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

A insulina regula as vias de sinalização induzidas por LPS em macrófagos derivados
de medula óssea

Fernando Henrique Galvão Tessaro

Tese para obtenção do título de Doutor
Orientador: Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

São Paulo
2018

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

A insulina regula as vias de sinalização induzidas por LPS em macrófagos derivados
de medula óssea

Fernando Henrique Galvão Tessaro

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Tese para obtenção do título de Doutor
Orientador: Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

São Paulo
2018

Fernando Henrique Galvão Tessaro

A insulina regula as vias de sinalização induzidas por LPS em macrófagos derivados
de medula óssea

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
orientador/presidente

Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni
(1° Examinador)

Prof. Dr. William Tadeu Lara Festuccia
(2° Examinador)

Prof. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho
(3° Examinador)

São Paulo, 18 de outubro de 2018.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

T3384	<p>Tessaro, Fernando Henrique Galvão Tessaro A insulina regula as vias de sinalização induzidas por LPS em macrófagos derivados de medula óssea / Fernando Henrique Galvão Tessaro Tessaro. - São Paulo, 2018. 129 p.</p> <p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Orientador: Martins, Joilson de Oliveira</p> <p>1. diabetes mellitus. 2. aloxana. 3. insulina. 4. macrófagos. 5. PI3K. I. T. II. Martins, Joilson de Oliveira, orientador.</p>
-------	---

“Dias inteiros de calma, noites de ardência, dedos no leme e olhos no horizonte, descobri a alegria de transformar distâncias em tempo. Um tempo em que aprendi a entender as coisas do mar, a conversar com as grandes ondas e não discutir com o mal tempo. A transformar o medo em respeito, o respeito em confiança. Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E, para se chegar onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer”.

Amyr Klink (navegador brasileiro)

*Aos meus pais, Pedro e Marli, por todo o amor
e por jamais hesitarem em me ajudar.*

*Ao Prof. Joilson, por toda ajuda,
companheirismo, confiança e exemplo nestes anos.*

*Sempre serei grato por toda sua contribuição
em minha formação como pesquisador e pessoa.*

AGRADECIMENTO

À Diretoria da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP), à Comissão de Pós-Graduação da FCF-USP, à Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e à Secretaria do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP.

À Thais Soprani Ayala, minha namorada e companheira nesta jornada. Sou muito grato pela sua ajuda e valiosa contribuição para este trabalho.

Ao Eduardo e ao Leonardo, pela amizade, companheirismo e ajuda no dia a dia.

À Fernanda Nunes, por todo ensinamento, carinho e paciência durante o período em que estive na pós-graduação.

Aos colegas do Laboratório de Imunoendocrinologia, por toda ajuda, companheirismo e discussão científica: Sabrina, Felipe, Mariana, Isis, Maria Fernanda e Thaís.

Aos amigos dos Blocos 17 e 13B da FCF, por toda ajuda, conversas e horas de café: Juliano, Clóvis, Rodolfo, Maristela, Ana, Leandro, Fábio, Suelen, Grasielle, José Roberto, Maryana, Maysa, Carmen, Maylla, Luciene, Alexandre, Marilisa, Juliana, Dalila, Araceli, Ed, Aline, Eric e Mariana. Um agradecimento especial à Claudinha que partiu e nos deixou com muita saudade.

Aos técnicos da FCF, Renata, Silene, Mariana, Edson e Stephanie, um obrigado especial por tudo. À Flávia, por ensinar-me a conduzir uma pesquisa com respeito aos animais.

Aos demais colaboradores que fizeram o seu melhor para que eu pudesse desenvolver este trabalho, em especial à Edna, Ana Dantas, Sueli, Rose, Marcia, Cicera e Andressa.

To Per-Olof Berggren and Christopher Barker for having me on the lab. I really appreciate all the efforts to make my dream come true. I could not forget to thank all my friends from P-O's Lab that I miss so much, Artor, Isabelle, Ismael, Elena, Essam, Subu, Katarina, Elisabetta, Saad, Karin, Pim, Concha, Yan, Meike, Anja, Montserrat, Andrea, Galyna, Lisa, Erwin, Martin, Tilo, Yue, Jia, Lisa, Yvonne, Shao-Nian, Irina, Martin, Ingo, Barbara, and Cecilia.

Aos meus amigos brasileiros na Suécia, Anderson e Paula.

Ao apoio financeiro da FAPESP, da CAPES e do CNPq sem o qual este trabalho não poderia ser realizado.

Aos amigos André, Felumpe, Rodrigo, Marlos, Kauã, Ellen e Alex que compartilharam comigo momentos inesquecíveis durante estes anos.

À minha família, por todas as coisas maravilhosas que vivemos nos poucos dias juntos.

À minha família de coração, Lucas, Alessandra, Pedro, Paula, Gustavo, Fábio, Lucão e Benjamin.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Projeto 301617/2016-3 e Bolsa de doutoramento: 168258/2017-0), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Bolsa de doutoramento e doutorado-sanduíche) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Projeto 2017/11540-7; 2014/05214-1; 2010/02272-0).

RESUMO

TESSARO, F. H. G. **A insulina regula as vias de sinalização induzidas por LPS em macrófagos derivados de medula óssea**. 2018. 129f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Pacientes diabéticos apresentam alterações no sistema imunológico que promovem, em parte, maior suscetibilidade de infecções bacterianas. O tratamento com insulina melhora a sobrevida e reduz o número de infecções recidivas no paciente com diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1). Pouco se sabe sobre os efeitos do diabetes e a ação da insulina nos macrófagos. Neste trabalho, investigamos a proteína fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), proteína quinase B (Akt) e as quinases ativadas por mitógenos (MAPK) em macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) e sua participação no estímulo por lipopolissacarídeo (LPS) na presença ou não do tratamento com insulina através da secreção dos mediadores inflamatórios fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-6 e IL-10. Observamos que os BMDM de animais com DM1 apresentam aumento da expressão da subunidade catalítica PI3K p110 α com redução na subunidade reguladora PI3K p55 e maior expressão da fosforilação das proteínas Akt (Serina-473 e Treonina-308), quinase regulada por sinal extracelular (ERK) 1/2 e quinase ativada por estresse/quinase Jun-amino-terminal (SAPK/JNK) MAPK. Observou-se alteração na concentração das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 no sobrenadante da cultura de BMDM dos animais diabéticos após estímulo com LPS, menor taxa de metabolismo mitocondrial, no entanto, sem resultar em morte celular, tampouco na expressão do receptor do tipo Toll 4 na membrana celular. Já o reestímulo destas células com LPS promoveu aumento na concentração de TNF- α sem alteração das demais citocinas. Além disto, o tratamento com insulina, simultaneamente ao estímulo com LPS, dos BMDM oriundos de animais diabéticos aumentou a concentração de TNF- α , IL-6, da fosforilação de p38, ERK 1/2 e SAPK/JNK MAPK, PI3K p55 e da Akt (Serina-473), o que não ocorreu nos BMDM dos animais não diabéticos sob a mesma condição. Este efeito foi abolido pela inibição farmacológica da PI3K e da ERK 1/2, resultando em novo aumento da concentração de TNF- α e IL-6. A análise conjunta destes resultados indica que a insulina, através da modulação das vias PI3K, Akt, ERK 1/2 e SAPK/JNK, amplifica o aumento da concentração de TNF- α e IL-6 sob estímulo com LPS.

Palavras-chave: diabetes *mellitus*, aloxana, insulina, macrófagos, PI3K.

ABSTRACT

TESSARO, F. H. G. **Insulin regulates LPS-induced signaling pathways in macrophages derived from bone marrow**, 2018. 129f. Thesis (PhD) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

Diabetic patients present alterations in the immune system that promote in part a greater susceptibility of bacterial infections. Insulin treatment improves survival and reduces the number of recurrent infections in patients with type 1 diabetes mellitus (DM1). Little is known about the effects of diabetes and the action of insulin on macrophages. In this work we investigated the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) / protein kinase B (Akt) and mitogen-activated kinase (MAPK) proteins in bone marrow-derived macrophages (BMDM) and their participation in lipopolysaccharide (LPS) or treatment with insulin through the secretion of inflammatory mediators tumor necrosis factor (TNF) - α , interleukin (IL) -6 and IL-10. We observed that BMDM of animals with DM1 increased PI3K p110 α catalytic subunit expression with a reduction in the PI3K p55 regulatory subunit and increased expression of the phosphorylation of the Akt (Serine-473 and Threonine-308), extracellular signal regulated kinase (ERK) 1/2 and Jun-amino-terminal stress-kinase / kinase (SAPK / JNK) MAPK. Changes in the concentration of TNF- α , IL-6 and IL-10 cytokines in the supernatant of the BMDM culture of diabetic animals after stimulation with LPS were observed, possibly due to a lower rate of mitochondrial metabolism, however, without resulting in cell death, so little in the expression of the Toll 4 receptor on the cell membrane. The re-stimulation of these cells with LPS promoted an increase in TNF- α concentration without alteration of the other cytokines. In addition, insulin and simultaneously LPS stimulation of BMDM from diabetic animals increased the concentration of TNF- α , IL-6, phosphorylation of p38, ERK 1/2 and SAPK / JNK MAPK, PI3K p55 and Akt (Serine-473), which did not occur in the BMDM of non-diabetic animals under the same condition. This effect was abolished by pharmacological inhibition of PI3K and ERK 1/2, resulting in a further increase in the concentration of TNF- α and IL-6. The analysis of these results indicate that insulin by modulating the PI3K, Akt, ERK 1/2 and SAPK / JNK pathways amplifies the concentration levels of TNF- α and IL-6 under stimulation with LPS.

Key words: diabetes *mellitus*, alloxan, insulin, macrophages, PI3K.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática das etapas de reconhecimento do LPS pela cascata de reconhecimento padrão extracelular da ligação ao TLR4	26
Figura 2. Ilustração sobre a obtenção dos macrófagos de medula óssea	35
Figura 3. Reagentes, concentração, fornecedor e código dos produtos utilizados para os ensaios celulares	36
Figura 4. Reagentes, concentração, fornecedor e código dos inibidores farmacológicos	37
Figura 5. Lista de anticorpos, concentração, fornecedor e código dos produtos utilizados para os ensaios de Western blot	38
Figura 6. Lista de anticorpos, reagente, concentração, fornecedor e código utilizados para os ensaios de citometria de fluxo	39
Figura 7. Estratégia de gate	40
Figura 8. Modelo de diabetes do tipo 1 por ALX	41
Figura 9. Fotomicrografia e contagem total dos BMDM oriundos de animais não diabéticos e diabéticos	42
Figura 10. Expressão de PI3K e Akt em BMDM de animais não diabéticos e diabéticos	43
Figura 11. Expressão das MAPK em BMDM de animais não diabéticos e diabéticos	44
Figura 12. Secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias após estímulo com LPS por BMDM de animais não diabéticos e diabéticos	46
Figura 13. Secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias após estímulo com LPS por macrófagos peritoneais de animais não diabéticos e diabéticos	47
Figura 14. Avaliação da viabilidade celular e teste de tolerância ao LPS em BMDM de animais não diabéticos e diabéticos	49
Figura 15. Secreção de citocinas pró e anti-inflamatória após reestímulo com LPS por BMDM de animais não diabéticos e diabéticos	50
Figura 16. Efeito da insulina na secreção de citocinas pró-inflamatórias por BMDM estimulados por LPS	51
Figura 17. Efeito da insulina na liberação de citocinas pró-inflamatórias por BMDM, de animais diabéticos, estimulados por LPS, em forma de evolução temporal	52
Figura 18. Avaliação de atividade metabólica mitocondrial e viabilidade celular em BMDM de animal diabético	53

Figura 19. Expressão proteica das phospho-MAPK em BMDM de animal diabético

54

Figura 20. Efeito da inibição farmacológica da MAPK na ação da insulina concomitante ao estímulo com LPS na liberação de IL-6 por BMDM de animal diabético

55

Figura 21. Expressão proteica das phospho-p85 e phospho-p55-PI3K em BMDM de animais diabéticos

57

Figura 22. Expressão proteica da phospho-Akt em BMDM de animais diabéticos

58

Figura 23. Efeito da inibição farmacológica da PI3K na ação da insulina concomitante ao estímulo com LPS na liberação de TNF- α e IL-6 por BMDM de animais diabéticos

59

Figura 24. Expressão proteica das isoformas da phospho-PKC em BMDM de animais diabéticos

60

Figura 25. Macrófagos derivados de medula óssea vindos de animais diabéticos apresentam níveis alterados de PI3K/Akt, ERK 1/2 e SAPK/JNK

73

Figura 26. Tratamento com insulina aumenta a fosforilação das proteínas do eixo PI3K/Akt (Ser-473) e da MAPK gerando aumento na secreção de IL-6 e TNF- α por macrófagos derivados de medula óssea, estimulados por LPS, de animais diabéticos

74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA: Associação Americana de Diabetes; *American Diabetes Association*
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ALX: Aloxana
ANOVA: Análise de variância
AP: Proteína ativadora
ARN: Ácido ribonucleico
BMDM: Macrófagos derivados de medula óssea
CD: Grupamento de diferenciação
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
CO₂: Dióxido de carbono
CSF-M: Fator estimulador de colônias de macrófagos
CST: *Cell Signaling Technology*
DAMP: Padrões moleculares associados ao dano
DM: Diabetes *mellitus*
DM1: Diabetes *mellitus* do tipo 1
DM2: Diabetes *mellitus* do tipo 2
DMG: Diabetes *mellitus* gestacional
EPM: Erro padrão da média
ERK: Quinase regulada por sinal extracelular
FCF: Faculdade de Ciências Farmacêuticas
GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLUT: Transportador de glicose
GM-CSF: Fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos
IDF: Federação Internacional de Diabetes; *International Diabetes Federation*
IFN: Interferon
I-κB: Proteína inibitória kappa B
IKK: Quinase I-κB
IL: Interleucina
IR: Receptor de insulina
IR-A: Isoforma A do receptor de insulina A
IR-B: Isoforma B do receptor de insulina B
IRAK: Quinase associada ao receptor de IL-1

IRF: Fator de transcrição do fator regulador de interferon
IRS: Família de substratos do receptor de insulina
LBP: Proteína ligadora de lipopolissacarídeo
LCCM: Sobrenadante de cultura de células L929
LPS: Lipopolissacarídeo
Mal: Proteína adaptadora semelhante à MyD88
mARN: Ácido ribonucleico mensageiro
MAPK: Quinases ativadas por mitógenos
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico
MyD88: Molécula adaptadora fator de diferenciação mieloide
NAD: Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NF- κ B: Fator nuclear kappa B
OMS: Organização Mundial de Saúde
PAMP: Padrões moleculares associados a patógenos
PBS: Tampão fosfato salina
PDK: Fosfatidilinositol dependente de quinase
PI: Fosfatidilinositol
PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinase
PIP: Fosfatidilinositol fosfato
PKB/Akt: Proteína quinase B
PKC: Proteína quinase C
PRR: Receptores de reconhecimento padrão
RPM: Rotações por minuto
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
SAPK/JNK: Quinase ativada por estresse/quinase Jun-amino-terminal
SBD: Sociedade Brasileira de Diabetes
SRP: Partícula de reconhecimento de sinal
STZ: Estreptozotocina
TAB: Proteína ligadora de TAK
TAK: *Transforming growth factor- β -activated kinase*
TGF: Fator de transformação de crescimento
TICAM: Molécula adaptadora contendo domínio de molécula
TIRAP: Molécula associada com receptores do tipo Toll
TLR: Receptor do tipo Toll

TNF: Fator de necrose tumoral

TRAF: Fator associado ao receptor de TNF- α

TRIF: Molécula adaptadora indutora de IFN- β contendo domínio TIR

USP: Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

%: por cento

°C: grau Celsius

cm: centímetro

g: grama

kDa: kilodalton

kg: quilograma

mg: miligrama

min: minuto

mL: mililitro

mM: milimolar

mU: miliunidade internacional

ng: nanograma

nm: nanômetro

RPM: rotações por minuto

UI: unidade internacional

μL: microlitro

μm: micrometro

μM: micromolar

α: alfa

β: beta

γ: gama

δ: delta

κ: kappa

μ: micro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 DIABETES MELLITUS	18
1.1.1 Diabetes mellitus do tipo 1	19
1.2 INSULINA	22
1.3 OS MACRÓFAGOS E OS MEDIADORES IMUNES	24
1.4 OS MACRÓFAGOS E A AÇÃO DA INSULINA EM ESTUDOS DE DIABETES DO TIPO 1	29
2 OBJETIVO	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 ANIMAIS	33
3.2 INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS DO TIPO 1 POR ALX	33
3.3 OBTENÇÃO, CULTURA DE CÉLULAS E TRATAMENTO DOS MACRÓFAGOS	33
3.3.1 Obtenção dos macrófagos peritoneais	34
3.3.2 Obtenção dos BMDM	34
3.3.3 Viabilidade Celular	36
3.3.4 Tratamentos	36
3.4 ENSAIO PARA ATIVIDADE DO METABOLISMO MITOCONDRIAL	37
3.5 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO	37
3.6 MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE INSULINA SÉRICOS	37
3.7 WESTERN BLOT	38
3.7 CITOMETRIA DE FLUXO	39
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4 RESULTADOS	41
4.1 MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES MELLITUS DO TIPO 1	41
4.1.1 Avaliação do peso, dos níveis de glicose e da insulina	41
4.1.2 Avaliação de citocinas no soro	41
4.1.3 Macrófagos derivados de medula óssea em animais não diabéticos e diabéticos	41

4.2 MACRÓFAGOS DE ANIMAIS DIABÉTICOS APRESENTAM RESPOSTA DESREGULADA AO LPS	42
4.2.1 BMDM oriundos de animais diabéticos apresentam alteração na fosforilação PI3K, Akt e MAPK	42
4.2.3 Macrófagos de animais diabéticos do tipo 1 estimulados por LPS secretam citocinas de forma alterada	45
4.2.4 Avaliação de atividade mitocondrial, viabilidade celular, expressão de TLR4 e reestímulo por LPS em BMDM	48
4.3 EFEITO DO TRATAMENTO IN VITRO COM INSULINA EM BMDM ESTIMULADOS POR LPS	51
4.3.1 A secreção das citocinas TNF-α e IL-6 por BMDM tratados com insulina	51
4.3.2 Avaliação de atividade metabólica mitocondrial e viabilidade celular em BMDM de animais diabéticos	52
4.3.3 A insulina na fosforilação das MAPK em BMDM de animais diabéticos	53
4.3.5 Função das MAPK no tratamento com insulina durante o estímulo por LPS: PD98059 e SB 203580 na liberação de TNF-α e IL-6 por BMDM de animais diabéticos	55
4.3.6 A insulina na fosforilação da PI3K em BMDM de animais diabéticos	56
4.3.7 A insulina na fosforilação da AKT em BMDM de animais diabéticos	57
4.3.8 Função da PI3K no tratamento com insulina durante estímulo por LPS: wortmanina e LY294002 na liberação de TNF-α e IL-6 por BMDM de animais diabéticos	58
4.3.9 A insulina na fosforilação de PKC em BMDM de animais diabéticos	60
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÃO	75
7 REFERÊNCIAS	76

8 APÊNDICE

92

9 ANEXOS

121

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES *MELLITUS*

Em suas diretrizes (2017-2018), a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) descreve o diabetes *mellitus* (DM) como um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, seja por defeitos na ação ou na secreção da insulina, ou em ambos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). A classificação do DM foi proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association – ADA*). No Brasil, a SBD recomenda a mesma categorização; dessa forma, o diabetes é classificado em quatro classes clínicas: diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1), diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2), diabetes *mellitus* gestacional (DMG) e outros tipos específicos de DM ou tipos específicos de diabetes devido a outras causas, termo utilizado pela ADA como *specific types of diabetes due to other causes* (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017-2018).

A classificação do diabetes é de suma importância para determinar a terapia que será indicada ao paciente; no primeiro diagnóstico, quando realizado no início da doença, é mais difícil diferenciar entre DM1 e DM2 (SKYLER et al., 2016). Apesar da dificuldade em diagnosticar o início da doença, tanto em crianças quanto em adultos, com o passar do tempo, o diagnóstico verdadeiro se torna mais claro (SKYLER et al., 2016). Após o estabelecimento do DM1, crianças e adolescentes apresentam poliúria, polifagia e cetoacidose diabética na maioria dos casos (DABELEA et al., 2014; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017-2018); em adultos, o início da doença é mais variável e pode não apresentar os sintomas clássicos observados em crianças por ainda apresentar células beta residuais (DABELEA et al., 2014; SKYLER et al., 2016).

O curso do diabetes acontece de forma diferente em cada classe clínica. No DM1, há destruição das células beta mediada por células do sistema imune, principalmente por macrófagos e linfócitos, e resulta em deficiência dos níveis séricos de insulina (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014). Enquanto que, no DM2, há perda progressiva na secreção da insulina, sendo frequentemente associada à resistência da sua ação no receptor de insulina (DONATH; SHOELSON, 2011; GUO, 2014). O DMG é diagnosticado no segundo ou no terceiro trimestre do período

gestacional – em mulheres que não apresentaram diabetes antes da gestação. Os tipos específicos de diabetes devido a outras causas ocorrem por outras condições que acometem o pâncreas, por uso de medicamentos como glicocorticoides, no tratamento do HIV/SIDA ou, também, da doença do pâncreas exógeno e da fibrose cística (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017-2018).

Em indivíduos sem diabetes, a concentração de glicose sanguínea, conhecida também como glicemia, em jejum, deve estar <100 mg/dL; indivíduos com pré-diabetes ou com risco aumentado para o DM possuem glicemia em jejum de ≤ 100 e < 126 mg/dL; e indivíduos com o diabetes já estabelecido apresentam glicemia em jejum ≥ 126 mg/dL (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017-2018). Diversos eventos podem resultar na perda progressiva das células beta que estão localizadas no pâncreas e, consequentemente, na redução da síntese e da secreção da insulina (VAN BELLE et al., 2011; ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014; KATSAROU et al., 2017). A hiperglicemia crônica está associada a danos prolongados e a perda de função em diferentes sítios no organismo, como nos olhos (retinopatia diabética), rins (nefropatia diabética), nervos (neuropatia diabética) e no sistema cardiovascular (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014; SKYLER et al., 2016; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017-2018).

1.1.1 Diabetes *mellitus* do tipo 1

No passado, o DM1 era nomeado de diferentes formas: diabetes insulino dependente, diabetes imunomediado e diabetes juvenil. O diagnóstico do DM1 é realizado a partir da constatação de elevado nível de glicemia sanguínea e de sintomas como polidipsia, boca seca, poliúria, fadiga, polifagia, perda de peso repentina e visão turva (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017-2018; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). Além do mais, a caracterização dos eventos patofisiológicos que ocorrem no DM1 está bem melhor delimitada do que no DM2 (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014; KATSAROU et al., 2017).

O DM1 é classificado como uma síndrome heterogênea; sua manifestação clínica e sua progressão são muito variáveis. A incidência do DM1 na população aumenta em todo o mundo (YOU; HENNEBERG, 2016). Em 2016, o DM1 correspondia a 5-10% dos indivíduos com diabetes (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). Segundo a Federação Internacional de Diabetes

(*INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION – IDF*), existe cerca de 1,1 milhão de indivíduos com DM1 na faixa etária de 0-19 anos, com crescimento anual de 132,6 mil casos em todo o mundo; no Brasil, o número de novos casos ao ano é de 9,6 mil indivíduos (*INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION*, 2017).

A hiperglicemia em indivíduos com DM1, na maioria das vezes, é resultado da destruição das células beta por componentes do sistema imune. Os auto-anticorpos característicos do DM1 são encontrados no sangue e são geralmente anticélulas-beta, insulina, descarboxilase do ácido glutâmico-65 e tirosina fosfatase; a presença de um ou mais auto-anticorpos ocorre em 85-90% dos indivíduos quando a hiperglicemia de jejum é detectada (*KATSAROU et al.*, 2017). Em familiares de primeiro grau, pacientes com DM1 mostram que há persistência de dois ou mais auto-anticorpos, sendo caracterizado como um preditor importante para o diagnóstico do diabetes. Vale ressaltar que a taxa de progressão do DM1 é dependente da idade no diagnóstico inicial, da concentração e da especificidade dos auto-anticorpos (*DABELEA et al.*, 2014).

Pacientes com DM1 são dependentes do uso de insulina exógena para sobreviver (*ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS*, 2014). Neste estágio da doença, os níveis basais de insulina são muito baixos, sendo acompanhados de baixos ou indetectáveis níveis de peptídeo C plasmático. Embora crianças e adolescentes possam apresentar eventos de cetoacidose como a primeira manifestação da doença, adultos podem manter, por anos, células beta residuais suficientes para prevenir os casos de cetoacidose (*AMERICAN DIABETES ASSOCIATION*, 2014). Indivíduos com DM1 são raramente obesos, mas a presença de obesidade não é incompatível com o diagnóstico (*AMERICAN DIABETES ASSOCIATION*, 2014).

Os três estágios do DM1 auxiliam na pesquisa científica e também na tomada da decisão médica (*INSEL et al.*, 2015; *SKYLER et al.*, 2016). O estágio 1 consiste na presença de múltiplos auto-anticorpos (autoimunidade), normoglicemia e apresenta-se como pré-sintomático; o estágio 2 apresenta a autoimunidade com múltiplos auto-anticorpos, com disglucemia – glicemia entre 100 e 125 mg/dL quando em jejum – e também é pré-sintomático; por outro lado, o estágio 3 consiste de hiperglicemia e presença dos sintomas clínicos (*INSEL et al.*, 2015; *SKYLER et al.*, 2016).

1.1.2 Modelos experimentais de *diabetes mellitus* do tipo 1 induzidos por substâncias diabetogênicas

Para estudar os efeitos do diabetes, algumas estratégias cujo mecanismo não depende das células beta pancreática têm sido utilizadas, como o uso de drogas classificadas como diabetogênicas – a aloxana (ALX) e a estreptozotocina (STZ) (KING; BOWE, 2016). Tanto a ALX quanto a STZ são transportadas para o interior da célula beta pelo transportador de glicose (GLUT)2 e induzem quimicamente o DM1 (SZKUDELSKI, 2001). A ALX e a STZ são agentes tóxicos para células beta, levando à morte celular e, assim, a hiperglicemia é detectada em poucos dias após sua administração (LENZEN, 2008).

No interior da célula beta, a ALX induz a síntese de radicais hidroxilas reativos, causando a fragmentação do ácido desoxirribonucleico (ADN) no núcleo e o dano celular (NERUP et al., 1994; SZKUDELSKI, 2001). A dose de ALX possui uma faixa estreita para sua utilização e depende da escolha da via de administração; em camundongos, a dose utilizada varia de 50 a 200 mg/kg (SZKUDELSKI, 2001); a faixa segura para o uso da ALX pela administração endovenosa é de 30 a 65 mg/kg (REIS; SEMENTILLI; GAGLIARDI, 2013; NOLASCO et al., 2015; BELLA et al.; 2017). A ALX é uma molécula hidrofílica e isto é essencial para o seu uso em modelos animais de diabetes, pois aumenta sua especificidade às células beta e minimiza danos sistêmicos. Algumas células, como hepatócitos e células tubulares renais, expressam o GLUT2 em sua superfície, o que explica porque, em doses altas, a ALX promove danos nesses sítios (SZKUDELSKI, 2001; LENZEM, 2008). As células beta apresentam menor atividade da glutathione peroxidase e, consequentemente, resistência 20 vezes menor à ação dos peróxidos exógenos, quando comparadas ao fígado e ao rim, levando, assim, à maior destruição desse ambiente (MALAISSE et al., 1982).

O mecanismo de ação da STZ é pela alquilação do ADN, levando à ativação de Poli(ADP-Ribose) polimerase, com depleção dos níveis de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD), assim gerando redução no conteúdo de adenosina trifosfato e consequente inibição da secreção de insulina (SANDLER; SWENNE, 1983). A STZ é fonte de radicais livres – o que contribui para a danificação do ADN. Eventualmente, o dano do ADN associado ao esgotamento de energia leva à morte celular. A administração de uma única dose em alta concentração – 100 a 200 mg/kg

(dependendo da estirpe do camundongo) – leva à rápida destruição das células beta (HAYASHI et al., 2006; SRINIVASAN, RAMARAO, 2007; DEKEL et al., 2009). Embora a mais utilizada seja a STZ, existem várias situações em que a aplicação da ALX é preferível, pois a taxa de mortalidade dos animais é menor (RADENKOVIĆ et al., 2016).

1.2 INSULINA

A insulina é um hormônio fundamental para o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos e sua síntese nas células beta deve ser altamente regulada (BELFIORE et al., 2017). As células beta são sensíveis às mudanças da concentração de glicose, a qual estimula a transcrição do gene e a tradução do RNA mensageiro para insulina (BARKER et al., 2013), para, assim, ocorrer a liberação de quantidades correspondentes de insulina (YAMAGUCHI et al., 1991; BARKER et al., 2013). A insulina secretada consiste em 51 aminoácidos que juntos pesam 5,8 kilodaltons (kDa) (BELFIORE et al., 2017). O acúmulo de insulina ocorre na presença de nutrientes e diminui em resposta à privação de alimentos (PILLAI et al., 2007).

O gene da insulina codifica o precursor da insulina que possui uma sequência de 110 aminoácidos, sendo conhecida como pré-pró-insulina. Essa molécula contém um peptídeo sinal na extremidade hidrofóbica N-terminal, o qual interage com a partícula de reconhecimento de sinal (SRP) em uma ribonucleoproteína no citosol. A SPR facilita a translocação da pré-pró-insulina da membrana do retículo endoplasmático rugoso para o lúmen, por um canal condutor de peptídeo, no qual o peptídeo sinal pertencente à pré-pró-insulina é clivado por uma peptidase gerando a pró-insulina (BELFIORE et al., 2017).

A pró-insulina sofre mudança em sua conformação, conhecida por fenômeno de dobramento, levando à formação de 3 pontes dissulfídicas. Esse processo acontece por ação de um grupo de proteínas chaperonas localizadas do retículo endoplasmático. Assim, a pró-insulina é transportada do retículo endoplasmático para o Complexo de Golgi, onde ocorre a entrada em vesículas secretórias imaturas, sendo clivada para a produção da insulina e peptídeo-C. Ambos, a insulina e o peptídeo-C, são estocados em grânulos secretores juntamente com polipeptídeo amiloide das ilhotas pancreáticas e outros produtos secretórios menos abundantes nas células beta (BELFIORE et al., 2017).

As células beta de camundongos possuem cerca de 13 mil grânulos de insulina, que ocupam mais de 10% do volume total da célula (LÓPEZ-LASTRA et al., 2005). Cada grânulo contém aproximadamente 200 mil moléculas de insulina (SPRIGGS et al., 2009). Vários nutrientes que estão circulando através do sangue, como a glicose e outros monossacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos, estimulam a secreção da insulina de acordo com a demanda metabólica do organismo (YUNN et al., 2018). Para detectar o estado nutricional, as células betas estão localizadas estrategicamente no pâncreas, de forma a se conectarem com os vasos sanguíneos do organismo, por uma densa rede de pequenos vasos que recebem e circulam dez vezes a quantidade de sangue em comparação às células da porção exócrina do pâncreas (Di FIORE; De CAMILLI, 2001).

A ação da insulina é dependente do seu receptor (IR), uma glicoproteína com alta especificidade e afinidade de ligação para com o hormônio (EVERT et al., 2004). O IR desempenha papel fundamental para iniciar os eventos intracelulares e as vias de sinalização (WHITE et al., 1994; NYSTROM et al., 1999; BIDDINGER; KAHN, 2006). Os efeitos da insulina se dão de forma diferenciada, pois dependem da localização do tipo celular no organismo (KIDO; NAKAE; ACCILI, 2001). A estrutura tridimensional do IR é conhecida desde 1969, embora a sua interação com a insulina tenha sido descrita apenas em 2013 (BELFIORE et al., 2017). Em humanos, o IR é um homodímero com duas cadeias α e β ligadas por duas pontes sulfeto e cada monômero possui sete domínios extracelulares. O IR possui duas isoformas conhecidas, as isoformas A (IR-A) e IR-B, que possuem diferentes comprimentos. A IR-A apresenta uma exclusão do produto residual do exon 11 localizado no cromossomo 19 em humanos, enquanto a IR-B possui a inclusão (CROLL et al., 2016). A expressão da IR-A é predominante durante o crescimento e o desenvolvimento pré-natal, enquanto que a IR-B tem ação no metabolismo de adultos (PANDINI et al., 2002).

A interação da insulina nas diferentes isoformas do IR resulta em diferentes ações biológicas devido às mudanças na afinidade do ligante, às interações com outras moléculas, às taxas de internalização e aos padrões de fosforilação do receptor, bem como de seus substratos (LEIBIGER et al., 2001; ZHANG et al., 2010). Quando o IR é ativado, ocorre a fosforilação de vários substratos proteicos; dez substratos já foram identificados, quatro desses pertencentes à família dos substratos do IR (IRS) (WHITE, 1998; BELFIORE et al., 2017). Em seguida, há o recrutamento

da fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato quinase (PI3K), por meio da ativação da fosfatidilinositol dependente de quinase (PDK)-1; seguida das proteínas-alvo, como a proteína kinase B (PKB)/Akt (KOHN et al., 1996; KIM et al., 1999; KOYASU, S. 2003; SIDDLE, 2011).

A classe IA da PI3K inclui porções catalíticas que são a p110alpha, beta, gama e delta que interagem com uma subunidade reguladora p85 formada por p85, p55 e p50 – as quais contêm o domínio com homologia de Src 2 (GUILLERMET-GUIBERT et al., 2008). Moléculas como Akt são ativadas pelo aumento da concentração de fosfatidilinositol 3,4,5 fosfato (PIP)3 e, em menor grau, por PIP2 que são gerados por atividade das PI3K classe I (CHAN; RITTENHOUE; TSICHLIS, 1999; JEAN; KIGER, 2014). A ativação da Akt por PI3K possui envolvimento em vários processos biológicos, incluindo proliferação, diferenciação, sobrevivência e migração celulares (KATSO et al., 2001; HIRSCH et al., 2007; MANNING et al., 2007).

1.3 OS MACRÓFAGOS E OS MEDIADORES IMUNES

As células precursoras dos macrófagos são geradas a partir de células-tronco hematopoiéticas, na medula óssea, e liberadas para a corrente sanguínea na forma de monócitos que diferenciam-se em macrófagos nos tecidos. Os macrófagos são divididos em dois grupos: os macrófagos recrutados e os macrófagos tecido-residentes (MURRAY, WYNN, 2011). Os macrófagos tecido-residentes também podem ser gerados nos tecidos que irão habitar e formam subpopulações especializadas, de acordo com sua localização anatômica e com os fatores produzidos localmente (POLLARD, 2009; GEISSMANN et al., 2010; MURRAY, WYNN, 2011). Incluem-se, como macrófagos tecido-residentes; os macrófagos peritoneais que residem na cavidade peritoneal; os osteoclastos, presentes nos ossos; as células de Kupffer, alocadas no fígado; e os macrófagos alveolares presentes nos pulmões (POLLARD, 2009; MURRAY; WYNN, 2011).

Os macrófagos residem em diversos tecidos variados, o que permite obtê-los para investigar suas diversas funções. A coleta destas células pode ser feita através de lavados – lavado peritoneal e lavado broncoalveolar – ou diretamente a partir dos órgãos, como fígado e baço. Outra estratégia inclui a geração dos macrófagos *in vitro* utilizando o conteúdo medular, nominando-os macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) (MURRAY et al., 2014). Para isso, uma das formas é utilizar, de modo individual, os fatores de crescimento – como o fator estimulante de colônia de

granulócitos e macrófagos (GM-CSF) ou fator estimulador de colônias de macrófagos (CSF-M) (WANG et al., 2013); uma outra forma é a utilização do meio condicionado obtido do cultivo celular de fibroblastos L929, conhecido por sobrenadante de cultura de células L929 (LCCM), que possui os fatores de crescimento necessários para a diferenciação das células em macrófagos (MARIM et al., 2010; ROVIDA; SBARBA, 2015).

Os macrófagos são responsáveis por vigilância imunológica, regulação homeostática do ambiente e limpeza de restos celulares. Quando estimulados, iniciam-se eventos na sinalização celular que culminam na ativação e no aprimoramento de suas funções, como a síntese e a secreção de citocinas, quimiocinas e outras moléculas que auxiliam na comunicação entre as células, coordenando a resposta inflamatória (GEISSMANN et al., 2010; BODE et al., 2012; DAVIES et al., 2013). Diferentemente de outras células do sistema imune, os macrófagos não se dividem logo após o contato com o antígeno e isto está relacionado ao crescimento e ao aprimoramento em sua capacidade de realizar funções especializadas (VALLEDOR et al., 2000).

Após sua maturação, os macrófagos interagem com células da imunidade inata e adquirida para que possam manter o hospedeiro livre de estímulos sem prejudicar o organismo (GEISSMANN et al., 2010). Suas funções são apresentar o antígeno e reconhecer os padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), por receptores de reconhecimento padrão (PRR), além de serem importantes para a manutenção da homeostasia dos tecidos; por isso, sua variedade de funções é atribuída principalmente à sua notável plasticidade (MOSSER; EDWARDS, 2008; BISWAS; MANTOVANI, 2010).

Os macrófagos expressam em sua superfície uma variedade de PRR para o reconhecimento dos PAMP e padrões moleculares associados ao dano (DAMP), tais como receptores do tipo Toll (TLR), receptores do tipo NOD, receptores para lectinas e receptores *scavenger* (DAVIES et al., 2013). Na presença de infecção ou lesão tecidual, os macrófagos auxiliam na defesa do hospedeiro, que incluem, principalmente, a produção de mediadores imunes e, conseqüentemente, a morte microbiana. Quando ativados, os macrófagos polarizam para vários fenótipos funcionais e isso depende do agente patogênico e das citocinas envolvidas e presentes no microambiente (MOSSER; EDWARDS, 2008; GORDON, S.; MARTINEZ, 2010).

A polarização melhor caracterizada é a ativação clássica, também denominada M1, induzida por interferon (IFN)- γ , GM-CSF, lipopolissacarídeo (LPS) e outros produtos microbianos. Os macrófagos M1 são eficazes na defesa do hospedeiro e eliminam os patógenos, porém, na ausência do controle destas atividades, os macrófagos podem causar toxicidade e danos nos tecidos. A ativação dos macrófagos pela molécula do LPS ocorre principalmente pelo lipídeo A que é o principal PAMP (Figura 1), porém a sua estrutura é composta também por um núcleo oligossacarídeo e pela cadeia lateral O (RAETZ; WHITFIELD, 2002; MILLER et al., 2005; DAVIES et al., 2013).

Figura 1. Representação esquemática das etapas de reconhecimento do LPS pela cascata de reconhecimento padrão extracelular da ligação ao TLR4. Abreviações: AP-1: Proteína ativadora-1; CD14: grupamento de diferenciação 14; DNA/ADN: Ácido desoxirribonucleico; ERK 1/2: Quinase regulada por sinal extracelular; I κ B: Proteína inibitória kappa B; IKK: Quinase I κ B; IL-6: Interleucina-6; IL-10: Interleucina-10; IRAK: Quinase associada ao receptor de IL-1; LBP: Proteína ligadora de LPS; LPS: Lipopolissacarídeo; Mal: Proteína adaptadora semelhante a MyD88; MyD88: Molécula adaptadora fator de diferenciação mieloide; NF- κ B: Fator nuclear kappa B; PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinase; PKB/Akt: Proteína quinase B; PKC: Proteína quinase C; SAPK/JNK: Proteína quinase ativada por estresse/quinase Jun-amino-terminal; TIRAP: molécula associada com receptores do tipo Toll; TLR4: Receptor do tipo Toll 4; TNF- α : Fator de necrose tumoral- α .

As estruturas do lipídeo A e do núcleo oligossacarídeo são conservadas entre as espécies bacterianas, enquanto que a do antígeno O é significativamente mais variável (TAN; KAGAN, 2014). Em animais, o reconhecimento do LPS ocorre pela

interação com a proteína ligadora de LPS (LBP), a qual é uma proteína de fase aguda sintetizada pelo fígado e está presente nos fluídos corporais, associando-se diretamente com a região do lipídeo A do LPS, formando o complexo LPS-LPB (TOBIAS et al., 1986; TOBIAS et al., 1997). A associação da LBP com o LPS pode acontecer em sua forma livre ou com a parede bacteriana (GIOANNINI et al., 2004). O LBP aumenta a afinidade de ligação e reatividade do LPS, transferindo-o para o grupamento de diferenciação (CD)14 que pode estar na membrana celular ou na forma solúvel (TAN; KAGAN, 2014). Estudos em camundongos nocautes para LBP demonstraram que a interação LPS-LBP aumenta a reatividade do LPS em cerca de 300 vezes (WURFEL; WRIGHT, 1997).

Para a ativação dos macrófagos, os complexos formados por LPS e CD14 devem ser transferidos para dois grupos de TLR4/MD-2 presentes na membrana celular, transmitindo a informação sobre a detecção do LPS na superfície para o citosol (POLTORAK et al., 1998; AKASHI et al., 2003; GIOANNINI et al., 2004; PARK et al., 2009). Dessa forma, na membrana dos macrófagos, o CD14 participa da endocitose do TLR4 (ZANONI et al., 2011), enquanto que a ativação do TLR4 depende da molécula MD-2 (GIOANNINI et al., 2004). A transdução do sinal gerado pelo LPS ocorre por associação e recrutamento de quatro moléculas adaptadoras, a molécula adaptadora fator de diferenciação mieloide (MyD)88, a proteína adaptadora semelhante à MyD88 (Mal), a molécula adaptadora indutora de IFN β contendo domínio TIR (TRIF) e a molécula adaptadora contendo domínio de molécula (TICAM)-2 para o domínio intracitoplasmático presente no TLR4 (O'NEIL; BOWIE, 2007).

O recrutamento da via dependente de MyD88 faz com que a molécula MyD88 interaja com molécula associada com receptores do tipo Toll (TIRAP) para depois associar-se com a quinase associada ao receptor de IL-1 (IRAK)4, formando o complexo MyD88-IRAK4, que recruta e ativa os outros membros da família IRAK: IRAK1 e IRAK2 (CAO et al., 1996; MUZIO et al., 1997; LU; YEH; OHASHI, 2008). Quando IRAK é oligomerizada em IRAK4/IRAK1/2, este complexo autofosforila, ativando o fator associado ao receptor de TNF- α (TRAF)-6. Após isto, há o recrutamento e a ativação de um complexo contendo o *transforming growth factor- β -activated kinase* (TAK)1 e a proteína ligadora de TAK (TAB)1, TAB2 e TAB3 (complexo TAK1/TAB), resultando no desencadeamento das vias de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (CHEN, 2005).

As MAPK são proteínas envolvidas na sinalização intracelular e respondem a estímulos provenientes dos ambientes extracelulares e intracelulares; estas controlam grande número de processos fundamentais para a sobrevivência celular (KIM; CHOI, 2010). A família das MAPK é composta por p38, p44 e p42, conhecidas também como quinase regulada por sinal extracelular (ERK) 1/2, e as p46 e p54 são as proteínas quinases ativadas por estresse/quinase Jun-amino-terminal (SAPK/JNK) 1/2 que, quando recrutadas, ativam o fator de transcrição proteína ativadora (AP)-1 (KIM; CHOI, 2010).

Além das MAPK, ocorre a ativação e a liberação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) que necessita das proteínas quinase I κ B (IKK)- β , IKK- α e IKK- γ . Após a fosforilação, a proteína inibitória kappa B (I κ B) - α é degradada, liberando o NF- κ B, permitindo sua translocação para o núcleo e iniciando a transcrição dos mediadores imunes (GHOSH et al., 1998). Em contraste com o IFN- γ , que exige a sinalização dependente de MyD88 para a sua síntese, a sinalização independente de MyD88 sintetiza principalmente IFN tipo I. Essa via está relacionada à ativação do fator de transcrição do fator regulador de interferon (IRF)-3 e à fase tardia da ativação de NF- κ B e MAPK (CAO et al., 1996; HÄCKER et al., 2006). Após a ativação destas vias, os macrófagos M1 secretam alta concentração de moléculas efetoras, como as citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β , IL-6, a IL-12 e as moléculas antimicrobianas, como as espécies reativas de oxigênio e o nitrogênio (SICA; MANTOVANI, 2012).

Os macrófagos previamente expostos ao LPS se tornam hiporresponsivos à ativação subsequente ao LPS, apresentando tolerância a esta endotoxina. A tolerância ao LPS é transitória e protege o organismo da inflamação excessiva e do possível choque gerado pelo LPS; por sua vez, a tolerância é estabelecida em vários contextos biológicos, como na sepse e no trauma (AZIZ et al., 2013; HOTCHKISS et al., 2013). Os macrófagos são os principais mediadores deste mecanismo no organismo (FREUDENBERG; GALANOS, 1988). A indução da tolerância celular gera reprogramação nos macrófagos, mudando a forma com que as células respondem ao próximo estímulo por LPS (CAVAILLON; ADIB-CONQUY, 2006; BISWAS; LOPEZ-COLLAZO, 2009).

Para macrófagos em estado da tolerância, a Akt é fundamental para o estabelecimento desta condição, pois conduz a menores níveis de expressão do TLR4 na membrana celular, o que resulta na secreção de menores níveis das citocinas TNF-

α , IL-6, IL12 e IL-1 β e, em contrapartida, maiores níveis de IL-10 e TGF β (ANDROULIDAKI et al., 2009). A Akt também coordena a polarização dos macrófagos devido a sua reatividade pelo LPS. Enquanto a ausência da proteína Akt2 gera menor resposta pró-inflamatória, com baixos níveis secretórios de IL-6 e TNF- α , a deficiência de Akt1 dirige as células para o fenótipo M1, que é hiperresponsivo ao LPS (ARRANZ et al., 2012).

Os macrófagos também podem polarizar em M2, descrito como uma ativação alternativa, sendo principalmente induzida por célula T auxiliar 2 e citocinas como IL-4, IL-13, fator de transformação de crescimento (TGF) β , glicocorticoides e complexos imunes (LAWRENCE; NATOLI, 2011). Os macrófagos M2 são importantes por promover a função do tecido em condições fisiológicas, preservando a função durante períodos de estresse, na presença da inflamação após casos de infecção ou lesão, bem como agindo na reparação e na cicatrização tecidual (IVASHKIV, 2013).

1.4 OS MACRÓFAGOS E A AÇÃO DA INSULINA EM ESTUDOS DE DIABETES DO TIPO 1

Os pacientes diabéticos, por conta de ambiente hiperglicêmico e carente de insulina, apresentam aumento na suscetibilidade a infecções e a complicações promovidas por alterações metabólicas (CASQUEIRO; CASQUEIRO; ALVES, 2012; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). Os locais de infecção com maior prevalência são o peritônio, a bexiga, os ossos, os rins e os pulmões (SHAH; HUX, 2003). Dentre os agentes etiológicos, as bactérias Gram-negativas são responsáveis por 25% das infecções nesses pacientes (ESPER; MOSS; MARTIN, 2008). Em parte, as infecções secundárias e reincidentes na população diabética ocorrem por falhas no sistema imunológico (GEERLINGS; HOEPELMAN, 1999; SHAH; HUX, 2003; ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014).

Os mecanismos efetores dos macrófagos, como capacidade fagocítica, atividade microbicida e produção de citocinas estão reduzidos, em sua maior parte, nos animais diabéticos; desse modo, o processo inflamatório progride de forma defeituosa, por haver insuficiente resposta vascular aos mediadores imunes, bem como quimiotaxia, aderência e migração das células imunes em direção ao foco inflamatório para combate ao agente infeccioso (GEERLINGS; HOEPELMAN, 1999; DE OLIVEIRA MARTINS et al., 2006; ALBA-LOUREIRO et al., 2006; ALBA-

LOUREIRO et al., 2007; PELEG et al., 2007; GUPTA et al., 2007; MARTINS et al., 2009; FERRACINI et al., 2010; NOLASCO et al., 2015).

Pacientes com DM1 apresentam os níveis glicêmicos elevados, o que promove alteração no metabolismo de lipídeos, proteínas e carboidratos, resultando no uso das reservas energéticas (OLIVEIRA; BRAGA; FERNANDES, 2013). Sendo assim, a manutenção dos níveis glicêmicos em pacientes com DM1, com o uso da insulina exógena, é imprescindível (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017), pois, além de auxiliar no metabolismo de açúcares, a insulina age no sistema imune, modulando suas funções na presença ou não de agentes infecciosos (DANDONA et al., 2007; DENG; CHAI, 2009; SUN et al., 2014; XIU et al., 2014).

Dandona e colaboradores (2013) mostraram que a insulina reduz a expressão do TLR4 em mononucleares circulantes de pacientes DM1, enquanto que a glicose promove aumento na expressão do TLR4. A insulina também promove a osteogênese em animais diabéticos, por agir inibindo a secreção das substâncias reativas de oxigênio pela via PI3K/Akt (WANG et al., 2015). A administração de insulina NPH em ratos Wistar diabéticos previamente à instilação pulmonar por LPS restaura os níveis de liberação das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 e a quantidade de neutrófilos recrutados para o ambiente pulmonar (DE OLIVEIRA MARTINS et al., 2006), bem como restaura os níveis de ácido ribonucleico mensageiro (mARN) para as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 nos pulmões e linfonodos (MARTINS et al., 2009). Além disso, a insulina modula a ativação das vias de MAPK, Akt e PKC pulmonares e a sua restauração, juntamente com a mesma ação nos níveis secretados de IL-6 e citocina indutora de quimiotaxia de neutrófilos presentes no lavado broncoalveolar (MARTINS et al., 2010). Estes estudos mostram que a redução na concentração dos mediadores imunes e a efetividade do sistema imunológico do animal diabético foram restauradas com a utilização em dose única de insulina.

A localização do IR, isoforma B, na superfície celular de macrófagos, foi demonstrada por Pal e colaboradores (2018); observações anteriores mostravam que granulócitos, monócitos e macrófagos expressavam o IR constitutivamente (BAR et al., 1977). A utilização *in vitro* da insulina evidenciou que os macrófagos são sensíveis ao hormônio e que o hormônio tem ação na quimiotaxia destas células, auxiliando nos processos de reparo e cicatrização, com participação da proteína Rac1 por ativação das vias PI3K/Akt, SAPK/JNK e p38 MAPK (LIU et al., 2018). Em macrófagos

alveolares de animais não diabéticos, o pré-tratamento com insulina inibe a fosforilação das proteínas de sinalização – ERK 1/2, p38, Akt, proteína quinase C (PKC) α e PKC delta – inibe a liberação de TNF- α (MARTINS et al., 2008a) e, ainda, reduz a fosforilação citoplasmática de I- κ B α , com diminuição da ativação dos fatores NF- κ B p65 (MARTINS et al., 2008b). Porém, em macrófagos peritoneais e alveolares de animais diabéticos, o tratamento com insulina, concomitante ao estímulo por LPS, reduz os níveis de secreção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β (TESSARO et al., 2017).

Os estudos experimentais contribuíram para que pudéssemos compreender um pouco mais por que os pacientes diabéticos são mais susceptíveis a infecções e como, em poucos anos após a introdução da insulina na terapêutica do diabetes, constatou-se diminuição nas taxas de mortalidade decorrente dos processos infecciosos (BELL; HOCKADAY, 1996). Os macrófagos são a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos e apresentam diferentes perfis de ativação no diabetes, o que pode explicar a maior incidência de casos de infecção nesta população.

Estudos, descritos aqui nesta seção, demonstram que a insulina age nas diversas funções dos macrófagos em níveis celular e molecular. Por conta disso, pretendemos ampliar o que se sabe sobre os BMDM, vindos de um ambiente diabético, e qual é o efeito imunomodulador da insulina concomitante a sua ativação pelo LPS nesses macrófagos.

2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos do diabetes *mellitus* do tipo 1 induzido por aloxana e do tratamento *in vitro* com insulina em macrófagos derivados de medula óssea estimulados ou não por LPS.

6 CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados presentes nesta tese sugerem que os BMDM oriundos de animais diabéticos e estimulados por LPS apresentam secreção alterada das citocinas TNF- α e IL-6 em comparação aos BMDM de animais saudáveis. Quando tratados com insulina, os BMDM estimulados por LPS liberam maior concentração de TNF- α e IL-6 pelo aumento na fosforilação das proteínas PI3K e ERK 1/2.

Detalhadamente, vimos que:

1) BMDM oriundos de animais com DM1 apresentam níveis basais aumentados da subunidade catalítica PI3K p110 α , com redução na subunidade reguladora PI3K p55, e possuem maior fosforilação das proteínas Akt (Ser473 e Thr308), ERK 1/2 e SAPK/JNK MAPK;

2) BMDM oriundos de animais diabéticos secretam níveis alterados das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 após estímulo por LPS, com menor taxa de metabolismo mitocondrial, porém sem alterar a morte celular;

3) Quando os BMDM receberam um segundo estímulo por LPS, eles apresentaram maiores níveis na secreção de TNF- α , mesmo com níveis de expressão semelhantes do TLR4 na membrana celular;

4) Em BMDM de animais diabéticos estimulados por LPS, o tratamento com insulina promoveu aumento nos níveis de TNF- α e IL-6 liberados, sem alterar a secreção dos BMDM vindos de animais não diabéticos;

5) A insulina aumentou a fosforilação de diversas proteínas envolvidas na transdução do sinal pelo estímulo por LPS: p38, ERK 1/2 e SAPK/JNK MAPK; além da subunidade reguladora PI3K p55 e no resíduo serina-473 da Akt em BMDM de animais diabéticos;

6) A inibição farmacológica da PI3K e ERK 1/2 preveniu o efeito gerado pela insulina no aumento da secreção de TNF- α e IL-6 por BMDM estimulados por LPS vindos de animais diabéticos.

7 REFERÊNCIAS

AKASHI, S.; SAITOH, S.; WAKABAYASHI, Y.; KIKUCHI, T.; TAKAMURA, N.; NAGAI, Y.; KUSUMOTO, Y.; FUKASE, K.; KUSUMOTO, S.; ADACHI, Y.; KOSUGI, A.; MIYAKE, K. Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 7, p. 1035-42, 2003.

AKIRAV, E.; KUSHNER, J. A.; HEROLD, K. C. Beta-cell mass and type 1 diabetes: going, going, gone? **Diabetes**, v. 57, n. 11, p. 2883-8, 2008.

ALBA-LOUREIRO, T. C.; MARTINS, E. F.; LANDGRAF, R. G.; JANCAR, S.; CURI, R.; SANNOMIYA, P. Role of insulin on PGE₂ generation during LPS-induced lung inflammation in rats. **Life Sciences**, v. 78, n. 6, p. 578-585, 2006.

ALBA-LOUREIRO, T. C.; MUNHOZ, C. D.; MARTINS, J. O.; CERCHIARO, G. A.; SCAVONE, C.; CURI, R.; SANNOMIYA, P. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 8, p. 1037-1044, 2007.

ALESSI, D. R. Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. Colworth Medal Lecture. **Biochemical Society Transactions**, vol. 29, pp. 1-14, 2001.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes – 2014. **Diabetes Care**, 37(Supplement 1): S14-S80, 2014.

ANDROULIDAKI, A.; ILIOPOULOS, D.; ARRANZ, A.; DOXAKI, C.; SCHWORER, S.; ZACHARIOUDAKI, V.; MARGIORIS, A. N.; TSICHLIS, P. N.; TSATSANIS, C. The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. **Immunity**, v. 31, n. 2, pp. 220-31, 2009.

ARRANZ, A.; DOXAKI, C.; VERGADI, E.; MARTINEZ DE LA TORRE, Y.; VAPORIDI, K.; LAGOUDAKI, E. D.; IERONYMAKI, E.; ANDROULIDAKI, A.; VENIHAKI, M.; MARGIORIS, A. N.; STATHOPOULOS, E. N.; TSICHLIS, P. N.; TSATSANIS, C. Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 24, pp. 9517-22, 2012.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **Lancet**, v. 383, p. 69-82, 2014.

AWAD, A. S.; YOU, H.; GAO, T.; COOPER, T. K.; NEDOSPASOV, S. A.; VACHER, J.; WILKINSON, P. F.; FARRELL, F. X.; BRIAN REEVES, W. Macrophage-derived tumor necrosis factor- α mediates diabetic renal injury. **Kidney International**, v. 88, n. 4, p. 722-33, 2015.

AZIZ, M.; JACOB, A.; YANG, W. L.; MATSUDA, A.; WANG, P. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 3, p. 329-42, 2013.

BAR, R. S.; KAHN, C. R.; KOREN, H. S. Insulin inhibition of antibody-dependent cytotoxicity and insulin receptors in macrophages. **Nature**, v. 265, n.5595, p. 632-5, 1977.

BARKER, C.J.; LEIBIGER, I. B.; BERGGREN, P. O. The pancreatic islet as a signaling hub. **Advances in Biological Regulation**, v. 53, n. 1, p. 156-63, 2013.

BAUMANN, B.; SALEM, H. H.; BOEHM, B. O. Anti-inflammatory therapy in type 1 diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 12, n. 5, p. 499-509, 2012.

BECK-NIELSEN, H.; PEDERSEN, O.; KRAGBALLE, K.; SORENSEN, N. S. The monocyte as a model for the study of insulin receptors in man. **Diabetologia**, v. 13, p. 563-9, 1977.

BELFIORE, A; MALAGUARNERA, R.; VELLA, V.; LAWRENCE, M. C.; SCIACCA, L.; FRASCA, F.; MORRIONE, A.; VIGNERI, R. Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View. **Endocrine Reviews**, v. 38, n. 5, 2017.

BELL, J. I.; HOCKADAY, T. D. R. Diabetes Mellitus. In Oxford Textbook of Medicine, v. 2, p. 1448-1504, 1996. DJ Wetherall, JGG Ledingham and DA Warrell, eds. Oxford: Oxford University Press.

BELLA L. M.; FIERI, I.; TESSARO, F. H. G.; NOLASCO, E. L.; NUNES, F. P. B.; FERREIRA, S. S.; AZEVEDO, C. B.; MARTINS, J. O. Vitamin D Modulates Hematological Parameters and Cell Migration into Peritoneal and Pulmonary Cavities in Alloxan-Diabetic Mice. **BioMed Research International**, v. 7651815, 2017.

BIDDINGER, S. B.; KAHN, C. R. From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. **Annual Review of Physiology**, v. 68, p. 123-158, 2006.

BIELER, G.; HASMIM, M.; MONNIER, Y.; IMAIZUMI, N.; AMEYAR, M.; BAMAT, J.; PONSONNET, L.; CHOUAIB, S.; GRELL, M.; GOODMAN, S. L.; LEJEUNE, F.; RÜEGG, C. Distinctive role of integrin-mediated adhesion in TNF-induced PKB/Akt and NF-kappaB activation and endothelial cell survival. **Oncogene**, v. 26, n. 39, p. 5722-32, 2007.

BISWAS, S. K.; LOPEZ-COLLAZO, E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 10, p.475-87, 2009.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature Immunology**, v. 11, n. 10, p. 889-96, 2010.

BODE, J. G.; EHLTING, C.; HÄUSSINGER, D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 6, p. 1185-94, 2016.

BRADSHAW, E. M.; RADDASSI, K.; ELYAMAN, W.; ORBAN, T.; GOTTLIEB, P. A.; KENT, S. C.; HAFLER, D. A. Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 7, p. 4432-9, 2009.

CABANE, C.; COLDEFY, A. S.; YEOW, K.; DÉRIJARD, B. The p38 pathway regulates Akt both at the protein and transcriptional activation levels during myogenesis. **Cellular Signalling**, v. 16, n. 12, p. 1405-15, 2004.

CAMPOS, M. R.; SEREZANI, C. H.; PETERS-GOLDEN, M.; JANCAR, S. Differential kinase requirement for enhancement of Fc gammaR-mediated phagocytosis in alveolar macrophages by leukotriene B4 vs. D4. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 6, p. 1204-11, 2009.

CAO, Z.; HENZEL, W. J.; GAO, X. IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. **Science**, v. 271, n. 5252, p. 1128-31, 1996.

CASQUEIRO, J.; CASQUEIRO, J.; ALVES, C. Infections in patients with diabetes mellitus: A review pathogenesis. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 16, p. 27-36, 2012.

CAVAILLON, J. M.; ADIB-CONQUY, M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. **Critical Care**, v. 10, n. 5, p. 233, 2006.

CHAN, T. O.; RITTENHOUSE, S. E.; TSICHLIS, P. N. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 68, p. 965-1014, 1999.

CHEN, L.; ZHANG, J.; LI, C.; WANG, Z.; LI, J.; ZHAO, D.; WANG, S.; ZHANG, H.; HUANG, Y.; GUO, X. Glycine Transporter-1 and glycine receptor mediate the antioxidant effect of glycine in diabetic RAT ISLETS AND INS-1 CELLS. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 123, p. 53-61, 2018.

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

CROLL, T. I.; SMITH, B. J.; MARGETTS, M. B.; WHITTAKER, J.; WEISS, M. A.; WARD, C. W.; LAWRENCE, M. C. Higher-Resolution Structure of the Human Insulin Receptor Ectodomain: Multi-Modal Inclusion of the Insert Domain. **Structure**, n. 24, v. 3, p. 469-76, 2016.

DABELEA, D.; REWERS, A.; STAFFORD, J. M.; STANDIFORD, D. A.; LAWRENCE, J. M.; SHARON, S.; IMPERATORE, G.; D'AGOSTINO Jr, R. B.; MAYER-DAVIS, E. J.; PIHOKER, C. Trends in the Prevalence of Ketoacidosis at Diabetes Diagnosis: The SEARCH for Diabetes in Youth Study. **Pediatrics**, v. 133, n. 4, e938-e945, 2014.

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

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

DAVIES, L. C.; JENKINS, S. J.; ALLEN, J. E.; TAYLOR, P. R. Tissue-resident macrophages. **Nature Immunology**, v. 14, n. 10, p. 986-95, 2013.

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

DAVIES, L. C.; TAYLOR, P. R. Tissue-resident macrophages: then and now. **Immunology**, v. 144, n. 4, p. 541-8, 2015.

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

DEKEL, Y.; GLUCKSAM, Y.; ELRON-GROSS, I.; MARGALIT, R. Insights into modeling streptozotocin-induced diabetes in ICR mice. **Laboratory Animals**, v. 38, p. 55-60, 2009.

DELANO, M. J.; WARD, P. A. Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 126, pp. 23-31, 2016.

DENG, H. P.; CHAI, J. K. The effects and mechanisms of insulin on systemic inflammatory response and immune cells in severe trauma, burn injury, and sepsis. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 11, p. 1251-1259, 2009.

DEVARAJ, S.; DASU, M. R.; ROCKWOOD, J.; WINTER, W.; GRIFFEN, S. C.; JIALAL, I. Increased Toll-Like Receptor (TLR) 2 and TLR4 Expression in Monocytes from Patients with Type 1 Diabetes: Further Evidence of a Proinflammatory State. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 2, p. 578-583, 2008.

Di FIORE, PP, De CAMILLI, P. Endocytosis and signaling: an inseparable partnership. **Cell**, v. 106, n. 1, p. 1-4, 2001.

DIAB, R. A.; FARES, M.; ABEDI-VALUGERDI, M.; KUMAGAI-BRAESCH, M.; HOLGERSSON, J.; HASSAN, M. Immunotoxicological effects of streptozotocin and alloxan: in vitro and in vivo studies. **Immunology Letters**, v. 163, n. 2, 193-8, 2015.

DIMITRIADIS, G.; MARATOU, E.; BOUTATI, E.; PSARRA, K.; PAPASTERIADES, C.; RAPTIS, S. A. Evaluation of glucose transport and its regulation by insulin in human monocytes using flow cytometry. **Cytometry A**, v. 64, n. 1, p. 27-33, 2005.

DOCKE, W.D.; RANDOW, F.; SYRBE, U.; KRAUSCH, D.; ASADULLAH, K.; REINKE; VOLK, H. D.; KOX, W. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. **Nature Medicine**, v. 3, p. 678-81, 1997.

DONATH, M. Y.; SHOELSON, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 98-107, 2011.

EMRE, Y.; HURTAUD, C.; NÜBEL, T.; CRISCUOLO, F.; RICQUIER, D.; CASSARD-DOULCIER, A. M. Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages. **Biochemical Journal**, v. 1, pp. 271-278, 2007.

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

EVERT, M.; SUN, J.; PICHLER, S.; SLAVOVA, N.; SCHNEIDER-STOCK, R.; DOMBROWSKI, F. Insulin receptor, insulin receptor substrate- 1, Raf-1, Mek-1 during hormonal hepatocarcinogenesis by intrahepatic pancreatic islet transplantation in diabetic rats. **Cancer Research**, v. 64, p. 8093, 2004.

FERRACINI, M.; MARTINS, J.O.; CAMPOS, M. R.; ANGER, D. B.; JANCAR, S. Impaired phagocytosis by alveolar macrophages from diabetic rats is related to the deficient coupling of LTs to the Fc gamma R signaling cascade. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 11-12, p. 1974-80, 2010.

FILGUEIRAS, L. R.; BRANDT, S. L.; WANG, S.; WANG, Z.; MORRIS, D. L.; EVANS-MOLINA, C.; MIRMIRA, R. G.; JANCAR, S.; SEREZANI, C. H. Leukotriene B4-mediated sterile inflammation promotes susceptibility to sepsis in a mouse model of type 1 diabetes. **Science Signaling**, v. 8, n. 361, 2015.

FREEMERMAN, A. J.; JOHNSON, A. R.; SACKS, G. N.; MILNER, J. J.; KIRK, E. L.; TROESTER, M. A.; MACINTYRE, A. N.; GORAKSHA-HICKS, P.; RATHMELL, J. C.; MAKOWSKI, L. Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a pro-inflammatory phenotype. **Journal of Biological Chemistry**, 2014.

FREUDENBERG, M. A.; GALANOS, C. Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages. **Infection and Immunity**, v. 56: p. 1352-1357, 1988.

FUKUZUMI, M.; SHINOMIYA, H.; SHIMIZU, Y.; OHISHI, K.; UTSUMI, S. Endotoxin-induced enhancement of glucose influx into murine peritoneal macrophages via GLUT1. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 1, p. 108-12, 1996.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 8, p. 551-67, 2016.

GAO, X.; LOWRY, P. R.; ZHOU, X.; DEPRY, C.; WEI, Z.; WONG, G. W.; ZHANG, J. PI3K/Akt signaling requires spatial compartmentalization in plasma membrane microdomains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 30, n. 35, p. 14509-14, 2011.

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

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

GERALDES, P.; KING, G. L. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. **Circulation Research**, v. 106, n. 8, p. 1319-31, 2010.

GHARBI, S. I.; ZVELEBIL, M. J.; SHUTTLEWORTH, S. J.; HANCOX, T.; SAGHIR, N.; TIMMS, J. F.; WATERFIELD, M. D. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. **Biochemical Journal**, v. 404, p. 15-21, 2007.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 225-60, 1998.

GIOANNINI, T. L.; TEGHANEMT, A.; ZHANG, D.; COUSSENS, N. P.; DOCKSTADER, W.; RAMASWAMY, S.; WEISS, J. P. Isolation of an endotoxin-MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, no. 12, p. 4186-4191, 2004.

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

GUAN, Z.; BUCKMAN, S. Y.; PENTLAND, A. P.; TEMPLETON, D. J.; MORRISON, A. R. Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 → SEK1/MKK4 → p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 12901-8, 1998.

GUILLERMET-GUIBERT, J.; BJORKLOF, K.; SALPEKAR, A.; GONELLA, C.; RAMADANI, F.; BILANCIO, A.; MEEK, D.; SMITH, A. J.; OKKENHAUG, K.; VANHAESEBROECK, B. The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 8292-8297, 2008.

GUO, S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. **Journal of Endocrinology**, v. 220, n. 2, 1-t23, 2014

GUPTA, S.; KOIRALA, J.; KHARDORI, R.; KHARDORI, N. Infections in diabetes mellitus and hyperglycemia. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 21, p. 617-638, 2007.

HÄCKER, H.; KARIN, M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. **Science Signaling**, v. 357, 2006.

HAYASHI, K.; KOJIMA, R.; ITO, M. Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1110-1119, 2006.

HIRSCH, E., COSTA, C., CIRAOLO, E. Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling. **Journal of Endocrinology**, v. 194, p. 243-256, 2007.

HOTCHKISS, R. S.; LEVY, J. H.; LEVI, M. Sepsis-induced disseminated intravascular coagulation, symmetrical peripheral gangrene, and amputations. **Critical Care Medicine**, v. 41, e290-e291, p. 103, 2013.

INSEL, R. A.; DUNNE, J. L.; ATKINSON, M. A.; CHIANG, J. L.; DABELEA, D.; GOTTLIEB, P. A.; GREENBAUM, C. J.; HEROLD, K. C.; KRISCHER, J. P.; LERNMARK, Å.; RATNER, R. E.; REWERS, M. J.; SCHATZ, D. A.; SKYLER, J. S.; SOSENKO, J. M.; ZIEGLER, A. G. Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 38, p. 1964-1974, 2015

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 8th edn. Brussels, Belgium: **International Diabetes Federation**, 2017. <http://www.idf.org/diabetesatlas>.

IVASHKIV, L. B. Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 5, p. 216-23, 2013.

JEAN, S.; KIGER, A. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 127, p. 923-928, 2014.

KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, p. 49-62, 2016.

KANTER, J. E.; KRAMER, F.; BARNHART, S.; AVERILL, M. M.; VIVEKANANDAN-GIRI, A.; VICKERY, T.; LI, L. O.; BECKER, L.; YUAN, W.; CHAIT, A.; BRAUN, K. R.; POTTER-PERIGO, S.; SANDA, S.; WIGHT, T. N.; PENNATHUR, S.; SERHAN, C. N.; HEINECKE, J. W.; COLEMAN, R. A.; BORNFELDT, K. E. Diabetes promotes an inflammatory macrophage phenotype and atherosclerosis through acyl-CoA synthetase 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 109, n. 12, e715-24, 2012.

KATSAROU, A.; GUDBJÖRNSDOTTIR, S.; RAWSHANI, A.; DABELEA, D.; BONIFACIO, E.; ANDERSON, B. J.; JACOBSEN, L. M.; SCHATZ, D. A.; LERNMARK, Å. Type 1 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 2017.

KATSO, R.; OKKENHAUGH, K.; AHMADI, K.; WHITE, S.; TIMMS, J.; WATERFIELD, M. D. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: Implications for development, immunity, and cancer. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 17, p.615-675, 2001.

KIDO, Y.; NAKAE, J.; ACCILI, D. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n.3, p. 872-9, 2001.

KIM, E. K.; CHOI, E. J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochim Biophys Acta**. v. 1802, n.4, p. 396-405, 2010.

KIM, E. K.; CHOI, E. J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1802, n. 4, p. 396-405, 2010.

KIM, M. J.; BYUN, J. Y.; YUN, C. H.; PARK, I. C.; LEE, K. H.; LEE, S. J. c-Src-p38 mitogen-activated protein kinase signaling is required for Akt activation in response to ionizing radiation. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 12, p. 1872-80, 2008.

KIM, Y. B.; NIKOULINA, S. E.; CIARALDI, T. P.; HENRY, R. R.; KAHN, B. B. Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 104, p. 733-41, 1999.

KING, A.; BOWE, J. Animal models for diabetes: Understanding the pathogenesis and finding new treatments. **Biochemical Pharmacology**, v. 99, p. 1-10, 2016.

KOHN, A. D.; SUMMERS S.A.; BIRNBAUM M.J.; ROTH R. A. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 31372-25, 1996.

KOYASU, S. The role of PI3K in immune cells. **Nature Immunology**, v. 4, n. 4, 2003.

LAMPETER, E. F.; HOMBERG, M.; QUABECK, K.; SCHAEFER, U. W.; WERNET, P.; BERTRAMS, J.; GROSSE-WILDE, H.; GRIES, F. A.; KOLB, H. Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation. **Lancet**, v. 341, n. 8855, p.1243-4, 1993.

LAWRENCE, T.; NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 750-61, 2011.

LEE, S. E.; CHUNG, W. J.; KWAK, H. B.; CHUNG, C. H.; KWACK, K. B.; LEE, Z. H.; KIM, H. H. Tumor necrosis factor- α supports the survival of osteoclasts through the activation of Akt and ERK. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 52, p. 49343-9, 2001.

LEIBIGER, B.; LEIBIGER, I. B.; MOEDE, T.; KEMPER, S.; KULKARNI, R. N.; KAHN, C.R.; DE VARGAS, L M.; BERGGREN, P. O. Selective insulin signaling through A and

B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells. **Molecular Cell**, v.7, n. 3, p. 559-70, 2001.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-26, 2008.

LIANG, C. P.; HAN, S.; SENOKUCHI, T.; TALL, A. R. The macrophage at the crossroads of insulin resistance and atherosclerosis. **Circulation Research**, 100, n. 11, p. 1546-55, 2007.

LIU, Y.; DHALL, S.; CASTRO, A.; CHAN, A.; ALAMAT, R.; MARTINS-GREEN, M. Insulin regulates multiple signaling pathways leading to monocyte/macrophage chemotaxis into the wound tissue. **Biology open**, v. 7, n. 1, 2018.

LIU, Y.; SHEPHERD, E. G.; NELIN, L. D. MAPK phosphatases – regulating the immune response. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 202-212, 2007.

LIVINGSTON, D. H.; APPEL, S. H.; WELLHAUSEN, S. R.; SONNENFELD, G.; POLK, H. C. Jr. Depressed interferon gamma production and monocyte HLA-DR expression after severe injury. **Archives of Surgery**, v. 123, p.1309-12, 1988.

LOEGERING, D. J.; LENNARTZ, M. R. Protein kinase C and toll-like receptor signaling. **Enzyme Research**, 2011.

LOMBARDO, E.; ALVAREZ-BARRIENTOS, A.; MAROTO, B.; BOSCA, L.; KNAUS, U. G. TLR4-mediated survival of macrophages is MyD88 dependent and requires TNF-alpha autocrine signalling. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 6, p. 3731-9, 2007.

LÓPEZ-COLLAZO, E.; DEL FRESNO, C. Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences. **Critical Care**, vol. 17, n. 6, p. 242, 2013.

LÓPEZ-LASTRA, M.; RIVAS, A.; BARRÍA, M. I. Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. **Biological Research**, v. 38, n. 2-3, p. 121-46, 2005.

LU, Y. C.; YEH, W.C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145-151, 2008.

MALAISSSE, W. J.; MALAISSSE-LAGAE, F.; SENER, A.; PIPELEERS, D. G. Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B cell. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, p. 927-930, 1982.

MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **Cell**, v. 129, p. 1261-1274, 2007.

MARIM, F. M.; SILVEIRA, T. N.; LIMA Jr, D. S.; ZAMBONI, D. S. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **Plos One**. v. 5, p. 1-8, 2010.

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

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

MARTINS, J.O.; FERRACINI, M.; RAVANELLI, N.; LANDGRAF, R.G.; JANCAR, S. Insulin Suppresses LPS-Induced iNOS and COX-2 Expression and NF- κ B Activation in Alveolar Macrophages. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 22, p. 279-286, 2008b.

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

MCGUIRE, V. A.; GRAY, A.; MONK, C. E.; SANTOS, S. G.; LEE, K.; AUBAREDA, A.; CROWE, J.; RONKINA, N.; SCHWERMANN, J.; BATTY, I. H.; LESLIE, N. R.; DEAN, J. L.; O'KEEFE, S. J.; BOOTHBY, M.; GAESTEL, M.; ARTHUR, J. S. Cross talk between the Akt and p38 α pathways in macrophages downstream of Toll-like receptor signaling. **Molecular and Cellular Biology**, v. 33, n. 21, p. 4152-65, 2013.

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

MOHAMMAD, M. K.; MORRAN, M.; SLOTTERBECK, B.; LEAMAN, DW.; SUN, Y.; GRAFENSTEIN, HV.; HONG; S. C.; McInerney, M. F. Dysregulated Toll-like receptor expression and signaling in bone marrow-derived macrophages at the onset of diabetes in the non-obese diabetic mouse. **International Immunology**, v 18, n. 7, p 1101-1113, 2006.

MONICK, M. M.; MALLAMPALLI, R. K.; BRADFORD, M.; MCCOY, D.; GROSS, T. J.; FLAHERTY, D. M.; POWERS, L. S.; CAMERON, K.; KELLY, S.; MERRILL, A. H. JR.; HUNNINGHAKE, G. W. Cooperative prosurvival activity by ERK and Akt in human alveolar macrophages is dependent on high levels of acid ceramidase activity. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 1, p.123-35, 2004.

MONICK, M. M.; POWERS, L. S.; BARRETT, C. W.; HINDE, S.; ASHARE, A.; GROSCKREUTZ, D. J.; NYUNOYA, T.; COLEMAN, M.; SPITZ, D. R.; HUNNINGHAKE, G. W. Constitutive ERK MAPK activity regulates macrophage ATP production and mitochondrial integrity. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 11, p. 7485-96, 2008.

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

MULLER, Y. D.; GOLSHAYAN, D.; EHIRCHIOU, D.; WYSS, J. C.; GIOVANNONI, L., MEIER, R.; SERRE-BEINIER, V.; PUGA YUNG, G., MOREL, P.; BÜHLER, L. H.; SEEBACH, J. D. Immunosuppressive effects of streptozotocin-induced diabetes result

in absolute lymphopenia and a relative increase of T regulatory cells. **Diabetes**, v. 60, n. 9, p. 2331-40, 2011.

MUNOZ, C.; CARLET, J.; FITTING, C.; MISSET, B.; BLEROT, J. P.; CAVAILLON, J. M. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 88, p. 1747-54, 1991.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 723-37, 2011.

MUZIO, M.; NI, J.; FENG, P.; DIXIT, V. M. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. **Science**, v. 278, n. 5343, p. 1612-5, 1997.

NAGAREDDY, P. R.; MURPHY, A. J.; STIRZAKER, R. A.; HU, Y.; YU, S.; MILLER, R. G.; RAMKHELAWON, B.; DISTEL, E.; WESTERTEP, M.; HUANG, L. S.; SCHMIDT, A. M.; ORCHARD, T. J.; FISHER, E. A.; TALL, A.R.; Goldberg, I. J. Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 5, p. 695-708, 2013.

NERUP, J.; MANDRUP-POULSEN, T.; HELQVIST, S.; ANDERSEN, H. U.; POCIOT, F.; REIMERS, J. I.; CUARTERO, B. G.; KARLSEN, A. E.; BJERRE, U.; LORENZEN, T. **Diabetologia**, S82-9, 1994.

NETO, A. F.; ROCHA, P. R. D.; PEREZ, E. C.; XAVIER, J. G.; PERES, G. B.; SPADACCI-MORENA, D. D.; ALVARES-SARAIVA, A. M., LALLO, M. A. Diabetes mellitus increases the susceptibility to encephalitozoonosis in mice. **Plos one**, v. 12, n. 11, 2017.

NOLASCO, E. L.; ZANONI, F. L.; NUNES, F. P.; FERREIRA, S. S.; FREITAS, L. A.; SILVA M. C.; MARTINS, J. O. Insulin Modulates Liver Function in a Type I Diabetes Rat Model. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 1467-1479, 2015.

NOMURA, F.; AKASHI, S.; SAKAO, Y.; SATO, S.; KAWAI, T.; MATSUMOTO, M.; NAKANISHI, K.; KIMOTO, M.; MIYAKE, K.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 7, p. 3476-9, 2000.

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

NYSTROM, F. H.; WHON, M. J. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. **Cellular Signalling**, v. 11, p. 563-574, 1999.

OLIVEIRA, G. O.; BRAGA, C. P.; FERNANDES, A. A. Improvement of biochemical parameters in type 1 diabetic rats after the roots aqueous extract of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.)] treatment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 256-60, 2013.

O'NEILL, L. A.; BOWIE, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 5, p. 353-64, 2007.

PAL, S.; NATH, P.; DAS, D.; HAJRA, S.; MAITRA, S. Cross-talk between insulin signalling and LPS responses in mouse macrophages. **Molecular and Cellular Endocrinology**, S0303-7207, n. 18, p. 30128-X, 2018.

PANDINI, G.; FRASCA, F.; MINEO, R.; SCIACCA, L.; VIGNERI, R.; BELFIORE, A. Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 42, p. 39684-39695, 2002.

PARK, B. S.; SONG, D. H.; KIM, H. M.; CHOI, B. S.; LEE, H.; LEE, J. O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1191-5, 2009.

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

PERDIGUERO, E. G.; GEISSMANN, F. The development and maintenance of resident macrophages. **Nature Immunology**, v. 17, n. 1, p. 2-8, 2016.

PERDIGUERO, E.; SOUSA-VICTOR, P.; RUIZ-BONILLA, V.; JARDÍ, M.; CAELLES, C.; SERRANO, A. L.; MUÑOZ-CÁNOVES, P. p38/MKP-1-regulated AKT coordinates macrophage transitions and resolution of inflammation during tissue repair. **The Journal of Cell Biology**, v. 195, n. 2, pp. 307-322, 2011.

PILLAI, R. S.; BHATTACHARYYA, S. N.; FILIPOWICZ, W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? **Trends in Cell Biology**, v. 17, n. 3, p. 118-126, 2007.

POLLARD, J. W. Trophic macrophages in development and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 4, p. 259-70, 2009.

POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; LIU, M.Y.; VAN HUFFEL, C.; DU, X.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B.; BEUTLER, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085-8, 1988.

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

RADENKOVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, M.; PROSTRAN, M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.78, p. 13-31, 2015.

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

RAJAIAH, R.; PERKINS, D. J.; IRELAND, D. D.; VOGEL, S. N. CD14 dependence of TLR4 endocytosis and TRIF signaling displays ligand specificity and is dissociable in endotoxin tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 27, p. 8391-6, 2015.

RATTER, J. M.; TACK, C. J.; NETEA, M. G.; STIENSTRA, R. Environmental Signals Influencing Myeloid Cell Metabolism and Function in Diabetes. **Trends Endocrinology Metabolism**, v. 29, n. 8, p. 468-480, 2018.

REIS, F. P.; SEMENTILLI, A.; GAGLIARDI, A. R. Experimental diabetes exacerbates skin transplant rejection in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 28, n 5, p. 323-6, 2013.

ROVIDA, E.; SBARBA, P. D. Colony-Stimulating Factor-1 Receptor in the Polarization of Macrophages: A Target for Turning Bad to Good Ones? **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v. 5, p. 379, 2015.

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

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

SANDLER, S.; SWENNE, I. Streptozotocin, but not alloxan, induces AND repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro. **Diabetologia**, v. 25, p. 444-447, 1983.

SARBASSOV, D. D.; GUERTIN, D. A.; ALI, S. M.; SABATINI, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, v. 307, p. 1098-1101, 2005.

SARKAR, S. N.; PETERS, K.L.; ELCO, C. P.; SAKAMOTO, S.; PAL, S.; SEM, G. C. Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 11, n. 11, p. 1060-7, 2004.

SCHWARTZ, S. S.; EPSTEIN, S.; CORKEY, B. E.; GRANT, S. F. A.; GAVIN III J.R.; AGUILAR, R. B.; HERMAN, M. E. A Unified Pathophysiological Construct of Diabetes and its Complications. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n9, p. 645-655, 2017.

SEIMON, T. A.; WANG, Y.; HAN, S.; SENOKUCHI, T.; SCHRIJVERS, D. M.; KURIAKOSE, G.; TALL, A. R.; TABAS, I. A. Macrophage deficiency of p38alpha MAPK promotes apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, pp. 4, 2009.

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

SHANMUGAM, N.; REDDY, M.; GUHA, M.; NATARAJAN, R. High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. **Diabetes**, v. 52, p. 1256, 2003.

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

SIDDLE, K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. **Journal of Molecular Endocrinology**, p. 1-10, 2011.

SKYLER, J. S.; BAKRIS, G. L.; BONIFACIO, E.; DARSOW, T.; ECKEL, R. H.; GROOP, L.; GROOP, P.; HANDELSMAN, Y.; INSEL, R. A.; MATHIEU, C.; MCELVAINE, A. T.; PALMER, J. P.; PUGLIESE, A.; SCHATZ, D. A.; SOSENKO, J. M.; WILDING, J. P. H.; RATNER, R. E. Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. **Diabetes**, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. São Paulo, SP, 2017.

SPRIGGS, K. A.; COBBOLD, L. C.; RIDLEY, S. H.; COLDWELL, M.; BOTTLEY, A.; BUSHELL, M.; WILLIS, A. E.; SIDDLE, K. The human insulin receptor mRNA contains a functional internal ribosome entry segment. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 17, p. 5881-93, 2009.

SRINIVASAN, K.; RAMARAO, P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. **Indian Journal of Medical Research**. v. 125, p. 451-472, 2007.

SU, D.; COUDRIET, G. M.; KIM, D. H.; LU, Y.; PERDOMO, G.; QU, S.; SLUSHER, S.; TSE, H. M.; PIGANELLI, J.; GIANNOUKAKIS, N.; ZHANG, J.; DONG H. H. FoxO1 Links Insulin Resistance to Proinflammatory Cytokine IL-1 β Production in Macrophages. **Diabetes**, v. 58, n. 11, p. 2624-2633, 2009.

SUN, C.; SUN, L.; MA, H.; PENG, J.; ZHEN, Y.; DUAN, K.; LIU, G.; DING, W.; ZHAO, Y. The phenotype and functional alterations of macrophages in mice with hyperglycemia for long term. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, n. 4, pp. 1670-9, 2012.

SUN, Q.; LI, J.; GAO, F. New insights into insulin: The anti-inflammatory effect and its clinical relevance. **World Journal of Diabetes**, v. 5, p. 89-96, 2014.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, v 50, p 537-546, 2001.

TAN, Y.; KAGAN, J. C.; A cross-disciplinary perspective on the innate immune responses to bacterial lipopolysaccharide. **Molecular Cell**, v. 54, n. 2, p. 212-23, 2014.

TESSARO, F. H. G.; AYALA, T. S.; NOLASCO, E. L.; BELLA, L.M.; MARTINS, J.O. Insulin Influences LPS-Induced TNF- α and IL-6 Release Through Distinct Pathways in Mouse Macrophages from Different Compartments. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 2093-2104, 2017.

TESSARO, F.H.; AYALA, T. S.; MARTINS, J. O. Lipid mediators are critical in resolving inflammation: a review of the emerging roles of eicosanoids in diabetes mellitus. **BioMed Research International**, v. 568408, 2015.

TOBIAS, P. S.; SOLD AU, K.; IOVINE, N. M.; ELSBACH, P.; WEISS, J. Lipopolysaccharide (LPS)-binding proteins BPI and LBP form different types of complexes with LPS. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 272, n. 30, p. 18682-5, 1997.

TOBIAS, P. S.; SOLD AU, K.; ULEVITCH, R. J. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 18, p. 10867-71, 1989.

TRACEY, K. K.; BEUTLER, B; LOWRY, S. F.; MERRYWEATHER, J.; WOLPE, S.; MILSARK, R. J.; IHARIRI, R. J.; FAHEY, T. J.; ZENTELLA, A.; ALBERT, J. D.; TOM SHIRES, G.; CERAMI, A. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin, **Science**, v. 234, p. 470, 1986.

VALLEDOR, A. F.; XAUS, J.; COMALADA, M.; SOLER, C.; CELADA, A. Protein kinase C epsilon is required for the induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 1, p. 29-37, 2000.

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

VANHAESEBROECK, B; STEPHENS, L.; HAWKINS, P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. **Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 195, 2012.

VERGADI, E.; IERONYMAKI, E.; LYRONI, K.; VAPORIDI, K.; TSATSANIS, C. Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 3, p. 1006-1014, 2017.

WANG, C.; YU, X.; CAO, Q.; WANG, Y.; ZHENG, G.; TAN, T. K.; ZHAO, H.; ZHAO, Y.; WANG, Y.; HARRIS, D. CH. Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. **BMC Immunology**, v 14, p. 6, 2013.

WANG, L.; ZHAO, X.; WEI, B. Y.; LIU, Y.; MA, X. Y.; WANG, J.; CAO, P. C.; ZHANG, Y.; YAN, Y. B.; LEI, W.; FENG, Y. F. Insulin improves osteogenesis of titanium implants under diabetic conditions by inhibiting reactive oxygen species overproduction via the PI3K-Akt pathway. **Biochimie**, v. 108, p. 85-93, 2015.

WHITE, M. F.; KAHN, C. R. The insulin signaling system. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 1-4, 1994.

WHITE, M. F.; The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 182, p. 3-11, 1998.

WURFEL, M. M.; WRIGHT, S. D. Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 transfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers: preferential interaction with particular classes of lipid. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 8, pp. 3925-34, 1997.

XIU, F.; STANOJCIC, M.; DIAO, L.; JESCHKE, M. G. Stress hyperglycemia, insulin treatment, and innate immune cells. **International Journal of Endocrinology**, 2014.

YAMAGUCHI, Y; FLIER, J. S.; YOKOTA, A.; BENECKE, H.; BACKER, J. M.; MOLLER, D. E. Functional properties of two naturally occurring isoforms of the human insulin receptor in Chinese hamster ovary cells. **Endocrinology**, v. 129, n. 4, p. 2058-2066, 1991.

YAP, T. A.; BJERKE, L.; CLARKE, P. A.; WORKMAN, P. Drugging PI3K in cancer: refining targets and therapeutic strategies. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 23, p. 98-10, 2015.

YOU, W. P.; HENNEBERG, M. Type 1 diabetes prevalence increasing globally and regionally: the role of natural selection and life expectancy at birth. **BMJ Open Diabetes Research & Care**, v. 4, n. 1, 2016.

YUNN, N. O.; KIM, J.; KIM, Y.; LEIBIGER, I.; BERGGREN, P. O.; RYU, S. H. Mechanistic understanding of insulin receptor modulation: Implications for the development of anti-diabetic drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 185, p. 86-98, 2018.

ZANONI, I.; OSTUNI, R.; MAREK, L. R.; BARRESI, S.; BARBALAT, R.; BARTON, G. R.; GRANUCCI, F.; KAGAN, J. C. CD14 Controls the LPS-Induced Endocytosis of Toll-like Receptor 4. **Cell**, v.147, p. 868-880, 2011.

ZHANG, H.; WEI, J.; XUE, R.; WU, J. D; ZHAO, W; WANG, Z. Z.; WANG, S. K.; ZHOU, Z. X.; SONG, D. Q.; WANG, Y. M.; PAN, H. N.; KONG, W. J.; JIANG, J. D. Berberine lowers blood glucose in type 2 diabetes mellitus patients through increasing insulin receptor expression. **Metabolism**, v. 59, n. 2, p. 285-92, 2010.

9 ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF 63.2014-P467

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Efeito da insulina na ativação das vias de sinalização por LPS em macrófagos alveolar e peritoneal de animais diabéticos**" (Protocolo CEUA/FCF/467), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Fernando Henrique Galvão Tessaro**, sob orientação do(a) **Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de **04 de julho de 2014**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 7 de julho de 2014.

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

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

Ofício CEUA/FCF 15.2015-P467

São Paulo, 10 de março de 2015.

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), em reunião realizada em 6 de março de 2015, **aprovou** as alterações propostas para o projeto de pesquisa **"Efeito da insulina na ativação das vias de sinalização por LPS em macrófagos alveolar e peritoneal de animais diabéticos"** (Protocolo CEUA nº 467), a saber: inclusão de procedimento de coleta e de pesquisador, conforme constante nos documentos apresentados.

Cordialmente,

Profa. Dra. Neuzi Mariko Aymoto Hassimotto
Vice-Coordenadora da CEUA/FCF/USP

Ilmo(a). Sr(a).
Fernando Henrique Galvão Tessaro
Orientador(a): Prof. Dr. Jolison de Oliveira Martins
FBC/FCF/USP

29/08/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9142 - 8439571/1 - Fernando Henrique Galvão Tessaro

Email: fernando.tessaro@usp.br
Data de Nascimento: 10/11/1988
Cédula de Identidade: RG - 8.737.006 2 - PR
Local de Nascimento: Estado do Paraná
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Paraná - Brasil - 2012
Mestrado: Mestre em Ciências - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2014

Curso: Doutorado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Fisiopatologia
Data de Matrícula: 19/09/2014
Início da Contagem de Prazo: 19/09/2014
Data Limite para o Depósito: 19/09/2018
Orientador: Prof(a). Dr(a). Joilson de Oliveira Martins - 10/08/2016 até o presente. Email: martinsj@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 19/09/2014
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 22/09/2016
Estágio no Exterior: Karolinska Institutet, Suécia - Período de 01/10/2016 até 30/09/2017
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 19/09/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Prorrogação em 20/08/2018

Impresso em: 29/08/2018 13:23:46

29/08/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9142 - 8439571/1 - Fernando Henrique Galvão Tessaro

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5792-3/2	Tópicos em Análises Clínicas III	03/03/2015	16/06/2015	15	1	87	A	N	Concluída
BMP5773-3/1	Bases Imunológicas da Relação Parasita-Hospedeiro (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/03/2015	29/04/2015	120	8	93	B	N	Concluída
MCM5772-7/1	Temas Básicos de Imunologia (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	06/04/2015	03/05/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5734-3/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	03/08/2015	09/08/2015	30	2	100	B	N	Concluída
FBC5766-4/2	Tópicos em Análises Clínicas IV	04/08/2015	16/11/2015	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5748-4/2	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	05/04/2016	17/05/2016	60	4	90	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
Para exame de qualificação		Para depósito de tese
Disciplinas:	0	20
Estágios:		
Total:	0	20

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Prorrogação em 20/08/2018

Impresso em: 29/08/2018 13:23:46