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

Papel da insulina na vigência da peritonite decorrente da infecção por *Staphylococcus aureus* em animais diabéticos e sadios

Paula Regina Knox de Souza

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

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

Papel da insulina na vigência da peritonite decorrente da infecção por *Staphylococcus aureus* em animais diabéticos e sadios

Paula Regina Knox de Souza

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

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.

Souza, Paula Regina Knox de
S729m Papel da insulina na vigência da peritonite decorrente da infecção por *Staphylococcus aureus* em animais diabéticos e sadios / Paula Regina Knox de Souza. -- São Paulo, 2015.
161p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Martins, Joilson de Oliveira

1. Imunopatologia : Medicina 2. Diabetes mellitus 3. Staphylococcus I. T. II. Martins, Joilson de Oliveira, orientador.

616.079 CDD

Paula Regina Knox de Souza

Papel da insulina na vigência da peritonite decorrente da infecção por *Staphylococcus aureus* em animais diabéticos e sadios

Versão original

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
orientador/presidente

Prof. Dr. Jorge Luiz Freire Pinto
1º. examinador

Prof. Dra. Luciana Chagas Caperuto
2º. examinadora

Profa. Dra. Carla Máximo Prado
3º. examinadora

Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza
4º. examinador

São Paulo, 14 de setembro de 2015.

DEDICATÓRIA

A meu marido Fabiano, pelo amor, pelo carinho, pelo companheirismo, pelo estímulo, pela paciência, essenciais durante todos esses anos.

A meus pais, Celina e Guy, que me proporcionaram as estruturas pessoal e educacional que me trouxeram até aqui.

A minha irmã, Maura, que sempre me defendeu e torceu por mim.

Às minhas tias, mulheres incríveis, que sempre comemoraram minhas conquistas: Ana, Cidinha, Gilda, Lia e Marisa.

A meus primos queridos: Ana Carolina, Amanda e André pelos momentos incríveis que passamos juntos.

Às minhas avós, Anita e Maria, que mesmo não estando mais entre nós, com certeza estão comemorando esta grande vitória: a formação da primeira Doutora da família.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins pela oportunidade.

A Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka pelo grande apoio e pela colaboração para a realização deste trabalho científico.

Ao Prof. Dr. Jose Walber Miranda Costa Cruz do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo pela ajuda essencial

Aos amigos Felipe Casagrande, Fernanda Nunes, Mariana Cristina e Sabrina Ferreira pela amizade e pelo apoio na realização de todas as etapas que compuseram este trabalho.

Aos colegas de Laboratório Eduardo Nolasco, Fernando Tessaro, Isis Fieri e Leonardo Mendes pelo apoio.

A todos os colegas, professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pelo apoio.

“Sou daqueles que pensam que a ciência tem grande beleza. Um sábio em seu laboratório não é apenas um teórico. É também uma criança colocada frente a fenômenos naturais que lhe impressionam como um conto de fadas.”

Marie Curie

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

RESUMO

KNOX-DE-SOUZA, P.R. **Papel da insulina na vigência da peritonite decorrente da infecção por *Staphylococcus aureus* em animais diabéticos e sadios**. 161f. Defesa (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A nefropatia diabética é uma doença crônica caracterizada por falência renal, que torna necessária a hemodiálise. A diálise peritoneal é uma alternativa para a hemodiálise, porém causa peritonite e morte, principalmente devido à infecção com *Staphylococcus aureus,* especialmente em pacientes imunodeprimidos, como pacientes diabéticos. Nossa hipótese é que a insulina possa modular a peritonite causada por *S. aureus.* Para tanto, investigamos sua intervenção, após a indução de *diabetes mellitus*, na infecção peritoneal por cepas diferentes de *S. aureus*, analisando os mecanismos moleculares (produção/liberação de citocinas, expressão de moléculas de adesão) e a atividade microbicida dos macrófagos peritoneais envolvidos. Ratos Wistar, machos, diabéticos (aloxana, 42 mg/kg, i.v., 10 dias) e respectivos controles (salina, i.v.) foram submetidos à injeção intraperitoneal de uma suspensão de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU/mL) ou volume equivalente de PBS estéril. Os animais foram submetidos a dois tratamentos com insulina NPH: 1) dose única (1UI e 4UI respectivamente, controle e diabético), administrada por via subcutânea; ou, 2) com 4 doses sendo a primeira administrada 2 horas antes da infecção, seguida de metade desta dose às 17 horas e no mesmo horário pelos próximos 2 dias (dose inicial 4UI e 1UI, grupo diabético e grupo controle, respectivamente), passadas 16 horas da última dose de insulina, a glicemia foi determinada e, em seguida, foi realizada eutanásia e coleta de amostras. Avaliamos: a) número de células no lavado peritoneal (LPe), leucograma e glicemia (monitor de glicose); b) níveis séricos de corticosterona e insulina (ELISA); c) concentrações de citocinas (IL-1β, TNF-α, IL-6, IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-12) e quimiocinas (CINC-1, CINC-2, CINC-3) no sobrenadante do LPe (ELISA); d) expressão de moléculas de adesão (P-selectina, PECAM-1, ICAM-1) no endotélio vascular (imunoistoquímica); e) atividade microbicida. Após a infecção com a cepa ATCC 25923, comparados aos não infectados, ratos diabéticos apresentaram aumento no número de leucócitos (350%)

e nas concentrações de CINC-1 (1900%), IL-1β (1300%), IFN-γ (280%), IL-4 (800%). O tratamento destes animais com dose única de insulina diminuiu as concentrações de CINC-1 (17%) e IFN-γ (30%) e o leucócitos (55%); e aumentou a concentração de IL-4 (260%); enquanto o tratamento com 4 doses diminuiu o número de leucócitos (82%) e as concentrações de CINC-1 (96%) e CINC-2 (45%); e, aumentou as concentrações de TNF-α (270%), IFN-γ (220%), IL-1β (42%), IL-6 (760%) e a expressão de ICAM-1 (1360%); enquanto as concentrações de CINC-3, IL-10 e IL-12 não foram alteradas pelos tratamentos com insulina. Após a infecção com a cepa N315 HLA+, comparados aos não infectados, ratos diabéticos apresentaram aumento do número de leucócitos (200%), nas concentrações de CINC-1 (1000%), IL-4 (860%), IFN-γ (200%) e na expressão de PECAM-1 (800%) e diminuição de CINC-2 (92%). O tratamento destes animais com dose única de insulina diminuiu a concentração de CINC-1 (85%); e aumentou a concentração de CINC-2 (2030%), IL-1β (370%) e IL-4 (250%); enquanto o tratamento com 4 doses diminuiu a concentração de CINC-1 (92%); e, aumentou número de leucócitos (66%), as concentrações de CINC-2 (100%), IL-1β (490%), IL-6 (1870%) e IFN-γ (330%), e os outros parâmetros não foram modificados pelos diferentes tratamentos com insulina. Estes dados sugerem que a insulina possa modular a peritonite induzida por cepas diferentes de *S. aureus*, controlando pelo menos em parte, o infiltrado inflamatório, a produção das citocinas CINC-1, CINC-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α e IL-1β; e, consequentemente a expressão P-selectina e PECAM-1 no endotélio vascular do mesentério.

Palavras chave: Infecção, quimiocinas, citocinas, moléculas de adesão

Apoio Financeiro: CAPES, CNPq, FAPESP (2010/02272-0 e 2014/05214-1).

ABSTRACT

KNOX-DE-SOUZA, P.R. **Insulin role in peritonitis presence due to *Staphylococcus aureus* infection in diabetic and healthy animals.** 161f. Defesa (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Diabetic nephropathy is a chronic disease characterized by kidney failure, so hemodialysis is necessary. Peritoneal dialysis is an alternative to hemodialysis, but causes peritonitis and death primarily due to infection by *Staphylococcus aureus*, especially in immunocompromised patients, such as diabetics. Our hypothesis is that insulin can modulate peritonitis caused by *S. aureus*, therefore, we investigated its action, after diabetes induction, in peritoneal infection with different *S. aureus* strains, analyzing the molecular mechanisms (cytokines production/release, adhesion molecules expression) and the microbicidal activity of peritoneal macrophages involved. Wistar male diabetic (alloxan, 42 mg/kg, iv, 10 days) and their respective controls (saline,iv) were subjected to intraperitoneal injection of *S. aureus* suspension ($5x10^9$CFU/mL) or an equivalent volume of PBS sterile. Animals were submitted to two treatments with NPH insulin administered subcutaneously : single dose (1IU and 4IU respectively , control and diabetic) 8 hours prior to euthanasia ; or 4 doses : first dose 2 hours before infection (4IU and 1IU , diabetic and control group, respectively), then half this dose of 17 pm and in the same time for the next 2 days, after 16 hours of the last dose, blood glucose was determined, and then it was carried out euthanasia and sampling. We evaluated: a) number of cells in peritoneal wash (PW), white blood cell count and blood sugar (glucose monitor) ; b) serum insulin and corticosterone (ELISA); c) concentrations of cytokines (IL-1β, TNF-α, IL-6, IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-12) and chemokines (CINC -1, CINC-2, CINC-3) in supernatant of the SBA assay (ELISA); d) expression of adhesion molecules (P- selectin, ICAM-1, PECAM-1) in vascular endothelium (immunohistochemistry); e) microbicidal activity. After infection with ATCC 25923 strain, compared to uninfected, diabetic rats showed an increase in leukocytes number (350%) and in concentrations of CINC-1 (1900%), IL-1β (1300%), IFN-γ (280%), IL-4 (800%). Treatment of these animals with a single dose of insulin decreased concentrations of CINC-1 (17%) and IFN-γ (30%) and

leukocytes number (55%); and increased IL-4 concentrations (260%); while treatment with 4 doses decreased leukocytes number (82%) and concentrations of CINC-1 (96%) and CINC-2 (45%); and increased concentrations of TNF-α (270%), IFN-γ (220%), IL-1β (42%), IL-6 (760%) and expression of ICAM-1 (1360%); while the concentrations of CINC-3, IL-10 and IL-12 were not affected by treatments with insulin. After infection with N315 HLA+ strain, compared to uninfected, diabetic rats showed an increase in leukocytes (200%), concentrations of CINC-1 (1000%), IL-4 (860%), IFN-γ (200%) and in the expression of PECAM-1 (800%); and CINC-2 decrease (92%). Treatment of these animals with a single dose of insulin decreased the concentration of CINC-1 (85%); and increased concentrations of CINC-2 (2030%), IL-1β (370%) and IL-4 (250%); while treatment with 4 doses decreased the concentration of CINC-1 (92%); and increased leukocytes number (66%), concentrations of CINC-2 (100%), IL-1β (490%), IL-6 (1870%) and IFN-γ (330%), and other parameters were not modified by treatments with insulin. These results suggest that both *S. aureus* strains activate differently the innate response during peritonitis, and insulin was not always able to modulate this response.

Key words: Infecction, chemokines, cytokines, adhesion mollecules

Financial Support: CNPq, CAPES, FAPESP (2010/02272-0 e 2014/05214-1).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de imunomodulação resultante de colonização persistente e não persistente das narinas por *Staphylococcus aureus*..... 30

Figura 2: Principais fatores de virulência apresentados por *Staphylococcus aureus* que evitam sua eliminação por fagócitos 35

Figura 3: Determinação de glicemia 58

Figura 4: Determinação da variação da massa corpórea 58

Figura 5: Contagem global absoluta de leucócitos no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles 60

Figura 6: Contagem global relativa de leucócitos no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles 61

Figura 7: Determinação dos níveis séricos de insulina de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles 62

Figura 8: CINC-1 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles 64

Figura 9: CINC-2 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles 65

Figura 10: CINC-3 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles 66

Figura 11: IL-1β no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e seus respectivos controles 67

Figura 12: IL-6 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles 68

Figura 13: TNF-α no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e seus respectivos controles 69

Figura 14: IFN-γ no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e seus respectivos controles 70

Figura 15: IL-12 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles 71

Figura 16: IL-4 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles 72

Figura 17: Marcação por imunohistoquímica para P-selectina em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com dose única de insulina 74

Figura 18: Marcação por imunohistoquímica para PECAM-1 em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com dose única de insulina 75

Figura 19: Marcação por imunohistoquímica para PECAM-1 em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina 77

Figura 20: Quantificação de PECAM-1 em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina 78

Figura 21: Marcação por imunohistoquímica para ICAM-1 em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina 79

Figura 22: Quantificação de ICAM-1 em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina 80

Figura 23: Marcação por imunohistoquímica para P-selectina em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina 81

Figura 24: Quantificação de P-selectina em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina 82

Figura 25: Contagem global absoluta de leucócitos no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla+ de *S. aureus* e respectivos controles 84

Figura 26: Contagem global relativa de leucócitos no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla+ de *S. aureus* e respectivos controles 85

Figura 27: Determinação dos níveis séricos de insulina de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla+ de *S. aureus* e respectivos controles 86

Figura 28: CINC-1 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa por cepa N315 HLA+ de *S. aureus* e respectivos controles 88

Figura 29: CINC-2 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 HLA+ de *S. aureus* e respectivos controles 89

Figura 30: CINC-3 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 HLA+ de *S. aureus* e respectivos controles 90

Figura 31: IL-1β no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 HLA+ de *S. aureus* e seus respectivos controles 91

Figura 32: IL-6 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 HLA+ de *S. aureus* e respectivos controles 92

Figura 33: TNF-α no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 HLA+ de *S. aureus* e seus respectivos controles 93

Figura 34: IFN-γ no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 HLA+ de *S. aureus* e seus respectivos controles 94

Figura 35: IL-12 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 HLA+ de *S. aureus* e respectivos controles 95

Figura 36: IL-4 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 HLA+ de *S. aureus* e respectivos controles 96

Figura 37: Marcação por imunohistoquímica para PECAM-1 em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 HLA+ de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina 98

Figura 38: Quantificação de PECAM-1 em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 HLA+ de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina 99

Figura 39: Marcação por imunohistoquímica para ICAM-1 em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 HLA+ de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina 100

Figura 40: Marcação por imunohistoquímica para P-selectina em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 HLA+ de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos grupos experimentais..... 48

Tabela 2: Leucócitos sanguíneos de ratos diabéticos com infecção peritoneal pela cepa ATCC 225923 de *S. aureus* e respectivos controles 60

Tabela 3: Glicemia dos ratos controles e diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus*, antes e após o tratamento com insulina 62

Tabela 4: Determinação dos níveis séricos de corticosterona de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 29523 de *S. aureus* e respectivos controles 63

Tabela 5: Dosagem de CINC-3, IL-12 e IL10 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controle 72

Tabela 6: Atividade microbicida de macrófagos de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles 82

Tabela 7: Leucócitos sanguíneos de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 HLA+ de *S. aureus* e respectivos controles 83

Tabela 8: Glicemia dos ratos controle e diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 HLA+ de *S. aureus* antes e após o tratamento com insulina 86

Tabela 9: Determinação dos níveis séricos de corticosterona de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 HLA+ de *S. aureus* e respectivos controles 87

Tabela 10: Dosagem de CINC-3, IL-12 e IL10 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 HLA+ de S. *aureus* e respectivos controle 96

Tabela 11: Quantificação de ICAM-1 e P-selectina em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 HLA+ de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina (μm^2) 99

Tabela 12: Atividade microbicida de macrófagos de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 HLA+ de *S. aureus* e respectivos controles 100

Tabela 13: Resumo dos resultados obtidos 111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	- *American Diabetes Association*
AMP	- Peptídeos Antimicrobianos
AP	- Proteína Ativadora
APC	- Células Apresentadoras de Antígenos
ATCC	- *American Type Culture Collection*
CFU	- Unidades Formadoras de Colônia
CINC	- *Cytokine-induced Neutrophil Chemoattractant*
Clf	- Fator *Clumping*
DM	- *Diabetes mellitus*
DM1	- *Diabetes mellitus* tipo 1
DM2	- *Diabetes mellitus* tipo 2
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
DP	- Diálise peritoneal
eDNA	- Ácido Desoxirribonucleico Extracelular
EDTA	- Ácido Tetraacético Etilenediamina
ELISA	- *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
ERK	- Quinases Reguladas por Sinal Extracelular
EROs	- Espécies Reativas de Oxigênio
FID	- Federação Internacional de *Diabetes*
GLUT	- transportador de glicose
hβD-3	- Defensina Humana β-3
Hla	- Hemolisina A
ICAM	- Molécula de Adesão Intracelular
IFN	- Interferon
Ig	- Imunoglobulina
Ik	- *Inhibitory kappa*
Ikk	- *Inhibitory kinase kappa*
IL	- Interleucina
iNOS	- Óxido Nítrico Sintase Indutível
i.p.	- Intraperitoneal

IRF	- Fator Regulador de Interferon
i.v.	- Intravenoso
JNK	- *c-jun N-terminal kinase*
LPe	- Lavado peritoneal
LPS	- Lipopolissacarídeo
LTA	- Ácido Lipoteicoico
MA	- Macrófago Alveolar
MAPK	- Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MIF	- Fator Inibitório de Migração de Macrófago
MyD88	- Fator de Diferenciação Mieloide 88
NF-κB	- Fator Nuclear *Kappa* B
NKF	- *National Kidney Fundation*
NPH	- *Neutral Protamine Hagedorn*
OPD	- Orto-fenilenodiamina
PAMP	- Padrão Molecular Associado a Patógeno
PBP2'	- Proteína de ligação a Penicilina 2'
PBS	- *Phosphate Buffered Saline*
PECAM	- Molécula de Adesão Célula Endotelial-Plaqueta
PG	- Prostaglandina
PGN	- Peptidoglicano
PK	- Proteína Quinase
PMA	- *Phorbol Myristate Acetate*
PMN	- Polimorfonuclear
PVL	- *Panton-Valentine leukocidin*
S. aureus	- *Staphylococcus aureus*
SARM	- *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
SASM	- *Staphylococcus aureus* susceptível à meticilina
s.c.	- Subcutânea
SCC*mec*	- *staphylococcal chromosomal cassette mec*
TGF	- Fator Transformador de Crescimento
Th	- Linfócitos T *helper*
TLR	- *Toll like receptor*
TNF	- Fator de Necrose Tumoral

TRS	- Terapia Renal Substitutiva
Treg	- Linfócitos T regulatórios
TSB	- *Tryptic-Soy Broth*
UI	- Unidade Internacional
vs	- *versus*
v:v	- volume:volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 21

1.1. *Diabetes mellitus* no mundo 22

1.2. *Diabetes mellitus* e resposta imune 23

1.3. *Diabetes mellitus* e suas complicações 25

1.4. Peritonite e *Staphylococcus aureus* 28

1.5. Staphylococcus aureus e seus fatores de virulência 33

1.6. Modelos experimentais de *diabetes mellitus* 37

1.7. Justificativa 39

2. OBJETIVOS 42

3. MATERIAIS E MÉTODOS 44

3.1. Animais 45

3.2. Delineamento experimental 45

3.3. Indução de *diabetes mellitus* 46

3.4. Indução de peritonite por *Staphylococcus aureus* 47

3.5. Protocolos de tratamento com insulina 48

3.6. Monitoramento com peritonite 49

3.7. Determinação da concentração sérica de corticosterona e insulina .. 50

3.8. Obtenção do lavado peritoneal 50

3.9. Contagem de células do lavado peritoneal 51

3.10. Separação de macrófagos peritoneais 51

3.11. Ensaio de atividade microbicida sobre *Staphylococcus aureus* pelo método do MTT 52

3.12. Determinação da concentração de citocinas e quimiocinas no lavado peritoneal 53

3.13. Avaliação da expressão de moléculas de adesão por imunoistoquímica 54

3.13.1. Fixação com formaldeído a 10% em placa de parafina 54

3.13.2. Fixação com acetona 55

3.13.3. Quantificação de moléculas de adesão..... 56

3.14. Análise estatística 56

4 RESULTADOS 57

4.1. Monitoramento do modelo experimental de diabetes..... 58

4.2. Monitoramento da peritonite 59

4.3. Peritonite causada por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* 59

4.4. Peritonite causada por cepa N315 Hla+ de *S. aureus* 83

5. DISCUSSÃO 103

6. CONCLUSÕES 112

7. REFERÊNCIAS 114

APÊNCICE 132

ANEXOS 158

Anexo A – Certificado de Aprovação do projeto "Efeito da insulina na inflamação peritoneal causada por *Staphylococcus aureus* na imunidade inata" (protocolo CEUA/FCF/375) 159

Anexo B - Certificado de Aprovação do projeto "Efeito da insulina na inflamação peritoneal causada por *Staphylococcus aureus* na imunidade inata" sob responsabilidade da pesquisadora Paula Regina Knox de Souza (protocolo CEUA/FCF/375) 160

Anexo C - Instruções para os Membros de Banca Julgadores de Mestrado / Doutorado 161

INTRODUÇÃO

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 em comum, a hiperglicemia, que pode ser causada por defeitos tanto na ação quanto na secreção de insulina (*American Diabetes Association - ADA*, 2014).

Em 2013, segundo estimativas da *Internacional Diabetes Federation* (IDF), 8,35% dos adultos do mundo todo, aproximadamente 382 milhões de pessoas, viviam com DM, sendo que, 46% destes não eram diagnosticadas. Enquanto, neste mesmo período, na América Latina existiam 24 milhões de pessoas diabéticas, sendo que aproximadamente 25% das pessoas não eram diagnosticadas (GUARIGUATA et al*.,* 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 diabetes, em relação a 2013, sendo que os maiores aumentos acontecerão na África, Oriente Médio, América Central e do Sul (GUARIGUATA et al., 2014).

Além disso, há 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).

O DM pode ser classificado em quatro categorias clínicas: *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1), *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), diabetes gestacional e outros tipos de causa identificável e características variadas, como, por exemplo, defeitos genéticos na função de células β, defeitos genéticos na ação de insulina e doenças induzidas por medicamentos (ADA, 2014). O aumento no número de pacientes diabéticos é devido 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, 2014; 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 (GUARIGUATA et al*.,* 2014).

O DM1 e o DM2 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 dos pacientes. Estes são diagnosticados quando há presença de seus sinais clínicos clássicos: polidipsia, polifagia e poliúria; resultado da hiperglicemia que é causada pela baixa funcionalidade da insulina. É importante notar 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, em que 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 insulinodependentes (WILLCOX, et al, 2009; VAN BELLE et al., 2011). Enquanto, DM2 é mais frequente após envelhecimento e em pacientes que apresentam obesidade, sendo resultado da resistência à insulina produzida pelas células-beta pancreáticas (ADA, 2014; VAN BELLE *et al.*, 2011).

1.2. *Diabetes mellitus* e resposta imune

A inflamação é caracterizada por eventos vasculares, linfáticos e celulares que levam ao extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido intersticial, permitindo marginação leucocitária e a migração de leucócitos para o espaço extra vascular (KVIETYS, GRANGER, 2012).

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). Além disso, o processo inflamatório acontece graças à ação de mediadores químicos e de citocinas que podem apresentar caráter pró e anti-inflamatório (BENSINGER, TONTONOZ, 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).

Assim, 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. Enquanto, as interleucinas (IL)-1α, IL-1β 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; 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 *helper* (Th) 2. Por outro lado, IL-10 é uma potente citocina anti-inflamatória, que apresenta como principal papel a supressão da resposta imune e inflamatória (OLIVEIRA et al, 2011), enquanto, fator transformador de crescimento (TGF)-β, também é um agente anti-inflamatório, que atua como regulador de crescimento e diferenciação celular (PEREIRA, MARTINS, 2010).

A inflamação aguda também é caracterizada pela presença de células polimorfonucleares (PMN), principalmente neutrófilos que realizam a fagocitose com posterior destruição das partículas estranhas presentes no tecido. É importante destacar a importância da ativação e diferenciação de linfócitos Th na resolução da resposta inflamatória, uma vez que dependendo de qual de suas subpopulações é estimulada, ocorre produção de um rol de citocinas específico que pode ser pró-inflamatório ou anti-inflamatório (RANKIN, 2004).

Evidências sugerem que em pacientes com DM ocorre baixa interação leucócito-endotélio, baixa expressão de molécula de adesão intracelular (ICAM)-1, baixos níveis de TNF-α e IL-1β 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 (ANJOS-VALOTA et al., 2006; DE OLIVEIRA MARTINS et al., 2006; DELAMAIRE et al., 1997). Sendo um dos motivos pelos quais, pacientes com DM apresentam maior risco de infecções que afetam mucosas e tecidos moles, tratos urinário e respiratório e infecções nosocomiais (JOSHI et al., 1999; PELEG et al., 2006).

Além disso, 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). A baixa fagocitose de partículas de *zymosan* e a baixa produção de peróxido de hidrogênio após estímulo de acetato miristato de forbol (PMA) por neutrófilos de

ratos diabéticos podem ser restauradas por dose única de insulina mesmo sem a normalização da glicemia (ALBA-LOUREIRO et al, 2006). Enquanto, macrófagos peritoneais de ratos diabéticos apresentam baixa capacidade fagocítica sobre partículas de *zymosan* e baixa produção de peróxido de hidrogênio, que podem ser revertidas pela adição de insulina na cultura destas células (COSTA-ROSA et al, 1996).

Este aumento na suscetibilidade a infecções pode ser explicado também pela diminuição da infiltração neutrofílica na cavidade pleural inflamada apresentada pelos ratos diabéticos em comparação aos 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-1β, TNF-α e IL-10 (DE OLIVEIRA MARTINS et al., 2006; MARTINS et al., 2009, revisto por SUNAHARA et al., 2012; SUNAHARA, MARTINS, 2012).

1.3. *Diabetes mellitus* e suas complicações

O DM é relacionado a efeitos deletérios na qualidade de vida dos pacientes (IMAYAMA et al., 2011), pois é acompanhado de complicações microvasculares levando a disfunção de múltiplos órgãos (MOUTZOURI et al., 2008). Sendo assim, pacientes com DM podem desenvolver várias complicações como, por exemplo, doença cerebrovascular, retinopatia, infecções orais recorrentes, doença cardíaca coronariana, neuropatia periférica, doença periférica vascular, ulceração em membros inferiores e nefropatia (GUARIGUATA et al., 2014; SBD, 2014-2015).

Apesar das doenças cardiovasculares serem a principal causa de morte de pessoas com diabetes (GUARIGUATA et al., 2014), a nefropatia diabética é a principal complicação progressiva da DM e pode evoluir para uma doença crônica renal que leva a alta mortalidade (ZHANG et al., 2012; SLEE, 2012).

A Insuficiência Renal, uma síndrome clínica em que há diminuição da função renal com acúmulo de metabólitos e eletrólitos no organismo, pode ser subdividida em insuficiência renal aguda e insuficiência renal crônica, de acordo com o tempo de desenvolvimento da doença (CERQUEIRA et al, 2014). Pode-se considerar que há uma epidemia da doença renal crônica acontecendo no mundo todo, o que gera uma sobrecarga social e econômica. Pesquisas feitas em vários países demonstram que

o número de pacientes com doença renal crônica terminal está crescendo e que o maior potencial de crescimento encontra-se nos países em desenvolvimento, onde a nefropatia diabética é uma das principais causas junto com hipertensão e glomerulonefrite crônica (LUGON, 2009).

A nefropatia diabética, caracterizada pela presença de microalbuminúria, ocorre em aproximadamente 20% a 30% dos pacientes com DM1, geralmente 15 anos após o diagnóstico; alguns destes progridem para macroalbuminúria, denominada de nefropatia declarada, e posteriormente, uma parte destes pacientes evolue para doença renal crônica terminal, que determina a realização de terapia de substituição renal, como hemodiálise e diálise peritoneal, a fim de previnir a morte por uremia, melhorando a expectativa de vida dos pacientes. A escolha da diálise utilizada em pacientes diabéticos é influenciada por vários fatores, como conveniência, presença de comorbidades, capacidade de tolerar mudanças de volume, risco e histórico de infecção, possibilidade de realização de acesso vascular periférico para HD e abdominal para PD. Geralmente, pacientes diabéticos de terceira idade são mais susceptíveis a problemas em vasos sanguíneos periféricos, o que limita utilização de HD, uma vez que esta necessita da manutenção de uma fístula arteriovenosa. Além disso, muitos de pacientes diabéticos apresentam episódios de hipotensão durante HD, gerando abandono desta técnica (GHADERIAN et al., 2015).

No Brasil, segundo dados do Censo Brasileiro de Diálise Crônica, realizado pela Sociedade Brasileira de Nefrologia, as taxas de prevalência e de incidência estimadas para doença renal crônica em tratamento por diálise aumentaram em relação a 2011, assim, em 2012, a taxa de prevalência era de 503 e de incidência era de 177 pacientes por milhão de população. Além disso, DM é a segunda principal doença causadora de doença renal crônica terminal que leva a realização de procedimento de diálise (SESSO et al, 2014).

Vários estudos têm comprovado que o início precoce do procedimento de diálise pode aumentar a sobrevida do paciente e sua qualidade de vida, assim como, pode diminuir as complicações crônicas relacionadas à falência renal; por este motivo, a diálise tem sido cada vez mais utilizada como uma terapia renal substitutiva (TRS) (COOPER et al., 2010).

Apesar do avanço das TRSs, conhecidas como diálises, a mortalidade e a morbidade dos pacientes que realizam este tipo de procedimento continuam altas.

Existem dois tipos de diálise: a hemodiálise e a diálise peritoneal (DP), e cada uma delas apresenta vantagens e desvantagens. Estudos comprovam que a escolha da técnica usada para a realização da diálise deve considerar a opinião do paciente, uma vez que a aderência ao tratamento e a qualidade de vida são melhores se o paciente tiver oportunidade de escolha (SÁ, 2011).

Além do tipo de acesso, sanguíneo ou peritoneal, a principal diferença entre as TRSs é o procedimento realizado (*NATIONAL KIDNEY FOUNDATION* - NKF, 2013).

Para a realização de hemodiálise é necessário realizar uma cirurgia vascular para gerar uma fístula, mesmo assim em alguns pacientes é necessária a instalação de cateter de curta ou longa permanência. Esta técnica deve ser realizada em clínicas especializadas e hospitais, geralmente 3 vezes por semana, em sessões de aproximadamente 4 horas, uma vez que é dependente de equipamentos, que filtram o sangue de maneira artificial por meio de uma membrana semipermeável; os dialisadores chegam a operar em até três turnos, uma vez que apresentam capacidade de atendimento de um único paciente por vez a fim de realizar o processo de filtração e depuração sanguínea de substancias como ureia, creatinina, potássio e sódio (NKF, 2013).

Por ser uma terapia intermitente, a hemodiálise leva a picos e decaimentos da concentração de alguns solutos durante a semana, como, por exemplo, potássio e sódio, o que pode levar a hipotensão e agravamento de falência cardíaca e de neuropatia cardiovascular (KOC et al., 2012). Por este motivo, a DP foi introduzida, em 1960, como uma alternativa viável para substituí-la (ALWAKEEL et al.,2011) e passou a ser um dos principais tratamentos para pacientes que apresentam falência renal (LOBO et al., 2010).

A DP pode ser realizada em ambiente domiciliar, para tanto é necessário implantar no paciente um cateter abdominal para garantir acesso ao peritônio, por onde é feita a infusão de uma solução de glicose que age como agente osmótico. A retirada de água e solutos ocorre devido ao contato desta solução de diálise com a microcirculação peritoneal. A filtração acontece devido à alta vascularização da membrana peritoneal, e neste caso ela é lenta e gradual, impedindo que ocorram episódios de hipotensão uma vez que é uma terapia constante em que não há modificação da concentração de solutos (NKF, 2013).

Estudos comprovam que no início do tratamento, até os três primeiros anos, a DP é mais vantajosa para o paciente do que hemodiálise, mas que depois deste período a hemodiálise melhora a qualidade de vida dos pacientes, pois diminui a chance de desenvolvimento de problemas como, por exemplo, falência da ultra filtração, diálise insuficiente e peritonite (KIM, 2008; KOC et al, 2012).

Apesar das inovações tecnológicas, como, por exemplo, desenvolvimento de novos equipamentos e cateteres para a realização de DP, treinamento especializado de profissionais de saúde e programas de promoção de educação ao paciente, que diminuíram à ocorrência de infecção nas últimas duas décadas; a peritonite ainda representa um dos principais motivos de hospitalização e de abandono de DP (DAVENPORT, 2009; TOBUDIC et al, 2011; SAITO et al., 2010).

1.4. Peritonite e *Staphylococcus aureus*

A peritonite é principal causa de morte em pacientes tratados por DP no mundo todo, sendo associada a 66% de aumento do risco de morte por infecções fúngicas e bacterianas (GOVINDARAJULU et al., 2010).

Os principais causadores de peritonite em pacientes submetidos à DP são as bactérias Gram-positivas, especialmente os estafilococos coagulase-negativos. Apesar do *Staphylococcus aureus* (*S. aureus)*, causar menos casos de peritonite, ele é geralmente associado com manifestações mais graves, gerando alto risco de hospitalização, remoção do cateter e morte (ZIMMERMAN et al., 1988; GOVINDARAJULU et al., 2010; PIRAINO, 2010, GIAROLA et al., 2012; HANKE, KIELIAN, 2012, DOTIS et al, 2012; SINANGIL et al, 2013)), principalmente em alguns países da América Latina, particularmente no Brasil (BARRETTI, 2012). A contaminação de cateteres peritoneais por *S. aureus* pode acontecer devido à internação do paciente em ambiente hospitalar, onde a disseminação da bactéria pode acontecer por via direta, por meio das mãos dos profissionais de saúde colonizados, e por via indireta, através do meio ambiente (OLSEN et al., 2013).

A bacteremia por *S. aureus* relacionada a cateter pode persistir e complicações podem desenvolver-se durante o tratamento, caso o cateter infectado não seja removido ou, caso o início do tratamento seja adiado (PARK et al, 2012). Por este motivo, *S. aureus* é um dos principias causadores de bacteremia em

pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva, principalmente por cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (SARM) (PRICE et al., 2010; VANDERKOOI et al., 2011).

Isto acontece, pois *S. aureus* está presente na microbiota nasal de aproximadamente 20% dos adultos saudáveis, o que faz com que haja grande risco de sua disseminação em ambiente hospitalar (OLSEN et al., 2012; WARREN, 2012; DIAWARA et al, 2014; JOHNSON et al, 2014). Devido a sua alta prevalência como microbiota nasal, *S. aureus* está relacionado à peritonite e à infecção no local de acesso do cateter em pacientes portadores nasais, principalmente devido à formação de biofilme, o que pode demonstrar contaminação por cepas presentes na pele, na mucosa nasal ou no ambiente hospitalar (DAVIES et al., 1989; ANNIGERI et al., 2001; SEGAL, MESSANA, 2013).

Evidências sugerem que a produção e secreção de IL-17 é essencial para uma defesa efetiva contra infecções cutâneas causadas por *S. aureus* (CHO et al, 2010), que pacientes com DM1 apresentam colonização nasal por *S. aureus* mais frequente do que pacientes não-diabéticos (RICH, LEE, 2005), e que pacientes que apresentam superinfecção cutânea por *S. aureus* produzem perfil de citocinas Th2, ou seja, com a produção de IL-4, IL-13 e IL-10, e consequentemente, diminuição de peptídeos antimicrobianos (CHO et al., 2010), devido a capacidade do peptideoglicano presente na parede celular da bactéria induzir o desenvolvimento de células Th2 (MATSUI, NISHIKAWA, 2012).

Normalmente, as células T mediariam à eliminação de *S. aureus* presente na mucosa nasal por meio de uma resposta T *helper* (Th) 17, facilitada por IL-17A e associada à migração de neutrófilos. Estudos sugerem que supressão de sinais pró-inflamatórios locais, facilitaria uma colonização persistente e transformaria o indivíduo em portador nasal (BROWN et al, 2014). Assim, durante a colonização nasal, *S. aureus* produz fator *clumping* B (ClfB) que se liga a loricrina presente na mucosa nasal, favorecendo a adesão bacteriana (SCHAFFER et al, 2006).

Além disso, a bactéria inibe a produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs), como, por exemplo, defensina humana β-3 (hβD-3), dificultando a resposta imunológica e facilitando a microinvasão da mucosa nasal (ZANGER et al., 2010); enquanto, as células apresentadoras de antígenos (APC) secretam IL-10, ativando linfócitos T regulatórios (Treg), suprimindo a resposta imunológica, e, portanto, permitindo colonização persistente (BROWN et al, 2014) (Figura1).

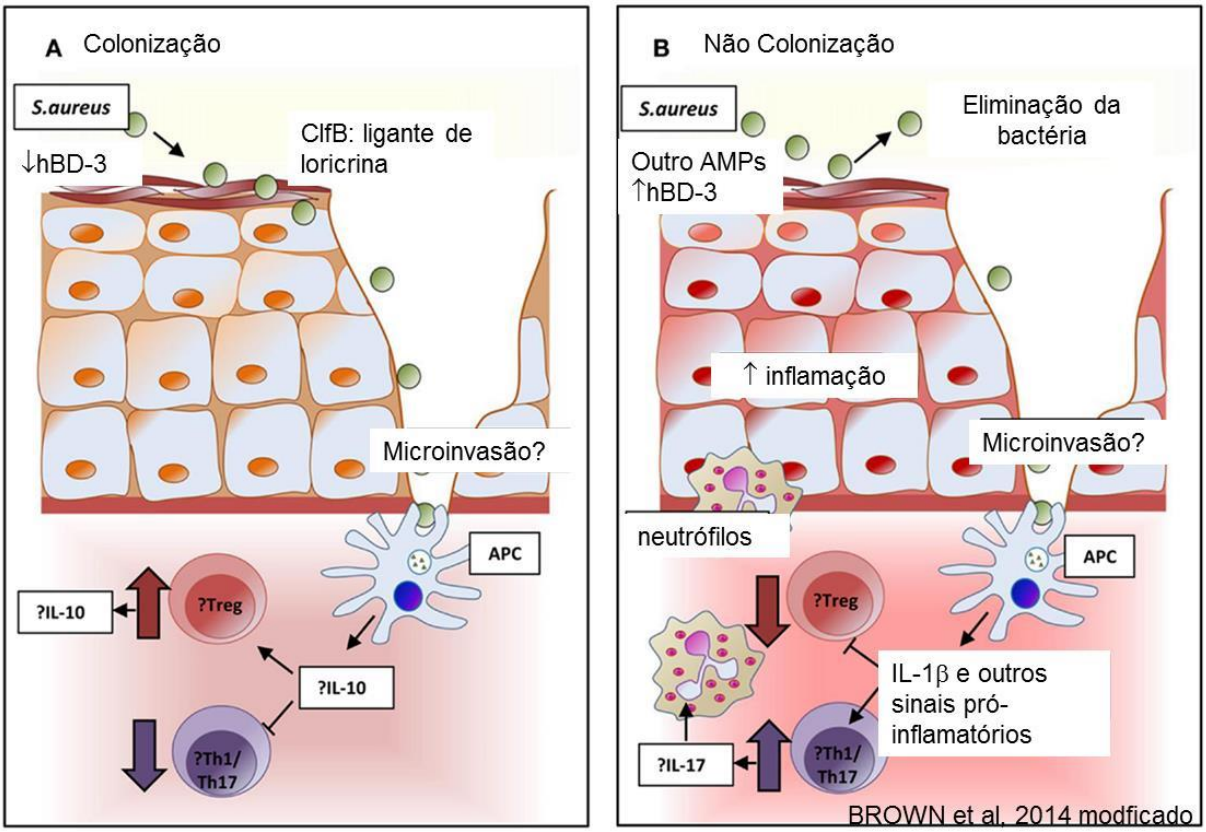


Figura 1. Modelo de imunomodulação resultante de colonização, persistente e não persistente, das narinas por *Staphylococcus aureus*. (A) Colonização: O epitélio nasal de indivíduos portadores de *Staphylococcus aureus (S.aureus)* favorece a colonização devido a concentração de ligantes como o Fator *clumping* B (ClfB), que se liga a loricrina presente na camada epitelial queratinizada das narinas, garantindo fixação bacteriana. Além disso, a bactéria leva a redução na concentração de peptídeos anti*m*icrobianos (AMPs), principalmente, Defensina humana B-3 (hBD-3), peptídeo anti-estafilocócico nas secreções nasais, dificultando a resposta imunológica. A interação entre células apresentadoras de antígenos (APC) locais e *S. aureus* pode gerar produção de interleucina (IL) 10 ativando linfócitos T regulatórios (Treg) e inibe linfócitos T *helper* (Th) 1 e Th17, resultando em supressão da resposta pró-inflamatória, permitindo colonização persistente.**(B) Não-colonização:** A secreção nasal apresenta níveis elevados de hBD-3 e AMPs, assim após a fagocitose as APCs produzem IL-1β e outros estímulos pró-inflamatórios que inibem linfócitos Treg e podem estimular linfócitos Th1 e Th17, a secretar IL-17, que atua sobre fagócitos, facilitando a eliminação bacteriana. (BROWN et al, 2014, modificado).

Enquanto, pacientes que não são portadores nasais, são capazes de produzir altas concentrações de hβD-3, pois suas APCs secretam IL-1β e outras citocinas pró-inflamatórias ativando Th1 e Th17, que secretam IL-17, estimulando a fagocitose e, consequentemente, a eliminação das bactérias pelos neutrófilos (ISHIGAME et al, 2009; FRODERMANN et al, 2011).

A presença de microbiota nasal interfere na capacidade do *S. aureus* fixar-se na mucosa, por exemplo, a presença de *Corynebacterium* spp inibe a colonização ao competir por nutrientes, enquanto, a presença de *Staphylococcus epidermidis*

induz a expressão de hβD-3 e hβD-2, levando a destruição da bactéria (JOHANNESSEN et al., 2012).

Além da colonização nasal, outros fatores favorecem o desenvolvimento da peritonite causada por *S. aureus*, entre eles a atuação da membrana peritoneal, durante o procedimento de diálise como um sítio imunocomprometido e a formação de um biofilme bacteriano no cateter (GIRARD et al., 2010; DAVIES, 2011; COSTERTON, 1995; SADOWSKA et al, 2013). Biofilme bacteriano é uma comunidade bacteriana complexa e estruturada, em que microrganismos encontram-se envoltos por uma matriz extracelular de polissacarídeos, aderidos entre si a uma superfície ou interface, como, por exemplo, a dispositivos médicos (COSTERTON, 1995), ou, até mesmo, a feridas crônicas presentes em pacientes diabéticos (SADOWSKA et al, 2013).

Em cateteres, *S. aureus* adere-se e sofre modificações fenotípicas como, por exemplo, o aumento da produção de matriz extracelular, formação de colônias com várias camadas e diminuição da taxa metabólica dificultando a resposta imunológica e o tratamento com antimicrobianos (GIRARD et al., 2010; DAVIES, 2011).

A resposta imunológica contra biofilmes de *S. aureus* é dificultada, pois as células do paciente formam uma matriz fibrótica acima do biofilme, dificultando o reconhecimento da bactéria pelos macrófagos (EDDIE et al, 2010; HANKE, KIELIAN, 2012). Além disso, as bactérias associadas ficam protegidas de variações ambientais que podem causar, por exemplo, desidratação (ANDERSON et al, 2013).

Uma resposta imune efetiva, ou seja, capaz de eliminar *S. aureus* é desencadeada por *Toll-like receptors* (TLR)-2, encontrados na superfície celular, e TLR-9, encontrados em compartimentos intracelulares, como, por exemplo, endossomos, que iniciam uma cascata de sinalização inflamatória eficiente que leva a destruição da bactéria (EDDIE et al, 2010).

Normalmente, a eliminação do *S. aureus* acontece quando padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) bacterianos extracelulares, como, por exemplo, ácido lipoteicoico e peptideoglicano ligam-se ao TLR-2 presente na superfície de macrófagos, levando a ativação do fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88) e, consequentemente do fator nuclear κB (NF-κB), gerando a ativação de macrófagos e a eliminação da bactéria (STRUNK et al., 2010). Existem duas outras vias de ativação de MyD88: a ligação de IL-1β a seu receptor existente na superfície

de macrófagos (THURLOW et al., 2011) e a ligação de PAMPs intracelulares, como por exemplo, ácido desoxirribonucleico extracelular ao TLR-9 encontrados nas membranas dos endossomos de macrófagos (RICE et al., 2007).

A ativação de TLR inicia uma série de eventos intracelulares envolvendo proteínas e fatores de transcrição como, por exemplo, a proteína ativadora (AP)-1, os fatores reguladores de interferon (IRF)-3 e NF-κB que transcrevem diversos genes que codificam citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, enzimas como, por exemplo, cicloxigenase 2 e óxido nítrico sintase indutível (iNOS) (AKIRA et al., 2001; TAKEDA et al., 2003).

No entanto, evidências demonstram que um mecanismo de evasão da resposta imune apresentado pelo biofilme é baseado em sua capacidade de dificultar o reconhecimento via TLR-2 e TLR-9. Isto pode ser explicado pela inacessibilidade ligante, uma vez que biofilmes são encerrados dentro de uma estrutura tridimensional complexa, com algumas bactérias livres expostas na superfície exterior, evitando, assim, a detecção por receptores expressos na superfície de fagócitos (HANK, KIELIAN, 2012).

Assim, uma resposta imune efetiva contra *S. aureus,* a bactéria extracelular Gram-positiva que nos últimos anos tem se tornado um enorme problema de saúde pública (FARAG et al, 2013), é baseada no recrutamento de neutrófilos que levam a eliminação desta bactéria (MATSUI, NISHIKAWA, 2012) e na ativação de certas subpopulações de linfócitos T (BANCHEREAU et al, 2012).

Durante o recrutamento, a ligação de receptores presentes na superfície dos neutrófilos com as selectinas (P-selectina e E-selectina) presentes no endotélio vascular, ativam vias de sinalização intracelular nos neutrófilos, modificando a conformação de integrinas e, consequentemente, diminuem a velocidade de rolamento dos neutrófilos (ZARBOCK, LEY, 2008), permitindo que eles entrem em contato com moléculas de adesão, como, por exemplo, molécula de adesão célula endotelial-plaqueta (PECAM)-1, molécula de adesão intracelular (ICAM)-1 e molécula adesão de célula vascular (VCAM)-1, alterando as junções das células endoteliais, o que gera retração celular e, consequentemente, permite sua migração para o tecido (COOK-MILLS, DEEM, 2005).

Por outro lado, a prevalência de infecções estafilocócicas invasivas é maior em diabéticos em comparação a pacientes não diabéticos, pois os neutrófilos de pacientes diabéticos apresentam função bactericida prejudicada e diminuição da

atividade fagocitária (JOSHI et al., 1999; PELEG et al., 2006). O mesmo panorama é encontrado em modelos experimentais, uma vez que os neutrófilos de ratos diabéticos apresentam baixa expressão de ICAM-1 e baixa produção de TNF-α e de IL-1β em comparação com neutrófilos de ratos não diabéticos (FERRACINI et al, 2010; HANSES et al, 2011).

1.5. Staphylococcus aureus e seus fatores de virulência

S. aureus é um coco Gram-positivo que faz parte da microbiota de seres humanos e atua como um importante patógeno humano, pois é responsável por uma grande variedade de infecções (MERRIMAN et al, 2014). Aproximadamente 40% dos seres humanos apresentam pele e mucosas colonizadas por *S. aureus* (MERRIMAN et al, 2014), sendo que 20% dos indivíduos devem apresentar colonização nasal persistente, enquanto 30% devem apresentar colonização nasal intermitente (POPOV et al, 2014).

Normalmente a fagocitose desencadeia ativação dos neutrófilos, levando a produção de espécies reativas de oxigênio e, consequentemente, a eliminação das bactérias, com posterior apoptose dos neutrófilos envolvidos e resolução da infecção. A presença de fatores de virulência bacterianos pode alterar a viabilidade dos neutrófilos, promovendo atraso no início da apoptose destas células ou citólise acelerada, facilitando a sobrevivência do patógeno e a promoção de doenças (RIGBY, DELEO, 2012).

Assim, a capacidade bacteriana de causar infecção é relacionada à expressão de fatores de virulência (NETSVYETAYEVA et al, 2014), cuja expressão é coordenada geneticamente (SAHUKHAL, ELASRI, 2014). Estes fatores de virulência facilitam a aderência do tecido, permitem evasão da resposta imunológica e mediam a lesão celular, causando inflamação, prejudicando a função de células imunológicas, alterando a coagulação sanguínea e comprometendo a integridade vascular (POWERS, WARDENBURG, 2014).

A fim de adaptar-se às características do hospedeiro, *S. aureus* possui muitas vias de sinalização que controlam a expressão dos genes que codificam estes fatores de virulência (GUILLET et al 2013). Além disso, sua expressão depende da

densidade populacional bacteriana e do ambiente de crescimento (MITCHELL et al, 2012). Por este motivo, entender a regulação dos fatores de virulência durante o crescimento em diferentes condições ambientais, como, por exemplo, no desenvolvimento de biofilmes, é essencial para a prevenção e tratamento de infecções estafilocócicas (SAHUKHAL, ELASRI, 2014).

Os principais fatores de virulência apresentados por *S. aureus* são proteínas que permitem sua adesão a componentes da célula hospedeira, como, por exemplo, Clf-A e Clf-B; fatores que permitem a evasão da resposta imune, como cápsula extracelular polissacarídica, inibidores de proteínas de quimiotaxia de neutrófilos e da cascata do complemento, proteínas de ligação a imunoglobulina e enzimas que permitem sua sobrevivência dentro do fagossomo de neutrófilos; e, invasinas (como, por exemplo, hialuronidase e estafiloquinase) e toxinas (como, por exemplo, enterotoxinas A e B, toxina α e leucocidina Panton-Valentine) que causam danos teciduais (ANDERSON et al., 2012). Os principais fatores de virulência do *S. aureus* são representados na Figura 2.

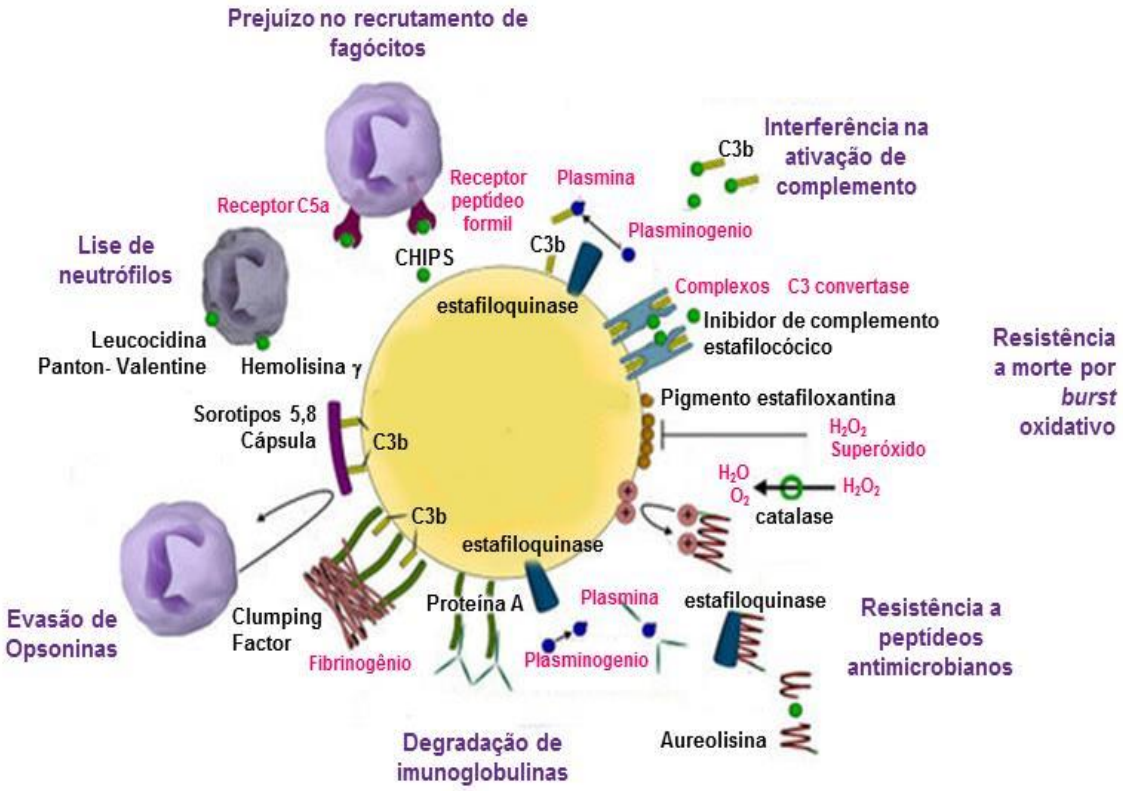


Figura 2. Principais fatores de virulência apresentados por *Staphylococcus aureus* que evitam sua eliminação por fagócitos. O recrutamento fagócito é inibido pela ligação de proteínas inibidoras de quimiotaxia de estafilococos (CHIPS) aos receptores de quimiocinas. A ativação do complemento é bloqueada pela inibição de C3 convertases por inibidor de complemento estafilocócico. O pigmento estafiloxantina cria um escudo antioxidante, enquanto a catalase consome o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerando água (H_2O) e oxigênio (O_2). A resistência a peptídeos antimicrobianos é proporcionada por modificações de carga positiva na parede celular, por proteólise mediada por aureolisina e por ligação da estafiloquinase. A proteína A liga-se ao domínio Fc de imunoglobulinas, enquanto que a ligação do fibrinogênio ao fator *clumping* e superfície da cápsula polissacarídica bloqueiam a ligação de opsoninas a superfície bacteriana e, consequentemente o reconhecimento por fagócitos. Hemolisina γ e leucocidina Panton-Valentine formam poros nas membranas de leucócitos. O plasminogênio transforma zimogênio em plasmina protease ativa, que pode degradar a opsonina C3b do sistema complemento e a porção de Fc de imunoglobulina (NIZET, BRADLEY, 2010, modificado).

A bactéria pode secretar toxinas que formam poros na membrana de células do sistema imune do hospedeiro, perturbando o equilíbrio osmótico e o potencial de membrana, levando à morte celular, como, por exemplo, leucocidina *Panton-Valentine* (PVL), cuja especificidade não é totalmente conhecida devido à ausência de determinantes nas células hospedeiras (ALONZO III et al, 2013). PVL é uma leucotoxina composta por duas proteínas secretadas separadamente, que atuam sinergicamente causando necrose tecidual e lise de leucócitos. Outras cepas produzem toxinas esfoliativas que podem causar desde síndrome da pele escaldada estafilocócica até mesmo impetigo bolhoso (NETSVYETAYEVA et al, 2014).

Outra toxina produzida por cepas de *S. aureus* é a toxina-α (α-hemolisina ou Hla) que apresenta atividade citolítica ou citotóxica dependendo da célula-alvo e de sua dosagem, assim altas doses causam necrose das células-alvo, enquanto doses mais baixas induzem apoptose ou resposta inflamatória nas células-alvo. Esta toxina é liberada por vesículas derivadas de membrana que se fundem a membrana da célula hospedeira, e permitindo a sobrevivência da bactéria nas células hospedeiras (THAY et al., 2013), uma vez que leva a fuga da bactéria do fagossomo (NIELSEN et al, 2014).

As principais adesinas expressas *S. aureus* são ClfA e ClfB e proteínas de ligação de fibronectina A e B, que após a ligação à célula hospedeira, ativam agregação plaquetária (VELOSO et al, 2013). Além de adesinas, a bactéria expressa proteases extracelulares que clivam proteínas específicas do hospedeiro e cadeias pesadas de imunoglobulinas humanas, contribuindo para a disseminação da bactéria (KOLAR et al, 2013).

Por outro lado, *S. aureus* pode expressar exotoxinas denominadas superantígenos, que apesar de sua estrutura comum, conseguem ligar-se simultaneamente ao complexo de histocompatibilidade principal tipo II e ao receptor de célula T presentes nos linfócitos, ativando diretamente grandes quantidades de linfócitos T e consequentemente gerando resposta sistêmica (XU, McCORNICK, 2012). Assim como, algumas moléculas conhecidas como *staphylococcal superantigen-like* (SSL) que se ligam a vários componentes da resposta imune inata por meio vários mecanismos, como, por exemplo, SSL3 que se liga a TLR-2, inibindo sua ativação (HERMANS et al., 2012).

A resistência a antibióticos β-lactâmicos apresentada pelas cepas SARM é devida a produção de proteína ligante de penicilina (PBP)-2', codificada pelo gene meticilina resistente *mecA*. Podemos dividir estas cepas em SARM, que apresentam resistência, e pré-SARM, que apresentam o gene *mecA*, mas são susceptíveis a meticilina graças a inibição da transcrição deste gene (ITO et al, 2001).

As cepas SARM tem se tornado cada vez mais frequentes em ambientes hospitalares. Entre os fatores risco para infecção hospitalar por SARM estão o período de hospitalização prolongado, uso de antibióticos prolongado e uso de dispositivos permanentes como, por exemplo, acessos e cateteres, onde há a formação de biofilme bacteriano (GERBER et al., 2009; CARVALHO et al., 2010).

Até mesmo cepas, que eram encontradas apenas em infecções de pele e tecidos moles na comunidade entre os pacientes sem fatores de risco clássicos, denominadas SARM associadas à comunidade, estão tornando-se cada vez mais frequentes. Estas cepas associadas à comunidade, embora resistentes à meticilina, são suscetíveis a muitas outras classes de drogas (VIDAL et al, 2009).

Uma forma de diferenciar as cepas SARM associadas à comunidade das cepas SARM multirresistentes presentes em hospitais é realizar o genótipo destas cepas, uma vez que as cepas associadas à comunidade apresentam menor quantidade de cassete cromossômico estafilocócico (SCC*mec*), elemento que carrega o gene *mecA* e presença de genes *lukSF-PV* para a PVL (SHUKLA et al, 2012). Apesar disto, estas cepas apresentam fatores de virulência como hemolisina-α, toxina formadora de poros que lisa células imunológicas, e modulinas fenol solúveis, peptídeos que recrutam e destroem neutrófilos humanos, permitindo evasão da resposta imunológica (NIELSEN et al, 2014).

1.6. Modelos experimentais de *diabetes mellitus*

A indução experimental de DM em modelos animais é essencial para a compreensão de sua patogênese. Além disso, estudos experimentais em animais apresentam a vantagem para 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).

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

A pirimidina conhecida como aloxana foi sintetizada em 1838 a partir da oxidação de ácido úrico. Em 1943, começou a ser utilizada em pesquisas relacionadas ao DM, quando Dunn e McLetchie demonstraram que ela era capaz de 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 e subcutânea (SZKUDELSKI, 2001).

A aloxana é largamente utilizada para a indução de DM1 em modelos animais (ROHILLA, ALI, 2012), uma vez que ela é uma droga hidrofílica e instável, com meia-vida é de apenas 90 segundos, tempo suficiente para permitir que destrua as células β pancreáticas, quando administrada por via endovenosa (LENZEN, MUNDAY, 1991). Isto acontece, pois ela entra na célula da mesma forma que a glicose utilizando o transportador de glicose (GLUT)-2 na membrana das células beta sendo levada até o citosol. O principal mecanismo atribuído à ação da aloxana é a suspensão da liberação de insulina induzida por glicose, pois ela inibe a ação da enzima glucoquinase (hexoquinase IV), que tem função de sensor de glicose nas células-beta causando um estado de diabetes dependente de insulina através da sua habilidade de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), resultando na necrose seletiva das células-beta (LENZEN, 2008).

Apesar disto, a aloxana não tem atividade tóxica para as células-beta pancreáticas do ser humano, provavelmente, devido à diferença existente entre os mecanismos de captação de glicose de humanos e roedores (ROHILLA, ALI, 2012).

Por outro lado, a STZ sintetizada por *Streptomycetes achromogenes*, pode ser utilizada para induzir experimentalmente DM1 e DM2, em dose única intravenosa ou em múltiplas doses baixas. Após sua entrada na célula via GLUT2, devido a sua atividade alquilante relacionada com a sua porção de nitrosoureia, ela leva a fragmentação do DNA das células β-pancreáticas, causando sua morte. Além disso, a STZ é um doador de óxido nítrico, que também danifica o DNA (ácido desoxirribonucleico) celular (SZKUDELSKI, 2001).

Tanto a aloxana quanto a estreptozotocina apresentam efeitos tóxicos; enquanto a aloxana, particularmente em altas doses, leva a necrose da célula tubular renal (LENZEN et al., 1996), a STZ apresenta toxicidade para células linfoides do baço e do timo (GAULTON et al., 1985).

A toxicidade linfoide causada pelo tratamento com STZ precede o aparecimento da hiperglicemia e se manifesta, até mesmo, em doses subdiabetogênicas, sendo que pode ser notada inversão imediata na taxa linfócito/neutrófilo no sangue periférico, com diminuição dos componentes linfoides (WELLHAUSEN, 1986), por este motivo esta droga não deve ser utilizada para

indução de DM1 em modelos experimentais utilizados para estudo de resposta imunológica.

1.7. Justificativa

O *diabetes* é uma das dez doenças que mais vitimam a população mundial (*WORLD HEALTHY ORGANIZATION* - WHO, 2013). Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2014, a prevalência global de *diabetes* foi estimada em 9% entre adultos acima de 18 anos (WHO, 2014a); enquanto em 2012, 1,5 milhões de mortes foram causadas diretamente por *diabetes*, sendo que mais de 80% das mortes por *diabetes* ocorreram em países de baixa renda (WHO, 2014b). Por outro lado, segundo estimativas da IDF, em 2013, o Brasil era o quarto país em número de casos de diabetes, entre 20 e 79 anos, no mundo todo (GUARIGUATA et al. 2014).

O DM causa complicações microvasculares (MOUTZOURI et al., 2008), que levam ao desenvolvimento de várias doenças, entre elas, a nefropatia diabética (GUARIGUATA et al., 2014; SBD, 2014-2015), que apesar de não ser a principal causa de morte (GUARIGUATA et al., 2014), é a principal complicação progressiva relacionada a DM, pois pode evoluir para falência renal com alta taxa de mortalidade (ZHANG et al., 2012; SLEE, 2012). Neste caso, a fim de melhorar a sobrevida e a qualidade de vida do paciente e diminuir as complicações relacionadas à falência renal, deve-se realizar TRS ou diálise (COOPER et al., 2010). No início do tratamento, a DP é mais vantajosa para o paciente, mas o desenvolvimento de problemas como, por exemplo, falência da ultra filtração, diálise insuficiente e peritonite, faz com que ela seja substituída pela HD (KIM, 2008; KOC et al, 2012).

Segundo estimativas, o Brasil é o terceiro país do mundo em número de pacientes em diálise, sendo que, em 2010, aproximadamente 90 mil pacientes provavelmente fizessem TRS, sendo que aproximadamente 10% realizavam DP (FIGUEIREDO et al., 2013), cuja principal complicação é a peritonite causada, principalmente, por *S. aureus* (BARRETI et al., 2012), que está presente na microbiota nasal de aproximadamente 20% dos adultos saudáveis (OLSEN et al., 2012; WARREN, 2012). Isto permite que *S. aureus* contamine cateteres formando biofilmes que prejudicam a resposta imunológica, pois dificultam seu

reconhecimento por macrófagos e PMNs (EDDIE et al, 2010; HANKE, KIELIAN, 2012).

Pacientes diabéticos apresentam disfunção imune (LERCO *et al*., 2003), que também pode ser observada em modelos experimentais (KIRSTEN, 2006). Isto acontece porque a hiperglicemia induz vários processos bioquímicos com implicações importantes, tornando as células mais vulneráveis ao estresse oxidativo, alterando o fluxo sanguíneo, a permeabilidade vascular e a tradução de fatores de transcrição, o resulta na modulação da expressão de citocinas e quimiocinas (KOJIMA et al, 2014). A disfunção endotelial, causada pela hiperglicemia, também pode modificar o recrutamento de leucócitos, tanto aumentando quanto diminuindo as interações entre leucócitos e células endoteliais (PETTERSSON et al, 2011).

Como característica comum, DM e DP apresentam: a concentração elevada de glicose no microambiente celular, sugerindo que possam compartilhar os caminhos que levam a lesão de células e tecidos. Assim, algumas evidências sugerem que os produtos de degradação da glicose em soluções de DP possam acelerar a apoptose dos leucócitos e que pacientes diabéticos sem controle glicêmico apresentam resposta imune prejudicada contra *S. aureus*, elevando a morbidade e mortalidade de pacientes diabéticos dialisados que apresentem infecção (SANTAMARIA et al, 2006).

A resposta inicial a peritonite é mediada por macrófagos e mastócitos peritoneais presente no peritônio, que após reconhecimento bacteriano pela ativação de TLR-2, secretam substâncias vasoativas, gerando vasodilatação e aumento da permeabilidade de vasos peritoneais, permitindo migração celular (YUNG, CHAN, 2012). E, uma resposta efetiva contra infecções peritoneais causadas por *S. aureus* acontece devido ao recrutamento de neutrófilos capazes de eliminar a bactéria (MATSUI, NISHIKAWA, 2012).

Existem evidências de que TLR-2 apresenta papel crucial na resposta imunológica a *S. aureus*, (PIETROCOLA et al., 2011), pois, neste caso, uma resposta efetiva é baseada na capacidade de leucócitos PMNs fagocitarem e destruírem a bactéria, em presença de concentrações ideais de citocinas pró-inflamatórias, como, por exemplo, IFN-γ, secretado pelos linfócitos Th1 (MCLOUGHLIN et al., 2008; HANSES, 2011). Além disso, outras citocinas são essenciais para a destruição da bactéria, como, por exemplo, a IL-1β produzida por monócitos estimulados por endotoxinas de bactérias Gram-positivas, que amplifica a

resposta ao induzir a produção de outras citocinas inflamatórias (PONGCHAROEN et al, 2011). Além de citocinas inflamatórias, a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular durante a infecção é essencial para a destruição da bactéria, pois permite a migração de leucócitos para o sítio de infecção, seguida por fagocitose e destruição intracelular do *S. aureus* (RIGBY, DELEO, 2012).

Sendo assim, ampliar o conhecimento sobre a resposta inflamatória na vigência de infecção peritoneal por *S. aureus* em indivíduos diabéticos é de fundamental relevância, pois isto permitiria contribuir para a discussão sobre o uso da insulina em pacientes com peritonite causada por *S. aureus*, a fim de melhorar a imunidade natural ou inibir os efeitos deletérios da inflamação.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Avaliar o papel da insulina sobre o curso da peritonite decorrente da infecção por *Staphylococcus aureus* em animais sadios e diabéticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Após aprovação deste projeto pela Comissão de Ética no Uso e Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Anexos I e II), foram solicitados ao Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade São Paulo (FCF-USP) ratos Wistar, machos, com peso inicial entre 200 e 350g e com idade entre 2 e 3 meses.

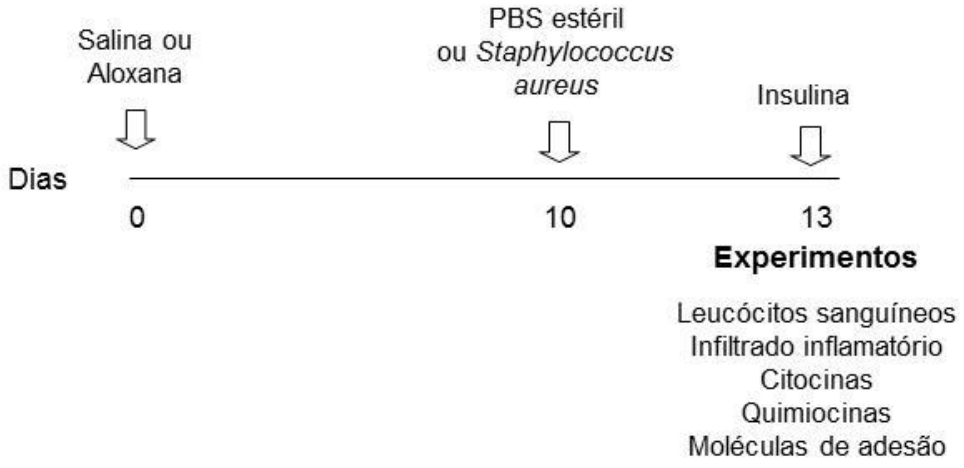
Os animais foram mantidos no Biotério FCF-USP, acondicionados em gaiolas coletivas, contendo no máximo cinco animais, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de 22ºC com controle de umidade relativado ar entre 45 a 65% e com suprimentos de água e alimento disponíveis todo o tempo.

Após um período de adaptação de sete dias, os animais foram separados em dois grupos: controle e diabético.

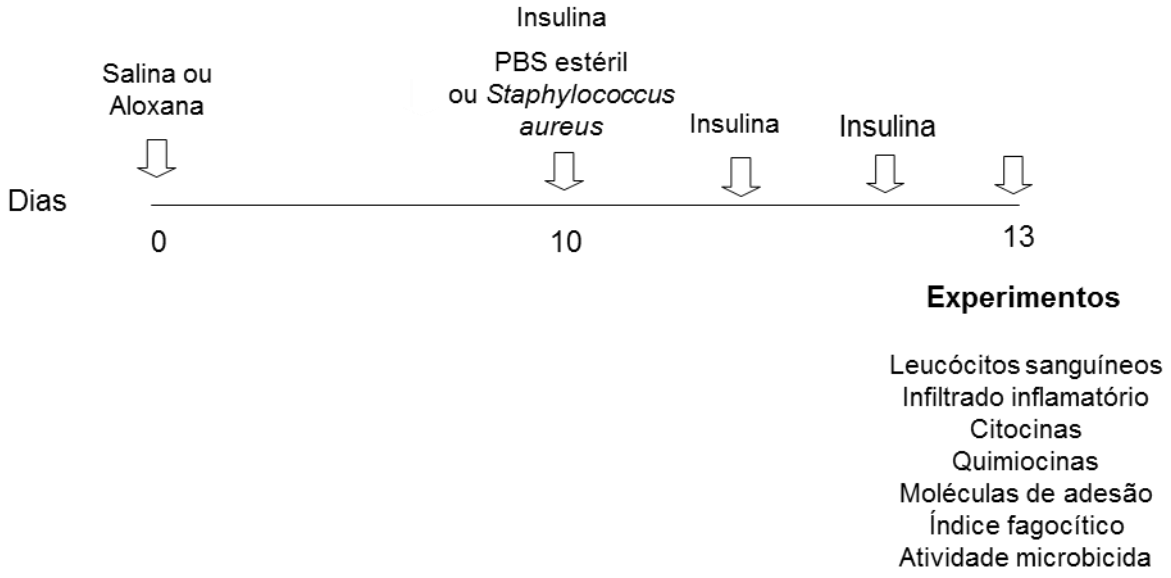
3.2. Delineamento experimental

Foram utilizados dois protocolos experimentais, que apresentam como principal diferença a forma como o tratamento dos animais com insulina foi realizado, que se encontram a seguir.

Protocolo experimental 1: Infecção Intraperitoneal por *Staphylococcus aureus*



Protocolo Experimental 2: infecção intraperitoneal de *Staphylococcus aureus*



3.3. Indução de *diabetes mellitus*

Os animais foram deixados em jejum de 12 horas antes da injeção de aloxana (grupo diabético) ou de solução salina (grupo controle).

Os animais do grupo diabético receberam uma injeção intravenosa (i.v.) de aloxana (42mg/kg) dissolvida em solução salina fisiológica estéril (LERCO et al,

2003), enquanto os animais do grupo controle receberam, pela mesma via de administração, volume equivalente de solução salina estéril. A glicemia dos animais foi determinada antes e depois da administração da solução de aloxana por um monitor de glicose (Accu-Chek Active, Roche, Brasil), utilizando-se amostras de sangue obtidas da extremidade da cauda dos animais. Somente foram utilizados para realização dos experimentos, os animais que 10 dias após a administração da solução de aloxana apresentavam glicemia superior a 200 mg/dL (MARTINS *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2010).

3.4. Indução de peritonite por *Staphylococcus aureus*

Para indução de peritonite foram utilizadas três cepas de *Staphylococcus aureus* gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).

As cepas utilizadas foram as seguintes: cepa *American Type Culture Collection* (ATCC) 25923, cepa N315 hemolisina α $(Hla)^+$ e cepa MR108 PVL^+. Estas cepas foram cultivadas aerobicamente a 37^oC em Tryptic Soy Broth (TSB) (Acumedia, USA). As culturas realizadas por 12 horas foram inoculadas 1:100 em TSB fresco e ficaram 2 horas sob agitação a 37°C. Estas culturas foram sedimentadas, lavadas e ressuspendidas em *phosphate buffered saline* (PBS) estéril para obter um inóculo de $5x10^9$ unidades formadoras de colônia por mL (CFU/mL) de acordo com a escala nefelométrica de Mac Farland (Nefelobac, Probac do Brasil, Brasil) (CALAME et al, 1995).

Os inóculos bacterianos foram injetados intraperitonealmente (i.p.) em parte dos animais, enquanto os animais controle receberam apenas o PBS estéril. Os animais infectados foram monitorados por três dias antes de serem eutanasiados para a realização do experimento (RAUCH et al., 2012).

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais Controle (C) e Diabético (D) que estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Descrição dos grupos experimentais

Grupo	**Injeção de Aloxana** (42mg/kg, i.v.)	**Salina Estéril** (1,0 ml, i.v.)	**Bactéria** ($5x10^9$ CFU/mL, i.p.)	**PBS Estéril** (0,5mL, i.p.)	**Insulina** (s.c.)
C_S	X	✓	X	✓	X
C_{ATCC}	X	✓	✓	X	X
$C_{ATCC+i1}$	X	✓	✓	X	✓
$C_{ATCC+i2}$	X	✓	✓	X	✓
C_{N315}	X	✓	✓	X	X
$C_{N315+i1}$	X	✓	✓	X	✓
$C_{N315+i2}$	X	✓	✓	X	✓
C_{MR108}	X	✓	✓	X	X
$C_{MR108+i1}$	X	✓	✓	X	✓
$C_{MR108+i2}$	X	✓	✓	X	✓
D_S	✓	X	X	✓	X
D_{ATCC}	✓	X	✓	X	X
$D_{ATCC+i1}$	✓	X	✓	X	✓
$D_{ATCC+i2}$	✓	X	✓	X	✓
D_{N315}	✓	X	✓	X	X
$D_{N315+i1}$	✓	X	✓	X	✓
$D_{N315+i2}$	✓	X	✓	X	✓
D_{MR108}	✓	X	✓	X	X
$D_{MR108+i1}$	✓	X	✓	X	✓
$D_{MR108+i2}$	✓	X	✓	X	✓

Sendo X animais não receberam o que está descrito; ✓ animais receberam o que está descrito; A= cepa ATCC 29325; N= cepa N315 Hla^+; M= cepa MR108 PVL^+; i1= tratamento com dose única de insulina; i2= tratamento com 4 doses de insulina.

3.5. Protocolos de tratamento com insulina

O tratamento com insulina foi realizado de duas formas diferentes apresentadas nos Protocolos Experimentais 1 e 2 e descritas a seguir.

No tratamento com dose única, os animais receberam 8 horas antes da eutanásia, insulina *neutral protamine Hagedorn* (NPH) por via subcutânea, sendo que os animais do grupo diabético receberam 4 unidades internacionais (UI), enquanto ratos não-diabéticos com peritonite causada por *Staphylococcus aureus*

receberam 1 UI pela mesma via. Os níveis glicêmicos foram determinados antes e 8 horas após o tratamento com insulina (DE OLIVEIRA MARTINS et al., 2006).

Por outro lado, no tratamento durante 3 dias após a infecção, os animais receberam insulina NPH por via subcutânea 2 horas antes da infecção peritoneal por *S. aureus* (grupo diabético, 4UI e grupo controle 1UI), às 17, os animais receberam metade destas doses e o mesmo acontece nos próximos 2 dias (DI PETTA et al., 2011). A eutanásia foi realizada 16 horas após a última dose de insulina (ANJOS-VALOTTA et al., 2006; DI PETTA et al, 2011, modificado). Neste caso, a glicemia foi determinada antes da eutanásia.

Para a determinação da glicemia, foram coletadas amostras de sangue obtidas da extremidade da cauda dos animais e foi utilizado um monitor de glicose (Accu-Chek Active, Roche, Brasil).

3.6. Monitoramento da peritonite

Para cada cepa, foram analisados os seguintes parâmetros: taxa de sobrevida, determinação da glicemia, variação de massa corpórea e contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos.

A taxa de sobrevida foi determinada, após a indução de peritonite, observando o número de mortes causadas por cada cepa de *S. aureus.*

Enquanto, 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 13º dia (3 dias após da indução de peritonite por *S. aureus*).

Então, os animais foram anestesiados com uma solução com cetamina (Ceva Santé Animale, Brasil) (100mg/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 da aorta abdominal 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 corticosterona e insulina

Após a coleta, por punção cardíaca, do sangue total por 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 -20ºC, utilizando *Rat Insulin Enzyme Immunoassay* (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, Bioteck, USA) e os resultados foram expressos em ng/mL.

Enquanto, a concentração sérica de corticosterona foi determinada em amostras de soro estocadas a -70ºC, utilizando *Corticosterone Immunoassay* (*Cayman Chemical Company*, MI, USA), que se baseia na capacidade da corticosterona, presente nas amostras de soro, em competir com a corticosterona ligada a fosfatase alcalina, pela ligação a um anticorpo específico. A leitura foi realizada a 405nm em leitora de microplacas (EPOK, Bioteck, USA) e os resultados foram expressos em pg/mL.

3.8. Obtenção do Lavado Peritoneal

Após a coleta de sangue total por punção cardíaca, o lavado peritoneal (LPe) foi coletado com o auxílio de uma seringa estéril inserida no peritônio, que foi lavado

com 10 mL de PBS estéril (10 mM; pH 7.4 a 4ºC) por 1 minuto (CALAME et al, 1995).

O lavado peritoneal obtido foi centrifugado a 500g, 4°C, por 10 minutos em centrifuga (5810R, Eppendorf, USA), seu sobrenadante foi separado, identificado e congelado para posterior dosagem de citocinas e quimiocinas.

As células foram ressuspensas em 1 mL de PBS estéril.

3.9. Contagem de células do lavado peritoneal

Para contagem do número total de células no lavado peritoneal, 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 brigth-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. Separação de macrófagos peritoneais

Os macrófagos peritoneais foram obtidos por lavagem peritoneal conforme descrito anteriormente, centrifugados a 500g por 10min e ressuspensos em meio RPMI-1640. Volumes da suspensão contendo 1x10^{6} células foram distribuídos em poços de placas de 96 poços e incubados em estufa a 37ºC, 5% CO_2 para adesão. Após duas horas, os poços foram lavados três vezes com RPMI morno e incubados em meio RPMI-1640 + soro fetal bovino 10% em estufa 37ºC, 5% CO_2 por 18h. Após um período de doze horas, as células foram lavadas por duas vezes para a remoção das células não aderidas.

3.11. Ensaio de atividade microbicida sobre *Staphylococcus aureus* pelo método do MTT

A atividade microbicida foi realizada para determinar a capacidade de sobrevivência da bactéria, dentro dos macrófagos peritoneais (PECK, 1985; OFEK et al., 2001; SEREZANI et al., 2005).

Para tanto, os macrófagos (10^6 céls/mL) distribuídos em placas de 96 poços, como descrito anteriormente, foram infectados com 100 µL de *S. aureus* com 5 horas de fase log (10^7 CFU/mL; proporção de infecção=50:1) em RPMI por 30min para permitir a fagocitose. Decorrido o tempo de fagocitose das bactérias, o meio RPMI foi removido e as células foram lavadas por três vezes com RPMI 37ºC para a remoção das bactérias não ingeridas.

Na placa controle, as células foram agitadas com 120µL de TSB (Difco, Detroit, Mich) suplementado com 5% de saponina (Sigma, St Louis, MO) por 1 min a 150rpm para que houvesse a lise dos macrófagos e, então, foi deixada a 4ºC por 90 min.

Enquanto, na placa experimental foi adicionado 100 uL de RPMI e a incubação durou 90 minutos a 37ºC para permitir a morte das bactérias ingeridas. Após este período, novamente as células foram lavadas com RPMI morno por três vezes, adicionou-se 120 µL de TSB suplementado com 5 % de saponina por 1 minuto sob agitação (150 rpm) para permitir citólise.

Após este procedimento, ambas as placas foram transferidas simultaneamente para a estufa a 37ºC por quatro horas para permitir o crescimento das bactérias remanescentes. Posteriormente, 15 µL de MTT [5 mg/mL; (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide); Sigma, St Louis, MO] foi adicionado aos poços; permanecendo por 20 minutos, sob agitação e protegido da luz. O cristal de formazan foi quantificado em espectrofotômetro com a determinação da absorbância (A600) que é o sal reduzido do MTT pelas bactérias viáveis. A densidade óptica é diretamente proporcional ao número de bactérias intracelulares presentes nos macrófagos. Os resultados foram expressos como porcentagem de sobrevivência de bactérias ingeridas, sendo que a sobrevivência de bactérias ingeridas = 100% x A600 placa controle/ A600 placa experimental.

3.12. Determinação da concentração de citocinas e quimiocinas no lavado peritoneal

As dosagens de citocinas pró-inflamatórias (IL1β, IL-6, TNF-α, IFN-γ), 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 µL/poço do anticorpo de captura, sendo anti-IL-1β (0,8 µg/mL), anti-TNF-α (4 µg/mL), anti-IL-10 (4 µg/mL), anti-IL-4 (2 µg/mL), anti-IFN-γ (2 µg/mL), anti-CINC-1 (0,4 µg/mL), anti-IL-6 (4 µg/mL), anti-CINC-2 (2 µg/mL), e anti-CINC-3 (2,0µg/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 µL/poço). Em seguida, foi realizada a reação de bloqueio adicionando-se 300 µL/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 IL1β, 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 IL-1β (350 ng/mL), 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 100µL/poço de uma solução de 10 mL tampão citrato com *ortho-phenylenediamine* (OPD) (1 tablete 10mg/placa) e 10µL 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

H_2SO_4 (2N), avaliando-se a densidade óptica das amostras a 495nm, imediatamente após o bloqueio da reação, em leitora de microplacas (EPOK, Bioteck, USA).

3.13. Avaliação de expressão de moléculas de adesão por imunoistoquímica

3.13.1. Fixação com formaldeído a 10% em placa de parafina

Após a anestesia, foi realizada uma laparotomia mediana para retirada do mesentério, que foi fixado com formaldeído a 10% em uma placa de parafina, onde permaneceu por aproximadamente 1 hora, a fim de distender-se, proporcionando uma melhor fixação. Posteriormente, foram retirados fragmentos que foram imersos em solução salina 0,9% e em álcool etílico absoluto, e em seguida, foram colocados diretamente sobre lâminas silanizadas.

As lâminas contendo os fragmentos de mesentério de ratos passaram pelo processo de reidratação em concentrações decrescentes de álcool etílico e foram lavadas em água corrente. Para recuperação antigênica, os cortes histológicos foram mergulhados em uma cuba, contendo tampão Tris (pH 7,6; 0,1 M) previamente aquecido a 96°C, que foi colocada dentro de uma panela a vapor onde permaneceu por 1 hora a 96° C. Para o bloqueio de peroxidase endógena, os cortes foram incubados com peróxido de hidrogênio a 1% por aproximadamente 30 minutos, à temperatura ambiente, e posteriormente, com solução aquosa de BSA a 1% durante 30 minutos, em câmara úmida, para bloquear as reações inespecíficas.

Para verificação da expressão de moléculas de adesão, os cortes foram incubados com diferentes anticorpos primários, anti-P-selectina (Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:50); anti-ICAM-1 (Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:50) e anti-PECAM-1 (Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:50), em câmara úmida, a 4ºC por 12 horas. Na sequência, os cortes foram incubados durante 1 hora, em câmara úmida a 37ºC, com os anticorpos secundários conjugados com peroxidase (Sigma Aldrich Company, diluição 1:500).

Posteriormente foi realizada a revelação da reação com uma solução contendo Tris-HCl (pH=7,6; 0,1M), peróxido de hidrogênio a 30% e 3,3 diaminobenzidina (DAB, Sigma Aldrich Company). Após a revelação, os cortes foram contracorados em Hematoxilina de Harris, desidratados e montados em resina

sintética (Entellan, MERCK). As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio de luz Nikon Eclipse 80i com o auxílio do programa de imagem NIS-Elements AR.

3.13.2. Fixação com acetona

Após a anestesia, o mesentério foi retirado, imerso em hexano e congelado em nitrogênio líquido. Cortes seriados de 8 mm feitos em criostato foram colocados em lâminas silanizadas. Para a verificação da expressão das moléculas de adesão, P-selectina, ICAM-1 e PECAM-1, nos microvasos mesentéricos, as amostras foram fixadas em acetona e expostos a 3% de peróxido de hidrogênio. O tampão de SuperBlock (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA) foi utilizado para bloquear os sítios não específicos (ZANONI et al., 2009).

Os cortes histológicos foram incubados por 12 horas a 4ºC com anticorpos anti-P-selectina (Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:50); anti-ICAM-1 (Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:50) e anti-PECAM-1 (Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:50), em câmara úmida, a 4ºC por 12 horas.

Na sequência, os cortes foram incubados durante 1 hora, em câmara úmida a 37ºC, com os anticorpos secundários conjugados com peroxidase (Sigma Aldrich Company, diluição 1:500).

Posteriormente foi realizada a revelação da reação com uma solução contendo Tris-HCl (pH=7,6; 0,1M), peróxido de hidrogênio a 30% e 3,3 diaminobenzidina (DAB, Sigma Aldrich Company). Após a revelação, os cortes foram contracorados em Hematoxilina de Harris, desidratados e montados em resina sintética (Entellan, MERCK). As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio de luz Nikon Eclipse 80i com o auxílio do programa de imagem NIS-Elements AR.

3.13.3. Quantificação de moléculas de adesão

Após a análise morfológica, utilizando o software NIS-Elements AR, a área positiva foi medida em (μm^2). O número máximo de vasos do mesentério por lâmina

foi fotografado, foi padronizado uma medida de diâmetros similares, para descartar a influência do calibre do vaso. Os resultados são expressos como a média do total/área de diâmetro para cada animal.

3.14. 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 $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Monitoramento do modelo experimental de *diabetes mellitus*

Em experimentos realizados com ratos machos da linhagem Wistar foi observado que 10 dias após a administração i.v. de aloxana (42mg/kg), os animais tornaram-se diabéticos e passaram apresentar perda de peso corporal e hiperglicemia (>200 mg/dL), enquanto o grupo controle apresentou normoglicemia, bem como apresentou ganho de peso corporal, no mesmo período (Figuras 3 e 4), demonstrando o desenvolvimento do *diabetes mellitus*.

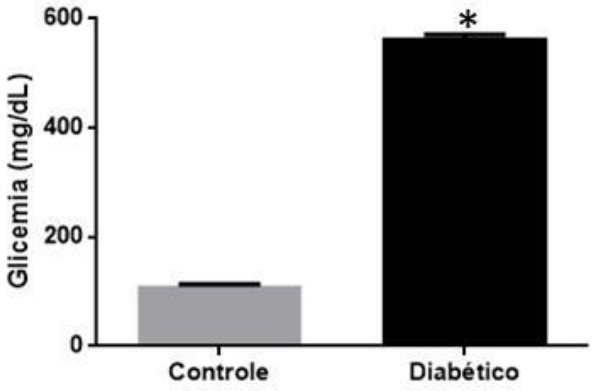


Figura 3. Determinação de glicemia. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42mg/kg, iv), 10 dias antes da indução de peritonite. Os valores representam a média ± e.p.m (49 animais por grupo). *****p<0,0001 vs controle.

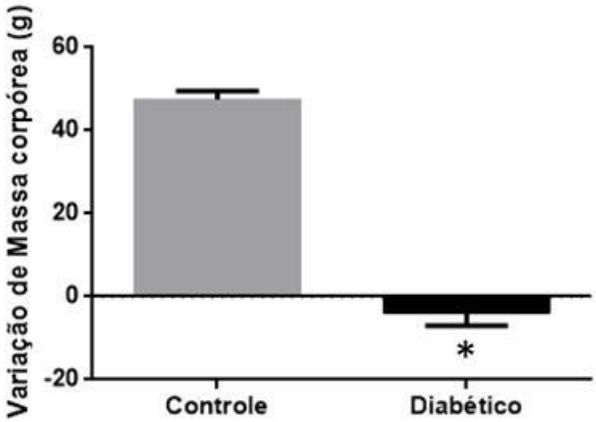


Figura 4. Determinação da variação de massa corpórea. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42mg/kg, iv), 10 dias antes da indução de peritonite. Os valores representam a média ± e.p.m (49 animais por grupo). *p<0,0001 vs controle.

4.2. Monitoramento da peritonite

Inicialmente durante a padronização dos experimentos, após a indução experimental de *diabetes mellitus*, para a indução de peritonite foram utilizadas três cepas diferentes de *S. aureus*: ATCC 25923, N315 Hla^+ e MR108 PVL^+.

Apesar disto, três dias após a indução da peritonite, a cepa MR108 PVL^+ causou nos 12 animais utilizados na padronização, severa hemorragia peritoneal; assim, os 6 animais diabéticos (50%) que a receberam foram a óbito, enquanto os 6 animais do grupo controle (50%) sobreviveram, mas apresentaram coagulação do lavado peritoneal, impossibilitando a sua obtenção para a quantificação das quimiocinas e das citocinas; por este motivo esta cepa foi retirada dos experimentos.

Assim, os experimentos foram realizados 3 dias após a injeção (i.p.) das cepas de *S. aureus* ATCC 25923 (ATCC) e N315 Hla^+ (N315), para tanto, foram utilizados 70 animais diabéticos (D) e controles (C) distribuídos em 10 grupos experimentais descritos anteriormente na Tabela 2.

4.3. Peritonite causada por cepa ATCC 25923 de *S. aureus*

A infecção não alterou o número total de leucócitos sanguíneos independentemente do tipo de tratamento de insulina utilizado, na vigência de peritonite causada pela cepa ATCC 25923 de *S. aureus* (Tabela 2).

Por outro lado, o grupo controle, não apresentou alterações na concentração de leucócitos no LPe, durante a infecção, independentemente do tratamento com insulina utilizado (Figura 5). Enquanto, no grupo diabético, a infecção (D_{ATCC}) aumentou o número de leucócitos no LPe em, aproximadamente, 350% em relação aos animais não infectados (D_S). O tratamento dos animais com insulina diminuiu a quantidade de leucócitos presentes no lado peritoneal, em relação ao grupo D_{ATCC}, sendo que, o tratamento com dose única de insulina ($D_{ATCC+i1}$), diminuiu em 55%; enquanto tratamento dos animais com 4 doses de insulina ($D_{ATCC+i2}$) diminuiu em 82% o número de leucócitos (Figura 5). Por outro lado, a cepa ATCC 25923, aumentou entre 2 e 3 vezes número de leucócitos no LPe dos animais diabéticos (D_{ATCC}) em relação ao grupo controle infectado por ATCC 25923 (C_{ATCC}) (Figura 5).

Tabela 2. Leucócitos sanguíneos de ratos diabéticos com infecção peritoneal pela cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles

Grupos	Células ($X10^3/mm^3$)					
	Totais	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Linfócitos	Monócitos
C_S	2,7 ± 0,2	0,5 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,1 ± 0,2	0,1 ± 0,0
C_{ATCC}	4,9 ± 0,3	1,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,6 ± 0,5	0,1 ± 0,0
$C_{ATCC+i1}$	3,7 ± 0,3	0,7 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,0 ± 0,3	0,0 ± 0,0
$C_{ATCC+i2}$	5,9 ± 0,8	1,2 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	4,7 ± 0,7	0,0 ± 0,0
D_S	3,4 ± 0,4	0,7 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,6 ± 0,3	0,1 ± 0,0
D_{ATCC}	4,1 ± 0,1	1,1 ±0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,9 ± 0,6	0,1 ± 0,0
$D_{ATCC+i1}$	2,9 ± 0,5	0,6 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,3 ± 0,3	0,0 ± 0,0
$D_{ATCC+i2}$	5,0 ± 0,6	1,6 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,2 ± 0,6	0,2 ± 0,1

Diabetes mellitus induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus.* Os animais foram tratados com insulina dose única (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m. (7 animais por grupo).

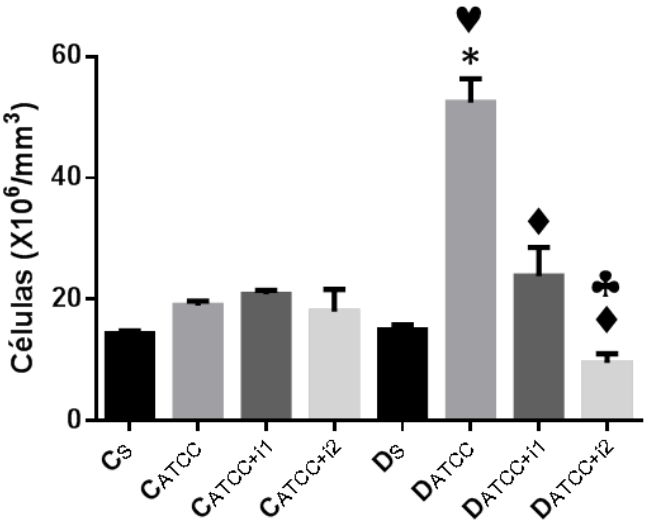


Figura 5. Contagem global absoluta de leucócitos no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m (7 animais por grupo). *p<0,001 vs C_{ATCC}; ♥p<0,001 vs D_S;♦p<0,001 vs D_{ATCC}; ♣p<0,01 vs $D_{ATCC+i1}$.

Não houve variação na contagem relativa de células polimorfonucleares (PMNs) e de mononucleares no LPe de animais do grupo controle; enquanto, a migração de células mononucleares nos animais diabéticos infectados (D_{ATCC}) foi entre 2 e 3 vezes maior do que nos animais diabéticos não infectados (D_S). O tratamento com insulina foi capaz de diminuir a migração de células mononucleares, em relação aos animais infectados e não tratados com insulina (D_{ATCC}); assim, enquanto, o tratamento com dose única de insulina ($D_{ATCC+i1}$) diminuiu em 60% a

migração, o tratamento com 4 doses de insulina ($D_{ATCC+i2}$) diminuiu a migração em 70% (Figura 6A).

Além disso, em ratos diabéticos, a infecção pela cepa ATCC 25923 (D_{ATCC}) aumentou a migração de PMNs em aproximadamente 440% em relação aos animais não infectados (DS), enquanto o tratamento de animais D_{ATCC} com dose única de insulina ($D_{ATCC+i1}$) diminuiu este número em aproximadamente 50% e o tratamento com 4 doses de insulina ($D_{ATCC+i2}$) diminuiu-o em aproximadamente 90%. Foi possível notar que animais diabéticos (D_{ATCC}) apresentaram migração de PMNs aproximadamente 3 vezes maior do que animais sadios (C_{ATCC}). Foi encontrada também diferença no número de PMNs dependendo do tratamento realizado com insulina, assim o tratamento com dose única ($D_{ATCC+i1}$) induziu migração celular entre 5 e 6 vezes maior do que com 4 doses de insulina ($D_{ATCC+i2}$) (Figura 6B).

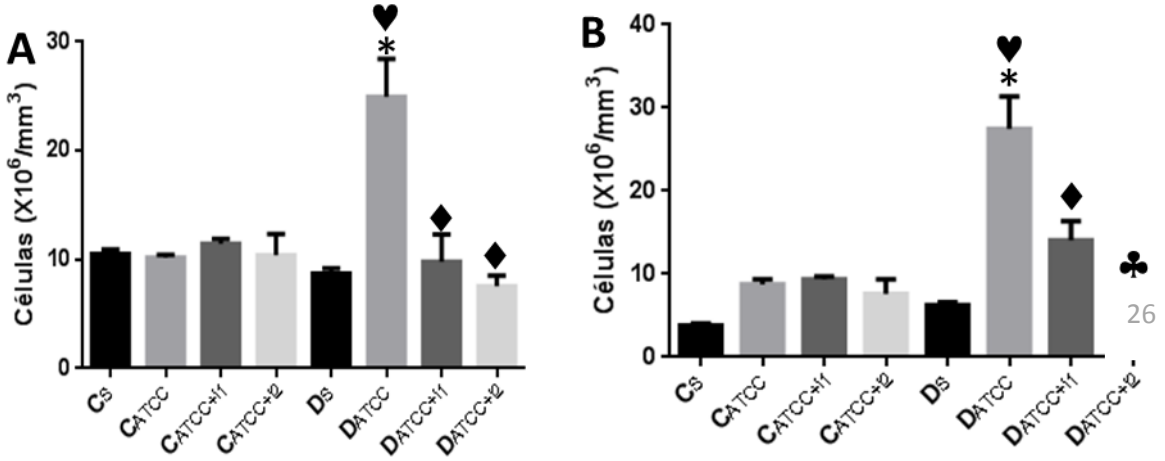


Figura 6. Contagem global relativa de leucócitos no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles. A. Contagem de Mononucleares. B. Contagem de Polimorfonucleares. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média± e.p.m (7 animais por grupo). *p<0,001 vs C_{ATCC}; ♥p<0,001 vs D_S;♦p<0,001 vs D_{ATCC}; ♣p<0,001 vs $D_{ATCC+i1}$.

A glicemia do grupo controle não foi alterada pelo tratamento com insulina (dose única ou 4 doses); enquanto no grupo diabético, o tratamento com dose única de insulina não alterou a glicemia e com 4 doses, embora tenha reduzido a concentração plasmática de glicose em 43% não foi suficiente para reduzi-la a níveis normais (Tabela 3). Determinando-se a insulinemia, verificou-se que os animais diabéticos exibiram redução de cerca de 3 vezes na concentração sérica de insulina, por comparação com os respectivos controles. O tratamento dos animais controle

com dose única de insulina ($C_{ATCC+i1}$) não alterou concentração sérica do hormônio e com 4 doses ($C_{ATCC+i2,}$), aumentou a concentração em 52% (Figura 7). Por outro lado, o tratamento dos animais diabéticos com dose única de insulina ($D_{ATCC+i1}$) aumentou em 2 vezes a concentração sérica do hormônio e com 4 doses ($D_{ATCC+i2,}$), aumentou a concentração em 4 vezes (Figura 7). Quanto à concentração sérica de corticosterona, não houve diferenças significativas após a infecção entre ratos controles e diabéticos ou após os diferentes tratamentos com insulina (Tabela 4).

Tabela 3. Glicemia dos ratos controles e diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* antes e após o tratamento com insulina

Animais	Glicemia (mg/dL)	
	Antes da insulina	Após a insulina
$C_{ATCC+ i1}$	110 ± 5	70 ± 6
$C_{ATCC+ i2}$	110 ± 4	95 ± 10
$D_{ATCC+ i1}$	568 ± 27	480 ± 74
$D_{ATCC+ i2}$	552 ± 18	312 ± 65*

Diabetes mellitus induzido por injeção de aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais receberam tratamento com insulina dose única (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m. (7 animais por grupo). ***** p<0,001 vs antes da insulina.

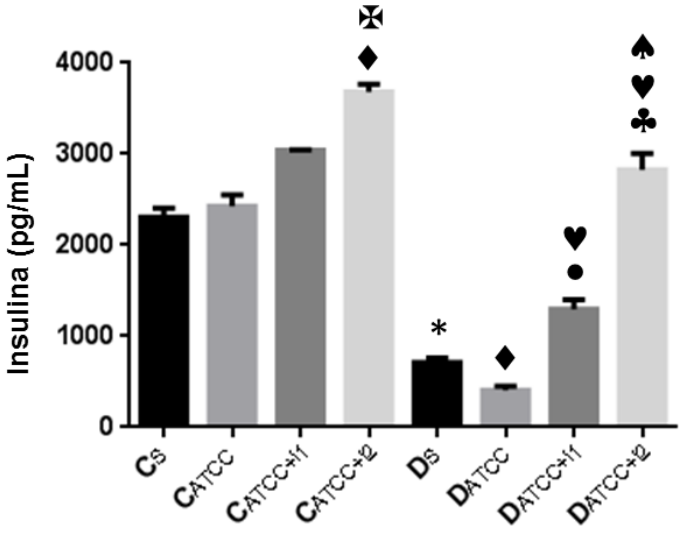


Figura 7. Determinação dos níveis séricos de insulina de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m. ∗p<0,001 vs C_S; ♦p<0,001 vs C_{ATCC}; ✠p<0,05 vs $C_{ATCC+i1}$; •p<0,001 vs $C_{ATCC+i1}$, ♣p< 0,001 vs $C_{ATCC+i2}$, ♥p< 0,001 vs D_{ATCC}, ♠p< 0,001 vs $D_{ATCC+i1.}$

Tabela 4 – Determinação dos níveis séricos de corticosterona de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 29523 de *S. aureus* e respectivos controles

	Corticosterona (pg/mL)
C_S	231,0 ± 10,3
C_{ATCC}	228,2 ± 4,7
$C_{ATCC+i1}$	211,4 ± 2,9
$C_{ATCC+i2}$	240,7 ± 2,9
D_S	230,5 ± 4,2
D_{ATCC}	214,4 ± 0,5
$D_{ATCC+i1}$	229,7 ± 8,3
$D_{ATCC+i2}$	219,4 ± 2,5

Diabetes mellitus induzido por injeção de aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais receberam tratamento com insulina dose única (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m. (5 animais por grupo).

O sobrenadante do lavado peritoneal foi utilizado para a determinação da concentração de citocinas pró-inflamatórias (IL1β, IL-6, TNF-α, IFN-γ, IL-12), de quimiocinas (CINC-1, CINC-2 e CINC-3) e de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) e são apresentadas a seguir.

A infecção de animais sadios com a cepa ATCC 25923 (C_{ATCC}) aumentou a produção de CINC-1 em aproximadamente 28,5 vezes, em relação aos animais não infectados (C_S). A produção de CINC-1 foi diminuída pelo tratamento com insulina em animais infectados, sendo que uma dose de insulina ($C_{ATCC+i1}$) diminuiu-a em aproximadamente 48%, enquanto o tratamento com 4 doses ($C_{ATCC+i2}$) diminuiu-a em aproximadamente 95%. Enquanto, em ratos diabéticos, a infecção pela cepa ATCC 25923 (D_{ATCC}) aumentou a produção de CINC-1 em aproximadamente 19 vezes quando comparada aos animais não infectados (D_S). Neste grupo, o tratamento com a insulina diminuiu a produção de CINC-1, sendo que uma dose de insulina ($D_{ATCC+i1}$) diminui-a em 16,7%, enquanto o tratamento com 4 doses de insulina ($D_{ATCC+i2}$) diminui-a em 96% (Figura 8).

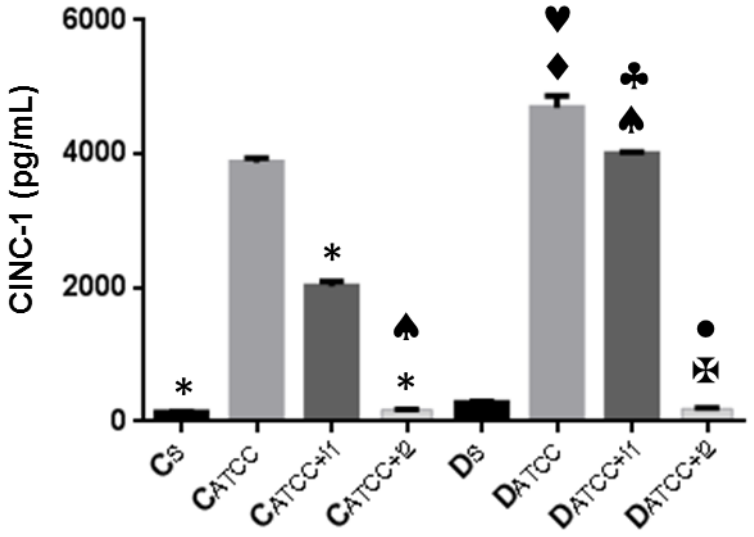


Figura 8. CINC-1 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m (7 animais por grupo). *p<0,001 vs C_{ATCC}; ♦p<0,01 vs C_{ATCC}; ♠p<0,001 vs $C_{ATCC+i1}$; ♥p<0,001 vs D_S; ♣p<0,05 vs D_{ATCC}; ✠ p<0,001 vs D_{ATCC}; •p<0,001 vs $D_{ATCC+i1}$.

A produção de CINC-2 por animais diabéticos foi maior do que a produção dos animais do grupo controle, independentemente da presença da bactéria ou do tipo de tratamento com insulina realizado. Assim, a produção de CINC-2 pelo grupo diabético não infectado (D_S) foi aproximadamente 8,3 vezes maior do que no grupo controle (C_S), enquanto a infecção de animais diabéticos (D_{ATCC}) com a bactéria aumentou sua produção em aproximadamente 6 vezes em relação ao grupo controle (C_{ATCC}). O tratamento com uma dose de insulina ($D_{ATCC+i1}$) não modificou a produção de CINC-2, porém o tratamento com 4 doses de insulina ($D_{ATCC+i2}$) diminuiu-a em 45% em relação aos animais diabéticos infectados (D_{ATCC}). Apesar disto, o tratamento com 4 doses ($D_{ATCC+i2}$) produziu 52% menos CINC-2 do que o tratamento com dose única ($D_{ATCC+i1}$) (Figura 9).

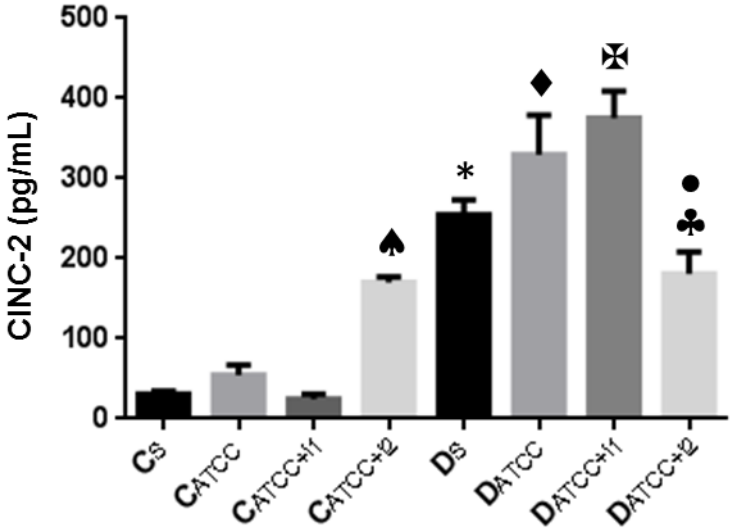


Figura 9. CINC-2 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m (7 animais por grupo). *p<0,05 vs C_S; ♦p<0,001 vs C_{ATCC}; ♠p<0,001 vs $C_{ATCC+i1}$; ✠ p<0,001 vs $C_{ATCC+i1}$; ♣p<0,01 vs D_{ATCC}; • p<0,001 vs $D_{ATCC+i1}$.

A produção de CINC-3 pelo grupo controle não infectado (C_S) não foi alterada pela infecção (C_{ATCC}), enquanto, o tratamento dos animais controle infectados com uma dose de insulina ($C_{ATCC+i1}$) aumentou a produção de CINC-3 em aproximadamente 37% em relação ao grupo infectado não tratado (C_{ATCC}). E, o tratamento dos animais infectados com 4 doses de insulina ($C_{ATCC+i4}$) não alterou a produção em relação ao grupo controle infectado (C_{ATCC}) (Figura 10).

A infecção dos animais diabéticos (D_{ATCC}) não alterou a produção de CINC-3, em relação aos diabéticos não infectados (D_S), porém o tratamento dos diabéticos infectados com uma dose de insulina ($D_{ATCC+i1}$) aumentou sua produção em aproximadamente 32,5% grupo diabético infectado (D_{ATCC}). O tratamento com 4 doses de insulina ($D_{ATCC+i1}$) não modificou a produção de CINC-3 (Figura 10).

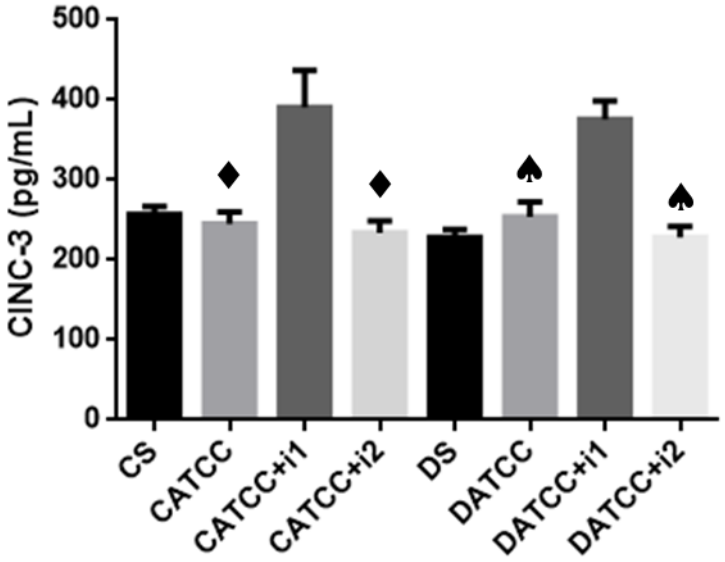


Figura 10. CINC-3 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m (7 animais por grupo). ♦p<0,01 vs $C_{ATCC+i1}$; ♠p<0,001 vs $D_{ATCC+i1}$.

No grupo controle não houve alteração na produção de IL-1β. Em ratos diabéticos, a infecção pela cepa ATCC 25923 (D_{ATCC}) aumentou em aproximadamente 13 vezes a produção de IL-1β em relação aos animais não infectados (D_S), enquanto, em relação ao grupo diabético infectado (D_{ATCC}), o tratamento com dose única de insulina ($D_{ATCC+i1}$) não a alterou e com 4 doses de insulina ($D_{ATCC+i2}$) aumentou-a em 42% (Figura 11).

Além disso, a produção de IL1-β foi 2,4 vezes maior no grupo diabético infectado (D_{ATCC}), 2,7 vezes maior no grupo diabético tratado com dose única de insulina ($D_{ATCC+i1}$) e 3,6 vezes maior no grupo diabético tratado com 4 doses de insulina ($D_{ATCC+i2}$), em relação a seus respectivos controles. Ao comparar os dois tratamentos, foi possível notar que no grupo controle não houve alteração; enquanto no grupo diabético o tratamento com 4 doses de insulina ($D_{ATCC+i2}$) aumentou em praticamente 55% a produção de IL-1β, em relação a produção gerada pelo tratamento com uma dose ($D_{ATCC+i1}$) (Figura 11).

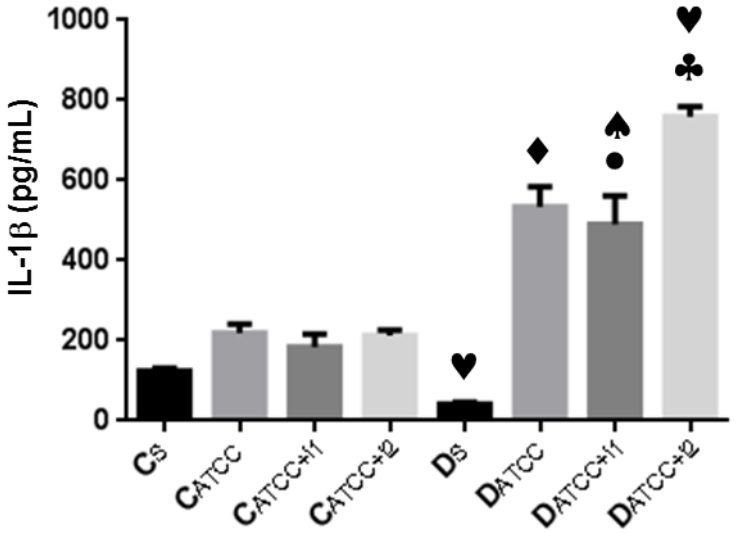


Figura 11. IL-1β no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m (5 animais por grupo). ♦p<0,001 vs C_{ATCC}; •p<0,001 vs C_{ATCC+1}; ♣p<0,001 vs $C_{ATCC+i2}$; ♥p<0,001 vs D_{ATCC}; ♠p<0,001 vs $D_{ATCC+i2}$.

A infecção de animais sadios com a cepa ATCC 25923 (C_{ATCC}), não alterou a produção de IL-6, em relação aos animais não infectados (C_S). Assim como o tratamento com uma dose de insulina ($C_{ATCC+i1}$) não foi capaz de alterar esta produção, enquanto, o tratamento com 4 doses de insulina ($C_{ATCC+i2}$) aumentou aproximadamente 467% a produção de IL-6. Da mesma forma, em ratos diabéticos, a infecção pela cepa ATCC 25923 (D_{ATCC}) e o tratamento com uma dose de insulina ($D_{ATCC+i1}$) não alteraram a produção de IL-6 em relação aos animais não infectados (D_S), enquanto o tratamento com 4 doses de insulina ($D_{ATCC+i2}$) aumentou 7,6 vezes a produção, em relação ao grupo diabético infectado (D_{ATCC}) (Figura 12).

Além disso, o tratamento com 4 doses de insulina, nos dois grupos (sadio e diabético), aumentou a produção de IL-6 em relação ao tratamento com uma dose de insulina. Comparando o efeito do tratamento com 4 doses de insulina no grupo sadio ($C_{ATCC+i2}$) e no grupo diabético ($D_{ATCC+i2}$), é possível notar os animais diabéticos apresentaram aproximadamente o dobro da produção de IL-6 (Figura 12).

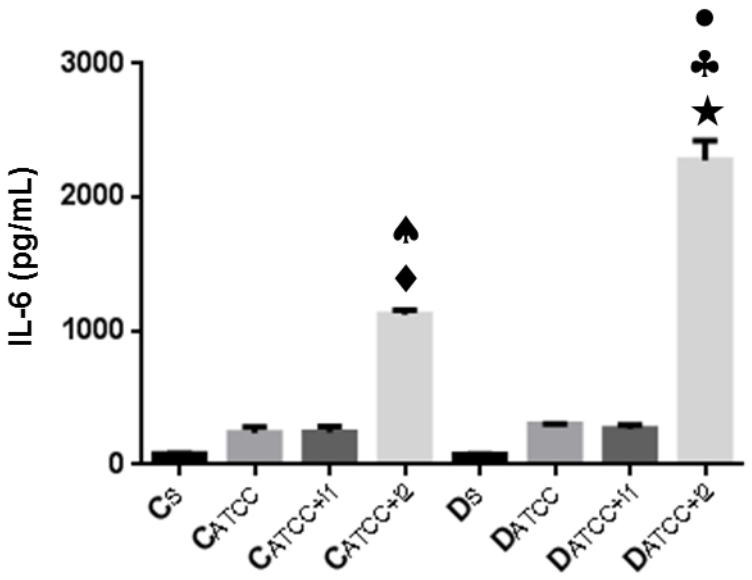


Figura 12. IL-6 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m (7 animais por grupo). ♦p<0,001 vs $C_{ATCC+i2}$; ♠p<0,001 vs $C_{ATCC+i1}$; ★p<0,001 vs D_{ATCC}; ♣p<0,001 vs C_{ATCC}; • p<0,001 vs $D_{ATCC+i1}$.

Em animais sadios, a infecção de com a cepa ATCC 25923 (C_{ATCC}) não alterou a produção de TNF-α, em relação aos animais não infectados (C_S). O tratamento com uma dose de insulina ($C_{ATCC+i1}$) não alterou esta produção, enquanto, o tratamento com 4 doses de insulina ($C_{ATCC+i2}$) aumentou aproximadamente 3,3 vezes a produção de TNF-α. Em ratos diabéticos, a infecção pela cepa ATCC 25923 (D_{ATCC}) não alterou a produção de TNF-α em relação aos animais não infectados (D_S), assim como o tratamento com dose única de insulina ($D_{ATCC+i1}$). A produção de TNF-α aumentou 2,7 vezes com o tratamento com 4 doses de insulina ($D_{ATCC+i2}$), em relação ao grupo diabético infectado (D_{ATCC}) (Figura 13).

Além disso, a produção de TNF-α foi 39% menor no grupo diabético infectado (D_{ATCC}) e 48% menor no grupo diabético tratado com 4 doses de insulina ($D_{ATCC+i2}$), em relação a seus controles, respectivamente C_{ATCC} e $C_{ATCC+i2}$. Ao comparar os dois tratamentos, foi possível notar que no grupo controle, o tratamento com 4 doses de insulina ($C_{ATCC+i2}$) produziu mais 4,3 vezes mais TNF-α, do que o tratamento com uma dose ($C_{ATCC+i1}$); enquanto no grupo diabético o tratamento com 4 doses de insulina ($D_{ATCC+i2}$) praticamente dobrou a produção de TNF-α, em relação a produção gerada pelo tratamento com uma dose ($D_{ATCC+i1}$) (Figura 13).

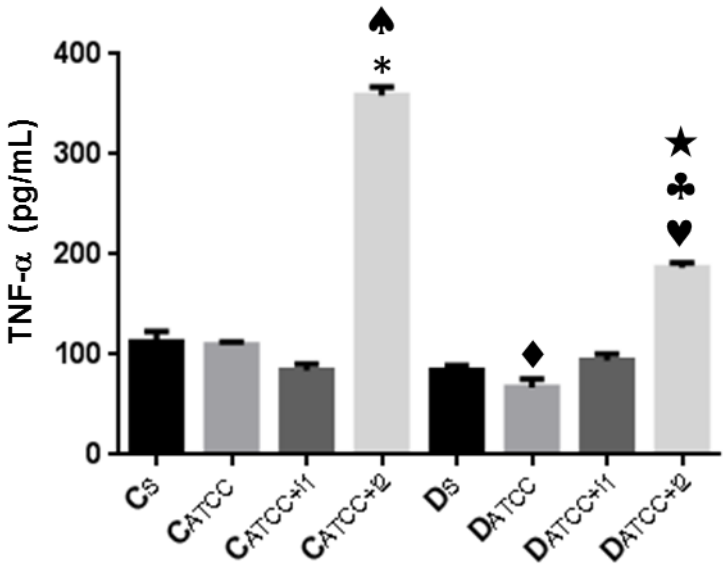


Figura 13. TNF-α no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m (7 animais por grupo). *p<0,001 vs C_{ATCC}; ♠p<0,001 vs C_{ATCC+1}; ♦p<0,05 vs C_{ATCC}; ♥p<0,001 vs $C_{ATCC+i2}$; ♣p<0,001 vs D_{ATCC}; ★p<0,001 vs $D_{ATCC+i1}$.

Em animais sadios, a infecção de com a cepa ATCC 25923 (C_{ATCC}) aumentou, aproximadamente, 2,8 vezes a produção de INF-γ, em relação aos animais não infectados (C_S). O tratamento com uma dose de insulina ($C_{ATCC+i1}$) não alterou esta produção, enquanto, o tratamento com 4 doses de insulina ($C_{ATCC+i2}$) aumentou aproximadamente 9,6 vezes a produção de IFN-γ. Em ratos diabéticos, a infecção pela cepa ATCC 25923 (D_{ATCC}) aumentou 2,8 vezes a produção de INF-γ em relação aos animais não infectados (D_S). Em relação ao grupo não tratado (D_{ATCC}), a produção de IFN-γ foi modificada pelos tratamentos com insulina da seguinte forma: o tratamento com dose única ($D_{ATCC+i1}$) diminuiu a produção em 30%, enquanto o tratamento com 4 doses ($D_{ATCC+i2}$) aumentou 2,2 vezes a produção (Figura 14).

Além disso, o tratamento com 4 doses de insulina, em animais sadios ($C_{ATCC+i2}$) e diabéticos ($D_{ATCC+i2}$), aumentou a produção de IFN-γ em relação aos animais tratados com uma dose de insulina, $C_{ATCC+i1}$ e $D_{ATCC+i1}$, respectivamente, 2,6 vezes e 3,1 vezes (Figura 14).

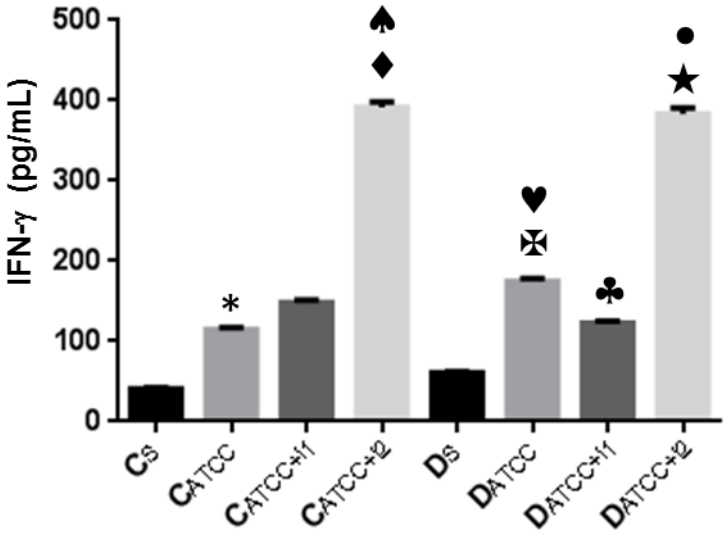


Figura 14. INF-γ no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valore s representam a média ± e.p.m (7 animais por grupo). *p<0,001 vs C_S; ♦p<0,001 vs C_{ATCC}; ♠p<0,001 vs C_{ATCC+1}; ♥p<0,001 vs D_S; ✠p<0,001 vs C_{ATCC}; ♣p<0,05 vs D_{ATCC}; ★p<0,001 vs D_{ATCC}; • p<0,001 vs $D_{ATCC+i1}$.

Em animais sadios, a infecção de com a cepa ATCC 25923 (C_{ATCC}) não modificou a produção de IL-12, em relação aos animais não infectados (C_S). O tratamento com uma dose de insulina ($C_{ATCC+i1}$) também não alterou esta produção, enquanto, o tratamento com 4 doses de insulina ($C_{ATCC+i2}$) diminuiu aproximadamente a metade a produção de IL-12. Em ratos diabéticos, a infecção pela cepa ATCC 25923 (D_{ATCC}) diminuiu em 40% a produção de Il-12 em relação aos animais não infectados (D_S), e o tratamento com uma ($D_{ATCC+i1}$) ou 4 doses de insulina ($D_{ATCC+i2}$) não modificou esta produção (Figura 15).

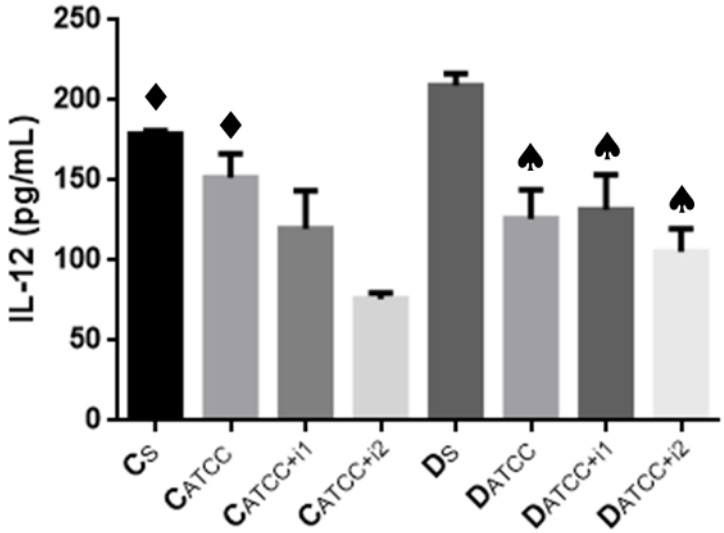


Figura 15. IL-12 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valore s representam a média ± e.p.m (7 animais por grupo). ♦p<0,001 vs $C_{ATCC+i2}$; ♠p<0,001 vs D_S.

A infecção de animais sadios com a cepa ATCC 25923 (C_{ATCC}) aumentou, aproximadamente, 9,3 vezes a produção de IL-4, em relação aos animais não infectados (C_S). O tratamento com uma dose de insulina ($C_{ATCC+i1}$) aumentou em 37% a produção de IL-4, enquanto o tratamento com 4 doses ($C_{ATCC+i2}$) não a alterou. Enquanto, em ratos diabéticos, a infecção pela cepa ATCC 25923 (D_{ATCC}) aumentou a produção de IL-4 em, aproximadamente, 8 vezes quando comparada aos animais não infectados (D_S). Em relação ao grupo diabético infectado (D_{ATCC}), a produção de IL-4 aumentou aproximadamente, 2,6 vezes com o tratamento com uma dose de insulina ($D_{ATCC+i1}$) (Figura 16).

Comparando o efeito do tratamento com dose única de insulina no grupo sadio ($C_{ATCC+i1}$) e no grupo diabético ($D_{ATCC+i1}$), é possível notar o grupo diabético produziu aproximadamente o dobro de IL-4 (Figura 16).

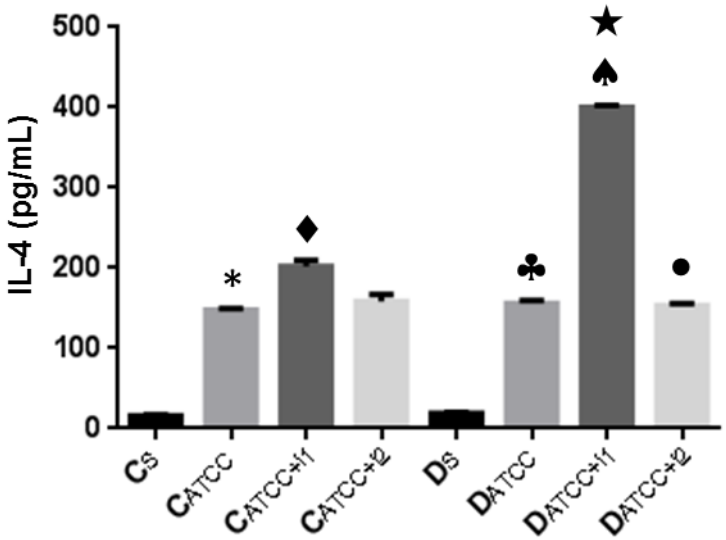


Figura 16. IL-4 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m (7 animais por grupo). *p<0,001 vs C_S; ♦p<0,05 vs C_{ATCC}; ♣p<0,001 vs D_S; ♠p<0,001 vs C_{ATCC+1}; ★p<0,001 vs D_{ATCC}; • p<0,001 vs $D_{ATCC+i1}$.

A produção IL-10 não apresentou diferenças significativas entre os grupos estudados e encontra-se na tabela 5.

Tabela 5. Dosagem de IL10 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles

	IL-10 (pg/mL)
C_S	203,5 ± 29,7
C_{ATCC}	153,1 ± 31,1
$C_{ATCC+i1}$	111,7 ± 6,4
$C_{ATCC+i2}$	168,6 ± 27,0
D_S	175,8 ± 23,6
D_{ATCC}	151,1 ± 31,1
$D_{ATCC+i1}$	109,2 ± 3,4
$D_{ATCC+i2}$	152,2 ± 19,4

Diabetes mellitus induzido por injeção de aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais receberam tratamento com insulina dose única (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m. (7 animais por grupo).

Os resultados para expressão de P-selectina e PECAM-1 no endotélio vascular do mesentério de animais controle e diabéticos, após o tratamento com dose única de insulina, são apresentados a seguir. Para este tratamento, a expressão de ICAM-1 não foi realizada por problemas técnicos.

A infecção com a cepa ATCC 25923 levou a expressão de P-selectina no endotélio vascular do mesentério de animais dos grupos controle (C_{ATCC}) e diabético (D_{ATCC}), o que não aconteceu nos grupos não infectados (C_S e D_S). O tratamento com dose única de insulina ($C_{ATCC+i1}$) manteve a expressão de P-selectina (Figura 17).

Enquanto, os animais do grupo controle não infectados (C_S), assim como, os infectados (C_{ATCC}) e os tratados com dose única de insulina ($C_{ATCC+i1}$) expressaram PECAM-1 no endotélio vascular do mesentério. No grupo diabético, o tratamento com dose única de insulina ($D_{ATCC+i1}$) estimulou a expressão de PECAM-1 no endotélio vascular do mesentério (Figura 18).

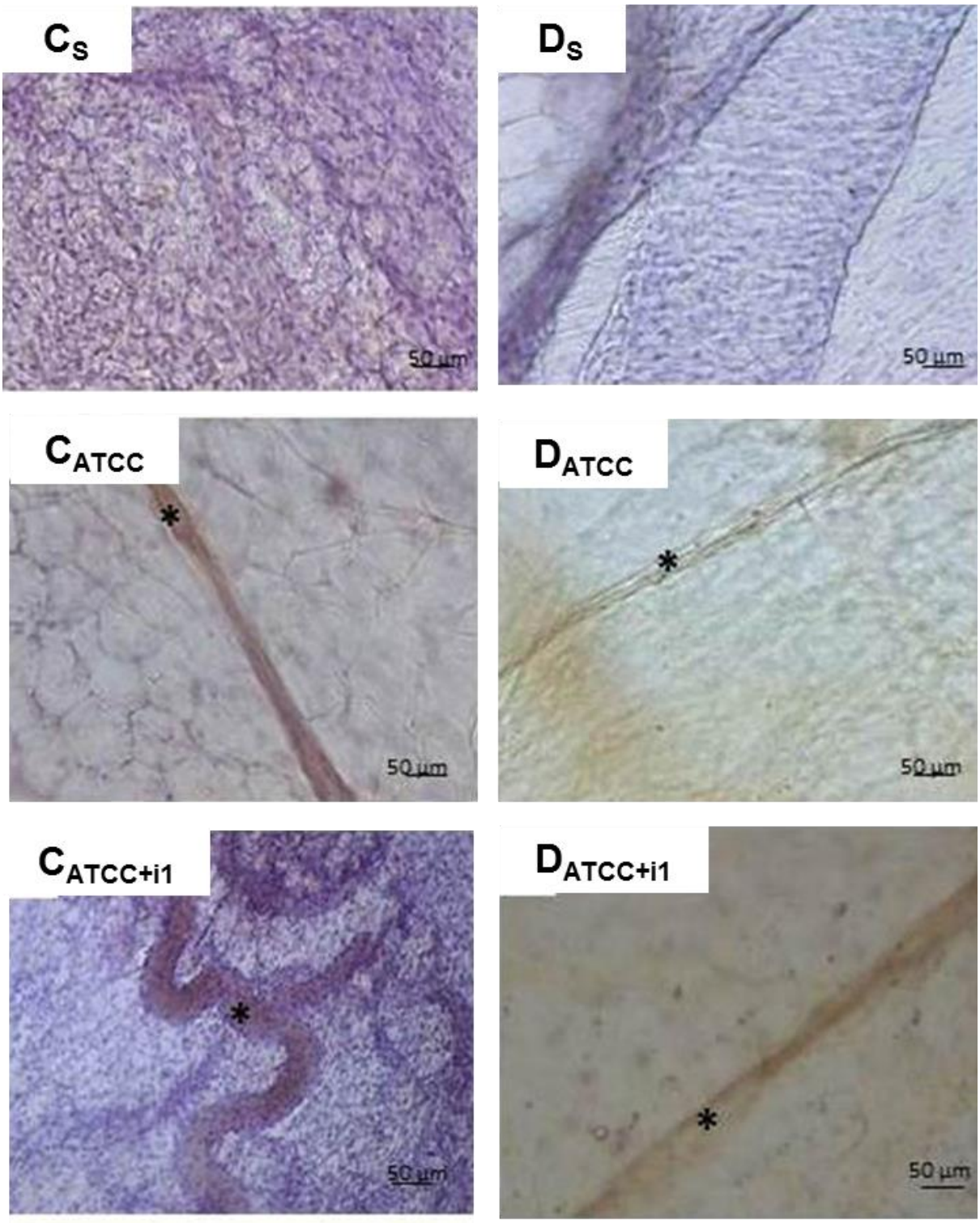


Figura 17. Marcação por imunohistoquímica para P-selectina em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com dose única de insulina. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1). Fragmentos obtidos de mesentério. (*) Imunomarcação positiva para P-selectina em endotélio vascular (coloração castanha). (Barra= 50µm).

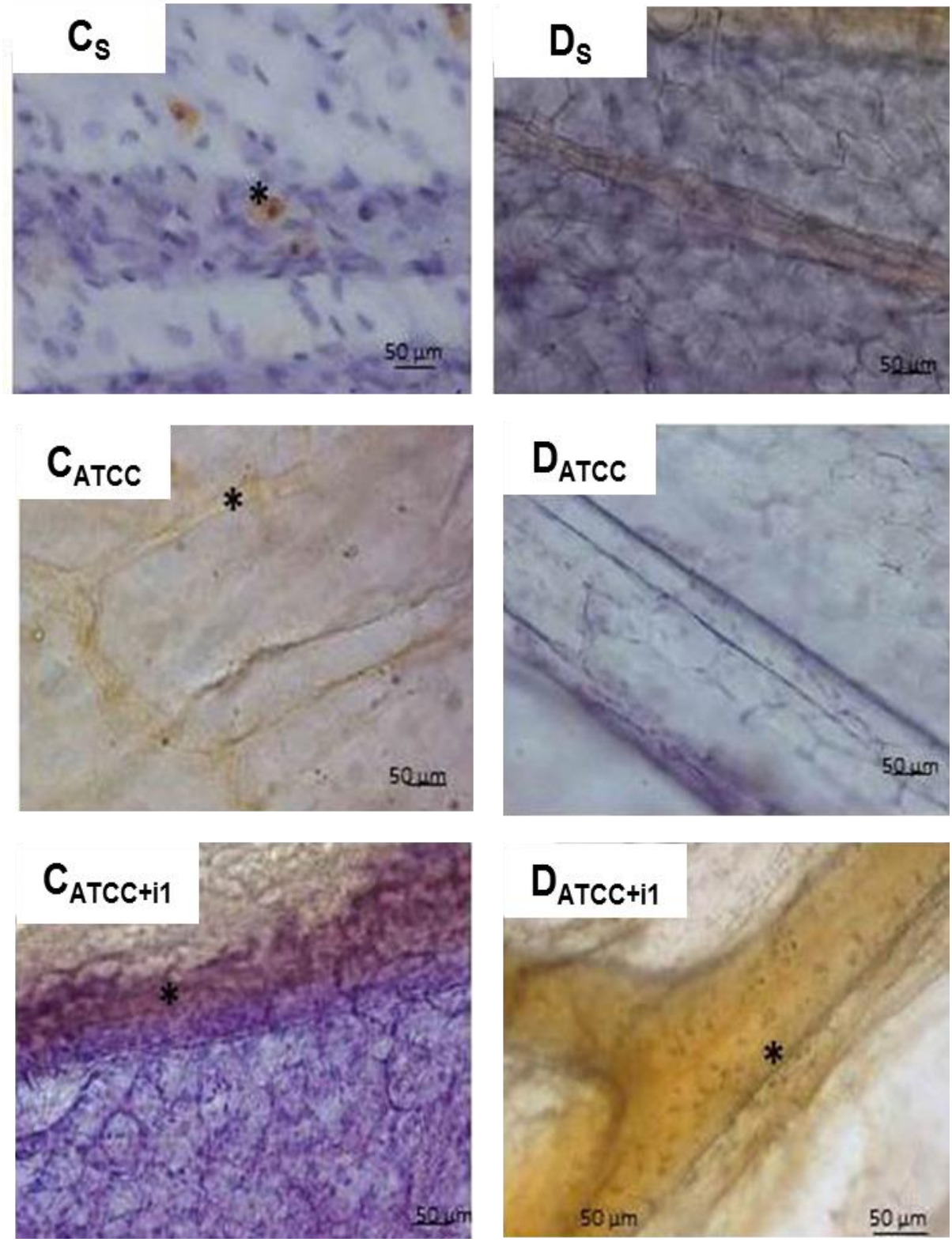


Figura 18. Marcação por imunohistoquímica para PECAM-1 em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com dose única de insulina. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1). Fragmentos obtidos de mesentério. (*) Imunomarcação positiva para PECAM-1 em endotélio vascular (coloração castanha). (Barra= 50µm).

A expressão de PECAM-1, ICAM-1 e P-selectina no endotélio vascular do mesentério de animais controles e diabéticos, após o tratamento com 4 doses de insulina, é apresentada a seguir.

No grupo controle, a infecção com a cepa ATCC 25923 gerou a expressão de PECAM-1 no endotélio vascular do mesentério (C_{ATCC}), o que não aconteceu nos grupos não infectados (C_S), sendo que o tratamento com 4 doses de insulina ($C_{ATCC+i2}$) manteve a expressão de PECAM-1; enquanto nos animais diabéticos não houve expressão desta molécula de adesão (Figura 19).

Corroborando com esses resultados, a quantificação de PECAM-1, mostra que, os valores em μm^2 observados ao redor do endotélio do mesentério do grupo controle infectado com a cepa ATCC 25923 (C_{ATCC}) foi 170 vezes maior do que nos animais não infectados (C_S). Após a administração de 4 doses de insulina ($C_{ATCC+i2}$) houve diminuição dos valores em 58%. Enquanto nos animais diabéticos não houve a expressão de PECAM-1 após a infecção ou o tratamento com 4 doses de insulina (Figura 20).

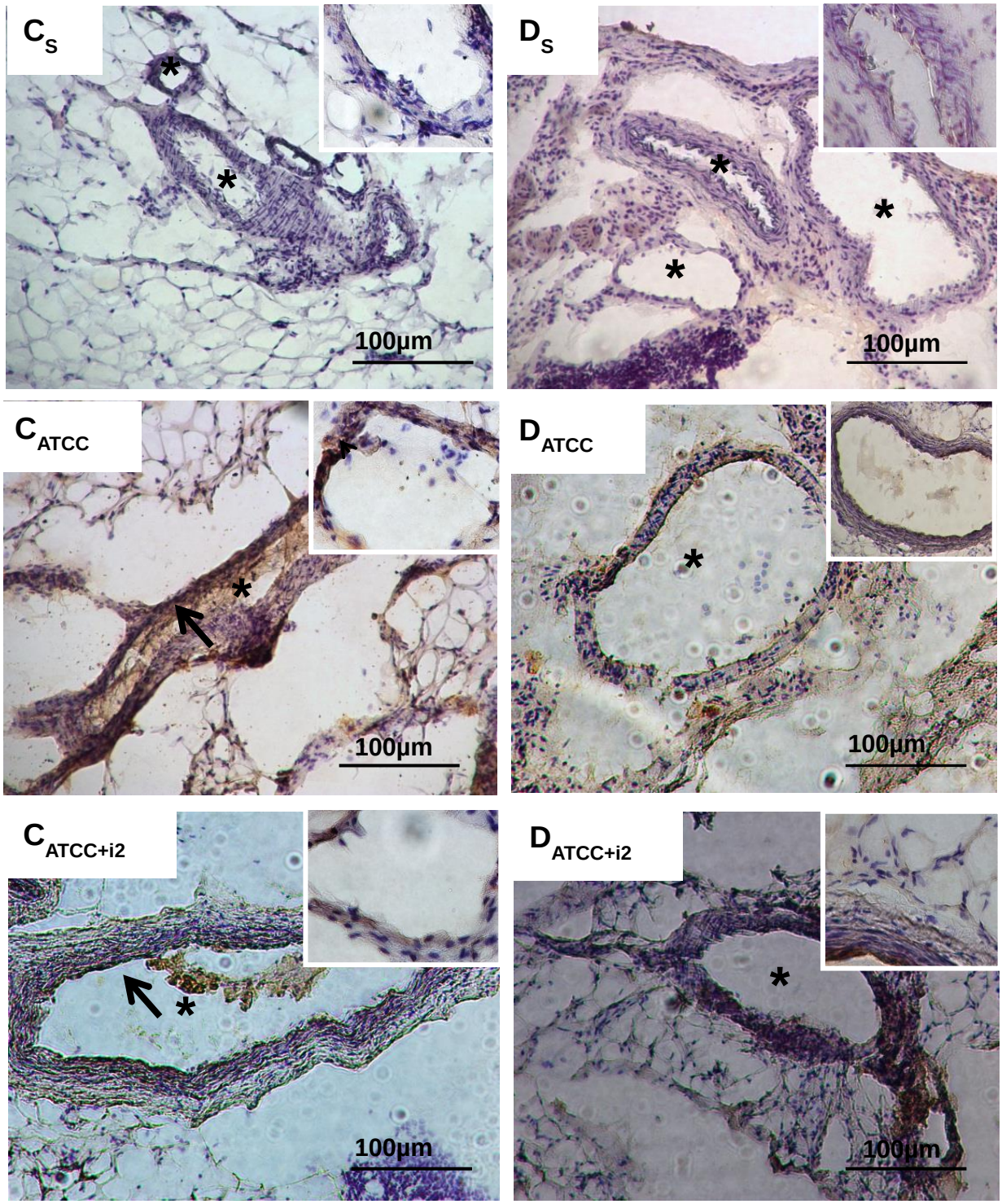


Figura 19. **Marcação por imunohistoquímica para PECAM-1 em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina.** *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com 4 doses de insulina (i2). Figuras representativas de 3 animais por grupo. 5-12 vasos/animal (*) – Vaso sanguíneo. Seta - Presença de imunomarcação positiva na parede do vaso (coloração castanha). Barras = 25µm (40x) e 100µm (10x).

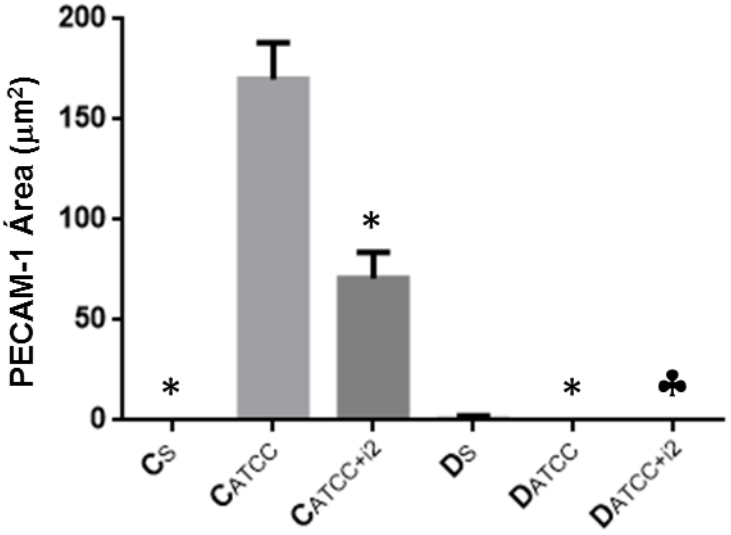


Figura 20. Quantificação de PECAM-1 em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina. Foram fotografados em média 10 campos por lâmina. A quantificação foi determinada pelo software NIS-Elements AR. Os valores representam a média da área do endotélio ± e.p.m. (3 animais por grupo). * p<0,001 vs C_{ATCC}; ♣p<0,001 vs $C_{ATCC+i2}$.

A infecção com a cepa ATCC 25923 levou a expressão de ICAM-1 no endotélio vascular do mesentério de animais dos grupos controle (C_{ATCC}) e diabético (D_{ATCC}), o que não aconteceu nos grupos não infectados (C_S e D_S). O tratamento com 4 doses de insulina manteve a expressão de ICAM-1 nos animais diabéticos ($D_{ATCC+i2}$), o mesmo não aconteceu com os animais controle ($C_{ATCC+i2}$) (Figura 21).

Corroborando com esses resultados, a quantificação de ICAM-1 mostra que, os valores em µm^2 observados ao redor do endotélio do mesentério do grupo controle infectado com a cepa ATCC 25923 (C_{ATCC}) foi 247 vezes maior do que nos animais não infectados (C_S). Após a administração de 4 doses de insulina ($C_{ATCC+i2}$) não houve expressão de ICAM-1. Enquanto no grupo diabético, os valores em µm^2 observados ao redor do endotélio do mesentério para expressão de ICAM-1 de animais infectados com a cepa ATCC 25923 (D_{ATCC}) foi 136 vezes maior do que nos animais não infectados (D_S); e o tratamento com 4 doses de insulina não foi capaz de alterar esta expressão (Figura 22).

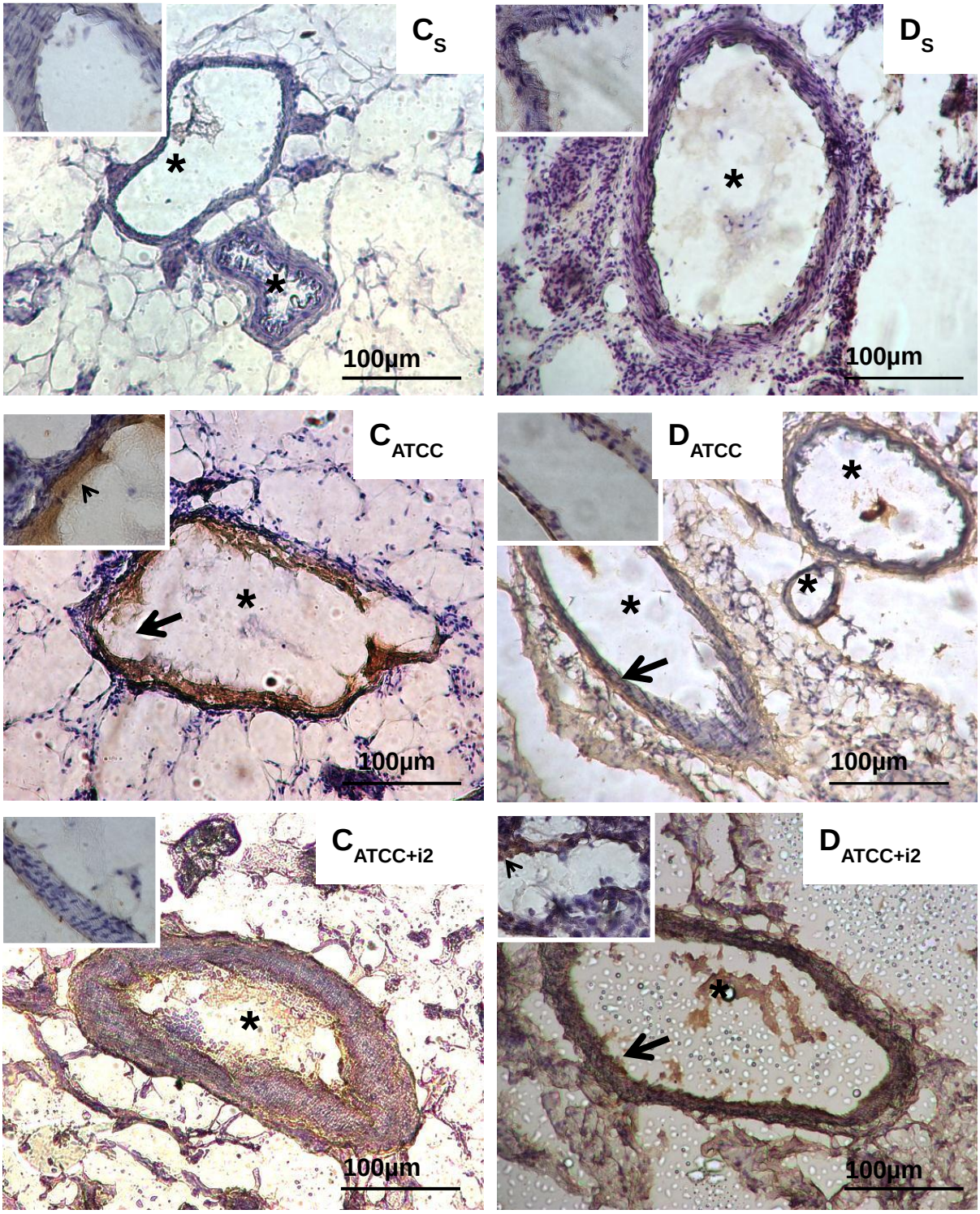


Figura 21. **Marcação por imunohistoquímica para ICAM-1 em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina.** *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com 4 doses de insulina (i2). Figuras representativas de 3 animais por grupo. 5-12 vasos/animal (*) – Vaso sanguíneo. Seta - Presença de imunomarcação positiva na parede do vaso (coloração castanha). Barras = 25µm (40x) e 100µm (10x).

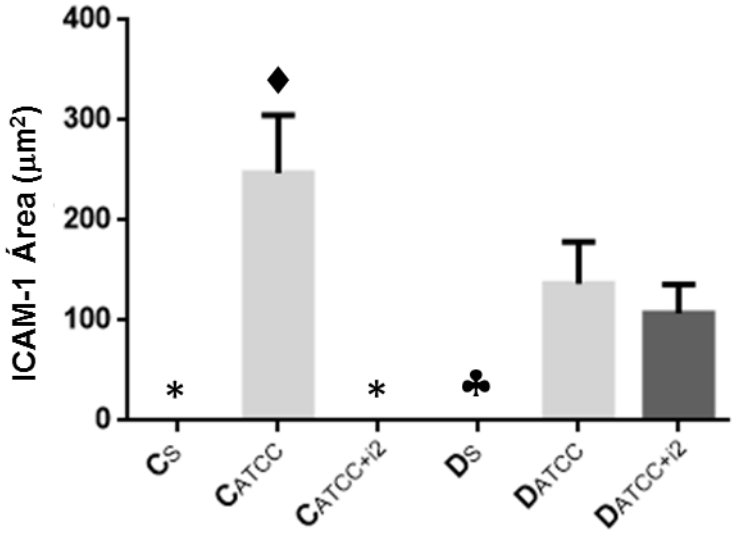


Figura 22. Quantificação de ICAM-1 em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina. Foram fotografados em média 10 campos por lâmina. A quantificação foi determinada pelo software NIS-Elements AR. Os valores representam a média do número de leucócitos ± e.p.m. (3 animais por grupo). *p<0,001 vs C_{ATCC}; ♦p<0,05 vs D_{ATCC}; ♣ p<0,01 vs D_{ATCC}.

A infecção com a cepa ATCC 25923 levou a expressão de P-selectina no endotélio vascular do mesentério apenas de animais do grupo controle (C_{ATCC}), o que não aconteceu nos grupos não infectados (C_S e D_S) e nos animais diabéticos infectados (D_{ATCC}). O tratamento com 4 doses de insulina inibiu a expressão desta molécula de adesão nos animais do grupo controle ($C_{ATCC+i2}$) e não gerou sua expressão no grupo diabético ($D_{ATCC+i2}$) (Figura 23).

Corroborando com esses resultados, a quantificação de P-selectina, mostra que, os valores em µm^2 observados ao redor do endotélio do mesentério do grupo controle infectado com a cepa ATCC 25923 (C_{ATCC}) foi 216 vezes maior do que nos animais não infectados (C_S). Após a administração de 4 doses de insulina ($C_{ATCC+i2}$), os valores em µm^2 observados diminuíram 11, 4 vezes. Enquanto no grupo diabético, tanto a infecção quanto o tratamento com insulina não foram capazes de alterar os valores em µm^2 observados (Figura 24).

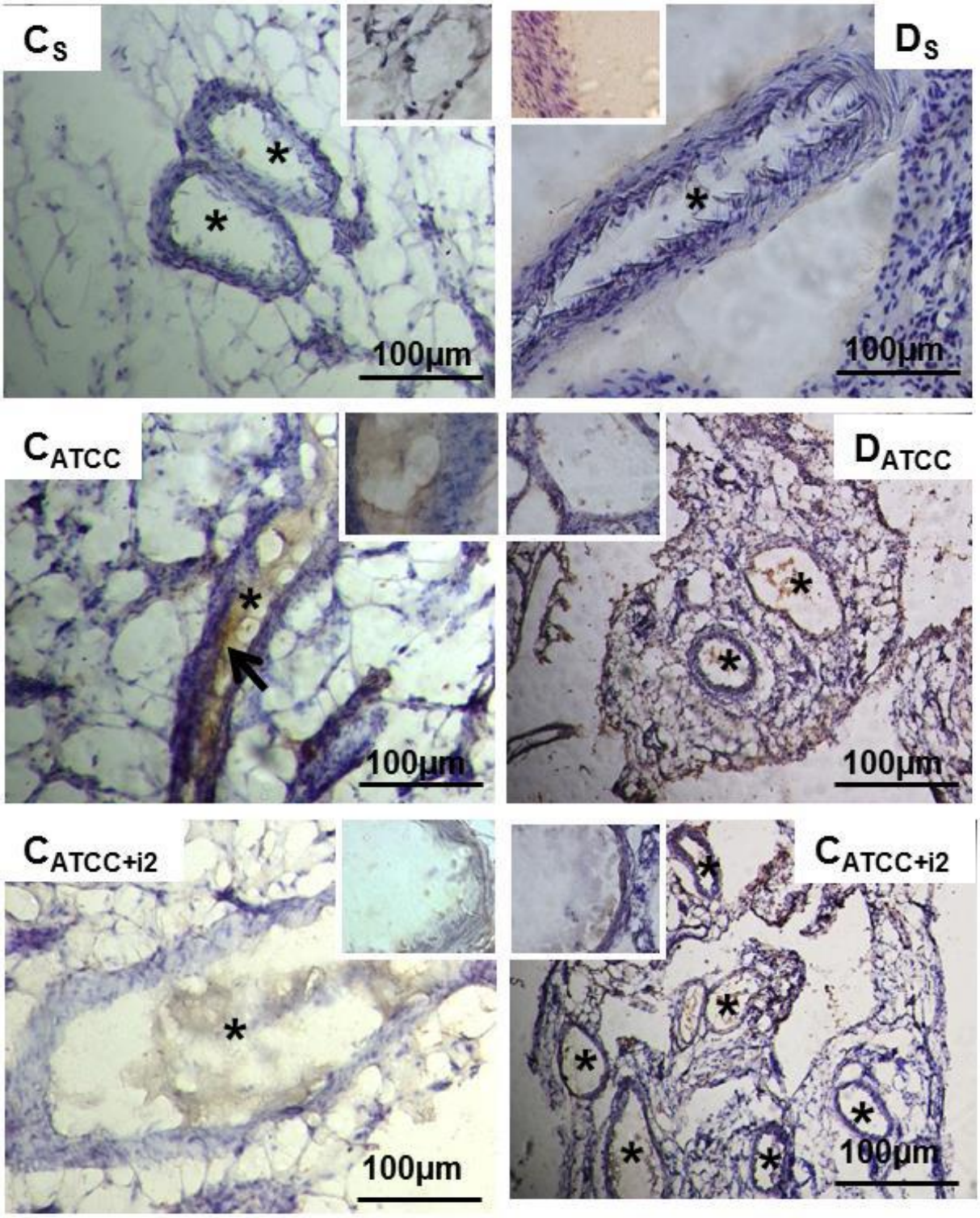


Figura 23. **Marcação por imunohistoquímica para P-selectina em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina.** *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com 4 doses de insulina (i2). Figuras representativas de 3 animais por grupo. 5-12 vasos/animal (*) – Vaso sanguíneo. Seta - Presença de imunomarcação positiva na parede do vaso (coloração castanha). Barras = 25µm (40x) e 100µm (10x).

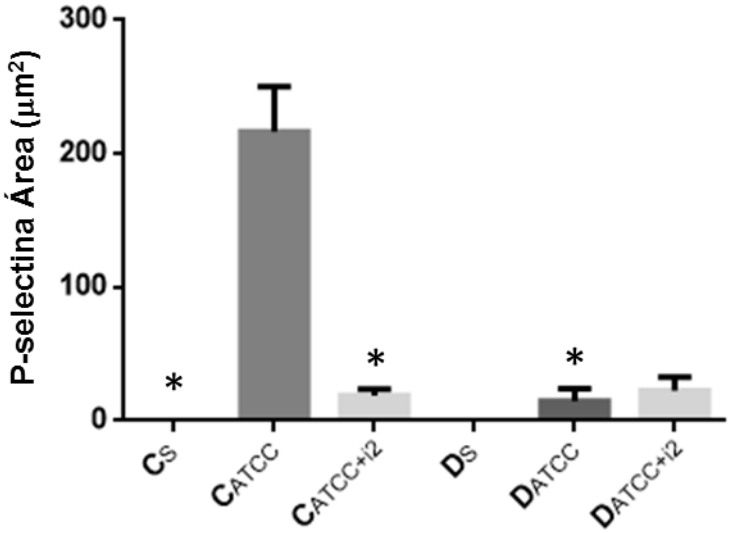


Figura 24. Quantificação de P-selectina em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina. Foram fotografados em média 10 campos por lâmina. A quantificação foi determinada pelo software NIS-Elements AR. Os valores representam a média do número de leucócitos ± e.p.m. (3 animais por grupo). *p<0,001 vs C_{ATCC}.

A atividade microbicida de macrófagos peritoneais isolados de ratos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* foi realizada para determinar a capacidade de sobrevivência desta bactéria dentro dos macrófagos, sendo que o tratamento com insulina não alterou a capacidade dos macrófagos eliminarem a bactéria (Tabela 6).

Tabela 6 – Atividade microbicida de macrófagos de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles

	Sobrevivência (%)
C_{ATCC}	47,6 ± 2,8
$C_{ATCC+i2}$	51,3 ± 2,6
D_{ATCC}	51,6 ± 4,9
$D_{ATCC+i2}$	55,9 ± 5,1

Diabetes mellitus induzido por injeção de aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais receberam tratamento com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m. (4 animais por grupo).

4.4. Peritonite causada por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus*

Após a anestesia dos animais, foi realizada coleta de sangue por punção cardíaca; as amostras coletadas foram utilizadas para a contagem global absoluta e a contagem diferencial absoluta de leucócitos sanguíneos, porém não houve diferenças significativas na concentração de leucócitos sanguíneos independentemente do tipo de tratamento de insulina utilizado, tanto na peritonite causada pela cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* (Tabela 7).

Tabela 7. Leucócitos sanguíneos de ratos diabéticos com infecção peritoneal pela cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles

Grupos	Células (X10^3/mm^3)					
	Totais	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Linfócitos	Monócitos
C_S	2,7 ± 0,2	0,5 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,1 ± 0,2	0,1 ± 0,0
C_{N315}	4,8 ± 0,3	0,8 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,9 ± 0,3	0,1 ± 0,0
$C_{N315+i1}$	4,6 ± 0,7	0,9 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0
$C_{N315+i2}$	4,4 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,5 ± 0,3	0,0 ± 0,0
D_S	3,4 ± 0,4	0,7 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,6 ± 0,3	0,1 ± 0,0
D_{N315}	4,5 ± 0,5	0,9 ±0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,5 ± 0,5	0,1 ± 0,1
$D_{N315+i1}$	3,2 ± 0,3	0,8 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,4 ± 0,1	0,0 ± 0,0
$D_{N315+i2}$	4,9 ± 0,4	1,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,7 ± 0,3	0,1 ± 0,0

Diabetes mellitus induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus.* Os animais receberam tratamento com insulina dose única (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m. (7 animais por grupos).

Por outro lado, a infecção de animais do grupo controle com cepa N315 Hla$^+$, (C_{N315}) aumentou em 4,4 vezes a contagem global absoluta de leucócitos no LPe, em relação ao grupo salina (C_S). Enquanto, o tratamento dos animais infectados com 4 doses de insulina ($C_{N315+i2}$) diminuiu 68% o número de leucócitos no LPe. Em ratos diabéticos, a infecção (D_{N315}) praticamente dobrou os leucócitos no LPe em relação a ratos não infectados (D_S). O tratamento dos animais diabéticos infectados com 4 doses de insulina ($D_{N315+i2}$) aumentou em 66% o número de leucócitos presentes no LPe, em relação ao grupo não tratado (D_{N315}) (Figura 25).

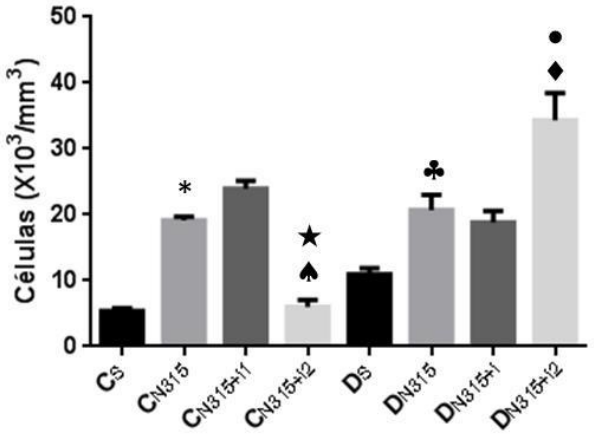


Figura 25. Contagem global absoluta de leucócitos no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média± e.p.m (7 animais por grupo). *p<0,001 vs C_S; ★p< 0,001 vs C_{N315}; ♠ p< 0,001 vs $C_{N315+i1}$; ♣p<0,001 vs D_S;♦p<0,001 vs D_{N315}; •p<0,001 vs $D_{N315+i1}$.

A migração de células mononucleares em animais controle não foi alterada pela infecção (C_{N315}). O tratamento com 4 doses de insulina ($C_{N315+i2}$) diminuiu a migração em 71%, em relação ao grupo não infectado (C_S). A infecção de animais diabéticos (D_{N315}), não modificou a migração celular, porém o tratamento com 4 doses de insulina ($D_{N315+i2}$) aumentou 2,5 vezes a migração celular em relação aos animais não tratados (D_{N315}). Por outro lado, nos animais controle, o tratamento com 4 doses de insulina ($C_{N315+i2}$) gerou migração 79,6% menor do que a migração gerada pelo tratamento com dose única ($C_{N315+i1}$); enquanto nos animais diabéticos, o tratamento com 4 doses de insulina ($D_{N315+i2}$) gerou migração 2,5 vezes maior do que a migração gerada pelo tratamento com dose única ($D_{N315+i1}$) (Figura 26A).

Apesar disso, em ratos não diabéticos, a infecção (C_{N315}) aumentou a migração de PMNs em aproximadamente 2,5 vezes em relação aos animais não infectados (C_S). O tratamento de animais infectados com 4 doses de insulina ($C_{N315+i2}$) diminuiu a migração de PMNs em aproximadamente 88%, tanto em relação ao grupo não tratado (C_{N315}) quanto em relação ao grupo tratado com dose única de insulina ($C_{N315+i1}$). Enquanto nos animais diabéticos não houve alteração *na* migração de PMNs (Figura 26B).

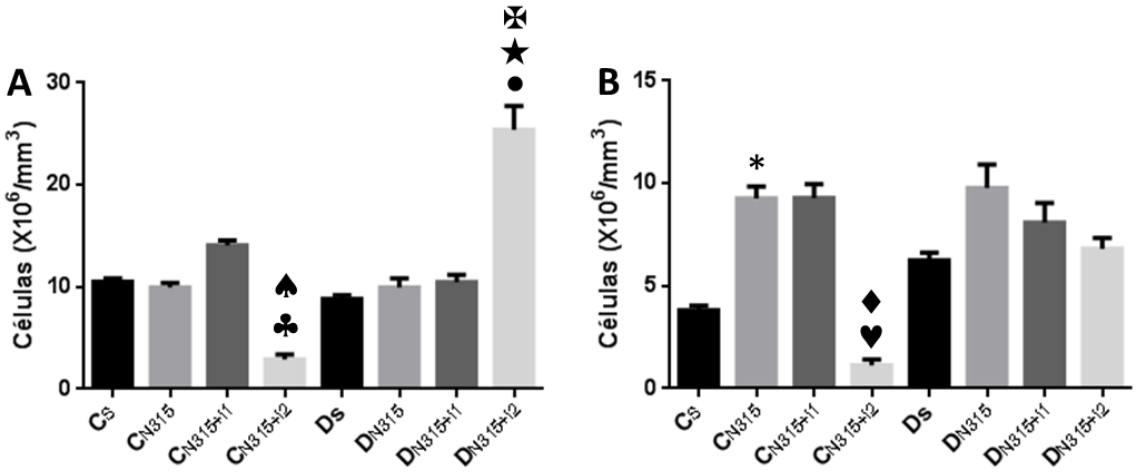


Figura 26. Contagem global relativa de leucócitos no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles. A. Contagem de Mononucleares. B. Contagem de Polimorfonucleares. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média± e.p.m (7 animais por grupo). ♠p<0,05 vs C_{N315}; ♣p<0,001 vs $C_{N315+i1}$;★p<0,001 vs $C_{N315+i2}$; •p<0,001 vs D_{N315}; ✠p<0,001 vs $D_{N315+i1}$; *p<0,05 vs C_S;♥p<0,01 vs C_{N315}; ♦p<0,05 vs $C_{N315+i1}$.

A glicemia do grupo controle não foi alterada pelo tratamento com insulina (dose única ou 4 doses); enquanto no grupo diabético, o tratamento com dose única de insulina e com 4 doses, embora tenham reduzido a concentração plasmática de glicose em não foram suficientes para reduzi-la a níveis normais (Tabela 8).

Os animais diabéticos exibiram redução nos níveis séricos de insulina, por comparação com os respectivos controles. O tratamento dos animais controle com dose única de insulina ($C_{N315+i1}$) não alterou este nível sérico, enquanto com 4 doses ($C_{N315+i2,}$) aumentou a concentração em 48%. Por outro lado, o tratamento dos animais diabéticos com dose única de insulina ($D_{N315+i1}$) aumentou em 5,3 vezes a concentração sérica de insulina hormônio e com 4 doses ($D_{N315+i2,}$), aumentou a concentração em 7,3 vezes (Figura 27).

Quanto à concentração sérica de corticosterona, não houve diferenças significativas após a infecção entre ratos controles e diabéticos ou após os diferentes tratamentos com insulina (Tabela 9).

Tabela 8. Glicemia dos ratos controle e diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ *S. aureus* antes e após o tratamento com insulina

Animais	Glicemia (mg/dL)	
	Antes da insulina	Após insulina
$C_{N315+i1}$	100 ± 5	66 ± 8
$C_{N315+i2}$	128 ± 6	115 ± 3
$D_{N315+i1}$	580 ± 14	450 ± 71*
$D_{N315+i2}$	562 ± 10	348 ± 46**

Diabetes mellitus induzido por injeção de aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais receberam tratamento com insulina dose única (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m. (7 animais por grupo). *p< 0,05 vs antes da insulina; **p<0,001 vs antes da insulina.

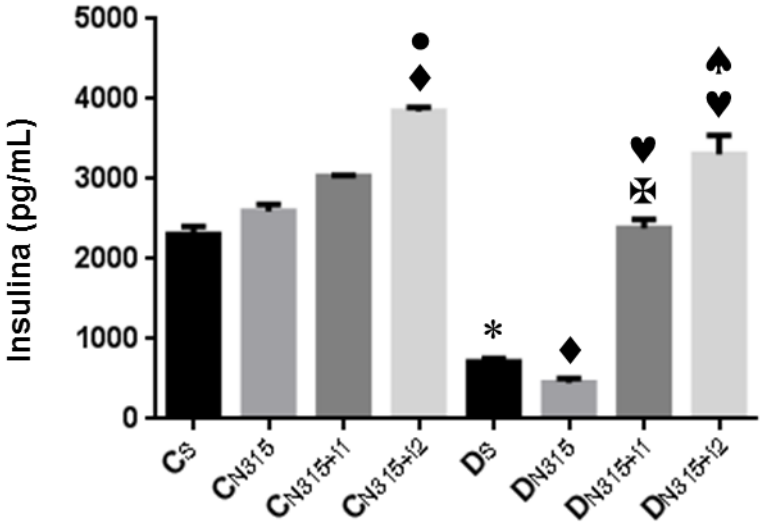


Figura 27. Determinação dos níveis séricos de insulina de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m (7 animais por grupo). ∗p<0,05 vs C_S; ♦p<0,001 vs C_{N315}; •p<0,001 vs $C_{N315+i1}$; ✠p<0,001 vs $C_{N315+i1}$; ♥p<0,001 vs D_{N315}; ♠p<0,05 vs $D_{N315+i1}$.

Tabela 9. Determinação dos níveis séricos de corticosterona de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles após tratamento com insulina

	Corticosterona (pg/mL)
C_S	231,0 ± 10,3
C_{N315}	227,2 ± 5,2
$C_{N315+i1}$	303,6 ± 1,0
$C_{N315+i2}$	224,2 ± 2,1
D_S	230,5 ± 4,2
D_{N315}	221,6 ± 15,5
$D_{N315+i1}$	226,9 ± 2,0
$D_{N315+i2}$	230,8 ± 15,6

O *diabetes mellitus* induzido pela injeção de aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais receberam tratamento com insulina dose única (i1) ou foram tratados com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m. (7 animais por grupo).

O sobrenadante do lavado peritoneal foi utilizado para a determinação da concentração de citocinas pró-inflamatórias (IL1β, IL-6, TNF-α, IFN-γ, IL-12), de quimiocinas (CINC-1, CINC-2 e CINC-3) e de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10),e são apresentadas a seguir.

A infecção de animais sadios com a cepa N315 Hla$^+$ (C_{N315}) aumentou a produção de CINC-1 em aproximadamente 5,5 vezes, em relação aos animais não infectados (C_S). O tratamento com 4 doses ($C_{N315+i2}$) diminuiu esta produção em, aproximadamente, 76%. Em ratos diabéticos, a infecção (D_{N315}) aumentou a produção de CINC-1 em aproximadamente 10 vezes quando comparada aos animais não infectados (D_S). Neste grupo, o tratamento com a insulina diminuiu a produção de CINC-1, sendo que uma dose de insulina ($D_{N315+i1}$) diminui-a em 84,3%, enquanto o tratamento com 4 doses de insulina ($D_{N315+i2}$) diminui-a em 91,6% (Figura 28).

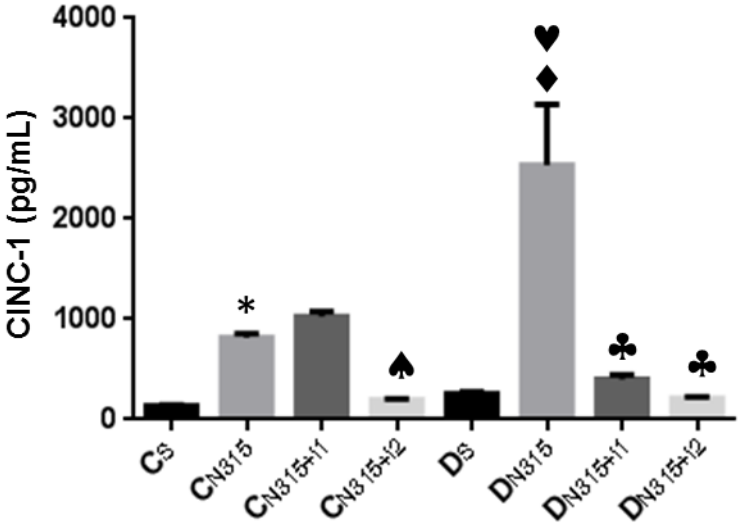


Figura 28. CINC-1 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m (7 animais por grupo). *p<0,01 vs C_S; ♠p<0,01 vs C_{N315}; ♥p<0,001 vs D_S; ♦p<0,001 vs C_{N315}; ♣p<0,05 vs D_{N315}.

A infecção de animais controle pela cepa N315 Hla$^+$ (C_{N315}) não alterou a produção de CINC-2, porém o tratamento destes animais com dose única de insulina ($C_{N315+i1}$) aumentou a produção de CINC-2 em, aproximadamente, 6,8 vezes, enquanto o tratamento com 4 doses de insulina ($C_{N315+i2}$) aumentou a produção de CINC-2 em, aproximadamente, 4 vezes, em relação ao grupo não tratado (C_{N315}). Em animais diabéticos não infectados (D_S) a produção de CINC-2 é 8,3 vezes maior do que em animais controle não infectados (C_S). Enquanto, a infecção pela bactéria (D_{N315}) diminuiu a produção de CINC-2 em aproximadamente 92%. A produção de CINC-2 por animais diabéticos infectados aumentou 20,3 vezes com tratamento com uma dose de insulina ($D_{N315+i1}$) e aproximadamente 10vezes com o tratamento com 4 doses de insulina ($D_{N315+i2}$). Apesar disto, o tratamento com 4 doses de insulina ($D_{N315+i2}$) produz 50% menos CINC-2 em relação ao tratamento com dose única ($D_{N315+i1}$) (Figura 29).

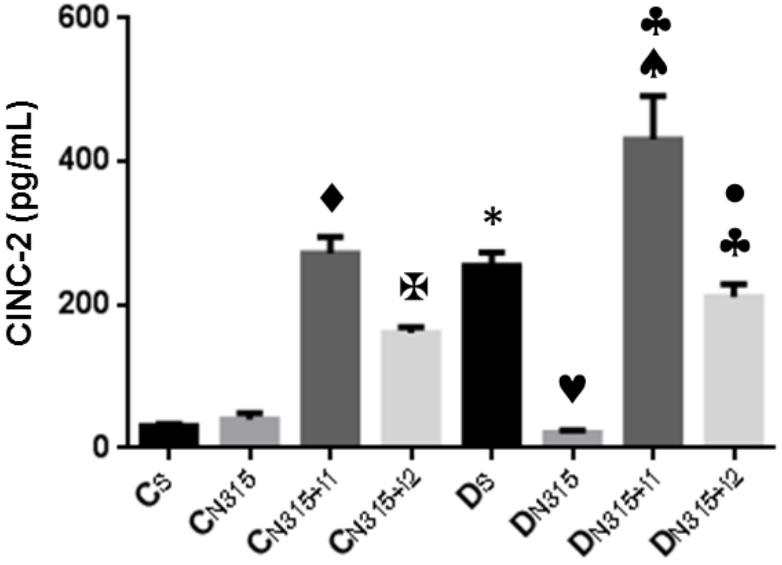


Figura 29. CINC-2 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m (7 animais por grupo). ♦p<0,001 vs C_{N315}; ✠p<0,05 vs C_{N315}; *p<0,001 vs C_S; ♥p<0,001 vs D_S; ♣p<0,001 vs D_{N315}; ♠p<0,01 vs $C_{N315+i1}$; • p<0,001 vs $D_{N315+i1}$.

No grupo controle tanto a infecção quanto os tratamentos com uma ou 4 doses de insulina não alteraram a produção de CINC-3. No grupo diabético, a infecção (D_{N315}) não alterou a produção de CINC-3 em relação do grupo não infectado (D_S), mas o tratamento com uma dose de insulina ($D_{N315+i1}$) aumentou esta produção em aproximadamente 45%, enquanto o tratamento com 4 doses ($D_{N315+i2}$) não a alterou em relação ao grupo não tratado (D_{N315}) (Figura 30)

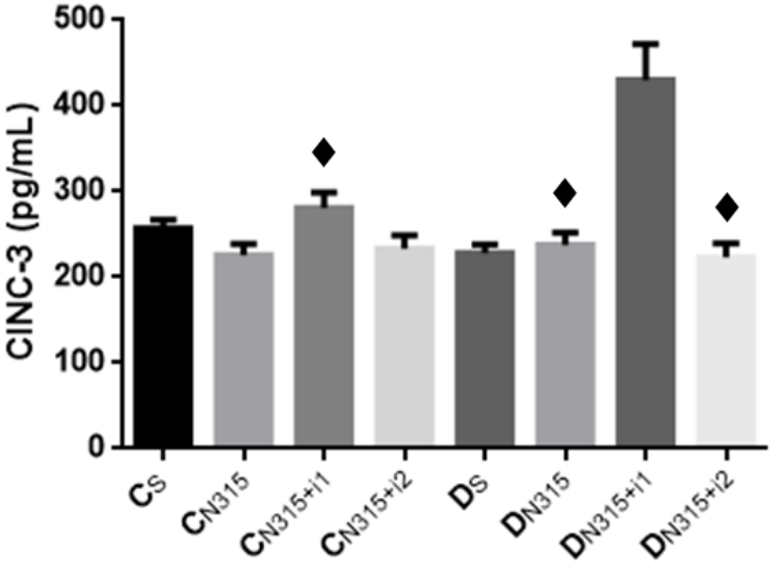


Figura 30. CINC-3 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m (7 animais por grupo). ♦p<0,001 vs $D_{N315+i1}$.

No grupo controle, a infecção pela cepa N315 Hla$^+$ (C_{N315}) aumentou 2,6 vezes a produção de IL-1β em relação a seu respectivo controle (C_S). Em ratos diabéticos, o tratamento com dose única de insulina ($D_{N315+i1}$) aumentou em 3,7 vezes a produção de IL-1β e com 4 doses de insulina ($D_{N315+i2}$) aumentou-a em 4,9 vezes. Além disso, a infecção fez com que grupo controle produzisse (C_{N315}) 6,4 vezes mais IL-1β em relação aos diabéticos infectados (D_{N315}) (Figura 31).

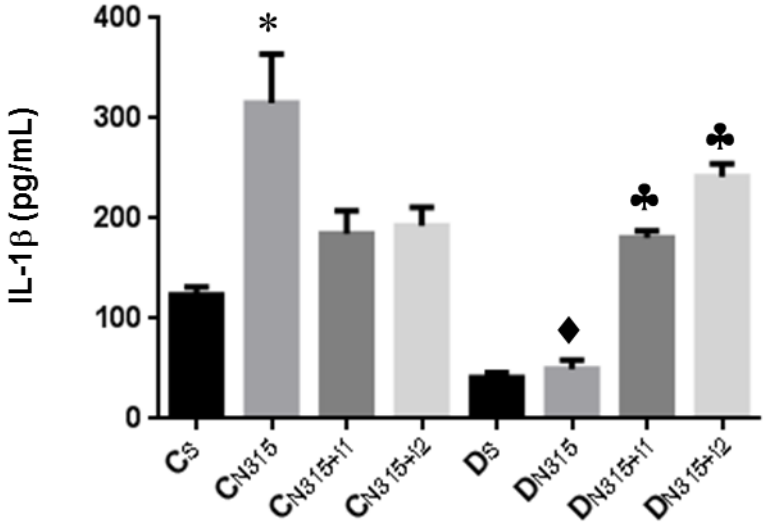


Figura 31. IL-1β no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m (5 animais por grupo). *p<0,01 vs C_S; ♦p<0,001 vs C_{N315}; ♣p<0,001 vs D_{N315}.

A infecção de animais sadios com a cepa N315 Hla$^+$ (C_{N315}), não alterou a produção de IL-6, em relação aos animais não infectados (C_S). Em relação ao grupo não tratado (C_{N315}), o tratamento com insulina aumentou a produção de IL-6, sendo que o tratamento com dose única ($C_{N315+i1}$) aumentou-a em 3,8 vezes e o tratamento com 4 doses ($C_{N315+i2}$) aumentou-a em 18 vezes. Em ratos diabéticos, a infecção (D_{N315}) não modificou a produção de IL-6 em relação aos animais não infectados (D_S), assim como, o tratamento com dose única de insulina ($D_{N315+i1}$) não modificou a produção de IL-6 em relação aos animais não tratados (D_{N315}); enquanto, o tratamento com 4 doses de insulina ($D_{N315+i2}$) aumentou 18,7 vezes a produção, em relação ao mesmo grupo (D_{N315}) (Figura 32).

Além disso, o tratamento com 4 doses de insulina, nos dois grupos (sadio e diabético), aumentou a produção de IL-6 em relação ao tratamento com uma dose de insulina, em 4,8 vezes no grupo sadio e em 9,3 vezes no grupo diabético (Figura 32).

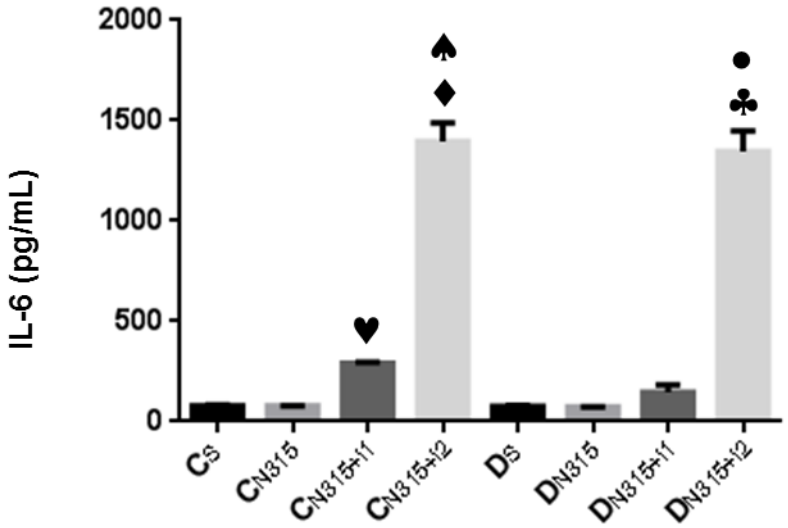


Figura 32. IL-6 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m (7 animais por grupo). ♥p<0,01 vs C_{N315}; ♦p<0,001 vs C_{N315}; ♠p<0,001 vs $C_{N315+i1}$; ♣p<0,001 vs D_{N315}; •p<0,001 vs $D_{N315+i1}$.

Em animais controle, a infecção de com a cepa N315 Hla$^+$ (C_{N315}) não alterou a produção de TNF-α, em relação aos animais não infectados (C_S). Em relação aos animais não tratados (C_{N315}), o tratamento com dose única de insulina ($C_{N315+i1}$) não foi capaz de modificar esta produção, enquanto, o tratamento com 4 doses de insulina ($C_{N315+i2}$) aumentou em aproximadamente 38% a produção de TNF-α. Em ratos diabéticos não houve modificação na produção TNF-α em na presença de infecção (D_{N315}) ou pelos tratamentos com insulina ($D_{N315+i1}$ ou $D_{N315+i2}$), em relação aos animais não infectados (D_S). Comparando o efeito do tratamento com 4 doses de insulina no grupo sadio ($C_{N315+i2}$) e no grupo diabético ($D_{N315+i2}$), é possível notar o grupo diabético produziu aproximadamente 34% menos TNF-α (Figura 33).

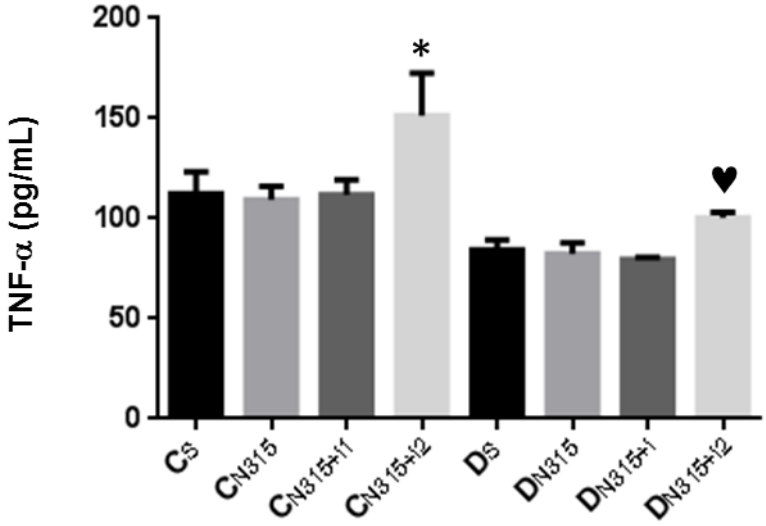


Figura 33. TNF-α no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m (7 animais por grupo). *p<0,05 vs C_{N315}; ♥p<0,001 vs $C_{N315+i2}$.

Em animais sadios, a infecção de com a cepa N315 Hla$^+$ (C_{N315}) aumentou 2,5 vezes a produção de INF-γ, em relação aos animais não infectados (C_S). Em relação ao grupo não tratado (C_{N315}), o tratamento com insulina aumentou a produção de INF-γ, sendo que o tratamento com dose única ($C_{N315+i1}$) aumentou-a 80% e o tratamento com 4 doses ($C_{N315+i2}$) aumentou-a aproximadamente 3,8 vezes. A infecção de animais diabéticos (D_{N315}) praticamente dobrou a produção de INF-γ em relação aos animais não infectados (D_S). Em relação ao grupo diabético infectado (D_{N315}), a produção de IFN-γ aumentou aproximadamente 3,3 vezes com a utilização de 4 doses de insulina ($D_{N315+i2}$) e não foi modificada com a utilização de dose única de insulina ($D_{N315+i1}$). Além disso, o tratamento com 4 doses de insulina, nos dois grupos (sadio e diabético), aumentou a produção de IFN-γ em relação ao tratamento com dose única de insulina, em 2,1 vezes no grupo sadio e em 2,3 vezes no grupo diabético (Figura 34).

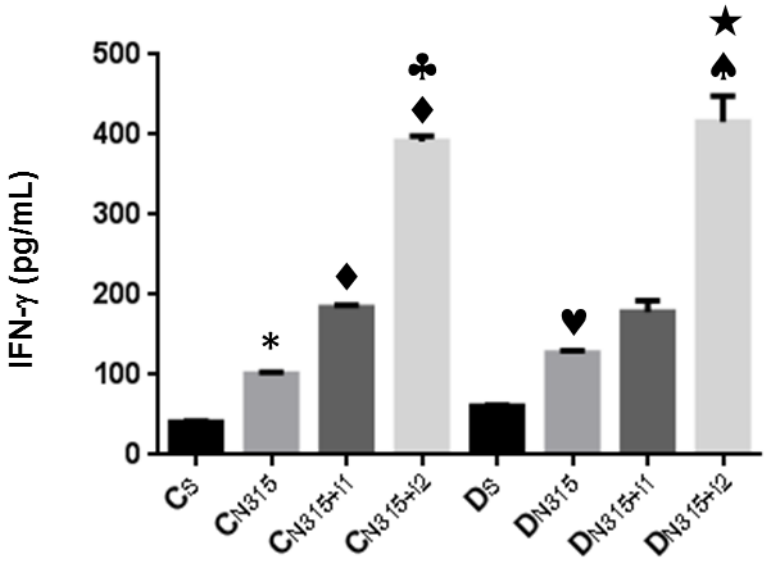


Figura 34. INF-γ no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m (7 animais por grupo). *p<0,05 vs C_S; ♦p<0,001 vs C_{N315}; ♣p<0,001 vs C_{N315+1}; ♥p<0,001 vs D_S; ♠p<0,001 vs D_{N315}; ★p<0,001 vs $D_{N315+i1}$.

No grupo controle tanto a infecção quanto os tratamento com insulina não alteraram a produção de IL-12. Apesar disto, no grupo diabético, a infecção (D_{N315}) diminuiu a produção de IL-12 em 45% em relação ao grupo não infectado (D_S) e os tratamentos com insulina não modificaram esta produção (Figura 35).

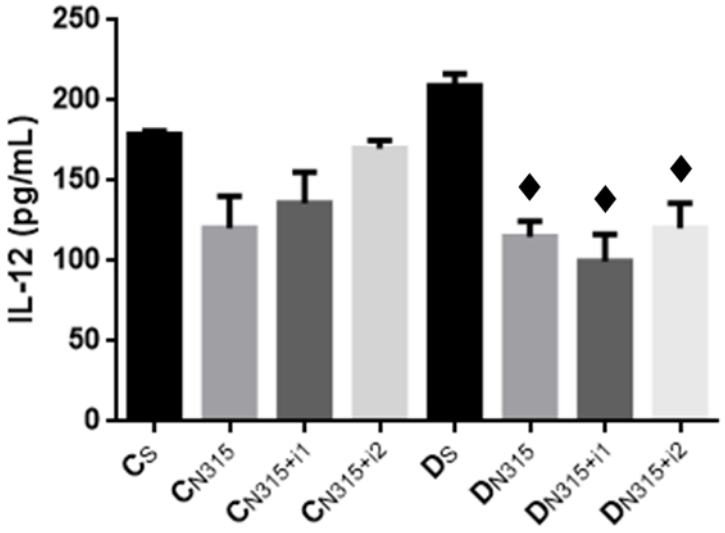


Figura 35. IL-12 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m (7 animais por grupo). *p<0,05 vs C_S; ♦p<0,001 vs C_{N315}; ♣p<0,001 vs C_{N315+1}; ♥p<0,001 vs D_S; ♠p<0,001 vs D_{N315}; ★p<0,001 vs $D_{N315+i1}$.

A infecção de animais sadios com a cepa N315 Hla$^+$ (C_{N315}) aumentou, aproximadamente, 9,8 vezes a produção de IL-4, em relação aos animais não infectados (C_S). O tratamento destes animais com uma dose de insulina ($C_{N315+i1}$) diminuiu em 45,7% a produção de IL-4, enquanto o tratamento com 4 doses ($C_{N315+i2}$) não a alterou. Enquanto, em ratos diabéticos, a infecção (D_{N315}) aumentou a produção de IL-4 em, aproximadamente, 8,6 vezes quando comparada aos animais não infectados (D_S). Em relação ao grupo diabético infectado (D_{N315}), o tratamento com dose única de insulina ($D_{N315+i1}$), aumentou a produção de IL-4 em 2,5 vezes. Comparando o efeito do tratamento com uma dose de insulina no grupo sadio ($C_{N315+i1}$) e no grupo diabético ($D_{N315+i1}$), é possível notar o grupo diabético produziu 4,8 vezes mais IL-4. Além disso, comparando os dois tratamentos com insulina no grupo diabético, é possível notar que o tratamento com dose única ($D_{N315+i1}$) produziu 2,6 vezes mais IL-4 do que o tratamento com 4 doses ($D_{N315+i2}$) (Figura 36).

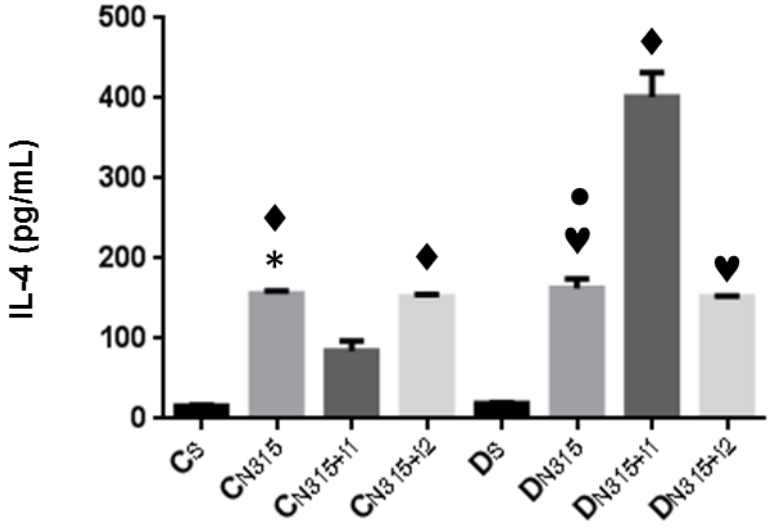


Figura 36. IL-4 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles. *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com dose única de insulina (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m (7 animais por grupo). *p<0,001 vs C_S; ♦p<0,001 vs $C_{N315+i1}$; ♥p<0,001 vs $D_{N315+i1}$; •p<0,001 vs D_S.

A produção de IL-10 não apresentou diferenças significativas entre os grupos estudados e encontra-se na Tabela 10.

Tabela 10. Dosagem de IL10 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles

	IL-10 (pg/mL)
C_S	203,5 ± 29,7
C_{N315}	124,0 ± 14,5
$C_{N315+i1}$	118,2 ± 5,4
$C_{N315+i2}$	153,7 ± 17,7
D_S	175,8 ± 23,6
D_{N315}	97,2 ± 7,8
$D_{N315+i1}$	121,8 ± 7,7
$D_{N315+i2}$	152,1 ± 19,7

Diabetes mellitus induzido por injeção de aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção intraperitoneal de *S. aureus*. Os animais receberam tratamento com insulina dose única (i1) ou com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m. (7 animais por grupo).

A expressão de PECAM-1, ICAM-1 e P-selectina no endotélio vascular do mesentério de animais controles e diabéticos, após o tratamento com 4 doses de insulina, é apresentada a seguir, enquanto a expressão após o tratamento com dose única não foi realizada por problemas técnicos.

A infecção com a cepa N315 Hla^+ levou a expressão de PECAM-1 no endotélio vascular do mesentério de animais infectados dos grupos controle (C_{N315}) e diabético (D_{N315}), o que não aconteceu nos grupos não infectados (C_S e D_S). O tratamento com insulina manteve a expressão de PECAM-1 em ambos os grupos ($C_{N315+i2}$ e $D_{N315+i2}$) (Figura 33).

Corroborando com esses resultados, a quantificação de PECAM-1, mostra que, os valores em μm^2 observados ao redor do endotélio do mesentério de animais diabéticos infectados com a cepa N315 Hla^+ (D_{N315}) foi 80 vezes maior do que nos animais não infectados (D_S). A administração de 4 doses de insulina não modificou a expressão desta molécula de adesão no grupo controle ($C_{N315+i2}$) nem no grupo diabético ($D_{N315+i2}$). E, comparando a expressão de PECAM-1 após a infecção, nota-se que o grupo controle (C_{N315}) apresentou expressão 4 vezes menor do que o grupo diabético (D_{N315}) (Figura 37).

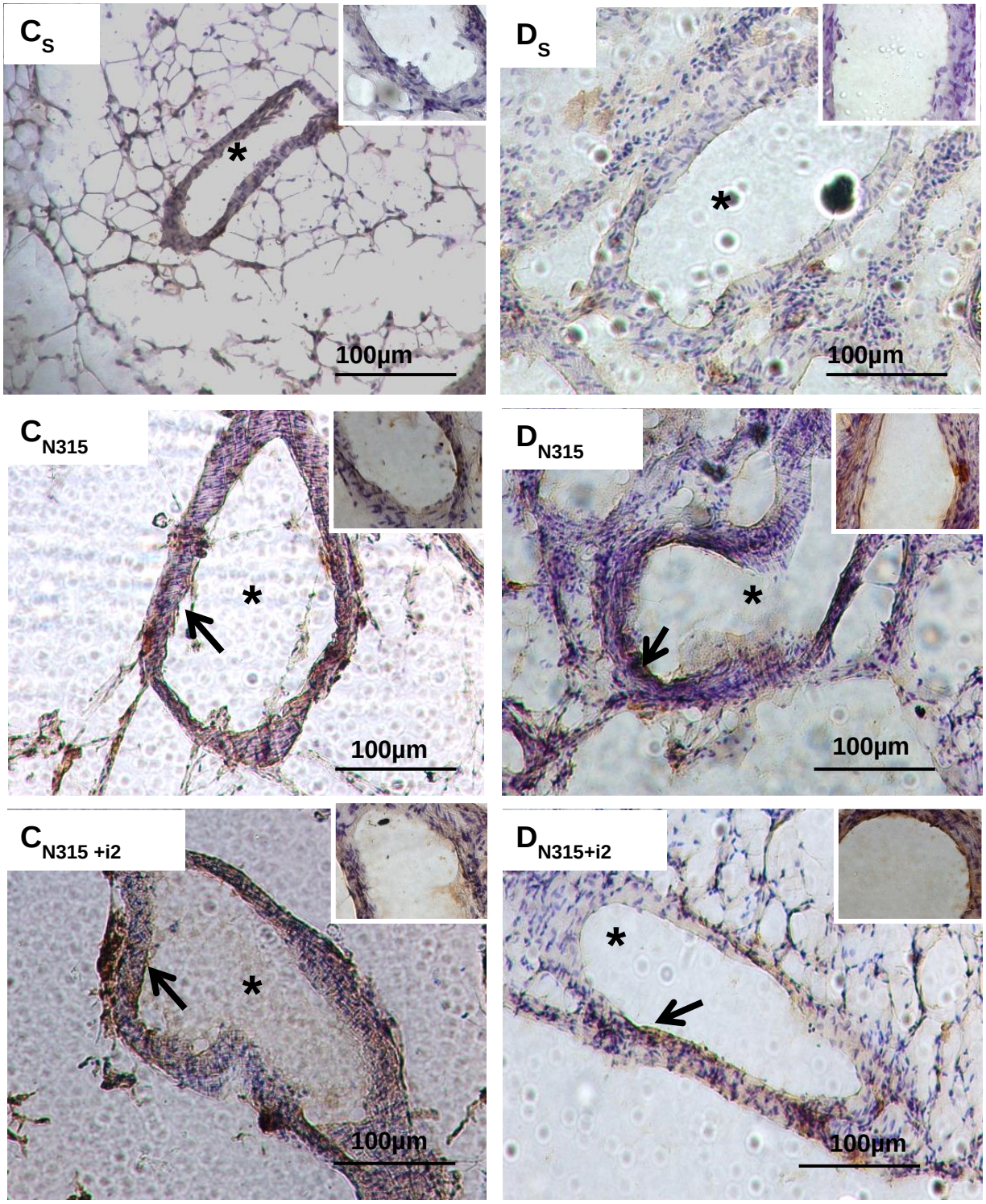


Figura 37. **Marcação por imunohistoquímica para PECAM-1 em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina.** *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com 4 doses de insulina (i2). Figuras representativas de 3 animais por grupo. 5-12 vasos/animal (*) – Vaso sanguíneo. Seta - Presença de imunomarcação positiva na parede do vaso (coloração castanha). Barras = 25µm (40x) e 100µm (10x).

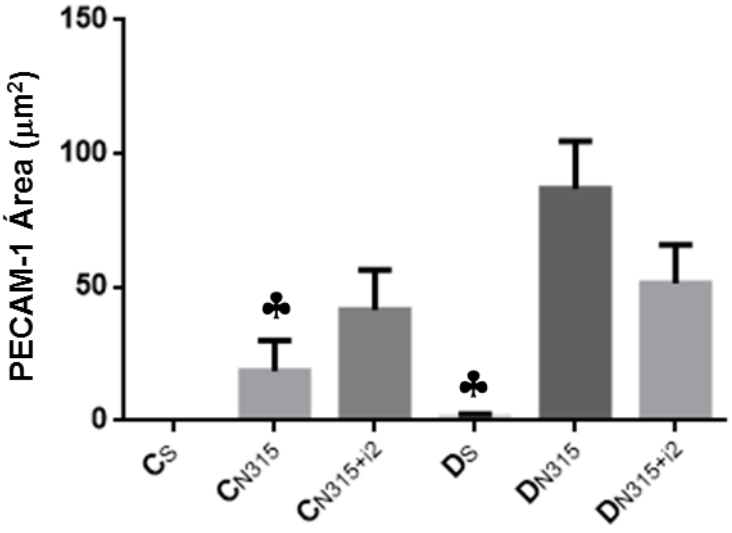


Figura 38. Quantificação de PECAM-1 em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina. Foram fotografados em média 10 campos por lâmina. A quantificação foi determinada pelo software NIS-Elements AR. Os valores representam a média da área do endotélio ± e.p.m. (3 animais por grupo). ♣p<0,001 vs D_{N315}.

A infecção com a cepa N315 Hla$^+$ não gerou expressão de ICAM-1 (figura 39) e P-selectina (figura 40) no endotélio vascular do mesentério de animais de nenhum dos grupos experimentais como pode ser notado na tabela 11 a seguir.

Tabela 11. Quantificação de ICAM-1 e P-selectina em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina (μm^2)

Animais	ICAM-1 (μm^2)	P-selectina (μm^2)
C_S	0 ± 0	0 ± 0
C_{N315}	0 ± 0	8 ± 4
$C_{N315+i2}$	27 ± 15	36 ± 10
D_S	0 ± 0	0 ± 0
D_{N315}	0 ± 0	4 ± 3
$D_{N315+i2}$	0 ± 0	0 ± 0

Diabetes mellitus induzido por injeção de aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção intraperitoneal de *S. aureus*. Os animais receberam tratamento com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m. (3 animais por grupo).

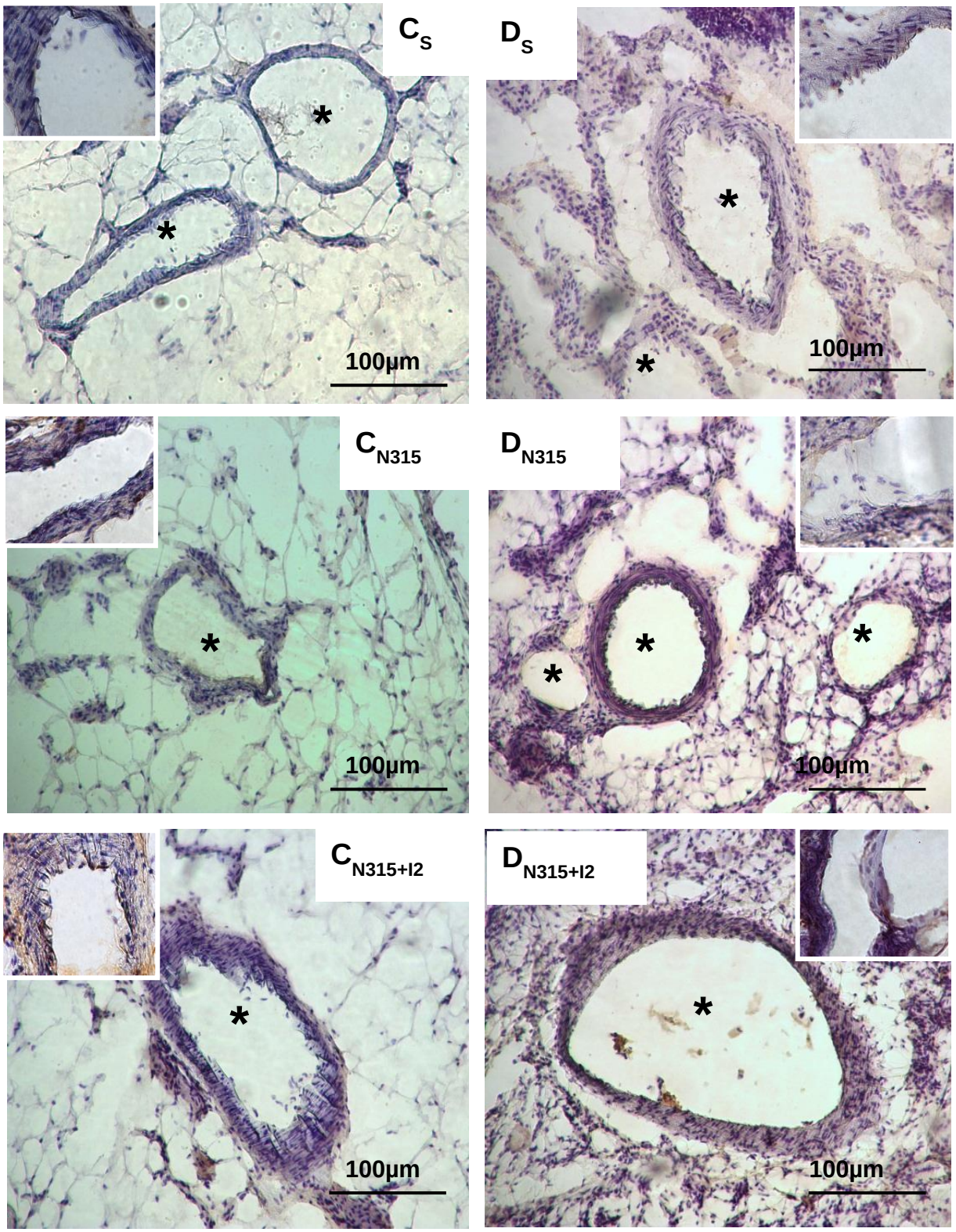


Figura 39. **Marcação por imunohistoquímica para ICAM-1 em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles.** *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com 4 doses de insulina (i2). Figuras representativas de 3 animais por grupo. 5-12 vasos/animal (*) – Vaso sanguíneo. Barras = 25µm (40x) e 100µm (10x).

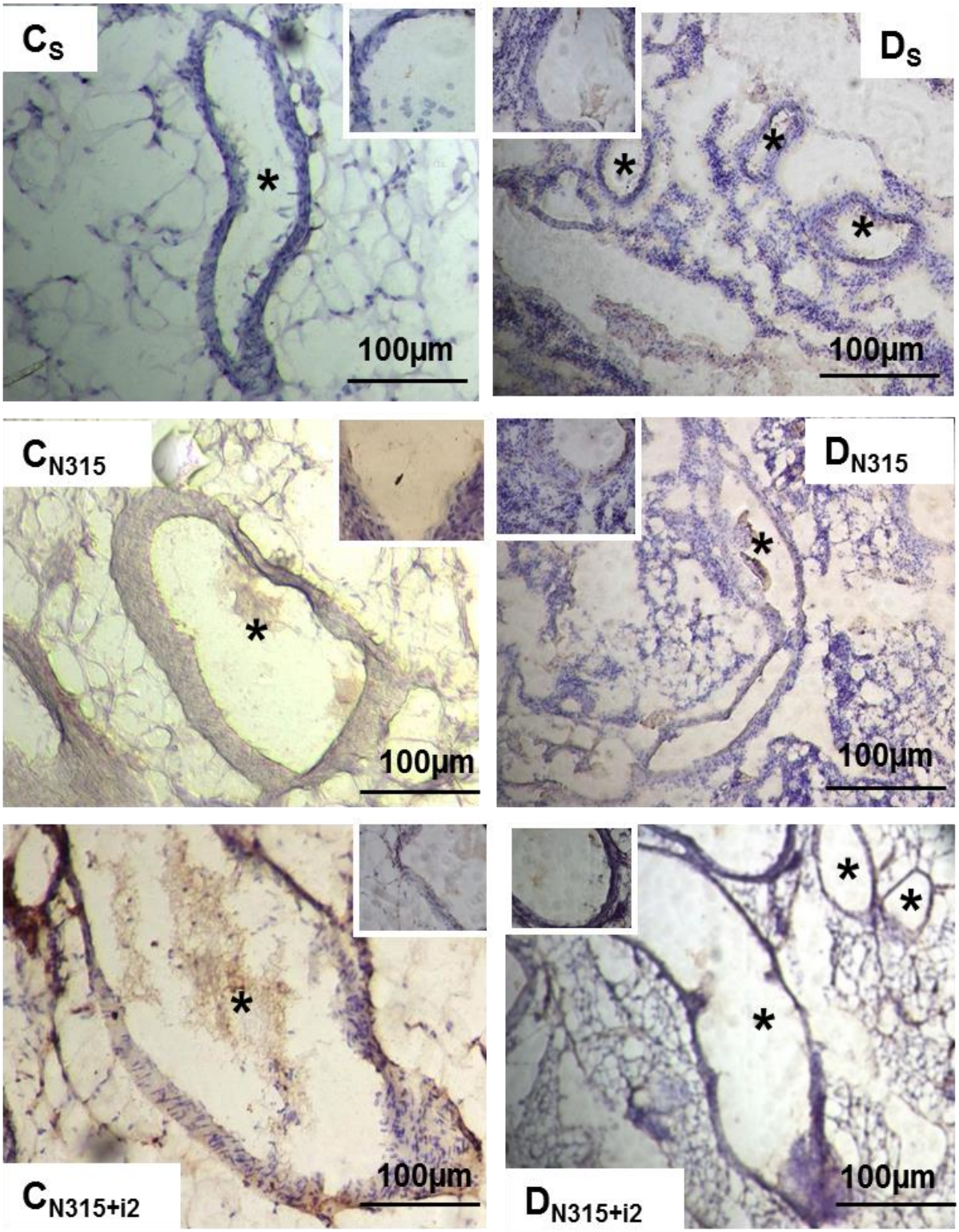


Figura 40. **Marcação por imunohistoquímica para P-selectina em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles.** *Diabetes mellitus* induzido por aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais foram tratados com 4 doses de insulina (i2). Figuras representativas de 3 animais por grupo. 5-12 vasos/animal (*) – Vaso sanguíneo. Barras = 25µm (40x) e 100µm (10x).

A atividade microbicida de macrófagos peritoneais isolados de ratos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla^+ de *S. aureus* foi realizada para determinar a capacidade de sobrevivência desta bactéria dentro dos macrófagos, sendo que o tratamento com insulina não alterou a capacidade dos macrófagos eliminarem a bactéria (Tabela 12).

Tabela 12 – Atividade microbicida de macrófagos de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla^+ de *S. aureus* e respectivos controles

	Sobrevivência (%)
C_{N315}	50,9 ± 3,4
$C_{N315+i2}$	48,1 ± 4,3
D_{N315}	46,6 ± 4,4
$D_{N315+i2}$	46,0 ± 4,9

Diabetes mellitus induzido por injeção de aloxana (42 mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.p. de *S. aureus*. Os animais receberam tratamento com 4 doses de insulina (i2). Os valores representam a média ± e.p.m. (4 animais por grupo).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A aloxana e a estreptozotocina são drogas diabetogênicas que se acumulam nas ilhotas pancreáticas causando necrose irreversível das células β pancreáticas (RERUP, 1970; GAULTON et al., 1985; SZKUDELSKI, 2001). Tanto a aloxana quanto a estreptozotocina apresentam efeitos tóxicos: a aloxana, particularmente em altas doses, leva a necrose da célula tubular renal (LENZEN et al., 1996), enquanto, a estreptozotocina apresenta toxicidade para células linfoides do baço e do timo (GAULTON et al., 1985).

A toxicidade linfoide causada pela estreptozotocina se manifesta, até mesmo, em doses subdiabetogênicas, sendo notada inversão imediata na proporção entre linfócitos e neutrófilos no sangue periférico, com diminuição dos componentes linfoides (WELLHAUSEN, 1986). Assim, para estudar a ação da insulina na resposta imune inata desenvolvida pela peritonite causada por *S. aureus*, após a indução de diabetes, deve ser utilizada a aloxana, uma vez que a estreptozotocina altera a resposta imunológica, ao depletar linfócitos circulantes e timócitos (GAULTON et al., 1985; WELLHAUSEN, 1986).

Após dez dias, da administração de aloxana por via endovenosa, os animais diabéticos apresentaram redução da massa corpórea, com simultâneo ao aumento da glicemia, como já havia sido observado em estudos prévios (MARTINS et al, 2009; MARTINS et al, 2010), comparados aos animais que receberam salina. Além disto, apresentaram os sinais clássicos de DM: poliúria, polidipsia e polifagia (KUMAR et al, 2012).

Pacientes com DM1 são tratados com doses diárias de diversos tipos de insulina. Neste estudo utilizamos a insulina NPH que, em humanos, atinge seu pico máximo entre 6 a 8 horas após sua administração subcutânea. Martins e colaboradores (2009 e 2010) observaram após a administração de 4 UI de insulina NPH, a restauração de vários parâmetros inflamatórios que estavam reduzidos nos ratos diabéticos instilados 6 horas antes com LPS, mesmo sem normalização da glicemia. Neste estudo, no entanto, a administração de 4UI de insulina NPH, 72 horas após a infecção com *S. aureus,* 8 horas antes da realização dos experimentos, não alterou da glicemia. Por este motivo, foi realizado um segundo protocolo de tratamento dos animais com doses múltiplas de insulina que foram

administradas antes da infecção e por 3 dias consecutivos (ANJOS-VALLOTA, 2006; DI PETTA, 2011), que reduziu a glicemia dos animais, sem normalizá-la.

Em nosso trabalho, a infecção peritoneal pela cepa ATCC 25923 de *S. aureus,* em ratos diabéticos, gerou aumento do infiltrado inflamatório na cavidade peritoneal, tanto para células mononucleares quanto para polimorfonucleares no LPe, em relação a seu grupo controle não infectado (CROSARA-ALBERTO et al, 2002). O tratamento destes animais diabéticos com dose única de insulina (NPH, 4UI, s.c.) 8 horas antes da eutanásia diminuiu a migração celular para o peritônio, mesmo sem modificar a glicemia, enquanto, o tratamento destes animais com 4 doses de insulina diminuiu ainda mais a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, após diminuir a glicemia dos animais. Sendo assim, quando o tratamento com insulina diminui a glicemia, há menor migração celular para cavidade peritoneal.

Por outro lado, a infecção com a cepa N315 HLA+ de *S. aureus* aumentou a migração celular nos animais-controle e diabéticos, em relação aos animais não infecatdos. Neste caso, o tratamento com dose única de insulina (NPH, 4UI, s.c.) 8 horas antes da eutanásia infecção não alterou a migração celular para o peritônio, no grupo controle nem no grupo diabético, apesar de ter alterado a glicemia dos animais diabéticos. Enquanto, o tratamento com 4 doses de insulina diminuiu a migração em animais do grupo controle e aumentou-a no grupo diabético, aumentando a quantidade de células mononucleares no infiltrado inflamatório.

A fagocitose é essencial para a destruição intracelular do *S. aureus*, pois permite a ação de enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio presentes em grânulos nos fagócitos. O processo de fagocitose é facilitado pela ligação de proteínas do sistema complemento e anticorpos, à superfície da bactéria (KO et al, 2013). Apesar disto, em presença de hiperglicemia, ocorre inibição da atividade microbicida dos fagócitos, tanto pela diminuição da capacidade fagocítica, relacionada à inibição da opsonização (MAURIELLO et al, 2014), quanto pela indução de disfunção em neutrófilos, devido à modificação da produção de mieloperoxidase e à redução da secreção de seus grânulos (XIU et al., 2014). Sendo assim, seria esperado que células isoladas de animais não diabéticos apresentassem maior atividade microbicida do que as células isoladas de animais diabéticos, porém isto não foi verificado em nossos experimentos em que o grupo controle e o grupo diabético apresentaram praticamente a mesma atividade microbicida em relação às duas cepas de *S. aureus.*

Isto pode ter acontecido, devido à expressão de fatores de virulência pelo *S. aureus,* entre eles, cápsula polissacarídica que evita fagocitose (NANRA et al, 2013) e, Hla, uma citotoxina, que além de causar citólise, reduz a capacidade fagocítica de macrófagos (ONOGAWA, 2002) e está presente tanto na cepa *S. aureus* ATCC 25923 quanto na cepa N315 HLA+ (ALMEIDA et al, 2013). Além de Hla, a cepa *S. aureus* ATCC 25923 também apresenta PVL, uma leucocidina que forma poros na membrana de leucócitos, causando citólise (MONECKE et al, 2006). A presença destes fatores de virulência pode explicar por que não foi observado aumento de leucócitos sanguíneos após a infecção, uma vez que Hla e PVL destroem os leucócitos.

Evidências, também, sugerem que entre 15 e 50% do inóculo de *S. aureus* sobrevive dentro dos fagossomos de neutrófilos após a fagocitose, e que, neutrófilos que contém *S. aureus* viáveis, sofrem citólise 6 horas após a fagocitose das bactérias e acabam sendo ingeridos por macrófagos, a fim de manter a homeostase do tecido (GREENLEE-WACKER et al, 2014). Este pode ser outro motivo para não tenham sido encontradas diferenças significativas no número de leucócitos sanguíneos em presença de infecção por ambas as cepas de *S. aureus*.

Apesar das evidências de que o tratamento com insulina reestabeleça a atividade bactericida de neutrófilos de animais diabéticos contra *S. aureus* (YANO et al, 2012); em nossos experimentos, o tratamento com insulina não melhorou a atividade microbicida das células independentemente da cepa de *S. aureus* utilizada para infecção peritoneal. Isto pode ter acontecido devido à secreção, pela bactéria, de inibidores de proteases serina neutrofílicas que bloqueiam a atividade de proteases essenciais para atividade celular, como, por exemplo, elastase, catepsina G e proteinase 3, que são armazenadas nos grânulos presentes nos neutrófilos e são secretadas após ativação celular a fim de eliminar as bactérias, ou até mesmo, inativar alguns de seus fatores de virulência (STAPELS et al, 2014).

Apesar disto, a bactéria pode sobreviver e crescer dentro de macrófagos, mesmo em presença de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio produzidas após a fagocitose, devido à expressão substâncias codificadas geneticamente que diminuem ou inativam estas espécies reativas, entre elas, a catalase e a superóxido dismutase, enzimas que convertem peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, diminuindo a atividade microbicida e, consequentemente, permitindo a sobrevivência bacteriana (BISHAYI, et al, 2015).

A peritonite lesiona as células mesoteliais que revestem a membrana peritoneal e desempenham um papel fundamental na homeostase, na resposta imune e na manutenção da estrutura da membrana peritoneal, induzindo-as a produzirem localmente, altas concentrações de vários mediadores inflamatórios, como, por exemplo, IL-1β, IL-6 e TNF-α, que apresentam papel essencial na resposta inflamatória decorrente da peritonite (HAUSMANN et al, 2000; YUNG, CHAN, 2012; FIEREN, 2012). Além disso, os macrófagos peritoneais também sintetizam mediadores inflamatórios, como, por exemplo, IL-1β, TNF-α, IFN-γ e TGF-β1, que medeiam a secreção de quimiocinas, cujo principal efeito é recrutamento de PMNs neutrófilos para o local da lesão (YUNG, CHAN, 2012).

Assim, neste estudo avaliou-se a participação das quimiocinas CINC-1, CINC-2 e CINC-3 na resposta inflamatória peritoneal induzida por *S. aureus,* uma vez que, em ratos, estas quimiocinas exercem a função de IL-8, produzida por humanos, como mediadora da resposta inflamatória, ativando neutrófilos e, consequentemente, assegurando resistência a infecções (SHIBATA et al., 2000). A produção de CINC-1 é estimulada pela secreção de IL-1β e TNF-α (WATANABE et al., 1991), sendo fundamental para a quimiotaxia de PMNs para o sítio inflamatório e para a infiltração de neutrófilos (OLARU, JENSEN, 2010).

Em nossos experimentos, a produção de CINC-3 pelos grupos controle e diabético, não foi alterada pela infecção com quaisquer das cepas de *S. aureus* ou pelos diferentes tratamentos com insulina. Enquanto a concentração de CINC-2, em resposta a infecção pela cepa ATCC 25923, foi maior no grupo diabético do que no controle e o tratamento do grupo diabético com 4 doses de insulina diminuiu esta produção em relação aos animais não tratados. Por outro lado, em resposta a infecção pela cepa N315 HLA+, a produção de CINC-2, no grupo controle foi aumentada pelos dois tratamentos com insulina e, no diabético, caiu com a infecção, mas os tratamentos com insulina restabeleceram-na.

Considerando que animais diabéticos apresentam resposta imunológica alterada, era esperada a diminuição de concentração de IL-1β, TNF-α e, consequentemente, CINC-1 em comparação com o grupo controle, com menor infiltrado leucocitário (ANJOS-VALOTA et al., 2006; DE OLIVEIRA MARTINS et al., 2006; DELAMAIRE et al., 1997), porém em nosso trabalho, a infecção peritoneal com a cepa ATCC 25923 de *S. aureus* determinou aumento expressivo das

concentrações de IL-1β e CINC-1 no LPe de animais diabéticos em relação a seus controles, com aumento do infiltrado leucocitário, mesmo sem que houvesse alteração nas concentrações de TNF-α e IL-6. Enquanto, a infecção com a cepa N315 HLA+ aumentou a produção de CINC-1 no LPe de animais diabéticos, com aumento do infiltrado leucocitário, sem que houvesse alteração nas concentrações de IL-1β, TNF-α e IL-6.

Apesar disto, evidências sugerem que a hiperglicemia promove inflamação, aumentando a concentração das citocinas pró-inflamatórias, TNF-α e IL-6; e, que o tratamento com insulina exerce efeitos anti-inflamatórios por meio da supressão da fase aguda da resposta inflamatória e da diminuição da produção destas citocinas pró-inflamatórias (WASMUTH et al, 2004).

Em nossos ensaios, no LPe de animais diabéticos com peritonite causada pela cepa ATCC 25923 tratados com dose única de insulina, houve diminuição na produção de CINC-1 e no infiltrado leucocitário, mesmo com a manutenção da produção de IL-1β, TNF-α e IL-6; enquanto, o tratamento, destes animais, com 4 doses houve aumento da produção de IL-1β, IL-6 e TNF-α e diminuição de CINC-1, e no infiltrado inflamatório. Já, no LPe de animais diabéticos com peritonite causada pela cepa N315 HLA+, os diferentes tratamento com insulina, não alteraram a produção de TNF-α. O tratamento com dose única de insulina aumentou a produção de IL-1β, diminuiu a produção de CINC-1, mas não alterou o infiltrado leucocitário e a produção de IL-6; enquanto o tratamento com 4 doses de insulina aumentou a produção de IL-1β, IL-6 e infiltrado inflamatório, mas reduzindo a produção de CINC-1.

Evidências sugerem que IL-6 possa estar relacionada à resolução da peritonite causada por *S.aureus,* pois restaura a atividade fagocítica e aumenta a acidificação do fagossomo, destruindo a bactéria (ONOGAWA et al, 2013); e, que pacientes com DM1 podem apresentar aumento na produção de IL-10 e IL-6 por monócitos, em certas condições (SPATZ et al, 2003). A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que inibe a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IFN- γ, modulando a resposta inflamatória (MOORE et al., 1993) . No entanto, no presente estudo, os níveis de IL-10 não se mostraram alterados em nenhum dos grupos, assim como não houve alteração nas concentrações de IL-12 e CINC-3.

Por outro lado, IFN-γ é produzido no início da infecção por *S. aureus*, e é um dos principais fatores que determinam a resolução da infecção, pois aumenta a expressão de TLR, promove ativação do NF-kB e induz a fatores de transcrição que são essenciais para ativação dos fagócitos (GILLRIE et al, 2010). Em nossos experimentos, a infecção com a cepa ATCC 25923 aumentou a produção de IFN-γ, tanto no grupo controle como no grupo diabético, sendo que, nos grupo controle e diabético, o tratamento com 4 doses de insulina aumentou esta produção, porém, mesmo assim, não houve melhora na capacidade microbicida dos macrófagos peritoneais. O mesmo resultado foi encontrado durante a infecção com a cepa N315 HLA+.

A migração de leucócitos pelas camadas endoteliais e mesoteliais, em direção à cavidade peritoneal, depende de eventos sucessivos que envolvem a expressão de algumas moléculas de adesão endoteliais que permitem interação do endotélio com os leucócitos, a reorganização das junções intercelulares e o rearranjo do citoesqueleto (WELTEN et al, 2004). Enquanto, P-selectina e E-selectina, interagem de forma reversível com ligantes presentes nos leucócitos, promovendo sua desaceleração perto do local da infecção, garantindo a interação entre ICAM-1, expressa por células endoteliais, e β2 integrinas, presentes na superfície dos fagócitos, para que ocorra a diapedese (SPAAN et al, 2013); PECAM-1, como o principal constituinte de junções intercelulares das células endoteliais, é essencial para a estabilidade destas junções e, consequentemente, para a transmigração de leucócitos através das células endoteliais (PRIVRATSKY, NEWMAN, 2014).

Assim, analisamos a expressão de P-selectina, ICAM-1 e PECAM-1 no endotélio vascular do mesentério, qualitativa e quantitativamente, após a infecção com as duas cepas e as consequências dos diferentes tratamento com insulina nesta expressão. Após a infecção com a cepa ATCC 25923, os animais controles exibem marcada expressão de PECAM-1, ICAM-1 e P-selectina, ao contrário dos animais diabéticos, que apresentam expressão de PECAM-1 e P-selectina parecida com animais não infectados e expressão de ICAM-1 reduzida, mostrando que esta cepa não gerou a expressão destas moléculas de adesão nos animais diabéticos infectados com ela. O tratamento com dose única de insulina apenas restaurou a expressão de PECAM-1 no endotélio vascular do mesentério de ratos diabéticos,

enquanto o tratamento com 4 doses de insulina não restaurou a expressão destas moléculas de adesão nos animais diabéticos e, ainda, diminuiu a expressão destas nos animais controles. Apesar da expressão destas moléculas de adesão não ser expressiva nos animais diabéticos infectados com a cepa ATCC 25923, encontramos aumento considerável no infiltrado inflamatório destes animais, com produção aumentada de CINC-1 no LPe. Além disto, ambos os tratamentos com insulina, além de não restaurarem a expressão de moléculas de adesão, ainda diminuiram a concentração de CINC-1 e infiltrado inflamatório no LPe de animais diabéticos, sugerindo que, neste caso, a produção de CINC-1 é o fator limitante para a migração celular para o sítio de infecção (WATANABE et al , 1992).

Além disso, a diminuição do infiltrado inflamatório pode ser devida à ativação de vias de autofagia pelo HLA expresso por esta cepa, por meio da diminuição dos níveis de AMPc intracelular, favorecendo a sobrevivência intracelular da bactéria (MESTRE, COLOMBO, 2012).

Por sua vez, a infecção com a cepa N315 HLA+ não alterou a expressão de ICAM-1 e P-selectina em endotélio vascular de animais controles e diabéticos, e, os diferentes tratamentos com insulina não foram capazes de reverter esta situação, porém, a infecção aumentou a expressão de PECAM-1 no endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos, sem que houvesse alteração desta expressão pelos diferentes tratamentos com insulina. Apesar da expressão destas moléculas de adesão não ser expressiva nos animais diabéticos infectados com a cepa N315 HLA+, foi verificado aumento no infiltrado inflamatório destes animais, com produção aumentada de CINC-1 no LPe. Neste caso, ambos os tratamentos com insulina, diminuíram consideravelmente a concentração de CINC-1, enquanto o tratamento com 4 doses de insulina aumentou o infiltrado inflamatório no LPe.

A Tabela 13, apresenta um resumo do efeito dos diferentes tratamentos com insulina nos parâmetros estudados.

Tabela 13: Resumo dos Resultados Obtidos

	ATCC						N315					
	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$	C_{N315}	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	D_{N315}	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
Infiltrado inflamatório	-	-	-	↑ 3,6x	↓ 56%	↓ 82%	-	-	↓ 80%	-	-	↑ 58%
CINC-1	↑ 28x	↓ 48%	↓ 95%	↑ 17x	↓ 15%	↓ 96%	↑ 5x	↑ 26%	↓ 75%	↑ 9x	↓ 84%	↓ 92%
CINC-2	-	-	↑ 3x	-	-	↓ 45%	-	↑ 6,8x	↑ 6,8x	↓ 92%	↑ 20x	↑ 10x
CINC-3	-	↑ 60%	-	-	↑ 48%	-	-	-	-	-	↑ 81%	-
IL-1β	-	-	-	↑ 13x	-	↑ 42%	-	-	-	-	↑ 3,7x	↑ 4,9x
IL-4	↑ 9,4x	↑ 37%	-	↑ 8,2x	↑ 2,6x	-	↑ 9,8x	↓ 46%	-	↑ 8,6x	↑ 60%	-
IL-6	-	-	↑ 4,7x	-	-	↑ 7,6x	-	-	↑ 18x	-	-	↑ 18,7x
IL-12	-	-	↓ 50%	↓ 40%	-	-	-	-	-	↓ 45%	-	-
TNF-α	-	-	↑ 3,3x	-	-	↑ 2,8x			↑ 40%	-	-	-
IFN-γ	↑ 2,8x	-	↑ 3,4x	↑ 2,9x	↓ 30%	↑ 2,2x	↑ 2,5x	↑ 1,8x	↑ 3,9x	↑ 2x	-	↑ 3,3x
PECAM-1	↑ 170x	NR	↓ 58%	-	NR	-	-	NR	-	↑ 44x	NR	-
ICAM-1	↑ 247x	NR	↓ 100%	↑ 137x	NR	-	-	NR	-	-	NR	-
P-selectina	↑ 216x	NR	↓ 91%	-	NR	-	-	NR	-	-	NR	-

Sendo, C_{ATCC}, C_{N315}, D_{ATCC}, D_{N315} – após a infecção; $C_{ATCC+i1}$, $C_{N315+i1}$, $D_{ATCC+i1}$, $D_{N315+i1}$ – após tratamento com uma dose de insulina em relação ao respectivo grupo infectado, $C_{ATCC+i2}$, $C_{N315+i2}$, $D_{ATCC+i2}$, $D_{N315+i2}$ – após tratamento com quatro doses de insulina em relação ao respectivo grupo infectado. NR – não realizado.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que, em ratos diabéticos, a insulina modula a peritonite induzida por cepas diferentes de *S. aureus*, modificado o infiltrado inflamatório, a produção das quimiocinas CINC-1, CINC-2, CINC-3; e a produção das citocinas, IL-1β, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, e, assim como, expressão de moléculas de adesão, ICAM-1, P-selectina e PECAM-1, no endotélio vascular do mesentério.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature Immunology**, New York, v. 2, n. 8, p. 675-680, 2001.

ALBA-LOUREIRO, T. C et al. Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils. **The Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 188, n. 2, p. 295-303, 2006.

ALMEIDA, L. M. et al. Comparative analysis of agr groups and virulence genes among subclinical and clinical mastitis *Staphylococcus aureus* isolates from sheep flocks of the Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 2, p. 493-498, 2013.

ALONZO III, F. et al. CCR5 is a receptor for *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED. **Nature**. London, v. 493, n. 7430, p. 51-55, 2013.

ALWAKEEL, J. S. et al. Factors affecting the progression of diabetic nephropathy and its complications: a single-center experience in Saudi Arabia. **Annals Saudi Medicine**, Riyadh, v. 31, n. 3, p. 236-242, 2011.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes – 2014. **Diabetes Care**, Alexandria; v. 37, p.S15-S80, 2014. Supplement.

ANDERSON, A. S. et al. Development of a multicomponent *Staphylococcus aureus* vaccine designed to counter multiple bacterial virulence factors. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, Philadelphia, v. 8, n. 11, p. 1585-1594, 2012.

ANDERSON, M. J.; PARKS, P. J.; PETERSON, M. L. A mucosal model to study microbial biofilm development and anti-biofilm therapeutics. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 92, n. 2, p. 201-208, 2013.

ANJOS-VALOTTA, E. A. et al. Inhibition of tumor necrosis factor-α-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in diabetic rats: role of insulin. **Inflammation Research**, Basel. v. 55, n. 1, p. 16-22, 2006.

ANNIGERI, R. et al. Emergence of mupirocin-resistant *Staphylococcus aureus* in chronic peritoneal dialysis patients using mupirocin prophylaxis to prevent exit-

site infection. **Peritoneal Dialysis International***,* Downsview*,* v. 21, n. 6, p. 554–559, 2001.

BANCHEREAU, R. et al. Host immune transcriptional profiles reflect the variability in clinical disease manifestations in patients with *Staphylococcus aureus* infections. **PLoS ONE***,* San Francisco, v. 7, n. 4, e.34390, 2012.

BARRETTI, P. et al. Peritoneal dialysis-related peritonitis due to *Staphylococcus aureus*: A single-center experience over 15 years. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 2, e. 3178, .2012.

BENSINGER, J. S.; TONTONOZ, P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-actived nuclear receptors. **Nature**, London, v. 454, 470-477, 2008.

BISHAYI, B. et al. Expression of CXCR1 (interleukin-8 receptor) in murine macrophages after *Staphylococcus aureus* infection and its possible implication on intracellular survival correlating with cytokines and bacterial anti-oxidant enzymes. **Inflammation**, New York, v. 38, n. 2, p. 812-827, 2015.

BROWN, A. F. et al. *Staphylococcus aureus* colonization: modulation of host immune response and impact on human vaccine design. **Frontiers in Immunology,** v. 4, 507, 2014.

CALAME, W. et al. Phagocytosis and killing of suspended and adhered bacteria by peritoneal cells after dialysis. **Peritoneal Dialysis International***,* Downsview, v. 15, n. 8, p. 320-327, 1995.

CARVALHO, K. S.; MAMIZUKA, E. M.; GONTIJO FILHO, P. P. Methicillin/Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases***.* Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 71-76, 2010.

CERQUEIRA, D. P.; TAVARES, J. R.; MACHADO, R. C. Fatores preditivos da insuficiência renal e algoritmo de controle e tratamento. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 211-217, 2014.

CHO, J. S. et al. IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. **The Journal of Clinical Investigation** Ann Arbor, v. 120, n. 5, p. 1762-1773, 2010.

COOK-MILLS, J. M.; DEEM, T. L. Active participation of endothelial cells in inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v. 77, n. 4, p. 487-495, 2005.

COOPER, B. A. et al. A Randomized, controlled trial of early versus late initiation of dialysis. **New England Journal of Medicine**, Boston*,* v. 363, n. 7, p. 609-19, 2010.

COSTA-ROSA, L. F. B. P. et al. The effect of insulin on macrophage metabolism and function. **Cell Biochemistry and Function**, Oxford, v.14, n. 1, p. 33-42, 1996.

COSTERTON, J. W. Overview of microbial biofilms. **Journal of Industrial Microbiology**, Houndsmills, v. 15, n. 3, p.137-140, 1995.

CROSARA-ALBERTO, D. P. et al. Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by *Staphylococcus aureus*. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 5, p. 645-658, 2002.

DAVENPORT, A. Peritonitis remains the major clinical complication of peritoneal dialysis: The London, UK, Peritonitis Audit 2002–2003. **Peritoneal Dialysis International***,* Downsview, v. 29, n. 3, p. 297-302, 2009.

DAVIES, S. J. et al. *Staphylococcus aureus* nasal carriage, exit-site infection and catheter loss in patients treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). **Peritoneal Dialysis International***,* Downsview*,* v. 9, n. 1, p. 61-64, 1989.

DAVIES, S. J. Peritoneal dialysis research in the UK: The Cardiff contribution. **Peritoneal Dialysis International***,* Downsview; v. 31, S39-S42, 2011. Supplement 2.

DE OLIVEIRA MARTINS, J. et al. Modulation of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation: Role of insulin. **Shock**, Philadelphia, v. 25, n. 3, p. 260-266, 2006.

DELAMAIRE, M. et al. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. **Diabetic Medicine**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 29-34, 1997.

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**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1, p. 239-244, 2012.

DIAWARA, I. et al. *Staphylococcus aureus* nasal carriage in hemodialysis centers of Fez, Morocco. **Iran Journal of Microbiology**, Tehran, v. 6, n. 3, p. 175-183, 2014.

DI PETTA, A. et al. Insulin modulates inflammatory and repair responses to elastase-induced emphysema in diabetic rats. **International Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v. 92, n. 6, p. 392-399, 2011.

DOTIS, J.; PRINTZA, N.; PAPACHRISTOU, F. Peritonitis due to uncommon gram-positive pathogens in children undergoing peritoneal dialysis. **Hippokratia**, Thessalonikē, v. 16, n. 3, p. 267-268, 2012.

EDDIE, W. K. et al. Phagocytosis and phagosome acidification are required for pathogen processing and MyD88-dependent responses to *Staphylococcus aureus.* **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 184, n. 12, p. 7071-781, 2010.

FARAG, N. et al. Assessment of the efficacy of polyclonal intravenous immunoglobulin G (IVIG) against the infectivity of clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *in vitro* and *in vivo*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v. 32, n. 9, p. 1149-1160, 2013.

FERRACINI, M. et al. Impaired phagocytosis by alveolar macrophages from diabetic rats is related to the deficient coupling of LTs to the FcγR signaling cascade. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 47, n. 11-12. p. 1974-1980, 2010.

FIEREN, M. W. J. A. The local inflammatory responses to infection of the peritoneal cavity in humans: Their regulation by cytokines, macrophages, and other leukocytes. **Mediators of Inflammation**, Sylvania, v. 2012, 976241, 2012.

FIGUEIREDO, A. E. et al. Peritonites em pacientes em diálise peritoneal: análise de um único centro brasileiro segundo a Sociedade Internacional de Diálise Peritoneal. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 214-219, 2013.

FRODERMANN, V. et al. A modulatory interleukin-10 response to staphylococcal peptidoglycan prevents Th1/Th17 adaptive immunity to *Staphylococcus aureus.* **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 204, n. 2, p. 253-262, 2011.

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**, Berlin, v. 28, n. 10, p. 769-775, 1985.

GERBER, J. S. et al. Trends in the incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Children's Hospitals in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 49, n. 1, p. 65-71, 2009.

GHADERIAN, S. B et al. Diabetes and end-stage renal disease; a review article on new concepts. **Journal of Renal Injury Prevention**, Isfahan, v. 4, n. 2, p. 28-33, 2015.

GIAROLA, L. B. et al. HLA molecules and nasal carriage of *Staphylococcus aureus* isolated from dialysis and kidney transplant patients at a hospital in Southern Brazil. **BMC Research Notes**, London, v. 5, 90, 2012.

GILLRIE, M. R. et al. Divergent roles of Toll-like receptor 2 in response to lipoteichoic acid and *Staphylococcus aureus* in vivo. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 40, n. 6, p. 1639-1650, 2010.

GIRARD, L. P. et al. MIC versus MBEC to determine the antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* in peritoneal dialysis peritonitis. **Peritoneal Dialysis International***,* Downsview, v. 30, n. 6, p. 652-656, 2010.

GOVINDARAJULU, S. et al. *Staphylococcus aureus* peritonitis in australian peritoneal dialysis: predictors, treatment, and outcomes in 503 cases. **Peritoneal Dialysis International***,* Downsview, v. 30, n. 3, p. 311-319, 2010.

GREGHI, Sebastiao Luiz Aguiar. **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. 2012. Tese (Livre Docência em Periodontia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2011.

GREENLEE-WACKER, M. C. et al. Phagocytosis of Staphylococcus aureus by human neutrophils prevents macrophage efferocytosis and induces programmed necrosis. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 192, n. 10, p. 4709-4717, 2014.

GUARIGUATA, L. et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Limerick, v. 103, p.137-149, 2014.

GUILLET, J.; HALLIER, M.; FELDEN, B. Emerging functions for the *Staphylococcus aureus* RNome. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 12. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3861533/pdf/ppat.1003767.pdf. Acesso em: 30 jul 2015.

HANKE, M. L.; KIELIAN, T. Deciphering mechanisms of staphylococcal biofilm evasion of host immunity. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 2, 62, 2012.

HANSES, F. et al. Reduced neutrophil apoptosis in diabetic mice during staphylococcal infection leads to prolonged TNF-alfa production and reduced neutrophil clearance. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 8, e23633, 2011.

HAUSMANN M. J. et al. Accessory role of human peritoneal mesothelial cells in antigen presentation and T-cell growth. **Kidney International**, New York, v. 57, n. 2, p. 476-486, 2000.

HERMANS, S. J. et al . Structural and functional properties of staphylococcal superantigen-like protein 4. **Infection and Immunity**, Washington, v. 80, n. 11, p. 4004-4013, 2012.

IMAYAMA, I. et al. Determinants of quality of life in adults with type 1 and type 2 diabetes. **Health and Quality of Life Outcomes**, London, v. 9, 115, 2011.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Key Findings 2014**. Disponível em: http://www.idf.org/diabetesatlas/update-2014. Acesso em: 24 jul 2015.

ISHIGAME, H. et al. Differential roles of interleukin-17A and-17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. **Immunity**, Cambridge, v. 30, n, 1, p. 108-119, 2009.

ITO, T. et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus.* **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 45, n. 5, p. 1323-1336, 2001.

JOHANNESSEN, M.; SOLLID, J. E.; HANSSEN, A.M. Host and microbe determinants that may influence the success of *S. aureus* colonization. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 2, 56, 2012.

JOHNSON, D. W. et al. Antibacterial honey for the prevention of peritoneal dialysis-related infections (HONEYPOT): a randomized trial. **The Lancet. Infectious Diseases**, New York, v. 14, n. 1, p. 23-30, 2014.

JOSHI, N. et al. Infections in patients with diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 341, n. 25, p.1906-1912, 1999.

KIM, Y-L. Update on Mechanisms of Ultrafiltration Failure. **Peritoneal Dialysis International,** Downsview,. v. 29, p. S123-S127, 2009. Supplement 2.

KIRSTEN, V.R. **Caracterização do modelo experimental NOD (nonobese diabetic) em ambiente convencional**. 2006. Dissertação (Mestrado em Nefrologia), Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

KO, Y. et al. Phagocytosis escape by a *Staphylococcus aureus* protein that connects complement and coagulation proteins at the bacterial surface. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 9, n.12, e1003816, 2013.

KOC, Y. et al. Is there impact of mortality prior hemodialysis therapy in peritoneal dialysis patients? **Nefrología**, Madrid, v. 32, n. 3, p. 335-342, 2012.

KOJIMA, H.; KIM, J.; CHAN, L. Emerging roles of hematopoietic cells in the pathobiology of diabetic complications. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 25, n. 4, p. 178-187, 2014.

KOLAR, S. L. et al. Extracellular proteases are key mediators of *Staphylococcus aureus* virulence via the global modulation of virulence-determinant stability. **MicrobiologyOpen**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 18-34, 2013.

KUMAR, S. et al. Acute and chronic animal models for the evaluation of anti-diabetic agentes. **Cardiovascular Diabetology**, London, v. 11, 9, 2012.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Acute and Chronic Inflammation. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER J.C. **Robbins and Cotran: Pathologic Basis of Disease**. 9th ed. Ontario: Saunders, 2014.

KVIETYS, P. R.; GRANGER, D. N. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**, New York. v. 52, n.3, p. 556-592, 2012.

LENZEN, S.; MUNDAY, R. Thiol-goup reactivity, hydrophilicity a stability of alloxan, its reduction products and its *N*-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 42, n. 7, 1385-1391, 1991.

LENZEN, S.; TIEDGE, M.; JORNS, A.; MUNDAY, R. Alloxan derivatives as a tool for the elucidation of the mechanism of the diabetogenic action of alloxan. In:

SHAFRIR, E. (ed). **Lessons from Animal Diabetes IV***,* Boston: Springer: 1996. P. 113-122.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, Berlin, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.

LERCO, M. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de *Diabetes Mellitus*, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirurgica Brasileira***,* São Paulo, v. 18, n. 2, p. 132-142, 2003.

LOBO, J. V. D. et al. Preditores de peritonite em pacientes em um programa de diálise peritoneal. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 32, n. 2, p.156-164, 2010.

LUGON, J. R. Doença Renal Crônica no Brasil: um problema de saúde pública. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo*,* v. 31 p. 2-5. 2009. Suplemento 1.

MARTINS, J. O. et al. Insulin modulates cytokine release and selectin expression in the early phase of allergic airway inflammation in diabetic rats. **BMC Pulmonary Medicine**, London, v. 10, 39, 2010a.

MARTINS, J. O. et al. Signaling pathways and mediators in LPS-induced lung inflammation in diabetic rats: Role of insulin. **Shock**, Philadelphia, v. 33, n. 1, p. 76-82, 2010b.

MARTINS, J. O. et al. Insulin regulates cytokines and intercellular adhesion molecule-1 gene expression through NF-kappaB activation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. **Shock**, Philadelphia, v. 31, n. 4, p. 404-409, 2009.

MATSUI, K.; NISHIKAWA, A. Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* induces TH2 immune response in mice. **Journal of Investigational Allergology and Clinical immunology**, Barcelona, v. 12, v. 2, p. 80-86, 2012.

MAURIELLO, C. T. et al. Hyperglycemia inhibits complement-mediated immunological control of *S. aureus* in a rat model of peritonitis. **Journal of Diabetes Research**, Cairo, v. 2014, 762051, 2014.

MCLOUGHLIN, R. M. et al. O. IFN-gama regulated chemokine production determines the outcome of *Staphylococcus aureus infection*. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 181, n. 2, p. 1323-1332, 2008.

MERRIMAN, J. A.; NEMETH, K. A.; SCHLIEVERT, P. M. Novel antimicrobial peptides that inhibit gram positive bacterial exotoxin synthesis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 4, e.95661, 2014.

MESTRE, M. B.; COLOMBO, M. I. *Staphylococcus aureus* promotes autophagy by decreasing intracellular cAMP levels. **Autophagy**, Georgetown, v. 8, n. 12, p. 1865-1867, 2012.

MITCHELL, G. et al. SigB is a dominant regulator of virulence in *Staphylococcus aureus* small-colony variants. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 5, e,65018, 2013.

MONECKE, S. et al. Comparative genomics and DNA array-based genotyping of pandemic *Staphylococcus aureus* strains encoding Panton-Valentine leucocidin. **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 13, n. 3, p. 236-249, 2007.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 11: p. 165-190, 1993 .

MOUTZOURI, A. G. et al. Severe sepsis and *diabetes mellitus* have additive effects on red blood cell deformability. **The Journal of Infection**, Kent, v. 57, n. 2, p. 147-151, 2008.

MULLER, W. A. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. **Circulation Research**, Baltimore, v. 105, n. 3, p. 223-230, 2009.

NANRA, J. S. et al. Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus.* **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, Philadelphia, v. 9, n. 3, p. 480-487, 2013.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. **A clinical update on an alternative vascular access for the catheter-dependent hemodialysis patient, 2012**. Disponível em: http://www.kidney.org/professionals/tools/pdf/12-10-4487_KBB.pdf. Acesso em: 11 jun 2014.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. **Dialysis, 2013**. Disponível em: http://www.kidney.org/atoz/content/dialysisinfo.cfm. Acesso em: 11 jun 2014.

NETSVYETAYEVA, I. et al. *Staphylococcus aureus* nasal carriage in Ukraine: antibacterial resistance and virulence factor encoding genes. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 14, 2014. Disponível em:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3996852/pdf/1471-2334-14-128.pdf. Acesso em: 30 jul 2015.

NIELSEN, A. et al. Solonamide B inhibits quorum sensing and reduces *Staphylococcus aureus* mediated killing of human neutrophils. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 1, e. 84992, 2014.

NIZET, V.; BRADLEY, J. S. Staphylococcal Infections. In: REMINGTON, J. S.; KLEIN, J. O.; WILSON, C. B.; NIZET, V.; MALDONADO, Y. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn**. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2010. p, 489-515.

OFEK, I. et al. Surfactant protein D enhances phagocytosis and killing of unencapsulated phase variants of *Klebsiella pneumonia*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 1, p. 24-33, 2001.

OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

OLSEN, K. et al. *Staphylococcus aureus* nasal carriage is associated with serum 25-hydroxyvitamin D levels, gender and smoking status. The Tromsø Staph and Skin Study. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Ddiseases**, Berlin, v. 31, n. 4, p. 465-473, 2012.

OLSEN, K. et al. Prevalence and population structure of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in healthcare workers in a general population. The Tromsø Staph and Skin Study. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 141, n. 1, p.143-152, 2013.

OLARU, F.; JENSEN, L. E. *Staphylococcus aureus* stimulates neutrophil targeting chemokine expression in keratinocytes through an autocrine il-1a signaling loop. **The Journal of Investigative Dermatology**, New York, v. 130, n. 7, p. 1866-1876, 2010.

ONOGAWA, T. Staphylococcal alpha-toxin synergistically enhances inflammation caused by bacterial components. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** , Oxford, v. 33, n. 1, p. 15-21, 2002.

ONOGAWA, T. et al. IL6 trans-signaling promotes functional recovery of hypofunctional phagocytes through STAT3 activation during peritonitis. **Inflammation Research**, Basel, v. 62, n. 8, p. 797-810, 2013.

PANNEERSELVAM, S.; GOVINDASAMY, S. Sodium molybdate improves the phagocytic function in alloxan-induced diabetic rats. **Chemico-biological Interactions**, Limerick, v. 145, n. 2, p. 159-163, 2003.

PARK, K-H. et al. Persistent catheter-related *Staphylococcus aureus* bacteremia after catheter removal and initiation of antimicrobial therapy. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 10, e. 46389, 2012.

PECK, R. A one-plate assay for macrophage bactericidal activity. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 82, n. 1, p.131-40, 1985.

PELEG, A. Y. et al. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 3-13, 2006.

PEREIRA, L. C.; MARTINS, G. B. Expressão do fator de crescimento transformador-beta em mucosa oral submetida à radioterapia. Uma revisão crítica da literatura. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, Juiz de Fora, v. 2, n. 1, p. 26-30, 2010.

PEREIRA, M. A. A.; SANNOMIYA, P.; GARCIA-LEME, J. Inhibition of leukocyte chemotaxis by factor in alloxan-induced diabetic rat plasma. **Diabetes**, Alexandria, v. 36, n. 11, p. 1307-1314, 1987.

PESCHKE, E. et al. ‘Classical’ and ‘new’ diabetogens - comparison of their effects on isolated rat pancreatic islets *in vitro*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 57, n. 1, p. 158-164, 2000;.

PETTERSSON, U. S. et al. Increased recruitment but impaired function of leukocytes during inflammation in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 7, e. 22480, 2011.

PIETROCOLA, G. et al. Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus.* **The International Journal of Artificial Organs**, Milano, v. 34, n. 9, p. 799-810, 2011.

PIRAINO, B. Can we reduce rates of S*taphylococcus aureus* and other peritonitis in peritoneal dialysis patients? **Peritoneal Dialysis**, Downsview, v. 30, n. 3, p. 277-279, 2010.

PONGCHAROEN, S. et al. Impaired interleukin-1b expression by monocytes stimulated with *Staphylococcus aureus* in diabetes. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v. 42, n. 5, p. 1197-1203, 2011.

POPOV, L. et al. Three-dimensional human skin models to understand *Staphylococcus aureus* skin colonization and infection. **Frontiers in immunology** , Lausanne, v. 5, e. 41, 2014.

POWERS, M. E.; WARDENBURG, J. B. Igniting the fire: *Staphylococcus aureus* virulence factors in the pathogenesis of sepsis. **PLoS Pathogens**, San Francisco*,* v. 10, n. 2, e. 1003871, 2014.

PRICE, J. et al. Clinical and microbiological determinants of outcome in *Staphylococcus aureus* bacteraemia. **International Journal of Microbiology**, Cairo, v. 2010, 654858, 2010.

PRIVRATSKY, J. R.; NEWMAN, P. J. PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity. **Cell and Tissue Research,** Berlin, v. 355, n. 3, p. 607-619, 2014.

RANKIN, J. A. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Clinical Issues**, Hagerstown, v. 15, n. 1, p. 3-17, 2004.

RAUCH, S. et al. Abscess formation and alpha-hemolysin induced toxicity in a mouse model of *Staphylococcus aureus* peritoneal infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 80, n. 10, p. 3721-3372, 2012.

RERUP, C. C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, v. 22, n. 4, p. 485-518, 1970.

RICE, K. C. et al. The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus.* **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 19, p. 8113–8118, 2007.

RICH, J.; LEE, J.C. The pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection in the diabetic NOD mouse. **Diabetes**, Alexandria, v. 54, n. 10, p. 2904-2910, 2005.

RIGBY, K. M.; DELEO, .R. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. **Seminars in Immunopathology**, Berlin, v. 34, n. 2, p. 237-259, 2012.

ROHILLA, A.; ALI, S. Alloxan induced diabetes: Mechanisms and effects. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences.** [S.l.], v. 3, n. 2, p. 819-823, 2012.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudos de diversos fatores. **Memórias do Instuto Butantan**, v. 20, p. 315-328,1947.

SÁ, H. O. Peritoneal dialysis as first option: a successful choice. **Portuguese Journal of Nephrology and Hypertension**, Coimbra, v. 25, n. 2, p. 119-125, 2011.

SADOWSKA, B. et al. The immunomodulatory activity of *Staphylococcus aureus* products derived from biofilm and planktonic cultures. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, Basel, v. 61, n. 5, p. 413-420, 2013.

SAHUKHAL G. S.; ELASRI, M. O. Identification and characterization of an operon, msaABCR, that controls virulence and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. **BMC Microbiology**, London, v. 14, 2014. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4229872/. Acesso em: 8 jun 2015.

SAITO, S. K. et al. A comparative study in sterility levels in continuous ambulatory peritoneal dialysis systems. **Journal of Nippon Medical School**, Tokyo, v. 77, n. 6, p. 306-311, 2010.

SANTAMARÍA, B. et al. Peritoneal defence-lessons learned which apply to diabetes complications. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, Oxford, 2006; v. 2, p. ii12–ii15. Supplement 2.

SCHAFFER, A. C. et al. Immunization with *Staphylococcus aureus* clumping factor B, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n. 4, p. 2145–2153, 2006.

SEGAL, J. H.; MESSANA, J. M. Prevention of peritonitis in peritoneal dialysis. **Seminars in Dialysis**, Cambridge, v. 26, n. 4, p. 494-502, 2013.

SEREZANI, C. H. C. et al. Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. **Blood**, Washigton, v. 106, n. 3, p.1067-1075, 2005.

SESSO, R. C. et al. Relatório do Censo Brasileiro de Diálise Crônica 2012. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 48-53, 2014.

SHIBATA, F.; KONISHI, K.; NAKAGAWA, H. Identification of a common receptor of three types of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINCs). **Cytokine**, Oxford, v. 12, n. 9, p.1368-1373, 2000.

SHUKLA, S. K. et al. Comparative whole-genome mapping to determine *Staphylococcus aureus* genome size, virulence motifs, and clonality. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 11, p. 3526-3533, 2012.

SINANGIL, A. et al. Effects of infectious complications on patients' survival in peritoneal dialysis. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, Rome, v. 17, n. 8, p. 1064-1072, 2013.

SLEE, A. D. Exploring metabolic dysfunction in chronic kidney disease. **Nutrition and Metabolism** , London, v. 9, 36, 2012. Disponível em:

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. São Paulo, SP, 2014-2015.

SPAAN, A. N. et al. Neutrophils versus *Staphylococcus aureus*: A biological tug of war. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 67, p. 629-650, 2013.

SPATZ, M. et al. Impaired primary immune response in type-1 diabetes. Functional impairment at the level of APCs and T-cells. **Cellular Immunology**, Orlando, v. 221, n. 2, p. 15-26, 2003.

STAPELS, D. A. C. et al. *Staphylococcus aureus* secretes a unique class of neutrophil serine protease inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 111, n. 36, p. 13187-13192, 2014.

STRUNK, T. et al. TLR2 mediates recognition of live *Staphylococcus epidermidis* and clearance of bacteremia. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 4, e. 10111, 2010.

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

SUNAHARA, K. K.; SANNOMIYA, P.; MARTINS, J. O. Briefs on insulin and innate immune response. **Cellular Physiology and Biochemistry**, Basel, v. 29, n. 1-2, p. 1-8, 2012.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, Praha, v. 50, n. 6, p. 536-546, 2001.

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

THAY, B.; WAI, S. N.; OSCARSSON, J. *Staphylococcus aureus* α-toxin-dependent induction of host cell death by membrane-derived vesicles. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 1, e. 0054661,2013.

THURLOW, L. R. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation *in vivo*. **Journal of Immunology** , Bethesda, v. 186, n. 11, p.6585-6596, 2011.

TOBUDIC, S. et al. Impact of various peritoneal dialysis solutions on the growth of common bacterial and yeast pathogens. **Peritoneal Dialysis International : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis***,* Downsview, v. 31, n. 6, p. 688-692, 2011.

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

VANDERKOOI, O. G. et al. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in children: a population-based assessment. **Paediatrics and Child Health**, Oakville, v. 16, n. 5, p. 276-280, 2011.

VELOSO, T. R. et al. Use of a human-like low-grade bacteremia model of experimental endocarditis to study the role of *Staphylococcus aureus* adhesins and platelet aggregation in early endocarditis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 81, n. 3, p. 697-703, 2013.

VIDAL, P. M. et al. Differences between “classical” risk factors for infections caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and risk factors for nosocomial bloodstream infections caused by multiple clones of the staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV MRSA strain. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Cambridge, v. 30, n. 2, p. 139-145, 2009.

WARREN, R. *Staphylococcus aureus:* A cross sectional study of prevalence and risk factors in one general practice **Australian Family Physician**, Rozelle, v. 41, n. 5, p. 325-328, 2012.

WASMUTH, H. E. et al. Hyperglycemia at admission to the intensive care unit is associated with elevated serum concentrations of interleukin-6 and reduced ex vivo secretion of tumor necrosis factor-alpha. **Critical Care Medicine**, Philadelphia, v. 32, n. 5, p. 1109-1114, 2004.

WATANABE, K. et al. Rat CINC, a member of the IL8 family, is a neutrophil-specific chemoattractant *in vivo*. *Exp Mol Pathol*. v. 55, n. 1, p. 30-37, 1991.

WATANABE, K. et al. Effect of Rat CINC/gro, a Member of the Interleukin-8 Family, on Leukocytes in Microcirculation of the Rat Mesentery. **Experimental and Molecular Pathology**, Orlando, v. 56, n. 1, p. 60-69, 1992.

WELLHAUSEN, S. R. Definition of streptozocin toxicity for primary lymphoidal tissues. **Diabetes**, Alexandria, v. 35, n. 12, p. 1404-1411, 1986.

WELTEN, A. G. A. et al. *In vitro* and *In vivo* model for peritonitis demonstrate unchanged neutrophil migration after exposure to dialysis fluid. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 831-839, 2004.

WILLCOX, A. et al. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 155, n. 2, p. 173-181, 2009.

WORLD HEALTHY ORGANIZATION. **Diabetes 2013: Fact Sheet, 312**. Disponível em: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html. Acesso em: 8 jan 2014.

WORLD HEALTHY ORGANIZATION. **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. 2014a. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf. Acesso em: 3 mar 2015.

WORLD HEALTHY ORGANIZATION. **Global health estimates: Deaths by cause, age, sex and country, 2000-2012**. 2014b. Disponível: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalCOD_method_2000_2012.pdf. Acesso em: 3 mar 2015.

XIU, F. et al. Stress hyperglycemia, insulin treatment, and innate immune cells. **International Journal of Endocrinology**. Cairo, v. 2014, 486403, 2014.

XU, S. X.; MCCORMICK, J. K. Staphylococcal superantigens in colonization and disease. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 2, 52, 2012.

YANO, H. et al. Insulin treatment directly restores neutrophil phagocytosis and bactericidal activity in diabetic mice and thereby improves surgical site *Staphylococcus aureus* infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 80, n. 12, p. 4409-4416, 2012.

YUNG, S.; CHAN, T. M. Pathophysiological changes to the peritoneal membrane during pd-related peritonitis: The role of mesothelial cells. **Mediators of Inflammation**, Sylvania, v. 2012, 484167, 2012.

ZANGER, P. et al. Severity of *Staphylococcus aureus* infection of the skin is associated with inducibility of human beta-defensin 3 but not human beta-defensin 2. **Infection and Immunity**, Washington, v. 78, n. 7, p. 3112-3117, 2010.

ZANONI, F. L et al. Mesenteric microcirculatory dysfunctions and translocation of indigenous bacteria in a rat model of strangulated small bowel obstruction. **Clinics**, São Paulo, v. 64, n. 9, p. 911-919, 2009.

ZARBOCK, A.; LEY, K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. **The American Journal of Pathology**, New York, v. 172, n. 1, p. 1-7, 2008.

ZHANG, H. et al. Geldanamycin derivative ameliorates high fat diet-induced renal failure in Diabetes. **PLoS ONE** , San Francisco, v. 7, n. 3, e. 32746, 2012.

ZIMMERMAN, S. W. et al. *Staphylococcus aureus* peritoneal catheter-related infections: A cause of catheter loss and peritonitis. **Peritoneal Dialysis International**, v. 8, p. 191-4, 1988.

APÊNDICE

Tabela A1: Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referente à Figura 3 da Seção Resultados: Determinação da glicemia (mg/dL)

Determinação da Glicemia														
	Controle (C)							Diabético (D)						
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	C_{N315}	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$	D_{N315}	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
Animal 1	101	109	86	97	105	99	134	600	467	600	589	600	600	546
Animal 2	113	109	129	102	128	81	133	543	498	600	469	600	600	589
Animal 3	104	106	114	110	115	94	154	496	432	600	533	595	600	524
Animal 4	112	114	108	97	110	117	132	600	600	600	524	464	600	538
Animal 5	104	105	113	118	128	117	113	572	600	600	600	600	502	600
Animal 6	100	102	113	120	114	90	116	600	600	408	562	534	559	572
Animal 7	120	98	105	126	123	99	112	600	600	570	587	600	597	568
média	111							564						
desvpad	13							51						
emp	2							7						

Tabela A2: Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referente à Figura 4 da Seção Resultados: Determinação da variação da massa corpórea (g)

Determinação da Glicemia														
	Controle (C)							Diabético (D)						
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	C_{N315}	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$	D_{N315}	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
Animal 1	47,0	42,0	57,0	50,0	56,0	40,0	49,0	-9,0	9,2	-3,0	7,8	-32,0	-21,0	-0,2
Animal 2	53,0	36,0	55,0	61,2	53,0	40,0	53,6	7,0	-10,0	-8,0	29,5	8,9	-13,0	-27,6
Animal 3	52,0	48,0	52,0	40,7	50,0	42,0	51,1	10,0	6,0	-1,0	14,8	-5,3	-21,5	6,6
Animal 4	45,0	38,0	36,0	106,9	34,0	39,0	41,5	6,0	-21,0	-34,0	10,4	-35,0	-14,0	6,3
Animal 5	41,0	34,0	43,0	34,9	70,0	27,0	54,2	-12,0	-8,0	8,0	16,0	-29,0	-15,0	25,3
Animal 6	39,0	50,0	39,0	46,8	42,0	35,0	48,4	-11,4	-32,0	-36,0	5,0	-8,0	-38,0	25,7
Animal 7	43,1	38,0	89,0	44,8	56,8	39,0	46,1	6,0	2,7	31,0	13,8	63,0	-43,8	-11,5
média	47,6							-3,9						
desvpad	13,5							3,0						
emp	1,9							21,1						

Tabela A3: Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referente à Tabela 2 da Seção Resultados: leucócitos sanguíneos de ratos com infecção peritoneal pela cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles (células X $10^3/mm^3$)

Contagem Absoluta Total de Leucócitos Sanguíneos								
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$
Animal 1	3,2	5,4	4,8	8,9	2,7	7,7	2,5	6,9
Animal 2	3,1	6,0	3,3	6,5	3,4	1,1	1,4	2,7
Animal 3	3,0	4,2	4,5	3,2	3,8	4,1	3,3	7,2
Animal 4	3,2	3,9	2,6	2,9	4,3	3,7	1,4	4,8
Animal 5	2,3	5,4	2,8	6,5	1,8	4,1	4,2	4,4
Animal 6	2,2	5,3	4,4	6,2	4,6	3,6	4,6	3,8
Animal 7	2,2	4,1	3,7	6,9	4,2	4,4	3,1	5,0
média	2,7	4,9	3,7	5,9	3,5	4,1	2,9	5,0
desvpad	0,5	0,8	0,9	2,1	1,0	1,9	1,3	1,6
epm	0,2	0,3	0,3	0,6	0,4	0,4	0,5	0,5
Contagem Absoluta de Neutrófilos								
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$
Animal 1	0,6	1,2	0,6	1,8	0,5	1,4	0,2	1,0
Animal 2	0,7	1,0	0,6	1,2	0,5	0,1	0,1	1,4
Animal 3	0,4	1,0	1,0	0,5	1,7	1,1	0,5	3,3
Animal 4	0,5	1,5	0,3	0,6	0,4	0,9	0,2	0,7
Animal 5	0,6	1,0	0,4	2,3	0,2	1,6	0,7	1,9
Animal 6	0,4	1,1	1,1	0,6	0,7	1,1	1,7	0,6
Animal 7	0,5	1,4	0,7	1,2	0,8	1,0	0,6	1,6
média	0,5	1,2	0,7	1,2	0,7	1,0	0,6	1,5
desvpad	0,1	0,2	0,3	0,7	0,5	0,5	0,5	0,9
epm	0,0	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
Contagem Absoluta de Linfócitos								
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$
Animal 1	2,5	4,1	4,2	7,1	2,4	6,2	2,3	5,8
Animal 2	2,4	5,0	2,7	5,3	2,7	1,0	1,2	1,2
Animal 3	2,3	1,8	3,3	2,7	2,1	2,8	2,8	3,2
Animal 4	2,9	3,0	2,3	2,3	3,9	2,8	1,2	4,0
Animal 5	2,1	4,3	2,4	4,1	1,5	1,9	3,5	2,3
Animal 6	1,5	4,1	3,3	5,6	3,5	2,4	2,6	1,7
Animal 7	1,5	1,8	3,1	5,7	3,0	3,3	2,4	3,5
média	2,2	3,4	3,0	4,7	2,7	2,9	2,3	3,1
desvpad	0,5	1,3	0,7	1,7	0,8	1,6	0,8	1,6
epm	0,2	0,5	0,2	0,5	0,3	0,3	0,3	0,4
Contagem Absoluta de Monócitos								
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$
Animal 1	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
Animal 2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1
Animal 3	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
Animal 4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,1
Animal 5	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1
Animal 6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0
Animal 7	0,1	0,2	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0
média	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1
desvpad	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
epm	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1

Tabela A4. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 5 da seção Resultados: Contagem global absoluta de leucócitos no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles (Células X10^6/mm^3)

Contagem global absoluta de leucócitos no lavado peritoneal								
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$
animal 1	13,7	18,9	19,9	28,2	17	46	17,9	12,7
animal 2	12,8	17,9	19,4	34,2	14,9	48	23,4	5,5
animal 3	15,8	20,9	23,7	17,7	13,9	41,1	17,6	8,7
animal 4	12,4	19,4	22,8	10,3	19,1	71,4	43,6	8,2
animal 5	13,5	15,2	19,2	15,1	10,9	65	10,8	14,7
animal 6	16,3	22,8	20,4	9,5	15,3	56,8	29,6	10,4
animal 7	14,7	15,7	20,3	10,9	13,8	50,2	23,9	9,8
média	14,2	18,7	20,8	18,0	15,0	54,1	23,8	10,0
desvpad	1,5	2,7	1,7	9,6	2,6	10,9	10,6	3,0
epm	0,6	1,0	0,7	3,6	1,0	4,1	4,0	1,1

Tabela A5. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 6 da seção Resultados: Contagem global de relativa de leucócitos no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal pela cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles (Células X10^6/mm^3). A. Contagem de Mononucleares. B. Contagem de Polimorfonucleares

	A. Contagem de Mononucleares							
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$
animal 1	10,3	10,8	10,3	15,8	10,0	26,7	7,7	10,4
animal 2	9,6	9,5	9,9	19,5	8,8	20,2	9,8	4,3
animal 3	11,7	11,1	13,0	9,4	8,6	25,1	5,1	6,6
animal 4	9,8	11,1	12,5	6,5	11,1	37,8	21,4	6,0
animal 5	9,0	9,1	11,1	7,6	6,3	27,3	4,3	10,1
animal 6	11,2	10,0	11,8	6,4	8,1	41,5	10,4	7,9
animal 7	9,8	8,5	11,6	7,5	7,5	29,6	9,3	7,2
média	10,2	10,0	11,5	10,4	8,6	29,7	9,7	7,5
desvpad	0,9	1,0	1,1	5,2	1,6	7,4	5,7	2,2
epm	0,4	0,4	0,4	2,0	0,6	2,8	2,1	0,8
	A. Contagem de Polimorfonucleares							
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$
animal 1	3,4	8,1	9,6	12,4	7,0	19,3	10,2	2,3
animal 2	3,2	8,4	9,5	14,7	6,1	27,8	13,6	1,2
animal 3	4,1	9,8	10,7	8,3	5,3	16,0	12,5	2,1
animal 4	2,6	8,3	10,3	3,8	8,0	33,6	22,2	2,2
animal 5	4,5	6,1	8,1	7,6	4,6	37,7	6,5	4,6
animal 6	5,1	12,8	8,6	3,1	7,2	15,3	19,2	2,5
animal 7	4,9	7,2	8,7	3,4	6,3	20,6	14,6	2,6
média	4,0	8,7	9,4	7,6	6,4	24,3	14,1	2,5
desvpad	0,9	2,1	0,9	4,6	1,2	8,8	5,3	1,0
epm	0,4	0,8	0,4	1,7	0,4	3,3	2,0	0,4

Tabela A6. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Tabela 3 da seção Resultados: Glicemia dos ratos controles e diabéticos com infecção peritoneal pela cepa ATCC 25923 de S. aureus antes e após o tratamento com insulina (mg/dL)

Glicemia dos ratos controles e diabéticos com infecção peritoneal pela cepa ATCC 25923 de *S. aureus* antes e após o tratamento com insulina								
	Glicemia antes de insulina				**Glicemia após de insulina**			
	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$
animal 1	86	97	600	589	100	111	600	453
animal 2	129	102	600	469	62	122	600	81
animal 3	114	110	600	533	59	57	600	190
animal 4	108	97	600	524	62	59	506	131
animal 5	113	118	600	600	79	109	439	422
animal 6	113	120	408	562	64	95	133	503
animal 7	105	126	570	587	67	111	483	405
média	110	110	568	552	70	95	480	312
desvpad	13	12	72	47	15	26	166	172
epm	5	4	27	18	6	10	63	65

Tabela A7. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 7 da seção Resultados: Determinação dos níveis séricos de insulina de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

Determinação dos níveis séricos de insulina								
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$
animal 1	2156,7	2765,1	3036,8	3511,0	721,5	526,0	1057,9	2858,7
animal 2	2706,0	2681,8	3054,4	3541,4	626,1	361,3	1522,5	2765,4
animal 3	2286,9	2128,1	3032,7	3966,4	792,4	334,6	1421,3	3329,0
animal 4	2114,2	2323,2	3045,8	3845,2	700,2	417,6	1182,3	2963,6
animal 5	2257,5	2221,5	3039,6	3761,3	723,9	409,1	1300,9	2221,5
média	2304,3	2423,9	3041,9	3725,1	712,8	409,7	1297,0	2827,6
desvpad	235,5	283,5	8,5	195,9	59,6	73,4	184,8	400,7
epm	105,3	126,8	3,8	87,6	26,7	32,8	82,7	179,2

Tabela A8. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Tabela 4 da seção Resultados: Determinação dos níveis séricos de corticosterona de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

Determinação dos níveis séricos de corticosterona								
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$
animal 1	215,7	235,5	203,7	231,1	232,1	215,6	205,8	218,9
animal 2	270,6	238,2	215,4	245,1	222,6	213,1	252,3	226,5
animal 3	228,7	212,8	219,3	236,6	239,2	213,5	242,1	222,9
animal 4	213,4	232,3	204,6	244,5	219,0	214,8	218,2	216,4
animal 5	226,7	222,1	214,0	246,1	239,4	214,9	230,1	212,1
média	231,0	228,2	211,4	240,7	230,5	214,4	229,7	219,4
desvpad	23,1	10,5	6,9	6,6	9,4	1,0	18,5	5,6
epm	10,3	4,7	3,1	2,9	4,2	0,5	8,3	2,5

Tabela A9. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 8 da seção Resultados: CINC-1 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

CINC-1 em lavado peritoneal								
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$
animal 1	95,0	4023,0	1759,0	199,8	374,0	5135,5	4123,0	235,8
animal 2	102,0	3892,0	2371,0	197,6	290,0	4893,0	3894,0	183,2
animal 3	127,0	4129,0	1994,0	158,4	294,0	3998,0	3986,5	172,5
animal 4	152,0	3772,5	1892,0	182,2	282,5	4992,0	3999,0	226,4
animal 5	152,2	3548,5	2102,8	170,5	324,0	5012,0	4012,0	176,3
animal 6	183,2	3873,0	2023,0	181,3	160,3	4810,0	4010,0	179,3
animal 7	149,5	3873,0	2024,0	136,8	211,7	3999,0	3990,0	176,3
média	137,3	3873,0	2023,7	175,2	276,6	4691,4	4002,1	192,8
desvpad	31,2	184,3	189,4	22,3	70,7	484,0	66,9	26,5
epm	11,8	69,7	71,6	8,4	26,7	182,9	25,3	10,0

Tabela A10. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 9 da seção Resultados: CINC-2 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

CINC-2 em lavado peritoneal								
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$
animal 1	40,0	57,0	11,0	139,4	283,0	466,0	273,0	164,8
animal 2	34,0	23,0	45,0	177,6	210,0	403,0	426,0	156,3
animal 3	28,0	28,0	17,0	160,6	312,0	224,0	324,0	147,9
animal 4	34,0	80,0	28,0	169,1	230,0	216,0	460,0	118,3
animal 5	17,0	85,0	23,0	198,9	239,0	340,0	392,0	342,8
animal 6	29,9	60,9	30,2	177,6	269,0	370,1	378,9	160,6
animal 7	30,7	53,1	20,8	169,1	240,1	302,0	371,0	173,3
média	30,5	55,3	25,0	170,3	254,7	331,6	375,0	180,6
desvpad	7,1	23,5	10,9	18,1	35,0	91,8	62,1	73,7
epm	2,7	8,9	4,1	6,9	13,2	34,7	23,5	27,8

Tabela A11. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 10 da seção Resultados: CINC-3 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

CINC-3 em lavado peritoneal								
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$
animal 1	228,0	208,3	220,0	203,7	215,5	194,6	273,0	210,7
animal 2	214,3	252,1	230,0	276,9	202,5	324,3	426,0	196,8
animal 3	257,7	292,5	520,0	262,0	264,9	270,8	324,0	276,9
animal 4	281,5	208,3	460,0	204,8	200,2	218,0	460,0	262,0
animal 5	287,7	284,6	450,0	196,8	259,1	290,9	392,0	262,0
animal 6	279,0	199,1	379,0	206,0	246,0	198,0	375,0	185,9
animal 7	249,0	272,3	478,0	287,7	209,0	279,9	379,0	203,7
média	256,7	245,3	391,0	234,0	228,2	253,8	375,6	228,3
desvpad	28,2	39,6	120,9	39,7	27,7	50,4	62,1	37,3
epm	10,6	15,0	45,7	15,0	10,5	19,0	23,5	14,1

Tabela A12. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 11 da seção Resultados: IL-1β no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

IL-1β em lavado peritoneal								
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$
animal 1	146,0	171,0	146,0	245,0	53,0	619,0	441,0	690,0
animal 2	112,0	249,0	103,0	190,0	39,0	405,0	357,0	716,0
animal 3	120,0	171,0	275,0	214,0	53,0	493,0	765,0	789,0
animal 4	103,0	223,0	146,0	178,0	32,0	683,0	465,0	814,0
animal 5	137,0	283,0	249,0	239,0	29,0	467,0	426,0	790,0
animal 6	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
animal 7	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
média	123,6	219,4	183,8	213,2	41,2	533,4	490,8	759,8
desvpad	17,7	49,0	74,1	29,4	11,4	114,3	158,5	53,6
epm	7,9	21,9	33,1	13,1	5,1	51,1	70,9	24,0

NR = não realizado

Tabela A13. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 12 da seção Resultados: IL-6 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

IL-6 em lavado peritoneal								
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$
animal 1	85,2	336,6	316,7	1167,0	76,5	310,3	313,5	2313,0
animal 2	89,0	71,7	71,0	1171,0	84,5	299,2	315,1	2315,0
animal 3	75,1	71,7	70,3	1170,0	66,4	286,8	296,1	1960,0
animal 4	71,7	311,9	324,9	1224,9	87,5	303,9	289,9	1898,0
animal 5	75,8	299,2	311,9	1119,0	64,4	291,4	69,7	2696,0
animal 6	79,4	291,4	302,3	1029,0	77,9	323,3	291,4	1913,0
animal 7	77,9	296,1	296,1	965,0	73,9	286,8	285,3	2852,0
média	79,2	239,8	241,9	1120,8	75,9	300,2	265,9	2278,1
desvpad	6,0	115,8	117,3	91,8	8,6	13,5	87,3	384,2
epm	2,3	43,8	44,4	34,7	3,2	5,1	33,0	145,2

Tabela A14. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 13 da seção Resultados: TNF-α no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

TNF-α em lavado peritoneal								
	C_S	**C_{ATCC}**	**$C_{ATCC+i1}$**	**$C_{ATCC+i2}$**	**D_S**	**D_{ATCC}**	**$D_{ATCC+i1}$**	**$D_{ATCC+i2}$**
animal 1	115,0	119,0	74,0	368,5	82,0	54,0	91,0	176,0
animal 2	131,0	107,0	95,0	357,0	95,0	78,0	103,0	198,0
animal 3	135,0	115,0	66,0	385,0	66,0	95,0	70,0	198,0
animal 4	107,0	107,0	87,0	339,0	91,0	54,0	103,0	178,0
animal 5	74,0	99,0	99,0	345,0	87,0	54,0	103,0	183,0
animal 6	119,0	109,9	87,2	363,9	86,7	76,9	110,2	201,0
animal 7	111,2	107,2	83,9	359,1	89,1	62,9	94,8	179,0
média	113,2	109,2	84,6	359,6	85,3	67,8	96,4	187,6
desvpad	20,0	6,4	11,5	15,2	9,4	15,9	13,2	10,9
epm	7,6	2,4	4,3	5,7	3,5	6,0	5,0	4,1

Tabela A15. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 14 da seção Resultados: IFN-γ no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

IFN-γ em lavado peritoneal								
	C_S	**C_{ATCC}**	**$C_{ATCC+i1}$**	**$C_{ATCC+i2}$**	**D_S**	**D_{ATCC}**	**$D_{ATCC+i1}$**	**$D_{ATCC+i2}$**
animal 1	40,2	113,3	141,1	371,2	62,6	168,0	133,9	418,6
animal 2	44,2	114,0	143,6	377,8	60,8	181,1	121,6	380,0
animal 3	38,0	112,7	149,5	393,4	61,9	173,0	118,8	371,2
animal 4	41,9	120,7	148,6	391,1	64,0	165,1	121,6	380,0
animal 5	38,7	120,0	148,6	391,1	56,3	171,0	117,4	366,9
animal 6	43,9	108,1	160,8	423,2	64,8	189,4	123,0	384,4
animal 7	40,9	114,2	147,9	394,2	62,1	177,2	120,9	389,0
média	41,1	114,7	148,6	391,7	61,8	175,0	122,5	384,3
desvpad	2,4	4,4	6,2	6,2	2,8	8,3	5,4	16,9
epm	0,9	1,7	2,3	16,4	1,0	3,1	2,0	6,4

Tabela A16. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 15 da seção Resultados: IL-12 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

IL-12 em lavado peritoneal								
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$
animal 1	183,4	161,8	205,3	68,6	246,7	161,8	165,4	161,8
animal 2	179,7	179,7	147,8	71,7	209,0	179,7	224,0	151,3
animal 3	177,9	194,3	198,0	77,9	210,3	161,8	154,8	65,6
animal 4	171,7	169,0	68,6	68,6	181,1	151,3	147,8	77,9
animal 5	174,5	159,5	71,7	93,9	199,1	65,6	65,6	81,1
animal 6	189,3	120,3	77,9	68,6	215,5	77,9	81,1	93,9
animal 7	176,0	77,9	68,6	84,2	202,9	84,2	84,2	106,9
média	178,9	151,8	119,7	76,2	209,2	126,0	131,8	105,5
desvpad	5,9	39,8	62,6	9,8	19,9	48,0	57,2	37,3
epm	2,2	15,0	23,7	3,7	7,5	18,1	21,6	14,1

Tabela A17. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 16 da seção Resultados: IL-4 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

IL-4 em lavado peritoneal								
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$
animal 1	20,1	149,8	175,9	157,1	18,4	150,3	412	156,5
animal 2	15,7	145,2	237,1	143,2	17,1	153,4	389,4	152,6
animal 3	15	152,3	199,4	153,9	17,3	150,3	398,7	152,9
animal 4	14,9	150,8	189,2	205,8	25,3	178,6	399,9	154,9
animal 5	13,8	145,2	210,3	147,7	17,2	152,3	401,2	145,7
animal 6	15,9	152,3	202,3	155,5	16	156,5	401	162,9
animal 7	15,1	138,3	202,4	147,7	21,2	148,2	399	150,3
média	15,8	147,7	202,4	158,7	18,9	155,7	400,2	153,7
desvpad	2,0	5,1	18,9	21,4	3,3	10,5	6,6	5,3
epm	0,8	1,9	7,2	8,1	1,2	4,0	2,5	2,0

Tabela A18 Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Tabela 5 da seção Resultados: Dosagem de IL-10 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

IL-10 em lavado peritoneal								
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i1}$	$C_{ATCC+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i1}$	$D_{ATCC+i2}$
animal 1	62,1	62,1	95,6	105,6	90,4	211,7	105,6	164,4
animal 2	210,7	144,1	140,8	140,8	164,4	81,6	110,8	99,4
animal 3	225,5	283,1	99	299	218	263,5	119	218
animal 4	331,4	73,1	93,4	93,4	259,6	225,5	93,4	189
animal 5	192,5	240,5	118	218	97,9	48,9	118	70,3
animal 6	204,1	118,1	114,1	144,1	200,4	97	114,1	174,8
animal 7	198	150,4	120,7	179,2	199,9	129,5	103,5	149,7
média	203,5	153,1	111,7	168,6	175,8	151,1	109,2	152,2
desvpad	78,6	82,2	17,0	71,4	62,6	82,2	9,1	51,4
epm	29,7	31,1	6,4	27,0	23,6	31,1	3,4	19,4

Tabela A19. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 20 da seção Resultados: Quantificação de PECAM-1 em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina (μm^2)

PECAM-1 em endotélio vascular de mesentério						
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i2}$
animal 1	0	114	125	0	0	0
animal 1	0	136	86	0	0	0
animal 1	0	132	47	0	0	0
animal 1	0	200	20	0	0	0
animal 1	0	130	6	12	0	0
animal 2	0	127	41	10	0	0
animal 2	0	102	95	0	0	0
animal 2	0	105	89	0	0	0
animal 2	0	226	80	0	0	0
animal 2	0	345	52	0	0	0
animal 3	0	130	162	0	0	0
animal 3	0	125	159	0	0	0
animal 3	0	214	68	0	0	0
animal 3	0	270	24	0	0	0
animal 3	0	195	10	0	0	0
média	0	170	71	2	0	0
desvpad	0	70	50	1	0	0
epm	0	18	13	4	0	0

Tabela A20. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 22 da seção Resultados: Quantificação de ICAM-1 em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina (μm^2)

ICAM-1 em endotélio vascular de mesentério						
	C_S	C_{ATCC}	$C_{ATCC+i2}$	D_S	D_{ATCC}	$D_{ATCC+i2}$
animal 1	0	338	0	0	282	190
animal 1	0	63	0	0	570	159
animal 1	0	339	0	0	297	98
animal 1	0	555	0	0	290	130
animal 1	0	191	0	0	184	168
animal 2	0	844	0	0	184	145
animal 2	0	142	0	0	50	0
animal 2	0	70	0	0	43	381
animal 2	0	57	0	0	60	67
animal 2	0	101	0	0	0	0
animal 3	0	90	0	0	61	0
animal 3	0	238	0	0	0	247
animal 3	0	295	0	0	0	0
animal 3	0	371	0	0	27	21
animal 3	0	15	0	0	0	0
média	0	247	0	0	137	107
desvpad	0	224	0	0	164	112
epm	0	58	0	0	42	29

Tabela A21. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 22 da seção Resultados: Quantificação de P-selectina em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina (μm^2)

P-selectina em endotélio vascular de mesentério						
	C_S	**C_{ATCC}**	**$C_{ATCC+i2}$**	**D_S**	**D_{ATCC}**	**$D_{ATCC+i2}$**
animal 1	0	201	38	0	0	0
animal 1	0	161	52	0	10	0
animal 1	0	233	11	0	84	97
animal 1	0	82	27	0	11	78
animal 1	0	141	32	0	118	0
animal 2	0	235	14	0	0	77
animal 2	0	98	48	0	0	0
animal 2	0	372	31	0	0	86
animal 2	0	78	0	0	0	0
animal 2	0	425	30	0	0	0
animal 3	0	412	0	0	0	0
animal 3	0	124	0	0	0	0
animal 3	0	328	0	0	0	0
animal 3	0	19	0	0	0	0
animal 3	0	336	0	0	0	0
média	0	216	19	0	15	23
desvpad	0	131	19	0	36	39
epm	0	34	5	0	9	10

Tabela A22. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Tabela 6 da seção Resultados: Atividade microbicida de macrófagos de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa ATCC 25923 de *S. aureus* e respectivos controles (%)

Atividade Microbicida				
	C_{ATCC}	**$C_{ATCC+i2}$**	**D_{ATCC}**	**$D_{ATCC+i2}$**
animal 1	50,9	51,8	77,5	76,7
animal 1	36,3	51,0	73,7	83,4
animal 1	49,0	44,0	44,2	60,3
animal 2	36,5	48,9	52,1	52,7
animal 2	38,5	53,8	77,0	77,0
animal 2	43,0	56,0	55,4	71,6
animal 3	52,5	59,5	34,5	36,2
animal 3	71,8	41,3	36,6	37,3
animal 3	45,9	41,4	34,6	34,7
animal 4	48,4	41,7	35,9	46,4
animal 4	53,6	54,0	60,1	56,2
animal 4	44,4	71,9	38,3	38,3
média	47,6	51,3	51,7	55,9
desvpad	9,7	8,9	17,0	17,8
epm	2,8	2,6	4,9	5,1

Tabela A23: Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referente à Tabela 7 da Seção Resultados: leucócitos sanguíneos de ratos com infecção peritoneal pela cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles (células X 10^3/mm^3)

Contagem Absoluta Total de Leucócitos Sanguíneos								
	C_S	C_{N315}	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{N315}	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
Animal 1	3,2	4,6	4,5	3,4	2,7	6,6	2,2	5,8
Animal 2	3,1	3,9	3,8	5,2	3,4	4,5	3,0	4,3
Animal 3	3,0	5,9	3,0	4,9	3,8	5,8	3,5	6,4
Animal 4	3,2	5,4	2,4	4,7	4,3	4,1	2,7	5,5
Animal 5	2,3	3,6	8,5	2,9	1,8	2,4	4,5	3,8
Animal 6	2,2	5,1	5,0	5,3	4,6	4,3	3,5	3,8
Animal 7	2,2	5,2	4,7	4,7	4,2	3,8	3,0	4,6
média	2,7	4,8	4,6	4,4	3,5	4,5	3,2	4,9
desvpad	0,5	0,8	2,0	0,9	1,0	1,4	0,7	1,0
epm	0,2	0,3	0,7	0,3	0,4	0,4	0,2	0,4
Contagem Absoluta de Neutrófilos								
	C_S	C_{N315}	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{N315}	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
Animal 1	0,6	1,1	0,9	0,5	0,5	1,8	0,4	1,1
Animal 2	0,7	0,4	0,7	1,2	0,5	0,4	0,5	1,5
Animal 3	0,4	0,9	0,6	0,7	1,7	0,5	0,6	1,7
Animal 4	0,5	1,0	0,4	0,7	0,4	0,3	0,5	1,0
Animal 5	0,6	0,5	1,5	0,4	0,2	1,1	2,1	0,5
Animal 6	0,4	1,3	1,0	1,2	0,7	1,9	0,9	1,1
Animal 7	0,5	0,5	1,0	1,6	0,8	0,6	0,7	1,0
média	0,5	0,8	0,9	0,9	0,7	0,9	0,8	1,1
desvpad	0,1	0,3	0,4	0,4	0,5	0,7	0,6	0,4
epm	0,0	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
Contagem Absoluta de Linfócitos								
	C_S	C_{N315}	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{N315}	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
Animal 1	2,5	3,1	3,5	2,9	2,4	5,5	1,8	4,6
Animal 2	2,4	3,5	3,1	4,0	2,7	4,1	2,5	2,8
Animal 3	2,3	4,9	2,3	4,1	2,1	5,3	2,9	4,6
Animal 4	2,9	4,4	2,0	4,0	3,9	3,8	2,2	4,5
Animal 5	2,1	3,1	7,0	2,5	1,5	1,3	2,2	3,3
Animal 6	1,5	3,7	4,1	4,1	3,5	1,2	2,6	2,7
Animal 7	1,5	6,0	3,9	3,3	3,0	3,1	2,7	3,4
média	2,2	4,1	3,7	3,6	2,7	3,5	2,4	3,7
desvpad	0,5	1,1	1,6	0,7	0,8	1,7	0,4	0,9
epm	0,2	0,4	0,6	0,2	0,3	0,6	0,1	0,3
Contagem Absoluta de Monócitos								
	C_S	C_{N315}	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{N315}	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
Animal 1	0,3	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,1
Animal 2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Animal 3	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1
Animal 4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0
Animal 5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0
Animal 6	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
Animal 7	0,1	0,3	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,1
média	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1
desvpad	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
epm	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela A24. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 25 da seção Resultados: Contagem global absoluta de leucócitos no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla^+ de *S. aureus* e respectivos controles (Células $X10^6/mm^3$)

Contagem global absoluta de leucócitos no lavado peritoneal								
	C_S	C_{N315}	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{N315}	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
animal 1	13,7	19,6	24,4	5,6	17	19,8	18,1	23,8
animal 2	12,8	21,2	23,3	1,4	14,9	19,8	20	35,9
animal 3	15,8	23,1	24,1	4,8	13,9	21,5	12,6	29
animal 4	12,4	18,3	19,9	3,3	19,1	16,3	20,4	48
animal 5	13,5	18,2	20,2	2,1	10,9	17,2	23	29,4
animal 6	16,3	27	27,7	6,7	15,3	32,4	17,7	35,2
animal 7	14,7	10,4	23,3	4	13,8	21,9	18,9	34,5
média	14,2	19,7	23,3	4,0	15,0	21,3	18,7	33,7
desvpad	1,5	5,1	2,7	1,9	2,6	5,3	3,2	7,6
epm	0,6	1,9	1,0	0,7	1,0	2,0	1,2	2,9

Tabela A25. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 26 da seção Resultados: Contagem global de relativa de leucócitos no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal pela cepa N315 Hla^+ de *S. aureus* e respectivos controles (Células $X10^6/mm^3$). A. Contagem de Mononucleares. B. Contagem de Polimorfonucleares

A. Contagem de Mononucleares								
	C_S	C_{N315}	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{N315}	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
animal 1	10,3	9,6	12,9	4,4	10,0	10,5	10,5	16,7
animal 2	9,6	10,2	14,2	1,0	8,8	10,9	11,8	28,7
animal 3	11,7	11,1	15,4	3,6	8,6	9,2	7,8	22,9
animal 4	9,8	10,2	12,3	2,3	11,1	8,2	9,8	38,9
animal 5	9,0	10,4	12,5	1,5	6,3	8,9	13,8	24,1
animal 6	11,2	13,5	16,6	4,3	8,1	14,9	9,4	29,2
animal 7	9,8	5,1	13,7	2,9	7,5	16,2	10,6	29,0
média	10,2	10,0	13,9	2,9	8,6	11,3	10,5	27,1
desvpad	0,9	2,5	1,6	1,3	1,6	3,1	1,9	6,9
epm	0,4	0,9	0,6	0,5	0,6	1,2	0,7	2,6
A. Contagem de Polimorfonucleares								
	C_S	C_{N315}	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{N315}	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
animal 1	3,4	10	11,5	1,2	7	9,3	7,6	7,1
animal 2	3,2	11	9,1	0,4	6,1	8,9	8,2	7,2
animal 3	4,1	12	8,7	1,2	5,3	12,3	4,8	6,1
animal 4	2,6	8,1	7,6	1	8	8,2	10,6	9,1
animal 5	4,5	7,8	7,7	0,6	4,6	8,3	9,2	5,3
animal 6	5,1	13,5	11,1	2,4	7,2	17,5	8,3	6
animal 7	4,9	5,3	9,6	1,1	6,3	5,7	8,3	5,5
média	4,0	9,7	9,3	1,1	6,4	10,0	8,1	6,6
desvpad	0,9	2,8	1,5	0,6	1,2	3,8	1,8	1,3
epm	0,4	1,1	0,6	0,2	0,4	1,4	0,7	0,5

Tabela A26. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Tabela 8 da seção Resultados: Glicemia dos ratos controles e diabéticos com infecção peritoneal pela cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* antes e após o tratamento com insulina (mg/dL)

Glicemia dos ratos controles e diabéticos com infecção peritoneal pela cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* antes e após o tratamento com insulina								
	Glicemia antes de insulina				**Glicemia após de insulina**			
	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
animal 1	99	134	600	546	52	121	567	437
animal 2	81	133	600	589	69	112	353	462
animal 3	94	154	600	524	101	112	417	371
animal 4	117	132	600	538	65	110	600	95
animal 5	117	113	502	600	67	128	216	366
animal 6	90	116	559	572	50	116	500	327
animal 7	99	112	597	568	60	106	500	378
média	100	128	580	562	66	115	450	348
desvpad	13	15	37	28	17	7	133	120
epm	5	6	14	10	6	3	50	46

Tabela A27. Valores individuais, média, desvio padrão(desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 27 da seção Resultados: Determinação dos níveis séricos de insulina de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

Determinação dos níveis séricos de insulina								
	C_S	C_{N315}	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{N315}	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
animal 1	2156,7	2909,6	3025,3	3968,7	721,5	619,1	2323,2	3619,1
animal 2	2706,0	2429,8	3055,3	3858,7	626,1	255,8	2262,9	3743,4
animal 3	2286,9	2313,0	3004,9	3839,2	792,4	681,8	2704,9	2424,2
animal 4	2114,2	2649,1	3057,5	3701,7	700,2	319,6	2257,5	3228,0
animal 5	2257,5	2559,5	3036,1	3839,2	723,9	382,7	2299,1	3528,4
média	2304,3	2572,2	3035,8	3841,5	712,8	451,8	2369,5	3308,6
desvpad	235,5	227,7	21,9	94,9	59,6	188,1	189,4	529,7
epm	105,3	101,8	9,8	42,4	26,7	84,1	84,7	236,9

Tabela A28. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Tabela 9 da seção Resultados: Determinação dos níveis séricos de corticosterona de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla^+ de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

Determinação dos níveis séricos de corticosterona								
	C_S	C_{N315}	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{N315}	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
animal 1	215,7	211,0	302,5	216,9	232,1	261,9	232,3	261,9
animal 2	270,6	243,0	305,5	228,9	222,6	225,6	226,3	174,3
animal 3	228,7	231,3	300,5	223,9	239,2	168,2	220,5	242,4
animal 4	213,4	224,9	305,7	227,2	219,0	214,0	225,7	222,8
animal 5	226,7	226,0	303,6	223,9	239,4	238,3	229,9	252,8
média	231,0	227,2	303,6	224,2	230,5	221,6	226,9	230,8
desvpad	23,1	11,6	2,2	4,6	9,4	34,7	4,5	34,8
epm	10,3	5,2	1,0	2,1	4,2	15,5	2,0	15,6

Tabela A29. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 28 da seção Resultados: CINC-1 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla^+ de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

CINC-1 em lavado peritoneal								
	C_S	C_{N315}	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{N315}	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
animal 1	95,0	878,0	1219,0	259,1	374,0	1200,0	460,0	264,2
animal 2	102,0	923,0	990,0	190,3	290,0	2930,0	420,0	221,8
animal 3	127,0	739,0	1025,0	191,4	294,0	1050,0	240,0	218,4
animal 4	152,0	692,0	880,0	203,0	282,5	3400,0	390,0	186,3
animal 5	152,2	846,0	1012,0	188,3	324,0	4100,0	500,0	176,3
animal 6	183,2	816,0	1030,9	173,4	160,3	2700,7	440,2	235,8
animal 7	149,5	813,9	1019,7	173,4	211,7	2564,9	390,5	182,2
média	137,3	815,4	1025,2	197,0	276,6	2563,7	405,8	212,1
desvpad	31,2	79,1	100,1	29,3	70,7	1107,8	82,8	32,3
epm	11,8	29,9	37,8	11,1	26,7	418,7	31,3	12,2

Tabela A30. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 29 da seção Resultados: CINC-2 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

CINC-2 em lavado peritoneal								
	C_S	C_{N315}	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{N315}	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
animal 1	40,0	63,0	228,0	194,6	283,0	34,0	642,0	156,3
animal 2	34,0	28,0	358,0	156,3	210,0	22,0	313,0	207,5
animal 3	28,0	17,0	267,0	160,6	312,0	16,0	313,0	169,1
animal 4	34,0	63,0	227,0	152,1	230,0	12,0	460,0	216,0
animal 5	17,0	28,0	278,0	122,5	239,0	22,0	426,0	233,2
animal 6	29,9	42,0	280,1	181,8	269,0	23,0	438,0	302,6
animal 7	30,7	37,1	262,9	156,3	240,1	21,0	429,1	190,4
média	30,5	39,7	271,6	160,6	254,7	21,4	431,6	210,7
desvpad	7,1	17,7	43,9	23,0	35,0	6,8	110,5	48,5
epm	2,7	6,7	16,6	8,7	13,2	2,6	41,8	18,3

Tabela A31. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 30 da seção Resultados: CINC-3 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

CINC-3 em lavado peritoneal								
	C_S	C_{N315}	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{N315}	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
animal 1	228,0	208,3	228,0	208,3	215,5	193,5	642,0	194,6
animal 2	214,3	267,9	267,0	204,8	202,5	273,8	313,0	266,4
animal 3	257,7	262,0	227,0	289,3	264,9	276,9	313,0	264,9
animal 4	281,5	208,3	278,0	281,5	200,2	196,8	460,0	175,5
animal 5	287,7	187,0	358,0	198,0	259,1	272,3	426,0	267,9
animal 6	279,0	194,6	290,0	189,1	246,0	201,4	419,0	172,5
animal 7	249,0	254,9	319,0	260,6	209,0	247,9	439,0	219,2
média	256,7	226,1	281,0	233,1	228,2	237,5	430,3	223,0
desvpad	28,2	34,2	47,2	42,5	27,7	38,9	110,6	43,4
epm	10,6	12,9	17,9	16,1	10,5	14,7	41,8	16,4

Tabela A32. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 31 da seção Resultados: IL-1β no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

IL-1β em lavado peritoneal								
	C_S	C_{N315}	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{N315}	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
animal 1	146,0	171,0	146,0	245,0	53,0	61,0	189,0	279,0
animal 2	112,0	249,0	103,0	190,0	39,0	28,0	190,0	250,0
animal 3	120,0	171,0	275,0	214,0	53,0	31,0	153,0	245,0
animal 4	103,0	223,0	146,0	178,0	32,0	49,0	180,0	199,0
animal 5	137,0	283,0	249,0	239,0	29,0	78,0	190,0	234,0
animal 6	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
animal 7	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
média	123,6	219,4	183,8	213,2	41,2	49,4	180,4	241,4
desvpad	17,7	49,0	74,1	29,4	11,4	20,9	15,9	29,0
epm	7,9	21,9	33,1	13,1	5,1	9,4	7,1	12,9

NR= não realizado

Tabela A33. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 32 da seção Resultados: IL-6 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

IL-6 em lavado peritoneal								
	C_S	C_{N315}	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{N315}	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
animal 1	85,2	86,0	313,5	1276,5	76,5	72,4	307,1	1307,0
animal 2	89,0	68,3	292,9	1284,5	84,5	69,7	74,4	1174,0
animal 3	75,1	69,0	285,3	1666,4	66,4	69,7	73,7	1173,0
animal 4	71,7	81,5	282,2	1187,5	87,5	76,5	260,0	1260,0
animal 5	75,8	77,9	294,5	1564,4	64,4	65,1	67,7	1670,0
animal 6	79,4	83,0	286,8	1379,0	77,9	80,8	175,9	1780,0
animal 7	77,9	75,8	285,3	1389,0	73,9	69,7	60,7	1060,0
média	79,2	77,4	291,5	1392,5	75,9	72,0	145,6	1346,3
desvpad	6,0	6,8	10,6	169,3	8,6	5,2	103,0	271,9
epm	2,3	2,6	4,0	64,0	3,2	2,0	38,9	102,8

Tabela A34. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 33 da seção Resultados: TNF-α no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

TNF-α em lavado peritoneal								
	C_S	**C_{N315}**	**$C_{N315+i1}$**	**$C_{N315+i2}$**	**D_S**	**D_{N315}**	**$D_{N315+i1}$**	**$D_{N315+i2}$**
animal 1	115,0	95,0	123,0	102,0	82,0	78,0	82,0	93,0
animal 2	131,0	127,0	95,0	168,0	95,0	95,0	78,0	105,0
animal 3	135,0	107,0	135,0	189,0	66,0	74,0	78,0	108,0
animal 4	107,0	123,0	99,0	100,0	91,0	70,0	78,0	94,0
animal 5	74,0	95,0	107,0	198,0	87,0	95,0	82,0	101,0
animal 6	119,0	121,7	112,4	170,7	86,7	89,4	82,5	110,1
animal 7	111,2	103,8	109,8	154,2	89,1	79,2	77,9	106,2
média	113,2	110,4	111,6	154,6	85,3	82,9	79,8	102,5
desvpad	20,0	13,5	13,8	39,3	9,4	10,2	2,2	6,7
epm	7,6	5,1	5,2	14,8	3,5	3,8	0,8	2,5

Tabela A35. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 34 da seção Resultados: IFN-γ no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

IFN-γ em lavado peritoneal								
	C_S	**C_{N315}**	**$C_{N315+i1}$**	**$C_{N315+i2}$**	**D_S**	**D_{N315}**	**$D_{N315+i1}$**	**$D_{N315+i2}$**
animal 1	40,2	100	182,8	388,9	62,6	126,1	170,1	395,6
animal 2	44,2	97,7	197,8	420,9	60,8	134,3	167,2	388,9
animal 3	38	97,1	174,5	371,2	61,9	120,4	155,9	362,6
animal 4	41,9	108,8	187	397,9	64	125,4	159,6	371,2
animal 5	38,7	109,4	176,5	375,6	56,3	137,4	247,9	576,6
animal 6	43,9	91,5	184,9	393,4	64,8	119,6	171,1	397,9
animal 7	40,9	99,9	179,9	394,7	62,1	119	160,9	409,1
média	41,1	100,6	183,3	391,8	61,8	126,0	176,1	414,6
epm	2,4	6,4	7,8	16,3	2,8	7,3	32,2	73,2
desvpad	0,9	2,4	2,9	6,2	1,0	2,8	12,2	27,7

Tabela A36. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 35 da seção Resultados: IL-12 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

IL-12 em lavado peritoneal								
	C_S	C_{N315}	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{N315}	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
animal 1	183,4	179,7	169,0	161,8	246,7	144,3	198,0	147,8
animal 2	179,7	161,8	165,4	179,7	209,0	137,4	68,6	147,8
animal 3	177,9	187,0	183,4	161,8	210,3	137,4	71,7	187,0
animal 4	171,7	77,9	187,0	151,3	181,1	120,3	77,9	81,1
animal 5	174,5	68,6	93,9	165,4	199,1	87,4	81,1	93,9
animal 6	189,3	84,2	68,6	183,4	215,5	81,1	93,9	106,9
animal 7	176,0	84,2	84,2	187,0	202,9	97,1	106,9	77,9
média	178,9	120,5	135,9	170,1	209,2	115,0	99,7	120,3
desvpad	5,9	52,9	51,3	13,3	19,9	26,2	45,3	41,2
epm	2,2	20,0	19,4	5,0	7,5	9,9	17,1	15,6

Tabela A37. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 36 da seção Resultados: IL-4 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla$^+$ de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

IL-4 em lavado peritoneal								
	C_S	C_{N315}	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{N315}	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
animal 1	20,1	164,0	121,9	158,1	18,4	145,7	460,0	153,9
animal 2	15,7	147,2	99,0	149,3	17,1	151,3	420,0	153,4
animal 3	15,0	155,5	12,0	150,8	17,3	230,9	240,0	154,4
animal 4	14,9	154,4	88,0	141,7	25,3	163,5	390,0	152,3
animal 5	13,8	141,2	101,2	150,8	17,2	149,8	500,0	151,8
animal 6	15,9	171,8	85,0	166,2	16,0	147,2	410,0	150,3
animal 7	15,1	154,4	84,0	150,3	21,2	150,8	390,0	150,8
média	15,8	155,5	84,4	152,5	18,9	162,7	401,4	152,4
epm	2,0	10,1	34,5	7,7	3,3	30,6	81,5	1,6
desvpad	0,8	3,8	13,1	2,9	1,2	11,6	30,8	0,6

Tabela A38. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Tabela 10 da seção Resultados: Dosagem de IL-10 no lavado peritoneal de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla^+ de *S. aureus* e respectivos controles (pg/mL)

IL-10 em lavado peritoneal								
	C_S	C_{N315}	$C_{N315+i1}$	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{N315}	$D_{N315+i1}$	$D_{N315+i2}$
animal 1	62,1	157,6	114,1	144,1	90,4	75,9	117,5	137,5
animal 2	210,7	127,7	114,4	164,4	164,4	73,1	114,2	154,2
animal 3	225,5	96,4	148,1	248,1	218	87,5	127,7	127,7
animal 4	331,4	75,9	102,5	102,5	259,6	124,4	110,8	140,8
animal 5	192,5	111,8	118,1	118,1	97,9	105,6	163,5	141,5
animal 6	204,1	189	110,8	140,8	200,4	121,2	99,4	263,5
animal 7	198	109,6	119,6	157,9	199,9	92,7	119,3	99,4
média	203,5	124,0	118,2	153,7	175,8	97,2	121,8	152,1
desvpad	78,6	38,3	14,3	46,9	62,6	20,6	20,3	52,0
epm	29,7	14,5	5,4	17,7	23,6	7,8	7,7	19,7

Tabela A39. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Figura 38 da seção Resultados: Quantificação de PECAM-1 em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla^+ de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina (μm^2)

PECAM-1 em endotélio vascular de mesentério						
	C_S	C_{N315}	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{N315}	$D_{N315+i2}$
animal 1	0	103	105	0	121	95
animal 1	0	148	100	0	65	129
animal 1	0	0	0	0	199	94
animal 1	0	27	99	0	43	165
animal 1	0	0	172	12	65	98
animal 2	0	0	48	10	99	27
animal 2	0	0	100	0	115	77
animal 2	0	0	0	0	238	64
animal 2	0	0	0	0	79	23
animal 2	0	0	0	0	150	0
animal 3	0	0	0	0	28	0
animal 3	0	0	0	0	68	0
animal 3	0	0	0	0	34	0
animal 3	0	0	0	0	0	0
animal 3	0	0	0	0	0	0
média	0	19	42	1	87	51
desvpad	0	45	58	4	69	55
epm	0	12	15	1	18	14

Tabela A40. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Tabela 11 da seção Resultados: Quantificação de ICAM-1 e P-selectina em endotélio vascular de mesentério de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla^+ de *S. aureus* e respectivos controles, tratados com 4 doses de insulina (μm^2)

ICAM-1 em endotélio vascular de mesentério						
	C_S	C_{N315}	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{N315}	$D_{N315+i2}$
animal 1	0	0	139	0	0	0
animal 1	0	0	181	0	0	0
animal 1	0	0	90	0	0	0
animal 1	0	0	0	0	0	0
animal 1	0	0	0	0	0	0
animal 2	0	0	0	0	0	0
animal 2	0	0	0	0	0	0
animal 2	0	0	0	0	0	0
animal 2	0	0	0	0	0	0
animal 2	0	0	0	0	0	0
animal 3	0	0	0	0	0	0
animal 3	0	0	0	0	0	0
animal 3	0	0	0	0	0	0
animal 3	0	0	0	0	0	0
animal 3	0	0	0	0	0	0
média	0	0	27	0	0	0
desvpad	0	0	59	0	0	0
epm	0	0	15	0	0	0
P-selectina1 em endotélio vascular de mesentério						
	C_S	C_{N315}	$C_{N315+i2}$	D_S	D_{N315}	$D_{N315+i2}$
animal 1	0	0	56	0	0	0
animal 1	0	0	46	0	0	0
animal 1	0	0	72	0	0	0
animal 1	0	14	149	14	0	0
animal 1	0	48	32	48	0	0
animal 2	0	31	74	31	0	0
animal 2	0	0	25	0	0	0
animal 2	0	30	27	30	0	0
animal 2	0	0	28	0	0	0
animal 2	0	0	33	0	0	0
animal 3	0	0	0	0	0	0
animal 3	0	0	0	0	27	0
animal 3	0	0	0	0	38	0
animal 3	0	0	0	0	0	0
animal 3	0	0	0	0	0	0
média	0	8	36	0	4	0
desvpad	0	15	40	0	12	0
epm	0	4	10	0	3	0

Tabela A41. Valores individuais, média, desvio padrão (desvpad) e erro padrão da média (epm) referentes à Tabela 12 da seção Resultados: Atividade microbicida de macrófagos de ratos diabéticos com infecção peritoneal por cepa N315 Hla^{+} de *S. aureus* e respectivos controles (%)

Atividade Microbicida				
	C_{N315}	$C_{N315+i2}$	D_{N315}	$D_{N315+i2}$
animal 1	47,6	48,4	49,9	59,0
animal 1	48,4	36,1	68,4	75,8
animal 1	54,4	37,3	61,7	56,0
animal 2	60,0	19,6	20,5	27,6
animal 2	63,8	53,5	50,0	63,1
animal 2	53,3	29,9	20,8	51,8
animal 3	50,1	69,5	40,5	29,5
animal 3	62,2	63,0	55,8	44,3
animal 3	39,0	62,8	40,2	33,4
animal 4	29,2	57,7	60,6	55,8
animal 4	34,9	47,9	53,7	38,2
animal 4	67,4	51,0	37,5	17,4
média	50,9	48,1	46,6	46,0
desvpad	11,9	14,9	15,3	17,1
epm	3,4	4,3	4,4	4,9

ANEXO

ANEXOS

ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF/84/2012

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **"EFEITO DA INSULINA NA INFLAMAÇÃO PERITONEAL CAUSADA POR Staphylococcus aureus NA IMUNIDADE INATA."** (Protocolo CEUA/FCF/375), de responsabilidade do **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 06 de agosto de 2012.

São Paulo, 04 de setembro de 2012.

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

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br

ANEXO B

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF/108/2012

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **"EFEITO DA INSULINA NA INFLAMAÇÃO PERITONEAL CAUSADA POR Staphylococcus aureus NA IMUNIDADE INATA."** (Protocolo CEUA/FCF/375), de responsabilidade da pesquisadora **Paula Regina Knox de Souza,** sob a responsabilidade do 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 06 de agosto de 2012.

São Paulo, 06 de novembro de 2012.

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

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br

Anexo C

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 argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir 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 argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição 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 argüição.

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

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br