UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Área de Fisiopatologia

Insulina modula migração celular e a secreção de citocinas na vigência da infecção pulmonar por *Paracoccidioides brasiliensis* em camundongos diabéticos e não-diabéticos

FELIPE BECCARIA CASAGRANDE

Tese para obtenção do grau de DOUTOR.

Orientador: Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

São Paulo

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Área de Fisiopatologia

Versão Corrigida

Insulina modula migração celular e a secreção de citocinas na vigência da infecção pulmonar por *Paracoccidioides brasiliensis* em camundongos diabéticos e não-diabéticos

FELIPE BECCARIA CASAGRANDE

Tese apresentada à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) para a defesa em nível de DOUTORADO.

Área de Concentração: Fisiopatologia

Orientador: Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, 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

CC334i

Casagrande, Felipe Beccaria
Insulina modula migração celular e a secreção de citocinas na vigência da infecção pulmonar por Paracoccidioides brasiliensis em camundongos diabéticos e não-diabéticos / Felipe Beccaria Casagrande. - São Paulo, 2020.
127 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).
Orientador: Martins, Joilson de Oliveira

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

Felipe Beccaria Casagrande

Insulina modula migração celular e a secreção de citocinas na vigência da infecção pulmonar por *Paracoccidioides brasiliensis* em camundongos diabéticos e não-diabéticos

Versão corrigida

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
orientador/presidente

Profa. Dra. Caroline Marcantonio Ferreira
1º. examinador

Profa. Dra. Patricia Xander Batista
2º. examinador

Prof. Dr. Wagner Luiz Batista
3º. examinador

São Paulo, 10 de abril de 2020.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Projeto Universal 2013 e bolsa PQ-1D), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 2014/05214-1 e 2017/11540-7).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Terezinha e Lincoln,

cujo incentivo é o chão firme que dá suporte aos meus passos.

Donos e responsáveis por cada vitória minha,

Inclusive esta.

AGRADECIMENTOS

À minha família, gratidão eterna pelo privilégio de dividir um núcleo familiar como o nosso. Aos meus pais, Terezinha e Lincoln, fonte de infinito apoio, amor incondicional, obrigado por me permitirem. Aos meus irmãos Beatriz e Lucas pela compreensão e por toda a ajuda, que muitas vezes envolvia apenas me escutar reclamar por horas sem parar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Joilson Martins, pela oportunidade e incentivo. Grato particularmente pela paciência e sabedoria com que me orientou durante estes anos e pelos ensinamentos que moldaram minha formação profissional.

A todos os meus colegas cujas trajetórias passaram pelo Laboratório de Imunoendocrinologia durante sua trajetória e cujas contribuições diretas ou indiretas foram fundamentais para o meu crescimento e para a evolução deste trabalho: Mariana Carvalho, Mariana Braz, João Pedro, Leonardo, Thais, Fernando, Thatyane e Paula. Agradeço especialmente a Dra. Fernanda Nunes pela ajuda sempre presente, a Sabrina Ferreira pelos risos e companheirismo, e aos meus mais recentes amigos Emanuella Sousa, Victória Moreira e Luiz Queiroz por tornarem o estresse da reta final mais tolerável.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Aos técnicos Renata, Fabiana, Edson, Kátia, Stephanie e, em especial à nossa técnica Silene Migliorini, pelos materiais arrumados de última hora e por brigar com quem deixava o laboratório bagunçado. Às secretárias Edna, Elaine e Samantha pela boa vontade em me ajudar com as correrias burocráticas. À equipe de limpeza, sempre gentil, em especial as senhoras Cícera, Andressa, Rose e Cláudia (*in memoriam*). À equipe do biotério, em especial a Flávia, pelos ensinamentos éticos.

As amigos e colegas de outros laboratórios que me cederam espaço para o desenvolvimento de meus experimentos: ao Prof. Sandro e aos alunos do laboratório de Micologia em especial Lavínia e Suelen, ao Prof. Stephen do departamento de Farmacologia do ICB/USP.

To Daniel Ketelhuth and his research team from the Center for Molecular Medicine of Karolisnka Institute, I thank for having me in their lab and for everything I've learned there. Special thanks to Maria José, Roland, Martin, Kostantinos, Linda and Anneli for all they've taught me.

Aos meus amigos fora do ambiente acadêmico que me ajudaram a manter a sanidade. Dayane e Jéssica, a quem eu reportava e reclamava. Roberto, Fernanda, Larissa,

Mayara, Laíse, Stannis, Mirielly e todos os amigos brasileiros cujos caminhos cruzaram com o meu na Suécia, quando eu mais precisava.

Aos meus amigos e amigas de longas datas e ainda mais longas distâncias, obrigado pela presença constante em meu celular.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Toxicologia pela oportunidade e ao CNPq, à FAPESP e à CAPES pelo financiamento que possibilitou a realização deste trabalho.

“’(...), sonhador ingênuo, quem resolve lutar contra a hidra de mil cabeças da natureza humana tem que pagar com muito sofrimento, e sua família há de pagar junto com ele! E será só no último estertor que você compreenderá que toda a sua vida não passou de uma gota d’água num oceano infinito!’
Porém, o que é um oceano senão uma multidão de gotas d’água?”

David Mitchell – Atlas de Nuvens

RESUMO

CASAGRANDE, F.B. **Insulina modula migração celular e a secreção de citocinas na vigência da infecção pulmonar por *Paracoccidioides brasiliensis* em camundongos diabéticos e não-diabéticos.** 127f. Defesa (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Diabetes *mellitus* (DM) compreende um conjunto de doenças metabólicas de grande importância e incidência mundial. Nele, o DM do tipo 1 é caracterizado pela destruição de células pancreáticas produtoras de insulina, e dentre seus sintomas, a disfunção imunológica relacionada à falta de insulina foi observada por diversos estudos, descrevendo pacientes diabéticos como mais susceptíveis a infecções e complicações decorrentes destas. Paracoccidioidomicose (PCM) é uma enfermidade sistêmica causada por fungos da espécie *Paracoccidioides sp.*, bastante importante no Brasil e endêmica em toda a América Latina. Este trabalho utiliza um modelo de carência relativa de insulina (DM experimental) para estudar a intervenção da insulina em um modelo de micose pulmonar causada por *P. brasiliensis*, analisando o processo de migração celular (expressão de moléculas de adesão por imunohistoquímica e fenótipo dos leucócitos do pulmão por citometria de fluxo), os mecanismos moleculares (produção/liberação de citocinas por *cytometric bead array*), intracelulares (vias de sinalização por *Western blot*), e a atividade fagocítica e microbicida dos macrófagos alveolares. Em resultados observamos que, comparados aos não-diabéticos, camundongos tornados diabéticos apresentam maior susceptibilidade evidenciada por menor atividade fagocítica e reduzidas secreções de interferon-γ e de interleucina-12 na fase inicial da inflamação, que leva a uma resposta menos efetiva com menor expressão de molécula de adesão de células vasculares, reduzidas populações de linfócitos TCD4+, TCD8+, células *natural killer*, culminando em inflamação crônica resultante da proliferação aumentada do fungo nos pulmões (aumento de interferon-γ e fator necrótico tumoral-α). Vemos ainda que o tratamento de insulina em animais diabéticos restaurou as secreções de citocinas pró-inflamatórias e a atividade fagocítica de macrófagos em 24 horas de infecção, e aumentou a celularidade, a expressão de moléculas de adesão de células vasculares-1 e restaurou as populações de linfócitos B, de células *natural killer* e de células coestimuladas por CD80, além de reduzir a inflamação crônica no pulmão. Estes dados em conjunto nos permitem inferir que a insulina modulou o ambiente inflamatório de animais tornados diabéticos de formas diferentes em estágios iniciais e tardios da infecção pelo isolado Pb18 do *Paracoccidioides brasiliensis*.

Palavras chave: Diabetes *mellitus*, insulina, paracoccidioidomicose, citocinas, migração celular.

ABSTRACT

CASAGRANDE, F.B. **Insulin modulates cell migration and cytokines secretion during pulmonary infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* in diabetic and non-diabetic mice.** 127p. Defense (PhD) – School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2020.

Diabetes *mellitus* comprehends a group of metabolic diseases of great importance and incidence worldwide. Type 1 diabetes *mellitus* is characterized by destruction of insulin producing-pancreatic cells and, among its symptoms, an impaired immunological function has been observed in many studies having diabetic patients described as more susceptible to infections and complications resulted of them. Paracoccidioidomycosis is a systemic disease caused by fungi of *Paracoccidioides spp.*, also of great importance in Brazil and endemic in the whole Latin America. This work uses a model of experimental T1DM to investigate the intervention of insulin in a model of murine PCM induced by *Paracoccidioides brasiliensis*, analyzing the process of cell migration (adhesion molecules expression, leukocyte phenotyping), molecular mechanisms (production and secretion of cytokines), intracellular mechanisms (signaling pathways) and phagocytic and microbicidal activities in alveolar macrophages. In results, compared to controls, we observed higher susceptibility in diabetic mice to PCM, evidenced by reduced phagocytic activity and reduced levels of interferon-γ and interleukin-12 on initial stages of infection, and a less effective inflammation with lesser expression of adhesion molecules, reduced migration of TCD4+, TCD8+, NK cells and B lymphocytes, resulting in chronic inflammation caused by higher fungal proliferation in lungs (higher interferon-γ and tumours necrosis factor-α levels). In addition, we saw treatment with insulin in diabetic animals restored secretion of pro-inflammatory cytokines and phagocytic activity on early stages and allowed higher cellularity, higher expression of vascular cells adhesion molecule-1 and restored populations of B lymphocytes, NK cells and the expression of costimularoty molecule CD80, also reducing the chronic inflammation in lungs. Taken together, these data lead us to suggest insulin modulated the inflammatory microenvironment in lungs of mice rendered diabetic, in different forms on earlier and later stages of an infection by Pb18 isolate.

Keywords: Diabetes *mellitus,* insulin, paracoccidioidomycosis, cytokines, cell migration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimativa global e regional de adultos diabéticos em 2017 e 2045. 20
Figura 2. Rankings dos países com maior número de adultos diabéticos e maiores estimativas de casos não diagnosticados. 21
Figura 3. Ciclo da infecção por *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. 26
Figura 4. Quadro de distribuição de grupos do experimento. 35
Figura 5. Modelo de micose pulmonar em animais diabéticos 36
Figura 6. Quadro dos painéis de anticorpos utilizados na FACS.....40
Figura 7. Estratégia de seleção de populações de leucócitos por FACS. 41
Figura 8. Quadro de anticorpos utilizados para análises por Western blot.....46
Figura 9. Concentrações de insulina em soro 51
Figura 10. Consumo de ração e água. 52
Figura 11. Caracterização da infecção no pulmão, 24h. 54
Figura 12. Análise de citocinas no pulmão, 24h. 55
Figura 13. Ensaio de CFU pulmonar, 24h. 56
Figura 14. Caracterização da infecção no baço, 24h. 57
Figura 15. Caracterização das populações leucocitárias no pulmão, 20d. 59
Figura 16. Análise de citocinas do pulmão, 20d. 60
Figura 17. Ensaio de CFU pulmonar, 20d. 61
Figura 18. Caracterização das populações leucocitárias no baço, 20d. 62
Figura 19. Caracterização da inflamação no pulmão, 45d. 64
Figura 20. Caracterização da inflamação no pulmão, 45d. 65
Figura 21. Análise de citocinas no pulmão, 45d. 66
Figura 22. Caracterização da inflamação no baço, 45d. 67
Figura 23. Imagens e quantificação de VCAM-1 no endotélio vascular de pulmão..69
Figura 24. Análise de expressão de moléculas em homogenato de pulmão. 71
Figura 25. Análise de expressão relativa de citocinas por PCR. 73
Figura 26. Análise de CINC-1 em homogenato de fígado e baço. 74
Figura 27. Índice fagocítico e CFU de Fagocitose. 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Determinação dos níveis glicêmicos. 50
Tabela 2. Determinação dos níveis glicêmicos e de variação de peso em 55 dias. .50

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

APC	*Allophycocyanin*
BHI	*Brain heart infusion*
CBA	*Cytometric bead array*
CFU	Unidades formadoras de colônia
CINC	*Cytokine Induced Neutrophil Chemoattractant*
DAB	3,3 diaminobenzidina
DM	*Diabetes mellitus*
DM1	*Diabetes mellitus* tipo 1
DM2	*Diabetes mellitus* tipo 2
ELISA	*Enzime-linked Immuno Sorbent Assay*
EPM	Erro padrão da média
ERK	*Extracellular signaling-activated kinase*
FACS	*Fluorescence-activated cell sorting*
FITC	*Fluorescein isothiocyanate*
FSC	*Forward scatter*
GAPDH	*Gliceraldehide-3-phosphate dehydrogenase*
HRP	*Horseradish Peroxidase*
ICAM	*Intracellular adhesion molecule*
IDF	*International Diabetes Federation*
IFN	*Interferon*
IL	Interleucina
i.t.	Intratraqueal
LBA	Lavado broncoalveolar
LPS	Lipopolissacarídeo
MA	Macrófago alveolar
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
MCP-1	Monocyte chemotractant protein-1
NK	*Natural killer*
NPH	*Neutral protamine Hagedorn*
OMS	Organização Mundial deSaúde
Pb	*Paracoccidioides brasiliensis*

Pb+i	*Paracoccidioides brasiliensis* + insulina
PBS	*Phospate Buffered Saline*
PCM	Paracoccidioidomicose
PE	*Phycoerythrin*
PECAM	*Platelet endothelial cell adhesion molecule*
PKC-α	*Protein kinase C alpha*
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SFB	Soro fetal bovino
SSC	*Side scatter*
Th	*T helper*
TLR	*Toll-like receptors*
TNF	*Tumours Necrosis Factor*
VCAM	*Vascular cell adhesion protein*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18

1.1. Conceitos gerais sobre diabetes *mellitus* 18

1.1.1. Epidemiologia do diabetes *mellitus* 19

1.1.2. Diabetes *mellitus*, insulina e a resposta imunológica 22

1.2. *Paracoccidioides brasiliensis* 24

1.2.1. PCM e resposta imunológica 28

1.3. Modelos experimentais de DM e PCM 29

1.4. Justificativa 32

2. OBJETIVOS 34

3. MATERIAL E MÉTODOS 35

3.1. Animais 35

3.2. Delineamento experimental 35

3.3. Indução de diabetes *mellitus* 36

3.4. Cultivo do *Paracoccidioides brasiliensis* 37

3.5. Infecção Intratraqueal 37

3.6. Tratamento com insulina 38

3.7. Monitoramento de parâmetros do DM1 38

3.8. Eutanásia e coleta dos órgãos 39

3.9. Determinação do CFU tecidual 39

3.10. Determinação da expressão de moléculas de superfície 39

3.10.1. Estratégia de análise 40

3.11. Quantificação de citocinas e quimiocina 41

3.12. Quantificação de insulina 42

3.13. Análise da expressão de mRNA 42

3.14. Análise de molécula de adesão por imunohistoquímica 44

3.15. Expressão de proteínas por *Western blot* 45

3.16. Obtenção dos macrófagos alveolares e cultura 46

3.17. Ensaio de atividade fagocítica 47

3.18. Ensaio de atividade e fungicida 47

3.19. Análise estatística 48

4. RESULTADOS 49

4.1. Caracterização do modelo de DM1 49

4.1.1. Variação de peso e glicemia 49

4.1.2. Tratamento de insulina 50

4.1.3. Consumo de água e ração 51

4.2. Caracterização da Infecção – 24h 52

4.3. Caracterização da Infecção – 20 dias 58

4.4. Caracterização da Infecção – 45 dias 63

4.5. Expressão de moléculas de adesão em pulmão 68

4.6. Expressão de moléculas de sinalização intracelular 70

4.7. Análises da expressão relativa de citocinas por PCR 72

4.8. Análises de quimiocinas 74

4.9. Atividade fagocítica de macrófagos alveolares 75

5. DISCUSSÃO 77

6. CONCLUSÃO.....86

REFERÊNCIAS.....87

APÊNDICES.....97

ANEXOS 119

1. INTRODUÇÃO

1.1 Conceitos gerais sobre diabetes *mellitus*

A Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) preconiza o diabetes como um grupo de doenças metabólicas resultantes da deficiência na secreção e/ou na ação da insulina (SBD 2017-2018). A falta da insulina ou a reduzida capacidade de resposta das células do organismo à mesma têm como consequência a hiperglicemia persistente que é a principal característica da doença e que, se não observada e tratada em longo prazo, pode causar dano a diversos órgãos e sistemas. Tendo em vista a importância e a prevalência das complicações em longo prazo associadas ao desequilíbrio metabólico causado por ele, o diabetes é considerado uma doença crônica complexa que requer tratamento e assistência médica contínua, além de mobilização de políticas sociais de prevenção e diagnóstico.

A classificação do diabetes, assim como suas diretrizes de diagnóstico, vem sendo alvo de constantes debates e revisões ao longo das décadas. No entanto, a classificação adotada pela SBD atualmente está de acordo com a proposta pela Organização Mundial de Saúde e é amplamente aceita, categorizando o diabetes de acordo com a etiologia da doença, e não do tratamento recebido pelo paciente. Temos então o diabetes dividido em quatro categorias (SBD 2017-2018):

- O diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1) está diretamente relacionado à deficiência relativa de insulina causada pela destruição, frequentemente autoimune, das células β-pancreáticas responsáveis pela produção e secreção do hormônio;
- O diabetes *mellitus* do tipo 2, de etiologia complexa e multifatorial, onde a hiperglicemia ocorre concomitantemente ao aumento da resistência dos tecidos periféricos à ação da insulina e em longo prazo diferentes graus de redução da secreção da insulina pelo pâncreas. Frequentemente associado ao excesso de peso e outros componentes da síndrome metabólica;

- Diabetes gestacional, quando a hiperinsulinemia compensatória em resposta às enzimas placentárias que degradam a insulina durante a gravidez resulta no desenvolvimento de resistência à insulina, podendo evoluir para intolerância a carboidratos.
- Outros tipos: casos menos comuns de diabetes, de manifestação clínica amplamente variada. A classe compreende, por exemplo, casos monogênicos de diabetes onde mutação em um único gene autossômico é responsável pela manifestação clínica do diabetes, diferente dos DM 1 e 2 onde há contribuição de múltiplos genes e fatores ambientais, e casos secundários de diabetes onde a doença surge como complicações de outras patologias, doenças no pâncreas e uso de fármacos (SBD 201-2018).

1.1.1 Epidemiologia do diabetes *mellitus*

Diabetes *mellitus* é um importante e crescente problema de saúde que transcende fronteiras e diz respeito a todos os países, independente de seu nível de desenvolvimento. De acordo com a OMS, o DM ocupa o terceiro lugar em causas de mortes prematuras por doenças não contagiosas, superada apenas por fatores como hipertensão arterial sistêmica e doenças resultantes do uso de tabaco (WHO, 2016).

A Federação Internacional do Diabetes (*International Diabetes Federation,* IDF) estimava que, em 2019, o mundo contava com cerca de 463 milhões de pacientes diabéticos, em um total de aproximadamente 8,8% dos adultos entre 20 e 79 anos, sendo que destes 32 milhões estejam na América do Sul.

Se as tendências se provarem verdadeiras, estima-se que em 2045 haja um aumento de 51% na população mundial de diabéticos, ou seja, teremos 700 milhões de pacientes diabéticos entre as idades de 20 e 79 anos (Figura 1; IDF, 2019). Este aumento deve ser ainda mais acentuado na América do Sul (55%), onde deveremos contar com cerca de 42 milhões de diabéticos em 2045 (**Figura 1**; IDF, 2019).

Diversas justificativas foram listadas para o aumento do número de pacientes portadores do DM, entre elas o crescimento e envelhecimento populacional e o

aumento da sobrevida dos pacientes diabéticos, mas fatores como aumento da frequência do estilo de vida sedentário e da obesidade também possuem efeito importante na ascensão da doença (SBD 2017-2018).

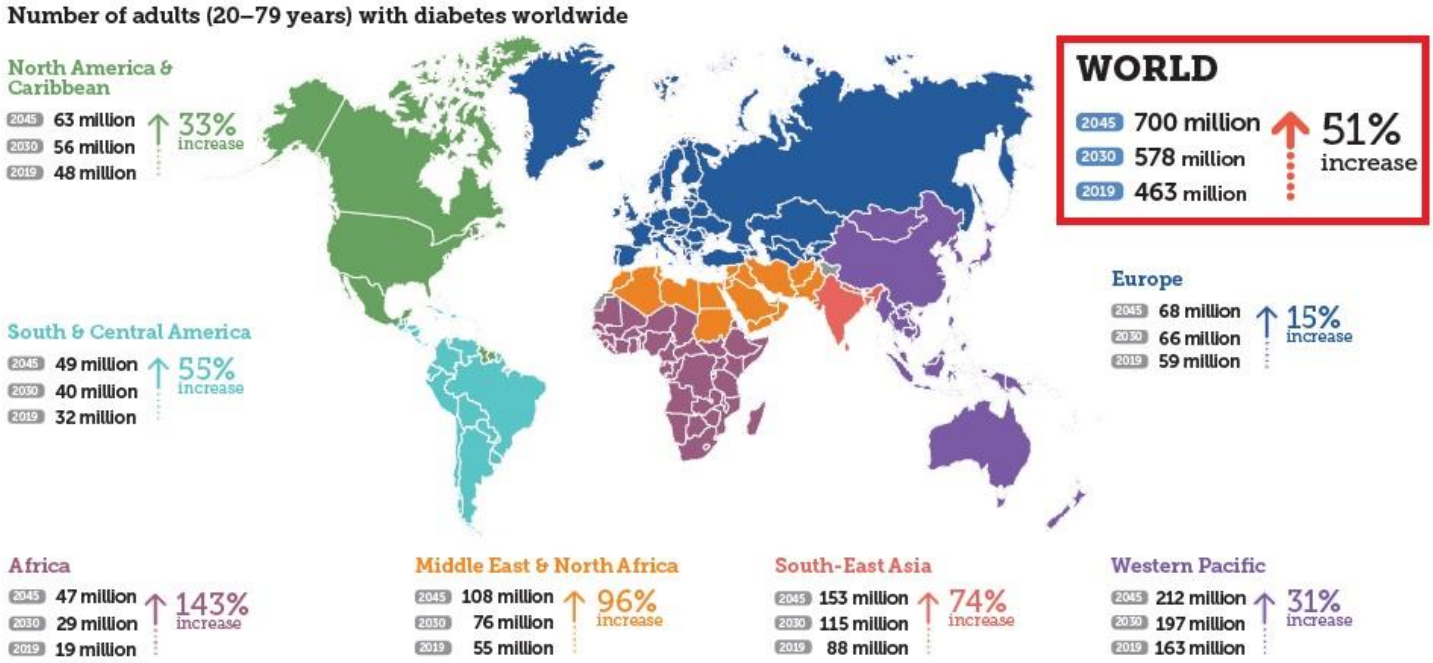


Figura 1. Estimativa global e regional de adultos diabéticos em 2017 e 2045.
Fonte: IDF Diabetes Atlas, 2019.

Neste contexto, o Brasil atualmente ocupa o quinto lugar no ranking dos países com maior número de pacientes portadores do DM entre 20 e 79 anos, contando com em torno de 21,5 milhões de diabéticos. Ainda, ocupa o sexto lugar entre os países com o maior número de casos não diagnosticados: estima-se que 46% dos casos de diabetes no Brasil não tenham sido diagnosticados, traduzindo-se em cerca de 7,7 milhões de pacientes diabéticos que não recebem devida orientação e tratamento por não terem sido diagnosticados (IDF, 2019). Estes dados e rankings do IDF podem ser observados na **Figura 2**.

2019				Estimativa de casos não diagnosticados		
Rank	**País/Território**	**N° de diabéticos**		**Rank**	**País/Território**	**N° de diabéticos**
1	China	140,5mi		1	China	65,2mi (56%)
2	Índia	101mi		2	Índia	43,9mi (57%)
3	Estados Unidos da América	34,4mi		3	Estados Unidos da América	11,8mi (38,1%)
4	Paquistão	26,2mi		4	Paquistão	8,5mi (43,8%)
5	Brasil	21,5mi		5	Indonésia	7,9mi (73,7%)
6	México	17,2mi		6	Brasil	7,7mi (46%)
7	Indonésia	13,7mi		7	México	4,9mi (38,6%)
8	Alemanha	11,9mi		8	Egito	4,8mi (54,4%)
9	Egito	11,4mi		9	Bangladesh	4,7mi (56%)
10	Bangladesh	8,4mi		10	Alemanha	4,5mi (47,6%)

Figura 2. Rankings dos países com maior número de adultos diabéticos e maiores estimativas de casos não diagnosticados.
Fonte: modificado de IDF Diabetes Atlas 2019.

A SBD e a associação americana de diabetes recomendam diversos critérios clínicos para o diagnóstico de DM. Desde 1997, a concentração de glicose sanguínea em jejum é considerada o principal exame no diagnóstico de DM, e desde 2010 valores acima de 100mg/dL caracterizam o quadro diabético (SBD 2017-2018). Valores como a glicemia 2 horas após teste oral de tolerância a glicose (>200mg/dL) e de hemoglobina glicada (>6,5%) auxiliam na confirmação do diagnóstico (SBD 2017-2018).

O diagnóstico precoce e tratamento eficaz do DM são de extrema importância, pois aumentam as chances de prevenção das complicações que frequentemente acompanham o quadro diabético e são danosas ao paciente e custosas ao serviço de saúde. Complicações de pacientes diabéticos não diagnosticados frequentemente exigem maior dispêndio de dinheiro e recursos públicos quando comparados a diabéticos que recebem o tratamento e acompanhamento adequados (DALL *et al.,* 2012).

1.1.2 Diabetes *mellitus*, insulina e a resposta imunológica

O DM possui relação direta com efeitos deletérios à qualidade de vida de pacientes, uma vez que é frequentemente acompanhado por complicações microvasculares geradas por variações na osmolaridade e que levam a disfunção de vários órgãos e sistemas (IMAYAMA *et al.*, 2011).

Entre os sistemas afetados pelo desequilíbrio metabólico causado pelo diabetes em longo prazo, pode-se citar o sistema imunológico. O desenvolvimento de uma resposta inflamatória visa recuperar a homeostasia diante reconhecimento de uma ameaça, ao eliminar o agente lesivo e restituir o tecido lesado (KVIETYS & GRANGER, 2012). Logo, a inflamação compreende alterações hemodinâmicas e estruturais nas paredes dos vasos sanguíneos levando à formação do edema inflamatório e a migração de leucócitos para o foco da inflamação (KUMAR *et al.*, 2010).

O processo inflamatório é controlado por mediadores químicos com diferentes características e funções dentro da inflamação visando regular, por exemplo, o tipo, a amplitude e a duração da resposta inflamatória (BENSINGER & TONTONOZ, 2008). Isto ocorre através da ativação da expressão de moléculas de adesão tanto na superfície do endotélio quanto na membrana dos leucócitos (MULLER, 2009). É o caso do fator de necrose tumoral (*tumoral necrosis fator;* TNF)-α, citocina pró-inflamatória moduladora da permeabilidade vascular, da diferenciação e da ativação celular. Outras citocinas como as interleucinas (IL) IL-1α, IL-1β e IL-6 promovem aumento da expressão de moléculas de adesão e síntese de proteínas de fase aguda, enquanto citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o TGF-β atuam principalmente na supressão da resposta inflamatória e na reparação do tecido (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Diversos estudos relacionam o DM a riscos relacionados resultantes de alterações do sistema imunológico; desse modo, as reações inflamatórias seriam menos eficazes e permitiriam a proliferação do agente patológico ou a progressão da doença, associando pacientes diabéticos a maiores riscos de casos de infecções hospitalares, dos tratos urinário e pulmonar e infecções que afetam mucosas e tecidos moles (JOSHI *et al.*, 1999; PELEG *et al.*, 2006). Destas complicações, a sepse é considerada uma das principais causadoras de mortalidade e morbidade em pacientes diabéticos (MOUTZORI *et al.*, 2008).

Dados da literatura apresentam diversas possíveis causa para o aumento de susceptibilidade a infecções e agravamento das mesmas. Anjos-Valotta e colabores observaram em 2006 a redução da expressão de moléculas de adesão intercelular 1 (*intercellular adhesion molecule-1;* ICAM-1) e redução dos níveis de TNF-α em ratos diabéticos estimulados por injeção de rTNF-α. Níveis reduzidos da IL-1β e menor migração de células fagocíticas para focos inflamatórios em animais diabéticos também foram observados em outros estudos (DE OLIVEIRA MARTINS *et al*., 2006; DELAMAIRE *et al*., 1997).

Tais disparidades na resposta inflamatórias abrangem também as funções de fagócitos em animais diabéticos. Neutrófilos de ratos diabéticos apresentaram menor capacidade de fagocitose de leveduras de *Candida albicans* quando comparados a animais não-diabéticos (PANNEERSELVAM & GOVINDASAMY, 2003; FERRACINI *et al.*, 2010). Também foi observado que leucócitos de animais diabéticos apresentavam reduzida atividade fagocítica de partículas de zymozan e baixa produção de peróxido de hidrogênio tanto *in vivo* (ALBA-LOUREIRO *et al.*, 2006) quanto em cultura (COSTA-ROSA *et al.*, 1996), indicando menor atividade microbicida.

Resultados *in vivo* observados na literatura vêm evidenciando o envolvimento da carência relativa de insulina com a deficiência do sistema imunológico, desvinculando tal efeito de um resultado da hiperglicemia observada no quadro de diabetes: o tratamento de animais diabéticos com insulina restaurou significativamente alguns dos parâmetros inflamatórios observados reduzidos devido ao DM. A insulina restaurou os níveis de TNF-α a moléculas de adesão em camundongos diabéticos (ANJOS-VALOTTA *et al.*, 2006), a secreção de citocinas (TNF-α, IL-1β e IL-10) e expressão de moléculas de adesão em pulmão e linfonodos mesentéricos de ratos diabéticos durante inflamação aguda, assim como a migração de leucócitos (DE OLIVEIRA MARTINS *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2009) e as capacidades fagocíticas e microbicidas de fagócitos (ALBA-LOUREIRO *et al., 2006;* COSTA-ROSA *et al.*, 1996), entre outras características inflamatórias descritas como reduzidas pelos modelos de DM experimental (SUNAHARA *et al.*, 2014; NOLASCO *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2017).

Por outro lado, resultados *in vitro* de publicações anteriores deste grupo relacionam a insulina a um papel protetor, reduzindo níveis de TNF-α secretados por macrófagos alveolares de ratos diabéticos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS)

como resultado da modulação das cascatas de sinalização das quinases ativadas por mitose (*mitogen-activated protein kinases*; MAPK), com reduzida fosforilação das quinases reguladas por sinalização extracelular (*extracelular signal-regulated kinases*; ERK), da p38MAPK e da quinase de proteínas C (*protein kinase C*. PKC)-α (MARTINS *et al.*, 2008a), resultando em reduzida ativação inflamatória da ciclooxigenase-2 e da enzima óxido nítrico sintase induzida, modulando a inflamação como agente protetor em ambiente de sepse (MARTINS *et al.*, 2008b; TESSARO *et al.*, 2017; TESSARO *et al.*, 2019; AYALA *et al.*, 2019).

Diante destes dados, faz-se importante um melhor entendimento do efeito da insulina em diferentes tipos de inflamação promovidos pelo sistema imunológico diante variados tipos de agentes etiológicos. Para este trabalho, escolheu-se observar um modelo de inflamação crônica dos pulmões.

1.2 *Paracoccidioides brasiliensis*

As micoses sistêmicas são infecções de fungos cuja patogenicidade é geralmente pequena ou intrínseca e se veem aumentadas em pacientes que apresentem algum grau de comprometimento imunológico (MAGALHÃES *et al.*, 2012; SHIKANAI-YASUDE *et al.*, 2017).

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada por fungos do gênero *Paracoccidioides sp.* Resultados sobre a doença foram publicados pela primeira vez em 1908 por Adolpho Lutz no Instituto Bacteriológico de São Paulo, onde a existência de fungos dimórficos distintos do *Coccidioides immitis* foi encontrada em lesões bucais de pacientes (MOREIRA, 2008).

A classificação definitiva e criação do gênero *Paracoccidioides* dentro do reino *Fungi* se deu em 1930 após estudos comparativos que mostraram indiscutíveis diferenças entre os granulomas do *C. immitis* e os encontrados no Brasil e mantendo a classificação prévia da espécie *brasiliensis* (ALMEIDA, 1930). Mais recentemente, dados filogenéticos, características morfológicas e análises de recombinação classificaram a linhagem Pb01-like do *P. brasiliensis* como uma nova espécie do fungo, denominada *Paracoccidioides lutzii*. No entanto, a escassez de estudos

comparativos entre as variadas formas e manifestações clínicas da PCM mascara a incidência real de cada espécie filogenética (HAHN *et al.*, 2014).

P. brasiliensis (Pb) e *P. lutzii* apresentam dimorfismo termo-dependente, podendo ser encontrado à temperatura ambiente sob a forma de colônias brancas, micélios aderentes ao meio (MARQUES, 2003; THEODORO, 2005). Acredita-se que o fungo nesta forma habite o solo das regiões endêmicas, embora o isolamento deste a partir de amostras de solo seja bastante difícil e pouco reprodutível (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017). Quando cultivado em temperatura mais alta (35°C-37°C), desenvolve colônias chamadas cerebriformes de cor creme, visualizadas em microscópio como células arredondadas cercadas por múltiplos brotamentos (MOREIRA, 2008).

Uma vez no pulmão como resultado da inalação dos conídeos infectantes, o fungo sofre os efeitos da temperatura corporal do hospedeiro e, através de processos enzimáticos, converte-se da forma de micélio infectante para a forma parasitária de levedura (RESTREPO *et al.*, 2001; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017; **Figura 3**). Nesta fase, fatores como a virulência da cepa do fungo, a carga fúngica do inóculo inalado e a imunocompetência do hospedeiro ditarão o desenvolvimento da infecção em doença (BENARD *et al.,* 2001; FORTES *et al.*, 2011).

Várias classificações clínicas da PCM foram postuladas através dos anos, baseadas em diversos critérios. A classificação mais aceita é a publicada no *International Colloquium on Paracoccidioidomycosis* (FRANCO *et al.*, 1987) e abrange a amplitude da doença:

- Forma subclínica: conhecida como PCM-infecção, nesta forma o fungo foi contido com sucesso por células do sistema imunológico inato do hospedeiro, antes ou depois de se multiplicarem no foco de infecção, com destruição total ou parcial do fungo inalado, muitas vezes observada em forma assintomática;

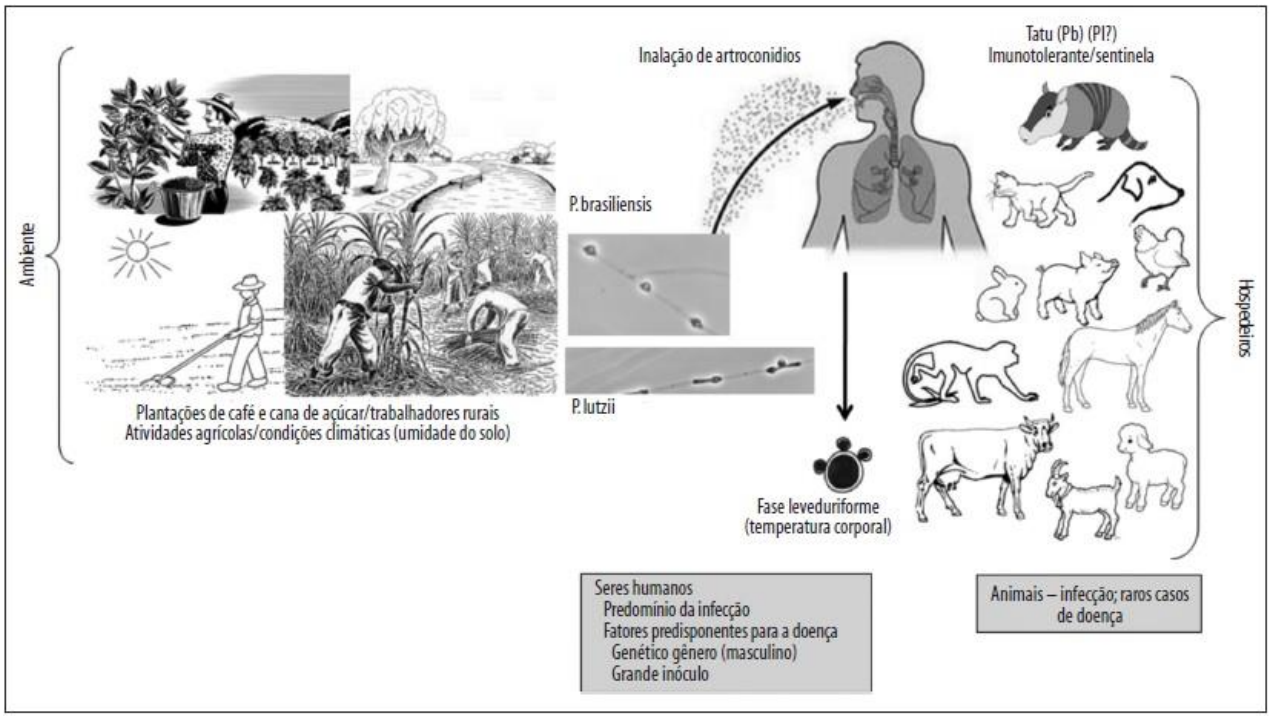


Figura 3. Ciclo da infecção por *P. brasiliensis* e *P. lutzii*.
Fonte: SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017.

- PCM aguda: Normalmente mais grave, ocorre quando as leveduras contidas no foco primário atravessam as superfícies mucocutâneas e parasita as células epiteliais, podendo assim disseminar-se pela via linfo-hematogênica e atingir tecidos mais profundos, gerando reações inflamatórias no hospedeiro que levam à formação de granulomas que visam bloquear e restringir a progressão do fungo no hospedeiro. Dependendo da disseminação do fungo, esta forma da doença pode evoluir para quadros de hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia e lesões cutâneas e nas mucosas;
- PCM crônica: compreendendo a maior parte dos casos, resulta da evolução do foco da infecção inicial ainda contendo fungos viáveis (chamado lesões quiescentes) e possui um curso de evolução lento, podendo ocorrer muitos anos após a infecção inicial e a sintomatologia pode se prolongar por meses e, em alguns casos, anos. O comprometimento dos pulmões está presente em 90% dos pacientes desta forma da doença;

- Forma residual: manifestações clínicas resultantes das cicatrizes e alterações anatômicas e funcionais mesmo após tratamento eficaz da PCM e se manifesta em comprometimento de tecidos como pulmonar, tegumentar e adrenal.

O fato de a PCM não ser listada como uma doença de notificação compulsória torna difícil a obtenção de informações acuradas sobre sua prevalência, e os cálculos de incidência e prevalência estão baseados em registros de surtos e inquéritos epidemiológicos. Estima-se que este fungo, e a doença, estão restritos à América Latina e que 80% dos casos sejam registrados no Brasil, onde se estima incidência anual que varia de 0,7 a 3,7 casos por 100 mil habitantes, dependendo da região estudada (MARTINEZ, 2017). É mais prevalente nos estados das regiões Sul e Sudeste, embora surtos tenham sido registrados em estados mais ao norte, como Rondônia (VIEIRA *et al.*, 2014). Coutinho e colaboradores constataram em estudo uma taxa de mortalidade por PCM de 1,45 caso/milhão de habitantes, sendo a mais alta causa de morte entre as micoses sistêmicas e a oitava maior por doenças infecciosas e parasitárias (COUTINHO *et al.*, 2002). Mais recentemente, aponta-se a PCM como responsável pelo maior número de internações dentre estas micoses (COUTINHO *et al.*, 2015).

Embora se distribua uniformemente entre crianças, a doença tem prevalência diferenciada de acordo com o gênero do paciente adulto. Estudos demonstraram que o acometimento de PCM entre adultos varia entre 10 e 15 casos em homens para cada caso em mulheres (revisto por SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017). Estudos mais antigos associam tal diferença ao envolvimento do estradiol na conversão do micélio em levedura ainda na fase subclínica da doença (RESTREPO *et al.*, 1984).

Por acometer principalmente homens em idade produtiva e trabalhadores rurais, a enfermidade causada pela PCM é um sério problema de saúde pública, com grande repercussão produtiva e econômica (MOREIRA, 2008), além de ser responsável pelo maior número de internações dentre as micoses sistêmicas (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

1.2.1 PCM e resposta imunológica

A organização de uma resposta inflamatória contra micoses sistêmicas no hospedeiro é multifatorial e faz uso de mecanismos inatos e adaptativos do sistema imunológico e a qualidade desta resposta imunológica determinará a severidade e o curso da doença (HUFFNAGLE & DEEPE, 2003). Barreiras naturais como pele e mucosas, componentes do sistema complemento e anticorpos naturais para opsonização dos patógenos para fagocitose por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, são exemplos de elementos da imunidade inata (MEDZHITOV & JANEWAY, 1997; ROMANI, 2011).

Dentre as células, macrófagos desempenham papel destacado tanto na imunidade inata quanto na adquirida, envolvidos em mecanismos contra infecções fúngicas como fagocitose do agente etiológico e regulação e produção de citocinas, modulando a resposta inflamatória (SMITH *et al.*, 1990; LOUIE *et al.*, 1994). Embora macrófagos também sejam peças importantes na apresentação antigênica para a produção e secreção de anticorpos, sabe-se que sua principal contribuição em casos de infecção fúngica é a fagocitose e destruição destes organismos (ROMANI, 2011).

A defesa à infecção do Pb ocorre de maneira semelhante: após inalação do inóculo, células dendríticas e macrófagos alveolares (MA) residentes entram em contato com as leveduras, tendo suas participações induzidas tanto pelo fungo quando pelas citocinas produzidas durante sua interação (CAVASSANI, 2011; KASHINO *et al*., 2000).

Uma resposta imunológica eficaz de perfil *T helper* (Th) do tipo 1, com secreção de citocinas ativadoras de macrófagos e linfócitos T (IFN-γ, IL-12, TNF-α), resulta em rápido controle da replicação do fungo e é comumente observada em indivíduos onde a infecção foi controlada ainda na fase subclínica, ou seja, sem desenvolver a doença (BENARD *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002). De modo semelhante, em indivíduos cuja infecção evoluiu para a doença crônica foi observado uma resposta Th1 deficiente e evolução para o padrão Th2 (IL-4, IL-13) gradativa juntamente à doença (CASTRO *et al.*, 2013).

Além de macrófagos, linfócitos TCD4+ e TCD8+ e células *natural killer* (NK) são fundamentais para uma resposta imunológica efetiva contra o Pb, e o sinergismo

entre citocinas Th1 secretadas pelos linfócitos TCD4+ possibilitando a ação citolítica do TCD8+ e células NK é o que confere proteção ao hospedeiro e resulta em menor disseminação do fungo (CALICH & BOLTTA, 2005; CHIARELLA, *et al*., 2007; ARRUDA *et al*., 2007).

Entre os receptores presentes na membrana celular de células fagocíticas capazes de interagir com as moléculas de superfície do fungo, destacam-se os receptores semelhantes a Toll (*Toll-like Receptors*; TLR), capazes de reconhecer porções moleculares de patógenos e produzirem sinais que ativam os eventos da resposta imunológica inata visando a destruição do agente (HERTZOG, 2008). No entanto, modelos experimentais descrevem o uso do TLR-2 do hospedeiro pelo Pb como um mecanismo de escape para penetrar os macrófagos do hospedeiro e garantir sua sobrevivência (CALICH *et al.*, 2008).

Uma modulação apropriada da resposta imunológica resulta na resolução do foco primário da inflamação, enquanto uma resposta inapropriada ou debilitada frequentemente leva a complicações relacionadas à inflamação crônica. Por este motivo, é extremamente importante o estudo da regulação da sinalização inflamatória.

1.3 Modelos experimentais de DM e PCM

O desenvolvimento de modelos para indução experimental de DM é de fundamental importância para melhor compreensão de sua patogênese e de seus efeitos sobre o organismo. Como vantagens da utilização de estudos experimentais realizados em animais, pode-se citar a eliminação de fatores que de outro modo limitariam fortemente os estudos clínicos, como, por exemplo, as variáveis étnicas, geográficas, sociais, dietéticas e diferenças de gênero e idade (KUMAR *et al.*, 2012).

São diversos os modelos animais desenvolvidos e padronizados para o estudo do diabetes. Entre eles, o uso de camundongos apresenta diversas vantagens: tamanho reduzido que permite o trabalho com diversos grupos simultaneamente sem a utilização de grandes espaços e reduzidos gastos com o projeto. No mais, tanto ratos quanto camundongos apresentam várias características clínicas, histopatológicas e laboratoriais semelhantes às do ser humano diabético, além de fatores comportamentais frequentemente observados em humanos diabéticos, como

a polidipsia, polifagia e aumentos nos débitos urinários, além de alterações na pelagem e queda dos pelos (LERCO *et al.*, 2003; MORDES *et al.*, 2004).

Várias técnicas de indução laboratorial de DM1 já foram descritas em literatura, desde manipulação genética até remoção cirúrgica total ou parcial das massas de células β ou a sua destruição química por agentes farmacológicos. O uso de aloxana e estreptozotocina, ambos análogos citotóxicos da glicose e seletivos para as células β pancreáticas, se mostra bastante conveniente por exibir todos os eventos bioquímicos, morfológicos e hormonais relacionados à indução do estado diabetogênico (LERCO *et al.*, 2003; SZKUDELSKI, 2001), portanto são vastamente utilizados para investigações experimentais do DM.

A aloxana (2,4,5,6-tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracil) é um derivado sintético de pirimidina originalmente sintetizada em 1838. Dunn e McLetchie demonstraram em 1943 a capacidade da aloxana de induzir diabetes em ratos através da necrose de células produtoras de insulina. Desde então a aloxana vem sendo amplamente utilizada para indução do DM1, tendo sua dose ajustada de acordo com a espécie animal, assim como seu estado nutricional e a via de administração utilizada (SZKUDELSKI, 2001). A via endovenosa é a mais utilizada devido a maior velocidade de infusão da droga por esta via, visto que a aloxana é instável, contando com meia-vida de apenas 90 segundos, e efeitos diabetogênicos não foram observados em casos de administração pela via oral (MORDES *et al.*, 2004).

A ação citotóxica da aloxana se inicia com o acúmulo do fármaco no interior das células β pancreáticas e é mediada pelas espécies reativas de oxigênio geradas por este na presença de tióis intracelulares, causando alterações estruturais e culminando com a morte celular por necrose. Possivelmente devido a diferenças entre mecanismos de captação de glicose entre roedores e humanos, efeitos citotóxicos da aloxana em humanos não foram observados (ROHILLA & ALI, 2012).

Os mecanismos diabetogênicos da aloxana foram extensivamente estudados e caracterizados. Lenzen em 2008 descreveu os efeitos diabetogênicos em quatro fases de acordo com a dose-resposta dos níveis glicêmicos em função do tempo de administração:

- Cerca de 30 minutos após a indução há hipoglicemia curta resultante de estimulação da secreção de insulina causado pela redução do consumo de glicose;

- Hiperglicemia de cerca de 2-4 horas causada pela inibição da secreção de insulina pelas células pancreáticas que se apresentam em diversos estágios de alteração morfológica;
- Hipoglicemia grave causada pela liberação de grânulos de insulina na corrente sanguínea resultante da destruição da membrana celular das células β. A partir deste estágio, os danos são irreversíveis;
- Fase de hiperglicemia diabética permanente após degranulação e destruição das células β, observada entre 12 e 48 horas após administração. Debris celulares serão removidos por macrófagos *scavengers* não ativados.

Através de mecanismos semelhantes aos da aloxana, mediados por geração de espécies reativas de oxigênio e alquilação de estruturas, a estreptozotocina também é capaz de causar DM1 por necrose de células produtoras de insulina (LENZEN, 2008). Estudos envolvendo estes fármacos apontaram ambas aloxana e estreptozotocina como capazes de promover toxicidade em vários tecidos do organismo; no entanto, a estreptozotocina, mesmo em doses subdiabetogênicas, foi observada como tóxica para órgãos linfoides como baço e timo (GAULTON *et al.*, 1985; WELLHAUSEN, 1986). Estas observações pautam a escolha da aloxana como agente diabetogênico para a realização deste estudo, pois exclui a possível interferência dos efeitos da estreptozotocina no sistema imunológico.

O estudo dos fatores patológicos de micoses sistêmicas através dos anos também levou ao estabelecimento de diversos modelos animais. No caso da PCM, tentativas de isolamento do fungo em animais selvagens e domésticos são realizadas para o monitoramento ecoepidemiológico da presença do fungo em regiões de estudo, enquanto animais de laboratório como ratos, camundongos e hamsters são utilizados para infecções experimentais. A técnica de indução experimental de PCM utilizado neste trabalho segue o modelo previamente estabelecido por Defaveri e colaboradores em 1982, onde descreveu a injeção intratraqueal da suspensão de leveduras do Pb em camundongos para avaliação da patogênese e evolução da PCM e a relevância das respostas celulares e humorais. Em seu estudo, a via intratraqueal se mostrou mais eficiente do que a via intranasal ao apresentar maior reprodutibilidade e chegada do fungo nos alvéolos pulmonares (DEFAVERI *et al.*, 1982).

Com o objetivo de evidenciar a susceptibilidade genética ao Pb, Calich e colaboradores (1985) conduziram experimentos em grupos isogênicos de nove linhagens de camundongos. Animais da linhagem B10D2/oSn foram identificados como mais sensíveis ao Pb, enquanto camundongos A/SN foram consideradosos mais resistentes. A susceptibilidade da linhagem C57Bl/10 foi determinada como intermediária, apresentando média de sobrevivência de 149 dias após a inoculação (CALICH *et al.*, 1985). Por este motivo, escolhemos linhagem similar de camundongos, de modo que a susceptibilidade ou resistência genética à infecção não fosse mais uma variável a ser considerada no estudo.

1.4 Justificativa

O DM caracteriza uma doença de imenso impacto mundial no âmbito social, produtivo e econômico. Embora possua uma incidência menor que o DM2, o DM1 é uma doença de enorme importância: compreendendo de 7% a 12% do número total de pacientes diabéticos, dependendo da região estudada (IDF, 2017), o DM1 está bastante relacionado com as complicações em longo prazo associadas ao quadro diabético (SBD 2017-2018). Entre os tipos de diabetes, é o que teve o crescimento de sua incidência mais acentuado, principalmente em crianças e adolescentes, e, diferente do DM2, estratégias de prevenção não são viáveis. O Brasil ocupa o 4° lugar entre os países com maior número total de diabéticos no mundo e passa a ocupar o 3° lugar quando considerados apenas jovens pacientes com DM1 (IDF, 2017). Desse modo, a importância de estudos voltados para a elucidação dos mecanismos que regem complicações do DM1 é inegável.

Estudos de nosso grupo vêm mostrando os efeitos observados na ausência de insulina que caracteriza do DM1 e na reposição desta sobre inflamações causadas por diferentes estímulos, como LPS *in vitro* (MARTINS *et al.*, 2008a; MARTINS *et al.*, 2008b) e inflamação aguda induzida por LPS *in vivo* (MARTINS *et al.*, 2010a; MARTINS *et al.*, 2010b), peritonite causada por *Staphylococcus aureus* (DE SOUZA *et al.*, 2019) e em inflamação alérgica de vias aéreas (FERREIRA *et al.*, 2017).

Também de grande importância, a PCM é endêmica em toda a América Latina, com grande prevalência em território brasileiro. Devido ao alto potencial incapacitante

e aos índices de mortalidade e debilidade relacionados a ela, representa um importante problema de Saúde Pública no Brasil, com grande potencial de ser agravado pela debilidade imunológica já vista em pacientes do DM1. Portanto, ampliar o conhecimento existente sobre a modulação da resposta imunológica e inflamatória geradas em resposta à infecção por Pb em pacientes DM1 é de fundamental relevância científica.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da insulina em modelo murino de de micose pulmonar causada por *P. brasiliensis* na presença ou ausência de diabetes *mellitus*, analisando as alterações de populações de células e os mecanismos moleculares e intracelulares da resposta inflamatória no pulmão e a atividade fagocítica e microbicida dos macrófagos alveolares.

2.1 Objetivos específicos

Para tanto foram avaliados:

a) níveis séricos de insulina e as concentrações de citocinas (IL-6, IL-10, IL-12, TNF-α, IFN-γ e MCP-1) e quimiocina (CINC-1) nos homogenatos de órgãos;
b) fenotipagem de células inflamatórias obtidas de pulmão e baço;
c) unidades formadoras de colônia do Pb no pulmão;
d) expressão total e fosforilação das proteínas envolvidas na sinalização intracelular (p38MAPK, ERK 1 e 2, PKC-α, JNK, pAkt e Ikb-α) e expressão do receptor TLR-2 em pulmão;
e) expressão de RNAm de citocinas de interesse na vigência da inflamação;
f) expressão de molécula de adesão celular nos vasos pulmonares;
g) índice fagocítico e a atividade microbicida contra *P. brasiliensis* dos MA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Este estudo utilizou 164 camundongos machos da linhagem C57BL/6, pesando entre 18 e 22g e entre 5 e 6 semanas de idade, todos procedentes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade São Paulo. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA-FCF/USP-512). Estudos prévios utilizando modelo de diabetes induzido por aloxana e de infecção intratraqueal por Pb foram realizados nesta linhagem, facilitando o entendimento dos resultados (CASAGRANDE *et al.*, 2018; SILVANA DOS SANTOS *et al.*, 2011).

3.2 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos em seis grupos de acordo com o quadro a seguir:

		Descrição		
	Grupos	**Dia 0**	**Dia 10**	**Dias 43-55**
CONTROLES	Controle sham	Salina	Salina	-
	Controle Pb	Salina	*P. brasiliensis*	-
	Controle Pb+i	Salina	*P. brasiliensis*	Insulina
DIABÉTICOS	Diabético sham	Aloxana	Salina	-
	Diabético Pb	Aloxana	*P. brasiliensis*	-
	Diabético Pb+i	Aloxana	*P. brasiliensis*	Insulina

Figura 4. Quadro de distribuição de grupos do experimento. Pb representando *Paracoccidioides brasiliensis* e Pb+i representando *Paracoccidioides brasiliensis* em conjunto com o tratamento de insulina.

Os camundongos foram mantidos em biotério acondicionado, em gaiolas coletivas, contendo no máximo cinco animais (três animais, se diabéticos), com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de 22ºC e com suprimentos de água e alimento disponíveis *ad libitum*. Após eutanásia e coleta, as carcaças são acondicionadas em saco plástico branco leitoso para descarte de lixo infectado, não perfuro cortante. O descarte ocorre segundo as normas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

O protocolo experimental seguindo o modelo de indução da diabetes e de infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* totaliza 55 dias, de acordo com o esquema na **Figura 5**:

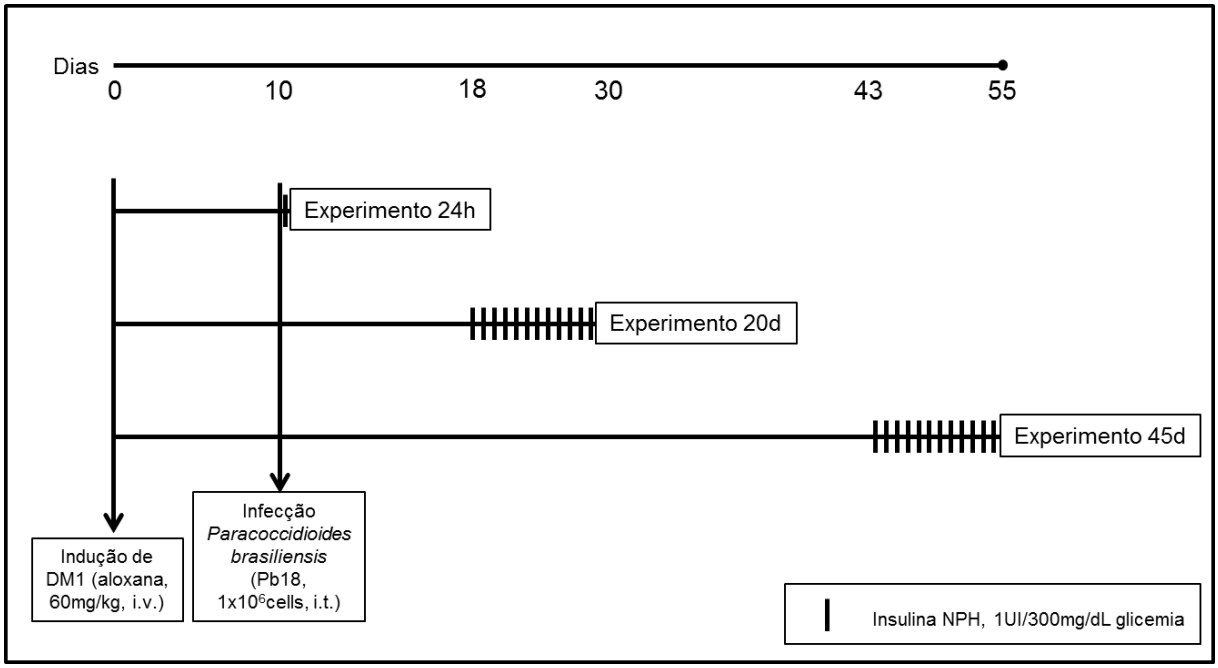


Figura 5. Modelo de micose pulmonar em animais diabéticos: Injeção intratraqueal de *P. brasiliensis*.

3.3 Indução de diabetes *mellitus*

Para indução do DM, os animais foram deixados em jejum alimentar de 12 horas, tendo acesso à água o tempo todo, antes de receberem a injeção endovenosa de aloxana (60 mg/kg de animal) dissolvida em solução de NaOH 0,9% estéril (100µL/animal). Este tempo de jejum é necessário para melhor eficiência da ação da

aloxana, pois tempos menores resultam em morte prematura do animal. Animais dos grupos controle receberam volume equivalente de solução salina, pela mesma via (SPILLER *et. al.*, 2012; BELLA *et al.*, 2017).

A glicemia foi determinada no décimo dia do protocolo com uso de monitor de glicose (Advantage, Lilly), através de amostras de sangue obtidas da extremidade distal da cauda dos animais. Somente foram considerados diabéticos animais com glicemia superior a 300 mg/dL (16,6 mM).

3.4 Cultivo do *Paracoccidioides brasiliensis*

Neste projeto foi realizado um protocolo de PCM padronizado previamente pelo laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, FCF-USP. Assim, este projeto tem a colaboração do Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida.

O isolado virulento Pb18 (KASHINO *et al.*, 2000; SILVANA DOS SANTOS *et al.*, 2011) do *P. brasiliensis* foi mantida a 37ºC em meio semi-sólido Sabouraud-dextrose-ágar (MERCK, Alemanha), com repiques semanais. Para manter as características de virulência do Pb18, utilizou-se sempre o terceiro repique a partir de colônias isoladas em animais.

Para a preparação do inóculo, colônias de leveduras foram coletadas em 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate-buffered saline;* PBS) em tubo falcon, seguida de vortexação por 10 segundos e centrifugação por 1 minuto a 3.000 RPM. O sobrenadante contendo células isoladas ou com poucos brotamentos foi coletado com auxílio de seringa de insulina para outro tubo falcon e posteriormente realizou-se a filtragem com auxílio do *cell strainer* 40nm.

A etapa de filtração deve ser repetida 3 vezes. Em seguida realizou-se a padronização dos inóculos através de contador hematimétrico de Neubauer.

3.5 Infecção Intratraqueal

Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal com cloridrato de ketamina (90mg/kg) associado ao cloridrato de xilazina (10mg/kg). Após completo estado de anestesia evidenciado pela ausência de resposta a estímulos visuais e

motores, os animais foram imobilizados e infectados por injeção intratraqueal (i.t.) com suspensão contendo $1x10^6$ leveduras viáveis de Pb contidas em 30µL de PBS. Após inoculação, a incisão foi suturada e os animais colocados sob uma fonte moderada de calor para controlar a hipotermia transitória produzida pela anestesia, até acordarem.

3.6. Tratamento com insulina

Animais diabéticos e controle receberam doses de 1UI de insulina NPH (*neural protamine Hagedorn insulin*; NPH, Eli Lilly, São Paulo) para cada 300mg/dL de glicemia (SPILLER *et al.*, 2012), por via subcutânea, no período da tarde (6p.m.), durante 12 dias antes da eutanásia (DiPETTA *et al.*, 2011).

Os animais eutanasiados 24h após a infecção receberam uma dose de insulina um dia antes da eutanásia. Os níveis glicêmicos e insulinêmicos foram determinados antes do tratamento dos animais com insulina e momentos antes da eutanásia (CASAGRANDE *et al.*, 2018).

3.7 Monitoramento de parâmetros do DM1

A fim de avaliar os parâmetros característicos do estabelecimento do modelo de deficiência relativa de insulina, assim como os valores para o cálculo da dosagem de insulina, a concentração de glicose no sangue foi aferida por glicosímetro eletrônico da *Accu-check* com sangue total obtido de punção da ponta das caudas dos animais.

A variação de massa corpórea foi avaliada em balança (Adventurer Pro, Ohaus Corporation, USA). As pesagens foram realizadas nos dias zero, antes do jejum, no 10º dia após a indução de diabetes e no 55º dia (45 dias após da indução da infecção por Pb). Resultados obtidos subtraindo-se o peso inicial dos camundongos do peso final.

Os consumos de água e ração foram determinados pelas variações de peso e volume de ração e água, respectivamente, divididas pela quantidade de animais nas gaiolas por dia de avaliação.

3.8 Eutanásia e coleta dos órgãos

Eutanásia dos animais foi realizada por overdose de anestésicos seguida por hipovolemia causada pela coleta do sangue arterial.

Em fluxo laminar limpo, foi realizada a coleta anti-séptica dos pulmões, baços, fígado e sangue dos animais com materiais estéreis. Fragmentos correspondentes dos órgãos foram acondicionados apropriadamente e, no futuro, destinados aos preparos de amostras para diferentes análises.

3.9 Determinação do CFU tecidual

Fragmentos de pulmão de cada animal foram macerados em 1mL de PBS estéril gelado.

O sobrenadante do macerado (100µL) foi plaqueado em meio semi-sólido BHI (*Brain Heart Infusion* – KASV) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB; Vitrocell). As placas foram incubadas em estufa a 37°C e contagem das colônias foi realizada após duas semanas de incubação. Resultados das médias das duplicatas são expressos em log.

3.10 Determinação da expressão de moléculas de superfície

Para a análise do perfil de populações leucocitárias no pulmão, os macerados obtidos de baços e pulmões passaram por *cell strainer* (70nm) e o filtrado foi centrifugado. O pellet formado foi ressuspenso em PBS suplementado com 5% de SFB. A lise das hemácias foi realizada após centrifugação com a adição de 1mL de água MiliQ gelada e, depois de rápida agitação, adição de mais 5mL de PBS+SFB 5%.

Após contagem e padronização das amostras em hemocitômetro, células foram marcadas de acordo com a estratégia de leitura e caracterização do tipo celular pelas moléculas de superfície apresentadas. A análise foi realizada por citometria de fluxo (*Fluorescence-activated cell sorting;* FACS) a partir da seleção da população de células que estão relacionadas com o desenvolvimento da resposta inflamatória à

infecção sistêmica. Para tanto, utilizou-se anticorpos para marcadores de superfície específicos conjugados a fluorocromos aloficocianina, isotianato de fluoresceína ou ficoeritrina (*allophycocyanin* (APC), *fluorescein isothiocyanate* (FITC) e *phycoerythrin* (PE), respectivamente), de acordo com o quadro na **Figura 6.**

Anticorpo	Clone	Fluorocromo	Empresa
CD4	RM4-4	FITC	BD Pharminger (#553055)
CD8a	53-6.7	PE	BD Pharminger (#561095)
CD3	17-A2	APC	BD Pharminger (#565643)
CD11c	N418	FITC	ThermoFisher (#11-0114-82)
MHC-II	AF6-120.1	APC	ThermoFisher (#17-5320-82)
CD80	16-10A1	PE	BD Pharminger (#553766)
CD11b	M1/70	FITC	BD Pharminger (#553310)
GR1	RB6-8C5	APC	BD Pharminger (#553129)
F4/80	T45-2342	PE	BD Pharminger (#565410)
CD19	MB19.1	APC	BD Pharminger (#557655)
NK1.1	1D3	PE	BD Pharminger (#557399)

Figura 6. Quadro dos painéis de anticorpos utilizados na FACS.

3.10.1 Estratégia de análise

A estratégia de seleção das populações celulares dos macerados de órgãos foi realizada por citometria de fluxo no aparelho BD FACS Canto II e a análise foi realizada no software FlowJo. Na Figura 7, pode-se obervar o *dot plot* onde o eixo das abcissas corresponde ao parâmetro *forward scatter* (FSC), ou seja, o tamanho celular, enquanto o eixo das ordenadas representa *side scatter* (SSC), a complexidade destas. Foram circundados os *singlets* para exclusão de debris celulares e leituras duplas. Das células selecionadas, as porcentagens foram obtidas através da fluorescência referente à marcação.

No exemplo a seguir (Figura 7), estuda-se as populações de uma amostra de baço onde a marcação por FITC representa a expressão de CD11c, a marcação por APC representa a expressão de MHC-II e a marcação por PE representa a expressão de CD80.

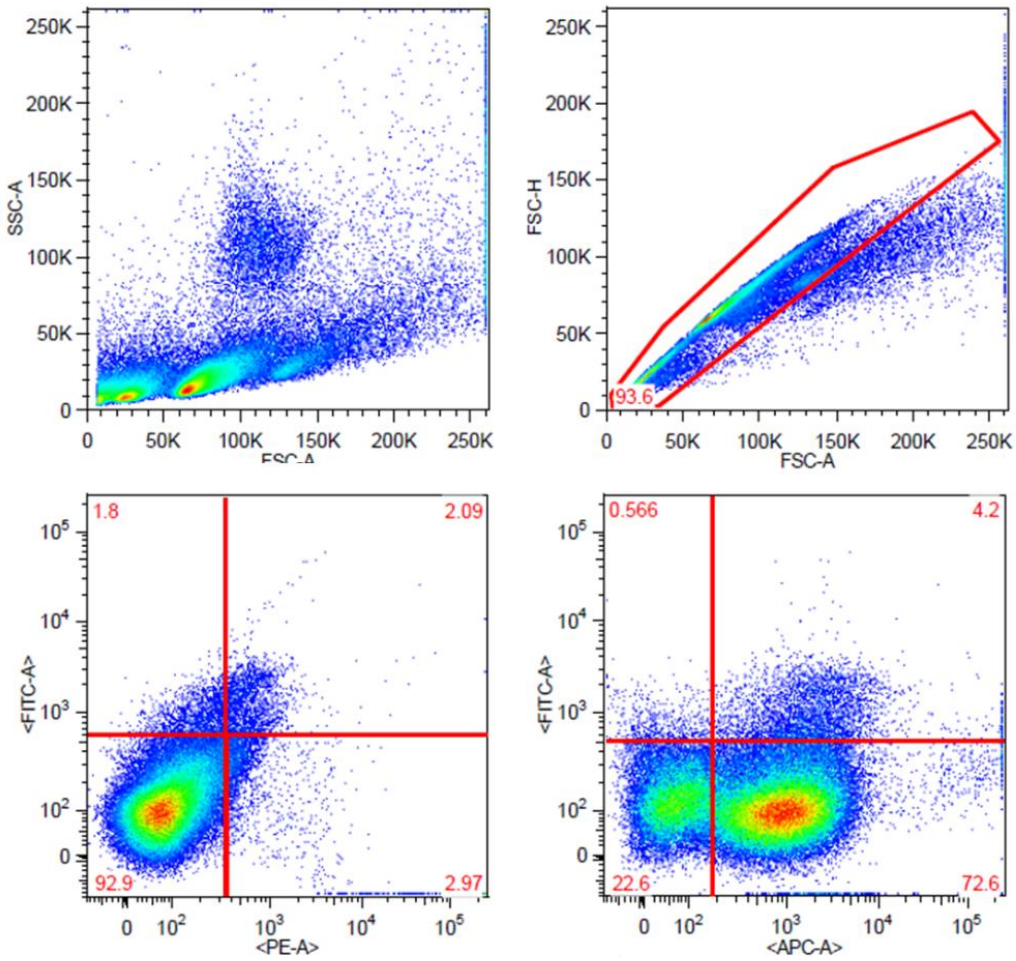


Figura 7. Estratégia de seleção de populações de leucócitos por FACS.

3.11 Quantificação de citocinas e quimiocina

Os sobrenadantes dos órgãos macerados filtrados foram aliquotados e acondicionados a -80°C até o momento da análise de citocinas. A concentração das proteínas totais das amostras foi quantificada com uso do kit BCA (*bicinchoninic acid*, Pierce, Rockford, IL, USA) de acordo com as especificações do fabricante.

As citocinas IL-6, IL-10, MCP-1, TNF-α, IFN-γ e IL-12p70 foram quantificadas com uso do *Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit* (BD, Biosciences). Leituras foram realizadas de acordo com instruções do fabricante e a mensuração foi por citometria de fluxo (FACSCanto I, BD Biosciences) e os dados analisados através do software especificado (*BD CBA Software*).

A mensuração da quimiocina CINC-1 (*cytokine-induced neutrophil chemoattractant*) foi realizada nos sobrenadantes por ensaios de enzima-imunoensaio (ELISA), utilizando-se kits comerciais (R & D Systems, Inc., Mineapolis, MN, USA).

3.12 Quantificação de insulina

A concentração sérica de insulina fora determinada em amostras de soro obtidas por centrifugação do sangue coletado pela via intracardíaca e armazenadas a -70ºC. Para a quantificação foi utilizado *mouse insulin enzyme immunoassay Kit* (SPIbio, Massy Cedex, France) que se baseia na capacidade da insulina ou presentes nas amostras de soro em competir com a insulina de camundongo ligada a acetilcolinesterase ou fosfatase alcalina (traçador), pela ligação ao anticorpo específico (reação imunológica), respectivamente. A leitura foi realizada a 414nm e os resultados foram expressos em pg/mL.

3.13 Análise da expressão de mRNA

Para extração do RNA das amostras de pulmão, fragmentos de pulmão foram macerados 1mL de trizol (Invitrogen – CA, USA), incubados a 65°C por 10min e adicionadas de 200µL de clorofórmio (Synth – SP, Brasil) para extração por afinidade polar.

Após agitação e incubação (5 min em temperatura ambiente), amostras foram centrifugadas a 14000RPM por 15min, de onde o sobrenadante superior contendo o RNA foi coletado. A precipitação foi feita com a adição de 500µL de isopropanol (Sigma – MO, USA). As amostras foram centrifugadas novamente (14000RPM, 5 minutos, 4ºC) e o sobrenadante descartado. O pellet formado teve o álcool remanescente evaporado em temperatura ambiente em fluxo laminar. O pellet contendo RNA foi ressuspenso em água DPEC livre de RNAse (Fermentas – Lituânia) e incubado a 60°C por 10 minutos. O tratamento para remoção de DNA genômico foi realizado com incubação com tampão contendo cloreto de magnésio, DNAse I e água DEPC por 1h a 37ºC (1µL para cada 10µL da amostra).

A quantificação do RNA foi realizada por NanoDrop (UniSize ND1000), o RNA lido em absorbância de 260nm, e sua integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose (Amersham Biosciences). Amostras do RNA foram diluídas em tampão de RNA e a corrida eletroforética foi realizada por 20 minutos em 100V.

Em gelo, as amostras para síntese do cDNA foram preparadas (RNA + água DEPC + 1µL de OligodT) e calculadas de modo a conter 1200ng de RNA em 12µL. A preparação foi incubada a 65ºC por 5 minutos. Depois, em cada tubo foi adicionado 4µL do tampão de reação (concentrado 4x), 1µL do inibidor de RNAse, 2µL de dNTPmix (10mM) e 1µL de RevertAid M-MuLV RT (200U/µL), totalizando 20µL em cada tubo. Os tubos foram agitados gentilmente e incubados por 60 minutos a 42ºC, depois 5 minutos a 70ºC.

A quantificação das expressões foi realizada por sistema de detecção de PCR em tempo real. Em poços de placas apropriadas, foram adicionados 5µL de SYBR Green qPCR, 1µL dos primers utilizados, 2µL de água DEPC e 2µL das amostras. Os ciclos termais foram determinados de acordo com instruções do fabricante. Utilizou-se o Sistema de PCR em Tempo Real para detectar e quantificar a amplificação dos genes estudados. A expressão relativa foi determinada usando-se o limiar comparativo e a calculada de acordo como grupo controle (método ΔΔCt), e usamos o gene de HPRT como controle endógeno (SCHMITTGEN *et al.*, 2008).

Os primers, obtidos da empresa Exxtend, foram:

- para **il6**: 5’TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC3’ e 5’TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC3’;
- para **il10**: 5’GCTCTTACTGACTGGCATGAG3’ e 5’CGCAGCTCTAGGAGCATGTG3’;
- para **il4**: 5’GGTCTCAACCCCCAGCTAGT3’ e 5’GCCGATGATCTCTCTCAAGTGAT3’;
- para **stat1**:5’GACTTCAGACACAGAAATCAACTC3’ e 5’TTGACAAAGACCACGCCTT3’;
- para **tgfβ**: 5’ATTGCTTCAGCTCCACACAG3’ e 5’TGTTGGTTGTAGAGGGCAAG3’
- para **tnfα**: 5’CCCTCACACTCAGATCATCTTCT3’ e 5’GCTACGACGTGGGCTACAG3’;
- para **il12**: 5’TGGTTTGCCATCGTTTTGCTG3’ e 5’ACAGGTGAGGTTCACTGTTTCT3’;
- para **hprt**: 5’AGCAGGTCAGCAAAGAACT3’ e 5’CCTCATGGACTGATTATGGACA3’.

3.14 Análise de molécula de adesão por imunohistoquímica

Após coleta, o lado direito superior do pulmão foi lavado com PBS estéril e acondicionado imerso em solução de 10% de formaldeído para fixação, então desidratado em soluções de concentração crescente de etanol (70% a 100%), depois incluídos em bloco de parafina. Os cortes transversais de 10µm de espessura foram recolhidos e fixados em lâminas silanizadas.

Para coloração, lâminas foram desparafinizadas por dois banhos em xilol (5 minutos cada) e reidratadas em banhos de 3 minutos em concentrações decrescentes de etanol (100%, 100%, 95% e 80%).

O procedimento de imunohistoquímica foi realizado com o kit *EnVision FLEX+* (K8002, Dako, Dinamarca), seguindo o protocolo e instruções do fabricante. Em suma, lâminas com cortes reidratados foram incubadas em tampão fornecido pelo kit para recuperação dos antígenos dos epítopos, dois minutos em microondas. Após lavagem, cortes foram incubados com tampão de bloqueio para peroxidase por 10 minutos. Em seguida, cortes foram incubados por 1 hora em solução de BSA (3% em PBS com 0,3% de Tween20) para bloqueio de ligações inespecíficas. O procedimento a partir deste ponto ocorre em câmara úmida.

Em seguida, cortes foram incubados em solução de anticorpos anti-VCAM-1 (Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:50), *overnight* a 4ºC. Após duas lavagens de 3 minutos cada, cortes foram incubados por 1 hora a 37ºC em anticorpo secundário conjugado à HRP (*Horseradish Peroxidase*).

A expressão de moléculas de adesão foi avaliada pela coloração resultante da reação da peroxidase presente nos anticorpos secundários com a 3,3 diaminobenzidina (DAB). Após lavagens do anticorpo secundário, cortes foram incubados por 8 minutos com o tampão contendo o cromógeno.

Lâminas foram lavadas, montadas usando resina sintética (*Entellan,* MERK) e observadas em microscópio óptico, onde 5 fotos foram tiradas de cada amostra, cada uma contendo, no mínimo, um vaso sanguíneo. As fotos foram analisadas com ajuda do software ImageJ e o resultado expresso de acordo com a densidade do cromógeno encontrado nas paredes dos vasos (RODRIGUES *et al.*, 2010).

3.15 Expressão de proteínas por *Western blot*

Fragmentos dos pulmões foram macerados (macerador de tecidos Potter-Elvhjem) separadamente em tampão RIPA (300µL de tampão/5mg de órgão) aditivado com coquetéis inibidores de fosfatase e protease (Ortovanadato de Sódio 1M, utilizado 1:100 e Pirofosfato de Sódio 1M, utilizado 1:200), seguido de centrifugação (12000RPM/20minutos). O sobrenadante foi aliquotado e encaminhado para análise.

Para a expressão das das moléculas envolvidas na sinalização intracelular (p38MAPK, ERK 1 e 2, PKC-α, JNK, pAkt e Ikb-α) e a expressão do receptor TLR-2 no pulmão, os ensaios foram realizados por eletroforese em gel de policrilamida a 10% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1%, conforme orientação do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Às amostras foi adicionado tampão Tris-HCl 62,5 M, contendo glicerol 10%; SDS 2%; β-mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,001%. Estas foram incubadas em água fervente por 5 min e, alíquotas de 25 uL, aplicadas no gel de policrilamida-SDS. A separação das proteínas foi feita em cuba de eletroforese (tampão de corrida: Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,5%) a 125V por aproximadamente 90 minutos. Solução padrão de proteínas (*Spectra multicolor Broad Range Protein Ladder*, ThermoFisher) foi usada como referência do peso molecular. As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%; metanol 20%), a 155 mA (50V) durante 1hora.

Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi colocada em solução de leite desnatado (5%) em tampão Tris-salina com 0,1% de Tween20 (TBST) durante 1 hora para minimizar as ligações específicas, incubadas com anticorpo primário durante 15-18 horas, sob agitação à temperatura ambiente, e com anticorpo secundário durante 2 horas. Previamente a cada etapa de incubação a membrana foi lavada com TBST durante 5 minutos por 3 vezes consecutivas. A revelação foi realizada utilizando ECL (*enhanced chemiluminescence* - ECL; Amersham, Arlington Heights, IL). Nas mesmas membranas foram realizadas determinação das proteínas constitutivas β-actina e Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como controles de corrida e transferência. A relação dos anticorpos utilizados se encontra na **Figura 8**.

As densidades relativas das bandas foram determinadas por meio de análise densitométrica utilizando o software ImageStudio (AYALA *et al.*, 2019).

Anticorpo	Empresa	Diluição
PKC-α-β	Cell Signaling (#2056)	1:1000 em TBS, 5% BSA, 0,1% Tween20
p38 MAPK	Cell Signaling (#9212)	1:1000 em TBS, 5% BSA, 0,1% Tween20
p-p38 MAPK	Cell Signaling (#4511)	1:1000 em TBS, 5% BSA, 0,1% Tween20
ERK1/2 (p42/p44)	Cell Signaling (#9102)	1:1000 em TBS, 5% BSA, 0,1% Tween20
p-ERK ½	Cell Signaling (#9101)	1:1000 em TBS, 5% BSA, 0,1% Tween20
iκB-α	Cell Signaling (#9242)	1:1000 em TBS, 5% BSA, 0,1% Tween20
pAkt (Sr473)	Cell Signaling (#4060)	1:1000 em TBS, 5% BSA, 0,1% Tween20
JNK	Cell Signaling (#9252)	1:1000 em TBS, 5% BSA, 0,1% Tween20
TLR-2	Cell Signaling (#13744)	1:1000 em TBS, 5% leite em pó desnatado, 0,1% Tween20
Anti-Rabbit HRP	Sigma-Aldrich (#A0545)	1:80000 em TBS, 5% leite em pó desnatado, 0,1% Tween20
B-actina	Sigma-Aldrich (#A5316)	1:40000 em TBS, 5% leite em pó desnatado, 0,1% Tween20
GAPDH	Sigma-Aldrich (#G9545)	1:50000 em TBS, 5% leite em pó desnatado, 0,1% Tween20

Figura 8. Quadro de anticorpos utilizados para análises por Western blot.

3.16 Obtenção dos macrófagos alveolares e cultura

Os macrófagos alveolares foram obtidos por lavagem broncoalveolar *ex vivo* conforme descrito anteriormente (SEREZANI *et al.*, 2005), centrifugados a 259xG/10min e ressuspensos em meio RPMI-1640. Volumes do lavado contendo $5x10^5$ MA foram distribuídos sobre lamínulas em placas de 24 poços e incubados em estufa a 37ºC, 5% CO_2 para adesão. Após uma hora, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS pré-aquecido e incubadas com meio RPMI-1640 + SFB 2% em estufa 37ºC, 5% CO_2 por 18h.

3.17 Ensaio de atividade fagocítica

Os macrófagos em cultura foram lavados para remover as células não aderidas e cultivados com meio de cultura RPMI contendo SFB 10%, 100 µg/mL penicilina, 100 ug/mL gentamicina e 100µg/mL estreptomicina na presença ou na ausência de insulina (insulina de pâncreas bovino, 0,005% em meio; Sigma) (FERRACINI *et al.,* 2010).

Para o ensaio fagocítico, a cultura foi infectada com células de levedura Pb18 a uma proporção de macrófagos / levedura de 1:1. A cultura infectada foi mantida por 4, 12 e 24h a 37°C em 5% CO_2 para permitir a adesão e a ingestão do fungo. O sobrenadante foi removido com lavagem como PBS para remover leveduras não fagocitadas e as lamínulas foram coletadas e coradas em corante Hema 3 (fixador, hematoxilina e eosina) e fixadas em lâminas para contagem de leveduras fagocitadas em microscópio, onde cada poço teve 300 macrófagos analisados. O índice fagocítico foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: (IF = (n° de leveduras internalizadas / n° de macrófagos) x 100) (PANG *et al.*, 2013).

3.18 Ensaio de atividade e fungicida

Macrófagos alveolares em cultura (RPMI + soro fetal bovino + penicilina + gentamicina + estreptomicina com ou sem insulina) foram infectados por suspensão de leveduras de Pb18 na proporção de 1:1 e incubados a 37°C em 5% CO_2 para permitir a adesão e a ingestão do fungo. Após 4, 12 ou 24 horas de interação, as células foram lavadas para remover as leveduras não aderidas e os macrófagos foram lisados com o uso de 200uL de solução de 0,1% de Triton em PBS gelado seguido de agitação. O lisado de células foi coletado e adicionado a placas de meio BHI. Após duas semanas de incubação em estufa a 37°C, as colônias foram contadas (DE SOUZA *et al.*, 2019).

3.19 Análise estatística

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

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização do modelo de DM1

4.1.1 Variação de massa corpórea e glicemia

A caracterização do modelo de DM1 induzido por aloxana é representada por resultados da variação de massa corpórea e glicemia entre o dia da indução e o dia da comprovação do DM e são mostrados pelas **Tabelas 1** e **2**.

Pode-se observar o estabelecimento dos sintomas clínicos do DM causado pelo modelo experimental. Após 10 dias, animais submetidos à injeção de aloxana apresentaram aumento em sua concentração de glicose sanguínea, enquanto redução no ganho de peso quando comparados aos animais de grupos controle.

No término do protocolo experimental, 45 dias após a infecção pelo fungo (55 dias após administração de aloxana), a mensuração do peso mostra que os animais de grupos diabéticos ganharam menos peso que animais do grupo controle (**Tabela 2**). Vê-se também que a infecção pelo fungo não apresentou modificações neste parâmetro, embora o tratamento com insulina tenha permitido que animais tratados tivessem um ganho maior de peso durante o período de tratamento (**Tabela 2**). No que diz respeito à glicemia, a infecção pelo Pb seguida pelo período de incubação não alterou os níveis glicêmicos de animais controles ou diabéticos no decorrer dos 45 dias. Animais diabéticos tratados com insulina apresentaram valores de glicemia menores, embora não o suficiente para que sua média fosse levada à normoglicemia (<300mg/dL em camundongos).

Tais resultados indicam que o modelo de indução de diabetes por aloxana tem se mantido de forma eficiente, apresentando resultados de caracterização corroborantes aos dos obtidos no mestrado e publicados posteriormente (CASAGRANDE *et al.*, 2018)

.

Tabela 1. Determinação dos níveis glicêmicos.

Animais	Glicemia Inicial (mg/dL)	Glicemia 10 dias (mg/dL)	Glicemia 55 dias (mg/dL)
CS	173 ± 13	195 ± 9	167 ± 5
CPb	205 ± 8	188 ± 4	163 ± 5
CPb+i	*192 ± 16*	*175 ± 6*	*119 ± 11*
DS	176 ± 4	489 ± 18*	506 ± 66◆
DPb	201 ± 5	429 ± 48	431 ± 40●
DPb+i	203 ± 3	490 ± 52	266 ± 26■,✠

Comparação entre os grupos do experimento. Valores de glicemia foram obtidos de sangue coletado da cauda nos dias 10 e 55 após a indução de DM. Os resultados expressam os valores de média ± EPM. *p<0,001, estatisticamente diferente do grupo controle. ◆p<0,001 vs Cs; ●p<0,01 vs CPb; ■p<0,01 vs Ds; ✠p<0,05 vs DPb.

Tabela 2. Determinação da variação de peso em 55 dias.

Animais	Peso Inicial (g)	Peso 10 dias (g)	Variação de Peso 10 dias (g)	Peso 55 dias (g)	Variação de Peso 55 dias (g)
CS	22,9 ± 0,9	25,0 ± 0,5	2,1 ± 0,4	29,7 ± 1,2	6,8 ± 0,8
CPb	22,6 ± 0,3	24,4 ± 0,5	1,8 ± 0,3	29,0 ± 0,7	6,4 ± 1,0
CPb+i	*23,2 ± 0,8*	*25,1 ± 1,0*	*1,9 ± 0,6*	*28,8 ± 1,1*	*5,7 ± 0,8*
DS	24,7 ± 0,4	25,1 ± 0,7	0,5 ± 0,3♣	27,8 ± 1,3	3,1 ± 1,5*
DPb	24,7 ± 0,4	24,7 ± 0,5	0,1 ± 0,4	27,3 ± 0,8	2,8 ± 1,2**,***
DPb+i	23,7 ± 0,3	24,8 ± 0,3	1,1 ± 0,3	29,0 ±0,6	5,4 ± 0,5

O DM foi induzido pela injeção de aloxana (60mg/kg, i.v.) 10 dias antes da injeção i.t. de Pb18. Os grupos CPb+i e DPb+i receberam insulina por via subcutânea diariamente durante 12 dias antes da coleta. Foram utilizados 5 animais em cada grupo. Os valores de peso foram mensurados nos dias 10 e 55 do protocolo. Os valores representam a média ± EPM. *p<0,05 vs Cs; **p<0,05 vs Cs; ***p<0,05 vs CPb; ♣p<0,001 vs Cs.

4.1.2 Tratamento de insulina

Animais diabéticos infectados apresentaram níveis reduzidos de insulina sérica quando comparados aos controles. O tratamento subcutâneo de insulina por 12 dias promoveu aumento do hormônio na corrente sanguínea dos animais diabéticos.

Curiosamente, tal aumento não foi encontrado em animais não-diabéticos que receberam o tratamento (**Figura 9**).

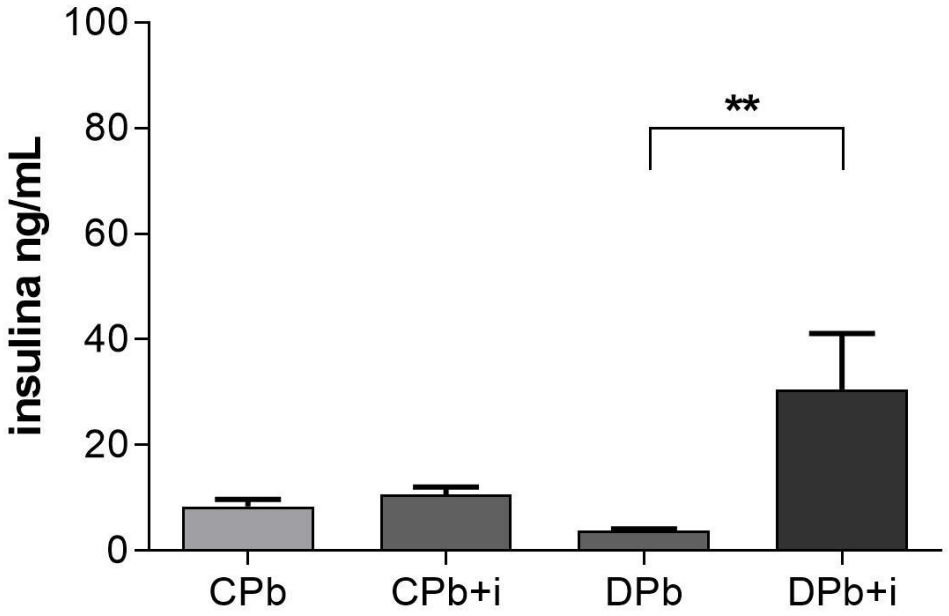


Figura 9. Concentrações de insulina em soro: A análise foi feita em amostras de soro coletadas no dia 55, 45 dias após a infecção por Pb18 e após 12 dias de tratamento com insulina NPH pela via subcutânea. Foram utilizados de 6 a 4 animais para cada grupo **(Ver Apêndice A)**. Os valores representam a média da concentração de insulina ± EPM. CPb (Controle + *Paracoccidioides brasiliensis*); CPb+i (CPb + insulina); DPb (Diabético + *Paracoccidioides brasiliensis*); DPb+i (DPb + insulina). *p<0,05.

4.1.3 Consumo de água e ração

Para avaliar mais características do estado diabético, o consumo médio de água e ração dos animais nos dez primeiros dias após indução da aloxana e nos dez últimos dias do protocolo. Observamos que animais que receberam aloxana consumiram mais ração (**Figura 10A**) e mais água (**Figura 10C**) que seus respectivos controles. Após 45 dias de incubação do fungo (55 dias após indução do DM1), observamos que o consumo de ração se torna mais homogêneo entre os grupos, mais elevado nos animais diabéticos que receberam o tratamento de insulina, enquanto o

consumo de água permanece alto em todos os animais dos grupos diabéticos (**Figuras 10B** e **10D**, respectivamente).

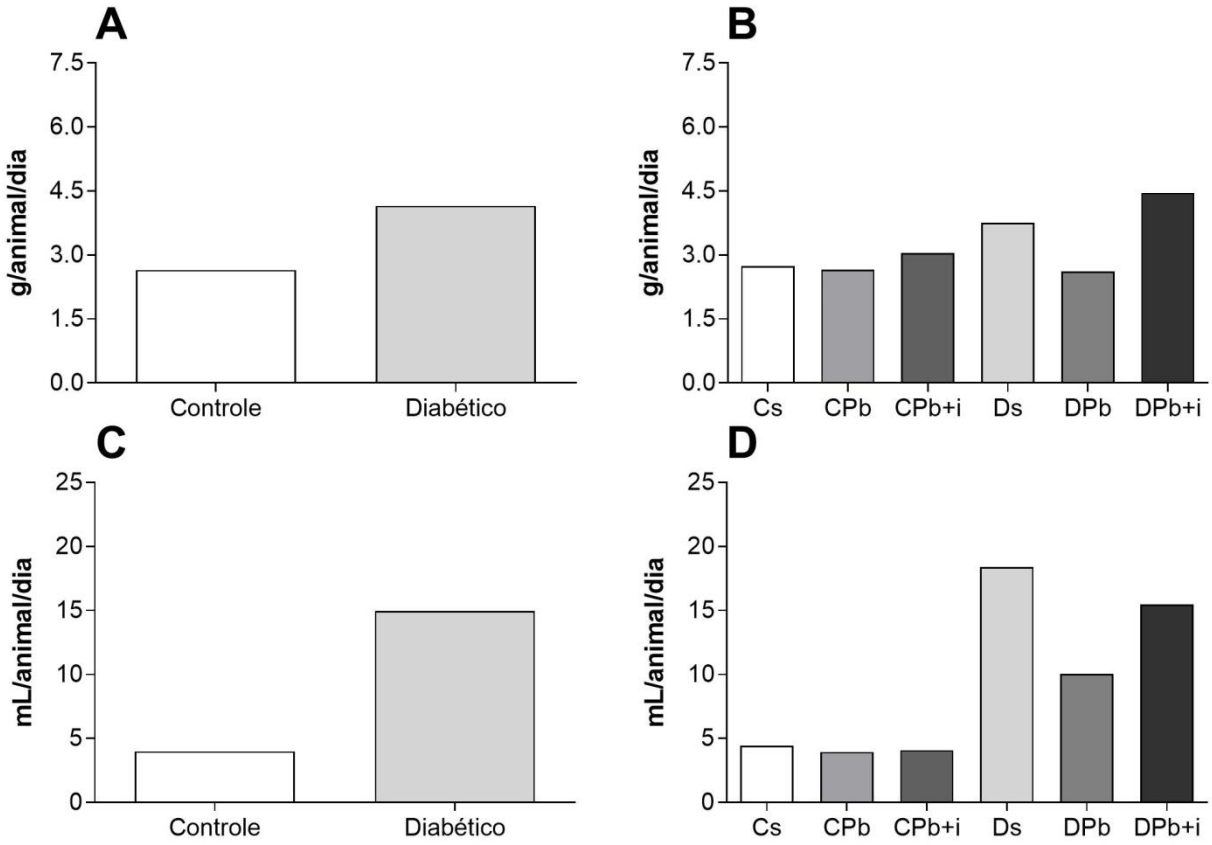


Figura 10 - Consumo de ração e água. Valores foram obtidos pela pesagem e mensuração de ração e água ofertadas *ad libitum* divididas pela quantidade de animais nas gaiolas (A e C: 15 animais por grupo; B e D: 5 animais por grupo). As mensurações foram feitas nos dez primeiros dias após injeção de aloxana (A e C) e nos dez últimos dias do protocolo (B e D).

4.2 Caracterização da infecção – 24h

Em células obtidas do pulmão na aguda da infecção, não se observou diferenças na migração de leucócitos para o pulmão em animais controles infectados que receberam o tratamento de insulina (**Figura 11A**), embora tenha resultado em maior migração de leucócitos para o pulmão no grupo diabético.

Quanto à fenotipagem das células encontradas, não houve diferenças significativas entre as populações celulares que expressassem os marcadores de membrana analisados (**Figuras 11B-E**): a presença do DM1 não alterou as populações observadas no pulmão durante as 24 horas de infecção no que diz respeito a fenotipagem destas células, e este aspecto também não foi modificado pela dose de insulina.

No perfil de citocinas avaliado com 24 horas de infecção, observamos na **Figura 12** que animais diabéticos infectados apresentaram concentrações reduzidas de IFN-γ e de IL-12 quando comparados aos animais controle infectados. O tratamento de insulina em animais infectados com o Pb resultou em reduzida produção de IFN-γ nos animais não diabéticos (**Figura 12D**), não afetando as outras citocinas estudadas. Por outro lado, em animais diabéticos o tratamento com insulina promoveu maior liberação de IL-6, de MCP-1 e de IL-12 (**Figuras 12A**, **12C** e **12E**) quando comparados aos animais diabéticos infectados e de TNF-α quando comparados aos animais não-diabéticos tratados com insulina (**Figura 12E**).

Pode-se também observar que não houve diferença significativa entre a carga fúngica recuperada de pulmões de animais diabéticos quando comparados aos controles, tratados ou não com insulina (**Figura 13**).

Em análises realizadas no baço, não foram observadas alterações significativas nos parâmetros analisados (**Figura 14**). O estado diabético não alterou as quantidades e os fenótipos das populações de leucócitos recrutados, embora exista a sugestão de aumento nas populações GR1+ em animais diabéticos infectados que receberam o tratamento de insulina, comparados aos animais diabéticos (**Figura 14G**).

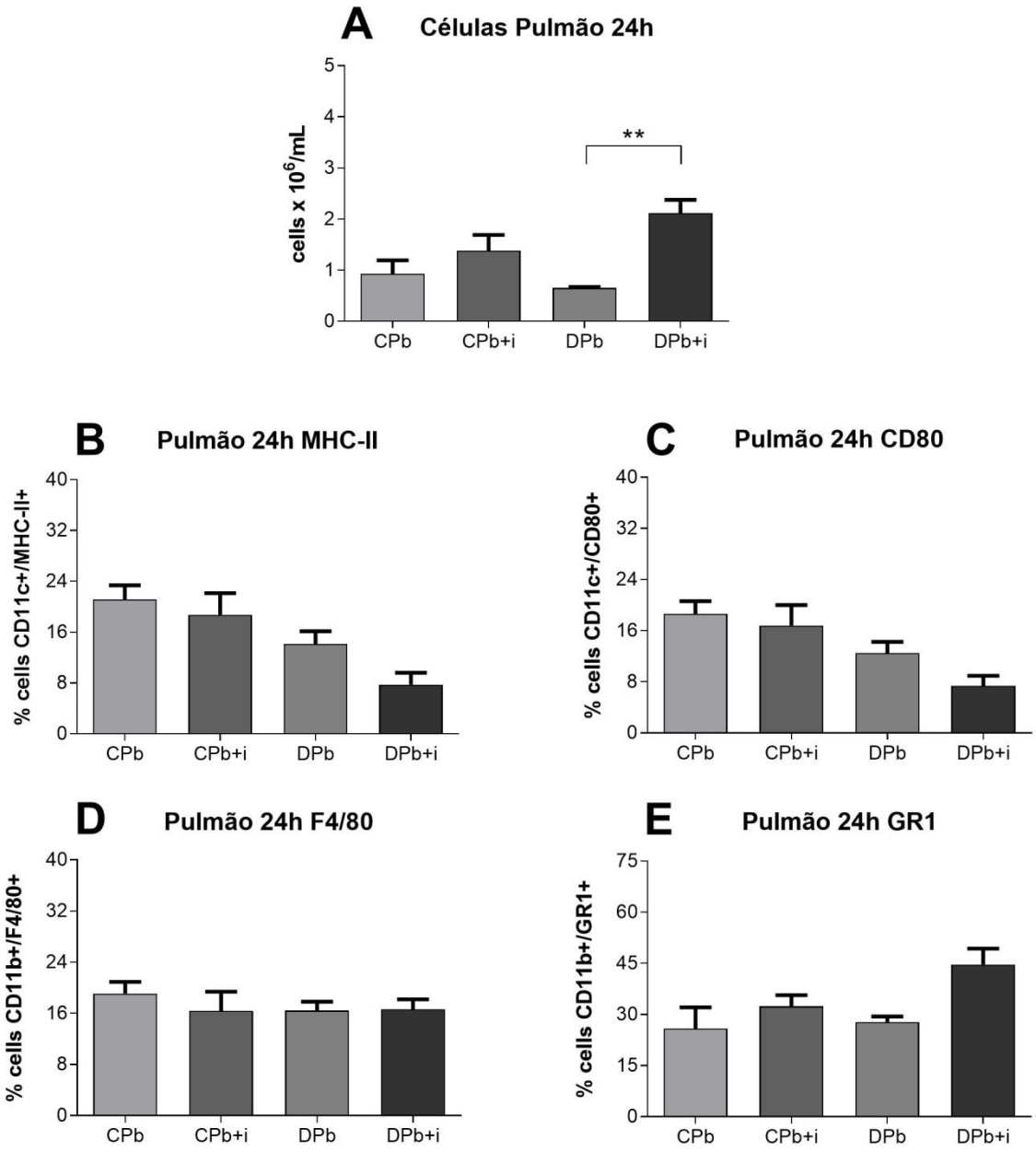


Figura 11. Caracterização da infecção no pulmão, 24h. Animais foram tornados diabéticos por injeção de aloxana (60 mg/kg i.v.) e infectados com *P. brasiliensis* ($1x10^6$ células, i.t.). Amostras do tecido foram obtidas 24 horas após a inoculação. Os valores representam media ± EPM. 5 animais foram utilizados por grupo. **Ver Apêndice B**. ***p*<0.01.

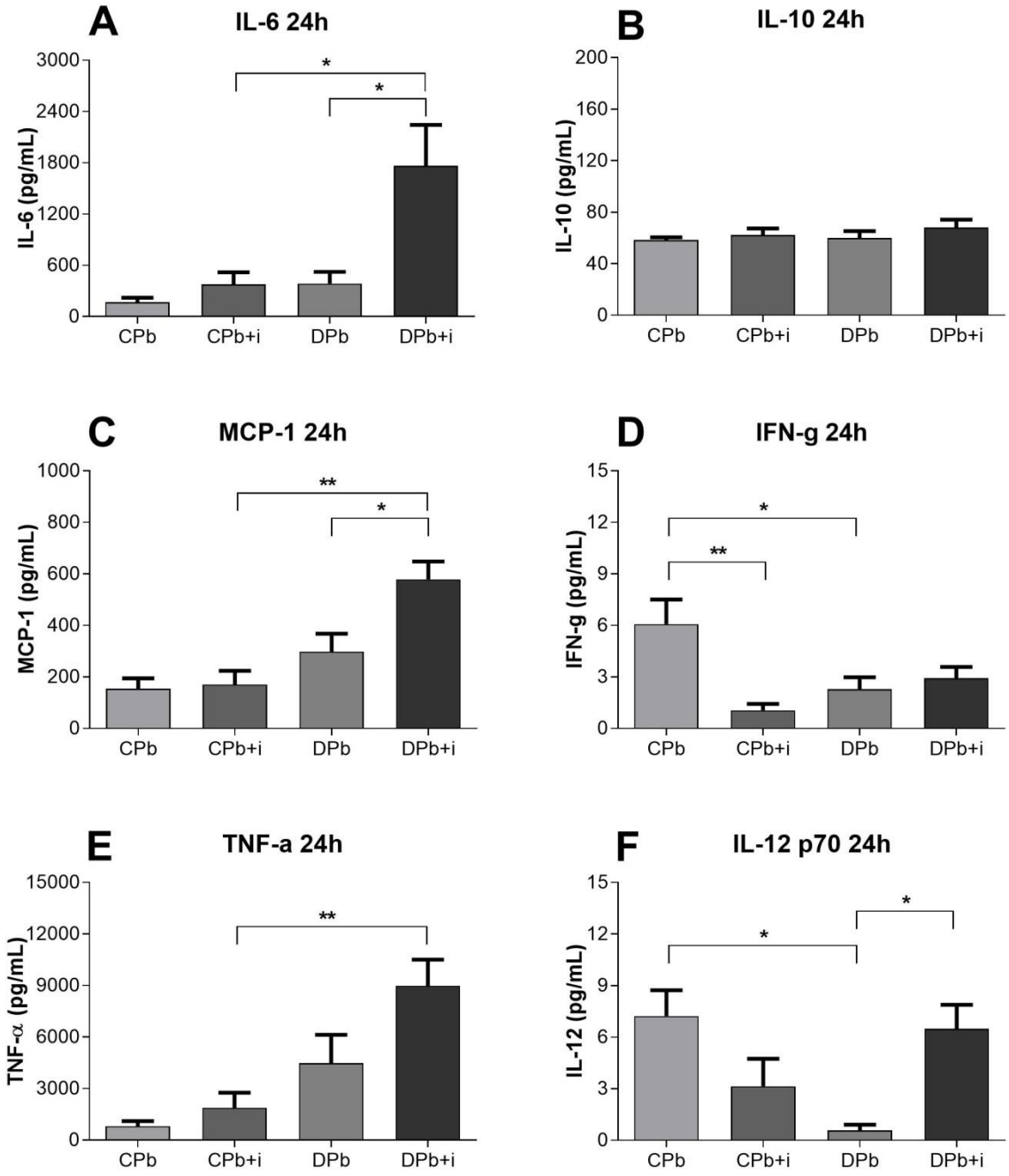


Figura 12. Análise de citocinas no pulmão, 24h. Animais foram tornados diabéticos por injeção de aloxana (60 mg/kg i.v.) e infectados com *P. brasiliensis* ($1x10^6$ células, i.t.). Amostras do pulmão foram obtidas 24 horas após a inoculação. Os valores representam media ± EPM. 5 animais foram utilizados por grupo. **Ver Apêndice C**. *p<0.05; **p<0.01.

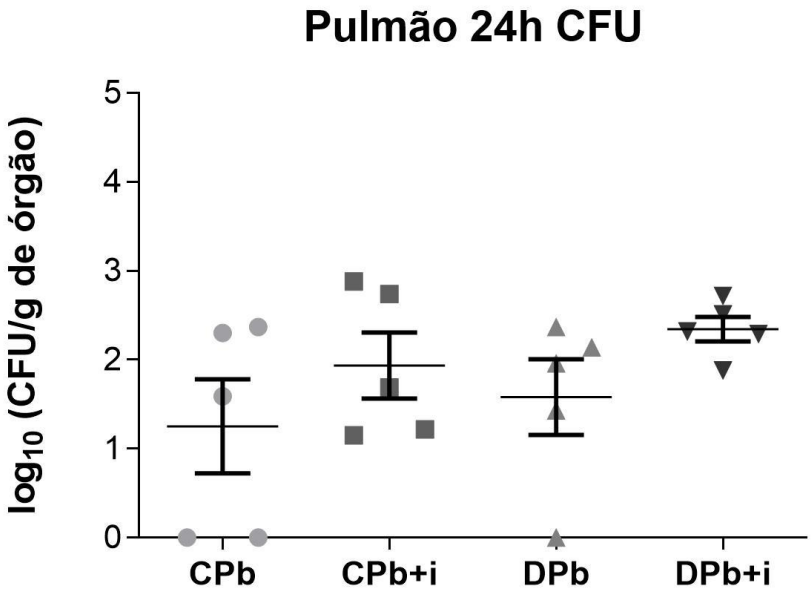


Figura 13. Ensaio de CFU pulmonar, 24h. Animais foram tornados diabéticos por injeção de aloxana (60 mg/kg i.v.) e infectados com *P. brasiliensis* ($1x10^6$ células, i.t.). Amostras do tecido foram obtidas 24 horas após a inoculação. A contagem das colônias foi realizada duas semanas após a coleta. Os valores representam média ± EPM. 5 animais foram utilizados por grupo. **Ver Apêndice D**.

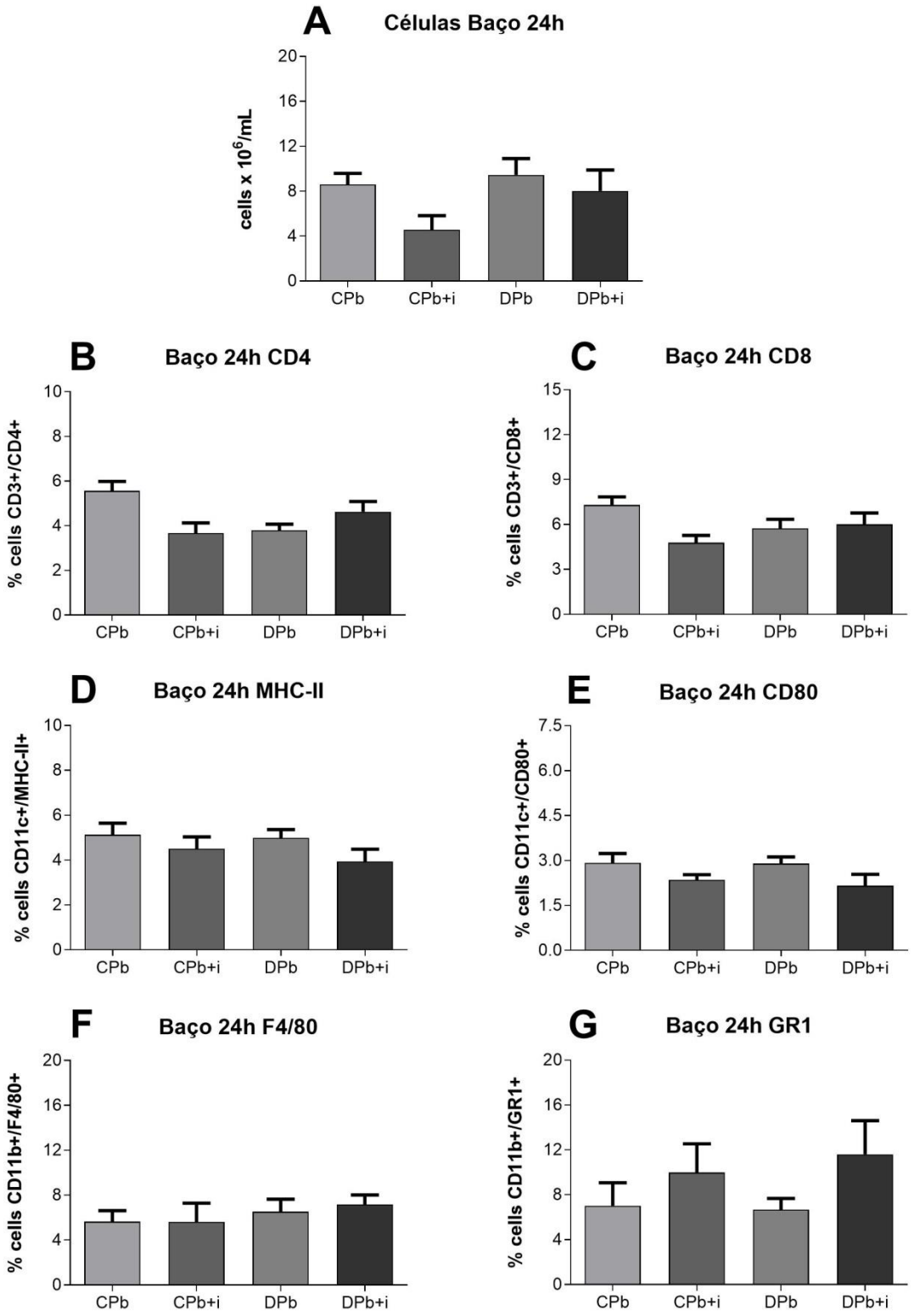


Figura 14. Caracterização da infecção no baço, 24h. Animais foram tornados diabéticos por injeção de aloxana (60 mg/kg i.v.) e infectados com *P. brasiliensis* ($1x10^6$ células, i.t.). Amostras do tecido foram obtidas 24 horas após a inoculação. Os valores representam media ± EPM. 5 animais foram utilizados por grupo. **Ver Apêndice E**.

4.3 Caracterização da infecção – 20 dias

O estado diabético dos animais infectados não promoveu modificações na contagem ou nas expressões de marcadores por populações de células recrutadas para pulmão no vigésimo dia da infecção. Não se observaram modificações nestes parâmetros mesmo depois do tratamento com 12 doses de insulina (**Figura 15**).

Nas citocinas avaliadas, o tratamento de insulina em animais infectados resultou em redução da citocina anti-inflamatória IL-10 (**Figura 16B**), enquanto nos grupos diabéticos, tratamento de insulina resultou na redução de IFN-γ quando comparado a animais diabéticos sem o tratamento (**Figura 16D**) e aumento do TNF-α quando comparado a animais não diabéticos submetidos ao mesmo tratamento (**Figura 16E**). Não foram encontradas alterações significativas nas secreções de IL-6, MCP-1 e IL-12 (**Figuras 16A, 16C** e **16F**).

Em ensaio de CFU, pode-se observar na **Figura 17** que pulmões colhidos de animais diabéticos apresentam uma tendência, ainda que não estatisticamente relevante, de possuir maior carga fúngica quando comparados aos seus respectivos controles.

No que diz respeito aos marcadores de membrana celular analisados no baço, não houve modificações significativas apresentadas no que diz respeito a concentração ou fenótipos de leucócitos migrados observados em animais diabéticos em relação aos seus controles infectados. O tratamento com 12 doses de insulina não promoveu alterações em nenhuma das populações, como observado na **Figura 18**.

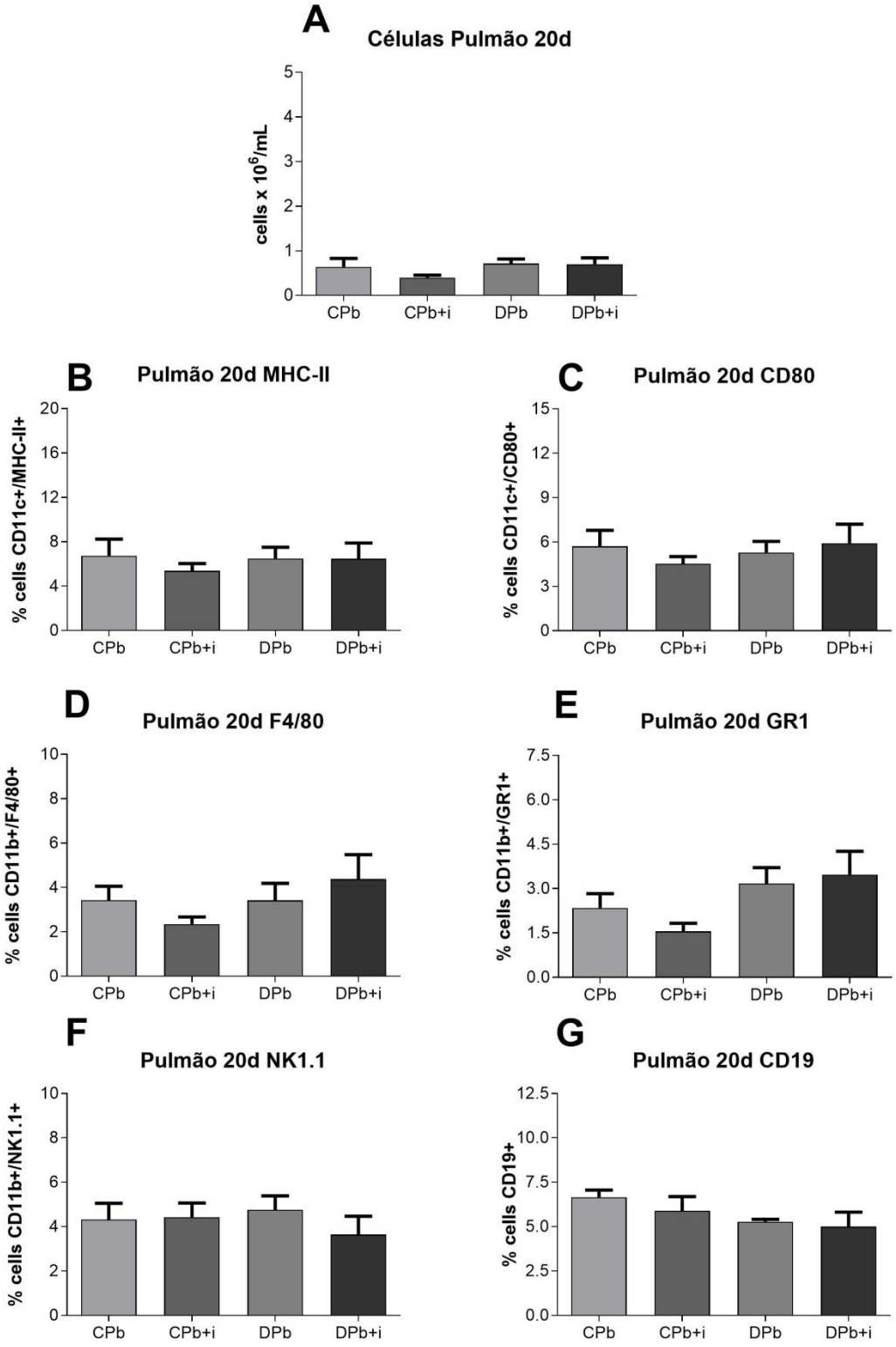


Figura 15. Caracterização das populações leucocitárias no pulmão, 20d. Animais foram tornados diabéticos por injeção de aloxana (60 mg/kg i.v.) e infectados com *P. brasiliensis* ($1x10^6$ células, i.t.). Amostras do tecido foram obtidas 20 dias após a inoculação. Os valores representam média ± EPM. 5 animais foram utilizados por grupo. **Ver Apêndice F**.

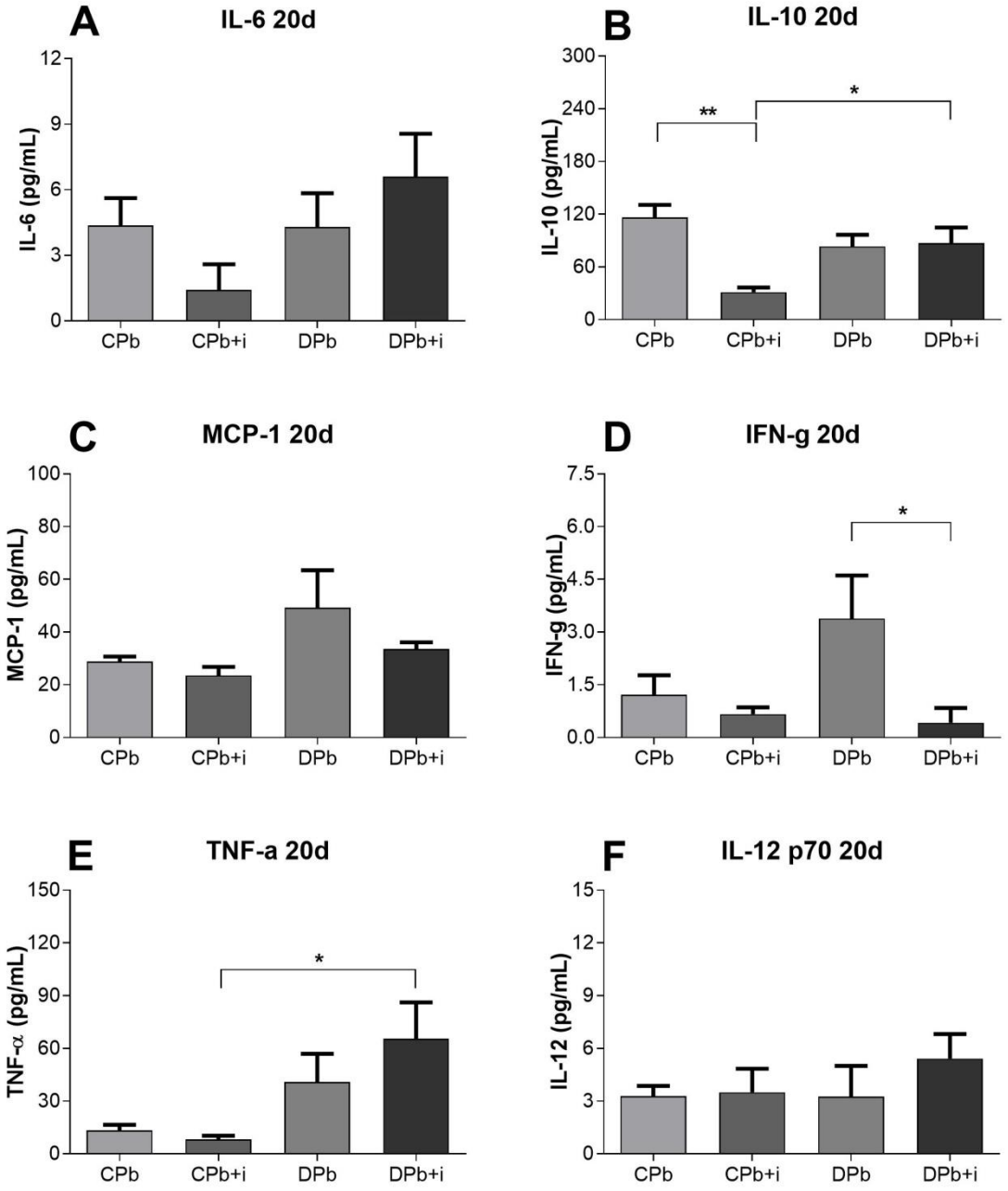


Figura 16. Análise de citocinas do pulmão, 20d. Animais foram tornados diabéticos por injeção de aloxana (60 mg/kg i.v.) e infectados com *P. brasiliensis* (1x10^6 células, i.t.). Amostras do pulmão foram obtidas 20 dias após a inoculação. Os valores representam média ± EPM. 5 animais foram utilizados por grupo. **Ver Apêndice G**. *p<0.05; **p<0.01.

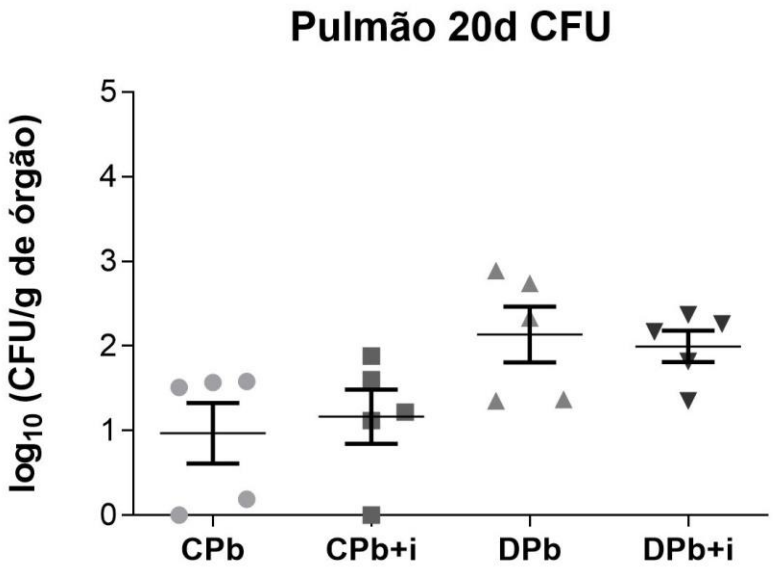


Figura 17. Ensaio de CFU pulmonar, 20d. Animais foram tornados diabéticos por injeção de aloxana (60 mg/kg i.v.) e infectados com *P. brasiliensis* ($1x10^6$ células, i.t.). Amostras do tecido foram obtidas 20 dias após a inoculação. A contagem das colônias foi realizada duas semanas após a coleta. Os valores representam média ± EPM. 5 animais foram utilizados por grupo. **Ver Apêndice H**.

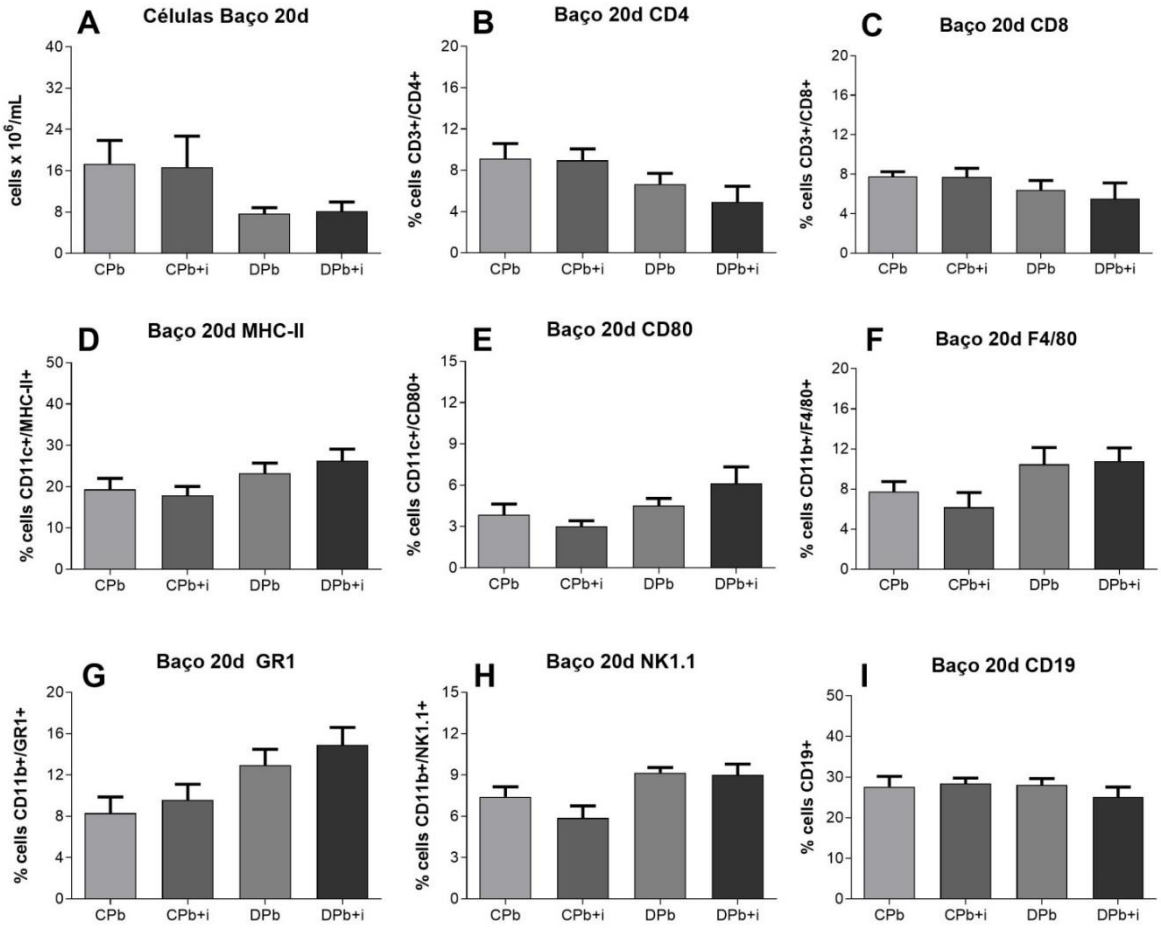


Figura 18. Caracterização das populações leucocitárias no baço, 20d. Animais foram tornados diabéticos por injeção de aloxana e infectados com *P. brasiliensis*. Amostras do tecido foram obtidas 20 dias após a inoculação. Os valores representam média ± EPM. 5 animais foram utilizados por grupo. **Ver Apêndice I**.

4.4 Caracterização da infecção – 45 dias

A fim de avaliar a inflamação em uma etapa mais tardia da PCM, pulmões e baços de camundongos infectados diabéticos e não diabéticos, foram coletados depois de incubação de 45 dias após a infecção. Para avaliar a influência da insulina nesta fase da inflamação, animais receberam o tratamento de 12 doses de insulina, uma dose ao dia, até a noite anterior ao experimento, conforme descrito.

A **Figura 19A** nos mostra que, no ponto de 45 dias da infecção, não houve diferenças entre a contagem de leucócitos dos pulmões diabéticos e o dos não diabéticos. Apenas nos animais diabéticos, o tratamento de 12 dias de insulina promoveu aumento da presença de leucócitos no pulmão.

Observa-se também que animais diabéticos infectados apresentaram carga fúngica significativamente superior quando comparados aos controles infectados pelo Pb (**Figura 19B**), e que o tratamento com insulina não modificou este aspecto.

Como se observa na Figura 20, na fase tardia da PCM a presença de DM1 promove efeitos na resposta inflamatória encontrada no pulmão. Animais diabéticos e infectados apresentaram menores populações de células marcadas por CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD80+, NK1.1+ e CD19+ quando comparados aos animais controles infectados. O tratamento de insulina não promoveu alterações significativas em animais não-diabéticos infectados quando comparados aos controles. Mesmo com o tratamento, as populações de animais diabéticos CD3+CD4+, CD3+CD8+ permaneceram reduzidas quando comparadas aos seus controles. Porém, o tratamento de 12 doses de insulina foi capaz de reestabelecer a presença de algumas populações de células no ambiente pulmonar, como CD19+ e CD80+.

Na análise de citocinas em 45 dias de infecção, observa-se que não houve alterações significativas entre os grupos no que diz respeito às citocinas IL-6, IL-10, MCP-1 e IL-12 p70 (**Figuras 21A**-**C** e **21F**). Animais diabéticos infectados apresentaram, neste estágio, uma inflamação acentuada caracterizada por aumento de IFN-γ e TNF-α quando comparados aos controles não-diabéticos infectados (**Figuras 21D** e **21E**, respectivamente). O tratamento com insulina resultou em acentuada redução da inflamação, e seus níveis de IFN-γ e TNF-α são comparáveis aos dos animais controles infectados (**Figuras 21D** e **21E**, respectivamente).

Ainda que na fase tardia do acompanhamento da infecção por Pb, não foi observada diferença nas populações de células migradas para o baço durante a infecção devido à presença do estado insulinopênico. O tratamento de insulina também não promoveu alterações significativas nos parâmetros analisados (**Figura 22**).

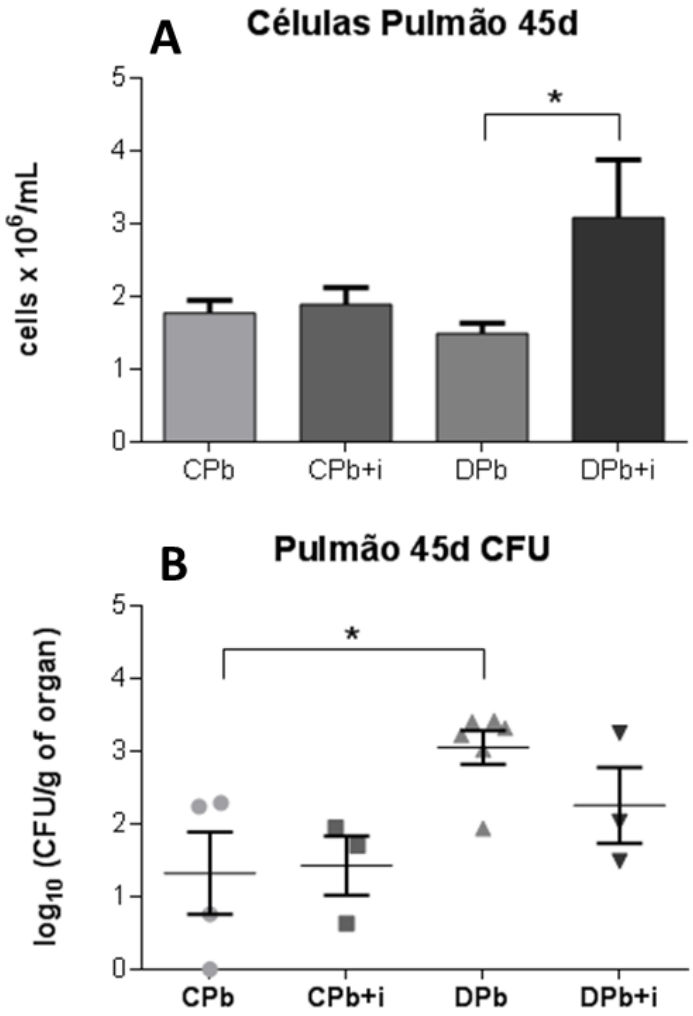


Figura 19. Caracterização da inflamação no pulmão, 45d. Animais foram tornados diabéticos por injeção de aloxana (60 mg/kg i.v.) e infectados com *P. brasiliensis* ($1x10^6$ células, i.t.). Amostras do tecido foram obtidas 45 dias após a inoculação. Os valores representam media ± EPM. 3 a 6 animais foram utilizados por grupo. **Ver Apêndice J**. *$p<0.05$.

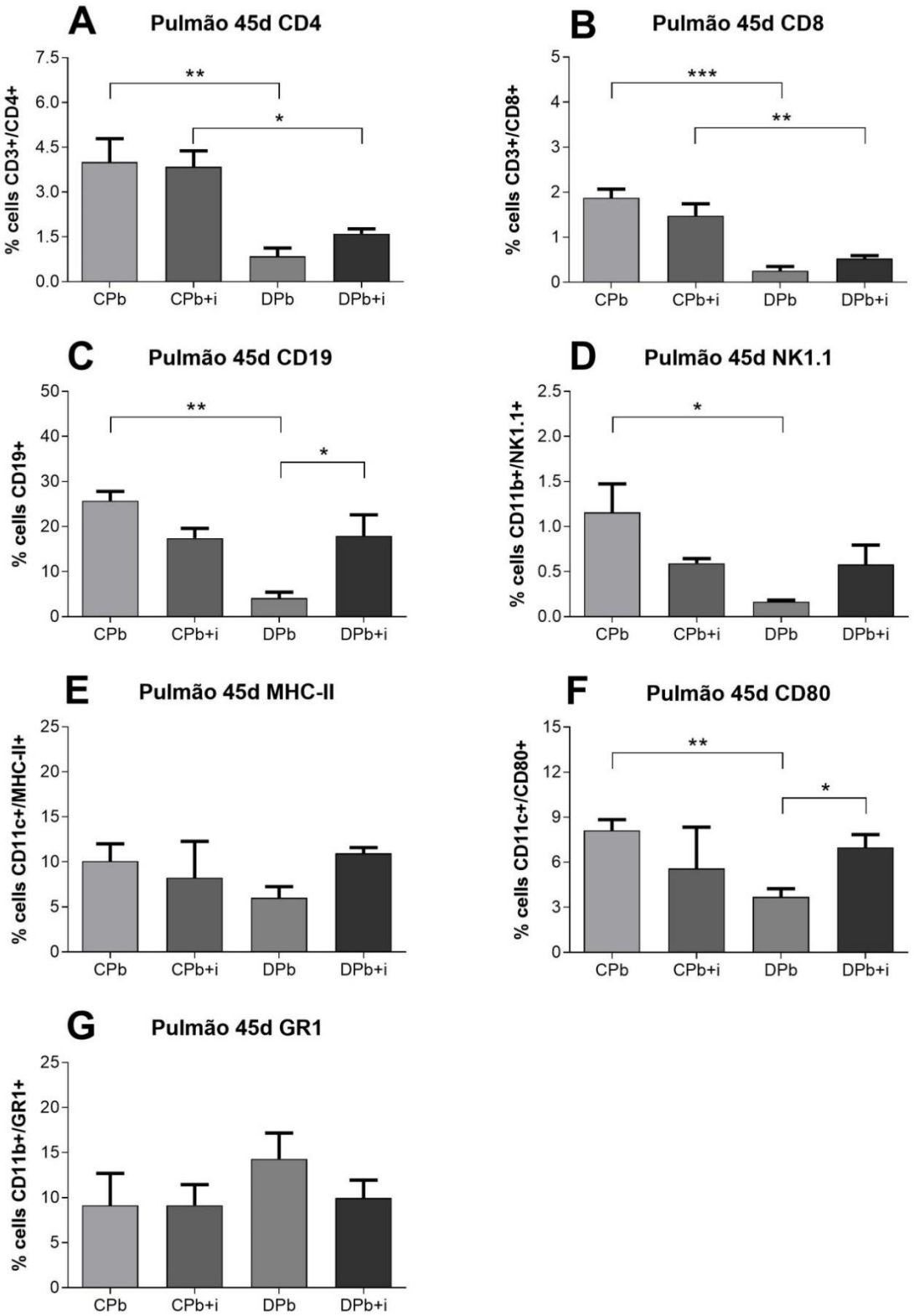


Figura 20. Caracterização da inflamação no pulmão, 45d. Animais foram tornados diabéticos por injeção de aloxana (60 mg/kg i.v.) e infectados com *P. brasiliensis* ($1x10^6$ células, i.t.). Amostras do tecido foram obtidas 45 dias após a inoculação. Os valores representam media ± EPM. 3 a 4 animais foram utilizados por grupo. **Ver Apêndice K**. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

.

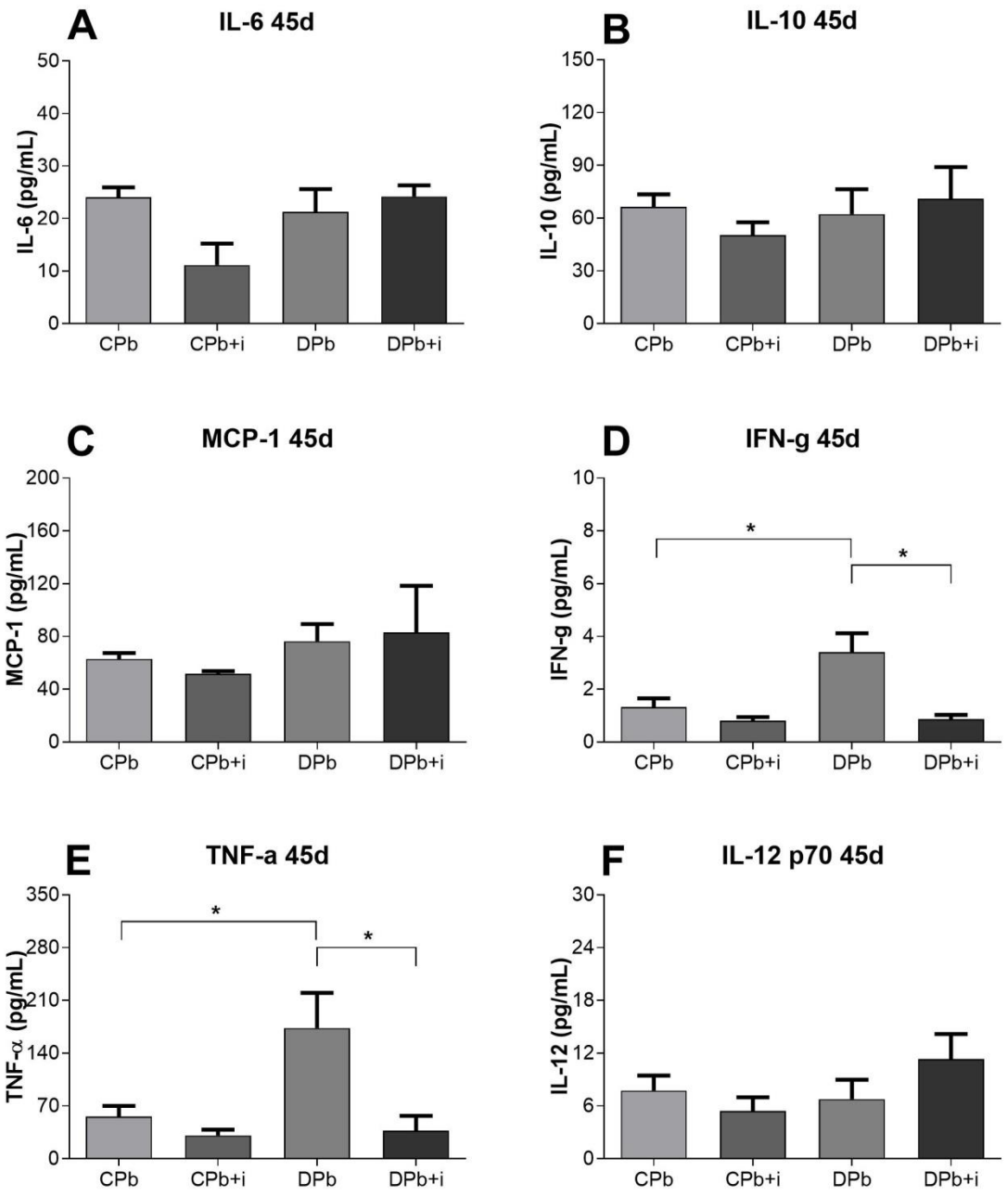


Figura 21. Análise de citocinas no pulmão, 45d. Animais foram tornados diabéticos por injeção de aloxana (60 mg/kg i.v.) e infectados com *P. brasiliensis* ($1x10^6$ células, i.t.). Amostras do pulmão foram obtidas 45 dias após a inoculação. Os valores representam media ± EPM. 3 a 4 animais foram utilizados por grupo. **Ver Apêndice L**. *p<0.05.

.

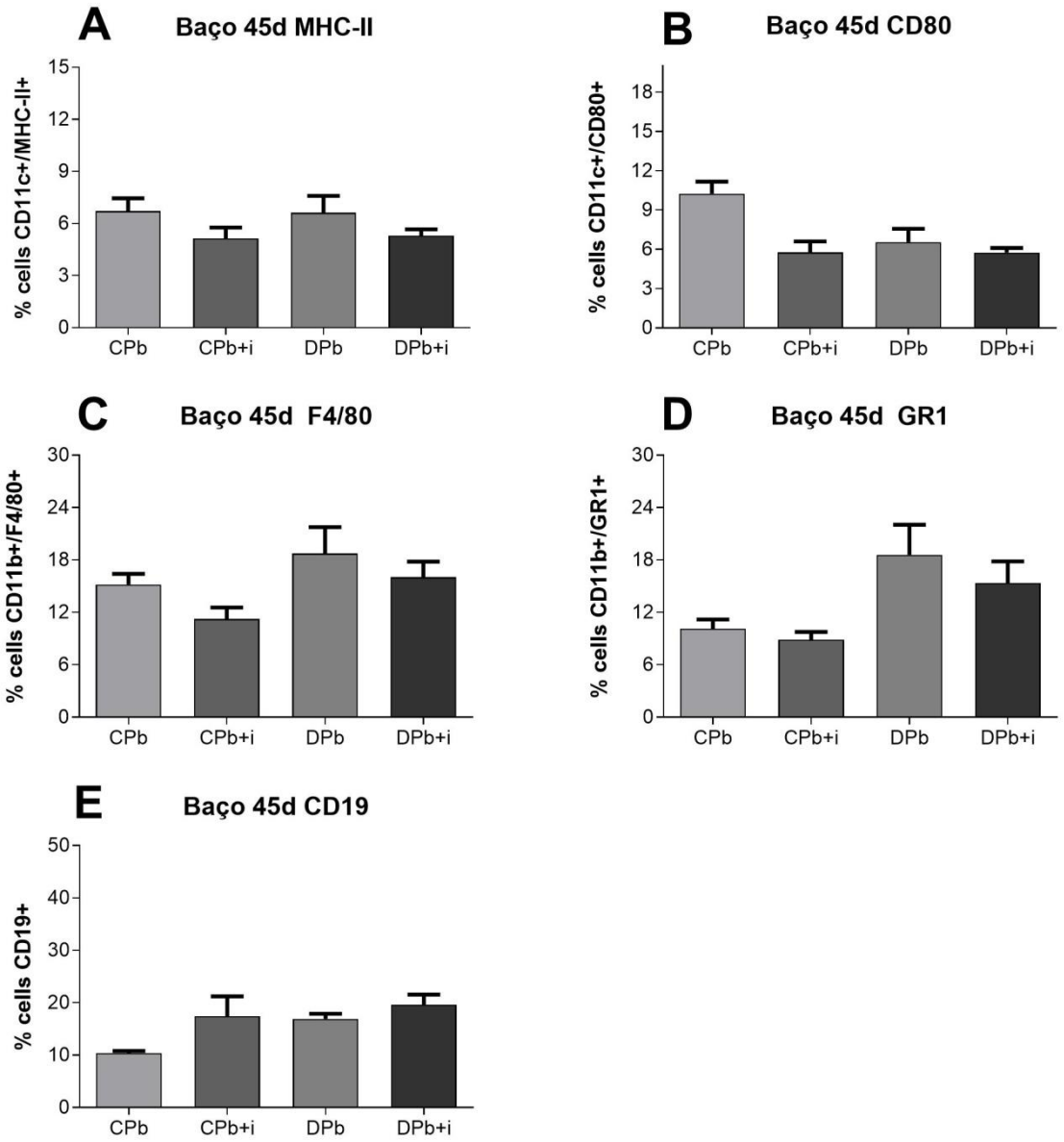


Figura 22. Caracterização da inflamação no baço, 45d. Animais foram tornados diabéticos por injeção de aloxana (60 mg/kg i.v.) e infectados com *P. brasiliensis* ($1x10^6$ células, i.t.). Amostras do tecido foram obtidas 45 dias após a inoculação. Os valores representam media ± EPM. 5 animais foram utilizados por grupo. **Ver Apêndice M**.

4.5 Expressão de molécula de adesão em pulmão

A fim de melhor entender o mecanismo de migração dos leucócitos para o foco pulmonar da infecção, a molécula de adesão VCAM-1 foi analisada em cortes de pulmão de animais expostos à fase mais tardia da PCM (45 dias).

Pode-se observar na **Figura 23** que a infecção por Pb resultou em maiores expressões de VCAM-1 por animais do grupo não-diabético quando comparados aos controles. Nos animais diabéticos, por outro lado, a infecção não causou alteração significativa da expressão da molécula em vasos pulmonares.

O tratamento de 12 doses de insulina não alterou de forma significativa este parâmetro nos animais não diabéticos infectados. Observa-se, porém, que a presença de insulina resultou em maior expressão da VCAM-1 (**Figura 23**).

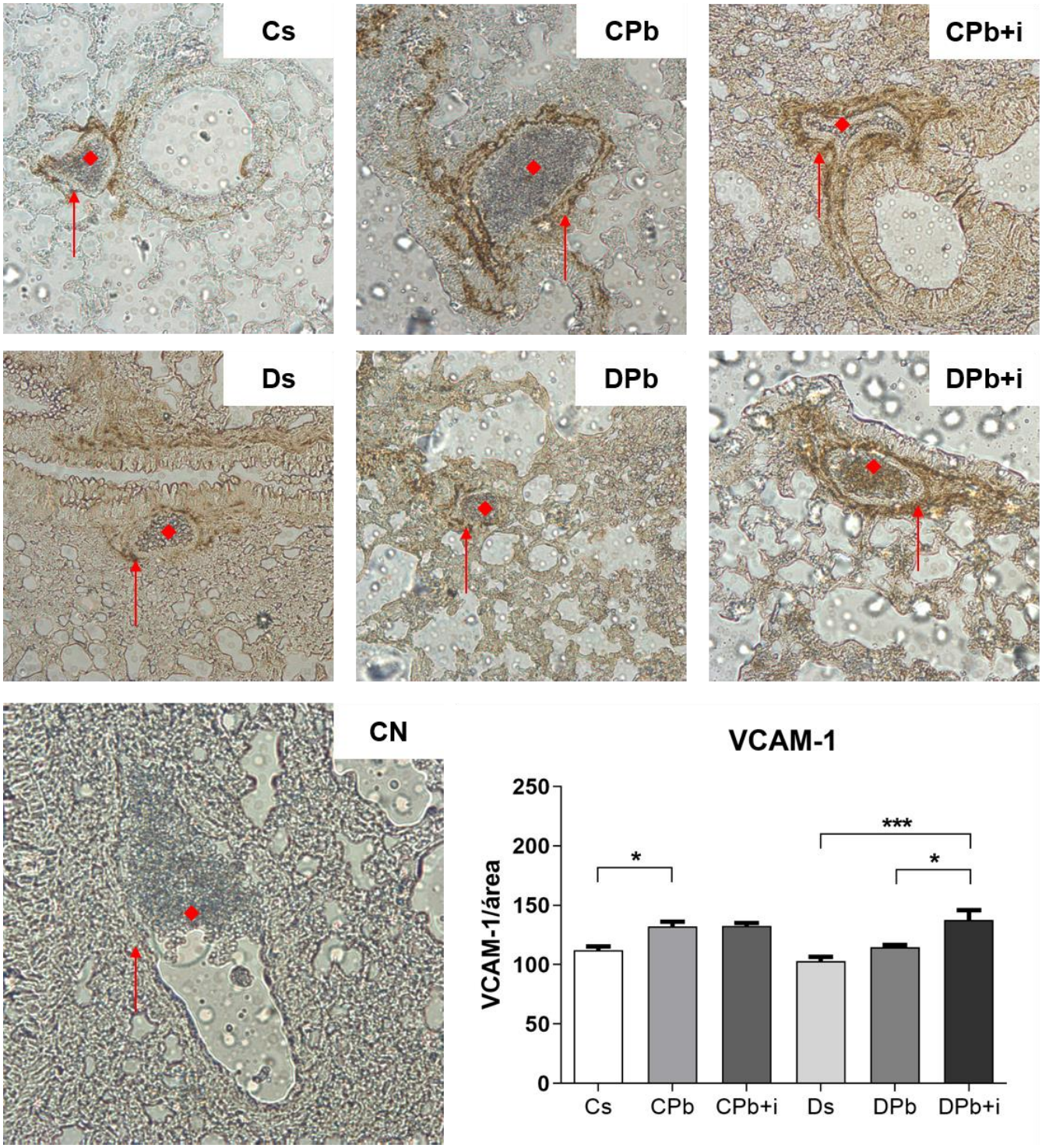


Figura 23. Imagens e quantificação de VCAM-1 no endotélio vascular de pulmão. Animais foram tornados diabéticos por injeção de aloxana (60 mg/kg i.v.) e infectados com *P. brasiliensis* ($1x10^6$ células, i.t.). Amostras do tecido foram obtidas 45 dias após a inoculação. Figuras representativas (aumento de 20x) de 3-4 animais por grupo **Ver Apêndice N**. 5 vasos/animal foram fotografados e analisados, a presença de imunomarcação representada pela coloração castanha. (◆): vaso sanguíneo; seta: endotélio. Os valores do gráfico representam media ± EPM. *$p<0.05$; ***$p<0.001$.

4.6 Expressão de moléculas de sinalização intracelular

As moléculas da via de sinalização intracelular resultante da ativação do receptor de insulina foram analisadas pela técnica de *Western blotting* para melhor entendimento dos mecanismos da infecção pelo Pb em camundongos diabéticos e não-diabéticos e, ainda, a intervenção de um tratamento de insulina exógena nestas alterações.

Em homogenato de pulmão, foram analisadas as seguintes moléculas: p38, P-p38, ERK (1 e 2), P-ERK (1 e 2), IkB-α, JNK (p54 e p46), pAkt, PKC-α e TLR-2.

A presença de DM não causou alterações significativas na presença e nas fosforilações destas moléculas encontradas em homogenato de pulmão (**Figura 24**), assim como a infecção por Pb também não alterou estes parâmetros.

Por sua vez, o tratamento com 12 doses de insulina resultou em redução da fosforilação da p42 MAPK em animais não diabéticos e infectados (**Figura 24B**), assim como maior expressão relativa de IkB-α e da molécula p46 do conjunto das JNK, também apenas em animais não diabéticos (**Figuras 24D** e **24F**).

O tratamento com insulina não modificou estes parâmetros em animais diabéticos e infectados.

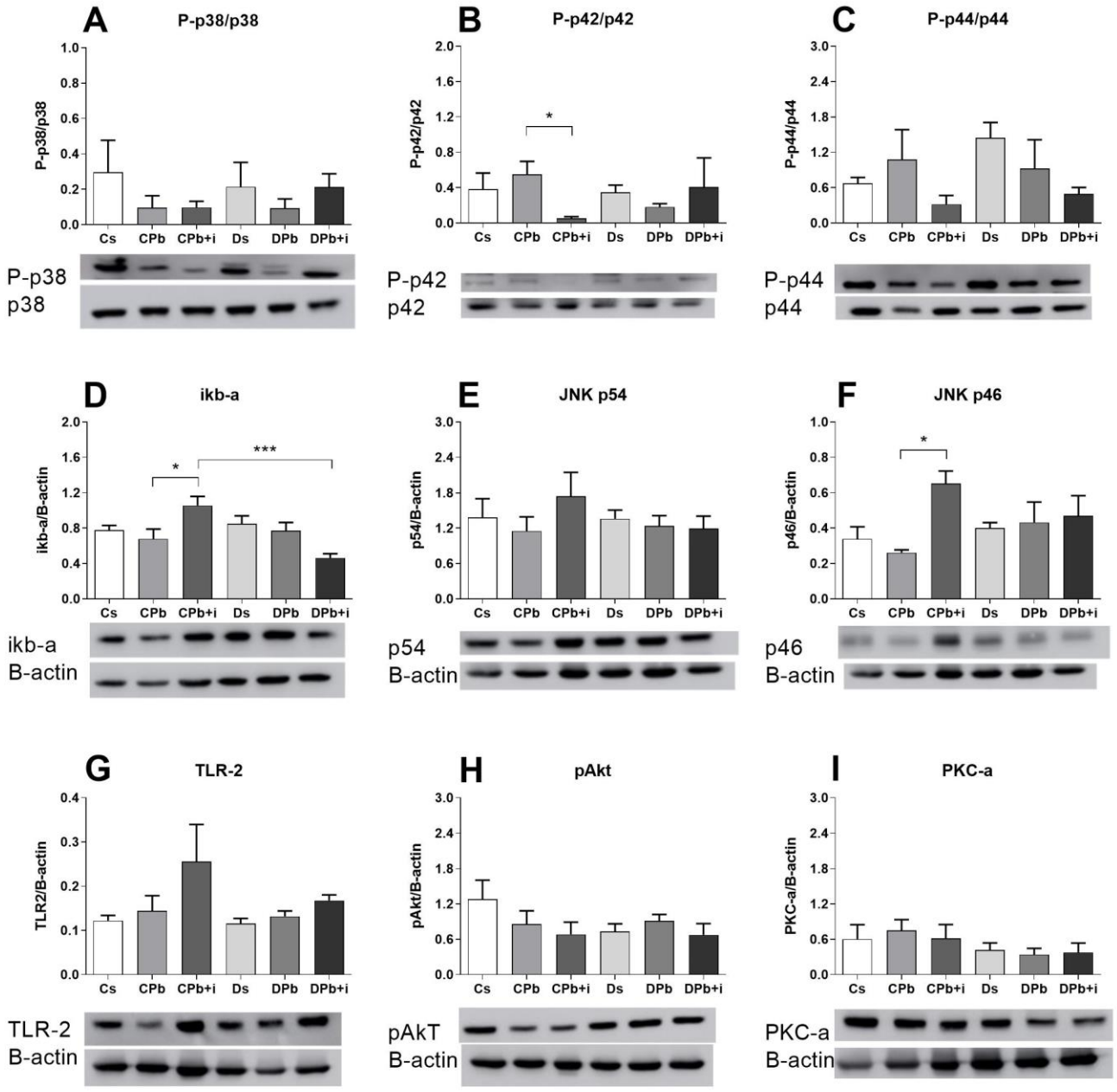


Figura 24. Análise de expressão de moléculas em homogenato de pulmão. Animais foram tornados diabéticos por injeção de aloxana (60 mg/kg i.v.) e infectados com *P. brasiliensis* ($1x10^6$ cells i.t.). Amostras do tecido foram obtidas 55 dias após a inoculação. Os valores representam media ± EPM. 5 animais foram utilizados por grupo. **Ver Apêndice O**. *p<0.05; ***p<0.001.

4.7 Análises da expressão relativa de citocinas por PCR

Através de RT-PCR, analisamos a expressão relativa dos genes codificadores das principais citocinas envolvidas na intenção de encontrar fatores pré-transcricionais afetados pelo modelo.

No momento avaliado, a expressão dos genes codificadores de IL-10, TGF-β, Stat1, TNF-α e IL-12 não foi alterada pelo modelo de DM. A infecção por Pb também não promoveu alterações nestes genes, assim como o tratamento de insulina.

As expressões de IL-6 e IL-4 não foram alteradas pela infecção em animais controles (**Figuras 25A** e **25C**, respectivamente). No entanto, ambas se observam aumentadas em animais diabéticos infectados. O tratamento com insulina reduziu a expressão relativa do gene da IL-6 (**Figura 25A**). Observa-se ainda que animais não diabéticos, infectados e tratados com insulina apresentaram expressões aumentadas de IL-4 (**Figura 25C**).

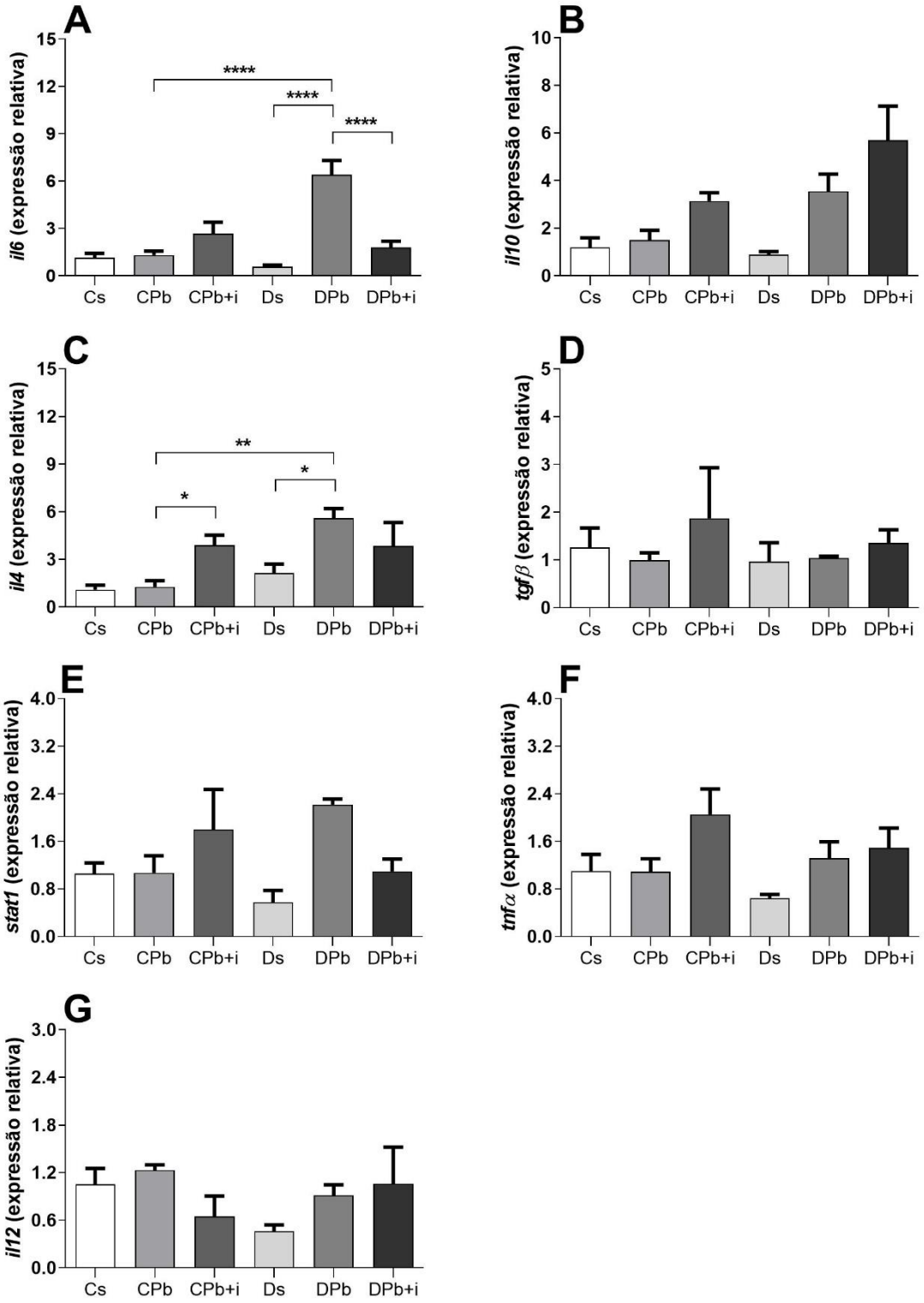


Figura 25. Análise de expressão relativa de citocinas por PCR. Animais foram tornados diabéticos por injeção de aloxana (60 mg/kg i.v.) e infectados com *P. brasiliensis* ($1x10^6$ células i.t.). Amostras do tecido para extração do RNA foram obtidas 55 dias após a inoculação. Os valores representam media ± EPM e os valores foram normalizados pela média do grupo controle. 3 a 5 animais foram utilizados por grupo. **Ver Apêndice P**. *p<0.05; **p<0.01; ****p<0.0001.

.

4.8 Análises de quimiocina

Em resultados anteriores a este projeto e referentes à minha tese de mestrado (CASAGRANDE *et al.*, 2018), este modelo de infecção não promoveu alterações significativas nas citocinas analisadas em homogenatos de fígado e baço. Quimiocinas foram analisadas para maior entendimento da migração leucocitária para os diferentes sítios inflamatórios durante a infecção pelo Pb.

Camundongos infectados apresentaram concentrações elevadas da quimiocina CINC-1 tanto em homogenatos de fígado quanto de baço (**Figura 26**). A presença do diabetes não promoveu alterações nestas concentrações, que permaneceram altas em relação aos grupos não infectados.

O tratamento com 12 doses de insulina resultou em menores secreções de CINC-1 observadas em homogenatos de fígado e baço tanto de animais diabéticos quanto dos não diabéticos, embora esta redução seja estatisticamente relevante apenas no baço dos grupos não diabéticos (**Figura 26B**).

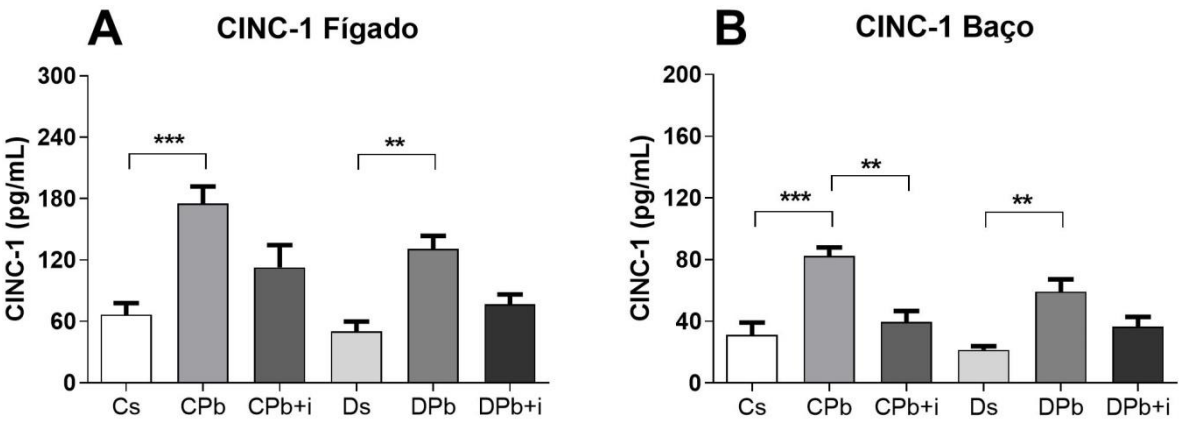


Figura 26. Análise de CINC-1 em homogenato de fígado e baço. Animais foram tornados diabéticos por injeção de aloxana (60 mg/kg i.v.) e infectados com *P. brasiliensis* ($1x10^6$ células i.t.). Amostras do tecido foram obtidas 55 dias após a inoculação. Os valores representam media ± EPM. 5 animais foram utilizados por grupo. **Ver Apêndice Q**. ***p*<0.01; ****p*<0.001.

4.9 Atividade fagocítica de macrófagos alveolares

Ensaios *in vitro* foram realizados para verificar a capacidade fagocítica dos macrófagos alveolares de animais diabéticos e não-diabéticos em culturas infectadas por leveduras de Pb18 com e sem a presença de insulina exógena.

Após 4 horas de interação, observa-se que macrófagos de animais diabéticos tiveram reduzido índice fagocítico quando comparados aos não diabéticos (**Figura 27A**). Tal resultado é comprovado pela reduzida carga fúngica encontrada após a lise das células (**Figura 27B**). A diferença foi ainda mais significativa após 12 horas de interação, onde a presença de insulina no meio de cultura ajudou a recuperar a capacidade fagocítica dos macrófagos diabéticos. A maior internalização das leveduras pelos macrófagos diabéticos foi comprovada nos resultados de CFU (**Figura 27D**). Em resultados obtidos após 24 horas de interação, vê-se que o índice fagocítico se manteve reduzido em macrófagos de animais diabéticos, e também que o tratamento de insulina resultou em maior internalização das leveduras (**Figuras 27E** e **27F**).

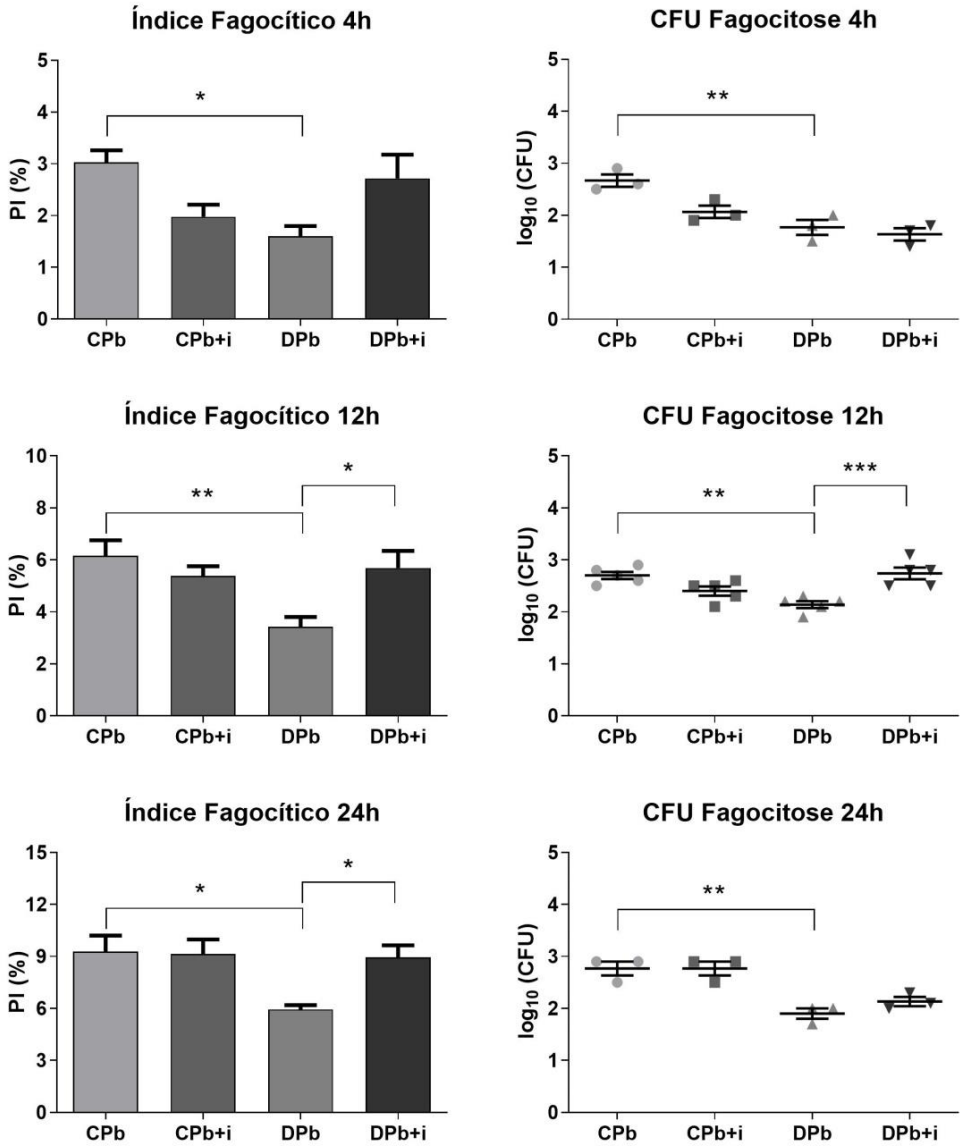


Figura 27. Índice fagocítico e CFU de Fagocitose. Animais foram tornados diabéticos por injeção de aloxana (60 mg/kg i.v.) e tiveram seus macrófagos alveolares coletados por lavado broncoalveolar, Em cultura, macrófagos foram infectados com leveduras do *P. brasiliensis* em proporção de 1:1. Lamínula e sobrenadante a ser plaqueado em BHI + 5% SFB foram colhidos 4h, 12h ou 24h de interação. Os valores representam media ± EPM. (A n=4-5; B n=3; C n=6-7; D n=5; E n=5; F n=3) V**er Apêndice R**. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

5. DISCUSSÃO

Em suma, os resultados apresentados neste trabalho sugerem que camundongos tornados diabéticos têm sua função imunológica debilitada perante o estímulo inflamatório decorrente da infecção por Pb. Tal sugestão é evidenciada pela reduzida expressão de molécula de adesão (VCAM-1) e menor presença de determinadas populações de células inflamatórias (CD4+, CD8+, CD80+, NK1.1+ e CD19+) e um padrão inflamatório debilitado de citocinas no sítio principal da infecção desde o início da inflamação, gerando eliminação menos eficiente do agente patológico no pulmão e resultando em maior carga fúngica recuperável dos pulmões de animais diabéticos.

Vimos ainda que o tratamento de insulina em DM1 já estabelecido tem efeitos modulatórios sobre alguns aspectos da inflamação em animais diabéticos. Nas etapas iniciais da inflamação, o tratamento com insulina resultou em maior aporte de leucócitos no foco inflamatório, aumentando a secreção de IL-6, MCP-1 em animais diabéticos. Quando administrado em fases crônicas da infecção, além de aumentar a expressão de moléculas de adesão e a presença de células no pulmão, o tratamento também aumentou as populações de linfócitos B e células dendríticas no pulmão (CD19+, CD80+), promovendo também a redução da inflamação exacerbada encontrada em animais diabéticos infectados em 45 dias.

O DM compreende um grupo de doenças com grande incidência mundial, dentro do qual o DM1 compreende de 8% a 12% dos casos (IDF, 2017) e tem sua prevalência aumentada em comparação ao DM2 (WHO, 2016). Tendo como característica principal a destruição irreversível das células β-pancreáticas produtoras de insulina, o principal tratamento para o DM envolve a administração subcutânea de insulina exógena (SBD, 2017-2018). A função principal da insulina é a sua ação hipoglicemiante, ou seja, é o hormônio que regula a captação de moléculas de glicose pela maioria dos tecidos (ATKINSON *et al.*, 2014). Sem esta regulação, a contínua absorção de glicose pela alimentação e o reduzido transporte da mesma para dentro das células culmina com a hiperglicemia que, característica do DM, é base para as muitas complicações do quadro diabético em longo prazo (SBD, 2017-2018).

Diversos estudos relacionam a carência relativa de insulina da DM1 a disfunções na qualidade da resposta imunológica do paciente, com reduzida interação leucócito-endotélio e consequente reduzida migração de leucócitos para o foco inflamatório (revisto por SUNAHARA *et al.*, 2012). Portanto, como portadores de imunidade menor do que ideal, pacientes diabéticos apresentam maiores riscos de infecções nosocomiais, de tratos respiratório e urinário (PELEG *et al.*, 2006), de tecidos cutâneos, ósseos e doenças fúngicas (CAREY *et al.*, 2018). Dados como este evidenciam a importância de estudos relacionando o estado insulinopênico e o comprometimento imunológico mediante diferentes estímulos inflamatórios.

O modelo de DM1 experimental escolhido para este trabalho se baseia no efeito citotóxico da aloxana que causa lesões irreversíveis nas células β-pancreáticas através da geração de espécies reativas de oxigênio (SZKUDELSKI, 2001). A aloxana foi escolhida devido a toxicidade para células linfoides anteriormente demonstrada pelo uso de estreptozotocina, outra droga diabetogênica vastamente utilizada (GAULTON *et al.*, 1985; WELLHAUSEN, 1986). Considerando o objetivo deste trabalho de avaliar o efeito de insulina na resposta inflamatória à infecção crônica, acredita-se que a alteração imunológica causada pela estreptozotocina ao causar dano ao timo venha a interferir nos resultados, de modo que a aloxana é melhor indicada para o estudo. A dose de aloxana para indução de DM1 estável em ratos Winstar estava padronizada em 42mg/kg de animal (MARTINS, *et al.*, 2010a; MARTINS, *et al.*, 2010b) ou em 50mg/kg de animal em camundongos da linhagem C57Bl/6 (SPILLER *et al.*, 2012). Nosso grupo adotou e padronizou a indução de DM1 em camundongos C57Bl/6 utilizando a dose de 60mg/kg por via endovenosa (CASAGRANDE *et al.*, 2018).

Nos presentes experimentos, observa-se que a administração endovenosa de aloxana levou camundongos machos C57Bl/6 a apresentarem características já consolidadas do DM1: concentrações plasmáticas de glicose e significativa redução do ganho de massa corporal, além de outros sinais característicos do DM1, como aumentado consumo de água e ração, aumento no volume urinário observado, alterações na pelagem e relativa apatia quando comparados aos animais dos grupos não diabéticos. Tais aspectos permaneceram até o final do período de experimentação, seja de 12, 20 ou 55 dias após a administração da aloxana,

comprovando a eficiência na reprodução de um modelo de indução de DM1 do tipo idiopático, ou seja, destruição das células pancreáticas sem que haja o início e desenvolvimento de uma resposta auto-imune. Dez dias após a injeção aloxana, observou-se elevados níveis de glicose no sangue e reduzido ganho de peso quando comparados aos animais do grupo controle, caracterizando o sucesso de um modelo de DM1 em camundongos. Em amostras e medidas obtidas 55 dias após a injeção da aloxana (45 dias após inoculação do fungo), vimos que as características do DM1 se mantiveram estáveis, e é razoável sugerir que o estado insulinopênico se manteve durante todo o período de incubação do fungo, como havia ocorrido em estudo anterior já publicado (CASAGRANDE *et al.*, 2018).

Para melhor explicitar a interferência da insulina na resposta mediante o estímulo inflamatório, utilizamos um modelo de “resgate”, administrando insulina exógena em animais diabéticos e não diabéticos. Dos tipos de insulina existentes para tratamento, neste estudo utilizamos a insulina NPH, cuja curva cinética dose-resposta já era conhecida neste modelo e possui liberação prolongada. DiPetta e colaboradores (2011) e Anjos-Valotta e colaboradores (2006) observaram em seu estudo que, em modelos murinos, o tratamento com múltiplas doses de insulina provou ser mais eficaz para observação de seus efeitos sobre inflamações crônicas em animais diabéticos. Neste protocolo, realizamos tratamentos diários durante 12 dias no início da noite devido aos hábitos noturnos e metabolismo mais acelerado dos camundongos. A dose de insulina injetada em cada camundongo seguiu o modelo padronizado de Spiller (2012) para que o hormônio estivesse presente sem que tornasse os animais normoglicêmicos. Desse modo, os animais receberam dosagens relativas aos seus níveis glicêmicos e, como conseguinte, a suplementação de insulina não promoveu efeitos nocivos aos animais não diabéticos e não houve óbitos relacionados à hipoglicemia neste trabalho. Nos animais diabéticos, porém, a atividade da insulina foi mais evidente: níveis de glicose sanguínea de animais tratados com insulina foram consideravelmente reduzidos, embora os animais mantivessem a hiperglicemia (glicose > 300mg/dL). Além disso, animais diabéticos que receberam o tratamento diário de insulina por 12 dias apresentaram significativo aumento no ganho de peso durante o período de tratamento, diferente do que aconteceu com os animais diabéticos não tratados, com ou sem a infecção do fungo. Tal achado nos leva a

sugerir que a insulina, mesmo quando não administrada em quantidade suficiente para reverter o quadro de hiperglicemia, tem efeitos no metabolismo energético dos animais diabéticos.

Como descrito anteriormente, animais diabéticos mostraram diferentes capacidades de promover respostas inflamatórias mediante diferentes estímulos. O estímulo inflamatório escolhido para este trabalho foi a inflamação crônica pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, fungo endêmico em todos os países da América Latina e ao qual se atribui a quinta principal causa de morte por infecções nas regiões Sudeste e Sul do Brasil (COUTINHO *et al.*, 2002)

A eficiência da resposta do sistema imunológico ao agente patológico, assim como a natureza do agente em questão, são fatores determinantes da natureza e severidade da doença na maior parte das infecções fúngicas (HUFFNAGLE & DEEPE, 2003; MEDZHITOV & JANEWAY, 1997; ROMANI, 2011). No caso do Pb, os mecanismos inatos e o funcionamento adequado de fagócitos são de extrema importância para a defesa do hospedeiro (LOUIE *et al.*, 1994; SMITH *et al.*, 1990). Outro fator importante para o sucesso da infecção é o ambiente inflamatório encontrado pelo fungo no momento da implantação deste no tecido pulmonar: enquanto a resposta inflamatória inicial ao agente é caracterizada com presença maior das citocinas do perfil Th1 (IL-12, IFN-γ, IL-2), a progressão da doença é caracterizada pelo silenciamento deste perfil através de aumento da produção e secreção de IL-4, IL-5 e IL-10, ou seja, promoção de uma resposta Th2, que não será protetora ao organismo (BENARD *et al.*, 2001).

A fim de comparar as respostas inflamatórias de animais sadios e diabéticos contra o Pb, realizamos a injeção intratraqueal de leveduras suspensas em PBS conforme descrito anteriormente (DEFAVERI *et al.*, 1982; TABORDA *et al.*, 1998), em uma concentração de $1x10^6$ leveduras em 60µL de PBS (FERREIRA *et al.*, 2007). A infecção foi realizada após indução e estabilização do estado diabético para que se pudesse avaliar o desenvolvimento desta em ambiente insulinopênico, e então com administração da insulina. Escolhemos analisar pontos de uma curva cinética da infecção, nos permitindo acessar os parâmetros inflamatórios em 24 horas, 20 dias e 45 dias após a infecção.

Após 10 dias de DM e 24 horas de infecção, observa-se reduzida secreção de IFN-γ e de IL-12 por animais diabéticos quando comparados a infectados não diabéticos. São citocinas bastante características da resposta inflamatória aguda causada pela infecção do Pb, ambas relacionadas à ativação dos processos de fagocitose e destruição do fungo (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Benard e colaboradores observaram em 2001 que uma resposta do tipo Th1, rica em IFN-γ e IL-12, está relacionada com resolução da infecção ainda em sua fase subclínica, sem o aparecimento de sintomas, enquanto os trabalhos de Souto e colaboradores (2003) demonstraram o envolvimento do IFN-γ na modulação do recrutamento de leucócitos durante uma infecção por Pb: camundongos deficientes de IFN-γ apresentaram reduzida migração de linfócitos e macrófagos para os pulmões, rendendo-os mais susceptíveis à infecção (SOUTO *et al.*, 2003). Tristão e colaboradores descreveram em 2017 a importância de presença de IL-6, assim como de IL-23, para a formação e maturação de granulomas em estágios iniciais de PCM em camundongos, enquanto TNF-α é conhecido por seu papel importante como parte importante do mecanismo de defesa inata em casos de PCM tanto em humanos quanto em camundongos, promovendo tanto a limitação do fungo ao local de inoculação pela formação de granulomas quanto estimulando a produção de outras citocinas inflamatórias (FLORY *et al.*, 1995; FORTES *et al.*, 2011). Desse modo, pode-se observar que a inflamação aguda observada em animais diabéticos foi reduzida e, portanto, menos eficiente quando comparada a de animais não diabéticos. Ao promover uma migração maior de leucócitos para o foco pulmonar e secreções aumentadas de IFN-γ e IL-12, além de aumento de IL-6, MCP-1 e TNF-α, a dose única de insulina em animais diabéticos resultou em uma resposta aguda mais acentuada e possivelmente mais eficiente contra o Pb18.

Alterações nas populações celulares não foram observadas entre os grupos em 24 horas de infecção. No entanto, quando avaliada após 45 dias de incubação, diferenças maiores foram encontradas envolvendo os fenótipos celulares encontrados e a expressão de moléculas de adesão por vasos pulmonares. A migração celular tem função extremamente importante na resposta imunológica, permitindo que leucócitos deixem os vasos sanguíneos em direção ao foco inflamatório. Em uma infecção por Pb, a presença de macrófagos e o aporte de células TCD4+, TCD8+ e células NK é

particularmente importante para conter a proliferação do agente etiológico, assim limitando a infecção (CALICH & BOLTTA, 2005; CHIARELLA, *et al*., 2007; ARRUDA *et al*., 2007). A importância da presença de linfócitos B também foi evidenciada: camundongos deficientes em linfócitos B apresentaram menor taxa de sobrevivência e maior carga fúngica nos pulmões (TRISTÃO *et al.*, 2013). O envolvimento dos linfócitos B também está associado ao controle do crescimento do agente patológico e na organização dos granulomas que os contém em doenças granulomatosas (VIGNA *et al.*, 2006; TSAI *et al.*, 2006).

No presente trabalho, animais diabéticos apresentaram reduzidas populações de linfócitos TCD4+, TCD8+, linfócitos B, células dendríticas e NK e, talvez consequentemente, apresentaram cronificação da inflamação evidenciada por níveis aumentados de IFN-γ e TNF-α no pulmão acompanhados de maiores cargas fúngicas recuperadas dos pulmões de animais diabéticos, indicando que o tecido passava, aos 45 dias de infecção, por uma inflamação intensa devido à grande proliferação do fungo. O tratamento com insulina resultou não apenas em restabelecimento da população de linfócitos B, mas também em melhorada capacidade de apresentação de antígenos, evidenciada pelo aumento da expressão molécula coestimulatória CD80 por células apresentadoras de antígenos. Como conseguinte, concentrações das citocinas pró-inflamatórias IFN-γ e TNF-α também foram encontradas reduzidas em animais diabéticos tratados com insulina.

A fim de estudar mecanismos que elucidassem a variação da migração celular para o foco pulmonar, analisamos a expressão de moléculas de adesão mais relacionadas a inflamações crônicas. Estudos anteriores mostram disfunções em migração celular relacionadas a moléculas de adesão em casos de DM1: Sharma e colaboradores viram em 2016 que, comparados a controles, pacientes diabéticos acometidos de retinopatia apresentavam concentrações aumentadas de TNF-α e ICAM-1, enquanto diabéticos que sofriam de doenças renais crônicas mostraram aumento de IL-6, MCP-1 e VCAM-1, ambos estudos indicando maiores expressões destas moléculas resultantes de patologias decorrentes do quadro diabético (SHARMA *et al*., 2016; TRIÑANEZ *et al*., 2012). Por outro lado, redução da secreção de TNF-α e IL-1β, assim como menores expressões de ICAM-1 em resposta a estímulos externos por TNF-α recombinante em ratos diabéticos comparados a

controles (ANJOS-VALOTTA *et al.*, 2006), assim como expressões de moléculas de adesão endotelial produzida por plaquetas (*platelet endothelial cell adhesion molecule*; PECAM)-1, ICAM-1 e P-selectina em mesentérios de ratos diabéticos infectados por *Staphylococcus aureus* (DE SOUZA *et al.*, 2019). No presente estudo, vasos pulmonares de animais diabéticos infectados pelo Pb18 apresentaram reduzidas expressões de VCAM-1 em seus endotélios quando comparados aos não-diabéticos infectados. O tratamento de doze doses de insulina restaurou esta expressão em animais diabéticos, que também mostraram aumento no aporte de leucócitos ao pulmão. Por outro lado, o aumento significativo de CINC-1 foi observado em homogenatos de baços e fígados de animais diabéticos e não-diabéticos infectados pelo Pb18. Quimiocinas como o CINC-1 são conhecidas como potentes mediadores inflamatórios da quimiotaxia de macrófagos e neutrófilos, guiando-os para o foco intersticial mediante estímulo por TNF-α (WATANABE *et al.*, 1989; JANG & RABB, 2015). O tratamento com insulina reduziu a presença desta quimiocina no baço de animais não-diabéticos, mas diferenças nas concentrações celulares no baço deste grupo não foram observadas.

Buscando compreender o efeito da insulina em fagócitos migrados para o foco inflamatório, analisamos a expressão de moléculas da via de sinalização em homogenato pulmonar. Proteínas da via de sinalização das MAPK têm participação importante na ativação e diferenciação de linfócitos T (DONG *et al.*, 2002). Estudos sugerem que a fosforilação da ERK está relacionada com a polarização de células T para o perfil Th2 (KLOTZ *et al.*, 1999), enquanto a fosforilação da p38 favorece a polarização para o perfil Th1 (DESBOIS-MOUTHON *et al.*, 1998; CHUANG *et al.*, 1999). Viardot e colaboradores demonstraram em 2007 que insulina promovia diferenciação de linfócitos T para Th2, reduzindo a proporção de células Th1 e a razão IFN-γ/IL-4. Esses resultados foram relacionados a aumento na pERK e redução da p-p38 (VIARDOT *et al.*, 2007). No presente trabalho, em amostras de 45 dias após a infecção com Pb18, o tratamento de insulina resultou em reduzida fosforilação da ERK, apenas em animais não-diabéticos, enquanto a fosforilação da p38 foi encontrada inalterada. No entanto, os outros resultados encontrados não corroboram com uma redução de um perfil Th2: a expressão relativa de IL-4 foi aumentada nos pulmões deste grupo, enquanto concentrações de IFN-γ estavam reduzidas.

Outro fator crucial utilizado pelo organismo em resposta a micoses sistêmicas é a capacidade de fagocitose e destruição do agente etiológico pelas células do sistema imunológico inato (ROMANI *et al.*, 2011). É o caso da PCM induzida pelo Pb, pois a resposta Th1, considerada protetora ao hospedeiro em detrimento à propagação da infecção, culmina com fagocitose e destruição do agente por células ativadas por IFN-γ, TNF-α e IL-12 (BENARD *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002). Neste trabalho, MA de camundongos diabéticos desafiados com leveduras de Pb18 mostraram atividades fagocíticas reduzidas nos três períodos de interação avaliados (4h, 12h e 24h). Resultados similares foram apresentados por estudos envolvendo fagócitos de modelos animais de DM1: macrófagos de camundongos diabéticos apresentaram atividade fagocítica reduzida quando desafiados com *Salmonella typhimurium* (KOLEY *et al.* 2017), assim como neutrófilos de ratos diabéticos foram menos eficientes contra leveduras de *Candida albicans* (DE SOUZA FERREIRA *et al.*, 2012). A disfunção fagocítica observada em diabéticos foi previamente associada às mudanças no metabolismo celular. Alba-Loureiro (2006) e colaboradores observaram a atividade fagocítica de neutrófilos de ratos diabéticos, previamente reduzida, ser restaurada por tratamento com insulina, enquanto os estudos de Yano e associados descrevem que tanto a atividade fagocítica quanto a capacidade bactericida de neutrófilos de camundongos diabéticos contra *Staphylococcus aureus* foi aumentada por um tratamento de insulina (YANO *et al.*, 2012). Tais dados corroboram com os resultados observados por este trabalho, onde a atividade fagocítica de macrófagos alveolares de camundongos diabéticos foi restaurada pela adição de insulina o meio de cultura nos tempos de 12h e 24h de interação com leveduras do Pb18.

A relação entre o DM e defeitos nas respostas inflamatórias é um assunto abordado com frequência em estudos do sistema imunológico, juntamente com os efeitos modulatórios que a insulina apresenta. No entanto, enquanto conclusões sobre as disfunções observadas em pacientes e modelos de DM sejam bastante consistentes, o mecanismo por trás da influência da insulina nestes não foi completamente elucidado e ainda gera discussão. Tendo como base os resultados obtidos pelo presente trabalho, pode-se inferir a maior susceptibilidade de camundongos diabéticos à PCM, evidenciada pela reduzida capacidade de resposta observada desde a fase inicial da infecção (menor secreção de citocinas pró-

inflamatórias, menor atividade fagocítica de MA) que, não compensada, leva a uma resposta menos efetiva (menor expressão de moléculas de adesão, reduzidas populações de linfócitos TCD4+, TCD8+, células NK) e a um pior prognóstico a longo prazo (cronificação da inflamação, carga fúngica aumentada). Ainda, pode-se sugerir que o tratamento com insulina modulou o microambiente inflamatório de animais diabéticos para um papel mais efetor na fase aguda da inflamação (maiores secreções de citocinas pró-inflamatórias) e, na fase mais tardia, para um papel mais protetor ao organismo, priorizando a prevenção da disseminação do agente infeccioso (restauração das moléculas de adesão e das populações celulares) e a resolução da resposta inflamatória (redução da inflamação crônica).

6. CONCLUSÃO

Observados em conjunto, resultados obtidos por este estudo nos permitem sugerir que a insulina apresenta efeitos modulatórios distintos em diferentes fases da infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* em camundongos tornados diabéticos.

Vimos ainda que:

a) camundongos tornados diabéticos apresentam maior susceptibilidade à infecção por Pb18, apresentando respostas inflamatórias ineficientes nas fases aguda e tardia da infecção e apresentando maior proliferação do fungo no pulmão;
b) nestes animais diabéticos, a insulina modula a resposta inflamatória aguda, tornando-a mais efetora ao promover maior celularidade, maior secreção de INF-γ e IL-12 e maior atividade fagocítica em macrófagos;
c) na fase tardia desta infecção, o tratamento com insulina torna a resposta mais protetora ao organismo, restaurando a expressão de moléculas de adesão e celularidades, as populações celulares de linfócitos B e células NK, e reduzindo os níveis de INF-γ e TNF-α da inflamação crônica.

REFERÊNCIAS

ALBA-LOUREIRO, T. C.; HIRABARA, S. M.; MENDONÇA, J. R.; CURI, R. PITHON-CURI, T. C. **Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils.** *The Journal of Endocrinology*, 188(2):295-303, 2006.

ALMEIDA, F. P. **Estudos comparativos do granuloma coccidiótico nos Estados Unidos e no Brasil: um novo gênero para o parasito brasileiro.** *An Fac Med S. Paulo, 5*: 125-41, 1930.

ANJOS-VALOTTA, E. A.; MARTINS, J. O.; OLIVEIRA, M. A.; CASOLARI, D. A.; BRITTO, L. R. G.; TOSTES, R. C.; FORTES, Z. B.; SANNOMIYA, P. **Inhibition of tumor necrosis factor-α-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in diabetic rats: role of insulin**. *Inflamm Res,* 55: 16-22, 2006.

ARRUDA, C.; KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; CALICH, V. L. G. **A primary subcutaneous infection with *Paracoccidioides brasiliensis* leads to immunoprotection or exacerbated disease depending on the route of challenge**. *Microbes and Infection*, 9:308-316, 2007.

ATKINSON, M. A; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. **Type 1 diabetes.** *Lancet,* 393:69-82, 2014.

AYALA, T. S.; TESSARO, F. H. G.; JANNUZZI, G. P.; BELLA, L. M.; FERREIRA, K. S.; MARTINS, J. O. **High glucose environments interfere with bone marrow-derived macrophage inflammatory mediator release, the TLR4 pathway and glucose metabolism**. *Sci Rep*, 9(1):1-15, 2019.

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 pulmonar cavities in alloxan-diabetic mice.** *Biomed Res Int,* 2017: 7651815, 2017.

BENARD, G.; ROMANO, C. C.; CACERE, C. R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANNINI, M. J.; DUARTE, A. J. **Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis**. *Cytokine*, 13:248-52, 2001.

BENSINGER, J. S. & TONTONOZ, P. **Integration of metabolism and inflammation by lipid-actived nuclear receptors**. *Nature*, 454, 2008.

CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. M.; SIQUEIRA, A. M.; BURGER, E. **Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*.** *Br J Exp Path,* 66:585-94, 1985.

CALICH, V. L. G.; BLOTTA, M. H. S. L. **Pulmonary paracoccidioidomycosis**. In FIDEL, P. L.; HUFFNAGLE, G. B. **Fungal Immunity: From an organ perspecitve**. New York: Springer, 201-228, 2005.

CALICH, V. L.; PINA, A.; FELONATO, M.; BERNARDINO, S.; COSTA, T. A., LOURES, F. V.; **Toll-like receptors mand fungal infections: the role of TLR-2, TLR-4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 53:1-7, 2008.

CAREY, I. M.; CRITCHLEY, J. A.; DEWILDE, S.; HARRIS, T.; HOSKING, F. J.; & COOK, D. G. **Risk of infection in type 1 and type 2 diabetes compared with the general population: a matched cohort study.** *Diabetes Care,* 41(3): 513-521, 2018.

CASAGRANDE, F. B.; FERREIRA, S. S.; NUNES, F. P. B.; ROMERA, L. M. D.; SANTOS, S. S.; TESSARO, F. H. G.; DE SOUZA, P. R. K.; ALMEIDA, S. R.; MARTINS, J. O. **Insulin modulates *Paracoccidioides brasiliensis*-induced inflammation by restoring the populations of NK cells, dendritic cells and B lymphocytes in lungs.** *Journal of Diabetes Research* 2018, 2018.

CASTRO, L. F.; FERREIRA, M. C.; SILVA, R. M.; BLOTTA, M. H.; LONGHT, L. N.; MAMONI, R. L. **Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis.** *J Infect,* 67(5):470-85, 2013.

CAVASSANI, K. A.; TRISTAO, F. S. M.; OLIVEIRA, L. L.; ROCHA, F. A.; VANCIM, J. O. *et al*. **Cell-free antigens from *Paracoccidioides brasiliensis* drive IL-4 production and increase the severity of Paracoccidioidomycosis**. *PLoS ONE,* 6(6): e21423, 2011.

CHIARELLA, A.P.; ARRUDA, C.; PINA, A.; COSTA, T.A.; FERREIRA, R.C.V.; CALICH, V.L.G. **The relative importance of CD4 and CD8 T cells in immunity to pulmonary paracoccicioidomycosis*.*** *Microbes and Infections*, 9:1078-1088, 2007.

CHUANG, S. M.; WANG, I. C.; YANG, J. L. **Roles of JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases in the growth inhibition and apoptosis induced by cadmium**. *Carcinogenesis,* 21(7):1423-32, 2000.

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

COUTINHO SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P.; WANKE, B. **Paracoccidioidomycosis mortality in Brasil** (1980-1995). *Cad Saúde Pub***,** 18(5):1441-1454, 2002.

COUTINHO, Z. F.; WANKE, B.; TRAVASSOS, C.; OLIVEIRA, R. M.; XAVIER, D. R.; COIMBRA, J. R. C. E. **Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998-2006)**. *Trop Med Int Health*, 20(5):673-80, 2015.

DALL, T. M.; YANG, W.; HALDER, P.; et al. **The economic burden of elevated blood glucose levels in 2012: diagnosed and undiagnosed diabetes, gestational diabetes mellitus, and prediabetes**. *Diabetes Care,* 37:3172-9, 2014.

DE OLIVEIRA MARTINS, J.; MEYER-PFLUNG, A. R.; ALBA-LOUREIRO, T. C.; MELBOSTAD, H.; COSTA DA CRUZ, J. W.; COIMBRA, R.; CURI, R.; SANNOMIYA, P. **Modulation of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation: Role of insulin**. *Shock*, 25:428, 2006.

DE SOUZA, P. R. K.; FERREIRA, S. S.; NUNES, F. P. B.; CASAGRANDE, F. B.; TESSARO, F. H. G.; SILVA, M. C. F.; CRUZ, J. W. M. C.; MAMIZUKA, E. M.; MARTINS, J. O. **Cytokine mand adhesion molecule expression induced by different strains of *Staphylococcus aureus* in type 1 diabetic rats.** *Frontiers in Immunology,* 9:1-13, 2019.

DE SOUZA FERREIRA, C.; ARAÚJO, T. H.; ÂNGELO, M. L.; PENNACCHI, P. C.; OKADA, S. S.; DE ARAÚJO PAULA, F. B.; MIGLIORINI, S.; RODRIGUES, M. R. **Neutrophil dysfunction induced by hyperglycemia: modulation of myeloperoxidase activity.** *Cell biochemistry and function,* 30(7):604-610, 2012.

DESBOIS-MOUTHON C.; BLIVET-VAN EGGELPOEL M.J.; AUCLAIR M.; CHERQUI G.; CAPEAU, J.; CARON, M. **Insulin differentially regulates SAPKs/JNKs and ERKs in CHO cells overexpressing human insulin receptors.** *Biochem Biophys Res Commun*, 24; 243(3):765-70, 1998.

DEFAVERI, J.; REZKALLAH-IWASSO, M. T.; FRANCO, M. F.; **Experimental pulmonary paracoccidioidomycosis in mice: morphology and correlation of lesions with humoral and cellular immune response.** *Mycopathologia,* 77:3-11, 1982.

DI PETTA, A.; GRECO, K. V.; CASTRO, E. O.; LOPES, F. D. T. Q. S.; MARTINS, M. A.; CAPELOZZI, V. L. *et al*. **Insulin modulates inflammatory and repair responses to elastase-induced emphysema in diabetic rats**. *Int J Exp Path*, 92:392-9, 2011.

DONG, C.; DAVIS, RJ.; FLAVELL, R.A. **MAP kinases in the immune response.** *Annu Rev Immunol,* 20:55-72, 2002.

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

FERRACINI, M.; MARTINS, J. O.; CAMPOS, M. R. M.; ANGER, D. B. C.; JANCAR, S**. Impaired phagocytosis by alveolar macrophages from diabetic rats is related to the deficient coupling of LTs to the FcγR signaling cascade**. *Mol Immunol*, 47:1974-80, 2010.

FERREIRA, K. S.; BASTOS, K. R.; RUSSO, M.; ALMEIRA, S. R. **Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin-**

10 production and Toll-like Receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. *Jor Infect Dis*, 196:1108-1115, 2007.

FERREIRA, S. S.; NUNES, F. P. B.; CASAGRANDE, F. B.; MARTINS, J. O. **Insulin modulates cytokine release, collagen and mucus secretion in lung remodeling of allergic diabetic mice.** *Frontiers in Immunmology,* 8:1-10, 2017.

FLORY, C. M.; JONES, M. L.; MILLER, B. F.; WARREN, J. S.; **Regulatory roles of tumor necrosis factor-a and interleukin 1b in chemoattractant protein-1 mediated granuloma formation in the rat.** *Am J Pathol,* 146:450-462, 1995.

FORTES, M. R. P.; MIOT, H. A.; KUROKAWA, C. S.; MARQUES, M. E. A. M.; MARQUES, S. A. **Imunologia da paracoccidioidomicose**. *An Bras Dermatol,* 86(3), 2011.

FRANCO, M.; MONTENEGRO M. R.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; DILLON, N. L.; MOTA, N. G.; **Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms.** *Rev Soc Bras Med Trop,* 20(2):129-32, 1987.

GAULTON, G. N.; SCHWARTZ, J. L.; EARDLEY, D. D. **Assessment of the diabetogenic drugs alloxan and streptozotocin as model for the study of immune defects in diabetic mice.** *Diabetologia*, 28(10):769-775, 1985.

HAHN, R. C.; RODRIGUES, A. M.; FONTES, C. J.; NERY, A. F.; TADANO, T.; QUEIROZ JUNIOR, L. P., *et al.* **Fatal fungemia due to *Paracoccidioides lutzii.*** *Am J Trop Med Hyg,* 91(2):394-8, 2014.

HERTZOG, P. **A Notch in the Toll Belt.** *J Immunity,* 10:663-665, 2008.

HUFFNAGLE, G. G.; DEEPE, G. S. **Innate and adaptative determinants of host susceptibility to medically important fungi.** *Curr Opin Microbiol*, 6:344-350, 2003.

IMAYAMA, I.; PLOTNIKOFF, R. C.; COURNEYA, K. S.; JOHNSON, J. A. **Determinants of quality of life in adults with type 1 and type 2 diabetes**. *Health Qual Life Outcomes*, 9:115, 2011.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes atlas**. 7a edição, 2017. Disponível em: <http://www.diabetesatlas.org>. Acesso em: 01 ago. 2019.

JANG, H. R; RABB, H. **Immune cells in experimental acute kidney injury**. *Nature Reviews Nephrology,* 11:88-101, 2015.

JOSHI, N.; CAPUTO, G. M.; WEITEKAMP, M. R.; KARCHMER, A. W. **Infections in pacients with *diabetes mellitus***. *New England J Med*, 341(25):1906-12, 1999.

KASHINO, S.S.; FAZIOLLI, R.A.; CAFALLI-FAVATI, I.C.; MELONI-BRUNERI, L.H.; VAZ, C.A.; BURGER, E.; SINGER, L.M.; CALICH, V.L. **Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune**

response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. *J Interferon Cytokine Res*, 20:89–97, 2000.

KLOTZ, L.O.; PELLIEUX, C.; BRIVIBA, K.; PIERLOT, C.; AUBRY, J. M.; SIES, H. **Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA.** *Eur J Biochem,* 3:917-22, 1999.

KOLEY, H.; GHOSH, P.; SINHA, R.; MITRA, S.; MUKHERJEE, P.; HOWLADER, D. R.; CHAKI, C.; NAG, D. **Mice with streptozotocin-induced hyperglycemia are susceptible to invasive enteric bacterial infection**. *Japanese journal of infectious diseases,* 70(1):111-114, 2017.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Inflamação aguda e crônica**. In: **Robbins & Cotran** – *Bases Patológicas das Doenças*. São Paulo, Editora Elsevier. 8ª edição, 2010.

KUMAR, S.; SINGH, R.; VASUDEVA, N.; SHARMA, S. **Acute and chronic animal models for the evaluation of anti-diabetic agentes**. *Cardiovasc Diabetol*, 11:9, 2012.

KVIETYS, P.; NEIL GRANGER, D. **Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation**. *Free Radical Biology & Medicine,* 52:556-592, 2012.

LENZEN, S. **The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes.** *Diabetologia*, 51(2):216-26, 2008.

LERCO, M. M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI, S. A.; PADOVANI, C. R. **Caracterização de um modelo experimental de *diabetes mellitus*, induzido pela aloxana em ratos.** Estudo clínico e laboratorial. *Acta Cirur Bras,* 18(2):132-142, 2003.

LOUIE, A.; BALTCH, A. L.; SMITH, R. P.; FRANKE, M. A.; RITZ, W. J.; SINGH, J. K.; GORDON, M. A. **Tumor necrosis factor alpha has a protective role in murine model of systemic candidiasis**. *Infect Immun*, 62:2761-2772, 1994.

MAGALHÃES, A.; FERREIRA, K. S.; ALMEIDA, S. R.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. **Prophylactic and therapeutic vaccination using dendritic cells primed with peptide 10 derived from the 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis.*** *Clin Vaccine Immunol*, 19(1):23, 2012.

MARQUES, A. S. **Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica**. *An Bras Dermatol*, 78:135-50, 2003.

MARTINEZ R. **New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology**. *J Fungi*, 3(1):1, 2017.

MARTINS, J. O.; FERRACINI, M.; RAVANELLI, N.; LANDGRAF, R. G.; JANCAR, S. **Insulin inhibits LPS-induced signaling pathways in alveolar macrophages**. *Cell Physiol Biochem,* 21:297-304, 2008a.

MARTINS, J. O.; FERRACINI, M.; RAVANELLI, N.; LANDGRAF, R. G.; JANCAR, S. **Insulin suppresses LPS-induced iNOS and COX-2 expression and NF-kB activation in alveolar macrophages**. *Cell Physiol Biochem*, 22:279-86, 2008b.

MARTINS, J. O.; ZANONI, F. L.; MARTINS, D. O.; COIMBRA, R.; KRIEGER, J. E.; JANCAR, S.; SANNOMIYA, P. **Insulin regulates cytokines and intercellular adhesion molecule-1 gene expression through NF-kappaB activation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats**. *Shock,* 31:404-409, 2009.

MARTINS, J. O.; FERRACINI, M.; ANGER, D. B. C.; MARTINS, D. O.; RIBEIRO JR, L. F.; SANNOMIYA, P.; JANCAR, S. **Signaling pathways and mediators in LPS-induced lung inflammation in diabetic rats: Role of insulin**. *Shock*, 33(1):76-82, 2010.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. **Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition**. *Cell*, 91:295-308, 1997.

MORDES, J. P.; BORTELL, R.; BLANKENHORN E. P.; ROSSINI, A. A.; GREINER. **Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity**. *ILAR Journal*, 45:4, 2004.

MOREIRA, A. P. V. **Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos.** Boletim Epidemiológico Paulista, 51(5):11-24, 2008.

MOUTZOURI, A. G.; ATHANASSIOU, G. A.; DIMITROPOULOU, D.; SKOUTELIS, A. T.; GOGOS, C. A. **Severe sepsis and *diabetes mellitus* have additive effects on red blood cell deformability**. *J Infect,* 57:147-51, 2008.

MULLER, W. A. **Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes**. *Circ Res*, 105:223-230, 2009.

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 1 diabetes rat model.** *Cell Physiol Biochem,* 36(4):1467-1479, 2015.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. **Citocinas e dor**. *Rev Bras Anestesiol*, 61(2):255-265, 2011.

OLIVEIRA, S. J.; MARMONT, R. L.; MUSATTI, C. C.; PAPALORDANOU, P. M.; BLOTTA, M. H. **Cytokines and lymphocyte proliferation in juveline and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected an non-infected controls.** *Microbes Infect,* 4(2):139-44, 2002.

PANG, W. W.; PLUVINAGE, J. V.; PRICE, E. A.; SRIDHAR, K.; ARBER, D. A.; GREENBERG, P. L.; SCHRIER, S. L.; PARK, C. Y.; WEISSMMAN, I. L. **Hematopoietic stem cell and progenitor cell mechanisms in myelodyplasplastics syndromes.** *PNAS,* 110(8):3011-16, 2013.

PANNEERSELVAM, S. & GOVINDASAMY, S. **Sodium molybdate improves the phagocytic function in alloxan-induced diabetic rats**. *Chemico-Biological Interactions*, 145(2):159-63, 2003.

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

RESTREPO, A.; SALAZAR, M. E.; CANO, L. E.; STOVER, E. P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D. A. **Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus Paracoccidioides brasiliensis: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis**. *Infect Immun*, 46:346-353, 1984.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTANEDA, E. **The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle?** *Med Myc,* 39(3):233-41, 2001.

RODRIGUES, S. F.; TRAN, E. D.; FORTES, Z. B.; SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. **Matrix metalloproteinases cleave the β2-adrenergic receptor in spontaneously hypertensive rats.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299(1):H25-H35, 2010.

ROHILLA, A.; ALI, S. **Alloxan induced diabetes: Mechanisms and effects**. *Int J Res Pharmac Biomed Sci*, 3(2):819-23, 2012.

ROMANI, L. **Immunity to fungal infections**. *Nat Rev Immunol*, 4:1-23, 2011.

SEREZANI, C. H. C.; ARONOFF, D. M.; JANCAR, S.; MANCUSO, P. PETERS-GOLDEN, M. **Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *klebsiela pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase.** *Blood,* 106(3):1067-75, 2005.

SCHMITTEN, T. MD.; LIVAK, K. J.; **Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method.** *Nature protocols*, 2008.

SHARMA, S.; PUROHIT, S.; SHARMA, A.; HOPKINS, D.; STEED, L.; BODE, B.; ANDERSON, S.W.; CALDWELL, R.; & SHE, J. X. **Elevated serum levels of soluble TNF receptors and adhesion molecules are associated with diabetic retinopathy in patients with type-1 diabetes**. *Med Inf,* 2015, 2015

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; QUEIROZ-TELLES, F. de; KONO, A. S. G.; PANIAGO, A. M. M.; *et al.* **Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis.** *Rev Soc Bras Med Trop,* 50(4):1-26, 2017.

SILVANA DOS SANTOS, S.; FERREIRA, K. S.; ALMEIDA, S. R. ***Paracoccidioides brasiliensis*-induced migration of dendritic cells and subsequent t-cell activation in the lung-draining lymph nodes.** *PLoS One,* 6(5):e19690, 2011.

SMITH, J.G.; MAGEE, D.M.; WILLIANS, D.M.; GRAYBILL, J.R. **Tumor necrosis factor alpha plays a role in host defense against *Histoplasma capsulatum*.** *J Infect Dis*, 162:1349-1353, 1990.

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

SOUTO, J. T.; ALIBERTI, J. C.; CAMPANELLI, A. P.; LIVONESI, M. C.; MAFFEI, C, M. L.; FERREIRA, B. R.; TRAVASSOS, L. R.; MARTINEZ, R.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. **Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-γ.** *American Journal of Pathology,* 163(2):583-590, 2003.

SPILLER, F.; CARLOS, D.; SOUTO, F. O.; DE FREITAS, A.; SOARES, F. S.; VIEIRA, S. M.; PAULA, F. J.; ALVES-FILHO, J. C.; CUNHA, F. Q. **α1-Acid glycoprotein decreases neutrophil migration and increases susceptibility to sepsis in diabetic mice**. *Diabetes*, 61(6):1584-91, 2012.

SUNAHARA, K. K. S.; SANNOMIYA, P.; MARTINS, J. O. **Briefs on Insulin and Innate Immune Response.** *Cell Physiol Biochem*, 29:01-08, 2012.

SUNAHARA, K. K. S.; MARTINS, J. O. **Alveolar macrophages in diabetes: friends or foes?** *J Leuk Biol,* 91, 2012

SUNAHARA, K. K.; NUNES, F. P.; BAPTISTA, M. A.; STRELL, C.; SANNOMIYA, P.; WESTERBERG, L. S.; & MARTINS, J. O. **Insulin influences autophagy response distinctively in macrophages of different compartments.** *Cell Physiol Biochem*, 34(6):2017-2026, 2014.

SZKUDELSKI, T. **The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas**. *Physiol Res,* 50(6):536-46, 2001.

TABORDA, C. P.; JULIANO, M. A.; PUCCIA, R.; FRANCO, M.; TRAVASSOS, L. R. **Mapping of the T-Cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice.** *Infect and Immun,* 66(2):786-793, 1998.

TESSARO, F. H.; 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.** *Cell Physiol Biochem*, 42(5):2093-2104, 2017.

TESSARO, F. H. G.; AYALA, T. S.; BELLA, L. M.; MARTINS, J. O. **Macrophages from a type 1 diabetes mouse model present dysregulated PI3K/AKT, ERK 1/2 and SAPK/JNK levels**. *Immunobiology*, 2019 (in press).

THEODORO, R .C.; CANDEIAS, J. M. G.; ARAÚJO Jr., J. P. *et al.* **Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil**. *Med Mycol*, 43:725-9, 2005.

TRIÑANES, J.; SALIDO, E.; FERNÁNDEZ, J.; RUFINO, M.; GONZÁLEZ-POSADA, J. M.; TORRES, A.; HERNÁNDEZ, D. **Type 1 diabetes increases the expression of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in the artery wall of candidate patients for kidney transplantation.** *Diabetes Care,* 35(2):427-433, 2012.

TRISTÃO, F. S. M.; PANAGIO, L. A.; ROCHA, F. A.; CAVASSANI, K.A.; MOREIRA, A. P.; SILVA, J. S. **B cell-deficient mice display enhanced susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis* infection.** *Mycopathologia,* 176:1-10, 2013.

TRISTÃO, F. S. M.; ROCHA, F. A.; CARLOS, D.; KETELUT-CARNEIRO, N.; SOUZA, C. O. S.; MILANEZI, C. M.; SILVA, J. S. **Th17-inducing cytokines IL-6 and IL-23 are crucial for granuloma formation durin experimental paracoccidioidomycosis.** *Front Immun,* 8:949, 2017.

TSAI, M.C.; CHAKRAVARTY, S.; ZHU, G.; XU, J.; TANAKA, K.; KOCH, C.; TUFERIELLO, J.; FLYNN, J.; CHAN, J. **Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension.** *Cellular Microbiology,* 8(2):218-232, 2006.

VIARDOT, A.; GREY, S. T.; MACKAY, F.; CHISHOLM, D., **Potential antiinflammatory role of insulin via the preferential polarization of effector T cells toward a T helper 2 phenotype**. *Endocrinology,* 148(1):346-53, 2007.

VIEIRA, G. D.; ALVES, T. C.; LIMA, S. M. D.; CAMARGO, L. M. A.; SOUSA, C. M. **Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease**. *Rev Soc Bras Med Trop,* 47(1):63-8, 2014.

VIGNA, A. F.; ALMEIDA, S. R.; XANDER, P.; FREYMÜLLER, E.; MARIANO, M.; LOPES, J. D. **Granuloma formation in vitro requires B-1 cells and is modulated by *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 antigen.** *Microbes and Infection, 8*:589-597, 2006.

WATANABE, K.; KINOSHITA, S.; NAKAGAWA, H. **Purification and characterization of cytokine-induced neutrophil chemoattractant produced by epithelioid cell line of normal rat kidney (NRK-52E cell)**. *Biochem Biophys Res Commun* ,161:1093–1099, 1989.

WELLHAUSEN, S. R**. Definition of streptozocin toxicity for primary lymphoidal tissues**. *Diabetes*, 35(12):1404-11, 1986.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diabetes 2016. Globar Report on Diabetes 2016.** Geneva, Switzerland, 2016.

YANO, H.; KINOSHITA, M.; FUJINO, K.; NAKASHIMA, M.; YAMAMOTO, Y.; MIYAZAKI, H.; HAMADA, H.; ONO, S.; IWAYA, K.; SAITOH, D.; SEKI, S.; TANAKA, Y. **Insulin treatment directly restores neutrophil phagocytosis and bactericidal activity in diabetic mice and thereby improves surgical site *Staphylococcus aureus* infection**. *Infection and immunity,* 80(12):4409-4416, 2012.

APÊNDICES

Apêndice A – Valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referentes a Figura 9 da seção de Resultados.

Quantificação de Insulina em soro				
	Insulina (ng/mL)			
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	5,86	8,75	4,70	17,42
Animal 2	8,84	5,89	2,98	11,43
Animal 3	8,84	12,05	3,21	58,91
Animal 4	10,56	13,41	4,15	34,21
Animal 5	3,59	12,99		
Animal 6	12,58			
Média	8,38	10,62	3,76	30,49
DP	2,94	2,87	0,70	18,41
EPM	1,20	1,29	0,35	9,20

Apêndice B – Valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referentes a Figura 11 da seção de Resultados.

Caracterização da infecção no pulmão, 24h

Pulmão - 24h	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	0,7	1,2	0,7	2,5
Animal 2	0,4	2,2	0,6	2,7
Animal 3	0,6	0,6	0,7	2,5
Animal 4	1,2	2,1	0,7	1,8
Animal 5	1,9	0,9	0,6	1,3
Média	0,9	1,4	0,7	2,1
DP	0,6	0,7	0,1	0,6
EPM	0,3	0,3	0,0	0,3

24h Mix 2 CD11c+/MHC-II+ (%)	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	21,7	10,3	9,55	9,13
Animal 2	24	13,4	19,2	1,69
Animal 3	24,4	25,7	15,7	8,15
Animal 4	23,3	27,6	9,28	13,2
Animal 5	12,3	16,8	17	6,65
Média	21,14	18,76	14,15	7,76
DP	5,05	7,59	4,50	4,17
EPM	2,26	3,39	2,01	1,87

24h Mix 2 CD11c+/CD80+ (%)	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	20,4	8,69	8,34	8,55
Animal 2	22,4	12	17,3	2,37
Animal 3	18,8	23,3	13,7	7,92
Animal 4	20,6	25,1	8,41	11,9
Animal 5	10,9	15	14,6	6,25
Média	18,62	16,82	12,47	7,40
DP	4,50	7,13	3,97	3,48
EPM	2,01	3,19	1,77	1,56

24h Mix 3 CD11b+/ F480+ (%)	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	15,1	8,41	13,8	18,6
Animal 2	21,2	10,6	19,6	11,9
Animal 3	14,3	17,6	15,8	19,5
Animal 4	21,3	23,6	13,2	19,3
Animal 5	23,5	21,7	19,7	13,7
Média	19,08	16,38	16,42	16,60
DP	4,11	6,69	3,10	3,54
EPM	1,84	2,99	1,39	1,58

24h Mix 3 CD11b+/GR1+ (%)	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	15	33,8	28,5	44
Animal 2	25,5	39,1	27,2	54,8
Animal 3	14,9	23,5	21,9	54,8
Animal 4	25	26	29,2	39,5
Animal 5	48,9	39,5	32	30,1
Média	25,86	32,38	27,76	44,64
DP	13,87	7,37	3,72	10,54
EPM	6,20	3,30	1,66	4,72

Apêndice C – Valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referentes a Figura 12 da seção de Resultados.

Análise de citocinas no pulmão, 24h

IL-6 24h (pg/mL)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	29,4	551,9	898,7	1682,6
Animal 2	196,0	434,6	162,9	3635,1
Animal 3	159,7	34,6	142,6	1168,5
Animal 4	286,4	77,2	289,8	1177,8
Animal 5	3389,5	784,8	434,6	1165,3
Média	812,2	376,6	385,7	1765,8
DP	1443,7	319,1	309,6	1068,2
EPM	645,6	142,7	138,5	477,7

IL-10 24h (pg/mL)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	56,4	81,9	56,4	79,4
Animal 2	56,4	63,6	62,4	70,8
Animal 3	56,4	58,8	63,6	83,1
Animal 4	64,8	52,8	41,2	54,0
Animal 5	578,1	54,0	75,7	52,8
Média	162,4	62,2	59,8	68,0
DP	232,4	11,8	12,6	14,1
EPM	103,9	5,3	5,6	6,3

MCP-1 24h (pg/mL)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	57,0	200,7	492,1	732,4
Animal 2	128,3	227,4	85,6	653,7
Animal 3	185,2	32,6	249,0	405,4
Animal 4	247,2	66,4	258,2	418,2
Animal 5	1519,8	324,2	403,3	685,0
Média	427,5	170,2	297,7	578,9
DP	614,6	120,0	156,4	155,2
EPM	274,9	53,7	69,9	69,4

INF-g 24h (pg/mL)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	4,0	1,6	2,7	4,0
Animal 2	8,8	0,0	1,6	4,4
Animal 3	5,4	0,8	3,2	2,3
Animal 4		0,7	0,0	0,7
Animal 5		2,2	4,0	3,2
Média	6,1	1,1	2,3	2,9
DP	2,5	0,9	1,6	1,5
EPM	1,1	0,4	0,7	0,7

TNF-a 24h (pg/mL)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	80,8	1874,0	9484,7	10685
Animal 2	786,9	2019,2	1023,9	14022
Animal 3	788,2	154,6	988,5	6401,4
Animal 4	1551,4	355,7	4226,0	5689,0
Animal 5	16567	5023,2	6690,6	8086,0
Média	3954,8	1885,3	4482,7	8976,8
DP	7069,5	1949,3	3678,8	3413,7
EPM	3161,6	871,8	1645,2	1526,7

IL-12 p70 24h (pg/mL)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	4,3	4,9	0,0	9
Animal 2	9,0	0,0	0,0	7
Animal 3	8,4	2,5	1,2	2,5
Animal 4		0,0	1,2	7,2
Animal 5		8,4		
Média	7,2	3,2	0,6	6,5
DP	2,6	3,6	0,7	2,8
EPM	1,2	1,6	0,3	1,3

Apêndice D – Valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referentes a Figura 13 da seção de Resultados.

Ensaio de CFU pulmonar, 24h

CFU(log) - 24h				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	0,0	2,9	2,4	2,5
Animal 2	2,3	2,7	0,0	2,3
Animal 3	0,0	1,2	2,1	1,9
Animal 4	1,6	1,2	1,4	2,7
Animal 5	2,4	1,7	2,0	2,3
Média	1,3	1,9	1,6	2,3
DP	1,2	0,8	0,9	0,3
EPM	0,5	0,4	0,4	0,1

Apêndice E – Valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referentes a Figura 14 da seção de Resultados.

Caracterização da infecção no baço, 24h

Baço - 24h				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	8,0	2,5	8,0	8,5
Animal 2	5,6	3,8	14,5	5,9
Animal 3	11,8	2,8	6,8	14,8
Animal 4	8,4	9,5	10,9	7,2
Animal 5	9,3	4,3	7,1	3,8
Média	8,6	4,6	9,5	8,0
DP	2,2	2,8	3,3	4,2
EPM	1,0	1,3	1,5	1,9

24h Mix 1 CD4+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	4,57	4,38	3,55	3,39
Animal 2	6,88	3,85	4,44	4,18
Animal 3	5,76	2,1	3,69	5,83
Animal 4	5,91	4,71	2,91	5,53
Animal 5	4,68	3,32	4,37	4,23
Média	5,56	3,67	3,79	4,63
DP	0,96	1,03	0,63	1,02
EPM	0,43	0,46	0,28	0,46

24h Mix 1 CD8+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	6,86	5,27	5,05	5,45
Animal 2	9,39	4,51	7,45	5,96
Animal 3	7,06	3,31	6,94	8,93
Animal 4	6,96	6,27	4,42	5,14
Animal 5	6,28	4,57	4,8	4,57
Média	7,31	4,79	5,73	6,01
DP	1,20	1,09	1,37	1,71
EPM	0,54	0,49	0,61	0,76

24h Mix 2 CD11c+/MHC-II+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	4,2	5,04	5,57	5,58
Animal 2	6,44	3,51	4,38	4,4
Animal 3	3,91	6,31	5,85	2,29
Animal 4	4,92	3,48	5,28	4,1
Animal 5	6,19	4,2	3,836	3,3
Média	5,13	4,51	4,98	3,93
DP	1,14	1,19	0,85	1,23
EPM	0,51	0,53	0,38	0,55

24h Mix 2 CD11c+/CD80+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	2,09	2,64	3,34	3,43
Animal 2	3,29	1,96	2,49	2,48
Animal 3	2,56	2,87	3,3	1,21
Animal 4	2,77	2,11	3,11	1,98
Animal 5	3,91	2,19	2,25	1,7
Média	2,92	2,35	2,90	2,16
DP	0,70	0,38	0,50	0,85
EPM	0,31	0,17	0,22	0,38

24h Mix 3 CD11b+/ F480+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	3,19	4,29	7,02	6,5
Animal 2	5,65	6,1	4	7,33
Animal 3	4,57	0,97	7,93	4,28
Animal 4	5,74	5,59	9,66	8,59
Animal 5	9,09	11,2	4,05	9,14
Média	5,65	5,63	6,53	7,17
DP	2,18	3,70	2,48	1,92
EPM	0,98	1,65	1,11	0,86

24h Mix 3 CD11b+/GR1+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	3,04	13,04	7,31	8,19
Animal 2	5,92	10,2	4,64	23,1
Animal 3	5,03	2,64	7,2	6,03
Animal 4	6,23	6,53	9,86	9,23
Animal 5	14,9	17,5	4,36	11,5
Média	7,02	9,98	6,67	11,61
DP	4,58	5,74	2,25	6,72
EPM	2,05	2,57	1,01	3,00

Apêndice F – Valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referentes a Figura 15 da seção de Resultados.

Caracterização das populações leucocitárias no pulmão, 20d

Pulmão - 20d				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	0,4	0,5	0,6	1,2
Animal 2	0,3	0,5	1,0	0,6
Animal 3	1,2	0,4	0,5	0,3
Animal 4	1,0	0,4	0,9	0,7
Animal 5	0,3	0,2	0,6	0,7
Média	0,6	0,4	0,7	0,7
DP	0,4	0,1	0,2	0,3
EPM	0,2	0,1	0,1	0,1

20d Mix 2 CD11c+/MHC-II+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	5,37	7,46	4,5	1,86
Animal 2	6,82	3,58	5,9	7,46
Animal 3	3,29	6,16	4,34	4,59
Animal 4	12,3	4,53	8,3	8,62
Animal 5	5,91	5,14	9,4	9,75
Média	6,74	5,37	6,49	6,46
DP	3,37	1,50	2,27	3,21
EPM	1,51	0,67	1,02	1,43

20d Mix 2 CD11c+/CD80+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	4,65	5,92	3,78	1,7
Animal 2	5,69	3,21	4,93	7,48
Animal 3	3,11	5,37	3,85	4,4
Animal 4	9,63	4,01	6,18	6,99
Animal 5	5,47	4,17	7,73	9,01
Média	5,71	4,54	5,29	5,92
DP	2,41	1,09	1,68	2,88
EPM	1,08	0,49	0,75	1,29

20d Mix 3 CD11b+/ F480+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	3,21	1,62	3,03	1,48
Animal 2	2,11	2,78	2,89	6,89
Animal 3	2,11	1,92	1,88	2,83
Animal 4	5,12	2,05	2,9	3,75
Animal 5	4,61	3,37	6,39	6,96
Média	3,43	2,35	3,42	4,38
DP	1,39	0,71	1,72	2,46
EPM	0,62	0,32	0,77	1,10

20d Mix 3 CD11b+/GR1+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	2,65	0,96	4,73	1,13
Animal 2	1,45	2	2,47	5,09
Animal 3	1,09	1,3	2,03	2,07
Animal 4	3,74	1,08	2,48	4,34
Animal 5	2,8	2,41	4,16	4,74
Média	2,35	1,55	3,17	3,47
DP	1,07	0,63	1,19	1,76
EPM	0,48	0,28	0,53	0,79

20d Mix 4 NK1.1+/CD3- (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	3,93	4,66	4,55	2,16
Animal 2	2,93	3,51	3,01	3,23
Animal 3	7,16	3,52	5,13	2,25
Animal 4	3,86	3,6	4,2	3,91
Animal 5	3,71	6,83	6,87	6,67
Média	4,32	4,42	4,75	3,64
DP	1,64	1,43	1,41	1,84
EPM	0,73	0,64	0,63	0,82

20d Mix 4 CD11b+/CD19+ +CD19+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	5,84	6,44	5,01	1,832
Animal 2	6,31	3,72	5,57	5,6
Animal 3	6,22	5,41	5,1	5,42
Animal 4	6,78	5,33	5,04	5,48
Animal 5	8,15	8,57	5,65	6,64
Média	6,66	5,89	5,27	4,99
DP	0,90	1,78	0,31	1,84
EPM	0,40	0,80	0,14	0,82

Apêndice G – Valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referentes a Figura 16 da seção de Resultados.

Análise de citocinas do pulmão, 20d

IL-6 20d (pg/mL)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	4,1	6,0	0,0	14,2
Animal 2	6,8	0,0	2,4	4,1
Animal 3	4,1	0,0	4,9	3,8
Animal 4	6,8	0,0	4,9	6,6
Animal 5	0,0	1,1	9,3	4,4
Média	4,4	1,4	4,3	6,6
DP	2,8	2,6	3,5	4,4
EPM	1,3	1,2	1,5	2,0

IL-10 20d (pg/mL)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	136,6	31,0	86,9	113,4
Animal 2	139,2	28,7	81,9	119,8
Animal 3	91,8	20,0	51,6	80,6
Animal 4	141,8	51,6	130,1	21,1
Animal 5	72,0	25,4	66,0	100,7
Média	116,3	31,3	83,3	87,1
DP	32,2	12,1	29,6	39,8
EPM	14,4	5,4	13,2	17,8

MCP-1 20d (pg/mL)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	26,9	36,2	16,3	39,8
Animal 2	23,4	21,3	36,2	36,9
Animal 3	34,0	21,3	101,9	27,6
Animal 4	29,0	17,0	47,7	36,2
Animal 5	31,2	22,0	44,1	27,6
Média	28,9	23,5	49,2	33,6
DP	4,1	7,3	31,8	5,6
EPM	1,8	3,3	14,2	2,5

INF-g 20d (pg/mL)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	0,8	1,1	1,7	2,1
Animal 2	1,1	0,9	0,7	0,0
Animal 3	0,3	0,0	7,8	0,0
Animal 4	3,4	0,6	3,2	0,0
Animal 5	0,5	0,7	3,6	0,0
Média	1,2	0,7	3,4	0,4
DP	1,2	0,4	2,7	0,9
EPM	0,6	0,2	1,2	0,4

TNF-a 20d (pg/mL)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	14,0	15,2	15,8	102,8
Animal 2	14,0	10,4	15,8	9,3
Animal 3	5,7	5,0	72,8	1,7
Animal 4	24,4	6,3	13,4	89,5
Animal 5	8,7	4,4	86,8	60,3
Média	13,3	8,3	40,9	52,7
DP	7,1	4,5	35,8	45,9
EPM	3,2	2,0	16,0	20,5

IL-12 p70 20d (pg/mL)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	1,2	1,8	0,0	7,8
Animal 2	3,7	6,6	5,5	0,0
Animal 3	4,3	2,5	1,8	6,0
Animal 4	3,1	6,6	9,0	6,0
Animal 5	4,3	0,0	0,0	7,2
Média	3,3	3,5	3,3	5,4
DP	1,3	3,0	3,9	3,1
EPM	0,6	1,3	1,8	1,4

Apêndice H – Valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referentes a Figura 17 da seção de Resultados.

Ensaio de CFU pulmonar, 20d

CFU(log) - 20d				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	0,0	1,2	1,4	2,4
Animal 2	1,6	1,1	2,9	1,8
Animal 3	1,5	1,9	2,7	1,4
Animal 4	1,6	1,6	1,3	2,3
Animal 5	0,2	0,0	2,3	2,2
Média	1,0	1,2	2,1	2,0
DP	0,8	0,7	0,7	0,4
EPM	0,4	0,3	0,3	0,2

Apêndice I – Valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referentes a Figura 18 da seção de Resultados.

Caracterização das populações leucocitárias no baço, 20d

Baço - 20d				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	31,0	18,5	6,7	4,5
Animal 2	7,0	6,8	6,2	10,7
Animal 3	24,2	10,8	12,3	9,8
Animal 4	9,2	39,5	7,1	3,3
Animal 5	15,3	7,6	6,2	12,5
Média	17,3	16,6	4,5	8,2
DP	10,1	13,6	2,6	4,0
EPM	4,5	6,1	1,2	1,8

20d Mix 1 CD4+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	11,7	10,1	5,63	4,87
Animal 2	5,68	6,82	6,33	8,67
Animal 3	9,66	8,61	10,7	7,57
Animal 4	5,76	12,6	5,82	0,07
Animal 5	12,8	6,76	4,93	3,46
Média	9,12	8,98	6,68	4,93
DP	3,30	2,45	2,30	3,42
EPM	1,48	1,10	1,03	1,53

20d Mix 1 CD8+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	9,06	9,04	4,68	6,61
Animal 2	6,76	5,61	5,82	5,55
Animal 3	8,33	6,61	10,3	10,1
Animal 4	6,52	10,5	5,46	0,16
Animal 5	8,16	6,82	5,66	5,24
Média	7,77	7,72	6,38	5,53
DP	1,09	2,00	2,23	3,57
EPM	0,49	0,89	1,00	1,60

20d Mix 2 CD11c+/MHC-II+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	12,6	14,6	24,5	31,9
Animal 2	25,7	22,5	26,5	17,4
Animal 3	16	14,3	14,3	23,1
Animal 4	25,6	14,2	22,3	32,3
Animal 5	16,9	23,9	28,7	26,9
Média	19,36	17,90	23,26	26,32
DP	5,96	4,87	5,54	6,27
EPM	2,67	2,18	2,48	2,80

20d Mix 2 CD11c+/CD80+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	1,84	2,3	4,98	7,64
Animal 2	5,7	4,02	5,02	3,1
Animal 3	2,91	2,58	2,5	3,41
Animal 4	5,67	2,2	4,49	8,08
Animal 5	3,15	3,95	5,59	8,49
Média	3,85	3,01	4,52	6,14
DP	1,74	0,90	1,19	2,66
EPM	0,78	0,40	0,53	1,19

20d Mix 3 CD11b+/ F480+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	9,1	2,37	8,06	13,5
Animal 2	9,38	8,47	16,8	10,3
Animal 3	4,16	8,74	10,9	7,36
Animal 4	9,3	2,83	8,68	12
Animal 5	6,73	8,56	7,93	
Média	7,73	6,19	10,47	10,79
DP	2,28	3,29	3,73	2,63
EPM	1,02	1,47	1,67	1,32

20d Mix 3 CD11b+/GR1+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	4,38	9,99	19,1	18,5
Animal 2	11,9	11,3	11,8	12,6
Animal 3	5,44	10,4	12	11,4
Animal 4	11,8	3,7	10,6	17,1
Animal 5	8	12,5	11,2	
Média	8,30	9,58	12,94	14,90
DP	3,49	3,42	3,49	3,43
EPM	1,56	1,53	1,56	1,72

20d Mix 4 NK1.1+/CD3- (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	5,57	3,67	8,22	11,2
Animal 2	8,56	6,32	9,9	8,88
Animal 3	5,8	7,83	10,2	6,53
Animal 4	8,34	3,98	8,91	10
Animal 5	8,85	7,61	8,62	8,41
Média	7,42	5,88	9,17	9,00
DP	1,60	1,97	0,85	1,75
EPM	0,72	0,88	0,38	0,78

20d Mix 4 CD11b+/CD19+ +CD19+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	23	31,94	27,4	24,52
Animal 2	21,98	25,02	26,99	27,21
Animal 3	35,07	29,29	34,31	32,71
Animal 4	26,19	30,13	25,8	17,89
Animal 5	31,94	25,91	25,79	23,28
Média	27,64	28,46	28,06	25,12
DP	5,69	2,91	3,57	5,43
EPM	2,54	1,30	1,60	2,43

Apêndice J – Valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referentes a Figura 19 da seção de Resultados.

Caracterização da inflamação no pulmão, 45d

Pulmão - 45d	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	1,4	1,8	1,7	1,1
Animal 2	1,5	2,1	1,5	3,9
Animal 3	1,6	1,9	1,0	3,9
Animal 4	1,8	1,2	1,9	
Animal 5	2,5	2,6	1,5	
Animal 6	2,1			
Média	1,8	1,9	1,5	2,9
DP	0,4	0,5	0,3	1,6
EPM	0,2	0,2	0,1	0,7

CFU(log) - 45d	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	2,3	0,6	3,4	2,0
Animal 2	0,8	2,0	1,9	1,5
Animal 3	0,0	1,7	3,3	3,2
Animal 4	2,2		3,4	
Animal 5			3,0	
Animal 6			3,2	
Média	1,3	1,4	3,1	2,3
DP	1,1	0,7	0,6	0,9
EPM	0,6	0,4	0,2	0,5

Apêndice K – Valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referentes a Figura 20 da seção de Resultados.

Caracterização da inflamação no pulmão, 45d

45d Mix 1 CD4+ (%)	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	3,37	4,16	0,45	2,05
Animal 2	3,1	4,58	0,795	1,29
Animal 3	5,56	2,8	0,499	1,65
Animal 4			1,66	1,44
Média	4,01	3,85	0,85	1,61
DP	1,35	0,93	0,56	0,33
EPM	0,78	0,54	0,28	0,16

45d Mix 1 CD8+ (%)	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	1,58	1,74	0,1	0,72
Animal 2	1,81	1,75	0,28	0,45
Animal 3	2,24	0,94	0,13	0,49
Animal 4			0,52	0,45
Média	1,88	1,48	0,26	0,53
DP	0,34	0,46	0,19	0,13
EPM	0,19	0,27	0,10	0,06

45d Mix 2 CD11c+/MHC-II+ (%)	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	8,59	13	2,65	11,6
Animal 2	7,74	11,5	5,71	9,18
Animal 3	13,9	0,23	7,36	10,8
Animal 4			8,32	12,2
Média	10,08	8,24	6,01	10,95
DP	3,34	6,98	2,49	1,31
EPM	1,93	4,03	1,24	0,65

45d Mix 2 CD11c+/CD80+ (%)	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	8,16	9,47	2,16	8,72
Animal 2	6,84	7,04	3,83	4,65
Animal 3	9,36	0,27	3,99	7,22
Animal 4			4,79	7,38
Média	8,12	5,59	3,69	6,99
DP	1,26	4,77	1,10	1,70
EPM	0,73	2,75	0,55	0,85

45d Mix 3 CD11b+/GR1+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	7	12,7	6,7	10,3
Animal 2	4,33	9,9	20,6	12,5
Animal 3	16,1	4,86	14,1	12,8
Animal 4			15,8	4,25
Média	9,14	9,15	14,30	9,96
DP	6,17	3,97	5,77	3,97
EPM	3,56	2,29	2,88	1,98

45d Mix 4 NK1.1+/CD3- (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	1,15	0,51	0,12	0,49
Animal 2	1,71	0,58	0,21	0,19
Animal 3	0,61	0,69	0,15	0,43
Animal 4			0,18	1,2
Média	1,16	0,59	0,17	0,58
DP	0,55	0,09	0,04	0,43
EPM	0,32	0,05	0,02	0,22

45d Mix 4 CD11b+/CD19+ +CD19+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	25,12	14,28	2,37	25,99
Animal 2	29,61	21,53	3,13	6,07
Animal 3	22,43	16,53	2,94	14,83
Animal 4			8,04	24,78
Média	25,72	17,45	4,12	17,92
DP	3,63	3,71	2,63	9,35
EPM	2,09	2,14	1,32	4,67

Apêndice L – Valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referentes a Figura 21 da seção de Resultados.

Análise de citocinas no pulmão, 45d

IL-6 45d (pg/mL)	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	29,7	26,6	30,3	20,6
Animal 2	29,7	5,2	17,0	28,0
Animal 3	23,2	5,5	18,9	24,0
Animal 4	21,2	12,6	31,7	
Animal 5	22,0	6,0	8,5	
Animal 6	18,7			
Média	24,1	11,2	21,3	24,2
DP	4,6	9,1	9,7	3,7
EPM	1,9	4,1	4,3	2,1

IL-10 45d (pg/mL)	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	55,2	52,8	51,6	35,5
Animal 2	37,7	26,5	57,6	83,1
Animal 3	72,0	62,4	74,5	94,4
Animal 4	77,0	67,2	107,0	
Animal 5	88,1	43,5	21,1	
Animal 6	68,4			
Média	66,4	50,5	62,4	71,0
DP	17,7	16,2	31,6	31,3
EPM	7,2	7,2	14,1	18,0

MCP-1 45d (pg/mL)	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	66,4	54,9	95,6	70,7
Animal 2	53,4	52,7	77,8	149,4
Animal 3	46,2	55,6	74,2	29,0
Animal 4	68,5	51,3	104,7	
Animal 5	75,7	44,1	29,8	
Animal 6	67,8			
Média	63,0	51,7	76,4	83,0
DP	10,9	4,6	28,9	61,1
EPM	4,5	2,1	12,9	35,3

INF-g 45d (pg/mL)	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	0,0	0,7	2,8	1,0
Animal 2	1,5	0,9	3,4	2,2
Animal 3	1,9	0,5	5,4	0,7
Animal 4	1,7	1,1	2,0	
Animal 5	1,6			
Animal 6				
Média	1,3	0,8	3,4	1,3
DP	0,7	0,3	1,4	0,8
EPM	0,3	0,1	0,6	0,5

TNF-a 45d (pg/mL)	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	111,5	17,6	250,5	9,3
Animal 2	31,3	29,4	47,2	75,5
Animal 3	21,9	54,4	159,9	26,9
Animal 4	70,2	40,2	236,5	
Animal 5	70,8	14,0	23,8	
Animal 6	30,0			
Média	56,0	31,1	143,6	37,2
DP	34,5	16,6	104,8	34,3
EPM	14,1	7,4	46,9	19,8

IL-12 p70 45d (pg/mL)	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	4,9	10,2	1,8	16,5
Animal 2	10,2	1,2	7,8	6,6
Animal 3	14,0	3,1	3,7	10,9
Animal 4	6,0	6,6	14,6	
Animal 5	2,5	6,0	6,0	
Animal 6	9,0			
Média	7,8	5,4	6,8	11,3
DP	4,1	3,5	4,9	5,0
EPM	1,7	1,6	2,2	2,9

Apêndice M – Valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referentes a Figura 22 da seção de Resultados.

Caracterização da inflamação no baço, 45d

45d Mix 2 CD11c+/MHC-II+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	6,39	3,13	9,01	4,58
Animal 2	5,33	5,55	4,91	5,74
Animal 3	5,54	4,37	6,98	5,59
Animal 4	9,43	6,72	8,28	
Animal 5	6,9	5,95	3,94	
Média	6,72	5,14	6,62	5,30
DP	1,64	1,41	2,16	0,63
EPM	0,74	0,63	0,97	0,36

45d Mix 2 CD11c+/CD80+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	9,41	4,48	8,62	5,12
Animal 2	8,63	5,06	5,11	5,85
Animal 3	8,65	3,84	7,7	6,32
Animal 4	13,4	7,29	8,06	
Animal 5	11,2	8,19	3,29	
Média	10,26	5,77	6,56	5,76
DP	2,04	1,87	2,27	0,60
EPM	0,91	0,84	1,01	0,35

45d Mix 3 CD11b+/ F480+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	16,5	9,08	23,7	15,4
Animal 2	14	9,03	22	19,4
Animal 3	11	9,61	19,2	13,3
Animal 4	17,2	12,7	21,8	
Animal 5	17,3	15,8	6,94	
Média	15,20	11,24	18,73	16,03
DP	2,70	2,96	6,78	3,10
EPM	1,21	1,33	3,03	1,79

45d Mix 3 CD11b+/GR1+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	10,2	7,67	23,5	15,3
Animal 2	8,47	6,94	23,6	19,7
Animal 3	7,42	8,4	19,4	11,1
Animal 4	13,5	9,1	21,3	
Animal 5	11,1	12,2	5,12	
Média	10,14	8,86	18,58	15,37
DP	2,37	2,03	7,72	4,30
EPM	1,06	0,91	3,45	2,48

45d Mix 4 CD11b+/CD19+ +CD19+ (%)				
	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	10,93	6,65	16,16	22,95
Animal 2	9,54	27,34	13,62	19,63
Animal 3	9,6	23,1	18,16	16,41
Animal 4	10,3	18,74	17,35	
Animal 5	11,61	11,32	19,34	
Média	10,40	17,43	16,93	19,66
DP	0,89	8,45	2,18	3,27
EPM	0,40	3,78	0,98	1,89

Apêndice N - Valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referentes a Figura 23 da seção de Resultados.

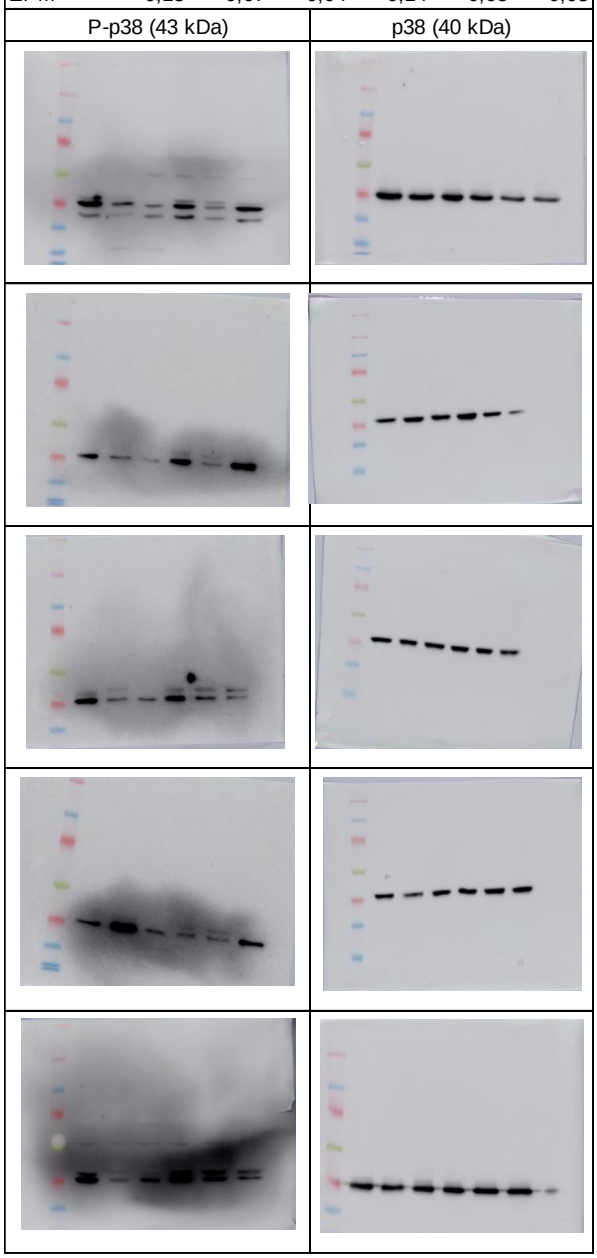
Análise de VCAM-1 por imunohistoquímica						
VCAM-1 (pixels/área)						
	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	119,2	129,7	127,7	109,8	115,8	153,7
Animal 2	110,1	123,3	135,6	95,3	116,5	130,1
Animal 3	104,6	141,1	138,1	99,4	110,6	128,5
Animal 4	114,7	135,0	128,0	107,5		
Média	112,1	132,3	132,3	103,0	114,3	137,4
DP	6,3	7,6	5,3	6,8	3,2	14,1
EPM	3,1	3,8	2,6	3,4	1,9	8,1

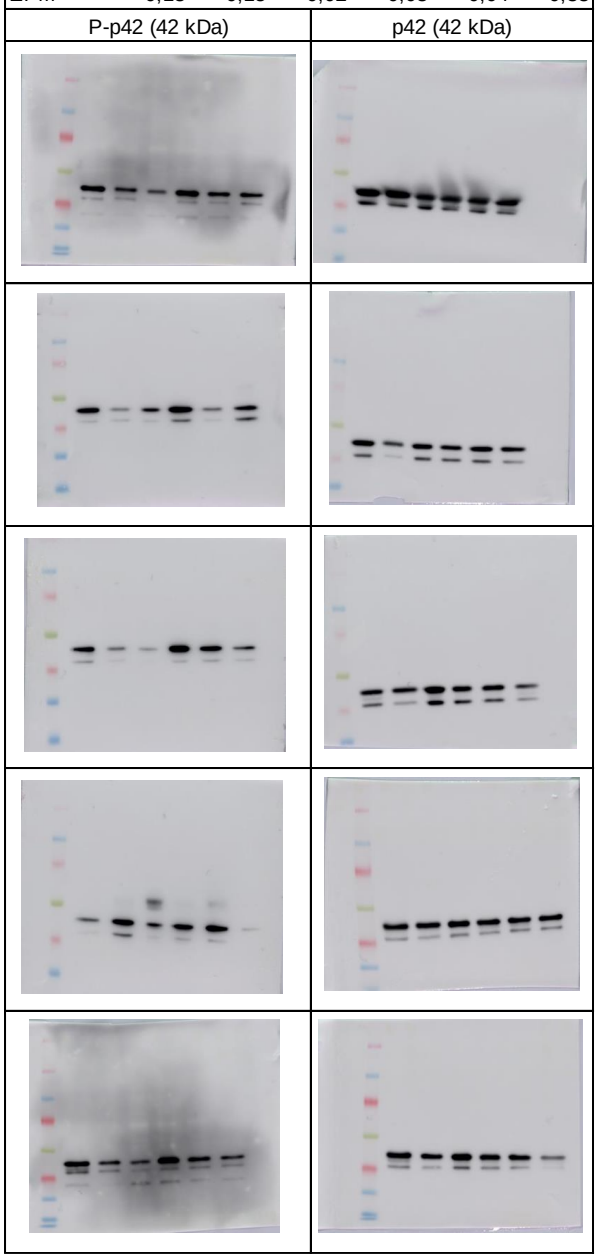
Apêndice O - Valores individuais, média, desvio padrão, erro padrão da média e membranas representativas referentes a Figura 24 da seção de Resultados.

Análise de vias de sinalização por Western blot - Homogenato de Pulmão

P-p38/p38	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	0,06	0,01	0,03	0,04	0,01	0,41
Animal 2	0,16	0,03	0,06	0,14	0,06	0,04
Animal 3	0,14	0,04	0,11	0,05	0,04	0,23
Animal 4	0,83	0,30	0,19	0,62	0,25	0,17
Animal 5						
Média	0,30	0,10	0,10	0,21	0,09	0,21
DP	0,36	0,14	0,07	0,28	0,11	0,15
EPM	0,18	0,07	0,04	0,14	0,05	0,08

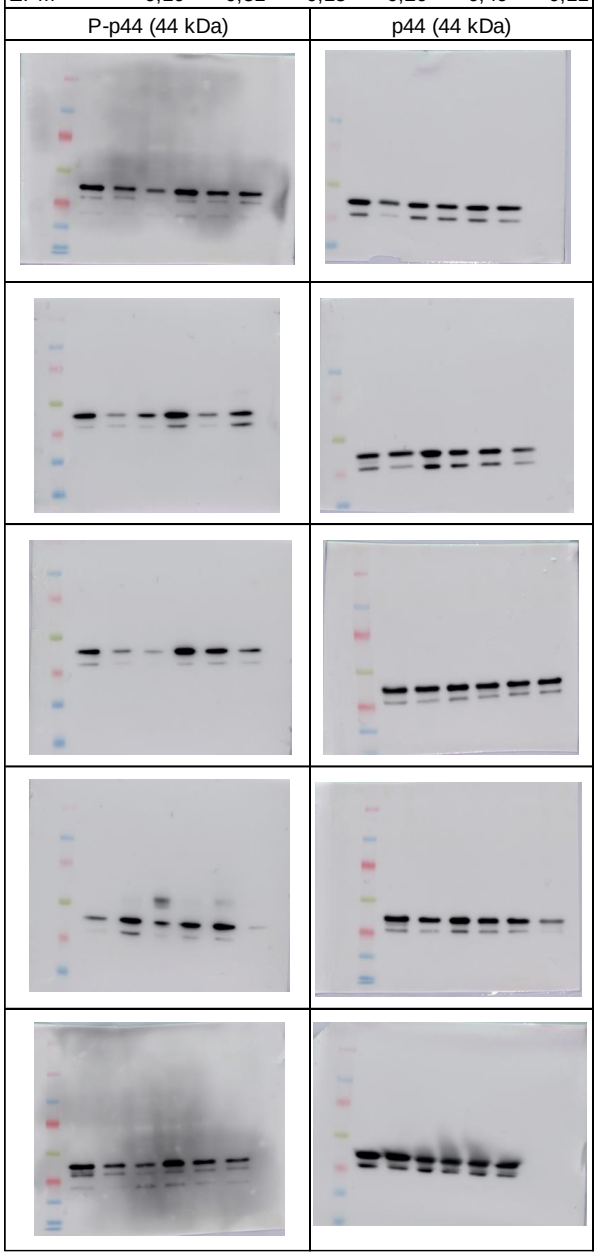
P-p42/p42	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	0,21	0,80	0,12	0,63	0,06	1,39
Animal 2	0,25	0,12	0,04	0,12	0,15	0,17
Animal 3	0,04	0,68	0,08	0,29	0,25	0,00
Animal 4	0,33	0,86	0,01	0,34	0,20	0,07
Animal 5	1,08	0,29	0,01	0,36	0,25	
Média	0,38	0,55	0,05	0,35	0,18	0,41
DP	0,40	0,33	0,05	0,19	0,08	0,66
EPM	0,18	0,15	0,02	0,08	0,04	0,33

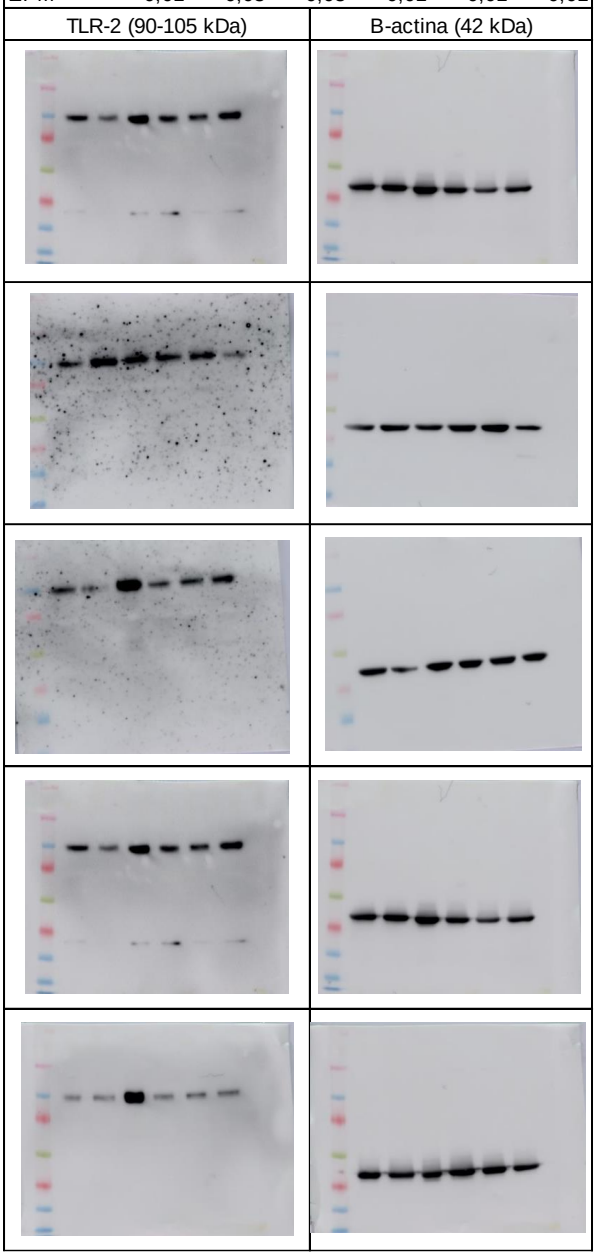




P-p44/p44	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	0,67	2,72	0,36	1,78	0,17	0,64
Animal 2	0,78	0,19	0,05	1,62	0,78	0,57
Animal 3	0,31	1,82	0,89	2,14	2,84	0,10
Animal 4	0,92	0,34	0,17	0,89	0,46	0,42
Animal 5	0,68	0,31	0,14	0,79	0,37	0,73
Média	0,67	1,08	0,32	1,44	0,92	0,49
DP	0,23	1,14	0,34	0,58	1,09	0,25
EPM	0,10	0,51	0,15	0,26	0,49	0,11

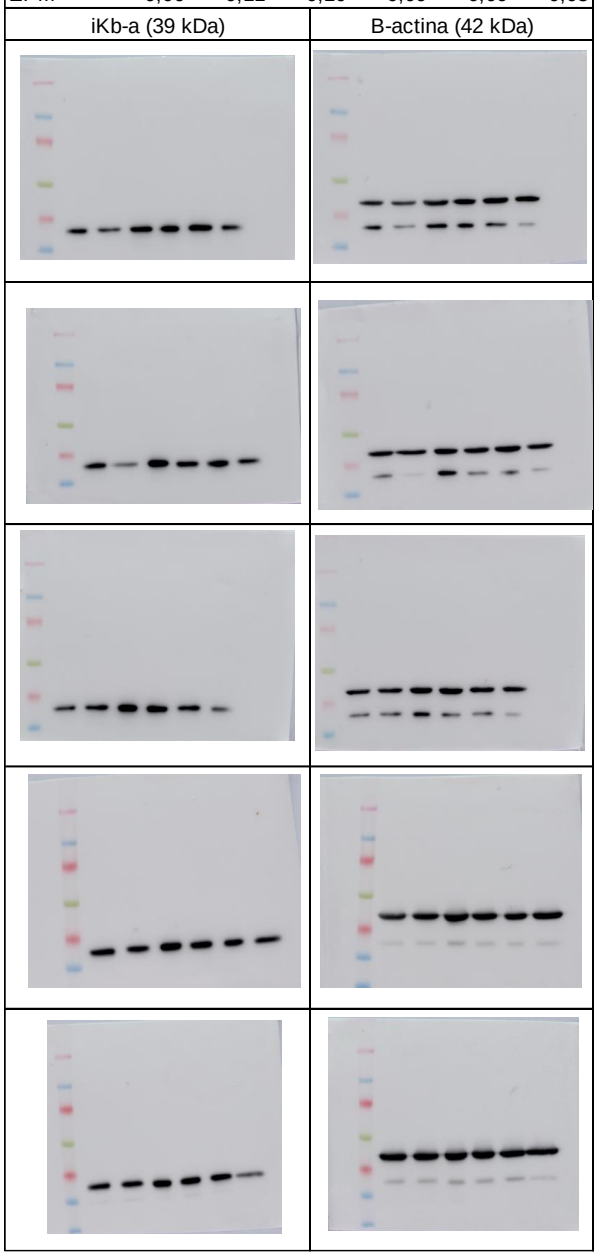
TLR-2/B-actina	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	0,14	0,25	0,22	0,15	0,16	0,21
Animal 2	0,15	0,18	0,12	0,13	0,16	0,14
Animal 3	0,13	0,13	0,50	0,09	0,11	0,19
Animal 4	0,10	0,04	0,17	0,09	0,12	0,16
Animal 5	0,09	0,13		0,11	0,11	0,15
Média	0,12	0,14	0,26	0,12	0,13	0,17
DP	0,03	0,08	0,17	0,03	0,03	0,03
EPM	0,01	0,03	0,08	0,01	0,01	0,01

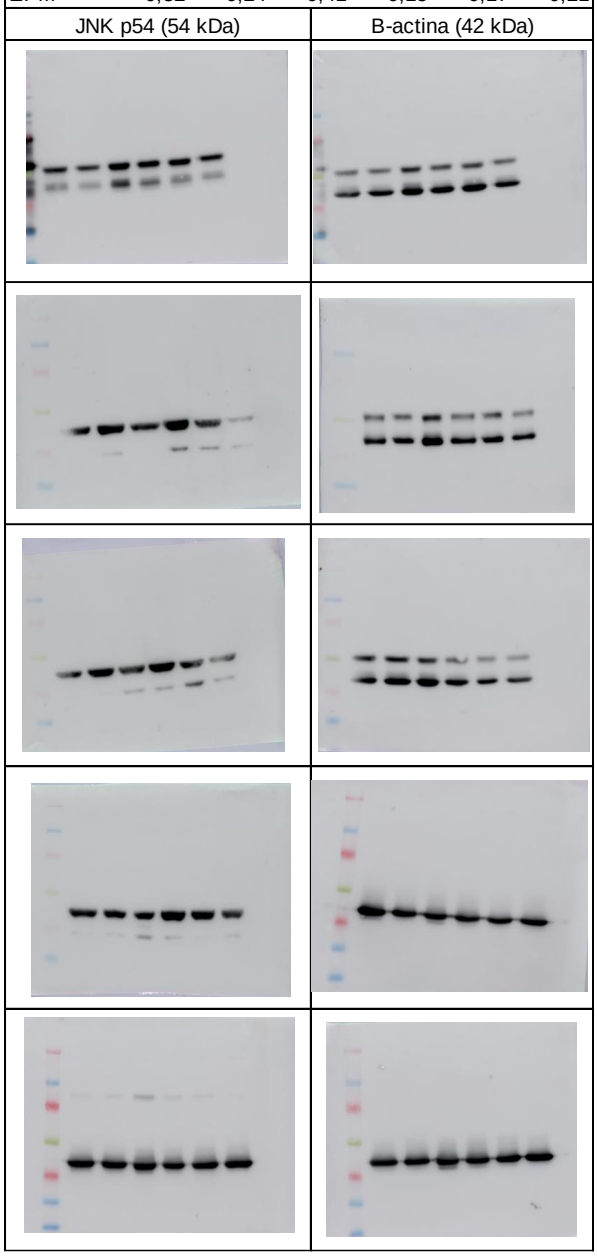




ikb-a/B-actina	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	0,77	0,31	1,26	0,77	0,67	0,62
Animal 2	0,90	0,78	1,10	0,93	0,92	0,43
Animal 3	0,58	0,85	1,01	0,77	0,68	0,36
Animal 4	0,80	0,55	0,68	0,64	0,55	0,37
Animal 5	0,84	0,90	1,22	1,15	1,05	0,53
Média	0,78	0,68	1,06	0,85	0,77	0,46
DP	0,12	0,25	0,23	0,20	0,20	0,11
EPM	0,06	0,11	0,10	0,09	0,09	0,05

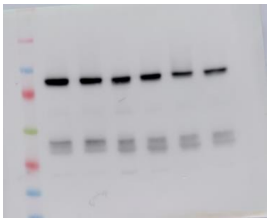
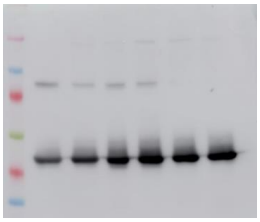
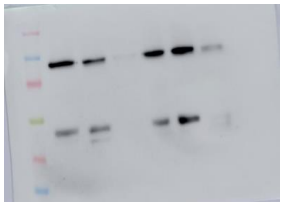
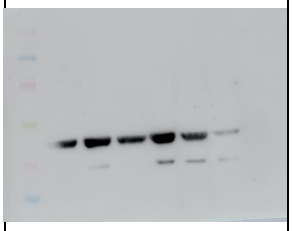
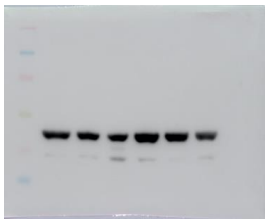
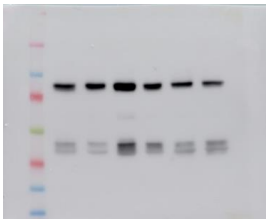
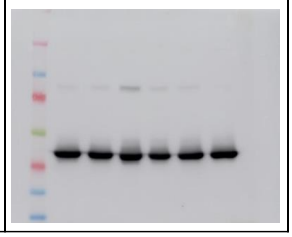
JNK p54/B-actina	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	1,12	0,71	1,07	0,96	0,84	0,97
Animal 2	2,32	1,48	1,25	1,44	1,59	1,75
Animal 3	0,60	0,51	0,92	1,08	1,39	0,94
Animal 4	0,96	1,27	2,88	1,58	1,58	1,63
Animal 5	1,90	1,79	2,57	1,74	0,81	0,69
Média	1,38	1,15	1,74	1,36	1,24	1,19
DP	0,71	0,54	0,91	0,33	0,39	0,47
EPM	0,32	0,24	0,41	0,15	0,17	0,21

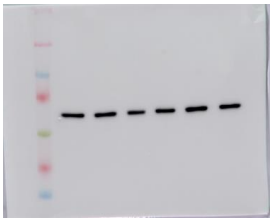
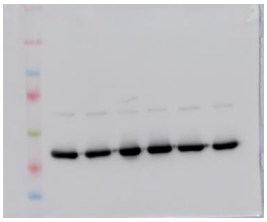
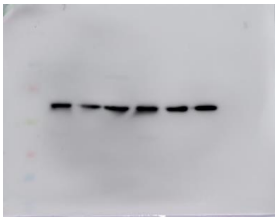
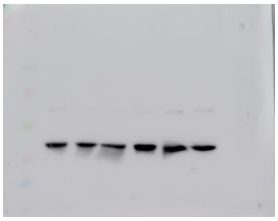
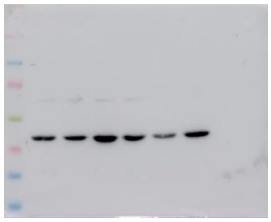
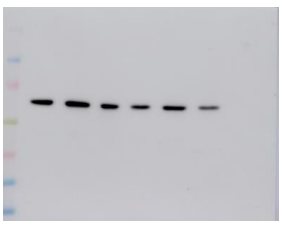
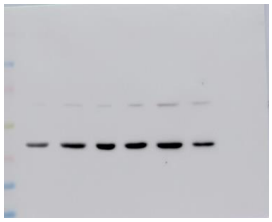
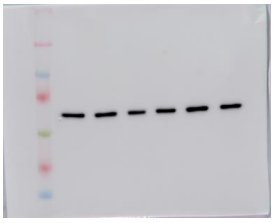
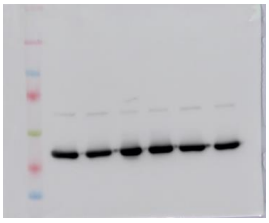




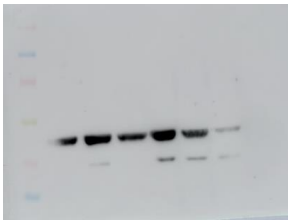
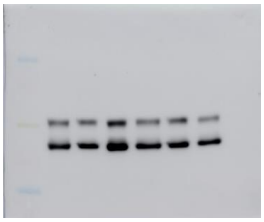
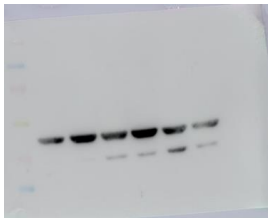
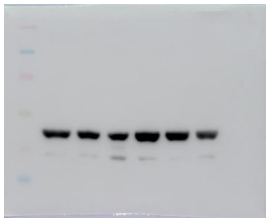
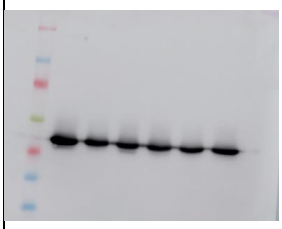
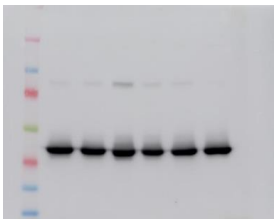
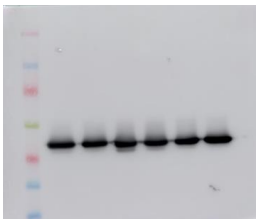
PKC-a/B-actina						
	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	0,23	0,47	0,04	0,10	0,03	0,11
Animal 2	0,49	0,97	0,50	0,42	0,49	0,83
Animal 3	1,32	0,43	1,16	0,50	0,44	0,25
Animal 4	0,38	1,15	0,76	0,66	0,40	0,33
Animal 5						
Média	0,60	0,75	0,62	0,42	0,34	0,38
DP	0,49	0,36	0,47	0,24	0,21	0,31
EPM	0,25	0,18	0,24	0,12	0,10	0,16

pAkt/B-actina						
	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	1,09	0,74	1,50	0,70	0,94	1,25
Animal 2	1,28	0,70	0,43	1,06	1,16	0,31
Animal 3	2,49	1,72	0,65	0,39	0,54	0,20
Animal 4	0,94	0,41	0,45	0,99	1,07	0,91
Animal 5	0,62	0,72	0,38	0,52	0,85	0,69
Média	1,28	0,86	0,68	0,73	0,91	0,67
DP	0,72	0,50	0,47	0,29	0,24	0,43
EPM	0,32	0,22	0,21	0,13	0,11	0,19

PKC-a (80 kDa)	B-actina (42 kDa)
	
	
	
	

pAkt (60 kDa)	B-actina (42 kDa)
	
	
	
	
	

JNK p46/B-actina						
	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	0,46	0,26	0,62	0,43	0,27	0,31
Animal 2	0,55	0,32	0,47	0,40	0,64	0,78
Animal 3	0,24	0,23	0,81	0,50	0,77	0,66
Animal 4	0,23	0,26	0,71	0,31	0,32	0,44
Animal 5	0,21	0,23		0,37	0,17	0,16
Média	0,34	0,26	0,65	0,40	0,43	0,47
DP	0,16	0,04	0,14	0,07	0,26	0,25
EPM	0,07	0,02	0,07	0,03	0,12	0,11

JNK p46 (46 kDa)	B-actina (42 kDa)
	
	
	
	

Apêndice P - Valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referentes a Figura 25 da seção de Resultados.

Análise de expressão relativa por qPCR

IL-12 (expressão relativa)	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	0,8	1,1	1,1	0,3	1,0	2,0
Animal 2	0,8	1,2	0,3	0,5	0,8	0,6
Animal 3	1,6	1,3	0,5	0,7		0,6
Animal 4	1,0	1,5		0,4		
Animal 5		1,2				
Média	1,1	1,2	0,6	0,5	0,9	1,1
DP	0,4	0,2	0,4	0,2	0,2	0,8
EPM	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,5

TNF-a (expressão relativa)	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	0,6	1,8	2,9	0,6	1,0	2,2
Animal 2	1,2	1,1	1,7	0,5	1,6	1,2
Animal 3	1,8	0,7	1,6	0,8		1,1
Animal 4	0,7	0,6		0,6		
Animal 5		1,3				
Média	1,1	1,1	2,1	0,6	1,3	1,5
DP	0,6	0,5	0,7	0,1	0,4	0,6
EPM	0,3	0,2	0,4	0,1	0,3	0,3

Stat1 (expressão relativa)	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	0,6	1,8	3,1	0,2	2,1	1,3
Animal 2	1,4	0,9	1,2	0,4	2,3	0,7
Animal 3	1,1	1,7	1,1	1,1		1,3
Animal 4	1,2	0,5		0,6		
Animal 5		0,5				
Média	1,1	1,1	1,8	0,6	2,2	1,1
DP	0,4	0,6	1,2	0,4	0,1	0,4
EPM	0,2	0,3	0,7	0,2	0,1	0,2

IL-6 (expressão relativa)	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	1,4	1,5	2,0	0,4	7,3	2,6
Animal 2	1,7	2,0	1,9	0,7	5,5	1,3
Animal 3	1,1	0,8	4,1	0,8		1,5
Animal 4	0,4	1,7		0,5		
Animal 5		0,6				
Média	1,1	1,3	2,7	0,6	6,4	1,8
DP	0,6	0,6	1,2	0,2	1,3	0,7
EPM	0,3	0,3	0,7	0,1	0,9	0,4

IL-10 (expressão relativa)	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	0,5	3,1	3,3	0,7	4,3	8,2
Animal 2	1,5	1,4	3,6	1,2	2,8	3,2
Animal 3	2,2	0,7	2,4	1,0		5,7
Animal 4	0,6	1,3		0,7		
Animal 5		1,0				
Média	1,2	1,5	3,1	0,9	3,5	5,7
DP	0,8	0,9	0,6	0,3	1,0	2,5
EPM	0,4	0,4	0,4	0,1	0,7	1,4

IL-4 (expressão relativa)	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	1,1	2,8	5,1	3,1	6,2	5,3
Animal 2	1,9	1,2	3,1	3,1	5,0	2,4
Animal 3	0,6	0,5	3,5	1,4		
Animal 4	0,8	1,2		0,9		
Animal 5		0,6				
Média	1,1	1,3	3,9	2,1	5,6	3,8
DP	0,6	0,9	1,1	1,1	0,9	2,1
EPM	0,3	0,4	0,6	0,6	0,6	1,5

TGF-b (expressão relativa)	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	0,3	1,5	3,9	0,4	1,1	1,4
Animal 2	2,3	1,1	1,2	0,5	1,0	0,9
Animal 3	1,2	0,7	0,5	2,1		1,8
Animal 4	1,3	0,9		0,8		
Animal 5		0,7				
Média	1,3	1,0	1,9	1,0	1,0	1,4
DP	0,8	0,3	1,8	0,8	0,1	0,5
EPM	0,4	0,1	1,1	0,4	0,0	0,3

Apêndice Q - Valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referentes a Figura 26 da seção de Resultados.

Análise de quimiocinas - Fígado e Baço

CINC-1 em Baço (pg/mL)						
	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	50,5	83,2	26,2	21,2	40,3	49,6
Animal 2	18,3	92,0	22,9	17,7	60,5	31,0
Animal 3	22,3	61,9	56,3	20,6	46,18	16,8
Animal 4	14,7	83,2	36,7	17,9	63,5	50,6
Animal 5	50,5	92,0	56,3	30,6	86,2	35,0
Média	31,3	82,4	39,7	21,6	59,3	36,6
DP	17,8	12,3	16,0	5,3	17,9	14,0
EPM	8,0	5,5	7,1	2,4	8,0	6,3

CINC-1 em Fígado (pg/mL)						
	Cs	CPb	CPb+i	Ds	DPb	DPb+i
Animal 1	91,0	219,7	64,9	19,8	105,7	71,5
Animal 2	34,2	192,0	177,6	62,6	161,0	64,9
Animal 3	84,6	156,1	151,1	54,6	158,04	98,4
Animal 4	78,1	185,9	82,4	75,1	130,1	99,2
Animal 5	45,6	122,2	89,0	40,0	99,2	50,1
Média	66,7	175,2	113,0	50,4	130,8	76,8
DP	25,2	37,3	48,6	21,4	28,7	21,5
EPM	11,3	16,7	21,7	9,6	12,8	9,6

Apêndice R - Valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referentes Figura 27 da seção de Resultados.

Índice Fagocítico e CFU de Fagocitose - Macrófagos Alveolares

Índice Fagocítico - 4h (%)	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	2,7	2,3	1,3	4,0
Animal 2	3,0	2,0	2,0	2,3
Animal 3	3,7	1,3	1,7	2,7
Animal 4	2,7	2,3	1,0	1,3
Animal 5			2,0	3,3
Média	3,0	2,0	1,6	2,7
DP	0,5	0,5	0,4	1,0
EPM	0,2	0,2	0,2	0,5

CFU de Fagocitose - 4h (log(CFU))	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	2,5	2,0	2,0	1,8
Animal 2	2,9	2,3	1,8	1,4
Animal 3	2,6	1,9	1,5	1,7
Média	2,7	2,1	1,8	1,6
DP	0,2	0,2	0,2	0,2
EPM	0,1	0,1	0,1	0,1

Índice Fagocítico - 12h (%)	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	5,0	4,0	2,3	5,0
Animal 2	8,0	5,0	4,7	9,0
Animal 3	5,3	5,3	2,7	6,0
Animal 4	7,0	5,3	2,3	3,7
Animal 5	4,3	6,7	3,7	4,7
Animal 6	7,3	6,0	4,0	6,7
Animal 7			4,3	4,7
Média	6,2	5,4	3,4	5,7
DP	1,5	0,9	1,0	1,8
EPM	0,6	0,4	0,4	0,7

CFU de Fagocitose - 12h (log(CFU))	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	2,6	2,5	2,1	3,1
Animal 2	2,8	2,6	2,3	2,5
Animal 3	2,7	2,5	2,2	2,8
Animal 4	2,9	2,1	2,2	2,8
Animal 5	2,5	2,3	1,9	2,5
Média	2,7	2,4	2,1	2,7
DP	0,2	0,2	0,1	0,3
EPM	0,1	0,1	0,1	0,1

Índice Fagocítico - 24h (%)	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	9,7	10,7	6,3	8,3
Animal 2	12,7	9,7	5,3	7,7
Animal 3	7,7	7,0	5,7	8,7
Animal 4	8,3	11,0	6,7	11,7
Animal 5	8,0	7,3	5,7	8,3
Média	9,3	9,1	5,9	8,9
DP	2,0	1,9	0,5	1,6
EPM	0,9	0,8	0,2	0,7

CFU de Fagocitose - 24h (log(CFU))	CPb	CPb+i	DPb	DPb+i
Animal 1	2,9	2,5	2,0	2,3
Animal 2	2,9	2,9	2,0	2,1
Animal 3	2,5	2,9	1,7	2,0
Média	2,8	2,8	1,9	2,2
DP	0,2	0,2	0,2	0,2
EPM	0,1	0,1	0,1	0,1

ANEXOS

- **Certificado do Comitê de Ética e Uso de Animais**
- **Histórico escolar do aluno**
- **Curriculum Lattes**

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

CEUA/FCF **098.2019-P600**

CERTIFICADO

Certifico "ad referendum" que a proposta intitulado **Insulina modula migração celular e a secreção de citocinas na vigência da infecção pulmonar por Paracoccidioides brasiliensis em camundongos diabéticos e não-diabéticos.**, registrada com o nº **512**, sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Felipe Beccaria Casagrande**, sob orientação da **Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins** – que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de **04 de Dezembro de 2015.**

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	08/12/2015 a 28/02/2020
Espécie/linhagem/raça	*Camundongo C57Bl/6*
Número de animais	180
Sexo	Machos
Peso/Idade	5 - 6 Semanas – 18 - 22g
Origem	Biotério FCF-IQ/USP

Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento do projeto de pesquisa, o respectivo **relatório final**.

Ressaltamos que após o período de término do projeto de pesquisa, nenhum ensaio poderá ser realizado.

São Paulo, 09 de dezembro de 2019.

Profa. Dra. Cristina Stewart Bittencourt Bogsan
Vice Coordenadora CEUA/FCF/USP

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

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9142 - 8445366/1 - Felipe Beccaria Casagrande

Email:	felipe.beccaria@usp.br
Data de Nascimento:	22/05/1989
Cédula de Identidade:	RG - 29.797.098-7 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Farmácia - Universidade Municipal de São Caetano do Sul - São Paulo - Brasil - 2013
Mestrado:	Mestre em Ciências - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2015

Curso:	Doutorado
Programa:	Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área:	Fisiopatologia
Data de Matrícula:	16/09/2015
Início da Contagem de Prazo:	16/09/2015
Data Limite para o Depósito:	14/01/2020
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Joilson de Oliveira Martins - 09/01/2017 até o presente. Email: martinsj@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 16/09/2015
Prorrogação(ões):	120 dias Período de 16/09/2019 até 14/01/2020
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 18/10/2017
Estágio no Exterior:	Karolinska Institutet, Suécia - Período de 01/10/2018 até 31/03/2019
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 16/09/2015 Prorrogação em 02/04/2019

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2019

Impresso em: 14/12/2019 13:33:01

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9142 - 8445366/1 - Felipe Beccaria Casagrande

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
MPT5794-1/4	Ultra-Estrutura e Função Celular (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	03/03/2016	06/04/2016	75	5	100	A	N	Concluída
FBC5792-3/3	Tópicos em Análises Clínicas III	08/03/2016	20/06/2016	15	1	100	A	N	Concluída
MCM5772-7/2	Temas Básicos de Imunologia (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	04/04/2016	01/05/2016	60	4	80	B	N	Concluída
ECB5803-1/1	Biologia e Cultura: Reflexões para Professores (Curso Interunidades: Ensino de Biologia - Universidade de São Paulo)	01/06/2016	05/07/2016	90	6	90	A	N	Concluída
FBC5766-4/3	Tópicos em Análises Clínicas IV	02/08/2016	14/11/2016	15	1	100	A	N	Concluída
MCM5866-3/1	Prática de Laboratório VII (Modelos Experimentais em Alergia) (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	26/09/2016	09/10/2016	60	4	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Co-autoria na publicação de artigo na revista Frontiers of Immunology em 2017 "Insulin modulates cyytokine release, collagen and mucus secetion in lung remodeling of allergic diabetic mice, v.8, p.1-10, 2017. (1)	09/06/2017	09/06/2017	-	2	-	-	-	-

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	23
Estágios:			
Total:	0	20	23

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o Artigo 60 do Regimento de Pós-Graduação e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 06/11/2019.

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: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2019

Impresso em: 14/12/2019 13:33:02

Currículo Lattes

Imprimir currículo

Felipe Beccaria Casagrande

Endereço para acessar este CV: **http://lattes.cnpq.br/8824151953044981**

Última atualização do currículo em 27/10/2019

Resumo informado pelo autor

Bacharel em Farmácia (2009-2012) pela Universidade Municipal de São Caetano do Sul (USCS). Mestrado em Farmácia na área de Análises Clínicas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF-USP). Atualmente, doutorando do laboratório de Imunoendocrinologia no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP com previsão para defesa até 02/2020.

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Felipe Beccaria Casagrande

Dados pessoais

Nome em citações bibliográficas CASAGRANDE, F. B.;FERREIRA, SABRINA S;FERREIRA, SABRINA S.;CASAGRANDE, FELIPE BECCARIA

Sexo Masculino

Cor ou Raça Branca

Filiação Lincoln Casagrande e Terezinha Beccaria Casagrande

Nascimento 22/05/1989 - Santo André/SP - Brasil

Carteira de Identidade 297970987 SP - SP - 29/05/2006

CPF 384.180.598-18

Endereço residencial
Rua Silva Jardim, 210
Santa Terezinha - Santo André
09210635, SP - Brasil
Telefone: 011 44796013
Celular 011 952095838

Endereço profissional
Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Avenida Professor Lineu Prestes
Butantã - São Paulo
05508000, SP - Brasil
Telefone: 11 30913662
URL da home page: http://www.fcf.usp.br

Endereço eletrônico
E-mail para contato : felipe.beccaria@usp.br
E-mail alternativo felipe.beccaria@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2015
Doutorado em Farmácia (Análises Clínicas).
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF - USP, Brasil
com **período sanduíche** em Karolinska Institutet (Orientador: Dr. Daniel Ketelhuth)
Título: Aspectos moleculares envolvidos na modulação da insulina em micose sistêmica causada por Paracoccidioides brasiliensis em animais sadios e diabéticos

Orientador: Joilson de Oliveira Martins
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Palavras-chave: diabetes mellitus, Imunologia, Micose Sistêmica, paracoccidioidomicose
Áreas do conhecimento: Imunologia Celular,Endocrinologia

2013 - 2015
Mestrado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Efeito da insulina em micose sistêmica causada por Paracoccidioides brasiliensis., Ano de obtenção: 2015

Orientador: Joilson de Oliveira Martins
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Palavras-chave: Imunologia, Micose Sistêmica, Insulina, Diabetes
Áreas do conhecimento: Imunologia Celular,Endocrinologia

2009 - 2012
Graduação em Farmácia.
Universidade Municipal de São Caetano do Sul, USCS, Sao Caetano Do Sul, Brasil
Título: Efeitos da poluição atmosférica nos atendimentos emergenciais por doenças cardiovasculares e respiratórias no município de São Caetano do Sul
Orientador: Brigitte Rieckmann Martins dos Santos

2007 - 2008
Ensino Profissional de nível técnico .
Colégio Dr. Clóvis Bevilácqua, CDCB, Brasil

Formação complementar

2018 - 2018 Curso de curta duração em Swedish legislation & Ethics, animal welfare and 3R..

Karolinska Institutet, KI, Estocolmo, Suécia

2018 - 2018 Curso de curta duração em Laboratory Animal Science Function A - Rodents and lagomorphs..
Karolinska Institutet, KI, Estocolmo, Suécia

2012 - 2012 Estágio em Farmácia-Escola de Manipulação. . (Carga horária: 1080h).
Universidade Municipal de São Caetano do Sul, USCS, Sao Caetano Do Sul, Brasil
Palavras-chave: Estágio

2010 - 2012 Estágio em Laboratório-Escola de Análises Clinicas. . (Carga horária: 2160h).
Universidade Municipal de São Caetano do Sul, USCS, Sao Caetano Do Sul, Brasil
Palavras-chave: Estágio

2011 - 2011 Monitoria Acadêmica: Bioquímica Básica. . (Carga horária: 40h).
Universidade Municipal de São Caetano do Sul, USCS, Sao Caetano Do Sul, Brasil

2009 - 2009 Curso de curta duração em Cap e Aperf em Coleta de Materiais Biológicos. (Carga horária: 20h).
Samavit Cursos, SAMAVIT CURSOS, Brasil

2007 - 2007 Auxiliar de Laboratório. . (Carga horária: 480h).
Colégio Dr. Clóvis Bevilácqua, CDCB, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2015 - Atual Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Pós Graduando (Nível Doutorado) , Carga horária: 40, Regime: Integral

2013 - 2015 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Pós-graduando (nível Mestrado) , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

Atividades

08/2013 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Linhas de pesquisa:
1. Imunologia Celular Objetivo: Avaliar o papel da insulina na modulação da resposta inflamatória e capacidade fagocítica e microbicida de macrófagos alveolares e mecanismos moleculares envolvidos na infecção por Paracoccidioides brasiliensis

2. Universidade Municipal de São Caetano do Sul - USCS

Vínculo institucional

2010 - 2012 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 30, Regime: Dedicação exclusiva

Linhas de pesquisa

1. 1. Imunologia Celular Objetivo: Avaliar o papel da insulina na modulação da resposta inflamatória e capacidade fagocítica e microbicida de macrófagos alveolares e mecanismos moleculares envolvidos na infecção por Paracoccidioides brasiliensis

Projetos

Projetos de pesquisa

2015 - Atual Aspectos moleculares envolvidos na modulação da insulina em micose sistêmica causada por Paracoccidioides brasiliensis em animais sadios e diabéticos

Descrição: Neste projeto pretendemos estudar a intervenção da insulina em um modelo de micose sistêmica causada por Paracoccidioide brasiliensis, analisando os mecanismos moleculares (produção/liberação de citocinas), intracelulares (vias de sinalização), a expressão dos receptores TLR envolvidos e a atividade fagocítica e microbicida dos macrófagos alveolares.
Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Doutorado (1);
Integrantes: Felipe Beccaria Casagrande; Joilson de Oliveira Martins (Responsável)

2013 - 2015 Efeito da insulina em micose sistêmica causada por Paracoccidioides brasiliensis

Descrição: A Paracoccidioidomicose é uma enfermidade sistêmica, causada pelo Paracoccidioides brasiliensis, fungo endêmico em toda a América Latina. O P. brasiliensis interage com células apresentadoras de antígenos, alterando suas principais funções biológicas. Recentemente observou-se que a capacidade fagocítica destas células em animais diabéticos para alvos opsonizados por IgG está diminuída em comparação aos animais sadios. Além disso, encontramos que a insulina estimula a atividade fagocítica em macrófagos alveolares oriundos de animais sadios e diabéticos, porém por mecanismos diferentes. Será utilizado um modelo de carência relativa de insulina (diabetes mellitus experimental). Assim, neste projeto pretendemos estudar a intervenção da insulina em um modelo de micose sistêmica causada por Paracoccidioides brasiliensis, analisando os mecanismos celulares e moleculares.
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);
Integrantes: Felipe Beccaria Casagrande; Joilson de Oliveira Martins (Responsável); Sandro Rogerio de Almeida; Paula Regina Knox de Souza

Idiomas

Inglês Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Bem , Lê Bem

Prêmios e títulos

2013 Honra ao Mérito, USCS

2012 Bolsa por Mérito, USCS

Producão

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. DE SOUZA, PAULA R. KNOX; **FERREIRA, SABRINA S.**; NUNES, FERNANDA P. B.; CASAGRANDE, FELIPE B.; TESSARO, FERNANDO H. G.; SILVA, MARIANA C. F.; CRUZ, JOSÉ WALBER MIRANDA COSTA; MAMIZUKA, ELSA M.; MARTINS, JOILSON O.
Cytokine and Adhesion Molecule Expression Induced by Different Strains of Staphylococcus aureus in Type 1 Diabetic Rats: Role of Insulin. Frontiers in Immunology. JCR, v.9, p.3165 - , 2019.
Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.3389/fimmu.2018.03165]

2. **CASAGRANDE, FELIPE BECCARIA**; DE SOUZA FERREIRA, SABRINA; NUNES, FERNANDA PEIXOTO BARBOSA; ROMERA, LAVÍNIA MARIA DAL'MAS; DOS SANTOS, SUELEN SILVANA; TESSARO, FERNANDO HENRIQUE GALVÃO; DE SOUZA, PAULA REGINA KNOX; ALMEIDA, SANDRO ROGÉRIO; MARTINS, JOILSON OLIVEIRA
Insulin Modulates *Paracoccidioides brasiliensis* -Induced Inflammation by Restoring the Populations of NK Cells, Dendritic Cells, and B Lymphocytes in Lungs. Journal of Diabetes Research. , v.2018, p.1 - 11, 2018.
Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1155/2018/6209694]

3. **FERREIRA, SABRINA S.**
Insulin Modulates Cytokine Release, Collagen and Mucus Secretion in Lung Remodeling of Allergic Diabetic Mice. Frontiers in Immunology. JCR, v.8, p.633 - , 2017.
Referências adicionais: Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.3389/fimmu.2017.00633]

Apresentação de trabalho e palestra

1. SILVA, M.C.F.; NUNES, F.P.B.; FERREIRA, S.S.; **CASAGRANDE, F. B.**; MARTINS, J. O.
Effect of Insulin on Cytokines Production in Different Tissues During Peritonitis Induced by Staphylococcus Aureusin Diabetic and Health Rats, 2016. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais: Brasil/Português; Local: São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: XXI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF/USP

2. **CASAGRANDE, F. B.**; NUNES, F.P.B.; ROMERA, L.D.; FERREIRA, S.S.; TESSARO, F.H.G.; SOUZA, P. R. K.; ALMEIDA, S. R.; MARTINS, J. O.
Insulin Effects on Paracoccidioides Brasiliensis-Induced Systemic Mycosis in Healthy and Diabetic Mice, 2016. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais: Brasil/Português; Local: São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: XXI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF/USP

3. FERREIRA, S.S.; TSUJITA, M.; **CASAGRANDE, F. B.**; NUNES, F.P.B.; GOMES, E.; CUSTÓDIO, R.W.A.; MARTINS, J. O.
Insulin Modulates Molecular Aspects of Asthma in Diabetic Mice, 2016. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais: Brasil/Português; Local: São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: XXI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF/USP

4. **CASAGRANDE, F. B.**; NUNES, F.P.B.; ROMERA, L.D.; FERREIRA, S.S.; TESSARO, F.H.G.; SOUZA, P. R. K.; ALMEIDA, S. R.; MARTINS, J. O.
Insulin effects on Paracoccidioides brasiliensis-induced systemic mycosis in healthy and diabetic mice, 2015. (Outra,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais: Brasil/Português; Local: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE; Inst.promotora/financiadora: FeSBE

5. **CASAGRANDE, F. B.**; NUNES, F.P.B.; ROMERA, L.D.; FERREIRA, S.S.; TESSARO, F.H.G.; SOUZA, P. R. K.; ALMEIDA, S. R.; MARTINS, J. O.
Paracoccidioides brasiliensis-induced systemic mycosis in healthy and diabetic mice: role of insulin, 2015. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais: Brasil/Português; Local: Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Cidade: São Paulo; Evento: XX Semana Farmacêutica de Ciências e Tecnologia; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências Farmacêuticas

6. SILVA, M.C.F.; SOUZA, P. R. K.; NUNES, F.P.B.; FERREIRA, S.S.; **CASAGRANDE, F. B.**; MARTINS, J. O.
Staphylococcus aureus-induced peritonitis in healthy and diabetic rats: role of insulin, 2015. (Outra,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais: Brasil/Português; Local: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE; Inst.promotora/financiadora: FeSBE

7. SOUZA, P. R. K.; NUNES, F.P.B.; FERREIRA, S.S.; SILVA, M.C.F.; **CASAGRANDE, F. B.**; MARTINS, J. O.
Insulin modulates peritonitis induced by Staphylococcus aureus in diabetic and healthy rats, 2014. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais: Brasil/Português; Local: Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Cidade: São Paulo; Evento: XIX Semana Farmacêutica de Ciências e Tecnologia; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **CASAGRANDE, F. B.**; MARCONDES, M. A.
Oficina: 'Passando um sabão na juventude: materiais recicláveis!', 2012. (Outra produção técnica)
Referências adicionais: Brasil/Português.

2. **CASAGRANDE, F. B.**; MARCONDES, M. A.
Oficina: 'As diversas faces do trabalho na área laboratorial', 2011. (Outra produção técnica)
Referências adicionais: Brasil/Português.

Educação e Popularização de C&T

Apresentação de trabalho e palestra

SILVA, M.C.F.; NUNES, F.P.B.; FERREIRA, S.S.; **CASAGRANDE, F. B.**; MARTINS, J. O.

1. **Effect of Insulin on Cytokines Production in Different Tissues During Peritonitis Induced by Staphylococcus Aureusin Diabetic and Health Rats**, 2016. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais: Brasil/Português; Local: São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: XXI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF/USP

2. **CASAGRANDE, F. B.**; NUNES, F.P.B.; ROMERA, L.D.; FERREIRA, S.S.; TESSARO, F.H.G.; SOUZA, P. R. K.; ALMEIDA, S. R.; MARTINS, J. O.
Insulin Effects on Paracoccidioides Brasiliensis-Induced Systemic Mycosis in Healthy and Diabetic Mice, 2016. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais: Brasil/Português; Local: São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: XXI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF/USP

3. FERREIRA, S.S.; TSUJITA, M.; **CASAGRANDE, F. B.**; NUNES, F.P.B.; GOMES, E.; CUSTÓDIO, R.W.A.; MARTINS, J. O.
Insulin Modulates Molecular Aspects of Asthma in Diabetic Mice, 2016. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais: Brasil/Português; Local: São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: XXI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF/USP

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia**, 2016. (Simpósio)
Insulin Effects on Paracoccidioides Brasiliensis-Induced Systemic Mycosis in Healthy and Diabetic Mice.

2. **XX Semana Farmacêutica de Ciências e Tecnologia**, 2015. (Simpósio)
.

3. **XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE**, 2015. (Outra)
.

4. **I Encontro de Iniciação Científica do ABC - IV Simpósio de Iniciação Científica e VI Congresso de Iniciação Científica da USCS**, 2011. (Simpósio)
Diagnóstico precoce e prevenção de doenças no complexo maxilo-mandibular.

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. BEZERRA, L. O.; SOUZA, P. R. K.; JANUÁRIO, S. J.; **CASAGRANDE, F. B.**
Participação em banca de Letícia de Oliveira Bezerra. **Ávaliação do perfil sorológico de anticorpos anti-citomegalovírus (anti-CMV) em usuários atendidos pelo Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Municipal de São Caetano do Sul**, 2013
(Farmácia) Universidade Municipal de São Caetano do Sul
Referências adicionais: Brasil/Português.

2. SILVA, C. G.; SOUZA, P. R. K.; YAVO, B.; **CASAGRANDE, F. B.**
Participação em banca de Cláudia Gomes da Silva. **Avaliação do uso irracional de anti-inflamatórios não-esteroidais por pacientes idosos atendidos pelo Centro Municipal de Reabilitação da USCS**, 2013
(Farmácia) Universidade Municipal de São Caetano do Sul
Referências adicionais: Brasil/Português.

3. SILVA, T. S.; SOUZA, P. R. K.; JANUÁRIO, S. J.; **CASAGRANDE, F. B.**
Participação em banca de Tiago Sales da Silva. **Avaliação dos níveis de estresse apresentado por estudantes do último ano dos cursos da Escola de Saúde da USCS**, 2013
(Farmácia) Universidade Municipal de São Caetano do Sul
Referências adicionais: Brasil/Português.

4. DIAS, J. L. F.; SOUZA, P. R. K.; MARCONDES, M. A.; **CASAGRANDE, F. B.**
Participação em banca de Jaqueline Louvencil Ferreira Dias. **Identificação dos principais agentes etiológicos relacionados a infecção hospitalar em unidade de terapia intensiva neonatal (utin)**, 2013
(Farmácia) Universidade Municipal de São Caetano do Sul
Referências adicionais: Brasil/Português.

5. DONINI, L. M.; SOUZA, P. R. K.; JANUÁRIO, S. J.; **CASAGRANDE, F. B.**
Participação em banca de Liliane de Moraes Donini. **Nível de conhecimento sobre a relação entre HPV e câncer do colo de útero entre alunos dos cursos da Escola da Saúde USCS**, 2013
(Farmácia) Universidade Municipal de São Caetano do Sul
Referências adicionais: Brasil/Português.

6. SILVA, V. P. O.; SOUZA, P. R. K.; SABINO, W.; **CASAGRANDE, F. B.**
Participação em banca de Vinícius Padilha de Oliveira da Silva. **Uso racional de medicamentos no tratamento de osteoporose por usuários da Farmácia Escola da Universidade de São Caetano do Sul (USCS)**, 2013
(Farmácia) Universidade Municipal de São Caetano do Sul
Referências adicionais: Brasil/Português.

7. SILVA, G. C. O.; SOUZA, P. R. K.; JANUÁRIO, S. J.; **CASAGRANDE, F. B.**
Participação em banca de Gabriela Cristina de Oliveira Silva. **Verificação dos níveis plasmáticos de colesterol total e frações em pacientes atendidos pelo LAC-USCS de 2005 a 2009**, 2013
(Farmácia) Universidade Municipal de São Caetano do Sul
Referências adicionais: Brasil/Português.

Totais de produção

Produção bibliográfica	
Artigos completos publicados em periódico	3
Apresentações de trabalhos (Simpósio)	5
Apresentações de trabalhos (Outra)	2

Produção técnica

Outra produção técnica	2

Eventos

Participações em eventos (simpósio)	3
Participações em eventos (outra)	1
Participação em banca de trabalhos de conclusão (graduação)	7

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 14/12/2019 às 13:08:01.