema de fagócitos pertencentes a uma família de células que tem uma linhagem comum, que se originam da medula óssea, circulam no sangue como monócitos e, quando migram para os tecidos, tornam-se macrófagos teciduais especializados (FUJIWARA & KOBAYASHI, 2005).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que o tratamento prévio de MA ativados pelo LPS com insulina diminui a expressão de p38 MAPK, ERK 1/2, Akt, PKC- α e pPKC- δ , e a produção de TNF. Estes dados sugerem que a administração de insulina na sepse com envolvimento pulmonar possa ter um efeito protetor por bloquear uma segunda onda de mediadores liberados pelos MA (MARTINS et al., 2008a).

A insulina também foi capaz de diminuir a fosforilação de I κ -B α citoplasmático. Estes dados mostram que, em MA estimulados por LPS, a insulina é capaz de inibir a translocação nuclear de NF- κ B, provavelmente por bloquear a degradação de I- κ B α e, assim, suprimir a produção de NO e PGE2 — dois mediadores que contribuem para o choque séptico (MARTINS et al. 2008b).

Por outro lado, a PCM é endêmica em países da América Latina com prevalência em países da América do Sul. No Brasil, as micoses sistêmicas são a décima causa de morte por doença infecciosa (MAGALHÃES et al, 2012).

O número de pacientes diabéticos, por sua vez, encontra-se em ininterrupto crescimento, e projeções estimam para 2035 um aumento médio de 55% sobre o número de pessoas com DM, em relação ao número já bastante significativo (cerca de 382 milhões de pacientes) encontrado em 2013 (IDF, 2013).

Assim, devido ao seu alto potencial incapacitante e ao número de mortes que provoca, a PCM representa um importante problema de Saúde Pública no Brasil, que pode ser agravado uma vez relacionado com a debilidade da resposta imune apresentada em pacientes diabéticos. Desta forma, ampliar o conhecimento sobre a resposta inflamatória e imune iniciadas pela infecção por *P. brasiliensis* em indivíduos diabéticos é de fundamental relevância.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi estudar a intervenção da insulina em um modelo de micose sistêmica causada por *P. Brasiliensis* em animais diabéticos e sadios, analisando produção/liberação de citocinas.

Para tanto, foi padronizado um modelo experimental, no qual foram avaliados:

- a) o número de células no lavado broncoalveolar (LBA) e peritoneal (LPe), o leucograma e a glicemia (monitor de glicose);
- b) os níveis sérico de corticosterona e insulina (ELISA);
- c) as concentrações de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-4, IL-10, IL-12, CINC-1, CINC-2 e CINC-3) nos lavados LBA e LPe, e em homogenatos de órgãos (pulmão, baço e fígado) pela técnica de ELISA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, machos, com peso inicial entre 18 - 22g com idade entre 5 - 6 semanas procedentes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade São Paulo. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA-FCF/USP-421).

Os animais foram mantidos em biotério, acondicionados em gaiolas coletivas, contendo no máximo cinco animais, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de 22°C e com suprimentos de água e alimento disponíveis todo o tempo.

3.2. Delineamento experimental

Os animais foram divididos em seis grupos de acordo com o quadro abaixo:

	Grupos	Descrição		
		Dia 0	Dia 10	Dias 43-55
CONTROLES	Controle salina	Salina	Salina	Salina
	Controle Pb	Salina	<i>P. brasiliensis</i>	Salina
	Controle Pb+i	Salina	<i>P. brasiliensis</i>	Insulina
DIABÉTICOS	Diabético salina	Aloxana	Salina	Salina
	Diabético Pb	Aloxana	<i>P. brasiliensis</i>	Salina
	Diabético Pb+i	Aloxana	<i>P. brasiliensis</i>	Insulina

Figura 2 - Quadro de distribuição de grupos do experimento. Pb representando *Paracoccidioides brasiliensis* e Pb+i representando *Paracoccidioides brasiliensis* em conjunto com o tratamento de insulina.

O protocolo experimental seguindo o modelo de indução da diabetes e de infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* totaliza 55 dias, de acordo com o seguinte esquema:

Figura 3 - Modelo de micose pulmonar em animais diabéticos: Injeção intratraqueal de *P. brasiliensis*.

3.3. 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 (60 mg/kg) dissolvida em solução salina fisiológica. Animais controle receberam volume equivalente de solução salina, pela mesma via (modificado de SPILLER, et. al., 2012). Também seguindo o modelo padronizado, a confirmação da DM foi realizada pela determinação da glicemia do animal no décimo dia do protocolo.

A glicemia foi determinada através de um monitor de glicose (Advantage, Lilly), utilizando-se amostras de sangue obtidas da extremidade distal da cauda dos animais. Somente foram considerados diabéticos animais com glicemia superior a 300 mg/dL (16,6 mM).

3.4. Infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*

Para o desenvolvimento do projeto foi realizado um protocolo de infecção por *P. brasiliensis* (Pb) previamente padronizado no laboratório de Imunologia das Micoses do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, FCF-USP. Assim, este projeto teve a colaboração do Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida e da estudante de doutorado Lavínia Maria Dalmas Romera.

3.4.1. Preparo do Inóculo

A cepa virulenta Pb 18 (KASHINO et al., 2000) do *P. brasiliensis* foi mantida em meio semi-sólido Sabouraud-dextrose-ágar (MERCK - Alemanha), em estufa a 37°C, com repiques realizados semanalmente.

Para a preparação do inóculo, as leveduras da cepa Pb18 foram coletadas em 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) em tubo falcon, seguida de centrifugação por 1 minuto a 3000 RPM. O sobrenadante foi coletado com auxílio de seringa de insulina para outro tubo falcon, e posteriormente realiza-se a filtração com auxílio do cell strainer de trama 40µm.

A suspensão obtida foi novamente coletada com auxílio de seringa de insulina para outro tubo falcon, seguida de filtração com auxílio do cell strainer 40µm. Em seguida realizou-se a contagem do número de células através da câmara de Neubauer e então o ajuste de concentração para 1×10^6 células/mm³.

3.4.2. Infecção Intratraqueal

No décimo dia do protocolo, após confirmação de diabetes, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal (i.t.) com cloridrato de cetamina (90 mg/kg) associado ao cloridrato de xilasina (10 mg/kg). Após completo estado de anestesia, evidenciado pela ausência de resposta a estímulos visuais e motores os animais foram imobilizados e infectados por i.t. com suspensão contendo 1×10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis* contidas em 50µl de PBS. Após inoculação, a incisão foi

fechada e os animais colocados sob uma fonte moderada de calor para controlar a hipotermia transitória produzida pela anestesia, até acordarem.

Os animais foram acompanhados por 45 dias de incubação da doença até a data de eutanásia.

3.5. Tratamento com insulina

Animais diabéticos e controle receberam doses de 1UI de insulina NPH para cada 300 mg/dL de glicemia (SPILLER, et. al., 2012), por via subcutânea, no período da tarde (6 p.m.), durante 12 dias antes da eutanásia. Os níveis glicêmicos e insulinêmicos foram determinados antes do tratamento dos animais com insulina e momentos antes da aplicação de anestesia para eutanásia (ANJOS-VALLOTA, et al, 2006).

3.6. Monitoramento da instalação do diabetes e da infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*

A fim de avaliar a infecção sistêmica causada por *P. brasiliensis* foram analisados os seguintes parâmetros: determinação da glicemia, variação de massa corpórea e contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos.

As amostras de sangue periférico, coletadas da cauda do animal, foram utilizadas para a determinação da glicemia por meio de um monitor de glicose (Accu-Chek Active, Roche, Brasil).

A variação de massa corpórea foi avaliada em balança (Adventurer Pro, Ohaus Corporation, USA) sendo que as medidas foram realizadas no 10º dia após a indução de diabetes e no 55º dia (45 dias após da indução da infecção por *P. brasiliensis*).

Então, os animais foram anestesiados com uma solução com cetamina (Ceva Santé Animale, Brasil) (90mg/kg) e xilasina (Ceva Santé Animale, Brasil) (10 mg/kg) (proporção 10:1) e em seguida foi realizada a coleta de sangue total por punção cardíaca em tubo contendo ácido tetraacético elilenediamina (EDTA)

A contagem global de leucócitos foi realizada por um contador hematológico automatizado (ABC Vet, ABX Micros 60, Horiba, Japan), enquanto a contagem diferencial foi realizada por meio de esfregaços corados pelo método pancrômico de Rosenfeld (ROSENFELD, 1947), em que um total de 100 células foi contado utilizando-se objetiva de imersão em microscópio óptico (CX31RBSFA, Olympus, Japan).

3.7. Determinação da concentração sérica de insulina

Após a coleta de sangue total dos animais pertencentes aos grupos experimentais, foi realizada a separação do soro por centrifugação das amostras a 1600g por 20 minutos em centrífuga (5810R, Eppendorf, USA).

A insulinemia foi determinada em amostras de soro estocadas a -20°C, utilizando *Rat Insulin Enzyme Immunoassay Kit* (SPIbio, Massy Cedex, France), que se baseia na capacidade da insulina, presente nas amostras de soro, em competir com a insulina de rato ligada a acetilcolinesterase, pela ligação a um anticorpo específico. A leitura foi realizada a 414nm em leitora de microplacas (EPOK, Biotek, USA) e os resultados foram expressos em ng/mL.

3.8. Lavados broncoalveolar e peritoneal

Os animais foram anestesiados pela via intraperitoneal com cloridrato de cetamina (90 mg/kg) associado ao cloridrato de xilasina (10 mg/kg). Após anestesia, a pele da região abdominal foi removida, a cavidade peritoneal foi lavada com 5mL de tampão fosfato salina, pH 7.4 (PBS). Após a massagem do abdômen as amostras de lavado peritoneal (LPe) foram coletadas e devidamente armazenadas. Em seguida, a cavidade abdominal foi exposta para a coleta de sangue da aorta. Para a determinação do número de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA), os pulmões foram lavados com 5 mL de PBS (reinfundidos por 3 vezes), utilizando-se tubo de polietileno de 1 mm de diâmetro, inserido na traqueia. Após a coleta, o material foi

centrifugado (500 g, 10 min, 4°C) e o sobrenadante do LPe e LBA foram mantidos a -70°C, para a dosagem de citocinas e quimiocinas.

3.9. Contagem de células

Para contagem do número total de células em LPe e LBA, a suspensão celular, foi diluída na proporção 1:20 (v:v) com líquido de Turk e a contagem total de células foi determinada, por microscopia, em câmara de Neubauer (Improved bright-line, Marienfeld superior, Germany).

Além disso, mediante a utilização de uma citocentrífuga (SPIN IV, Incibras, Brasil), 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 em microscópio óptico (CX31RBSFA, Olympus, Japan).

3.10. Quantificação de citocinas e quimiocinas por enzima-imunoensaio

As dosagens de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12, TNF- α), das quimiocinas CINC-1, CINC-2 e CINC-3 e de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) foram realizadas em amostras de LPe, por ensaios de enzima-imunoensaio (ELISA), utilizando-se reagentes comerciais (R&D Systems Inc., Mineapolis, MN, USA).

Inicialmente, na placa com 96 poços, foram adicionados 100 μ L/poço do anticorpo de captura, sendo anti-TNF- α (4 μ g/mL), anti-IL-10 (4 μ g/mL), anti-IL-4 (2 μ g/mL), anti-CINC-1 (0,4 μ g/mL), anti-IL-6 (4 μ g/mL), anti-CINC-2 (2 μ g/mL), e anti-CINC-3 (2,0 μ g/mL).

Após incubação por uma noite a temperatura ambiente (20°C a 26°C), o sobrenadante foi desprezado e a placa lavada três vezes com o tampão de lavagem (aproximadamente 300 μ L/poço). Em seguida, foi realizada a reação de bloqueio adicionando-se 300 μ L/poço de albumina sérica bovina a 2% em PBS e incubação por 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada 3 vezes com o

tampão de lavagem. Adicionaram-se, em duplicata, 100 µL/poço do padrão ou das amostras, procedendo-se à incubação da placa por 2 horas à temperatura ambiente.

Para a curva padrão utilizaram-se IL-12, TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-10, CINC-1, CINC-2 e CINC-3 recombinantes em diluição seriada de acordo com as instruções do fabricante. Após repetir o procedimento de lavagem da placa, foram adicionados 100 µL/poço do anticorpo de detecção biotinilado para TNF- α (225 ng/mL), IL-10 (300 ng/mL), IL-4 (200 ng/mL), IFN- γ (150 ng/mL), CINC-1 (50 µg/mL), CINC-2 (100 µg/mL), IL-6 (400 µg/mL), CINC-3 (50 µg/mL), e a placa incubada por 2 horas à temperatura ambiente.

Ao término da incubação, o ciclo de lavagem da placa foi repetido e, em seguida, adicionaram-se 100 µL/poço da enzima estreptoavidina peroxidase na proporção 1:200 de enzima:PBS com 0,05% de tween20, e incubação por 20 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. Em seguida, o ciclo de lavagem da placa foi repetido e a reação revelada pela adição de 100 µL/poço de uma solução de 10 mL tampão citrato com *ortho-phenylenediamine* (OPD) (1 tablete 10mg/placa) e 10 µL de água oxigenada. A placa foi então incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi bloqueada adicionando-se 50 µL/poço de H₂SO₄ (2N), avaliando-se a densidade óptica das amostras a 495nm, imediatamente após o bloqueio da reação, em leitora de microplacas (EPOK, Biotek, USA).

3.11. Preparo dos homogenatos de órgãos

Foram realizados homogenatos com o pulmão, o fígado e o baço dos animais, separadamente, utilizando 1 mL de PBS gelado (2mL para o fígado) e maceração do órgão, que posteriormente foi centrifugado e o sobrenadante coletado e armazenado para análises.

3.12. Determinação de proteína total nos homogenatos

Para a quantificação de proteína total das amostras de pulmão foi utilizado o kit BCA (bicinchoninic acid, Pierce, Rockford, IL, USA). A leitura será realizada a 562 nm, comparando-se com curva-padrão de albumina.

3.13. Análise estatística

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

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização do modelo de DM de acordo com a variação de glicemia e peso

Para a caracterização do modelo de deficiência relativa de insulina experimental, foram tomados como parâmetro: a glicemia sérica dos animais e a variação de peso destes durante o período do experimento. Os resultados individuais encontram-se na Tabela A1 do Apêndice.

Observando o gráfico das amostras coletadas no dia 10, pode-se verificar que animais que receberam aloxana apresentaram concentrações plasmáticas elevadas de glicose (média de $570,1 \pm 9,27$; Figura 4). No mesmo período, o grupo controle apresentou normoglicemia ($192 \pm 7,46$; Figura 4).

Quanto à variação de peso, animais do grupo diabético apresentaram uma variação média de peso significativamente menor ($0,87 \pm 0,25$; Figura 5), comparados aos do grupo controle ($2,94 \pm 0,39$; Figura 5).

Figura 4 - Determinação dos níveis glicêmicos (10 dias): A glicemia foi determinada através de um monitor de glicose (advantage, Lilly), 10 dias após a injeção endovenosa de aloxana (60mg/kg de animal), utilizando-se amostras de sangue obtidas da cauda dos animais. Animais controle receberam injeção de salina pela mesma via. Foram usados 20 animais por grupo. Os valores representam a média da glicemia $\pm$ e.p.m.; * $p < 0,0001$, estatisticamente diferente do grupo controle.

Figura 5 - Variação da Massa Corpórea (10 dias): Comparação entre os grupos controle e diabético. A variação foi determinada através dos pesos obtidos nos dias 0 e 10. Foram utilizados 20 animais por grupo. Os resultados expressam os valores de média $\pm$ e.p.m.; * $p < 0,0001$, estatisticamente diferente do grupo controle.

Nas amostras obtidas 45 dias após a infecção pelo fungo (55 dias após indução do DM), pode-se observar que animais dos grupos diabéticos apresentaram glicemia elevada em relação ao grupo controle ($462,2 \pm 58,6$ no grupo Ds; Figura 6). A infecção pelo fungo não promoveu alterações neste parâmetro, tanto nos grupos controle quanto nos diabéticos ($547,6 \pm 36,8$ no grupo DPb; Figura 6). O tratamento de insulina não alterou os níveis séricos de glicose nos animais do grupo controle e reduziu significativamente este valor nos animais diabéticos, sem normalizar a glicemia dos animais ($323,6 \pm 36,9$; Figura 6).

No gráfico da variação de massa corpórea durante os 55 dias do experimento (Figura 7), vê-se que a redução no ganho de massa nos grupos diabéticos foi mais evidente nos dados do dia 55 ($2,96 \pm 0,93$ no grupo Ds, comparado a $6,19 \pm 0,75$ no grupo Cs; Figura 7). A infecção sozinha não alterou o ganho de peso dos animais não diabéticos (CPb). Os resultados sugerem que esta variação em animais diabéticos infectados por Pb possa ser ainda mais reduzida. Houve, porém, aumento no ganho de peso dos animais grupo diabético tratado ($6,34 \pm 0,81$ no grupo DPb+i, comparado a $0,93 \pm 0,87$ no grupo DPb; Figura 7). Os resultados individuais encontram-se nas Tabelas A2 e A3 do Apêndice.

Figura 6 - Determinação dos níveis glicêmicos (55 dias): A glicemia foi determinada através de um monitor de glicose (advantage, Lilly), 55 dias após a injeção endovenosa de aloxana (60mg/kg de animal), utilizando-se amostras de sangue obtidas da cauda dos animais. Animais controle receberam injeção de salina pela mesma via. Foram utilizados 5 animais por grupo. Os valores representam a média da glicemia $\pm$ e.p.m. Cs (Controle + salina); CPb (Controle + *P. brasiliensis*); CPb+i (CPb + insulina); Ds (Diabético + salina); DPb (Diabético + *P. brasiliensis*); DPb+i (DPb + insulina). * p<0,001 vs Cs; ● p<0,001 vs CPb; ◆ p<0,01 vs CPb+i; ✕ p<0,001 vs DPb.

Figura 7 - Variação da Massa Corpórea (55 dias): Comparação entre os grupos controles e diabéticos. A variação foi determinada através dos pesos obtidos nos dias 0 e 55. Foram utilizados 5 animais por grupo. Os resultados expressam os valores de média $\pm$ e.p.m. Cs (Controle + salina);

CPb (Controle + *P. brasiliensis*); CPb+i (CPb + insulina); Ds (Diabético + salina); DPb (Diabético + *P. brasiliensis*); DPb+i (DPb + insulina). * $p < 0,01$ vs CPb; ● $p < 0,05$ vs DPb.

4.1.1. Tratamento de insulina

As concentrações séricas de insulina foram analisadas em amostras de soro coletadas no dia do experimento. Os valores individuais encontram-se na Tabela A4 do Apêndice.

Pode-se observar na Figura 8 que os animais diabéticos (Ds) não apresentaram níveis detectáveis de insulina. A infecção em si não promoveu diferenças entre tais concentrações nos grupos controles (Cs vs CPb) e nos grupos diabéticos (Ds vs DPb). Animais que receberam tratamento subcutâneo de insulina por 12 dias apresentaram níveis elevados do hormônio na corrente sanguínea, tanto nos grupos controle (CPb+i) quanto nos diabéticos (DPb+i; Figura 8).

Figura 8 - Concentrações de insulina em soro. A análise foi feita em amostras de soro coletadas no dia 55, 45 dias após a infecção por *P. brasiliensis* e após 12 dias de tratamento com insulina NPH pela via subcutânea. Foram utilizados 5 animais para cada grupo. Os valores representam a média do número de leucócitos $\pm$ e.p.m. Cs (Controle + salina); CPb (Controle + *Paracoccidioides brasiliensis*); CPb+i (CPb + insulina); Ds (Diabético + salina); DPb (Diabético + *Paracoccidioides brasiliensis*); DPb+i (DPb + insulina). ◆ $p < 0,05$ vs CPb; ● $p < 0,01$ vs Ds; ◆ $p < 0,01$ vs DPb.

4.2. Modelo de infecção intratraqueal pelo *Paracoccidioides brasiliensis*

Os experimentos conduzidos 55 dias após a injeção do fungo pela via intratraqueal permitiram a determinação dos valores hematológicos e das contagens de células no sangue, nos LBA e LPe.

4.2.1. Hemograma e Leucograma

Analisando a Tabela 2 dos resultados hematológicos, pode-se observar que a indução da DM não alterou fatores hematimétricos, pois não há diferença estatística entre os grupos Cs e Ds. Tais fatores também não foram alterados pela infecção do fungo, assim como a presença da insulina não apresentou influência sobre tais parâmetros. Os valores individuais podem ser encontrados na Tabela A5 do Apêndice.

Tabela 2 - Hemograma de camundongos diabéticos com infecção intratraqueal por *Paracoccidioides brasiliensis* e seus respectivos controles

Animais	Hemograma			
	Hemácias	Hematócrito	Hemoglobina	Plaquetas
C _s	9,5 ± 0,4	44,0 ± 1,0	14,5 ± 0,3	719 ± 52
C _{Pb}	8,7 ± 0,4	42,2 ± 2,3	13,3 ± 0,4	825 ± 77
C _{Pb+i}	9,3 ± 0,8	45,5 ± 3,0	14,1 ± 1,3	760 ± 43
D _s	9,2 ± 0,5	44,7 ± 1,4	14,1 ± 0,6	692 ± 100
D _{Pb}	8,9 ± 0,6	43,7 ± 1,9	13,7 ± 0,3	886 ± 50
D _{Pb+i}	9,3 ± 0,1	46,7 ± 1,1	14,3 ± 0,2	776 ± 114

O *diabetes mellitus* foi induzido pela injeção de aloxana (60 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.t. de *P. brasiliensis*. A coleta foi realizada no dia 55. Os grupos CPb+i e DPb+i receberam insulina por via subcutânea diariamente durante 12 dias antes da coleta. Foram utilizados 5 animais para cada grupo, e a análise foi feita em amostras de sangue total com anticoagulante. Os valores representam a média ± e.p.m.

Quanto à leucometria, animais infectados pelo fungo (CPb) apresentaram aumento no número de leucócitos em relação ao grupo controle (Cs) e o grupo que recebeu tratamento de insulina (CPb+i) não apresentou diferença quando comparado aos animais não tratados. Não houve diferença entre os grupos controles diabético e não diabético. Nos animais diabéticos, observou-se mais uma vez o aumento da concentração de leucócitos nos animais que receberam a suspensão com o fungo, e o tratamento de insulina não promoveu alterações significativas neste parâmetro (Tabela 3).

Os animais diabéticos infectados (DPb e DPb+i) apresentaram maior presença de neutrófilos em relação aos animais diabéticos não infectados. Os resultados da contagem total presentes na Tabela 3 estão melhor demonstrados em gráfico na Figura 9. Os valores individuais podem ser encontrados na Tabela A6 do Apêndice.

Tabela 3 - Contagem diferencial de leucócitos em sangue de camundongos diabéticos com infecção intratraqueal por *Paracoccidioides brasiliensis* e seus respectivos controles

Grupos	Células $\times 10^3/\text{mm}^3$				
	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Linfócitos	Monócitos
C_s	$0,3 \pm 0,1$	$0,04 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$2,6 \pm 0,3$	$0,02 \pm 0,0$
CPb	$0,7 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$3,0 \pm 0,8$	$0,0 \pm 0,0$
CPb+i	$0,8 \pm 0,4$	$0,03 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$2,8 \pm 0,7$	$0,04 \pm 0,0$
D_s	$0,2 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$2,1 \pm 0,4$	$0,05 \pm 0,0$
DPb	$0,8 \pm 0,3$	$0,08 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$2,9 \pm 0,5$	$0,03 \pm 0,0$
DPb+i	$0,9 \pm 0,4$	$0,06 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$2,6 \pm 0,4$	$0,04 \pm 0,0$

O *diabetes mellitus* foi induzido pela injeção de aloxana (60 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.t. de *P. brasiliensis*. A amostra foi de sangue total coletado no dia 55 do experimento. Os grupos CPb+i e DPb+i receberam insulina por via subcutânea diariamente durante 12 dias antes da coleta. Foram utilizados 5 animais para cada grupo. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m.

Figura 9 - Contagem total de leucócitos. A análise foi feita em sangue total coletado no dia 55, 45 dias após a infecção por *P. brasiliensis*. Foram utilizados 5 animais para cada grupo. Os valores representam a média do número de leucócitos $\pm$ e.p.m. Cs (Controle + salina); CPb (Controle + *Paracoccidioides brasiliensis*); CPb+i (CPb + insulina); Ds (Diabético + salina); DPb (Diabético + *Paracoccidioides brasiliensis*); DPb+i (DPb + insulina).

4.2.2. Lavados peritoneal e broncoalveolar

Na análise da concentração de células inflamatórias no LBA (Figura 10), a infecção pelo fungo (CPb) levou os animais a apresentarem um número maior de células em relação ao grupo controle (Cs) ($1,5 \pm 0,31$ vs $0,51 \pm 0,07$ do grupo controle). O mesmo não foi observado nos grupos diabéticos, onde animais infectados (DPb) não apresentaram maior contagem de leucócitos do que diabéticos não infectados (Ds). Os animais controle que receberam tratamento com insulina apresentaram reduzida migração leucocitária para os pulmões, e nos animais diabéticos tratados (DPb+i) a insulina não promoveu a migração leucocitária para o pulmão. Os resultados individuais encontram-se na Tabela A7 do Apêndice.

As células do LPe (Figura 11) foram analisadas e encontraram-se aumentadas em animais infectados (CPb), em relação ao grupo controle (Cs), e viu-se que o tratamento com insulina promoveu redução dessa concentração. Nos grupos diabéticos, porém, a infecção com o fungo não alterou a concentração de células inflamatórias no LPe. A administração de insulina aumentou significativamente a migração de leucócitos para o exsudato inflamatório, mostrando diferença significativa entre o grupo diabético tratado (DPb+i) e o diabético não infectado (Ds). Os resultados individuais podem ser encontrados na Tabela A8 do Apêndice.

Figura 10 - Contagem de leucócitos em lavado broncoalveolar. A coleta do LBA foi realizada no dia 55, 45 dias após a infecção por *P. brasiliensis*. Foram utilizados 5 animais por grupo. Os valores representam a média do número de leucócitos $\pm$ e.p.m. Cs (Controle + salina); CPb (Controle + *Paracoccidioides brasiliensis*); CPb+i (CPb + insulina); Ds (Diabético + salina); DPb (Diabético + *Paracoccidioides brasiliensis*); DPb+i (DPb + insulina). * $p < 0,05$ vs Cs.

Figura 11 - Contagem de leucócitos do lavado peritoneal. A coleta do LPe foi realizada no dia 55, 45 dias após a infecção por *P. brasiliensis*. Foram utilizados 5 animais em cada grupo. Os valores representam a média do número de leucócitos $\pm$ e.p.m. Cs (Controle + salina); CPb (Controle + *Paracoccidioides brasiliensis*); CPb+i (CPb + insulina); Ds (Diabético + salina); DPb (Diabético + *Paracoccidioides brasiliensis*); DPb+i (DPb + insulina). * $p < 0,05$ vs Cs; ● $p < 0,05$ vs DPb.

4.3. Análises de citocinas

4.3.1. Lavado Broncoalveolar

Nos LBA, foram analisadas as seguintes citocinas e quimiocinas: IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , CINC-1 e CINC-2 pela técnica de ELISA. Os resultados individuais podem ser encontrados na Tabelas A9 e A10 do Apêndice.

As secreções das citocinas avaliadas, tanto pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias, não apresentaram variações nestas amostras, e os resultados estão descritos na Tabela 4. As amostras não apresentaram níveis detectáveis de IL-6.

No que diz respeito às concentrações de CINC-1, a infecção não promoveu diferenças entre o grupo controle infectado (CPb) e controle salina (Cs). Porém, nos animais diabéticos, houve ligeira redução destes níveis quando comparados aos controles diabéticos (Ds). O tratamento de insulina não gerou alterações no grupo controle, embora no grupo diabético infectado e tratado (DPB+i) tenha reestabelecido os níveis desta citocina para níveis semelhantes aos apresentados pelo grupo controle (Tabela 5).

Já em análises de CINC-2, animais do grupo controle aos quais foi administrada a suspensão de fungo apresentaram maior expressão da quimiocina no pulmão. O mesmo não ocorreu no grupo diabético. O tratamento com a insulina promoveu o aumento desta quimiocina nos animais do grupo controle (CPb+i), e apenas um leve aumento nos animais diabéticos tratados (DPb+i) (Tabela 5).

Tabela 4 - Dosagem de citocinas no lavado broncoalveolar de camundongos diabéticos com infecção intratraqueal por *Paracoccidioides brasiliensis* e seus respectivos controles

Animais	Citocinas			
	TNF- α (pg/mL)	IL-12 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)
Cs	133,6 $\pm$ 20,1	21,2 $\pm$ 1,8	263,2 $\pm$ 28,5	25,2 $\pm$ 3,3
CPb	165,1 $\pm$ 51,2	28,8 $\pm$ 4,5	337,1 $\pm$ 79,1	28,3 $\pm$ 4,6
CPb+i	160,7 $\pm$ 49,9	27,1 $\pm$ 2,6	379,0 $\pm$ 126,1	29,9 $\pm$ 10,6
Ds	102,5 $\pm$ 30,6	23,85 $\pm$ 1,5	230,3 $\pm$ 36,2	27,1 $\pm$ 3,2
DPb	55,7 $\pm$ 18,4	20,2 $\pm$ 2,3	161,0 $\pm$ 59,4	17,5 $\pm$ 3,2
DPb+i	151,5 $\pm$ 38,2	23,7 $\pm$ 2,3	244,3 $\pm$ 55,4	20,1 $\pm$ 3,4

O *diabetes mellitus* foi induzido pela injeção de aloxana (60 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.t. de *P. brasiliensis*. A coleta do LBA foi realizada no dia 55. Os grupos CPb+i e DPb+i receberam insulina por via subcutânea diariamente durante 12 dias antes da coleta. Foram utilizados 5 animais para cada grupo. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m.

Tabela 5 - Dosagem de quimiocinas no lavado broncoalveolar de camundongos diabéticos com infecção intratraqueal por *Paracoccidioides brasiliensis* e seus respectivos controles

Animais	Quimiocinas	
	CINC-1 (pg/mL)	CINC-2 (pg/mL)
Cs	136,7 $\pm$ 15,5	456,5 $\pm$ 63,4
CPb	124,2 $\pm$ 24,0	662,3 $\pm$ 42,7
CPb+i	132,5 $\pm$ 29,5	807,9 $\pm$ 128,7
Ds	95,9 $\pm$ 20,0	441,6 $\pm$ 65,9
DPb	105,9 $\pm$ 17,1	375,3 $\pm$ 102,9
DPb+i	128,7 $\pm$ 19,7	581,4 $\pm$ 112,8

O *diabetes mellitus* foi induzido pela injeção de aloxana (60 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.t. de *P. brasiliensis*. A coleta do LBA foi realizada no dia 55. Os grupos CPb+i e DPb+i receberam insulina por via subcutânea diariamente durante 12 dias antes da coleta. Foram utilizados 5 animais para cada grupo. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m.

4.3.2. Lavado Peritoneal

Nos LPe, foram analisadas as seguintes citocinas: IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , CINC-1 e CINC-2 pela técnica de ELISA. Os resultados individuais podem ser encontrados na Tabela A11 do Apêndice

Em relação às dosagens de citocinas de IL-10, a infecção do fungo não causou alterações estatisticamente relevantes nas concentrações de IL-4, IL-10 e TNF- α , e o tratamento com insulina não pareceu promover alterações destes níveis no meio peritoneal. Os resultados podem ser analisados na Tabela 6. As amostras não apresentaram níveis detectáveis de IL-12 e IL-6.

Por outro lado, em análises de CINC-1, há sugestão de que a infecção esteja induzindo um aumento da secreção da CINC-1 quando comparado com os animais controle. O oposto foi observado nos animais diabéticos, onde foi sugerida redução dos níveis desta citocina. O tratamento com insulina neste caso nos permite sugerir que há redução de CINC-1 em animais controle infectados, diferentemente do que foi observado nos animais diabéticos infectados e tratados (Tabela 7).

No que diz respeito aos níveis da CINC-2, foram observados níveis inferiores da molécula em todos os grupos quando comparados ao grupo controle. No caso dos grupos diabéticos, esta redução é levemente mais acentuada, porém, sem que exista diferença estatística (Tabela 7).

Tabela 6 – Dosagem de citocinas no lavado peritoneal de camundongos diabéticos com infecção intratraqueal por *Paracoccidioides brasiliensis* e seus respectivos controles

Animais	Citocinas		
	TNF- α (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)
Cs	348,2 $\pm$ 116,2	589,7 $\pm$ 146,8	85,4 $\pm$ 17,1
CPb	178,3 $\pm$ 164,2	444,3 $\pm$ 291,0	83,1 $\pm$ 27,2
CPb+i	181,5 $\pm$ 181,5	250,4 $\pm$ 155,1	67,1 $\pm$ 13,4
Ds	328,5 $\pm$ 133,5	426,3 $\pm$ 245,1	97,8 $\pm$ 19,6
DPb	193,7 $\pm$ 100,6	426,8 $\pm$ 136,5	89,8 $\pm$ 12,1
DPb+i	181,6 $\pm$ 86,6	409,6 $\pm$ 207,9	87,2 $\pm$ 20,7

O *diabetes mellitus* foi induzido pela injeção de aloxana (60 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.t. de *P. brasiliensis*. A coleta do LPe foi realizada no dia 55. Os grupos CPb+i e DPb+i receberam insulina por via subcutânea diariamente durante 12 dias antes da coleta. Foram utilizados 3 animais em cada grupo, 4 nos grupos Cs e CPb+i. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m.

Tabela 7 – Dosagem de quimiocinas no lavado peritoneal de camundongos diabéticos com infecção intratraqueal por *Paracoccidioides brasiliensis* e seus respectivos controles

Animais	Quimiocinas	
	CINC-1 (pg/mL)	CINC-2 (pg/mL)
Cs	85,6 $\pm$ 39,6	1337,5 $\pm$ 239,4
CPb	99,4 $\pm$ 56,0	1145,8 $\pm$ 295,2
CPb+i	53,3 $\pm$ 37,0	682,5 $\pm$ 281,7
Ds	133,4 $\pm$ 31,2	965,6 $\pm$ 283,9
DPb	93,4 $\pm$ 28,0	837,1 $\pm$ 276,3
DPb+i	100,5 $\pm$ 34,4	781,9 $\pm$ 260,8

O *diabetes mellitus* foi induzido pela injeção de aloxana (60 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.t. de *P. brasiliensis*. A coleta do LPe foi realizada no dia 55. Os grupos CPb+i e DPb+i receberam insulina por via subcutânea diariamente durante 12 dias antes da coleta. Foram utilizados 3 animais em cada grupo, 4 nos grupos Cs e CPb+i. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m.

4.3.3. Homogenato de Pulmão

Nas amostras de homogenatos de pulmão foram analisadas as seguintes citocinas: IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , CINC-1, CINC-2 e CINC-3, todas pela técnica de ELISA. Os resultados individuais podem ser encontrados nas Tabelas A12 e A13 do Apêndice.

Nestas amostras, animais infectados pelo Pb apresentaram concentrações aumentadas de TNF- α , mais pronunciada em animais diabéticos (Figura 12). O tratamento com insulina não alterou este parâmetro tanto no grupo controle quanto no diabético.

Os resultados da Tabela 8 sugerem também o aumento da concentração de IL-6 em animais infectados, menos acentuado em animais diabéticos infectados. O tratamento com insulina não promoveu alterações nestas concentrações. Não foram encontrados níveis detectáveis de IL-12 nestas amostras.

Quanto às análises das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, a infecção por Pb não promoveu alterações significativas nestas e o tratamento com insulina não alterou estes parâmetros (Tabela 8).

Por outro lado, a concentração da quimiocina CINC-1 encontrou-se elevada no grupo infectado (CPb) em relação ao grupo controle (Cs). Tal diferença não pôde ser notada nos grupos diabéticos, e o tratamento com insulina não promoveu alterações (Figura 13).

As produções das quimiocinas CINC-2 e CINC-3 não apresentaram produções significativas e seus resultados estão descritos na Tabela 9.

Figura 12 - Concentração de TNF-α em homogenato de pulmão. A coleta dos órgãos foi realizada no dia 55, 45 dias após a infecção por *P. brasiliensis*. Foram utilizados 3 animais em cada grupo, 4 nos grupos Cs e CPb+i. Os valores representam a média da concentração de TNF-α ± e.p.m. Cs (Controle + salina); CPb (Controle + *Paracoccidioides brasiliensis*); CPb+i (CPb + insulina); Ds (Diabético + salina); DPb (Diabético + *Paracoccidioides brasiliensis*); DPb+i (DPb + insulina). ♦p<0,05 vs Ds.

Tabela 8 - Dosagem de citocinas em homogenato de pulmão de camundongos diabéticos com infecção por *P. brasiliensis* e respectivos controles

Animais	IL-6 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
CS (n=4)	40,7 ± 14,1	38,7 ± 11,6	320,0 ± 32,1
CPb (n=3)	104,8 ± 8,2	66,2 ± 14,5	473,7 ± 58,4
CPb+i (n=4)	125,3 ± 48,4	81,1 ± 9,4	421,8 ± 59,0
DS (n=3)	24,7 ± 1,0	27,8 ± 1,2	291,0 ± 13,2
DPb (n=3)	69,9 ± 23,4	40,5 ± 18,3	398,8 ± 46,0
DPb+i (n=3)	66,0 ± 28,7	50,2 ± 14,7	391,8 ± 107,6

O *diabetes mellitus* foi induzido pela injeção de aloxana (60 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.t. de *P. brasiliensis*. A coleta dos órgãos foi realizada no dia 55. Os grupos CPb+i e DPb+i receberam insulina por via subcutânea diariamente durante 12 dias antes da coleta. Foram utilizados 3 animais em cada grupo, 4 nos grupos Cs e CPb+i. Os valores representam a média ± e.p.m.

Figura 13 - Concentração de CINC-1 em homogenato de pulmão. A coleta dos órgãos foi realizada no dia 55, 45 dias após a infecção por *P. brasiliensis*. Foram utilizados 3 animais em cada grupo, 4 nos grupos Cs e CPb+i. Os valores representam a média da concentração de CINC-1 $\pm$ e.p.m. Cs (Controle + salina); CPb (Controle + *Paracoccidioides brasiliensis*); CPb+i (CPb + insulina); Ds (Diabético + salina); DPb (Diabético + *Paracoccidioides brasiliensis*); DPb+i (DPb + insulina). ♣ $p < 0,05$ vs Cs.

Tabela 9 - Dosagem de quimiocinas em homogenato de pulmão de camundongos diabéticos com infecção por *P. brasiliensis* e respectivos controles

Animais	CINC-2 (pg/mL)	CINC3 (pg/mL)
CS (n=4)	215,3 $\pm$ 42,0	122,2 $\pm$ 10,8
CPb (n=3)	368,1 $\pm$ 42,2	121,9 $\pm$ 15,2
CPb+i (n=4)	475,1 $\pm$ 131,0	167,4 $\pm$ 49,0
DS (n=3)	427,1 $\pm$ 107,4	95,4 $\pm$ 6,7
DPb (n=3)	683,2 $\pm$ 221,3	125,5 $\pm$ 19,3
DPb+i (n=3)	759,6 $\pm$ 87,8	175,0 $\pm$ 42,6

O *diabetes mellitus* foi induzido pela injeção de aloxana (60 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.t. de *P. brasiliensis*. A coleta dos órgãos foi realizada no dia 55. Os grupos CPb+i e DPb+i receberam insulina por via subcutânea diariamente durante 12 dias antes da coleta. Foram utilizados 3 animais em cada grupo, 4 nos grupos Cs e CPb+i. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m.

4.3.4. Homogenato de Fígado

Nas amostras de homogenatos de fígado foram analisadas as seguintes citocinas: IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , CINC-1, CINC-2 e CINC-3, todas pela técnica de ELISA. Os resultados individuais encontram-se nas Tabela A14 e A15 do Apêndice.

No que diz respeito às citocinas, a infecção pelo fungo não promoveu alteração significativa nas concentrações tanto de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12, TNF- α) quanto de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) no fígado. Os resultados estão descritos na Tabela 10.

Quanto às quimiocinas, foram observados valores aumentados para as concentrações de CINC-1 no homogenato de fígado dos animais infectados (CPb) em relação ao grupo controle (Cs). Este aumento também esteve presente nos animais diabéticos infectados (DPb vs Ds). Em ambos os casos, porém, o tratamento com insulina pareceu reduzir a secreção desta quimiocina (Figura 14).

A análise das dosagens de CINC-2 e CINC-3 foi realizada. A infecção pelo fungo não promoveu alterações significativas nas secreções destas quimiocinas no fígado. Os resultados estão descritos na Tabela 11.

Tabela 10 - Dosagem de citocinas em homogenato de fígado de camundongos diabéticos com infecção por *P. brasiliensis* e respectivos controles

Animais	IL-6 (pg/mL)	IL-12 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
CS (n=4)	42,8 $\pm$ 14,2	82,6 $\pm$ 8,4	623,6 $\pm$ 170,9	83,1 $\pm$ 8,4	974,1 $\pm$ 304,4
CPb (n=3)	75,6 $\pm$ 27,5	98,6 $\pm$ 14,4	796,6 $\pm$ 216,9	99,0 $\pm$ 14,4	1390,8 $\pm$ 414,2
CPb+i (n=4)	142,9 $\pm$ 79,9	111,3 $\pm$ 25,0	590,4 $\pm$ 253,6	111,7 $\pm$ 25,0	1585,4 $\pm$ 392,4
DS (n=3)	72,8 $\pm$ 4,6	80,0 $\pm$ 4,3	172,3 $\pm$ 11,5	80,4 $\pm$ 4,3	983,6 $\pm$ 263,3
DPb (n=3)	63,1 $\pm$ 9,3	77,7 $\pm$ 24,8	309,5 $\pm$ 102,6	78,1 $\pm$ 24,7	639,8 $\pm$ 139,8
DPb+i (n=3)	180,2 $\pm$ 18,4	133,5 $\pm$ 33,2	388,8 $\pm$ 67,0	133,9 $\pm$ 33,2	1042,9 $\pm$ 231,3

O *diabetes mellitus* foi induzido pela injeção de aloxana (60 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.t. de *P. brasiliensis*. A coleta dos órgãos foi realizada no dia 55. Os grupos CPb+i e DPb+i receberam insulina por via subcutânea diariamente durante 12 dias antes da coleta. Foram utilizados 3 animais em cada grupo, 4 nos grupos Cs e CPb+i. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m.

Figura 14 - Concentração de CINC-1 em homogenato de fígado. A coleta dos órgãos foi realizada no dia 55, 45 dias após a infecção por *P. brasiliensis*. Foram utilizados 3 animais em cada grupo, 4 nos grupos Cs e CPb+i. Os valores representam a média da concentração de CINC-1 $\pm$ e.p.m. Cs (Controle + salina); CPb (Controle + *Paracoccidioides brasiliensis*); CPb+i (CPb + insulina); Ds (Diabético + salina); DPb (Diabético + *Paracoccidioides brasiliensis*); DPb+i (DPb + insulina). ♣p<0,01 vs Cs; ♦p<0,05 vs Ds.

Tabela 11 - Dosagem de quimiocinas em homogenato de fígado de camundongos diabéticos com infecção por *P. brasiliensis* e respectivos controles

Animais	CINC-2 (pg/mL)	CINC-3 (pg/mL)
CS (n=4)	226,4 ± 67,3	330,8 ± 27,7
CPb (n=3)	258,5 ± 94,4	330,2 ± 38,8
CPb+i (n=4)	287,2 ± 48,4	449,5 ± 128,3
DS (n=3)	194,2 ± 25,5	262,7 ± 16,9
DPb (n=3)	115,0 ± 38,0	339,4 ± 49,3
DPb+i (n=3)	185,0 ± 75,8	468,1 ± 110,9

O *diabetes mellitus* foi induzido pela injeção de aloxana (60 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.t. de *P. brasiliensis*. A coleta dos órgãos foi realizada no dia 55. Os grupos CPb+i e DPb+i receberam insulina por via subcutânea diariamente durante 12 dias antes da coleta. Foram utilizados 3 animais em cada grupo, 4 nos grupos Cs e CPb+i. Os valores representam a média ± e.p.m.

4.3.5. Homogenato de Baço

Nas amostras de homogenatos de baço foram analisadas as seguintes citocinas: IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , CINC-1, CINC-2 e CINC-3, todas pela técnica de ELISA. Os valores individuais podem ser encontrados nas Tabelas A16 e A17 do Apêndice.

Na análise das citocinas, pode-se observar que a infecção não promoveu aumento da secreção de TNF- α e IL-10 no baço, tanto nos grupos controle quanto nos diabéticos, e os resultados estão demonstrados pela Tabela 12. Não foram encontrados níveis detectáveis ($>15\text{pg/mL}$) de IL-4, IL-6 e IL-12 nestas amostras.

Analisando as concentrações de quimiocinas no baço, pode-se verificar níveis aumentados de CINC-1 em animais infectados em relação ao controle (CPb vs Cs). O aumento desta concentração não é significativa nos grupos tornados diabéticos e infectados (DPb). Além disso, o tratamento com insulina nos animais do grupo controle infectado reduziu a secreção desta quimiocina no baço, como pode-se observar na Figura 15.

Resultados demonstrados pela Tabela 13 sugerem que a infecção pelo Pb não promove modificações nas concentrações de CINC-2 e CINC-3 no baço.

Tabela 12 - Dosagem de citocinas em homogenato de baço de camundongos diabéticos com infecção por *P. brasiliensis* e respectivos controles

Animais	TNF- α (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
CS (n=4)	95,8 $\pm$ 8,0	261,8 $\pm$ 45,3
CPb (n=3)	38,8 $\pm$ 8,5	301,2 $\pm$ 18,3
CPb+i (n=4)	72,6 $\pm$ 19,4	295,0 $\pm$ 19,1
DS (n=3)	65,2 $\pm$ 23,6	195,9 $\pm$ 17,5
DPb (n=3)	55,9 $\pm$ 11,8	186,8 $\pm$ 32,4
DPb+i (n=3)	175,6* $\pm$ 54,4	491,9** $\pm$ 119,1

O *diabetes mellitus* foi induzido pela injeção de aloxana (60 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.t. de *P. brasiliensis*. A coleta dos órgãos foi realizada no dia 55. Os grupos CPb+i e DPb+i receberam insulina por via subcutânea diariamente durante 12 dias antes da coleta. Foram utilizados 3 animais em cada grupo, 4 nos grupos Cs e CPb+i. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. *p<0,05 vs DPb; **p<0,05 vs DPb.

Figura 15 - Concentração de CINC-1 em homogenato de baço. A coleta foi realizada no dia 55, 45 dias após a infecção por *P. brasiliensis*. Foram utilizados 3 animais em cada grupo, 4 nos grupos Cs e CPb+i. Os valores representam a média da concentração de CINC-1 $\pm$ e.p.m. Cs (Controle + salina); CPb (Controle + *Paracoccidioides brasiliensis*); CPb+i (CPb + insulina); Ds (Diabético + salina); DPb (Diabético + *Paracoccidioides brasiliensis*); DPb+i (DPb + insulina). ♣ p<0,01 vs Cs; ♠ p<0,05 vs CPb.

Tabela 13 - Dosagem de quimiocinas em homogenato de baço de camundongos diabéticos com infecção por *P. brasiliensis* e respectivos controles

Animais	CINC-2 (pg/mL)	CINC-3 (pg/mL)
CS (n=4)	53,9 ± 19,6	62,8 ± 4,2
CPb (n=3)	72,7 ± 12,1	63,1 ± 5,3
CPb+i (n=4)	93,6 ± 18,5	62,3 ± 7,5
DS (n=3)	82,2 ± 26,9	50,5 ± 5,2
DPb (n=3)	52,6 ± 8,5	44,8 ± 2,8
DPb+i (n=3)	183,6* ± 30,6	54,0 ± 5,5

O *diabetes mellitus* foi induzido pela injeção de aloxana (60 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.t. de *P. brasiliensis*. A coleta dos órgãos foi realizada no dia 55. Os grupos CPb+i e DPb+i receberam insulina por via subcutânea diariamente durante 12 dias antes da coleta. Foram utilizados 3 animais em cada grupo, 4 nos grupos Cs e CPb+i. Os valores representam a média ± e.p.m. *p<0,01 vs DPb.

5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesse trabalho sugerem que animais tornados diabéticos têm sua função imunológica debilitada perante o estímulo de inflamação sistêmica pelo Pb, e que a insulina é capaz de restaurar alguns destes fatores, como o infiltrado leucocitário do LPe.

O DM é um grupo de doenças de grande incidência mundial (ADA, 2015). Dentre elas, o DM1 compreende cerca de 5% a 10% do total de casos do DM e sua prevalência está aumentando (WHO, 2014). Tendo como característica a destruição das células beta pancreáticas produtoras de insulina, o DM1 é considerado uma doença autoimune, de modo que o principal tratamento para pacientes diabéticos é a administração de insulina (SBD, 2014). Estudos recentes sugerem que a DM1 promove efeitos negativos na qualidade da resposta imunológica do paciente, com baixa interação leucócito-endotélio e reduzida migração de leucócitos para o foco inflamatório (revisto por SUNAHARA *et. al*, 2012). Desse modo, pacientes com DM1 apresentam maior risco de infecções que afetam mucosas e tecidos moles, os tratos urinário e respiratório e lesões nosocomiais (PELEG *et al.*, 2006). Existe, portanto, grande importância em estudos que relacionem o estado insulinopênico característico do DM1 com o comprometimento imunológico mediante diferentes estímulos inflamatórios.

O modelo de *diabetes mellitus* experimental por aloxana se baseia no efeito citotóxico desta, que se acumula nas ilhotas pancreáticas e causa lesões irreversíveis nas células β , de modo que sua ação mediada por espécies reativas do oxigênio culmina com a lise das células levando à diabetogênese (SZKUDELSKI, 2001).

Este não é, porém, o único modelo disponível na literatura: por mecanismos similares aos da aloxana, a estreptozotocina também provoca o diabetes insulino dependente. Tanto a aloxana quanto a estreptozotocina são capazes de apresentar efeitos tóxicos, a aloxana sendo conhecida por gerar necrose das células tubulares renais quando administrada em altas doses (LENZEN *et al.*, 1996). Porém, a estreptozotocina promove toxicidade para células linfóides do baço e do timo, e essa toxicidade linfóide precede a hiperglicemia e pode ser observada mesmo em doses subdiabetogênicas (GAULTON *et al.*, 1985; WELLHAUSEN, 1986).

Considerando o objetivo deste trabalho de avaliar o efeito de insulina na resposta imunológica à infecção sistêmica, acredita-se que a alteração imunológica causada pela estreptozotocina ao causar dano ao timo venha a interferir nos resultados, de modo que a aloxana é a melhor indicada para o estudo, como pode ser observado nos resultados de concentrações de leucócitos no sangue total e nos lavados broncoalveolar e peritoneal, onde a administração da aloxana em si não promoveu alterações nestes níveis.

A dose de aloxana para indução de DM estava padronizada em 42mg/kg de animal para ratos da linhagem Wistar (MARTINS, et al., 2010a; 2010b), ou 50mg/kg 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).

Nos presentes experimentos em camundongos machos da linhagem C56BL/6, foi observado que a administração endovenosa de aloxana (60 mg/kg), levou os animais a apresentarem características do estado insulinopênico: concentrações plasmáticas elevadas de glicose e significativa redução do ganho de massa corporal, além de outros sinais característicos do DM, como aumentado consumo de água, aumento no volume urinário e relativa apatia dos animais quando comparados aos animais que receberam solução salina (controle), comprovando a eficiência na reprodução do modelo de indução de DM1.

O modelo inflamatório escolhido para este estudo foi a inflamação crônica por *Paracoccidioides brasiliensis*, fungo endêmico em países da América Latina e causador de uma micose sistêmica que corresponde à quinta causa de óbitos por doenças infecciosas, considerando as regiões Sul e Sudeste brasileiras (COUTINHO, 2002).

A resposta do sistema imunológico ao agente patológico determina a natureza e a severidade da doença. Como ocorre na maioria das infecções fúngicas, o funcionamento adequado de monócitos/macrófagos é de extrema importância para os mecanismos inatos contra o Pb (LOUIE et al., 1994; SMITH et al., 1990). Outro fator importante para a implantação do fungo no tecido pulmonar é o ambiente inflamatório em questão: a doença em progressão é caracterizada pela diminuição das citocinas da resposta Th1 (IL-12, IFN- γ , IL-2), enquanto há aumento da

produção e secreção de IL-4, IL-5 e IL-10, ou seja, a ativação de uma resposta Th2 que não será protetora ao organismo (BERNARD et al., 2001).

Para comparar a resposta inflamatória de animais saudáveis e diabéticos contra o Pb, foi realizada a injeção intratraqueal de leveduras suspensas em PBS, conforme descrito anteriormente (TABORDA et al., 1998), em uma concentração de 1×10^6 leveduras em 50 μ L (FERREIRA et al., 2007). Escolhemos realizar a infecção por Pb depois de instalado o estado diabético, para que pudesse ser avaliada evolução da mesma em ambiente insulínopênico, e então com administração da insulina.

O tratamento padronizado para pacientes com DM1 é o uso diário de injeções de insulina (SBD, 2014). A insulina é um hormônio que participa de diversos processos, sendo capaz de regular a atividade metabólica na transcrição de genes pela modulação de proteínas envolvidas na sinalização intracelular. É também de extrema importância para a função normal de células endoteliais durante o processo inflamatório (revisto por SUNAHARA et al., 2012).

Dos tipos de insulina existentes para tratamento, 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). Di Petta e colaboradores (2011) e Anjos-Vallota e colaboradores (2006), observaram em seus estudos que, em modelos murinos, o tratamento com múltiplas doses de insulina provou ser mais eficaz para que se pudesse observar seus efeitos sobre inflamações crônicas em animais diabéticos. Neste protocolo foi realizado um tratamento diário de 12 dias, no período da noite, devido aos hábitos noturnos e metabolismo mais acelerado dos camundongos. A dose de insulina administrada a cada camundongo seguiu o protocolo padronizado por Spiller (2012) para que a insulina estivesse presente sem tornar os animais normoglicêmicos. Desse modo, os animais receberam dosagens relativas aos seus níveis glicêmicos (1UI de insulina / 300mg/dL de glicose).

Durante o tratamento com insulina, foram observadas mudanças nos animais diabéticos que recebiam o tratamento, como, por exemplo, a redução do consumo de água e a redução do volume urinário.

Nas amostras obtidas 45 dias após a infecção pelo fungo (55 dias após indução do DM), pode-se observar que as características do diabetes se mantiveram durante todo o tempo de incubação do fungo, de modo que se manteve a hiperglicemia dos grupos diabéticos e a redução no ganho de massa foi mais

evidente. Ou seja, o ambiente insulínopênico causado pelo DM1 se manteve durante toda a incubação do fungo.

Pode-se verificar que a infecção do fungo em si não apresentou alterações nos níveis glicêmicos dos animais do experimento, controles ou diabéticos. Os resultados sugerem, porém, que o ganho de peso em animais diabéticos infectados por Pb possa ser ainda mais reduzida.

O tratamento com insulina não alterou os níveis glicêmicos dos animais não diabéticos (CPb+i), o que condiz com o protocolo adotado, uma vez que a dose de insulina administrada nestes animais era bastante menor do que a dose administrada a diabéticos. Nos animais diabéticos, porém, a atividade da insulina foi evidente: seus níveis de glicose sanguínea foram consideravelmente reduzidos, embora os animais se mantivessem hiperglicêmicos (glicose > 300mg/dL). Além disso, animais diabéticos que receberam o tratamento de 12 doses consecutivas de insulina tiveram significativo aumento no ganho de peso durante o período de tratamento, diferente do que aconteceu com os animais diabéticos não tratados, com ou sem a infecção do fungo. Este resultado nos permite sugerir que a insulina, ainda que administrada em doses subterapêuticas que não restauram a normoglicemia, foi capaz de melhorar o estado metabólico e energético dos animais diabéticos.

Nestes experimentos, observou-se aumento na concentração de leucócitos no sangue de animais infectados pelo fungo, tanto animais controles quanto diabéticos, indicando um possível quadro inflamatório. O aumento de leucócitos causado pelo fungo também estava presente, de forma mais significativa, nos LBA e LPe. Porém, não houve aumento de leucócitos nos LPe e LBA de animais diabéticos. O resultado parece concordar com os obtidos pelo modelo de inflamação induzida por LPS em ratos diabéticos, onde houve redução da migração dos leucócitos devido à redução das moléculas de adesão causada pela DM (DE OLIVEIRA MARTINS, 2006). Neste modelo, a insulina foi capaz de restaurar a migração de leucócitos para o foco peritoneal dos animais diabéticos, mas o mesmo não ocorreu no LBA, onde as concentrações de leucócitos permaneceram baixas mesmo nos animais que receberam o tratamento.

Outro dos efeitos observados na presença da infecção por Pb foi aumento das concentrações de TNF- α no tecido pulmonar, tanto de animais controle quanto de animais infectados pelo fungo. O TNF- α é uma citocina que está diretamente

relacionada com a função macrofágica em modelos de PCM humano e experimental, pois é capaz de promover a formação de granulomas e modular a atividade fungicida dos macrófagos (FORTES et al., 2011; PARISE-FORTES et al., 2000). O tratamento de insulina não promoveu alterações nestes níveis.

Além disso, no mesmo tecido, foram encontrados níveis aumentados de IL-4 e IL-10 nos animais infectados (tanto diabéticos quanto não-diabéticos) em relação aos controles. Tais resultados não apresentaram relevância estatística, possivelmente pelo reduzido número de amostras, mas sugerem a formação de um ambiente anti-inflamatório imposto pelo fungo como mecanismo de escape à resposta Th1.

O aumento significativo da quimiocina CINC-1 foi observado em homogenatos de pulmões, baços e fígados de animais infectados pelo Pb. O CINC-1 é conhecido como um potente fator quimiotático que age na resposta imunológica para recrutamento de neutrófilos para o foco intersticial mediante estímulo inflamatório por TNF- α (WATANABE et al., 1989). Em animais diabéticos, a concentração desta quimiocina foi encontrada um pouco reduzida no fígado e bastante reduzida no baço. Em ambos os casos, o tratamento com insulina não aumentou as secreções de CINC-1 em animais diabéticos. Pelo contrário, reduziu a concentração desta no baço de animais não diabéticos do grupo infectado.

Os resultados obtidos neste estudo nos permitem sugerir que a insulina teve efeitos moduladores sobre a concentração de leucócitos no lavado peritoneal de animais diabéticos infectados por *Paracoccidioides brasiliensis*, mas não promoveu o mesmo efeito em outros focos da infecção, como o pulmão e o baço.

6. RESUMO DOS RESULTADOS

Na vigência da micose sistêmica induzida por *Paracoccidioides brasiliensis*, verificou-se que:

- 1) Os camundongos diabéticos apresentaram redução nas concentrações de leucócitos no LPe. O tratamento destes animais com insulina corrigiu a concentração de leucócitos do LPe, mesmo sem normalizar a glicemia.
- 2) Animais diabéticos também apresentaram redução da concentração de leucócitos no LBA e da concentração de CINC-1 nos homogenatos de baço. Nestes casos, o tratamento com insulina não promoveu restauração dos níveis.
- 3) A insulina melhorou o estado metabólico dos animais diabéticos, evidenciado pelo ganho de peso nos animais que receberam o tratamento.

7. CONCLUSÃO

Os dados sugerem que a insulina modula a produção/liberação de citocinas durante o curso da paracoccidioidomicose, sem restaurar a migração de leucócitos para o LBA de animais diabéticos, mas aumentando a presença destes no LPe.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBA-LOUREIRO, T.C.; HIRABARA, S.M.; MENDONÇA, J.R.; CURI, R. PITHON-CURI, T.C. Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils. *The Journal of Endocrinology*, 188(2):295-303, 2006.
- ALMEIDA, F.B.R.; CARVALHO, F.C.; MARIANO, V.S.; ALEGRE, A.C.P.; SILVA, R.D.N. et al. Influence of N-Glycosylation on the Morphogenesis and Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* and on the Biological Activities of Yeast Proteins. *PLoS ONE*. 6(12): e29216, 2011.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes – 2015. *Diabetes Care*. v. 35, s.1, p. S11 – S63, 2015.
- 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. *Inflamm. Res.*, 55: 16-22, 2006.
- ARISTIZABAL, B.H.; KARL, V.C.; DAVID, A.S.; RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. *Infect. Immun.*66: 5587-5591, 1998.
- ARRUDA, C.; KASHINO, S.S.; FAZIOLI, R.A.; CALICH, V.L.G. A primary subcutaneous infection with *Paracoccidioides brasiliensis* leads to immunoprotection or exacerbated disease depending on the route of challenge. *Microbes and Infection*. 9:308-316, 2007.
- 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
- BENSINGER, J.S. & TONTONNOZ, P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature*. 454, 2008.

- BERNARD, G.; HONG, M.A.; DEL NEGRO, G.M.; BATISTA, L.; SHIKANAI-YATSUDA, M.A.; DUARTE, A.J. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am J Med Hyg.* 54: 7-12, 1996.
- BERNARD, G.; ROMANO, C.C.; CACERE, C.R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANNINI, M.J.; DUARTE, A.J. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 13:248-52, 2001.
- BISINELLI, J.C.; FERREIRA, M.L.S. Doenças infecciosas: paracoccidioidomicose (blastomicose sul-americana). In: TOMMASI, A.F. Diagnóstico em patologia bucal. 3ª ed. São Paulo: Pancast. p. 202-9, 2002.
- BRITTO, T.; FURTADO, J.S.; CASTRO, R.M.; MANINI, M. Intraepithelial parasitism as an infection mechanism in human paracoccidioidomycosis. *Vir Arch Path Anat*, v. 36: 129-138, 1973.
- BRUMMER, E.; HANSON, L.H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A.; *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN- for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis* *J. Immunol.* 140:2786-2789, 1988.
- BRUMMER, E.; HANSON, L.H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A.; Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect. Immun.* 57:2289-2294, 1989.
- CALICH, V.L.G.; BLOTTA, M.H.S.L. Pulmonary paracoccidioidomycosis. In Fidel, P.L.; Huffnagle, G.B. *Fungal Immunity: From an Organ Perspective*. New York: Springer. 201-228, 2005.
- CANO, L.E.; GÓMEZ, B.; BRUMMER, E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. Inhibitory effect of deferoxamine or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin. *Infect. Immun.* 62,1494-1496, 1994.

- CANO, L.E.; BRUMMER, E.; STEVENS, D.A.; RESTREPO, A. Fate of conidia of *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine-treated macrophages. *Infect. Immun.* 60:2096-2100, 1992.
- CAVASSANI, K.A.; TRISTAO, F.S.M.; OLIVEIRA, L.L.; ROCHA, F.A.; VANCIM, J.O. et al. Cell-Free Antigens from *Paracoccidioides brasiliensis* Drive IL-4 Production and Increase the Severity of Paracoccidioidomycosis. *PLoS ONE* 6(6): e21423, 2011.
- CHIARELLA, A.P.; ARRUDA, C.; PINA, A.; COSTA, T.A.; FERREIRA, R.C.V.; CALICH, V.L.G. The relative importance of CD4 and CD8 T cells in immunity to pulmonary paracoccidioidomycosis. *Microbes and Infections.* 9:1078-1088, 2007.
- COSTA-ROSA, L.F.B.P.; SAFI, D.A.; CURY, Y.; CURI, R. The effect of insulin on macrophage metabolism and function. *Cell Biochemistry and Function*, 14:33-42, 1996.
- COUTINHO SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R.M.; SABROZA, P.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brasil (1980-1995). *Cad Saúde Pub.* 18(5): 1441-1454, 2002.
- DIAS, J. C. R.; CAMPOS, J. A. D. B. *Diabetes mellitus: razão de prevalências nas diferentes regiões geográficas no Brasil, 2002-2007. Ciência & Saúde Coletiva.* 17(1): 239- 44, 2012.
- DE OLIVEIRA MARTINS, J.; MEYER-PFLUNG, A.R.; ALBA-LOUREIRO, T.C.; MELBOSTAD, H.; COSTA DA CRUZ, J.W.; COIMBRA, R.; CURI, R.; SANNOMIYA, P. Modulation of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation: Role of insulin. *Shock*, 25:428, 2006.
- DI PETTA, A.; GRECO, K. V.; CASTRO, E. O.; LOPES, F. D. T. Q. S.; MARTINS, M. A.; CAPELOZZI, V. L. et al. Insulin modulates inflammatory and repair responses to elastase-induced emphysema in diabetic rats. *Int J Exp Path.* 92: 392-9, 2011.
- DUNN, J. S.; McLETCHIE, N. G. B. Experimental alloxan diabetes in the rat. *Lancet.* v.245, p.384–387, 1943.

- FERRACINI, M.; MARTINS, J. O.; CAMPOS, M. R. M.; ANGER, D. B. C.; JANCAR, S. Impaired phagocytosis by alveolar macrophages from diabetic rats is related to the deficient coupling of LTs to the Fc γ R signaling cascade. *Mol. Immunol.* 47: 1974-80, 2010.
- FERREIRA, K.S.; BASTOS, K.R.; RUSSO, M.; ALMEIRA, S.R. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin-10 production and Toll-like Receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. *Jor. Infect. Dis.*, 196.: 1108-1115, 2007.
- FORTES, M.R.P.; MIOT, H.A.; KUROKAWA, C.S.; MARQUES, M.E.A.M.; MARQUES, S.A. Imunologia da paracoccidioidomicose. *An. Bras. Dermatol.* 86(3), 2011.
- FRANCO, M. Host parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.*, v. 25, p. 5-18, 1986.
- FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages and inflammation. *Curr Targets Inflamm Allergy.* 4(3):281-6, 2005.
- 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(10): 769-775, 1985.
- GIRALDO, R.; RESTREPO, A.; GUTIERREZ, F.; ROBLEDO, M.; LONDONO, F.; HERNANDEZ, H.; SIERRA, F.; CALLE, G. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. *Mycopathologia*, 58: 63-70, 1976.
- GONZALEZ, A.; ARISTIZABAL, B.H.; GOMEZ, E.C.; RESTREPO, A.; CANO, L.E. Short report: Inhibition by tumor necrosis factor--activated macrophages of the transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells through a mechanism independent of nitric oxide *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71,828-830, 2004.
- GONZALEZ, A.; de GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L.E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect. Immun.* 68: 2546-2552, 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.
- HERNANDEZ RUIZ, O.; GONZALEZ, A.; ALMEIDA, A.J.; TAMAYO, D.; GARCIA, A.M. et al. Alternative Oxidase Mediates Pathogen Resistance in *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 5(10): e1353, 2011.
- HERTZOG, P. A Notch in the Toll Belt. *J Immunity*. 10:663-665, 2008.
- HUFFNAGLE, G.G.; DEEPE, G.S. Innate and adaptative determinants of host susceptibility to medically important fungi. *Curr Opin Microbiol*. 6: 344-350, 2003.
- IMAYAMA, I.; PLOTNIKOFF, R.C.; COURNEYA, K.S.; JOHNSON, J.A. Determinants of quality of life in adults with type 1 and type 2 diabetes. *Health Qual Life Outcomes*. 9:115 doi:10.1186/1477-7525-9-115, 2011.
- INTERNATIONAL DIABETES FOUNDATION. IDF Diabetes atlas. 6a edição, 2013. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org>>. Acesso em: 17 jun, 2014.
- JOSHI, N.; CAPUTO, G.M.; WEITEKAMP, M.R.; KARCHMER, A.W. Infections in patients with diabetes mellitus. *New England J Med*, 341(25):1906-12, 1999.
- KASHINO, S.S.; FAZIOLLI, R.A.; CAFALLI-FAVATI, I.C.; MELONI-BRUNERI, L.H.; VAZ, C.A.; BURGER, E.; SINGER, L.M.; CALICH, V.L. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. *J. Interferon Cytokine Res*. 20:89–97, 2000.
- KRISTEN, V.R. Caracterização do modelo experimental NOD (nonobese diabetic) em ambiente convencional. *Dissertação de Mestrado*. 2006.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Inflamação aguda e crônica. In: Robbins & Cotran – *Bases Patológicas das Doenças*. São Paulo, Editora Elsevier. 8ª edição, 2010.

- KUMAR, S.; SINGH, R.; VASUDEVA, N.; SHARMA, S. Acute and chronic animal models for the evaluation of anti-diabetic agentes. *Cardiovasc Diabetol.* 2012; 11:9. Disponível em: <http://www.cardiab.com/content/11/1/9>. Acesso em: 8 de janeiro de 2014.
- KVIETYS, P.; NEIL GRANGER, D. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radical Biology & Medicine.* 52: 556-592, 2012.
- LACAZ, C.S. Historical evolution of the knowledge on *Paracoccidioides brasiliensis*. In Franco MF, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. Nova York: CRC Press; 1994.
- LAZERA, C.Z.S.D. et al. Mortalidade por paracoccidioidomicose: Brasil 1980-1995. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA. Rio de Janeiro. Brasil. São Paulo: Sociedade Brasileiro de Micologia. 1998.
- 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 clínico e laboratorial. *Acta Cirur Bras.* 18(2): 132-142, 2003.
- LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 51(2): 216-26, 2008.
- LIEW, F.Y.; XU, D.; BRINT, E.K.; O'NEILL, L.A. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol.* 5:446-458, 2005.
- LOUIE, A.; BALTCH, A.L.; SMITH, R.P.; FRANKE, M.A.; RITZ, W.J.; SINGH, J.K.; GORDON, M.A. Tumor necrosis factor alpha has a protective role in murine model of systemic candidiasis. *Infect. Immun.* 62: 2761-2772, 1994.
- MAGALHÃES, A.; FERREIRA, K.S.; ALMEIDA, S.R.; NOSANCHUK, J.D.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. Prophylactic and Therapeutic Vaccination Using Dendritic Cells Primed with Peptide 10 Derived from the 43-Kilodalton Glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin. Vaccine Immunol.* 19(1):23. DOI: 10.1128/CVI.05414-11, 2012.

- MARQUES, A.S. Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. *An Bras Dermatol.* 78:135-50, 2003.
- MARTINS, J.O.; FERRACINI, M.; RAVANELLI, N.; LANDGRAF, R.G.; JANCAR, S. Insulin inhibits LPS-induced signaling pathways in alveolar macrophages. *Cell Physiol Biochem*, 21: 297-304, 2008a.
- MARTINS, J.O.; FERRACINI, M.; RAVANELLI, N.; LANDGRAF, R.G.; JANCAR, S. Insulin Suppresses LPS-Induced iNOS and COX-2 Expression and NF-kB Activation In Alveolar Macrophages. *Cell Physiol Biochem*, 22: 279-86, 2008b.
- MARTINS, J.O.; ZANONI, F.L.; MARTINS, D.O.; COIMBRA, R.; KRIEGER, J.E.; JANCAR, S.; SANNOMIYA, P. Insulin regulates cytokines and intercellular adhesion molecule-1 gene expression through NF-kappaB activation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. *Shock* 31, 404-409, 2009.
- MARTINS, J. O.; FERRACINI, M.; ANGER, D. B. C.; MARTINS, D. O.; RIBEIRO JR, L. F.; SANNOMIYA, P.; JANCAR, S. Signaling pathways and mediators in LPS-induced lung inflammation in diabetic rats: Role of insulin. *Shock*, 33(1): 76-82, 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.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. 91: 295-308, 1997.
- 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.
- MOUTZOURI, A.G.; ATHANASSIOU, G.A.; DIMITROPOULOU, D.; SKOUTELIS, A.T.; GOGOS, C.A. Severe sepsis and diabetes mellitus have additive effects on red blood cell deformability. *J Infect*, 57:147-51, 2008.

- MULLER, W.A. Mechanisms of Transendothelial Migration of Leukocytes. *Circ Res.* 105: 223-230, 2009.
- OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e dor. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 61(2): 255-265, 2011.
- PANNEERSELVAM, S. & GOVINDASAMY, S. Sodium molybdate improves the phagocytic function in alloxan-induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 145(2):159-63, 2003.
- PARISE-FORTES, M.R.; DA SILVA, M.F.; SUGIZAKI, M.F.; DEFAVERI, J.; MONTENEGRO, M.R.; SOARES, A.M. et al. Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. *Med Mycol.* 38:51-60, 2000,
- 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.
- 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.
- PESCHKE, E.; EBELT, H.; BRÖMME, H. J.; PESCHKE, D. 'Classical' and 'new' diabetogens - comparison of their effects on isolated rat pancreatic islets *in vitro*. *Cell Mol Life Sci.* 57(1): 158-64, 2000.
- RESTREPO, A.; SALAZAR, M.E.; CANO, L.E.; STOVER, E.P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D.A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* v. 46, p.346-353, 1984.
- ROHILLA, A.; ALI, S. Alloxan induced diabetes: Mechanisms and effects. *Int J Res Pharmac Biomed Sci.* 3(2): 819-23, 2012.
- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol.* 4:1-23, 2004.

- 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.
- SMITH, J.G.; MAGEE, D.M.; WILLIAMS, D.M.; GRAYBILL, J.R. Tumor necrosis factor alpha plays a role in host defense against *Histoplasma capsulatum*. *J. Infect. Dis.* 162: 1349-1353, 1990.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo, SP, 2014-2015.
- 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(6):1584-91, 2012.
- SUNAHARA, K.K.S.; MARTINS, J.O. Alveolar macrophages in diabetes: friends or foes? *J Leuk Biol.* 91 doi:10.1189/jlb.0911488, 2012.
- SUNAHARA, K.K.S.; SANNOMIYA, P.; MARTINS, J.O. Briefs on Insulin and Innate Immune Response. *Cell Physiol Biochem*, 29:01-08, 2012.
- SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 50(6): 536-46, 2001.
- TABORDA, C.P.; JULIANO, M.A.; PUCCIA, R.; FRANCO, M.; TRAVASSOS, L.R. Mapping of the T-Cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. *Infect. and Immun*, 66(2): 786-793, 1998.
- TEIXEIRA, M.M.; THEODORO, R.C.; OLIVEIRA, F.F.; et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov: biological and clinical implications. *Med Mycol.* Jan;52(1):19-28, 2014.
- THEODORO, R.C.; CANDEIAS, J.M.G.; ARAÚJO Jr., J.P. et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol.* 43:725-9, 2005.
- TWIGG, H.L. Macrophages in innate and acquired immunity. *Sem Resp Crit CareMed.* 25:21-31, 2004.

- VAN BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M. G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev.* 91(1): 79-118, 2011.
- WANKE, B.; LONDERO A.T. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection. In: Franco, M.; Lacaz, C.S.; Restrepo-Moreno, Del Negro, G. eds. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press. 109-20, 1994.
- WATANABE, K.; KINOSHITA, S.; NAKAGAWA, H. Purification and characterization of cytokine-induced neutrophil chemoattractant produced by epithelioid cell line of normal rat kidney (NRK-52E cell). *Biochem Biophys Res Commun* 161:1093–1099, 1989.
- WELLHAUSEN, S. R. Definition of streptozocin toxicity for primary lymphoidal tissues. *Diabetes.* 35(12): 1404-11, 1986.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on noncommunicable diseases 2014. World Health Organization, 2014a. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf. Acesso em 3 de março de 2015.
- ZHANG, Q.; WANG, C.; LIU, Z.; LIU, X.; CHAOFENG, H.; CAO, X.; LI, N. Notch signal suppresses TLR-triggered inflammatory responses in macrophages by inhibiting ERK1/2-mediated NF- κ B activation. *J Biol Chem.* 287:6208-6217, 2011.

ANEXOS

Anexo I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 702013

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP) CERTIFICA que o Projeto de Pesquisa **"Efeitos da insulina em micose sistêmica causada por Paracoccidioides brasiliensis"** (Protocolo CEUA/FCF/421), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Felipe Beccaria Casagrande**, sob orientação/supervisão do(a) **Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de 10 de junho de 2013.

São Paulo, 16 de agosto de 2013.

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

APÊNDICE

Tabela A1. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes às Figuras 4 e 5 na Caracterização do modelo de DM de acordo com a variação de glicemia e peso, da seção Resultados.

Glicemia e Variação de Peso de animais após 10 dias do tratamento com aloxana				
	Glicemia (mg/dL)		Variação de Peso (g)	
	Controles	Diabéticos	Controles	Diabéticos
Animal 1	135	562	1,09	0,4
Animal 2	160	522	1,32	1,16
Animal 3	160	600	0,88	-0,72
Animal 4	182	600	1,41	0,29
Animal 5	179	600	2,28	-0,13
Animal 6	178	600	2,44	-0,56
Animal 7	186	497	1,36	1,09
Animal 8	207	519	5,19	2,48
Animal 9	154	504	1,58	0,69
Animal 10	160	509	2,59	0,32
Animal 11	158	600	1,56	1,39
Animal 12	242	600	4,24	1,94
Animal 13	230	600	4,75	2,51
Animal 14	233	511	6,27	1,85
Animal 15	182	577	1,85	0,89
Animal 16	181	600	1,83	1,59
Animal 17	219	600	4,53	-1,88
Animal 18	238	600	5,14	0,71
Animal 19	242	600	2,59	1,17
Animal 20	209	600	5,8	2,29
Média	191,75	570,05	2,94	0,87
DP	33,34	41,49	1,76	1,13
EPM	7,46	9,28	0,39	0,25

Tabela A2. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à Figura 6 na Caracterização do modelo de DM de acordo com a variação de glicemia e peso, da seção Resultados.

Glicemia (mg/dL) de animais controles e diabéticos após 55 dias da administração de aloxana (45 dias após infecção com <i>P. brasiliensis</i>)						
	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	157	152	115	301	405	407
Animal 2	156	133	68	440	600	356
Animal 3	150	161	148	600	600	238
Animal 4	162	145	139	380	550	233
Animal 5	151	164	137	590	583	384
Média	155,2	151,0	121,4	462,2	547,6	323,6
DP	4,9	12,6	32,2	130,9	82,3	82,5
EPM	2,2	5,6	14,4	58,6	36,8	36,9

Tabela A3. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à Figura 7 na Caracterização do modelo de DM de acordo com a variação de glicemia e peso, da seção Resultados.

Variação de Peso (g) de animais controles e diabéticos após 55 dias da administração de aloxana (45 dias após infecção com <i>P. brasiliensis</i>)						
	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	8	6,4	5,1	1,7	1,9	3,4
Animal 2	3,8	4,9	11,2	1,6	-1,4	6,2
Animal 3	7,2	4,4	10,4	1,9	0,6	8,1
Animal 4	5,3	10,8	6,2	6,5	-0,1	7,0
Animal 5	6,7	12,5	9,9	3,2	3,7	7,2
Média	6,2	7,8	8,6	3,0	0,9	6,4
DP	1,7	3,6	2,7	2,1	2,0	1,8
EPM	0,8	1,6	1,2	0,9	0,9	0,8

Tabela A4. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à Figura 8 do Tratamento de insulina, da seção Resultados.

Níveis de insulina (pg/mL) de animais controles e diabéticos, 55 dias após administração de aloxana e tratamento diário de insulina por 12 dias.						
	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	321,7	448,6	576,3	ND	ND	402,1
Animal 2	179,5	108,8	1324,1	ND	116,5	411,3
Animal 3	228,4	545,9	1414,3	ND	ND	458,0
Animal 4	124,3	195,7	525,9	ND	ND	1256,1
Animal 5	496,5	287,1	NR	ND	55,6	1433,1
Média	270,0	317,2	960,1	-	86,1	792,1
DP	145,9	179,4	474,2	-	43,1	508,7
EPM	65,2	80,2	212,1	-	30,5	227,5

ND: não detectável.

NR: Não Realizado

Tabela A5. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à Tabela 2 do Modelo de infecção intratraqueal pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, da seção Resultados.

Contagem Total de Hemácias (células x 10 ⁶ /mm ³)						
	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	9,1	10,2	12,1	10,7	8,1	9,2
Animal 2	9,9	7,9	7,5	9,8	8,9	9,0
Animal 3	9,5	8,3	8,1	8,7	9,7	9,2
Animal 4	10,6	8,2	9,9	8,3	9,0	9,6
Animal 5	8,5	8,7	9,0	8,7	9,1	9,3
Média	9,5	8,7	9,3	9,2	8,9	9,3
DP	0,8	0,9	1,8	1,0	0,6	0,2
EPM	0,4	0,4	0,8	0,5	0,3	0,1
Dosagem de Hemoglobina (mg/dL)						
	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	14,1	14,8	18,4	15,6	12,8	14,7
Animal 2	14,7	12,4	11,2	15,4	13,4	13,7
Animal 3	14,7	12,7	12,2	13	13,8	14,3
Animal 4	15,4	13	14,9	13	14,3	14
Animal 5	13,5	13,5	13,9	13,3	13,8	14,9
Média	14,5	13,3	14,1	14,1	13,6	14,3
DP	0,7	0,9	2,8	1,3	0,6	0,5
EPM	0,3	0,4	1,3	0,6	0,3	0,2
Hematócrito (%)						
	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	41,3	46,8	55,5	49,7	40,6	45,6
Animal 2	43,2	35,4	38,2	44,9	38,9	43,4
Animal 3	44,1	38,2	41,2	42	47,9	49
Animal 4	47,6	44,8	47,3	42,3	42,7	46,5
Animal 5	43,9	45,7	45,1	44,6	48,6	49,2
Média	44,0	42,2	45,5	44,7	43,7	46,7
DP	2,3	5,1	6,6	3,1	4,3	2,4
EPM	1,0	2,3	3,0	1,4	1,9	1,1
Contagem de Plaquetas (x 10 ⁶ /mm ³)						
	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	690	765	744	888	830	884
Animal 2	535	966	816	603	926	868
Animal 3	838	1045	894	827	1040	753
Animal 4	762	702	655	342	894	320
Animal 5	770	645	691	800	742	954
Média	719	824,6	760	692	886,4	755,8
DP	115,4	172,8	96,4	222,9	111,0	254,1
EPM	51,6	77,3	43,1	99,7	49,6	113,6

Tabela A6. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à Tabela 3 e à Figura 9 do Modelo de infecção intratraqueal pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, da seção Resultados.

Contagem de Leucócitos em sangue (cél/mm³)						
	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	3300	7000	7700	2200	6200	3500
Animal 2	3000	3200	1000	3300	4200	6300
Animal 3	2400	3600	3800	1200	3000	3800
Animal 4	3200	2800	3000	3400	4500	3800
Animal 5	2200	2100	2900	2100	5100	3200
Média	2820	3740	3680	2440	4600	4120
DP	492	1905	2471	918	1177	1244
EPM	174	852	1105	375	480	470

Tabela A7. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à Figura 10 do Modelo de infecção intratraqueal pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, da seção Resultados.

Contagem total de leucócitos no lavado Broncoalveolar ($\times 10^6/\text{mm}^3$)						
	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	0,51	1,71	1,02	0,79	0,83	0,84
Animal 2	0,66	2,40	1,16	1,22	1,90	0,87
Animal 3	0,38	1,08	0,97	0,11	0,52	0,64
Animal 4	0,69	1,70	1,50	0,26	0,56	0,52
Animal 5	0,34	0,60	0,94	0,18	0,64	0,34
Média	0,52	1,50	1,12	0,51	0,89	0,64
DP	0,16	0,69	0,23	0,48	0,58	0,22
EPM	0,07	0,31	0,10	0,21	0,26	0,10
Contagem diferencial de Polimorfonucleados ($\times 10^6/\text{mm}^3$)						
	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	0,01	0,09	0,02	0,01	0,02	0,03
Animal 2	0,02	0,00	0,03	0,05	0,06	0,03
Animal 3	0,00	0,00	0,05	0,01	0,02	0,01
Animal 4	0,06	0,07	0,02	0,02	0,02	0,02
Animal 5	0,01	0,02	0,00	0,01	0,01	0,01
Média	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02
DP	0,02	0,04	0,02	0,02	0,02	0,01
EPM	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00
Contagem diferencial de Mononucleados ($\times 10^6/\text{mm}^3$)						
	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	0,50	1,62	1,00	0,78	0,81	0,33
Animal 2	0,64	2,40	1,13	1,17	1,84	0,84
Animal 3	0,38	1,08	0,92	0,11	0,50	0,63
Animal 4	0,63	1,63	1,49	0,24	0,54	0,50
Animal 5	0,33	0,58	0,94	0,17	0,63	0,24
Média	0,49	1,46	1,09	0,49	0,87	0,51
DP	0,14	0,68	0,23	0,46	0,56	0,24
EPM	0,06	0,30	0,10	0,21	0,25	0,11

Tabela A8. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à Figura 10 do Modelo de infecção intratraqueal pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, da seção Resultados.

Contagem de leucócitos no lavado Peritoneal ($\times 10^6/\text{mm}^3$)						
	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	0,83	2,20	1,53	1,12	1,40	0,94
Animal 2	1,01	2,04	1,12	1,17	1,21	2,78
Animal 3	1,24	2,80	1,43	0,67	0,75	2,67
Animal 4	1,31	1,50	1,63	1,44	1,51	2,71
Animal 5	1,27	2,30	2,48	1,20	1,53	1,37
Média	1,13	2,17	1,64	1,12	1,28	2,09
DP	0,20	0,47	0,51	0,28	0,32	0,87
EPM	0,09	0,21	0,23	0,13	0,14	0,39
Contagem diferencial de Polimorfonucleados ($\times 10^6/\text{mm}^3$)						
	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	0,11	0,20	0,32	0,11	0,15	0,09
Animal 2	0,01	0,31	0,17	0,09	0,09	0,28
Animal 3	0,10	0,25	0,14	0,04	0,06	0,21
Animal 4	0,12	0,15	0,15	0,14	0,15	0,21
Animal 5	0,06	0,25	0,20	0,10	0,09	0,10
Média	0,08	0,23	0,20	0,10	0,11	0,18
DP	0,04	0,06	0,07	0,04	0,04	0,09
EPM	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,04
Contagem diferencial de Mononucleados ($\times 10^6/\text{mm}^3$)						
	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	0,72	2,00	1,21	0,91	1,25	0,86
Animal 2	1,00	1,73	0,95	1,08	1,13	2,50
Animal 3	1,14	2,55	1,29	0,63	0,69	2,46
Animal 4	1,19	1,35	1,48	1,30	1,36	2,49
Animal 5	1,20	2,05	2,28	1,10	1,44	1,27
Média	1,05	1,94	1,44	1,00	1,17	1,92
DP	0,20	0,44	0,51	0,25	0,29	0,79
EPM	0,09	0,20	0,23	0,11	0,13	0,35

Tabela A9. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à Tabela 4 da Análise de citocinas, da seção Resultados.

Citocinas do lavado broncoalveolar de camundongos controles e diabéticos infectados por <i>P. brasiliensis</i> e tratados com insulina						
TNF-α (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	179,8	325,1	48,4	113,8	26,7	70,1
Animal 2	168,7	91,9	336,4	102,8	37,5	213,0
Animal 3	146,7	26,7	91,9	ND	102,8	268,8
Animal 4	91,9	168,7	190,9	102,8	NR	113,8
Animal 5	81,0	213,0	135,7	190,9	NR	91,9
Média	133,6	165,1	160,7	102,1	55,7	151,5
DP	44,9	114,5	111,5	67,9	41,2	85,4
EPM	20,1	51,2	49,9	30,4	18,4	38,2
IL-12 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	19,8	33,4	26,0	27,0	18,1	22,4
Animal 2	25,1	19,8	36,2	22,4	15,5	25,1
Animal 3	18,1	16,4	25,1	21,5	28,7	21,5
Animal 4	17,2	35,3	27,8	20,6	19,8	18,1
Animal 5	26,0	39,1	20,6	27,8	18,9	31,5
Média	21,2	28,8	27,1	23,9	20,2	23,7
DP	4,1	10,1	5,7	3,3	5,0	5,0
EPM	1,8	4,5	2,6	1,5	2,3	2,6
IL-10 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	324,7	484,6	123,8	288,8	85,9	142,5
Animal 2	252,7	216,3	852,0	324,7	123,8	360,5
Animal 3	161,1	85,9	234,5	123,8	288,8	396,1
Animal 4	306,8	431,6	288,8	179,6	306,8	142,5
Animal 5	270,8	467,0	396,1	234,5	ND	179,6
Média	263,2	337,1	379,0	230,3	161,1	244,3
DP	63,8	177,0	282,0	81,0	132,8	123,9
EPM	28,5	79,1	126,1	36,2	59,4	55,4
IL-4 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	24,7	37,0	15,0	22,2	10,4	22,2
Animal 2	22,2	23,1	71,9	23,1	17,3	32,5
Animal 3	37,9	12,7	16,5	46,3	21,4	17,3
Animal 4	18,9	34,3	20,6	27,3	27,3	14,2
Animal 5	22,2	34,3	25,6	16,5	11,2	14,2
Média	25,2	28,3	29,9	27,1	17,5	20,1
DP	7,4	10,3	23,8	11,4	7,1	7,7
EPM	3,3	4,6	10,7	5,1	3,2	3,4

Tabela A10. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à Tabela 5 da Análise de citocinas do LBA, da seção Resultados.

Quimiocinas do lavado broncoalveolar de camundongos controles e diabéticos infectados por <i>P. brasiliensis</i> e tratados com insulina						
CINC-1 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	139,5	137,0	200,5	76,0	96,8	148,2
Animal 2	92,9	86,5	207,7	142,0	166,5	112,0
Animal 3	186,0	68,1	98,1	40,8	104,4	161,7
Animal 4	146,9	206,5	82,6	142,0	101,9	61,4
Animal 5	118,3	124,6	73,4	78,7	60,1	160,4
Média	136,7	124,6	132,5	95,9	105,9	128,7
DP	34,6	53,6	66,1	44,7	38,3	42,6
EPM	15,5	24,0	29,5	20,0	17,1	19,1
CINC-2 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	676,4	818,7	818,7	676,4	367,8	279,15
Animal 2	442,3	676,4	1063,4	442,3	ND	624,02
Animal 3	442,3	568,3	367,8	367,8	624,0	773,30
Animal 4	442,3	624,0	726,0	279,2	442,3	367,83
Animal 5	279,4	624,0	1063,4	442,3	442,3	862,55
Média	456,5	662,3	807,9	441,6	375,3	581,37
DP	141,8	95,4	287,7	147,4	230,1	252,32
EPM	63,4	42,7	128,7	65,9	102,9	112,84

Tabela A11. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes às Tabelas 6 e 7 da Análise de citocinas do LPe, da seção Resultados.

Citocinas e quimiocinas do lavado peritoneal de camundongos controles e diabéticos infectados por <i>P. brasiliensis</i> e tratados com insulina						
IL-10 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	206,2	1580,8	244,0	963,5	747,5	ND
Animal 2	555,3	ND	ND	ND	ND	ND
Animal 3	993,8	126,8	841,0	1084,0	421,5	993,8
Animal 4	352,3	126,8	ND	84,1	684,3	244,0
Animal 5	841,0	387,1	167,3	ND	280,8	810,0
Média	589,7	444,3	250,5	426,3	426,8	409,6
DP	328,3	650,7	346,8	548,1	305,3	464,9
EPM	146,8	291,0	155,1	245,1	136,5	207,9
IL-4 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	52,4	189,1	55,9	132,7	120,6	57,7
Animal 2	93,1	41,9	54,2	79,8	50,6	41,9
Animal 3	134,8	45,4	120,6	155,3	89,3	151,2
Animal 4	41,9	65,0	48,9	55,9	108,7	68,6
Animal 5	104,8	74,2	55,9	65,0	79,8	116,6
Média	85,4	83,1	67,1	97,8	89,8	87,2
DP	38,2	60,7	30,1	43,8	27,1	45,3
EPM	17,1	27,2	13,4	19,6	12,1	20,3
CINC-1 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	ND	316,0	78,4	199,0	109,8	46,0
Animal 2	81,2	ND	ND	32,6	17,1	39,5
Animal 3	199,0	32,6	188,2	194,7	138,8	230,5
Animal 4	ND	83,9	165,2	141,1	161,7	89,2
Animal 5	148,1	64,3	ND	99,6	39,5	97,1
Média	85,6	99,4	86,4	133,4	93,4	100,5
DP	88,6	125,2	88,8	69,7	62,7	77,0
EPM	39,6	56,0	39,7	31,2	28,1	34,4
CINC-2 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	1081,2	2286,7	284,5	1660,7	1712,5	79,9
Animal 2	1608,0	623,6	79,9	793,7	79,9	417,1
Animal 3	1863,6	793,7	1712,5	793,7	1146,1	1554,5
Animal 4	526,8	1081,2	711,8	79,9	623,6	1146,1
Animal 5	1608,0	944,0	623,6	1499,9	623,6	711,8
Média	1337,5	1145,8	682,5	965,6	837,1	781,9
DP	535,3	660,2	629,8	634,9	617,7	583,2
EPM	239,4	295,2	281,7	283,9	276,3	260,8

Tabela A12. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à Figura 12 e à Tabela 8 da Análise de citocinas do homogenato de pulmão, da seção Resultados.

Citocinas do homogenato de pulmão de camundongos controles e diabéticos infectados por <i>P. brasiliensis</i> e tratados com insulina						
TNF-α (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	266,7	296,5	263,8	156,4	373,7	556,6
Animal 2	143,0	236,0	202,4	103,3	566,2	376,9
Animal 3	71,9	440,6	434,1	96,0	332,2	350,9
Animal 4	114,2	-	396,6	-	-	-
Média	149,0	324,4	324,2	118,6	424,0	428,1
DP	83,8	105,1	109,3	33,0	124,8	112,0
EPM	41,9	60,7	54,6	19,1	72,1	64,7
IL-6 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	82,7	110,1	77,5	23,6	66,9	99,6
Animal 2	26,7	115,7	62,8	23,7	111,8	89,7
Animal 3	23,0	88,8	269,3	26,7	30,9	8,84
Animal 4	30,3	-	91,7	-	-	-
Média	40,7	104,8	125,3	24,7	69,9	66,0
DP	28,2	14,2	96,7	1,7	40,5	49,8
EPM	14,1	8,2	48,4	1,0	23,4	28,7
IL-4 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	73,1	40,0	72,7	29,9	46,6	64,4
Animal 2	29,1	68,4	67,8	25,7	68,7	65,4
Animal 3	22,2	90,2	102,7	27,9	6,3	20,9
Animal 4	30,3	-	-	-	-	-
Média	38,7	66,2	81,1	27,8	40,5	50,2
DP	23,2	25,2	18,9	2,1	31,6	25,4
EPM	11,6	14,5	9,4	1,2	18,3	14,7
IL-10 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	403,5	461,0	328,8	305,5	421,6	533,6
Animal 2	316,0	379,5	319,8	302,8	464,6	461,1
Animal 3	247,1	580,7	562,7	264,7	310,2	180,6
Animal 4	313,5	-	475,9	-	-	-
Média	320,0	473,7	421,8	291,0	398,8	391,8
DP	64,1	101,2	118,1	22,8	79,7	186,4
EPM	32,1	58,4	59,0	13,2	46,0	107,6

Tabela A13. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à Figura 13 e à Tabela 9 da Análise de citocinas do homogenato de pulmão, da seção Resultados.

Quimiocinas do homogenato de pulmão de camundongos controles e diabéticos infectados por <i>P. brasiliensis</i> e tratados com insulina						
CINC-1 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	56,4	455,7	404,2	422,2	275,7	511,9
Animal 2	39,3	498,4	286,3	443,7	504,2	625,3
Animal 3	56,7	247,7	749,2	435,0	341,7	25,7
Animal 4	55,8	-	382,0	-	-	-
Média	52,0	400,6	455,4	433,6	373,9	387,6
DP	8,5	134,1	202,4	10,8	117,6	318,6
EPM	4,3	77,4	101,2	6,2	67,9	183,9
CINC-2 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	323,6	342,0	295,6	620,4	592,4	926,6
Animal 2	165,1	311,6	224,1	249,5	1103,8	723,1
Animal 3	135,2	450,7	784,9	411,2	353,3	629,1
Animal 4	237,0	-	595,9	-	-	-
Média	215,3	368,1	475,1	427,1	683,2	759,6
DP	83,9	73,2	261,9	186,0	383,4	152,1
EPM	42,0	42,2	131,0	107,4	221,3	87,8
CINC-3 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	150,1	116,2	112,8	93,8	117,8	168,1
Animal 2	97,2	99,0	312,1	84,7	96,6	104,8
Animal 3	121,3	150,6	102,4	107,8	162,0	252,0
Animal 4	120,1	-	142,7	-	-	-
Média	122,2	121,9	167,4	95,4	125,5	175,0
DP	21,6	26,3	98,0	11,6	33,4	73,9
EPM	10,8	15,2	49,0	6,7	19,3	42,7

Tabela A14. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à Tabela 10 da Análise de citocinas do homogenato de fígado, da seção Resultados.

Citocinas do homogenato de Fígado de camundongos controles e diabéticos infectados por <i>P. brasiliensis</i> e tratados com insulina						
TNF-α (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	600,4	804,0	164,4	173,8	509,6	520,3
Animal 2	506,2	417,2	1051,3	191,4	249,2	300,6
Animal 3	290,0	1168,5	138,5	151,7	169,7	345,4
Animal 4	1096,0	-	1007,4	-	-	-
Média	623,6	796,6	590,4	172,3	309,5	388,8
DP	341,9	375,7	507,3	19,9	177,8	116,1
EPM	170,9	216,9	253,6	11,5	102,6	67,0
IL-6 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	81,8	83,1	13,0	79,7	54,9	95,0
Animal 2	41,7	24,7	347,1	74,7	52,8	31,4
Animal 3	14,3	118,9	18,2	64,0	81,6	414,2
Animal 4	33,4	-	193,4	-	-	-
Média	42,8	75,6	142,9	72,8	63,1	180,2
DP	28,4	47,6	159,9	8,1	16,1	205,1
EPM	14,2	27,5	79,9	4,7	9,3	118,4
IL-4 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	103,0	103,5	54,6	89,0	90,7	138,6
Animal 2	63,1	72,1	176,1	75,4	30,4	74,2
Animal 3	78,4	121,4	103,8	76,8	113,2	188,9
Animal 4	87,8	-	112,2	-	-	-
Média	83,1	99,0	111,7	80,4	78,1	133,9
DP	16,7	24,9	49,9	7,5	42,8	57,5
EPM	8,4	14,4	25,0	4,3	24,7	33,2
IL-10 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	1860,0	1578,0	1456,1	567,4	700,3	922,0
Animal 2	504,4	598,4	2606,3	1471,1	373,2	716,6
Animal 3	666,6	1996,0	697,4	912,3	845,9	1489,9
Animal 4	865,4	-	1581,7	-	-	-
Média	974,1	1390,8	1585,4	983,6	639,8	1042,9
DP	608,8	717,3	784,8	456,1	242,1	400,6
EPM	304,4	414,2	392,4	263,3	139,8	231,3

Tabela A15. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à Figura 14 e à Tabela 11 da Análise de citocinas do homogenato de fígado, da seção Resultados.

Quimiocinas do homogenato de fígado de camundongos controles e diabéticos infectados por <i>P. brasiliensis</i> e tratados com insulina						
CINC-1 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	91,0	219,7	64,9	19,8	105,7	71,5
Animal 2	34,2	192,0	177,6	62,6	161,0	64,9
Animal 3	84,6	156,1	151,1	54,6	158,0	98,4
Animal 4	78,1	-	82,4	-	-	-
Média	72,0	189,3	119,0	45,7	141,6	78,3
DP	25,7	31,9	54,0	22,8	31,1	17,7
EPM	12,9	18,4	27,0	13,2	18,0	10,2
CINC-2 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	49,9	129,2	157,1	143,6	113,5	193,0
Animal 2	203,9	203,9	384,6	224,6	49,9	49,9
Animal 3	288,0	442,2	279,6	214,4	181,6	312,2
Animal 4	364,0	-	327,6	-	-	-
Média	226,4	258,5	287,2	194,2	115,0	185,0
DP	134,6	163,5	96,8	44,1	65,9	131,3
EPM	67,3	94,4	48,4	25,5	38,0	75,8
CINC-3 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	402,2	315,3	306,8	258,5	319,6	449,0
Animal 2	267,2	271,7	828,8	235,7	265,7	286,4
Animal 3	328,5	403,6	280,3	293,9	433,0	668,9
Animal 4	325,4	-	382,1	-	-	-
Média	330,8	330,2	449,5	262,7	339,4	468,1
DP	55,3	67,2	256,5	29,3	85,4	192,0
EPM	27,7	38,8	128,3	16,9	49,3	110,9

Tabela A16. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à Tabela 12 da Análise de citocinas do homogenato de baço, da seção Resultados.

Citocinas do homogenato de baço de camundongos controles e diabéticos infectados por <i>P. brasiliensis</i> e tratados com insulina						
TNF-α (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	102,1	21,9	97,6	37,8	71,5	212,3
Animal 2	73,0	49,0	15,7	45,4	63,5	68,5
Animal 3	110,2	45,6	96,8	112,3	32,7	245,9
Animal 4	97,7	-	80,3	-	-	-
Média	95,8	38,9	72,6	65,2	55,9	175,6
DP	16,0	14,8	38,7	41,0	20,5	94,2
EPM	8,0	8,5	19,4	23,7	11,8	54,4
IL-10 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	388,6	275,2	259,6	194,7	144,8	525,0
Animal 2	190,0	336,6	264,3	166,2	250,4	270,4
Animal 3	264,6	291,8	329,1	226,9	165,1	678,5
Animal 4	204,0	-	326,9	-	-	-
Média	261,8	301,2	295,0	195,9	186,8	492,0
DP	90,5	31,8	38,2	30,3	56,1	206,3
EPM	45,3	18,3	19,1	17,5	32,4	119,1

Tabela A17. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à Figura 15 e à Tabela 13 da Análise de citocinas do homogenato de baço, da seção Resultados.

Quimiocinas do homogenato de baço de camundongos controles e diabéticos infectados por <i>P. brasiliensis</i> e tratados com insulina						
CINC-1 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	50,5	83,2	26,2	21,2	40,3	49,6
Animal 2	18,3	92,0	22,9	17,7	60,5	31,0
Animal 3	22,3	61,9	56,3	20,6	46,1	16,8
Animal 4	14,7	-	36,7	-	-	-
Média	26,5	79,0	35,5	19,9	49,0	32,5
DP	16,3	15,5	15,0	1,9	10,4	16,4
EPM	8,2	8,9	7,5	1,1	6,0	9,5
CINC-2 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	89,8	93,8	51,7	77,2	38,4	198,0
Animal 2	20,0	51,7	77,2	131,0	67,9	124,9
Animal 3	20,0	72,6	137,0	38,4	51,7	228,0
Animal 4	85,8	-	108,4	-	-	-
Média	53,9	72,7	93,6	82,2	52,7	183,6
DP	39,2	21,0	37,1	46,5	14,8	53,1
EPM	19,6	12,1	18,5	26,9	8,5	30,6
CINC-3 (pg/mL)						
	CS	CPb	CPb+i	DS	DPb	DPb+i
Animal 1	53,8	72,5	42,1	59,5	48,5	43,5
Animal 2	57,7	54,0	65,3	50,5	39,4	56,2
Animal 3	68,9	62,7	63,7	41,7	46,5	62,3
Animal 4	70,8	-	78,1	-	-	-
Média	62,8	63,1	62,3	50,6	44,8	54,0
DP	8,3	9,2	15,0	8,9	4,8	9,6
EPM	4,2	5,3	7,5	5,2	2,8	5,5