

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

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

Área de Fisiopatologia

A hiperglicemia altera o perfil inflamatório e imunometabólico de macrófagos
derivados de medula óssea de camundongos

Thais Soprani Ayala

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

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

Área de Fisiopatologia

A hiperglicemia altera o perfil inflamatório e imunometabólico de macrófagos
derivados de medula óssea de camundongos

Thais Soprani Ayala

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

São Paulo

2019

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

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

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

A973h Ayala, Thais Soprani
A hiperglicemia altera o perfil inflamatório e imunometabólico de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos / Thais Soprani Ayala. - São Paulo, 2019.
153 p.

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

1. Macrófagos. 2. Diabetes mellitus. 3. Hiperglicemia. 4. Inflamação. 5. Glicose. I. T. II. Martins, Joilson de Oliveira, orientador.

Thais Soprani Ayala

A hiperglicemia altera o perfil inflamatório e imunometabólico de macrófagos
derivados de medula óssea de camundongos

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

orientador/presidente

Prof. Dr. Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira

(1º. Examinador)

Prof. Dr. Marcio Chaim Bajgelman

(2º. Examinador)

Prof. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos

(3º. Examinador)

São Paulo 21 de março de 2019.

À minha mãe, Solange Pinto Soprani, por todo
amor, por sempre acreditar em mim e sempre
me apoiar. Eu amo você.

Agradecimentos

Primeiramente eu gostaria de agradecer à Deus, à força e Luz que vem do eterno, que me guia e me auxilia em todos os momentos.

Agradeço com todo o coração minha mãe Solange Pinto Soprani, obrigada mãe, por ser guia, apoio e por ser amparo. Você é minha inspiração, obrigada por me ensinar as coisas da vida, obrigada pela vida, pelas oportunidades e por tantas outras coisas que são difíceis de escrever mas que fazem meu coração bater mais forte quando penso no quão grata eu sou por você. Te amo!

A minha irmã Camila e meu irmão Ângelo, foram tantas batalhas que passamos juntos, nossos corações estarão sempre em sincronia independente da distância, amo vocês e obrigada por me auxiliar, acompanhar e apoiar desde sempre, amo vocês! Neste mesmo parágrafo eu gostaria de agradecer ao meu cunhado Thiago, que também é um irmão para mim, obrigada Thi por tudo o que você faz por nós, amo você.

Agradeço a minha avó Marlene Pinto Soprani, uma guerreira que eu tenho muito orgulho. Obrigada pelo apoio, pela vida e pela família que você nos proporcionou, te amo.

Ao meu orientador Joilson de Oliveira Martins, obrigada pela confiança, pelo apoio e incentivo. Fico muito grata por ter você como orientador de doutorado. Obrigada por tudo.

Ao Fernando, obrigada por fazer parte desta trajetória. Obrigada pelo apoio, parceria, ajuda e incentivo.

Agradeço a minha família, minhas tias, meus tios, meus primos e àqueles que se tornaram parte da nossa família ao longo dos anos. Obrigada!

As minhas amigas, Letícia Carboni e Priscila Sombrio, vocês trazem o melhor de mim. Obrigada por tudo, eu amo vocês.

As minhas amigas Marina e Cláudia, e ao “I thought this on my Dina”. A amizade, apoio e o amor de vocês fez especial diferença nessa trajetória. Obrigada, amo vocês!

Aos meus amigos Paula A., Letícia N., Carla L., Carla F., Talita, Aline, Laiza, Dani, Vanessa, Paula R., Alexandre, Cássio, Rodrigo R., Maira e Débora. Obrigada por fazerem parte da minha história, vocês são muito especiais.

A Sabrina e o Leonardo por tantos momentos e também pela parceria durante esses anos.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Imunoendocrinologia, pela parceria, ajuda e companhia: Fernando, Leonardo, Eduardo, Sabrina, Fernanda, Mariana, João, Luiz, Emanuella, Fernanda e Felipe.

A Carol e o André, parceiros de casa, obrigada por me acolherem e facilitarem tantas coisas para mim.

Aos amigos e colegas do departamento: Grasi, Suelen, Vivian, Maysa, Maryana, Leandro, Zé, Rodolfo, Guilherme, Maylla, Carmen, Fabi, Silene, Fábio, Aline, Larissa e Araceli.

Aos técnicos de laboratório e funcionários da USP que me auxiliaram em diversos momentos desta jornada: Silene, Mariana, Edson, Renata, Stephanie, Camille, Flávia, Marilisa, Samanta, Edna, Elaine e Silvia, muito obrigada.

Aos amigos de Foz do Iguaçu.

Aos amigos do ICB IV.

A Kamila, Milla, Hadley, Mauricio e Vanessa. Obrigada equipe, vocês foram muito importantes para mim!

To Per-Olof Berggren, Christopher Barker and Elisabetta Daré, thank you for having me in the lab, for believing in me, teaching me and for all the help in so many aspects.

Special greetings to my friends and colleagues who I met in Stockholm: Teresa Daraio, Ismael, Subbu, Artor, Isabelle, Essam, Concha, Pauline, Elena, Anderson, Paula K., Pim, Meike, Teresa Pereira, Katarina, Anya, Lisa, Galyna, Tilo, Erwin, Martin and Karin. Thank you for the moments, for the “fika” and all the moments we spent together.

A todos que de alguma maneira me auxiliaram, apoiaram ou contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sem o qual este trabalho não poderia ser realizado.

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

“Queira, basta ser sincero e desejar profundo, você será capaz de sacudir o mundo, vai, tente outra vez. Tente, e não diga que a vitória está perdida, se é de batalhas que se vive a vida, tente outra vez.”

(Raul Seixas/ Paulo Coelho/ Marcelo Motta)

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) auxílios 470523/2013-1 e 301617/2016-3 (CNPq, Projeto Universal 2013, P1-1D), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Auxílio Regular da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 2014/05214-1 e 2017/11540-7.

RESUMO

AYALA, T. S. **A hiperglicemia altera o perfil inflamatório e imunometabólico de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos.** 2019. 153f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O *diabetes mellitus* é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos caracterizado pela hiperglicemia. Indivíduos diabéticos possuem maior susceptibilidade a infecções comparado a indivíduos saudáveis e a hiperglicemia é um dos principais fatores que contribuem para isso, em parte, por alterar a resposta imune. Sendo assim, os macrófagos, como células essenciais para a resposta inflamatória, podem apresentar importante papel na resposta imune alterada de indivíduos diabéticos. Neste estudo, investigamos como a hiperglicemia modula os macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) sob um estímulo inflamatório. Para realizar este estudo, os BMDMs de camundongos C57BL/6 machos não diabéticos e diabéticos (60 mg/kg de aloxana, iv) (CEUA / FCF / USP-488) foram cultivados sob condições normais de glicose (5,5 mM) e alta concentração de glicose (25 mM ou 40 mM) e estimuladas ou não com lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL). Em comparação com os BMDMs dos camundongos não diabéticos, os BMDMs dos camundongos diabéticos estimulados com LPS apresentaram menor expressão de CD38 no tempo basal e após 24 horas, além de menor expressão de receptor do tipo Toll (TLR)-4 na superfície celular, menor capacidade fagocítica e redução na secreção de óxido nítrico, lactato, fator de necrose tumoral- α e interleucina (IL)-10, porém apresentaram maior expressão de CD80, CD86 e MHC-II, maior consumo de oxigênio e maior fosforilação em quinase ativada por estresse/quinase Jun-amino-terminal (SAPK/JNK) subunidade p46 e em quinase regulada por sinal extracelular (ERK) subunidade p42, proteína quinase B (AKT) e proteína quinase C (PKC)- δ assim como maior secreção de IL-6. Quando os BMDMs dos camundongos não diabéticos foram cultivados sob condições de alta concentração de glicose *in vitro* e estimulados com LPS, a expressão de TLR4 e os níveis de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio foram reduzidos. Por outro lado, os BMDMs diabéticos que também foram cultivados em alta concentração de glicose *in vitro* apresentaram níveis aumentados de lactato e fosforilação reduzida em AKT e PKC- δ , porém apresentaram fosforilação aumentada em p46 SAPK/JNK. A alta concentração de glicose parece modificar o comportamento dos macrófagos, afetando diferentes aspectos dos BMDMs diabéticos e não diabéticos sob estímulo de LPS, assim a hiperglicemia deixa um legado de glicose, induzindo uma memória glicêmica, alterando o estado basal dos macrófagos, modificando a via de sinalização do TLR4 contribuindo para a susceptibilidade de indivíduos diabéticos a infecções.

Palavras – chave: macrófagos, hiperglicemia, diabetes do tipo 1, inflamação, glicose, lipopolissacarídeo, mediadores imunes.

ABSTRACT

AYALA, T. S. **Hyperglycemia alters the inflammatory and immunometabolic profile of mouse bone marrow derived macrophages.** 2019. 153p. Thesis (PhD). School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

Diabetes mellitus is a heterogeneous group of metabolic disorders characterized by hyperglycemia. Diabetic individuals are more susceptible to infections compared to healthy subjects, and hyperglycemia is one of the major contributing factors, partly because they alter the immune response. Thus, macrophages, as essential cells for the inflammatory response, may play an important role in the altered immune response of diabetic individuals. In this study, we investigated how hyperglycemia modulates bone marrow derived macrophages (BMDMs) under an inflammatory stimulus. To perform this study, BMDMs from non-diabetic male and diabetic C57BL/6 mice (60 mg / kg aloxane, iv) (CEUA / FCF / USP-488) were cultured under normal glucose conditions (5.5 mM) and high glucose concentration (25 mM or 40 mM) and stimulated or not with lipopolysaccharide (LPS, 100 ng / ml). Compared to non-diabetic mice BMDMs, the BMDMs of LPS-stimulated diabetic mice showed lower expression of CD38 at baseline and after 24 hours, as well as lower Toll-like receptor (TLR)-4 on the cell surface, lower secretion of lactate, tumor necrosis factor- α , and interleukin (IL)-10, but showed higher expression of CD80, CD86 and MHC-II, higher oxygen consumption and greater phosphorylation in stress-activated kinase/Jun-amino-terminal kinase (SAPK / JNK) p46 subunit and in extracellular signal regulated kinase (ERK) p42 subunit, protein kinase B (AKT) and protein kinase C (PKC)- δ as well as higher secretion of IL-6. When the BMDMs of non-diabetic mice were cultured under conditions of *in vitro* high glucose concentration and stimulated with LPS, the levels of TLR4 expression, nitric oxide and hydrogen peroxide were reduced. On the other hand, diabetic BMDMs that were also cultured in high glucose concentration of glucose *in vitro* showed increased levels of lactate and reduced phosphorylation in AKT and PKC- δ , but showed increased phosphorylation in p46 SAPK/JNK. A high glucose concentration seems to modify the behavior of macrophages, affecting different aspects of diabetic and non-diabetic BMDMs under the same LPS stimulus. Hyperglycemia leaves a glucose legacy, inducing a glycemic memory, altering the basal state of macrophages, modifying the TLR4 signaling pathway, and may play a key role in the high susceptibility of diabetic individuals to infections.

Key words: macrophages, hyperglycaemia, type 1 diabetes, TLR4, inflammation, glucose, lipopolysaccharide, immune mediators.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 A glicose e o seu metabolismo.....	16
1.2 O Diabetes <i>mellitus</i>	20
1.2.1 Diabetes <i>mellitus</i> do tipo 1 – DM1.....	21
1.2.2 As complicações no DM1	23
1.2.3 Indivíduos diabéticos são mais susceptíveis a infecções	24
1.2.4 A hiperglicemia altera a resposta imunológica	26
1.3 Os macrófagos como células chave na resposta inflamatória	27
1.3.1 Ativação do TLR4 por lipopolissacarídeo	30
1.4 Modelo experimental de DM1.....	37
2. JUSTIFICATIVA	40
3. OBJETIVOS	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Animais.....	42
4.2 Indução do diabetes <i>mellitus</i>	42
4.3 Obtenção dos macrófagos	42
4.4 Diferenciação do material medular.....	43
4.5 Obtenção dos macrófagos peritoneais (MP)	43
4.6 Tratamento das células	43
4.7 Ensaio para atividade do metabolismo mitocondrial	44
4.8 Quantificação de citocinas por ensaio imunoenzimático	45
4.9 Dosagem de Lactato.....	45
4.10 Atividade de arginase	45
4.11 Quantificação de óxido nítrico.....	46
4.12 Quantificação de peróxido de hidrogênio	46
4.13 Consumo de oxigênio	46
4.14 Marcadores de superfície celular e viabilidade por citometria de fluxo	46
4.15 Análise das vias de sinalização.....	47
5. RESULTADOS	49

5.1	Caracterização do modelo animal.....	49
5.2	Caracterização dos BMDM.....	49
5.3	Viabilidade celular.....	50
5.4	Avaliação da atividade mitocondrial.....	51
5.5	Alterações fenotípicas	52
5.6	Expressão de TLR4 na superfície dos BMDM.....	54
5.7	Expressão de proteínas da via de sinalização do TLR4 ativada por LPS.....	55
5.8	Avaliação do metabolismo energético	59
5.9	Evolução temporal da liberação de mediadores inflamatórios pelos BMDM.....	60
5.9.1	Liberação de TNF- α pelos BMDM	60
5.9.2	Liberação de IL-6 pelos BMDM	62
5.9.3	Liberação de IL-1 β pelos BMDM	64
5.9.4	Liberação de IL-10 pelos BMDM	65
5.9.5	Liberação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico pelos BMDM	67
5.10	Fagocitose	68
5.11	Efeito da hiperglicemia na autofagia.....	68
5.12	Cinética da liberação de citocinas pelos MP	69
5.12.1	Liberação de TNF- α por ND-MP e D-MP.....	69
5.12.2	Liberação de IL-6 por ND-MP e D-MP.....	70
6.	DISCUSSÃO	73
7.	CONCLUSÕES.....	84
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
	ANEXOS.....	101

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Regulação da glicemia através dos hormônios insulina e glucagon	18
Figura 2	Metabolismo da glicose em macrófagos	20
Figura 3	A polarização dos macrófagos	29
Figura 4	Reconhecimento do LPS via TLR4	32
Figura 5	Via de sinalização do TLR-LPS	36
Figura 6	Tratamento dos macrófagos com diferentes concentrações de glicose	44
Figura 7	Caracterização do estado diabético	49
Figura 8	Caracterização celular dos BMDM por anticorpo PE anti-mouse F4/80	50
Figura 9	Viabilidade celular	51
Figura 10	Alterações fenotípicas comparando ND-BMDM e D-BMDM	52
Figura 11	Expressão de TLR-4 nos BMDM	53
Figura 12	Via de sinalização do TLR4	55
Figura 13	Via de sinalização do TLR4: fosforilação das MAPKs.	56
Figura 14	Metabolismo da glicose	58
Figura 15	Liberação de TNF- α por ND-BMDM e D-BMDM	60
Figura 16	Liberação de IL-6 por ND-BMDM e D-BMDM	61
Figura 17	Liberação de IL-1 β por ND-BMDM e D-BMDM.	62
Figura 18	Liberação de IL-10 por ND-BMDM e D-BMDM.	64
Figura 19	Liberação de EROs e NO pelos ND-BMDM e D-BMDM.	65
Figura 20	Fagocitose de hemácias opsonizadas	66
Figura 21	Avaliação da via da autofagia após 24 horas de incubação	67
Figura 22	Liberação de TNF- α por MP	68
Figura 23	Produção de IL-6 pelos MP	68
Figura 24	Resumo dos resultados na comparação entre ND- e D-BMDM	74
Figura 25	Resumo dos resultados comparando os ND- ou os D-BMDM foram cultivados em alta concentração de glicose per se ou concomitante ao estímulo por LPS.	75

LISTA DE ABREVIATURAS

ALX	Aloxana
APC	Célula Apresentadora de Antígenos
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
BSA	Albumina sérica bovina
BMDM	Macrófagos derivados de medula óssea
CO ₂	Gás carbônico
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> do tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> do tipo 2
D-MP	Macrófago peritoneal de animal diabético
D-BMDM	Macrófagos derivados de medula óssea de animais diabéticos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i>
GLUT	Transportador de glicose de difusão facilitada
GTP	2-Trifosfato de guanosina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERK	Proteína quinase regulada por sinais extracelulares 1 e 2
FADH	Flavina-adenina dinucleotídeo
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HMGB1	<i>High mobility group B1</i>
IDF	Federação internacional de Diabetes
IFN	Interferon
IKK	IκB quinase
IL	Interleucina
ISPAD	<i>International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes</i>
JNK	Proteína quinase ativada por estresse ou c-jun NH ₂ - terminal
LDH	Lactato desidrogenase

LBP	Proteína ligadora de LPS
LPe	Lavado peritoneal
LPS	Lipopolisacarídeo
LBO	Proteína ligadora de LPS
LCCM	Meio condicionado de L929
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MP	Macrófagos peritoneais
mRNA	RNA mensageiro
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MTT	<i>3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide</i>
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MyD88	<i>Myeloid differentiations primary response gene 88</i>
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH2	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
ND	Não detectável
ND-BMDM	Macrófagos derivados de medula óssea de animais não diabéticos
ND-MP	Macrófagos peritoneais de animais não diabéticos
NF-κB	Fator nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos
PBS	Tampão fosfato salina
PMK2	Piruvato quinase M2
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
PI	Iodeto de propídeo
PIP2	Fosfatidilinositol (4,5)- bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5)- trifosfato
PDK1	Proteína quinase dependente de fosfoinositol-1
PI3k	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PKC	Proteína quinase C
S6K1	Proteína ribossomal S6
SDS	Dodecil sulfato de sódio
STZ	Estreptozotocina

TBS	Tampão tris salina
TIRAP	Proteína adaptadora contendo domínio TIR
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
TRIF	<i>Domínio TIR contend adaptador inductor de inferferon-β</i>

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença que afeta mais de 425 milhões de indivíduos no mundo (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017), e esses indivíduos apresentam diversas comorbidades que ocorrem principalmente devido a altas concentrações de glicose plasmática, condição também conhecida como hiperglicemia, decorrente da carência de insulina, ou da sua ação (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Manter a homeostasia da glicose é um dos grandes desafios enfrentados por indivíduos diabéticos que com frequência apresentam níveis glicêmicos desregulados (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018).

Sabe-se que indivíduos diabéticos são mais susceptíveis a infecções quando comparados aos indivíduos saudáveis (CASQUEIRO; CASQUEIRO; ALVES, 2012), e existem algumas explicações para isso, primeiramente, a resposta imunológica desses indivíduos é inadequada e prejudicada (BENFIELD; JENSEN; NORDESTGAARD, 2007), adicionado a isso, um meio hiperglicêmico pode favorecer a permanência de diversos tipos de microrganismos que utilizam a glicose para crescimento e divisão (STUTTARD et al., 2015). Além dessas duas condições, indivíduos diabéticos são submetidos a numerosos e diversos procedimentos médico-hospitalares, o que aumenta inclusive o risco de infecções pós-cirúrgicas, sendo assim, tem sido demonstrado um melhor controle nas infecções de indivíduos que mantêm a glicemia próximo aos valores fisiológicos (CASQUEIRO; CASQUEIRO; ALVES, 2012).

Uma das células mais importantes para o reconhecimento de microrganismos potencialmente causadores de infecções no organismo são os macrófagos. Essas são células pertencentes à imunidade inata que reconhecem antígenos, iniciam processos de destruição, além de liberarem mediadores imunes para controlar o ambiente inflamatório, também ativam a imunidade adaptativa para que ocorra uma resposta mais especializada (GLASS; NATOLI, 2016). Neste contexto, os macrófagos são extremamente importantes para todo o processo inflamatório, uma vez que podem contribuir para a susceptibilidade a infecções de indivíduos diabéticos (SICA; MANTOVANI, 2012).

1.1 A glicose e o seu metabolismo

A glicose é uma fonte fundamental de energia para as células (DASHTY 2013), e é utilizada em diferentes vias metabólicas com objetivos de: prover a estabilidade dos níveis glicêmicos em casos de hipoglicemia, fornecer energia aos tecidos periféricos, servir de estoque

energético no fígado e músculo esquelético na forma de glicogênio (FAIRCHILD et al., 2003; HESSMAN e THOREN 1975), estoque de energia nos adipócitos para sua conversão em triglicerídeos (MARIN et al., 1992) e de prover estabilidade da temperatura corpórea (GALE et al., 1981).

Após a ingestão dos alimentos e absorção gastrointestinal, a glicose é absorvida para a corrente sanguínea elevando os níveis glicêmicos (de FRONZO, 2004) e o organismo ativa mecanismos para manter níveis fisiológicos de glicose no sangue (65-100 mg/dL) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Em condições de glicemia elevada, além de suprir a demanda energética para diversas células, a glicose, através de sua internalização nas células β -pancreáticas por meio do transportador de glicose de difusão facilitada (GLUT)2, irá promover a liberação de insulina para a corrente sanguínea (revisto por MacDONALD et al., 2005). A insulina possui papel fundamental na homeostasia da glicose, e atua no tecido hepático promovendo o metabolismo da glicose e nos tecidos adiposo e muscular esquelético auxilia a internalização, normalizando assim os níveis glicêmicos. Em momentos de hipoglicemia, a glicose pode também ser disponibilizada através da quebra do glicogênio (glicogenólise) e da produção de glicose por fontes aglicanos (gliconeogênese), processos que ocorrem principalmente no fígado e em uma menor porcentagem no córtex renal (ARONOFF et al., 2004). O hormônio que atua na contra regulação da insulina é o glucagon que é secretado pelas células α -pancreáticas (Figura 1).

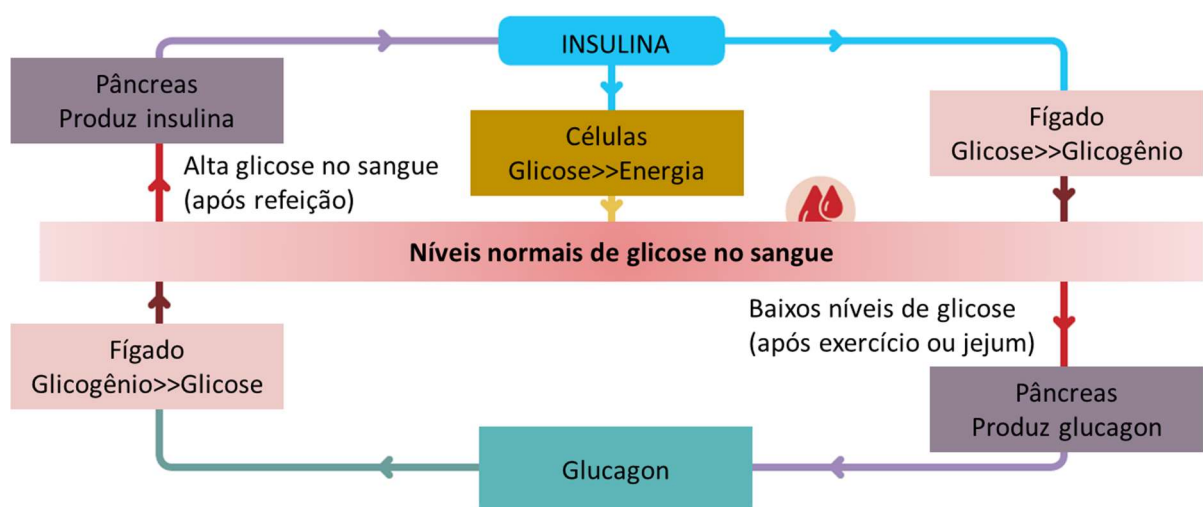


Figura 1: Regulação da glicemia através dos hormônios insulina e glucagon. Para manter os níveis fisiológicos de glicose no sangue, quando há altos níveis de glicose no sangue, o pâncreas será estimulado a secretar insulina, a insulina irá atuar na captação de glicose pelas células e na conversão de glicose em glicogênio no fígado. Quando há baixos níveis glicêmicos, o pâncreas será estimulado a liberar glucagon, que irá promover a quebra do

glicogênio para disponibilizar glicose e assim normalizar a glicemia (Adaptado de: FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES, 2015).

O transporte de glicose através da membrana das células eucariotas ocorre por um tipo de proteínas integrais de membrana da família GLUT (JOOST et al., 2004) pelo processo de difusão facilitada. Existem 14 tipos de GLUTs descritos em células humanas e são classificados baseado na similaridade de sua sequência em: classe 1 (GLUTs 1-4 e 14); classe 2 (GLUTs 5, 7, 9 e 11) e classe 3 (GLUTs 6, 8, 11, 12 e HMIT). Um ou mais tipos de GLUTs são expressos virtualmente em todos os tipos celulares no corpo humano (THORENS; MUECKLER, 2010). A existência desses diferentes tipos de transportadores de glicose com diferentes propriedades cinéticas e expressão na superfície celular, fornece a base para o ajuste da captação, metabolismo e geração de sinal para preservar a integridade celular e de todo o metabolismo corpóreo (THORENS, MUECKLER, 2010).

Quando dentro da célula, a glicose será direcionada para a produção de adenosina trifosfato (ATP). Há duas principais estratégias celulares para converter a glicose em fonte de energia, as vias não oxidativa ou também chamada de fermentação anaeróbia, e a via oxidativa, com isso, a reação da descarboxilação oxidativa é o elo entre essas duas vias (DASHTY, 2013). A glicólise é a via da fermentação anaeróbia e ocorre no citoplasma celular, ao fim desta via ocorre a produção de duas moléculas de ATP e ácido pirúvico. Posteriormente, o ácido pirúvico pode majoritariamente ser convertido em lactato pela lactato desidrogenase, ou pode sofrer reação do complexo piruvato desidrogenase e ser convertido em duas moléculas de acetil coenzima A e duas moléculas de NADH₂. O NADH₂ é consumido na fosforilação oxidativa (OXPHOS) e a acetil coenzima A alimenta o ciclo de Krebs e a OXPHOS na mitocôndria, ou é convertido em citrato para posterior biossíntese de ácidos graxos no citoplasma (DASHTY, 2013).

A via oxidativa ocorre na mitocôndria na presença de oxigênio, envolvem esta via o ciclo de Krebs e a OXPHOS. No ciclo de Krebs duas moléculas de piruvato, originadas da glicólise, são degradadas para liberar sua energia na forma de 2 trifosfato de guanosina (GTP) e as formas reduzidas de moléculas de alta energia (6 moléculas de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e 2 moléculas de flavina-adenina dinucleotídeo (FADH)) e esses são utilizados na cadeia respiratória pela OXPHOS na mitocôndria. No fim desse processo, há a produção de gás carbônico (CO₂) e água (H₂O) como produtos residuais, e produção de ATP. De modo geral a fosforilação oxidativa é 19 vezes mais eficiente do que a glicólise, e produz 36 moléculas de ATP. No total da metabolização da glicose, em condições de homeostasia, há a produção de 38 moléculas de ATP (DASHTY, 2013) (Figura 2).

A oxidação da glicose envolve também a formação de ácidos graxos, através da utilização do NADH₂ proveniente da conversão do ácido pirúvico para a OXPHOS. Também, a glicose que entra na célula pode participar da via das pentose fosfato, que é outro meio da oxidação da glicose e ocorre em fagócitos, adipócitos, hemácias e também hepatócitos (DASHTY, 2013). Esta via tem como substrato principal a glicose-6-fosfato, primeiro produto intermediário da glicólise, que é convertido em ribose-5-fosfato, ribulose-5-fosfato e principalmente NADPH₂ (fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida). A via das pentose fosfato é utilizada principalmente para síntese de ácidos nucleicos e reações biosintéticas como a síntese de ácidos graxos. Em células fagocíticas, como os macrófagos, o NADPH₂ formado é utilizado para produzir radicais superóxidos do oxigênio e também espécies reativas de oxigênio (EROs) para promover a morte de microrganismos. Para tanto, durante o processo de fagocitose, os macrófagos aumentam o seu consumo de oxigênio para suprir esta via e eliminar o microrganismo invasor (DASHTY, 2013) (Figura 2).

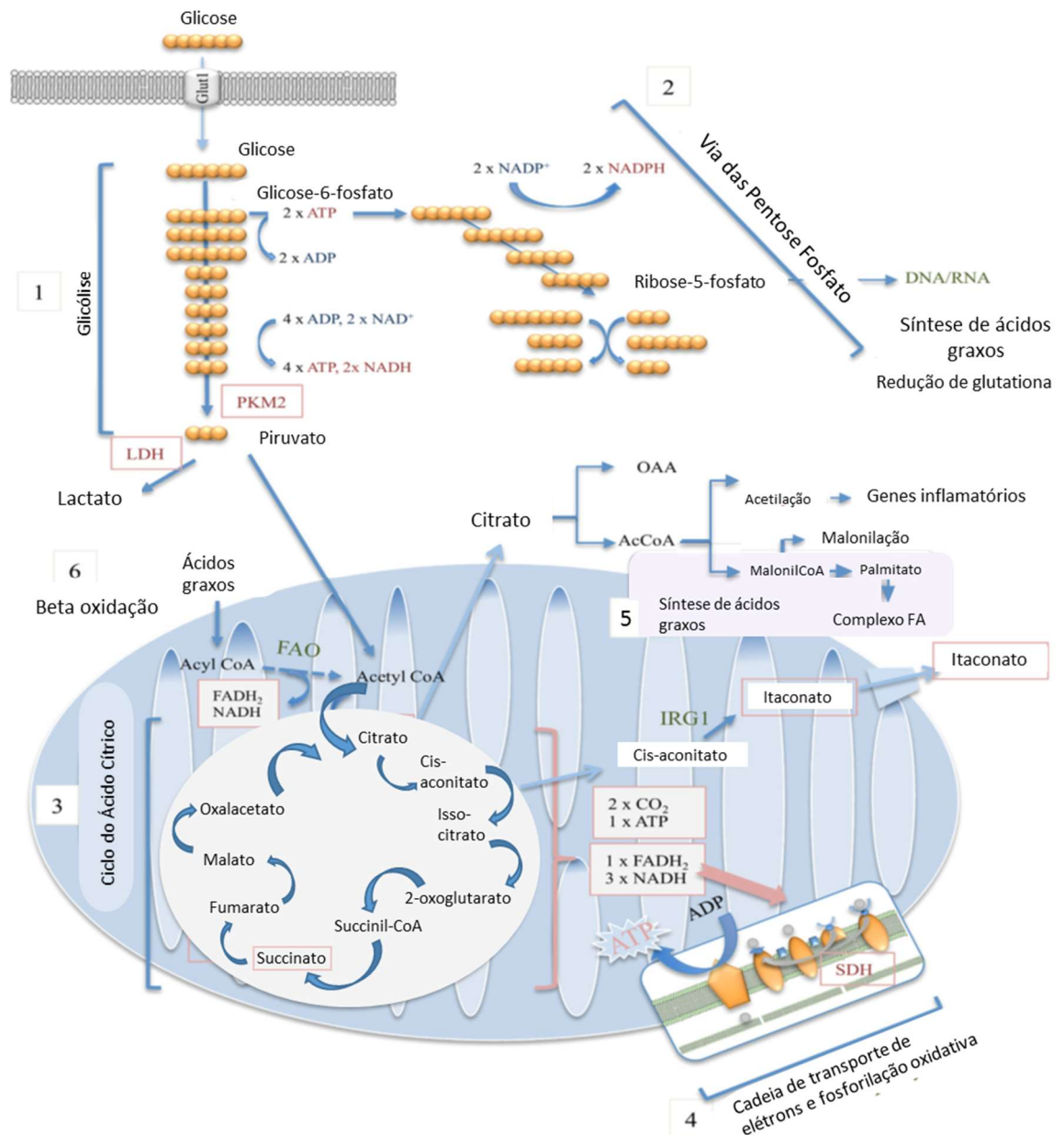


Figura 2: O metabolismo da glicose em macrófagos. Visão esquemática da via metabólica dos macrófagos após a entrada da glicose pelo GLUT, incluindo a glicólise (1), via da pentose fosfato (2), ciclo do ácido cítrico (3), cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa (4), síntese de ácidos graxos (5) e beta oxidação (6). Após a entrada da glicose via GLUT, ela é convertida em glicose-6-fosfato, no primeiro passo da via da glicólise, pode entrar na via da pentose fosfato ou continuar na via da glicólise produzindo como produto final piruvato e lactato, o piruvato é convertido em Acetil coenzima A, e agrega a cadeia do ciclo do ácido cítrico, que irá gerar mediadores para a fosforilação oxidativa. O citrato do ciclo do ácido cítrico pode ser substrato para a síntese de ácidos graxos (Adaptado de: DISKIN; McDERMOTT, 2018).

1.2 O Diabetes *mellitus*

Uma das condições envolvidas no desequilíbrio do metabolismo da glicose é o DM (ATKINSON 2014). Por definição, o DM é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos, caracterizado pela hiperglicemia, que ocorre por deficiência na ação e/ou produção da insulina

(SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). O DM é classificado em 4 classes clínicas de acordo com sua etiologia em: DM do tipo 1 (DM1) onde ocorre uma carência na produção da insulina; DM do tipo 2 (DM2) onde ocorre uma falha na atuação da insulina; diabetes gestacional, quando a hiperglicemia é diagnosticada durante a gestação, pois há uma diminuição da ação da insulina devido hormônios produzidos na placenta (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017; DARNTON et al., 2004); e outros tipos de diabetes que não se encaixam nas classificações anteriores, decorrente de alguma alteração de base como pancreatite e até mesmo rubéola congênita e promove também distúrbios glicídicos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

Considerado uma epidemia global, há uma estimativa que o número de indivíduos diabéticos cresça para até aproximadamente 629 milhões de indivíduos até o ano de 2045. O Brasil está em 3º lugar no ranking dos países com mais indivíduos diagnosticados com DM1, com idade de até 19 anos, atrás apenas dos Estados Unidos e Índia, e em 4º lugar no ranking de indivíduos na faixa etária de 20 a 79 anos diagnosticados com DM2, atrás de países como a China, Índia e Estados Unidos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

1.2.1 Diabetes *mellitus* do tipo 1 – DM1

O DM1 é uma das principais condições endócrinas e metabólicas envolvendo indivíduos de até 14 anos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018). O número de indivíduos com DM1 cresce anualmente em todo o mundo, e segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF), em sua edição de 2017, com uma incidência anual de 3%, estima-se que há 1.106.200 crianças e adolescentes, com idade de até 19 anos, diagnosticados com DM1 em todo o globo (IDF, 2017), este número é quase o dobro comparado com a edição anterior do IDF, em 2015 (IDF, 2015). O Brasil está entre os top 10 dos países com maior incidência e prevalência, com 88.300 indivíduos diagnosticados (<20 anos), e estima-se que haja aproximadamente 9.600 novos casos de DM1 por ano (IDF, 2017).

A fisiopatologia do DM1 envolve a destruição das células produtoras e secretoras de insulina. Neste caso, a consequência é o prejuízo, relativo ou absoluto, da secreção de insulina (ATKINSON; MACLAREN, 1994). Com a destruição das células β -pancreáticas, o indivíduo com DM1 apresenta níveis insuficientes de insulina para a normalização da glicose, sendo assim desencadeia uma condição caracterizada por uma constante hiperglicemia e dessa forma a

principal estratégia de tratamento e sobrevivência é a utilização de injeções diárias de insulina para normalização da glicemia (YOU; HENNEBERG, 2016).

Os três sintomas clássicos do estabelecimento do DM1 são a polidipsia, a polifagia e a poliúria, e o diagnóstico é realizado através da avaliação da glicemia em conjunto com os sintomas desses pacientes, que podem incluir também falta de energia, visão borrada e perda repentina de peso (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Na maioria das vezes, as alterações fisiopatológicas se instalam antes às alterações clínicas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017), sendo que, quando diagnosticado, o indivíduo com DM1 já apresenta aproximadamente 90-95% de destruição das células β (FOULIS et al., 1984; WILLCOX et al., 2009).

O desenvolvimento do DM1 ocorre por uma reação autoimune com destruição das células β -pancreáticas, e geralmente com a presença de auto anticorpos (sendo que os principais auto anticorpos são os: anticorpos anti-ilhotas (ICA) e auto anticorpos antidecarboxilase do ácido glutâmico (GAD65)), caso não seja desencadeado por reação autoimune, é provável que posteriormente ao início da destruição dessa células, ocorra o recrutamento das células do sistema imunológico, o que potencializa a destruição. Os casos que envolvem participação do sistema imunológico como desencadeadores, englobam aproximadamente de 70 a 90% dos casos de DM1 e são chamados de DM1 tipo 1A (EISENBARTH, 2007), já as causas dos 10% restantes permanecem desconhecidas, o que é designado como DM1 de origem idiopática, onde não há presença de auto anticorpos, e são chamados de DM1 tipo 1B, porém, a recomendação terapêutica é a mesma para ambos os tipos (GIANANI et al., 2010).

A pré-disposição genética é um dos principais fatores que culminam no desenvolvimento do DM1, sendo uma desordem poligênica, com aproximadamente 40 *loci* conhecidos por afetarem a susceptibilidade à doença. A maioria dos *loci* envolvidos estão ligados a resposta imunológica, ou seja, a influência genética contribui para uma resposta imune desordenada, o que leva a autodestruição das células β (CONCANNON et al., 2009). Ainda, a susceptibilidade genética pode também interferir nas respostas aos estímulos ambientais ou vias fisiológicas (COOPER et al., 2011), sendo assim, o ambiente pode ser um gatilho para aqueles indivíduos geneticamente susceptíveis (HALLER; ATKINSON; SCHATZ, 2005). Infecções como enterovirose, rubéola e até mesmo citomegalovírus podem ativar mecanismos de destruição das células β (VAN DER WERF et al., 2007). Toxinas e alguns agentes químicos também podem promover o gatilho desta destruição (ESPOSTI; SAVILAHTI; MYERS, 1996). Além disso, o aleitamento materno parece promover uma proteção contra o risco do

desenvolvimento do DM1, principalmente pela transferência de anticorpos protetores (LUOPAJÄRVI et al, 2008).

1.2.2 As complicações no DM1

A hiperglicemia, níveis glicêmicos acima de 126 mg/dL em jejum (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017), em conjunto com baixos níveis de insulina, gera uma incapacidade de oxidação da glicose no tecido adiposo e muscular, assim como a sua metabolização no fígado (GLASGOW, 1992). Além disso, o excesso de glicose pode prejudicar as células e tecidos que não necessitam de insulina para internalizar a glicose. Contudo, a falta da insulina também induz a lipólise, com uma produção excessiva de ácidos graxos e também corpos cetônicos que podem culminar em acidose metabólica. Este estado gerado pela falta de insulina pode levar o indivíduo ao coma (SPERLING, 2002).

Devido a quantidades insuficientes de insulina endógena é necessário utilizar o tratamento com insulina exógena para a normalização dos níveis de glicemia (CALLIARI; NORONHA, 2016; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018), almejando alcançar as metas glicêmicas estabelecidas para cada situação (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018). A maioria das crianças e adolescentes com DM1 devem realizar injeções múltiplas e diárias de insulina, ou até mesmo infusão subcutânea contínua, além disso, devem monitorar a glicemia várias vezes por dia (COOPER et al., 2013; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018). Em alguns casos também são necessários a associação com hipoglicemiantes orais (REWERS et al., 2014).

As metas glicêmicas estabelecidas pela *International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes* (ISPAD) são: glicemia pré-prandial de 90-145 mg/dL; pós-prandial de 90-180 mg/dL; glicemia ao deitar de 120-180 mg/dL; e hemoglobina glicada de até 7,5% (REWERS et al, 2014), os alvos glicêmicos estabelecido pela ISPAD são parecidos com os estabelecidos pela *American Diabetes Association*, onde os objetivos são: glicemia pré-prandial de 90-130 mg/dL; glicemia ao deitar de 90-150 mg/dL; e hemoglobina glicada de até 7,5% (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018). Tais metas são guias iniciais que devem ser individualizados para os pacientes, conforme necessidade, garantindo que a glicemia chegue o mais próximo aos valores fisiológicos, com cuidados para não promover casos de hipoglicemia (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018).

Estudos realizados pelo *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT), apresentaram que a maior parte das complicações no indivíduo diabético está relacionado ao descontrole metabólico (DCCT, 1993). Ainda, existem diversos benefícios da utilização do controle restrito da glicemia, obtendo resultados positivos no que se refere a alterações macrovasculares e renais (KÄHLER et al., 2014), porém este manejo apresenta alguns vieses como a adesão do paciente a um maior controle glicêmico e também a casos graves de hipoglicemia (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018).

O risco de hipoglicemia grave em pacientes com DM1 é um fator importante no planejamento estratégico do protocolo de tratamento desses indivíduos (DCCT, 2005). Atualmente com vários mecanismos para realizar este controle, como o uso de bombas de insulina e monitoramento contínuo da glicemia, a utilização de estratégias para o controle glicêmico tem sido intensificado, buscando a redução da variabilidade glicêmica objetivando menos complicações relacionado não só à hiperglicemia mas também com a hipoglicemia (McCALL, 2012).

As complicações resultantes do DM1 são as principais causas de morbidade e mortalidade nesses indivíduos, e são classificadas em macrovascular e microvascular. A principal complicação macrovasculares estão relacionadas a doenças cardiovasculares (MELENDEZ-RAMIREZ; RICHARDS; CEFALU, 2010), sendo que indivíduos diabéticos apresentam 10 vezes mais chances de complicações comparado a indivíduos não diabéticos, e um controle intensivo do DM1 pode reduzir em até 42% desses riscos cardiovasculares (ORCHARD et al., 2006). Entre as complicações microvasculares estão retinopatia e também neuropatia (ATKINSON; EISENBARCH; MICHELS 2014). A alta susceptibilidade de indivíduos diabéticos a infecções também é uma das principais complicações, principalmente em pacientes pós-cirúrgicos (CASQUEIRO; CASQUEIRO; ALVES, 2012).

1.2.3 Indivíduos diabéticos são mais susceptíveis a infecções

Existe uma correlação entre pacientes diabéticos e a ocorrência de infecções, e esse fato é ainda mais relevante se tratando de indivíduos com DM1, estima-se que em indivíduos hospitalizados, 6% das infecções e 12 % das mortes devido infecções ocorram em pacientes DM (CAREY et al., 2018). Vários estudos apontam que a presença de uma resposta imuno-inflamatória deficiente na população com DM1 aumenta o risco de infecções (LO, 2005; SHAH; HUX, 2003), assim como a neuropatia diabética e também o descontrole no metabolismo lipídico (PEARSON-STUTTARD et al., 2016; PELEG et al., 2007).

Um controle glicêmico inadequado está diretamente relacionado ao risco de infecções nesses indivíduos (SIMONSEN et al., 2015). Diversas pesquisas tem apresentado que até mesmo um aumento agudo da glicemia está relacionado ao aumento de marcadores inflamatórios em indivíduos diabéticos. Em conjunto a isso, um aumento de 1 mMol/L (18 mg/dL) de glicose no sangue pode elevar de 6 a 10% o risco de hospitalização por pneumonia, infecções de pele ou do trato urinário (BENFIELD; JENSEN; NORDESTGAARD, 2007; GORDIN et al., 2008).

A alta susceptibilidade a infecções adicionadas ao fácil desenvolvimento de complicações infecciosas após um trauma ou cirurgia contribuem para um aumento na morbidade e mortalidade de pacientes diabéticos. Um estudo realizado entre 1996 e 2009 mostrou que 81% das hospitalizações de indivíduos diabéticos eram devido as infecções bacterianas, e este fato estava relacionado a hiperglicemia (SIMONSEN et al., 2015). Outro estudo realizado com dois milhões de diabéticos no período entre 1979 a 2003 apresentou as bactérias Gram-negativas como responsáveis por 25% das infecções registradas, o restante 75% das infecções foram causadas por bactérias Gram-positivas (29%), patógenos anaeróbios (1%), fungos (2%) e outros patógenos desconhecidos (43%) (ESPER; MOSS; MARTIN, 2008).

Os principais mecanismos para esta alta susceptibilidade às infecções em indivíduos diabéticos envolvem diversos fatores. Primeiramente, um ambiente hiperglicêmico pode potencializar diretamente a virulência de alguns patógenos (SIMONSEN et al., 2015).

Outro fator importante que aumenta as chances de infecções é a própria nefropatia diabética, que está relacionada com maior prevalência de infecções nos indivíduos diabéticos, em conjunto a isso, um fraco controle glicêmico está associado a um maior consumo de antibióticos, e um maior consumo de antibióticos está relacionado a um risco elevado de desenvolvimento de nefropatia em indivíduos diabéticos (SIMONSEN et al., 2015). Este fato mostra como um descontrole da glicemia promove um efeito cascata em indivíduos diabéticos.

A glicosúria, a dismotilidade gastrointestinal e urinária, são também três fatores presentes no DM que aumenta a susceptibilidade à infecções (CASQUEIRO; CASQUEIRO; ALVES, 2002).

Por último, um fator crucial é uma resposta imunodeficiente em indivíduos diabéticos, que propicia a evasão de microrganismos, facilitando o estabelecimento de diversos tipos de infecções. Entre as diferentes falhas já descritas, destacam-se uma baixa produção de interleucinas (IL) em resposta a infecções, com menor secreção de IL-1 e IL-6, e menor resposta

aos estímulos por LPS, baixa atividade fagocítica e citotóxica, baixa adesão dos polimorfonucleares para migração celular além de menor atividade antioxidante (GEERLINGS; HOEPELMAN, 1999; PELEG et al., 2007). A hiperglicemia tem sido relacionada como o principal fator para essas alterações imunológicas (CASQUEIRO; CASQUEIRO; ALVES, 2012).

1.2.4 A hiperglicemia altera a resposta imunológica

Como principal gatilho para a predisposição a infecções em indivíduos diabéticos, a hiperglicemia altera diversas funções, componentes e mecanismos do sistema imune que favorece a evasão, permanência e crescimento de microrganismos causadores de infecções. O ambiente hiperglicêmico pode promover a glicação de proteínas, incluindo citocinas como IL-10 e TNF- α , essa glicação inativa essas citocinas, diminuindo o potencial inflamatório e também anti-inflamatório do sistema imune.

A hiperglicemia também contribui para a diminuição da atividade bactericida (SOUZA et al., 2007), a resposta da microvasculatura também é alterada pela hiperglicemia (ANJOS-VALOTTA et al., 2006; RASSIAS et al., 1999; BAGDADE; WALTERS, 1980) o sistema complemento também sofre modificações (SAIEPOUR; SEHLIN; OLDENBORG, 2003), além de alterações na secreção de citocinas que influenciam na resolução da inflamação (SUN, et al. 2012).

A inabilidade da resolução da infecção em indivíduos diabéticos gera uma estimulação crônica dos macrófagos (CAMPUS et al., 2005; TARGHER et al., 2005). Muitos estudos mostram a flexibilidade fenotípica dos macrófagos em resposta a sinais do microambiente (MANTOVANI et al., 2008; HAGEMANN et al., 2008; KRAUSGRUBER et al., 2011; BRADY et al., 2016). Sabe-se que as funções dos macrófagos e o metabolismo da glicose estão interconectados, como por exemplo, a influência do metabolismo da glicose na resposta inflamatória contra a bactérias, sendo que um aumento no metabolismo de glicose pelos macrófagos pode influenciar a reprogramação metabólica e sua capacidade inflamatória (FREEMERMAN et al., 2014). Além disto, como outros autores já demonstraram, algumas quinases envolvidas no metabolismo da glicose são também responsáveis por um papel imunomodulatório nos macrófagos, mas se essa correlação é uni ou bidirecional ainda é pouco conhecida (MAUER et al., 2014).

1.3 Os macrófagos como células chave na resposta inflamatória

Os macrófagos são componentes da imunidade inata e possuem um papel principal no reconhecimento de microrganismos, participando da inicialização e também da resolução da resposta inflamatória (BAIN et al., 2016). Além de participarem da ativação da imunidade adaptativa, onde atuam como células apresentadoras de antígenos (APC) (GORDON; MARTINEZ, 2010).

Atuando como células sentinelas, os macrófagos são importantes sensores do microambiente e atuam como linha de frente do sistema imunológico onde coordenam funções metabólicas e imunológicas (GLASS; NATOLI 2016). Distribuídos estrategicamente em quase todos os tecidos do corpo, os macrófagos podem ser divididos em macrófagos residentes e macrófagos recrutados, sendo assim, essas células podem apresentar algumas atuações distintas dependendo do sítio microanatômico em que se encontram (GORDON; TAYLOR, 2005). Os macrófagos residentes possuem ontogenia diferente dos macrófagos recrutados. Representando o sistema mononuclear fagocítico, os macrófagos recrutados possuem origem na medula óssea, circulam no sangue como monócitos e populam os tecidos durante estado basal e também inflamação (GEISSMENN *et al.*, 2010), já a ontogenia dos macrófagos residentes ainda não está bem, esclarecida, mas parece que se originam nos próprios sítios onde estão localizados como populações renováveis (DAVIES et al., 2013).

Essas células possuem uma dualidade funcional, a proteção do hospedeiro *versus* a injúria tecidual, para isso, os macrófagos devem manter um estreito balanço entre suas funções de inflamação e resolução (GORDON; PLUDDMANN, 2017), para evitar uma inflamação crônica e prolongada e ao mesmo assim orquestrar uma resposta eficiente (LOMBARDO et al., 2007).

Os macrófagos reconhecem uma gama de diferentes tipos de patógenos, onde distinguem patógenos através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) via receptores de reconhecimento padrão (PRRs). A conexão entre os PRRs e os PAMPs é uma fonte primária de reconhecimento de patógenos e desencadeia as respostas mediadas pelos macrófagos (GLASS; NATOLI, 2016). Além disso, os macrófagos também reconhecem padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que consiste no reconhecimento de moléculas liberadas pelas células injuriadas, desta maneira, os macrófagos desempenham papel fundamental no reconhecimento de patógenos e no reconhecimento de danos causados pelos patógenos (MATZINGER 2002).

Na presença do antígeno, os macrófagos realizam o processo de fagocitose, que tem basicamente dois objetivos: matar o microrganismo dentro do fagolisossoma, e também processar o antígeno para que possa ser apresentado aos linfócitos T, e assim, ativar uma resposta mais específica, a resposta imune adaptativa (DAVIES et al., 2013). Além desses dois passos, ao reconhecer o antígeno através do seu PRR específico, há a ativação de vias de sinalizações específicas que irão culminar na ativação de fatores de transcrição com liberação de mediadores imunes que terão importante papel na modulação do sítio inflamatório. Conforme o processo infeccioso evolui, os macrófagos irão alterar os tipos de mediadores liberados para suprir a demanda e também promover a resolução da inflamação assim que necessário (BONIAKOWSKI et al., 2017).

Com ação pró ou anti-inflamatória, os mediadores imunes incluem: citocinas como as interleucinas (IL), fator de necrose tumoral (TNF), interferon (IFN), Espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (NO) entre outras, e a liberação desses mediadores dependem dos sinais do microambiente em que os macrófagos se encontram, dependendo do estágio do processo inflamatório. Cada um dos mediadores imunes possui funções específicas e papéis importantes na evolução de diversas patologias (AKIRA; TAKEDA; KAISHO, 2001).

Dependendo dos estímulos externos e vias de sinalizações ativadas, os macrófagos podem se comportar como fenótipos diferentes, existem dois fenótipos bem esclarecidos: os macrófagos M1 e M2, ilustrados na Figura 4 (MURRAY, 2016; MOSSER; EDWARDS, 2008). Conhecido como ativação clássica, os macrófagos M1 apresentam uma característica pro-inflamatória principalmente com uma imunidade direcionada para bactérias e patógenos intracelulares, sendo ativados após a sinalização pelo receptor do tipo Toll (TLR), um PRR, e também sinalização por IFN. Já a ativação dos macrófagos M2, é conhecida por ativação alternativa, está relacionada a imunidade contra helmintos e processos alérgicos, com uma função que visa reparo tecidual e remodelamento, nesse contexto a ativação é mediada principalmente por IL-4 ou IL-13 (AKIRA; TAKEDA; KAISHO, 2001).

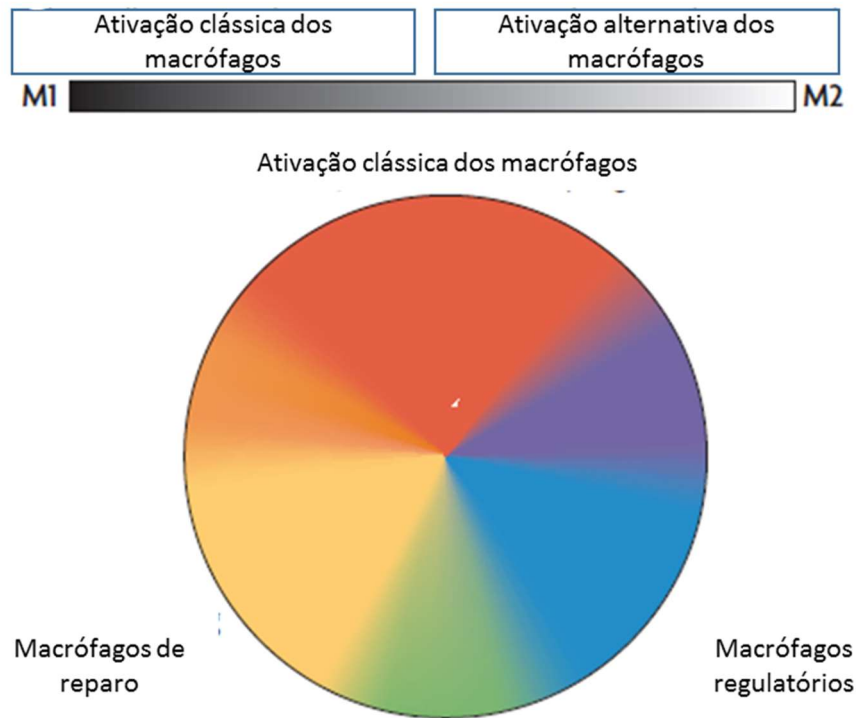


Figura 3: A polarização dos macrófagos. Divisão representativa da polarização dos macrófagos, onde a ativação clássica promove a polarização para macrófagos M1, e a ativação alternativa para M2. Na divisão de cores na roda, em vermelho está representando os macrófagos da ativação clássica, relacionados à resposta pró-inflamatória, em amarelo está sendo representado a polarização dos macrófagos para modo de reparo, e em azul para macrófagos regulatórios. A capacidade plástica dos macrófagos permite que, dependendo do estímulo do microambiente, ele transite por esses três perfis representados na roda das cores (Adaptado de: MOSSER; EDWARDS, 2008).

A polarização dos macrófagos pode ser crucial para o sucesso da resposta inflamatória, e a mudança fenotípica pode ocorrer em diversos momentos de acordo com as mudanças fisiológicas ou desafios do ambiente (WYNN; CHAWLA; POLLARD 2013). A célula que se comporta como fenótipo M1, geralmente ativada via TLR, promove ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias que irão contribuir para a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), e liberação de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (BONIZZI; KARIN, 2004), com alta produção de Espécies reativas de oxigênio e NO, promovem resposta do tipo Th1, e possuem uma forte atividade microbicida e tumoricida, o que contribui para promover mais inflamação (SICA; MANTOVANI, 2012). A ativação do NF- κ B também promove a ativação de genes que são essenciais para a resolução da inflamação e para a polarização em M2 (LAWRENCE; GILROY, 2007).

As vias de sinalização envolvidas na polarização para M2 são ativadas principalmente pela sinalização dos receptores para as interleucinas IL-4 e também IL-13. Os macrófagos M2 estão envolvidos na resposta parasitária, na promoção do remodelamento tecidual e progressão

de tumores, promovem resposta do tipo Th2, apresentando uma função imunoreguladora. São caracterizadas por boa capacidade fagocítica, expressão elevada de receptores do tipo *scavengers*, expressam receptores de manose e galactose, produzem ornitina e poliaminas através da via da arginase e também liberam mediadores anti-inflamatórios como a IL-10 (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Entre as extremas características da polarização dos macrófagos, há uma grande variação de comportamento dentro dessa classificação, onde essas células podem ter características que abarcam ambas as classificações, tendo perfil intermediário. Esta plasticidade dos macrófagos pode ser a razão do desenvolvimento de diversos tipos de doenças e complicações. Se por algum motivo há disfunções no processo de polarização dos macrófagos, o processo homeostático de inflamação e resolução da inflamação é rompido (SICA; MANTOVANI, 2012). Se no estado basal essas células estiverem “pré-polarizadas” para M1 ou M2, pode alterar drasticamente a resposta do organismo ao agente infeccioso (MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009; MOSSER; EDWARDS, 2012).

Como células APC, os macrófagos apresentam antígenos via complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II (MHC-II), e assim auxiliam na ativação dos linfócitos T CD4⁺ (NEEFJES et al., 2011). Após o reconhecimento pelo PRR, o antígeno é englobado, processado e fragmentado para que, partes de sua estrutura sejam expostas na superfície celular pelo MHC-II, esta molécula forma um suporte para os peptídeos do antígeno, e assim, é enviada para a superfície celular o complexo MHC-II e antígeno (NEEFJES et al., 2011). Este processo irá ativar a resposta adaptativa, com expansão clonal de linfócitos T. Porém, a molécula do MHC-II sozinha não é suficiente para ativar os linfócitos T, por isso as moléculas co-estimulatórias são necessárias para que promovam a geração de sinais secundários. As moléculas acessórias CD86 e CD80 são os sinais co-estimulatórios mais importantes deste processo. Caso o CD86 não esteja presente e/ou não esteja funcionando adequadamente, a apresentação de antígeno torna-se prejudicada (SUBAUSTE et al., 1998).

1.3.1 Ativação do TLR4 por lipopolissacarídeo

Um PRR importante para o reconhecimento de bactérias Gram-negativas é o TLR4, que forma um complexo TLR-4/MD2/CD14 para reconhecer o lipopolissacarídeo (LPS), constituinte da parede dessas bactérias (Van AMERSFOOT, 2003). Primeiramente, o LPS se liga a proteína ligadora de LPS (LBP) presente no soro e em fluídos, e forma o complexo LPS-LBP. O LBP transfere o LPS para o CD14, uma glicoproteína presente na superfície dos

macrófagos, e o CD14 transfere o LPS para o MD-2 no complexo TLR4/MD-2 (Figura 4) (da SILVA CORREIA et al., 2001; GIOANNINI et al., 2005).

A transferência do sinal via TLR4/MD2, induzida pelo complexo LPS-LBP, junto ao CD14, possui duas vias bem esclarecidas: a via dependente de MyD88 e a via dependente de TRIF, também conhecida como via independente de MyD88, onde ocorre o recrutamento de dois pares de proteínas adaptadoras TIRAP/MyD88 e TRAM/TRIF respectivamente, e esses recrutam outras quinases formando complexos multimoleculares (KAWAI; AKIRA, 2007). A via dependente de MyD88 irá promover uma ativação de fase inicial de NF- κ B, de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) e proteína ativadora 1 (AP1), com o controle da produção de citocinas como TNF- α e IL-6 (KAWAI; AKIRA, 2007; KUMAR et al., 2009a, b; BODE et al., 2012). Já a via dependente de TRIF inicia a sinalização da via promovendo a expressão de IFN do tipo 1 e quimiocinas induzidas por IFN, como a IL-10, também promove uma ativação de fase tardia do NF- κ B e MAPK (KAWAI; AKIRA, 2011). Sendo assim, a sinalização inicia pela via TLR4 ativando MyD88 através da transdução de sinal do receptor, já o complexo TRAM/TRIF é recrutado após a endocitose do TLR4 (AKIRA; TAKEDA, 2004; HUSEBYE et al., 2006).

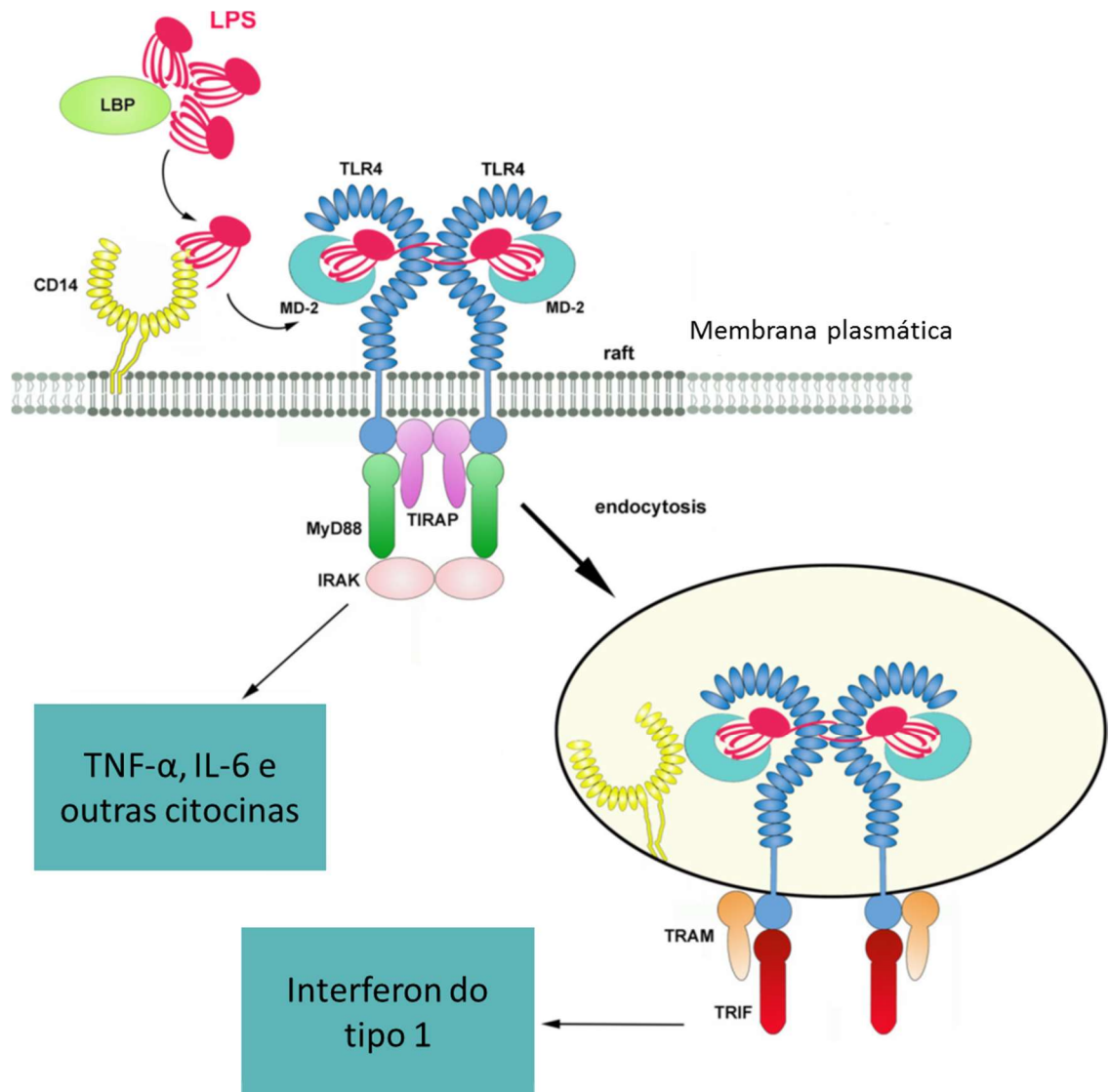


Figura 4: Reconhecimento do LPS via TLR4. O LPS se liga ao LBP, que transfere o LPS para o CD14, presente na membrana celular. O CD14 transfere então o LPS para o complexo TLR4-MD2, e o sinal será transmitido via MyD88, que irá ativar vias de sinalização para a secreção de citocinas pró-inflamatórias. A via dependente de TRIF irá ser ativada com a endocitose do complexo TLR4-MD2-CD14, e irá promover primariamente a secreção de IFN do tipo 1 (Adaptado de: PŁÓCIENNIKOWSKA et al., 2014).

A interação do LPS com TLR4 é caracterizada pela ativação de cascatas inflamatórias e metabólicas, de cascatas envolvidas na sobrevivência celular e também crescimento e diferenciação (DOYLE; O'NEIL, 2006). Dentre as diferentes vias ativadas através da sinalização do TLR4, a via fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3 quinase (PI3K)/proteína quinase B (AKT) possui um papel central na regulação da sobrevivência celular e proliferação (KATSO et al., 2001).

Após a ligação do TLR4 com o seu agonista LPS, há o recrutamento de TIRAP/MYD88 com ativação da PI3K, esta quando fosforilada em sua subunidade regulatória p85, realiza a conversão de fosfatidilinositol (4,5) -bisfosfato (PIP2) em fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato

(PIP3), e a PIP3 ativa a proteína quinase dependente de fosfoinositol 1 (PDK1) que fosforila a AKT, e a recruta para próximo da membrana plasmática (ALESSI et al., 1994). A molécula mTORC2 também ativa a AKT, que consequentemente ativa mTORC1, com ativação de suas proteínas que promovem síntese proteica, essencial para produção e secreção de citocinas (Figura 5).

Outras vias de sinalização que também estão envolvidas na sinalização do TLR4-LPS, são as MAPK, a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) que é um dos principais sensores energéticos da célula (HARDIE et al., 2017), as diferentes isoformas da proteína quinase C (PKC), e também o complexo mTOR (HOWELL; MANNING, 2011). A cascata de sinalização das MAPK é composta por MAPK, MAPK quinase e MAPK quinase quinase (SWEET; HUME, 1996). O conjunto de proteínas das MAPK é composto pela proteína quinase regulada por sinais extracelulares 1 e 2 (ERK 1/2), proteína quinase ativada por estresse ou c-jun NH2-terminal (SAPK/JNK) e também pela proteína quinase p38. Elas possuem importante papel na resposta inflamatória, levando a ativação dos fatores de transcrição AP1 e NF- κ B. A ativação da sinalização das MAPK induz mudanças na cromatina que irão remover os freios que previnem a expressão de genes inflamatórios em estado basal (MEDZHITOV; HORNG, 2009).

A ERK1/2 é ativada através de sua fosforilação, e a sua inibição promove uma redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 induzida por LPS em monócitos (GUHA; MACKMAN et al., 2001). A via da SAPK/JNK é ativada por LPS também, e seus alvos envolvem fatores de transcrição que regulam genes inflamatórios (SWANTEK et al., 1997).

O mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos) é uma quinase serina/treonina e apresenta uma subunidade catalítica com dois complexos, complexo mTOR 1 (mTORC1) e complexo mTOR 2 (mTORC 2). Possui a função de sensor energético na célula o que auxilia na disponibilidade de nutrientes e sua utilização pelas vias dos processos metabólicos como a síntese proteica, glicólise e também lipogênese (HOWELL; MANNING, 2011), e é central na regulação metabólica da imunidade (O'NEILL; HARDIE, 2013). O mTORC1 é regulado negativamente pelo complexo de tuberosa esclerososa ou complexo esclerose tuberosa (TSC) 1 e 2. Sabe-se que a via de mTORC1 pode coordenar alterações metabólicas durante a ativação dos macrófagos, onde a ativação dos macrófagos com LPS resulta em ativação do mTORC1 com fosforilação em seus alvos: a proteína ribossomal S6 (S6K1) e 4E-BP1 (BYLES et al., 2013).

Ainda, macrófagos nocautes para TSC1 possuem alta atividade de mTORC1, que além de diminuída sinalização da AKT, apresentam uma menor ativação de seus alvos, como a

FOXO1, o que provavelmente ocorre devido ao feedback negativo mediado pela ativação de mTORC1. Porém, não se sabe ainda o quanto esse mecanismo implica na liberação de citocinas que poderia interferir na polarização desses macrófagos para M2 (BYLES et al., 2013). Além disso, a ativação de mTORC1 suprime a autofagia, um processo catabólico para degradação lisossomal e de organelas injuriadas.

Identificado como um regulador metabólico e inflamatório, a AMPK atua inativando componentes do complexo mTOR, através da fosforilação e ativação do inibidor de mTOR, o TSC-2, induzindo uma resposta anti-inflamatória. Isso ocorre, principalmente, como um resultado de privação de energia, o que promove uma supressão na síntese proteica e crescimento celular (HARDIE; CARLING, 2008; INOKI; ZHU; GUAN, 2003).

A AMPK pode ser rapidamente ativada ou inativada por sinais anti-inflamatórios ou pro-inflamatórios respectivamente (SAG et al., 2008). A ativação da AKT também é regulada positivamente pela AMPK (SAG et al., 2008). A sinalização via TLR4 induz além das alterações inflamatórias, mudanças metabólicas. A ativação da AKT neste cenário faz parte da ação anti-inflamatória da AMPK (GUHA et al., 2002).

Diferentes isoformas da proteína quinase C (PKC) auxiliam na sinalização gerada pelo complexo LPS-TLR4. Suas isoformas são divididas em subfamílias de acordo com os requisitos necessários para sua ativação. PKC- α , - β I e β II necessitam de cálcio, fosfatidilserina e de diacilglicerol, já a PKC- δ , - ϵ , - η e - θ requerem diacilglicerol e fosfatidilserina, mas são cálcio independente (NEWTON, 2003). A PKC- α está envolvida na ativação da MAPK, liberação de TNF- α , IL-1 β , NO, assim como na fagocitose e também na destruição de microrganismos intracelulares (POOLE et al., 2004). A PKC- δ também atua na sinalização mediada por TLR4, possui papel fundamental na propagação do sinal do TLR4 via interação com TIRAP tendo ação principal na ativação do NF- κ B, produção de citocinas inflamatórias e (KONTNY et al., 2000). Modificações na atividade da PKC altera a liberação de citocinas (FRONHOFER; LENNARTZ; LOEGERING, 2006).

A conexão entre a resposta imune e o metabolismo energético tem sido foco nos últimos anos (BUCK et al., 2017; den BOSSCHE et al., 2017; LANGSTON et al., 2017; LEE et al., 2018; O'NEILL, PEAERCE, 2016). A glicose é metabolizada principalmente para gerar energia na forma de ATP (NAGY et al., 2015). Os macrófagos metabolizam a glicose para responder a alguns tipos de estímulos, selecionando a via que irá gerar os intermediários metabólicos para beneficiar e suprir o tipo de resposta necessária para a manutenção celular. Além disso, o

microambiente pode influenciar diretamente os macrófagos e a forma como a glicose será metabolizada, e isso terá influência direta na resposta inflamatória (O'NEILL et al., 2014).

As células normalmente priorizam a fosforilação oxidativa para a geração de ATP, no entanto algumas condições podem promover a priorização da via glicolítica para metabolizar a glicose mesmo em condições aeróbias, e isso de alguma forma confere vantagem para essas células (NAGY; HASCHEMI, 2015). Este fato foi primeiramente descrito em células cancerígenas, um fenômeno chamado de “efeito Warburg”, onde as células mesmo na presença de oxigênio desviavam a maior parte do piruvato, produto final da glicólise, para lactato, ao invés de converter em Acetyl-CoA para realizar a OXPHOS (KRAWCZYK et al., 2010). Este efeito também é observado em células imunes (O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016).

O tipo de resposta dos macrófagos, é altamente influenciado pelas vias de metabolização da glicose e tem sido demonstrado que os macrófagos M1 priorizam a glicólise, e os M2 direcionam priorizam a OXPHOS (FREEMERMAN et al., 2014; MILLS et al., 2016; O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016). Em conjunto a isso, os macrófagos consomem uma maior quantidade de glicose quando estimulados por LPS (FREEMERMAN et al., 2014), o que é afetado por fatores como a expressão do transportador de glicose e da capacidade da célula em aumentar a atividade da via da glicólise (FUKUZUMI et al., 1996). Da mesma maneira, após uma superexpressão de GLUT1, principal transportador de glicose em macrófagos, há um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e alguns mediadores pró-inflamatórios por macrófagos RAW 264.7 (FREERMERMEN 2014). O tipo e a quantidade de energia disponível para os macrófagos serão essenciais para modificar e direcionar o tipo de resposta que esta célula vai proporcionar.

Sendo assim, a ativação dos macrófagos via TLR4-LPS, promove uma mudança no metabolismo dos macrófagos, aumento da glicólise, e atenuação do metabolismo oxidativo, que é mediado em parte pelo NO, isso leva a uma limitação na cadeia de transporte de elétrons, e consequentemente acumulo de espécies reativas de oxigênio. O aumento da expressão de GLUT1, na ativação por LPS e aumento da glicólise são dependentes de PI3K/AKT, e esses efeitos são opostos aos da AMPK. Além disso, a sinalização de IL-10 promove a mudança da glicólise para a fosforilação oxidativa, diminuindo a sinalização do TLR4 (RODRIGUES-PRADOS et al., 2010). A ativação de mTORC1 também ativa a glicólise.

A sinalização da AKT mediada por TLR4 e o seu papel na inflamação mitocondrial ainda não está bem definida (KENNY; O'NEIL, 2008). A via PI3K/AKT possui tanto papel pró-inflamatório como anti-inflamatório na sinalização do TLR e esta via pode ser o link entre

a resposta imune através do TLR e restauração do metabolismo energético (BAUERFELD et al., 2012).

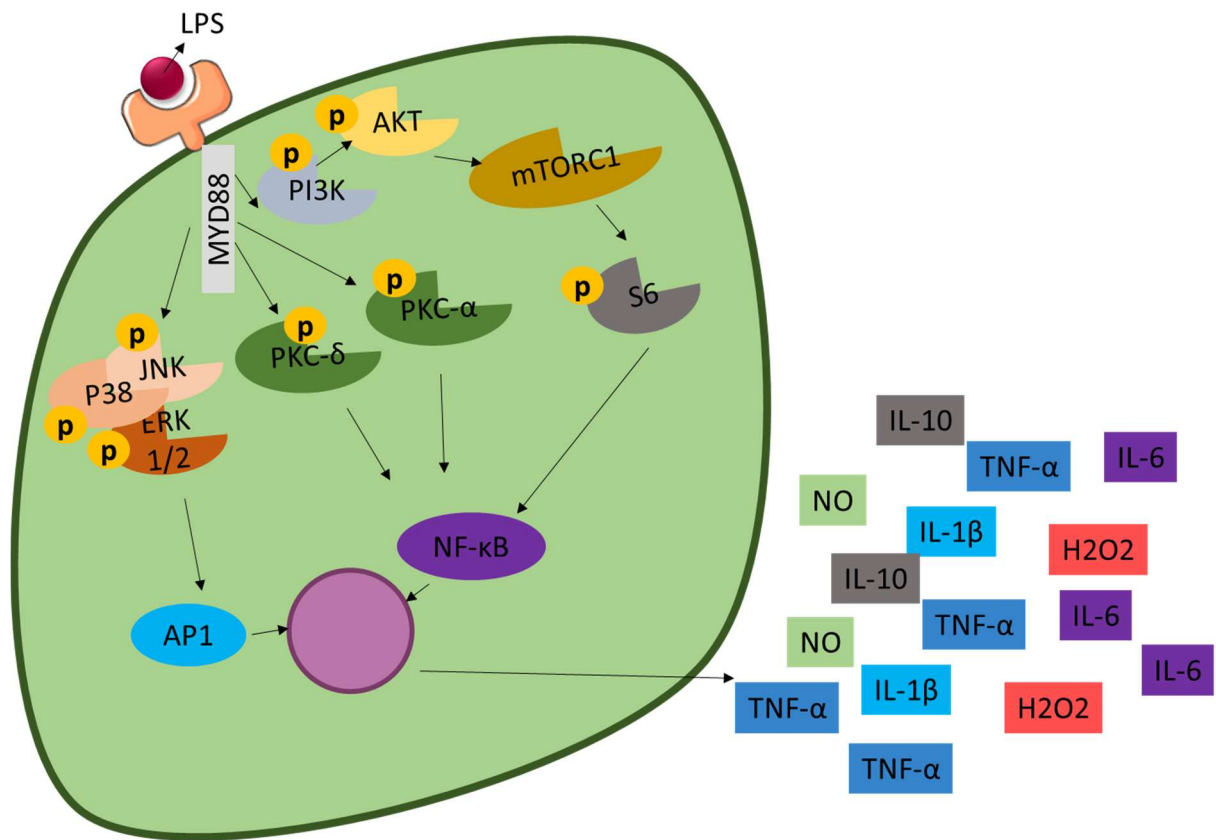


Figura 5: Via de sinalização do TLR-LPS. A ligação do LPS ao TLR4 promove o recrutamento da molécula adaptadora MYD88, esta molécula ativa a PI3K subunidade p85, converte PIP2 em PIP3 que recruta a AKT para a membrana, a Akt possui papel fundamental na ativação de outras vias de sinalização que culminam na liberação de citocinas, incluindo mTORC1, que fosforila a proteína S6, envolvida na síntese proteica e ativação do fator de transcrição NF-κB. O recrutamento de MYD88 também ativa as PKCs, proteínas envolvidas na fagocitose, morte microbiana e também na ativação do fator de transcrição NF-κB que culmina na produção e secreção de citocinas inflamatórias. O complexo das MAPK também é ativado via TLR4-LPS, culminando na ativação do fator de transcrição AP1, que também é responsável por promover síntese e secreção de citocinas inflamatórias (AKIRA; TAKEDA 2004; LOEGERING; LENNARTZ 2011).

A desregulação nos macrófagos dos camundongos diabéticos pode ser causada por deficiência de insulina ou efeitos diretos da hiperglicemia nos precursores das células do hospedeiro (SUN et al., 2012). A hiperglicemia pode alterar algumas moléculas de superfície como os PRRs (MOHAMMAD, et al. 2006), moléculas envolvidas na ativação na imunidade adaptativa como o MHC, (TURINA et al., 2006a, b) e moléculas co-estimulatórias (GONZALEZ, et al. 2012), como por exemplo o CD86 (SUN, et al., 2012). Além disso, o estado hiperglicêmico pode ocasionar a glicação de proteínas levando a sua inativação (TURINA et al., 2006a, b). Também já foi observado aumento na expressão de p38 MAPK (DANDONA et al., 2013), alteração na PKC (PILLAY; XIAO; OLEFSKY, 1996), e AKT (COVARRUBIAS et al., 2015).

A desregulação da homeostasia da glicose é um dos fatores chave para a contribuição de infecções no diabetes (DASU; DEVARAJ, JIALAL, 2007; GUPTA et al., 2007; SHILLING; RAPHAEL, 2008). Ainda, há algumas dúvidas em relação ao efeito da hiperglicemia na secreção de citocinas inflamatórias (XIU, et al., 2014). Alguns autores defendem que o estado hiperglicêmico promove uma secreção espontânea de citocinas pró-inflamatórias (TURINA; FRY; POLK, 2005; OHNO; AOKI; NISHIMURA, 1993), entretanto, após estímulos, a produção das citocinas é inferior quando comparado à condição normoglicêmica (GEERLINGS; HOEPELMAN, 1999).

Os macrófagos são células essenciais para a inflamação, pois iniciam e controlam a resposta através da liberação e recepção de mediadores pró- e anti-inflamatórios. O ambiente hiperglicêmico em macrófagos pode estar relacionado ao aumento da susceptibilidade dos diabéticos a infecções (FORBES et al., 2013). Uma inflamação descontrolada pode promover injúria tecidual, e a inflamação crônica é uma das principais características nos sítios das complicações diabéticas (FORBES et al., 2013). Por isso, avaliar a influência hiperglicemia *in vivo* e *in vitro* simultaneamente a outros estímulos inflamatórios irá ampliar nosso conhecimento sobre a resposta inflamatória e a susceptibilidade a infecção em animais diabéticos.

1.4 Modelo experimental de DM1

Há diversos modelos animais para o estudo do DM1, um dos grandes desafios na utilização desses modelos é que a patogênese do DM1 ainda não está totalmente descrita. É necessário saber a pergunta que se quer responder para a escolha do melhor modelo. Entre os modelos existentes, existem os modelos de desenvolvimento espontâneo do DM1 como camundongos NOD ou diabetes sem obesidade, e também os modelos experimentalmente induzidos, que promovem a destruição das células β -pancreáticas, como o modelo de DM1 induzido por aloxana (ALX), e o modelo induzido por estreptozotocina (STZ) (VAN BELLE; TAYLOR; VONHERRARTH, 2009).

Os modelos induzidos por ALX e STZ, são conhecidos por indução química de DM1, tais drogas diabetogênicas destroem boa parte das células produtoras e secretoras de insulina e promove insulinopenia com consequente hiperglicemia e perda de peso (DUFRANE et al., 2006). Nesses modelos, a indução do diabetes é realizada com aproximadamente 7 dias antes do experimento para garantir a estabilidade da hiperglicemia. A ALX e a STZ são estruturalmente parecidas com a glicose e é necessário que os animais estejam em jejum para a

indução do DM1 para que não ocorra competição da glicose com a droga utilizada (BANSAL et al., 1980).

O mecanismo de ação para a destruição das células β pelos agentes diabetogênicos ALX e STZ são distintos. A ALX é um derivado de pirimidina, e induz necrose das células β pancreáticas (LENZEN, 1998). Possui 2 mecanismos de ação, inibe a glucoquinase inibindo assim a secreção de insulina induzida por glicose, e induz a formação de Espécies reativas de oxigênio que resulta na destruição seletiva das células β . Por sua similaridade com a glicose, a ALX entra nas células β através do transportador de glicose presente na membrana plasmática dessas células, o GLUT2 (LENZEN, 2008; DUNN et al., 1943).

A STZ possui o seu efeito diabetogênio através do seu potencial de alquilação, é específico para células beta. A STZ inibe a secreção de insulina e causa um acúmulo de STZ nas células beta pancreáticas, onde entra através do GLUT2. Sua ação ocorre por alquilação do ácido desoxirribonucleico (NAD ou DNA) celular, ocorre a transferência de um grupo metil da STZ para o DNA, que resulta em fragmentação do DNA. Ocorre uma superestimulação de ADP-ribose polimerase, diminuindo NAD^+ e subsequentemente ATP. Com a depleção das reservas de energia, a célula beta entra em necrose (WEISS, 1982; PRESTON, 1985).

Após a injeção da droga ALX, ocorre uma primeira fase transitória de hipoglicemia que dura aproximadamente 30 minutos, e este fato ocorre devido uma liberação transiente de insulina. Isso ocorre devido uma redução temporária no consumo de ATP aumentando a sua disponibilidade causado pelo bloqueio da fosforilação da glicose através da inibição da glucoquinase. Esta fase de hipoglicemia não ocorre no modelo induzido por STZ. Na segunda fase ocorre um aumento na concentração de glicose sanguínea, uma hora após a administração de ALX ou STZ, com uma diminuição da insulina circulante. Esta primeira fase de hiperglicemia, dura aproximadamente de 2 a 4 horas, e é causada pela inibição da secreção de insulina. Nesta fase há algumas alterações morfológicas, incluindo vacuolização intracelular e inchaço da mitocôndria nas células β (LENZEN, 2008).

A terceira fase, é uma fase de hipoglicemia, e ocorre 4-8 horas após a injeção. Essa fase de hipoglicemia ocorre devido grande quantidade de insulina na circulação resultante da secreção dos grânulos de insulina e ruptura das células β . A quarta e última fase é a fase hiperglicêmica, que é permanente, onde há degranulação completa e perda da integridade celular. Esta fase pode ser atingida de 12-48 horas após a injeção de ALX ou STZ (LENZEN, 2008).

Pela seletividade com o GLUT2, tanto a ALX quanto a STZ podem promover danos em outros tecidos que também expressam este transportador, como as células tubulares nos rins e hepatócitos no fígado (LENZEN 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Indivíduos diabéticos são mais susceptíveis a infecções comparado aos indivíduos saudáveis, e existem indícios de que a hiperglicemia é um dos principais motivos para o aumento desta susceptibilidade (CASQUEIRO; CASQUEIRO; ALVES, 2012). Os macrófagos como células pontuais para a resposta inflamatória possivelmente são modulados pelo excesso de glicose sanguínea. Elucidar o efeito da hiperglicemia em alguns aspectos dos macrófagos, como expressão de PRR, via de sinalização inflamatória e também liberação de citocinas e perfil metabólico pode nos ajudar a entender os mecanismos que promovem a alta susceptibilidade de diabéticos a infecções.

3. OBJETIVOS

Temos como objetivo avaliar o efeito da hiperglicemia sobre os macrófagos derivados de medula óssea (BMDM), principalmente na expressão de TLR4, ativação de vias de sinalização ativadas pelo TLR4-LPS, liberação de mediadores imunes, marcadores de polarização e metabolismo da glicose.

Também objetivamos verificar o efeito da hiperglicemia em macrófagos peritoneais (MP).

Realizamos duas comparações, a diferença dos BMDM e dos MP de animais diabéticos e não diabéticos, e o efeito da alta concentração de glicose *in vitro*. Para tanto, objetivamos avaliar o efeito da hiperglicemia ou da alta concentração de glicose *in vitro* e assim:

- Verificar a diferença do perfil inflamatório entre os BMDM de animais diabéticos e não diabéticos;
- Avaliar as alterações fenotípicas;
- Verificar possíveis alterações na polarização dos BMDM;
- Avaliar a resposta dos BMDM através da via do TLR ativado por LPS;
- Avaliar o efeito a curto ou longo prazo da alta concentração de glicose *in vitro*;
- Verificar possíveis alterações imunometabólicas;
- Verificar possíveis alterações na liberação de citocinas pelos MP.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/488). Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, com peso inicial de 25 a 30 gramas com idade entre 9 a 11 semanas. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, contendo no máximo cinco animais, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de $22^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ e com suprimentos de água e alimento disponíveis todo o tempo. O estudo foi realizado de acordo com os princípios e guias do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.2 Indução do diabetes *mellitus*

Para indução do DM, os animais foram pesados e a glicemia foi mensurada através de um monitor de glicose (Advantage, Lilly, Indianápolis, Indiana, EUA). Os animais permaneceram em jejum por 12 horas antes de receberem uma injeção endovenosa de aloxana (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) (60 mg/kg) dissolvida em solução salina fisiológica e, após a injeção, permaneceram por mais 5 horas em jejum. Após 10 dias, os animais foram pesados e a glicemia foi determinada novamente. Os animais utilizados no estudo foram considerados diabéticos quando a glicemia foi superior a 300 mg/dL (SPILLER et al., 2012; TESSARO et al., 2017). Os animais não diabéticos passaram pelos mesmos procedimentos e receberam apenas o veículo no momento da injeção endovenosa.

4.3 Obtenção dos macrófagos

Após 10 dias da injeção da aloxana (animais diabéticos), ou do veículo (animais não diabéticos), os animais foram eutanasiados com cloridrato de cetamina (270mg/kg) e cloridrato de xilasina (30mg/kg). Em seguida foram realizadas as coletas dos macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) de animais não diabéticos (ND-BMDM) e animais diabéticos (D-BMDM), e macrófagos peritoneais (MP) de animais não diabéticos (ND-MP) e diabéticos (D-MP).

4.4 Diferenciação do material medular

O conteúdo da medula óssea foi coletado conforme descrito por MARIM e colaboradores (2010). Foi realizada uma excisão cirúrgica dos fêmures dos animais, as extremidades foram cortadas e o material medular foi obtido através da lavagem do interior do fêmur. O material medular foi incubado em meio R20/30 (meio RPMI-1640 (Gibco® by life technologies ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), 20% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich) e 30% de diferenciador para macrófagos provenientes de meio condicionado da cultura do cultivo de fibroblastos L929 (LCCM)), por sete dias para diferenciação, sendo suplementado com meio R20/30 no quarto dia de cultura (MARIM et al., 2012).

No sétimo dia, as células aderentes foram coletadas, centrifugadas, ressuspensas em meio R10/5 (meio RPMI 1640, 10% de soro fetal bovino e 5% de LCCM). A contagem das células foi realizada por azul de trypan (Gibco® by life technologies ThermoFisher Scientific) e o cálculo foi feito baseado na quantidade de células viáveis através da exclusão das células coradas. Em seguida, as células foram distribuídas em placa de 6 poços com uma concentração de 2×10^6 célula/poço (TESSARO et al., 2017).

4.5 Obtenção dos macrófagos peritoneais (MP)

Os MP foram coletados através do lavado peritoneal (NUNES et al., 2007). Após centrifugação dos lavados, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640, em seguida as células foram contadas e por azul de trypan a viabilidade celular foi verificada, e então as células foram distribuídas em uma placa de 6 poços. As células permaneceram em meio RPMI 1640 por 2 horas para aderência, os poços foram lavados com PBS e meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino foi adicionado, a placa permaneceu por 12 horas em estufa a 37°C a 5 % de CO₂. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com PBS e as células foram tratadas conforme figura 6, o sobrenadante foi coletado e armazenado para dosagem de citocinas.

4.6 Tratamento das células

Após 12 horas de incubação celular, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com PBS morno e as células foram cultivadas com RPMI-1640 no glucose e a concentração de glicose foi ajustada adicionando uma solução de glicose (ambos da Gibco® by life technologies ThermoFisher Scientific). As células foram mantidas em diferentes

concentrações de glicose, sendo que a concentração normal de glicose foi considerada como 5,5 mM, enquanto que alta concentração de glicose foi considerada sendo 25 e 40 mM (SHERRY et al., 2007; CHENG et al., 2015; CHUNG et al., 2015). As células foram estimuladas por LPS (100 ng/mL) (Sigma-Aldrich) ao mesmo tempo que receberam o tratamento com glicose (TESSARO et al., 2017).

Foi realizada uma cinética em forma de evolução temporal para verificar a liberação dos mediadores inflamatórios no sobrenadante da cultura celular, a expressão das proteínas envolvidas na via de sinalização do TLR4 no lisado celular, expressão de marcadores M1 e M2 na superfície celular, fagocitose, expressão de marcadores envolvidos na ativação da imunidade adaptativa na superfície celular.

Para os BMDM que foram incubados por 7 dias, houve suplementação com o meio de cultura celular no terceiro dia de incubação (LACHMANDS et al., 2015).

Foi realizada uma cinética em evolução temporal para realizar os ensaios descritos abaixo (Figura 6). Considerando como curto prazo, o tempo de incubação até 48 horas, e longo prazo, as células cultivadas por 7 dias.

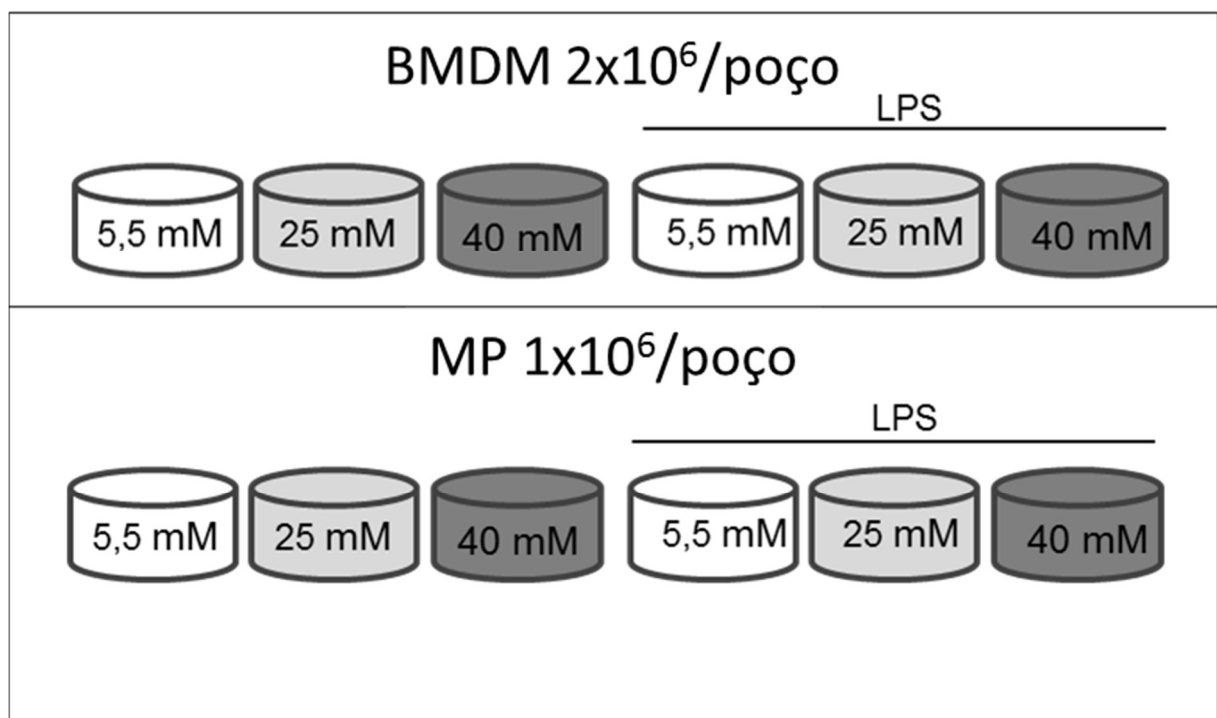


Figura 6: Tratamento dos macrófagos com diferentes concentrações de glicose.

4.7 Ensaio para atividade do metabolismo mitocondrial

Em uma placa de 96 poços, 2×10^5 células foram distribuídas em cada poço (LOMBARDO et al., 2007), e mantidas em estufa 37°C e 5% de CO_2 por 12 horas para

completa adesão. As células foram lavadas com PBS morno e os tratamentos com as diferentes concentrações de glicose foram realizados conforme descrito em 4.6, este teste foi realizado após 24, 48 horas e 7 dias de cultura celular. Após o período de incubação celular com os tratamentos foi adicionado 100 µL da solução de 3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (0,5 mg/mL) em cada poço e a incubação foi realizada por 4h. O sobrenadante foi retirado e os cristais foram solubilizados com dimetilsulfóxido (DMSO) e a leitura foi realizada em leitor de placas a 540nm (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments). Os valores apresentados são em relação à porcentagem do controle (LOMBARDO et al., 2007).

4.8 Quantificação de citocinas por ensaio imunoenzimático

A quantificação das citocinas foi realizada em amostras do sobrenadante da cultura celular pela técnica de ensaio imunoenzimático, utilizando-se kits comerciais, segundo as normas do fabricante (R&D[®] Systems, Inc., Mineapolis, MN, EUA).

4.9 Dosagem de Lactato

Os BMDM foram cultivados em uma placa de 6 poços e incubadas por 24 horas nas condições citadas na figura 5. Foi utilizado o kit comercial L-lactate assay kit (Abcam ab65330, Cambridge, Reino Unido) e realizado de acordo com as instruções na bula. Brevemente, a amostra foi desproteïnizada, e em uma placa de 96 poços as amostras foram distribuídas e incubadas com o tampão do ensaio do kit, mix de substrato do lactato e mix de enzima de lactato. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, a densidade óptica foi mensurada a 450 nm em um leitor de placa.

4.10 Atividade de arginase

A atividade de arginase foi realizada como descrito previamente (CORRALIZA et al., 1995). Os BMDM foram cultivados em uma placa de 6 poços e incubadas por 24 horas nas condições citadas na figura 5. Brevemente, as células foram lisadas com 0,1% Triton X-100, então foi adicionado um tampão contendo 25 mM Tris-HCl e 5 mM of MnCl₂, e as amostras foram aquecidas para ocorrer a ativação da enzima. Após isso, o lisado ativado foi incubado com 0,5 M de arginina para hidrólise. A reação foi parada pela adição de 400 µL de H₂SO₄:H₃PO₄:H₂O. Após incubação com 9% α-isonitrosophenone e aquecidas a 100°C por 45 minutos, a uréia foi mensurada a 540 nm.

4.11 Quantificação de óxido nítrico

Usamos a reação de GRIESS para verificar o óxido nítrico no sobrenadante de 7 dias de cultura de BMDM. Resumidamente, os sobrenadantes de 7 dias de BMDM foram adicionados em uma placa de 96 poços e incubados com a reação GRIESS ([1% sulfanilamida/0,1% N- (1-naftil) etilenodiamina dicloridrato /2,5% H_3PO_4) por 15 minutos em temperatura ambiente e depois lido a 540 nm em um leitor de microplacas.

4.12 Quantificação de peróxido de hidrogênio

Os BMDM foram cultivados em uma placa de 6 poços e a quantificação de H_2O_2 foi realizada no sobrenadante da cultura celular após 24, 48 horas e 7 dias por uma técnica enzimática que usa o reagente 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine para detectar o H_2O_2 utilizando um kit comercial, segundo as normas do fabricante (Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay kit - Invitrogen®).

4.13 Consumo de oxigênio

O oxigênio foi medido utilizando o kit de ensaio de consumo de oxigênio extracelular (ab197243) (Abcam) e realizado de acordo com as instruções na bula da empresa. As células foram semeadas numa placa de 96 poços, com as mesmas condições da figura 5, incubadas com reagente de O_2 , cobertas com óleo mineral e lidas subsequentemente em um curso de tempo num leitor de microplacas de fluorescência.

4.14 Marcadores de superfície celular e viabilidade por citometria de fluxo

Para confirmar a diferenciação do material da medula óssea para macrófagos foi utilizado como alvo o marcador específico de macrófagos F4/80. Após 7 dias de diferenciação, as células foram retiradas das placas de Petri com auxílio de PBS gelado estéril, o material foi centrifugado e em seguida as células foram marcadas utilizando anticorpo PE *anti-mouse* F4/80 (F4/80 anti-mouse PE clone T45-2342) (BD Biosciences Pharmingen Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA) na diluição 1/100. Após 30 minutos de incubação a 4°C foi realizado a aquisição das células em citômetro de fluxo FACSCanto II e analisadas utilizando FlowJo Software.

A viabilidade celular dos macrófagos foi avaliada por iodeto de propídio (PI) após 24 e 48 horas de tratamento. Os macrófagos foram descolados da placa com solução de PBS e SFB 5%. As células foram marcadas por Pe/PercP *anti-mouse* PI (Thermo Fisher®) na diuição de

1/100 e analisadas em citômetro de fluxo FACSCantoII e analisados utilizando *FlowJo Software*.

Após os tempos dos tratamentos, as células foram retiradas da placa com solução de PBS e soro fetal bovino 5%, gelado, centrifugadas, lavadas e em seguida foram marcadas com anticorpos para TLR4 (PE anti-mouse TLR4 clone MTS510) (BD Biosciences Pharmigen Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA) na diluição de 1/100, CD38 (APCcy7 anti-mouse CD38 clone 90) (Biolegend San Diego, Califórnia, EUA), CD206 (APC anti-mouse CD206 clone C068C2) (Biolegend), CD11b (FITC anti-mouse CD11b clone M1/70), MHC-II (PE anti-mouse TLR4 clone) (BD Biosciences Pharmigen), CD80, CD86. Após incubação de 30 minutos a 4°C, foi realizado a aquisição das células em citômetro de fluxo FACSCanto II e analisadas utilizando FlowJo Software.

4.15 Análise das vias de sinalização

Os ensaios foram realizados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), conforme orientação do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Às amostras foram adicionadas ao tampão de amostra e incubadas em banho seco por 5 minutos à 95°C e aplicadas no gel de poliacrilamida-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 120 minutos. 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 60 mA durante 60 minutos. Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi colocada em solução de leite desnatado (5%) em tampão Tris-salina (TBS)-Tween durante 1 hora para minimizar as ligações específicas, incubadas com anticorpo primário na diluição de 1/1000, durante 15-18 horas, sob agitação à 4°C, e com anticorpo secundário durante 2 horas (Abcam) na diluição de 1/20000. 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) no equipamento Amersham Imager 680 blot and gel imager (Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom).

Os anticorpos utilizados foram: phospho-AKT, anti-mouse phospho-PI3k p85/p55, phospho-PKC α / β II, phospho-PKC- δ , phospho-p38, phospho-ERK1/2, phospho-SAPK/JNK, anti-mouse phospho-AMPK α , anti-mouse LC3b, anti-mouse Beclin-1 (Cell Signaling Technology®, Danvers, Massachusetts, EUA) como anticorpo primário. Os anticorpos anti-mouse β -actin (Cell Signaling Technology®) ou anti-mouse GAPDH (Cell Signaling

Technology®) foram utilizados para a normalização dos valores adquiridos com os anticorpos primários, os anticorpos secundários utilizados continham HRP-conjugado anti-mouse IgG (Abcam). As densidades relativas das bandas foram determinadas por meio de análise densitométrica utilizando o software Image Studio Lite Versão 5.2.

4.16 Fagocitose de hemácias opsonizadas

Primeiramente nós realizamos a sensibilização das hemácias de carneiro com anticorpos antihemácias de carneiro. Os macrófagos foram plaqueados em lamínulas em uma placa de 12 poços, após a adesão, as células são lavadas e então são adicionados junto ao meio de cultura a suspensão de hemácias opsonizadas com IgG. Como controle foram utilizadas hemácias não opsonizadas, são adicionados 30 alvos (hemácias opsonizadas) por célula. Após 60 minutos de incubação, os poços são lavados e as lamínulas são retiradas e em seguida são coradas utilizando coloração de GIEMSA. As lamínulas são coladas em uma lâmina, e então se realiza as contagens. Após a contagem, é realizado o cálculo para obter o índice fagocítico, considerando a porcentagem de células contendo no mínimo um alvo ingerido, dividido pelo n° de alvos ingeridos por esses macrófagos (Ferracini et al., 2010).

4.17 Análise estatística

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey-Kramer. Os dados foram representados com o erro padrão da média. Considerando-se significativo valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização do modelo animal

Os animais tornados diabéticos com aloxana apresentaram as seguintes características: redução do peso corpóreo (Figura 7A) e hiperglicemia (Figura 7B). Os animais não diabéticos mantiveram os níveis normais de glicemia e obtiveram ganho de peso no mesmo período.

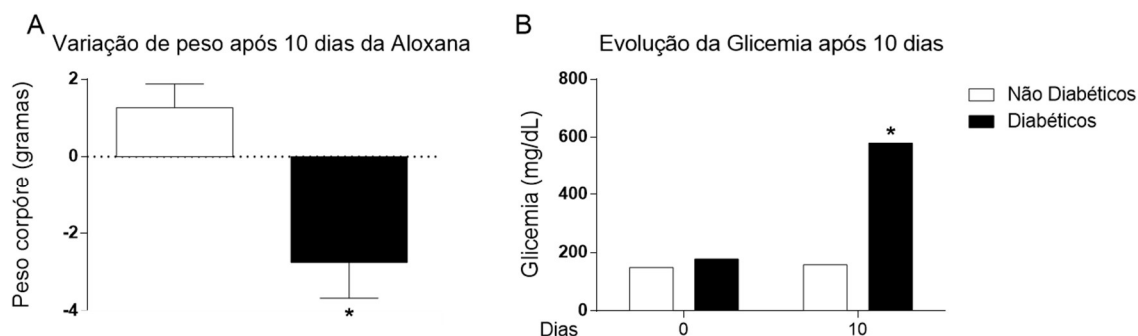


Figura 7 - Caracterização do estado diabético. O diabetes foi induzido em camundongos C57BL/6 machos com idade de 9-11 semanas, através da administração de dose única da aloxana (60 mg/dL; i.v.) (animais diabéticos) ou solução fisiológica (animais não diabéticos); (A) Variação da glicemia após 10 dias da injeção de aloxana ou solução fisiológica. (B) Variação do peso corporal após 10 dias da injeção da aloxana ou solução fisiológica. Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$. N= 12.

5.2 Caracterização dos BMDM

A marcação com F4/80 caracteriza os macrófagos em uma população celular (AUSTIN; GORDON, 1981). Após 7 dias de diferenciação do material da medula óssea dos camundongos, os ND-BMDM e D-BMDM tiveram a porcentagem de células F4/80+ avaliada. Em nosso processo de diferenciação, aproximadamente 95% das células viáveis eram positivas para F4/80 (Figura 8).

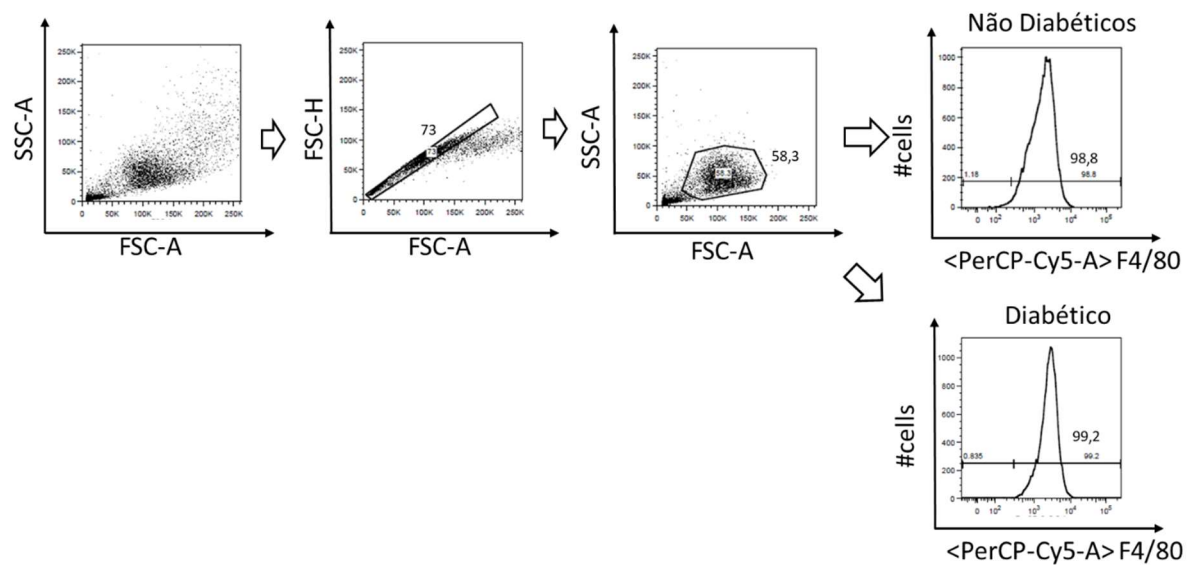


Figura 8- Caracterização celular dos BMDM por anticorpo PE anti-*mouse* F4/80. Estratégia de *gate* seguida de marcação realizada em células de animais não diabéticos e diabéticos após 7 dias de diferenciação do material medular. A marcação negativa está apresentada no apêndice O. Figura representativa de 6 animais por grupo.

5.3 Viabilidade celular

O uso do iodeto de propídeo (PI) é utilizado como estratégia para a avaliação da viabilidade de um grupo celular. O método é baseado no princípio de que células em processo de apoptose são caracterizadas por uma fragmentação do DNA. Dessa forma, o PI é capaz de intercalar-se entre as moléculas de DNA, sendo possível distinguir as células viáveis das demais, pois as células íntegras não possuem fragmentação da membrana citoplasmática e exposição do conteúdo nuclear (RICCARDI e NICOLETTI, 2006).

Quando comparamos os ND-BMDM com os D-BMDM encontramos que os D-BMDM mantidos em 25 e 40 mM de glicose e estimulados com LPS apresentaram menor viabilidade comparado aos ND-BMDM. Enquanto que as diferentes concentrações de glicose *in vitro* não alteraram a viabilidade celular de ambos os grupos de animais em 24 e 48 horas de cultura celular (Figura 9).

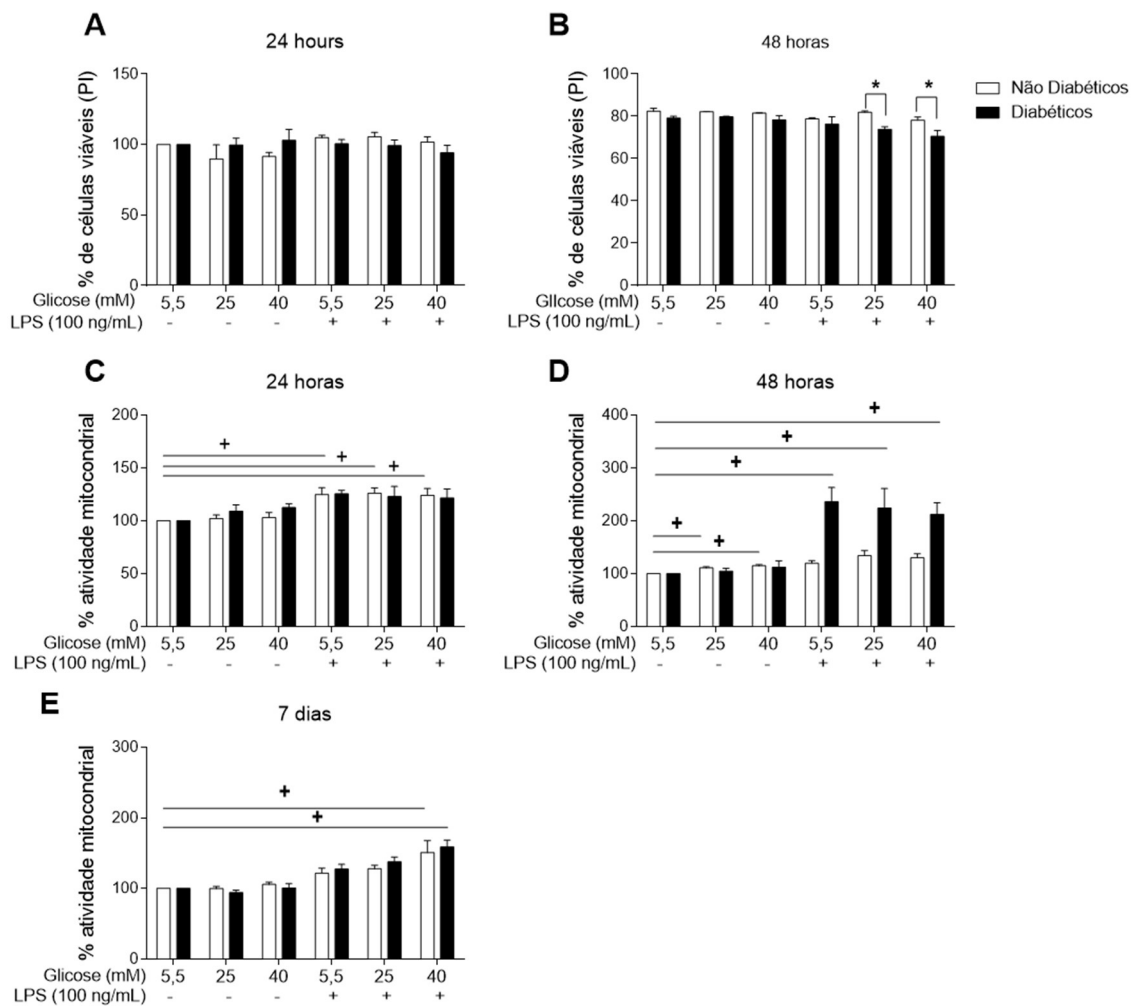


Figura 9- Viabilidade celular. Marcação de iodeto de propídeo (PI) (A e B) (n=3) e atividade mitocondrial (C, D e E) (n=6). *p<0,05 vs diabéticos +P<0,05 vs outras concentrações de glicose. Os valores representam a média $\pm$ EPM.

5.4 Avaliação da atividade mitocondrial

O teste do MTT avalia a atividade da succinato desidrogenase, que é dependente da respiração mitocondrial, e indiretamente a viabilidade celular (GRIFFEN; LOWENBERG, 1986). A taxa de atividade mitocondrial foi realizada após 24 (Figura 9C), 48 horas (Figura 9D) e 7 dias (Figura 9E). Os resultados são comparados em relação ao controle (5,5 mM de glicose).

O estímulo por LPS nos ND-BMDM promoveu maior atividade mitocondrial no tempo de 24 horas comparado aos macrófagos mantidos em meio de cultura celular sem estímulo. O LPS também promoveu o aumento da atividade mitocondrial para os D-BMDM, este evento ocorreu apenas após 48 horas de incubação.

Já após 7 dias, os BMDM de ambos grupos de animais apresentaram maior atividade mitocondrial quando mantidos em 40 mM de glicose e estímulo por LPS (Figura 9E).

5.5 Alterações fenotípicas

Nós também investigamos se houve alguma mudança nos marcadores relacionados a polarização para M1 e M2 comparando o ND-BMDM e D-BMDM. Desse modo, descobrimos que o D-BMDM expressaram níveis mais baixos de CD38 (Figura 10A e B) em comparação com os ND-BMDM. Nós também analisamos a marcação para CD206, um marcador de M2, mas não observamos diferença estatística em sua expressão (Figura 10C).

A atividade da arginase também pode ser usada para verificar a polarização M1 ou M2. Nossas investigações mostraram que os D-BMDM apresentaram uma menor atividade de arginase quando incubados por 24 horas nas diferentes concentrações de glicose (5,5 e 25 mM) com ou sem LPS (Figura 10D).

Além disto, verificamos a marcação para CD80, CD86 e MHC-II, os quais são marcadores envolvidos na função de APC dos macrófagos. Avaliando após 24 horas de incubação, verificamos que os D-BMDM expressaram mais esses marcadores comparado aos ND-BMDM (Figura 10E, F e G).

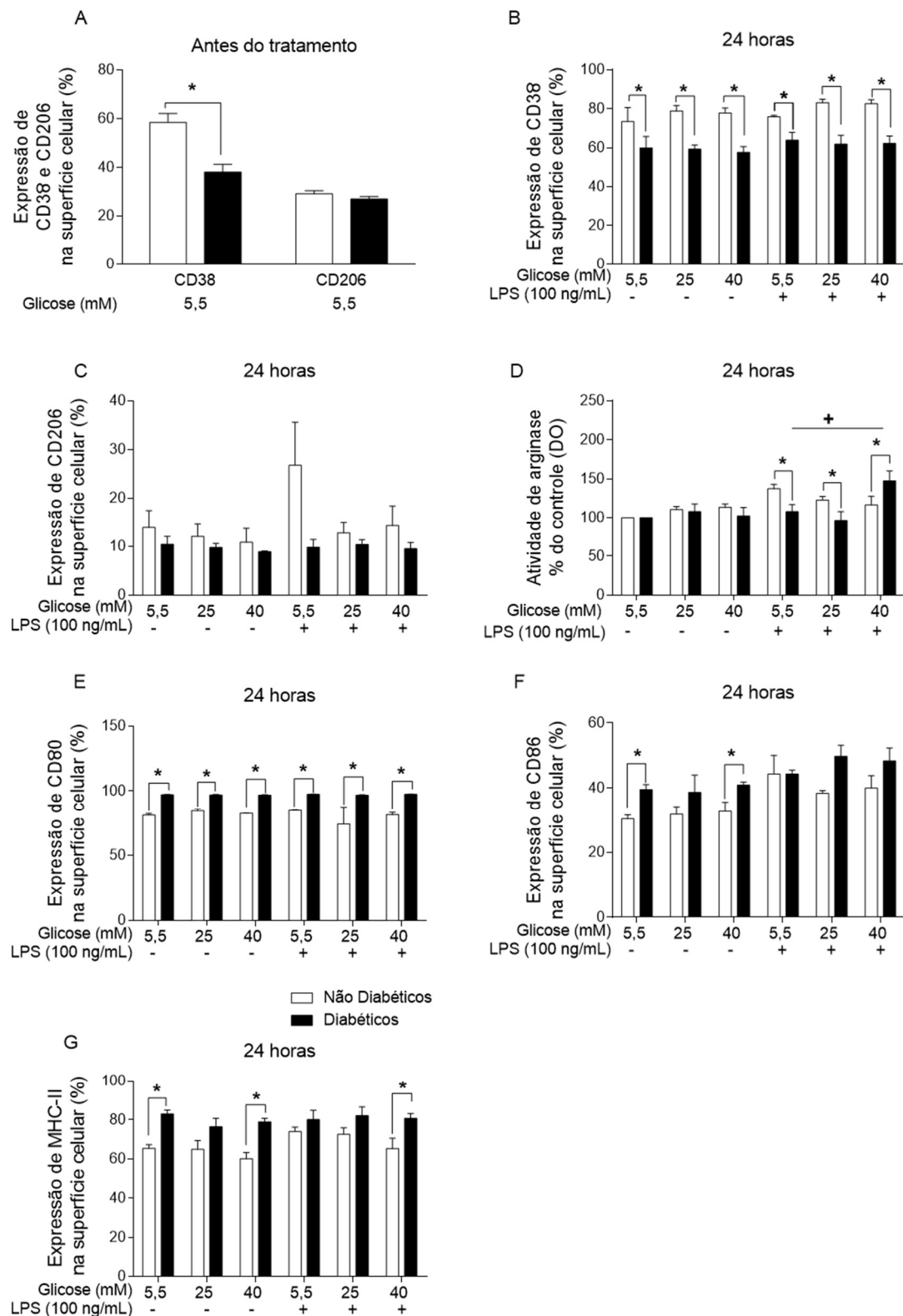


Figura 10- Alterações fenotípicas comparando ND-BMDM e D-BMDM. Expressão de (A) F4/80, CD11b, CD38 e CD206 em tempo basal. (B) Expressão de CD38 após 24 horas. (C) Expressão de CD206 após 24 horas. (D) Atividade de arginase após 24 horas. Expressão de (E) CD80 (F) CD86 e (H) MHC-II após 24 horas de incubação. Os valores representam a média $\pm$ EPM. N=3. * $p < 0,05$ vs diabéticos + $p < 0,05$ vs outras concentrações de glicose.

5.6 Expressão de TLR4 na superfície dos BMDM

Os TLRs reconhecem PAMPs e induzem respostas da imunidade inata que são essenciais para a defesa do hospedeiro (IVASHKIV, 2011). As interações do TLR com seus ligantes promovem a expressão de citocinas pró-inflamatórias assim como a maturação funcional de APC, como os macrófagos (AKIRA et al., 2006; LEE et al., 2007).

A partir disso, nós buscamos avaliar as possíveis alterações na expressão do TLR4 com e sem a presença de seu agonista LPS nas diferentes concentrações de glicose. Nós realizamos dois tempos de análise, um em que consideramos tempo basal, onde as células foram incubadas durante 16 horas (período prévio à qualquer tratamento realizado), e outro tempo após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de glicose, com ou sem LPS.

Na primeira análise, antes de qualquer tipo de tratamento, os D-BMDM expressaram menos TLR4 na superfície celular comparado aos ND-BMDM (Figura 11A). Enquanto que na segunda análise, em 24 horas há duas comparações que podem ser realizadas; a expressão entre os ND-BMDM e D-BMDM, e a expressão comparando as diferentes concentrações de glicose. Dessa forma, os ND-BMDM expressaram maiores níveis de TLR4 comparado aos D-BMDM quando mantidos em meio contendo 5,5 mM de glicose e estímulo por LPS, e, quando os ND-BMDM foram mantidos em alta concentração de glicose *in vitro*, a expressão do TLR4 foi menor comparado àqueles mantidos em meio normal de glicose (Figura 11B).

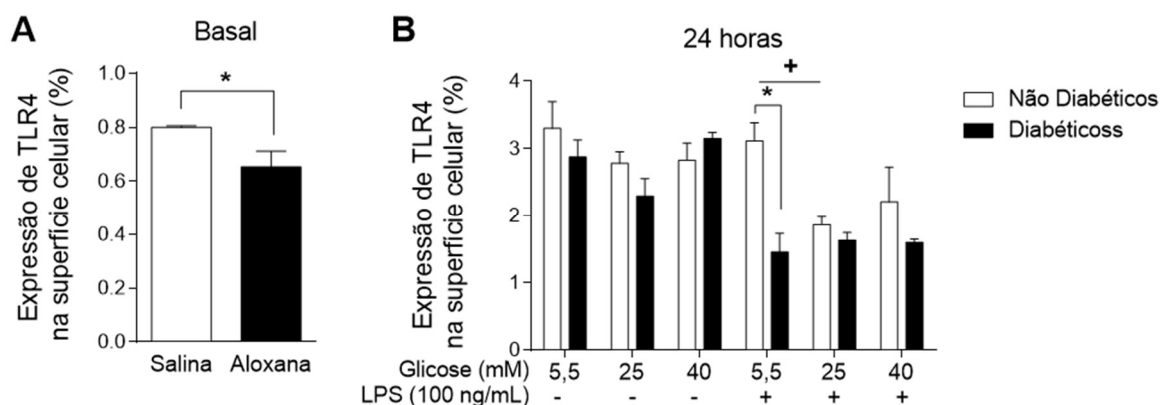


Figura 11 - Expressão de TLR-4 nos BMDM. (A) Tempo basal e (B) após 24 horas de tratamento. Os valores representam a média $\pm$ EPM. N=3. * $p < 0,05$ vs diabéticos + $p < 0,05$ vs outras concentrações de glicose.

5.7 Expressão de proteínas da via de sinalização do TLR4 ativada por LPS

Nós avaliamos a fosforilação das proteínas intracelulares envolvidas na sinalização do TLR4. O eixo PI3K/AKT está plenamente envolvido na sinalização do TLR4 pelo estímulo por LPS. Quando avaliamos a fosforilação em AKT (Ser-473) (Figura 12B), nós verificamos que os D-BMDM fosforilaram mais esta proteína quando mantidos em 5,5 mM de glicose e estimulados por LPS, quando comparado aos ND-BMDM. Além disso, quando esses D-BMDM foram expostos a altas concentrações de glicose *in vitro* concomitante ao estímulo por LPS, houve uma diminuição na sua fosforilação. A ativação da PI3K também foi alterada pela hiperglicemia, visto que, os D-BMDM fosforilaram mais a subunidade p85 comparado aos ND-BMDM (Figura 12C). Já quando observamos o efeito da alta concentração de glicose *in vitro*, vimos que, os ND-BMDM fosforilaram mais em PI3K subunidade p55 comparado àqueles mantidos em meio normoglicêmico (Figura 12E).

Avaliamos a fosforilação de duas isoformas diferentes de PKC, a α/β II e a isoforma δ . Verificamos, portanto que os D-BMDM fosforilaram em maiores níveis em PKC- δ comparado aos ND-BMDM (Figura 12G). Ainda, a alta concentração de glicose *in vitro* promoveu diminuição na fosforilação desta subunidade nos D-BMDM. Por outro lado, nós não observamos alteração na fosforilação em PKC- α/β II (Figura 12F). Além disto, a fosforilação em FOXo1 também foi avaliada e não houve diferença entre os grupos analisados (Figura 12F).

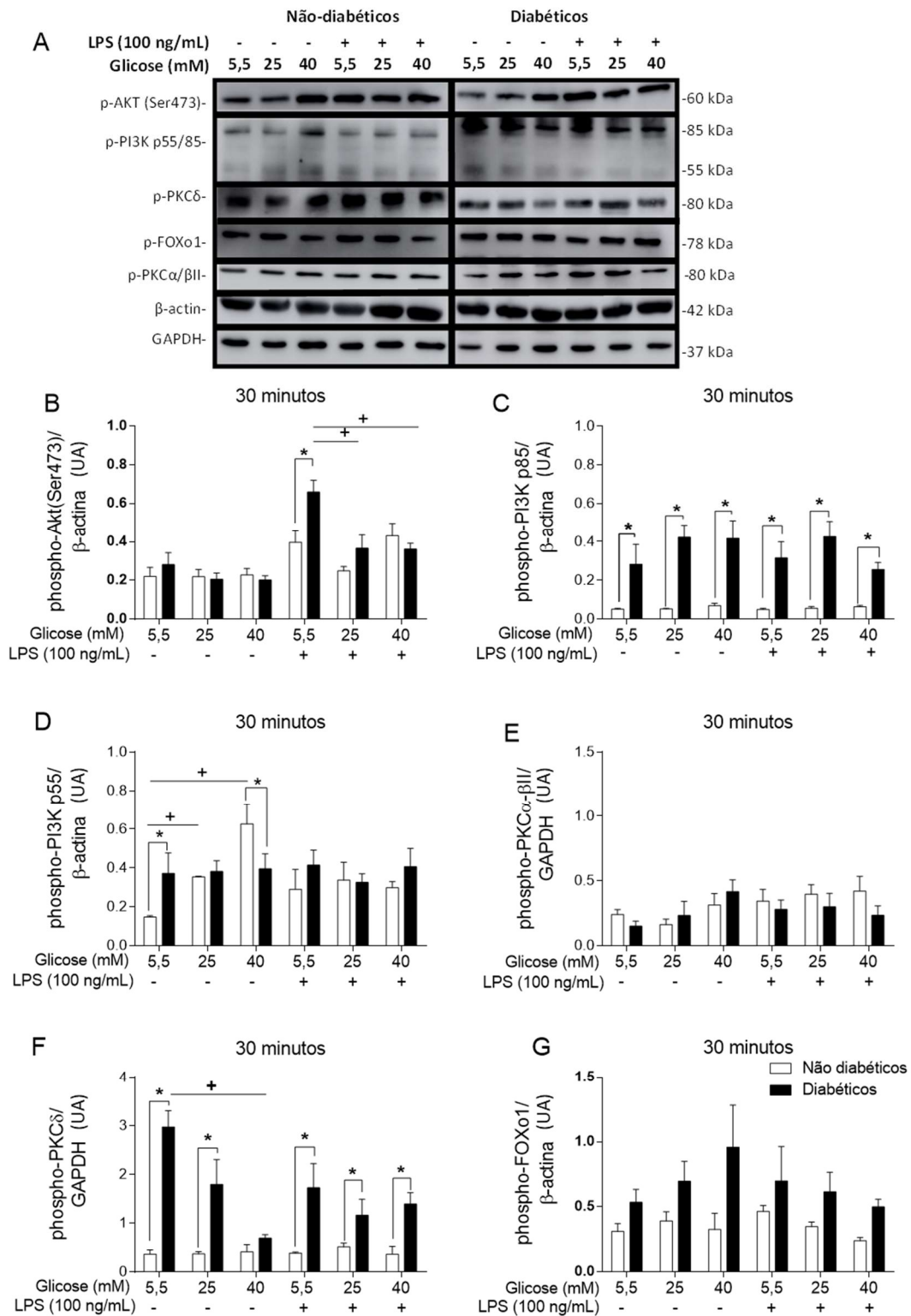


Figura 12- Via de sinaliza  o do TLR4. (A) Membranas de Western blot sondada com anticorpo anti-phospho-AKT, anti-phospho-PI3K, anti-phospho-PKC- , anti-phospho-PKC- , anti-phospho FoxO1, anti- -actina (B) Rel a o phospho-AKT/ -actina (C) Rel a o phospho-PI3Kp85/ -actina (D) Rel a o phospho-PI3Kp55/ -actina (E) Rel a o phospho-PKC-   / -actina (F) Rel a o phospho-PKC- / -actina (G) Rel a o phospho-FoxO1/ -actina. * $p < 0,05$ vs diab ticos, + $p < 0,05$ vs outras concentra  es de glicose. (UA): unidade aleat ria. Os valores representam a m dia $\pm$ EPM. N=4.

Foram avaliadas o nível de fosforilação em ERK1/2, SAPK/JNK e p38 MAPK. Nossos resultados mostram que os níveis de fosforilação em p38 são similares entre os grupos (Figura 13F). Entretanto, os D-BMDM fosforilaram maiores níveis em SAPK/JNK e ERK1/2, principalmente nas subunidades p46 (Figura 13C) e p42 (Figura 13E) respectivamente. Neste contexto, a alta concentração de glicose *in vitro* promoveu alteração na fosforilação de SAPK/JNK subunidade p46, onde houve diminuição da ativação desta subunidade quando os D-BMDM foram mantidos em alta concentração de glicose, porém houve aumento quando foram mantidos em alta concentração de glicose concomitante ao estímulo por LPS (Figura 13C).

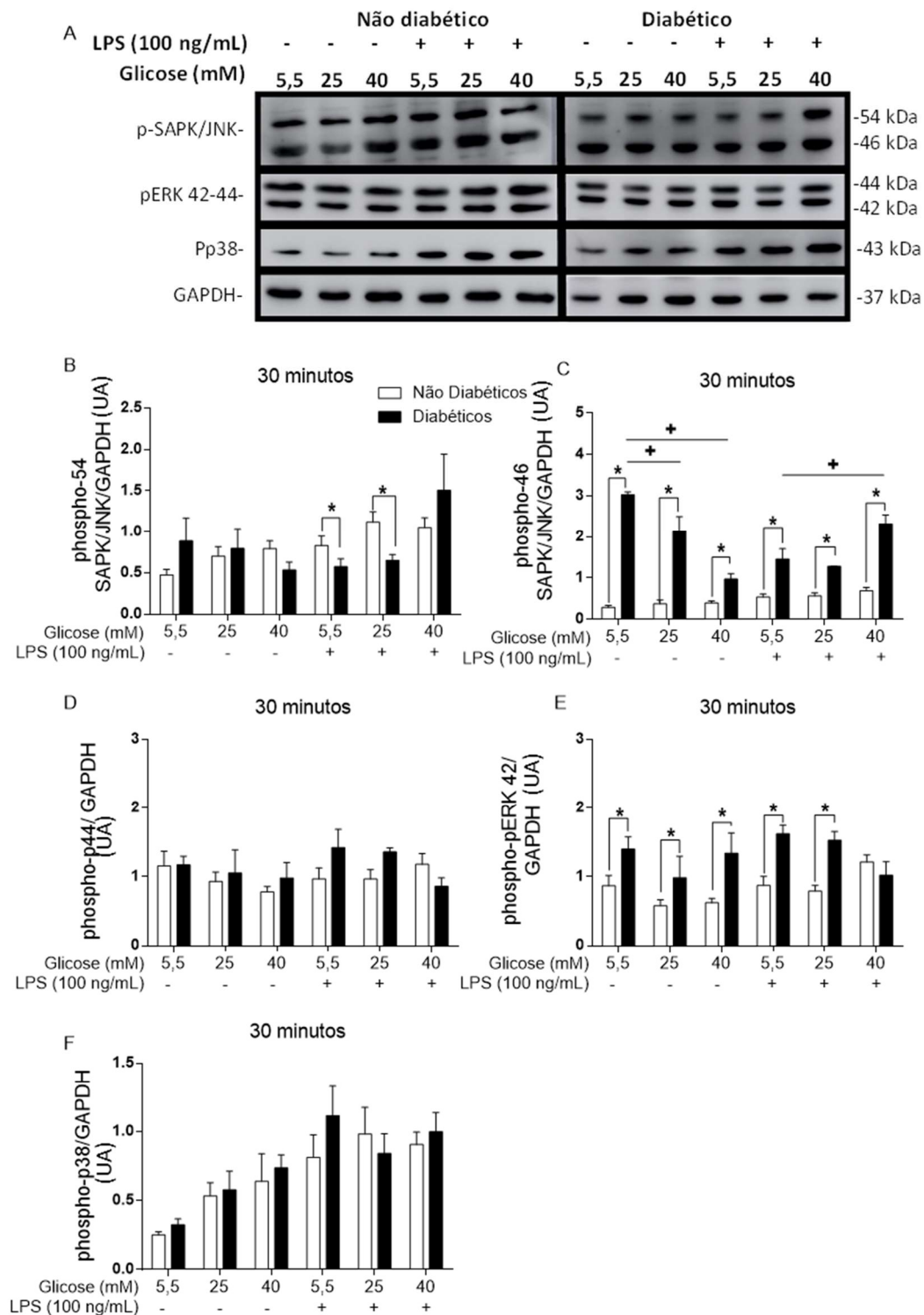


Figura 13- Via de sinalização do TLR4: fosforilação das MAPKs. A) Membranas de Western blot sondada com anticorpo anti-phospho-SAPK/JNK, anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-P38, anti-GAPDH (B) Relação phospho-SAPK/JNK p54/GAPDH (C) Relação phospho-SAPK/JNK p46/GAPDH (D) Relação phospho-ERK p44/GAPDH (E) Relação phospho-ERK p42/GAPDH (F) Relação phospho-P38/GAPDH. * $p < 0,05$ vs diabéticos, + $p < 0,05$ vs outras concentrações de glicose. (UA): unidade aleatória Os valores representam a média $\pm$ EPM. N=4.

5.8 Avaliação do metabolismo energético

A AMPK está envolvida na regulação do estado metabólico e energético dos macrófagos, bem como tem sido descrito sua relação com as vias inflamatórias (O'NEILL; HARDIE, 2013). A fosforilação da AMPK α 1 está aumentada em 40 mM de glicose nos D-BMDM e ND-BMDM estimulados por LPS quando comparados aos D- e ND- BMDM estimulada por LPS a 5,5 mM de glicose (Figura 14A e B). Comparado aos ND-BMDM, os D-BMDM estimulados por LPS apresentou maior nível de ativação a 40 mM.

A proteína S6 é uma molécula da via mTORC1 correlacionada a eventos pró-inflamatórios e homeostase metabólica. Aqui podemos ver após 30 minutos, que a fosforilação de S6 foi maior em ND-BMDM mantidos a 25 mM de glicose e a 5,5 mM de glicose sob estímulo com LPS comparado aos D-BMDM sob a mesma condição (Figura 13C).

A glicólise é o primeiro passo metabólico para degradar a glicose em ATP e tem o piruvato como produto final, este pode ser convertido em lactato ou acetil-CoA. Quanto maior a atividade glicolítica, haverá uma maior liberação de lactato. Os ND-BMDM liberaram mais lactato em comparação com D-BMDM após 24 horas de incubação (Figura 14D). Enquanto isso, o LPS aumentou a liberação de lactato de ambos os grupos.

A OXPHOS metaboliza os produtos da glicólise e gera uma quantidade maior de ATP comparado a glicólise. Junto a isso, quando as células realizam a OXPHOS, mais oxigênio é consumido pela mitocôndria. Ao todo, realizamos um ensaio de consumo de O₂ durante um tratamento agudo com alta concentração de glicose, com ou sem LPS. Os D-BMDM consumiram mais O₂ comparado aos ND-BMDM na primeira hora de incubação (Figura 14E).

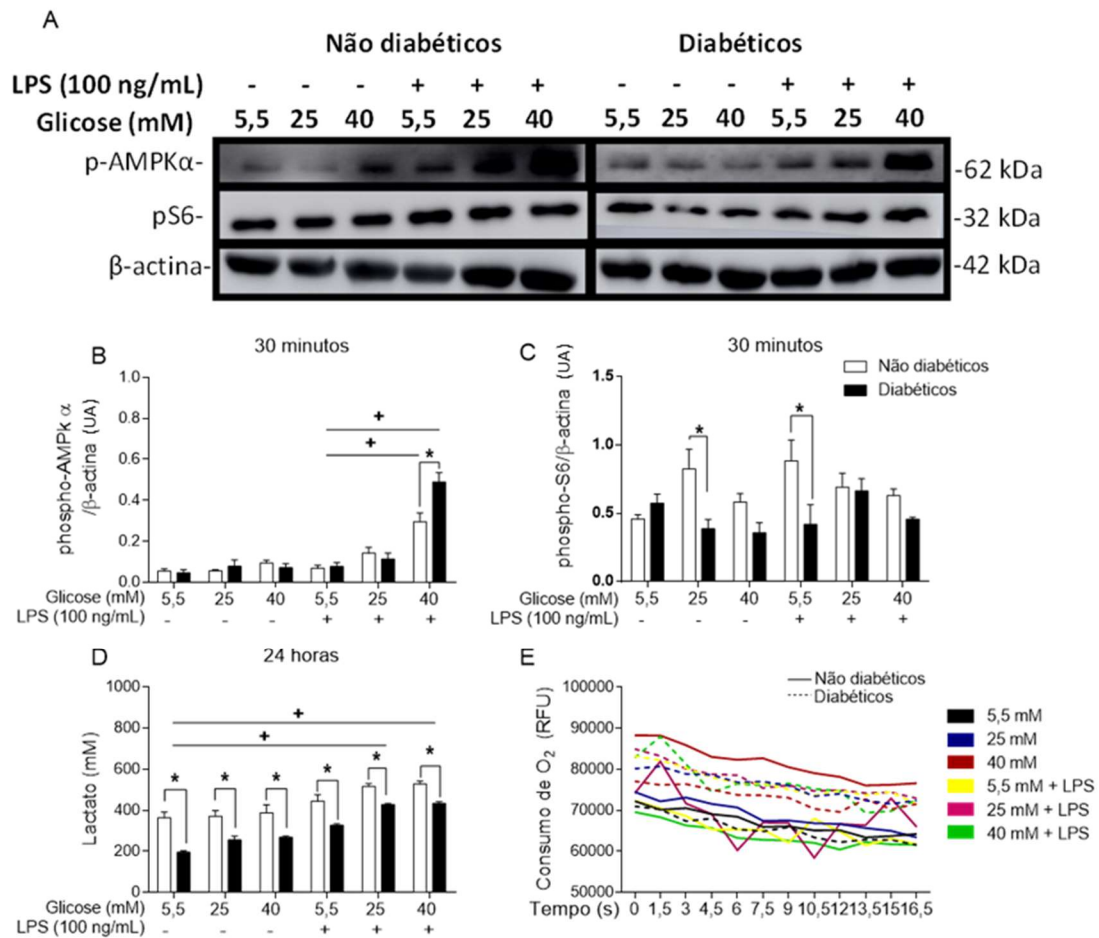


Figura 14- Metabolismo da glicose. (A) Expressão proteica de phospho-AMPK, pS6 e β-actina. (B) Relação phospho-AMPK/β-actina. (C) Relação phospho-S6/β-actina. (D) Lactato no sobrenadante após 24 horas de cultura. (E) Consumo de oxigênio na primeira hora de incubação * $p < 0,05$ vs diabéticos, + $p < 0,05$ vs outras concentrações de glicose. (UA): unidade aleatória Os valores representam a média $\pm$ EPM. N=4.

5.9 Evolução temporal da liberação de mediadores inflamatórios pelos BMDM

A partir de uma cinética de liberação de mediadores imunes em forma de evolução temporal, avaliamos os efeitos da alta concentração de glicose. Nós analisamos a liberação de TNF- α , IL-6, IL-1 β , NO e H₂O₂. Na maioria dos tempos analisados, verificamos que um meio de cultura celular hiperglicêmico na presença ou não do LPS, não alterou a liberação dos mediadores inflamatórios analisados na cultura dos ND-BMDM e D-BMDM (Figura 15, 16, 17 e 18).

5.9.1 Liberação de TNF- α pelos BMDM

O TNF- α é uma das principais moléculas influenciadora na manutenção da sobrevivência de macrófagos (RICHES et al., 1996). É liberado rapidamente após exposição ao

LPS, e é um dos mediadores mais abundantes na fase inicial da resposta (FELDMANN et al., 1994).

Assim, realizamos uma evolução temporal de 3, 6, 12, 24, 48 horas e 7 dias (Figura 15) para verificar o efeito de altas concentrações de glicose *in vitro* na secreção de TNF- α . Os ND-BMDM estimulados por LPS secretaram uma maior concentração de TNF- α em comparação aos D-BMDM também estimulados por LPS durante os tempos de 6 horas e 24 horas quando mantidos em 25 e 40 mM de glicose; 48 horas nas concentrações de 5,5, 25 e 40 mM de glicose por e 7 dias nas concentrações de 5,5 e 40 mM de glicose.

Já após 7 dias de cultivo celular, os D-BMDM liberaram mais TNF- α comparado ao ND-BMDM em meio contendo 40 mM de glicose sem o estímulo por LPS. A liberação de TNF- α apresentou os mesmos níveis entre os BMDM nos tempos de 3 e 12 horas em todas as concentrações de glicose acrescido do estímulo por LPS.

Após 12 horas, a alta concentração de glicose (40 mM) em conjunto ao estímulo por LPS, promoveu menor liberação de TNF- α pelos D-BMDM (Figura 15C). Em conjunto a isso, após 7 dias a alta concentração de glicose *per se* promoveu maior liberação de mediador por esses mesmos D-BMDM (Figura 15F).

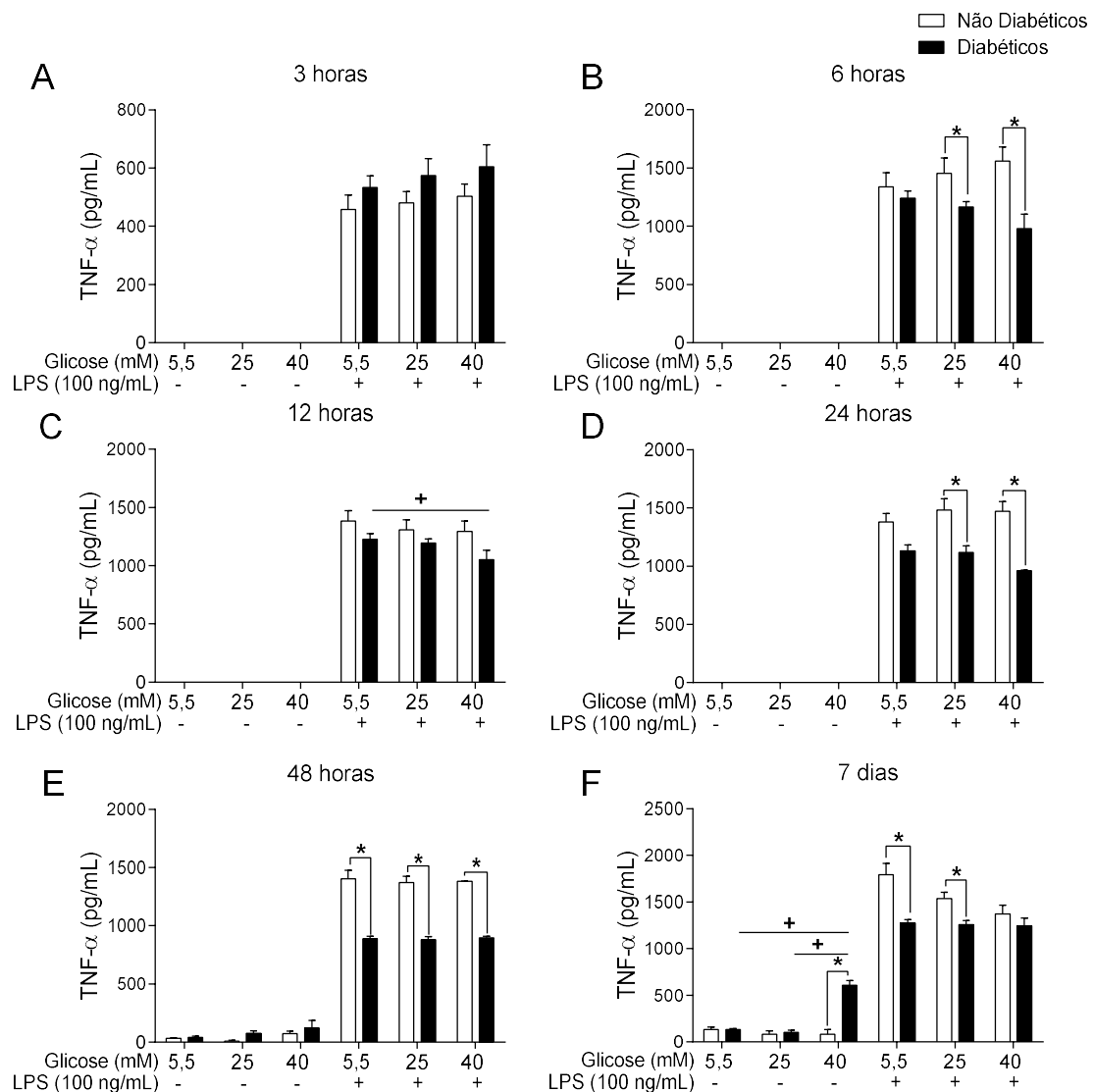


Figura 15- Liberação de TNF- α por ND-BMDM e D-BMDM. Produção de TNF- α após (A) 3 horas de estímulo com diferentes concentrações glicose. (B). 6 horas de estímulo com diferentes concentrações glicose. (C) 12 horas de estímulo com diferentes concentrações glicose. (D) 24 horas de estímulo com diferentes concentrações glicose. (E) após 48 horas de estímulo com diferentes concentrações glicose. (F) 7 dias de estímulo com diferentes concentrações glicose. * $<0,005$ vs não diabéticos, + $<0,05$ vs outras concentrações de glicose. Os valores representam a média $\pm$ EPM. Os valores representam a média $\pm$ EPM. N=mínimo de 3.

5.9.2 Liberação de IL-6 pelos BMDM

Enquanto o TNF- α é liberado nos primeiros momentos da inflamação, a IL-6 é liberada em um tempo mais tardio (NISHIMOTO; KISHIMOTO, 2004). A IL-6 possui efeitos proinflamatório, regenerativo e em alguns momentos efeitos anti-inflamatório (MATHEWS et al., 2010). Está envolvida tanto na amplificação quanto na proteção contra a inflamação (KRISTIANSEN; POULSEN 2005; DUQUE; DESCOTEAUX 2014). Assim, realizamos uma evolução temporal nos tempos de 3, 6, 12, 24, 48 horas e 7 dias para verificar o efeito da

hiperglicemia na liberação de IL-6 (Figura 16). Os D-BMDM estimulados por LPS liberaram mais IL-6 comparado aos ND-BMDM após os tempos de 3, 12 e 48 horas quando mantidos em 5,5 mM, 25 mM e 40 mM de glicose; e em 7 dias quando mantidos em 5,5 mM, 25 mM e 40 mM de glicose.

Não houve diferença na liberação de IL-6 entre os ND-BMDM mantidos em diferentes concentrações de glicose estimulados por LPS em nossa evolução temporal. Enquanto que após 7 dias de estímulo, os D-BMDM mantidos em 25 mM e 40 mM de glicose tiveram diminuição na liberação de IL-6 comparado aos D-BMDM mantidos em 5,5 mM de glicose.

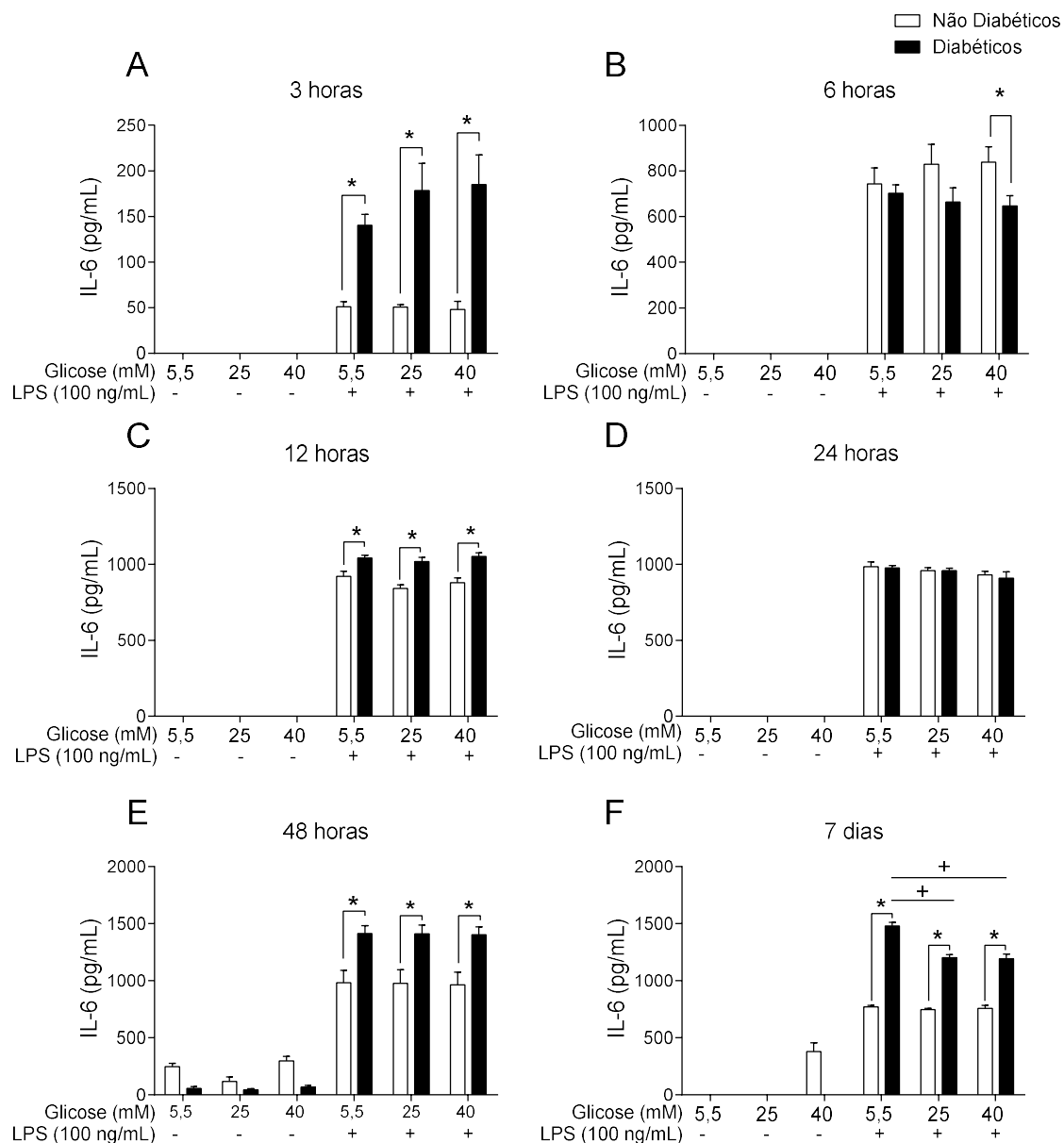


Figura 16- Liberação de IL-6 por ND-BMDM e D-BMDM. Produção de IL-6 após (A) 3 horas de estímulo com diferentes concentrações glicose. (B). 6 horas de estímulo com diferentes concentrações glicose. (C) 12 horas de estímulo com diferentes concentrações glicose. (D) 24 horas de estímulo com diferentes concentrações glicose. (E) 48 horas de estímulo com diferentes concentrações glicose. (F) 7 dias de estímulo com diferentes concentrações glicose. * $<0,05$ vs não diabéticos, + $<0,05$ vs outras concentrações de glicose. Os valores representam a média ± EPM. N= no mínimo 3 animais por grupo.

5.9.3 Liberação de IL-1 β pelos BMDM

Realizamos uma evolução temporal nos tempos de 3, 6, 12, 24, 48 horas e também após 7 dias para verificar o efeito da hiperglicemia na liberação de IL-1 β (Figura 17).

A liberação de IL-1 β foi detectada a partir do tempo de 24 horas. Após 7 dias os D-BMDM liberaram mais IL-1 β em relação aos ND-BMM. Neste mesmo tempo, a alta concentração de glicose *in vitro* prejudicou a liberação desta citocina. Os D-BMDM mantidos

em 25 mM e 40 mM de glicose de glicose sob estímulo por LPS liberaram menores concentrações de IL-1 β em relação àqueles mantidos em 5,5 mM.

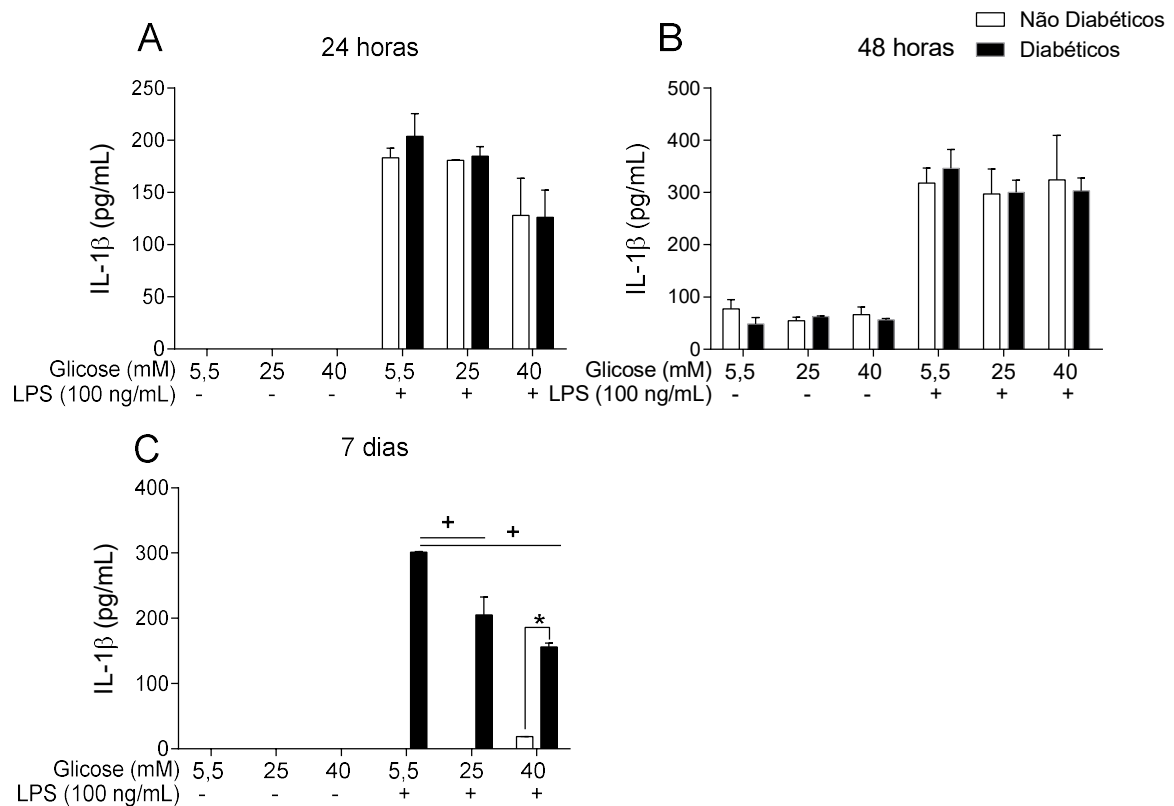


Figura 17- Liberação de IL-1 β por ND-BMDM e D-BMDM. Produção de IL-1 β após A) 24 horas de estímulo com diferentes concentrações glicose. (B) 48 horas de estímulo com diferentes concentrações glicose. (C) 7 dias de estímulo com diferentes concentrações glicose. * $<0,05$ vs não diabéticos, + $<0,05$ vs outras concentrações de glicose. Os valores representam a média $\pm$ EPM. N=mínimo de 3.

5.9.4 Liberação de IL-10 pelos BMDM

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que é liberada em uma fase mais tardia da resposta imune e regula negativamente a resposta adaptativa através da inibição de várias funções dos macrófagos e expressão e atividade de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β (MOORE et al., 2001). Sendo assim, nós avaliamos a liberação de IL-10 após 3, 6, 12, 24, 48 horas e 7 dias (Figura 18).

Os ND-BMDM liberaram mais IL-10 comparado aos D-BMDM quando estimulados por LPS em 6 horas quando mantidos nas concentrações de 25 e 40 mM de glicose, em 12 horas quando mantidos na concentração de 40 mM de glicose e em 7 dias mantidos nas concentrações de 5,5, 25 e 40 mM de glicose. Enquanto que em 48 horas, os D-BMDM liberaram uma maior concentração de IL-10 quando mantidos em de 5,5, 25 e 40 mM de glicose com estímulo por

LPS e em 7 dias quando mantidos nas concentrações de 5,5 e 25 mM de glicose sem estímulo por LPS.

A alta concentração de glicose *in vitro* promoveu maior liberação de IL-10 pelos ND-BMDM após 6 horas de estímulo por LPS. Após o tempo de 7 dias, a alta concentração de glicose promoveu menor liberação de IL-10 pelos ND-BMDM, tanto quando estimulados ou não com LPS. A alta concentração de glicose *in vitro per se* também promoveu menor liberação de IL-10 pelos D-BMDM (Figura 18F).

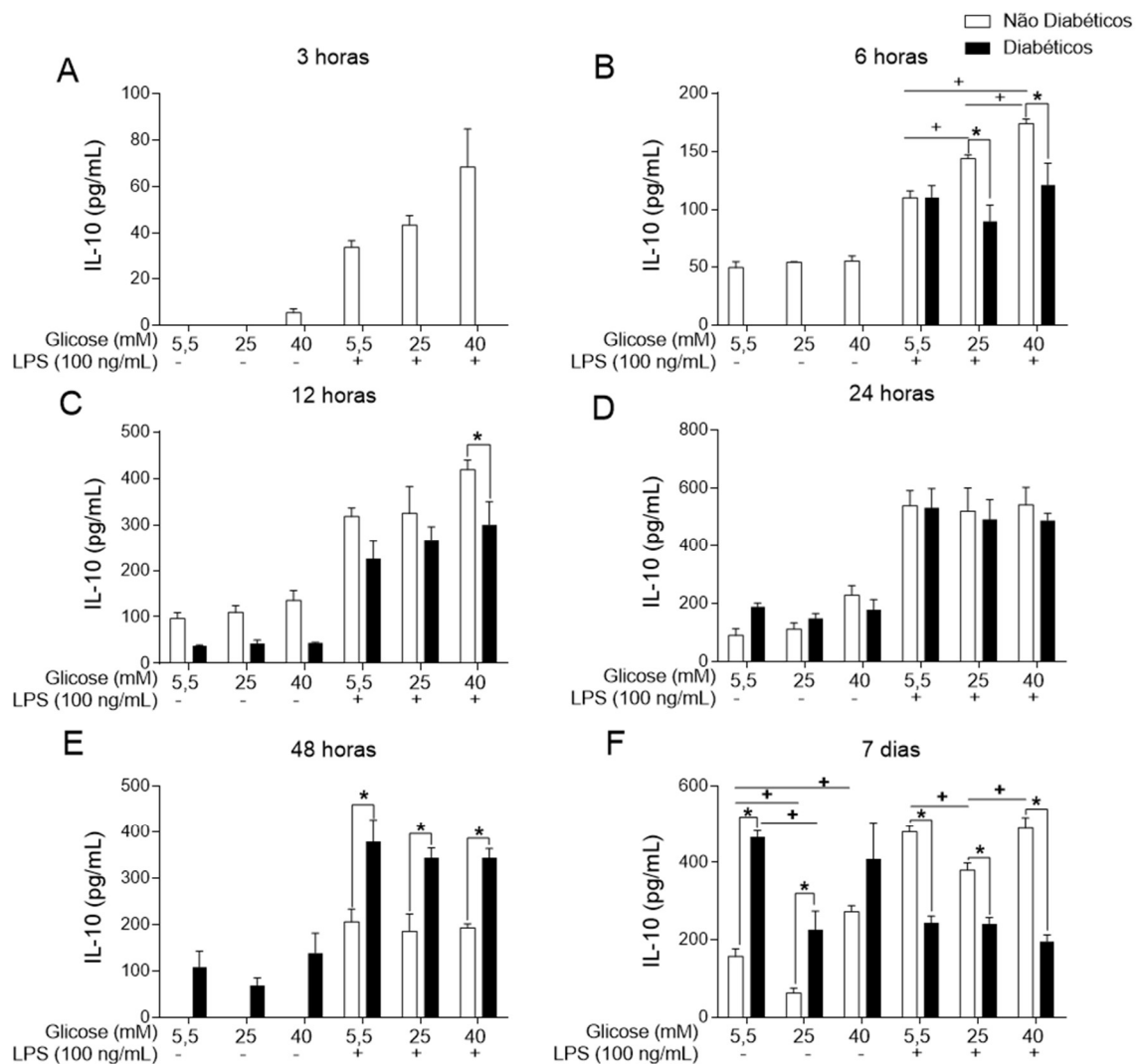


Figura 18- Liberação de IL-10 por ND-BMDM e D-BMDM. Liberação de IL-10 após (A) 3 horas de estímulo com diferentes concentrações de glicose. (B) 6 horas de estímulo com diferentes concentrações de glicose. (C) 12 horas de estímulo com diferentes concentrações de glicose. (D) 24 horas de estímulo com diferentes concentrações de glicose. (E) 48 horas de estímulo com diferentes concentrações de glicose. (F) 7 dias de estímulo com diferentes concentrações de glicose. Os resultados representam a média ± EPM. N=mínimo de 3.

5.9.5 Liberação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico pelos BMDM

A liberação de H_2O_2 foi verificada utilizando o kit de detecção Amplex red (Invitrogen®). Após 24 horas de cultura celular, os D-BMDM de animais diabéticos produziram mais H_2O_2 em relação aos ND-BMDM quando estimulados com LPS em meio contendo 40 mM de glicose. A alta concentração de glicose *in vitro*, 40 mM levou a uma menor liberação de H_2O_2 pelos ND-BMDM (Figura 19A).

Após 48 horas e 7 dias de incubação, verificamos que os D-BMDM liberaram menos H_2O_2 comparado aos ND-BMDM. Além disso, a alta concentração de glicose *in vitro* também promoveu menor liberação desse mediador pelos ND-BMDM (Figura 19 B e C).

A liberação de NO também foi verificada após 7 dias de incubação, neste sentido, os ND-BMDM liberaram mais NO comparado D-BMDM. Assim como aconteceu com a liberação de H_2O_2 , a alta concentração de glicose *in vitro* promoveu diminuição na liberação deste mediador (Figura 19D).

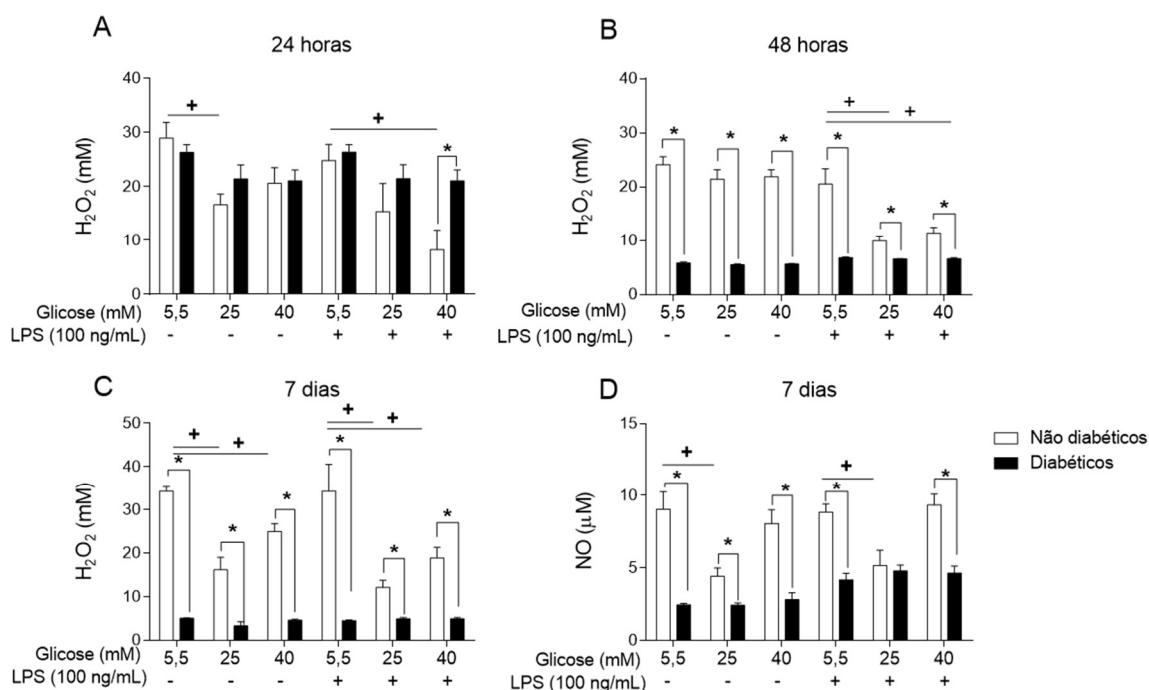


Figura 19- Liberação de Espécies reativas de oxigênio e NO pelos ND-BMDM e D-BMDM. Liberação de H_2O_2 após (A) 24 horas, (B) 48 horas e (C) 7 dias. (D) liberação de NO após 7 dias. * $p < 0,05$ vs diabéticos, + $p < 0,05$ vs outras concentrações de glicose. Os valores representam a média $\pm$ EPM. N=mínimo de 3.

5.10 Fagocitose

Para verificar de que forma a hiperglicemia influencia a capacidade de fagocitose dos BMDM, usamos hemácias de carneiro opsonizadas e, após uma interação dos BMDM com as hemácias opsonizadas sobre uma lamínula, avaliamos o índice de fagocítico. A fagocitose foi menos efetiva pelos D-BMDM comparado à capacidade fagocítica dos ND-BMDM (Fig. 20), ainda quando essas células foram expostas a 25 e 40 mM de glicose *in vitro*, enquanto os ND-BMDM não apresentaram alterações na fagocitose, os D-BMDM apresentaram maior índice fagocítico em comparação com aqueles mantidos em ambiente de glicose normal.

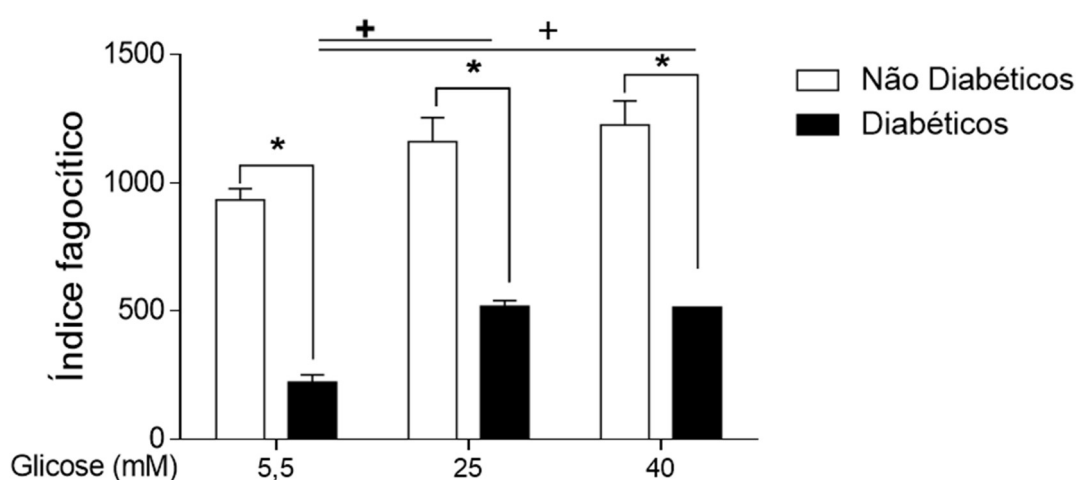


Figura 20 – Fagocitose de hemácias opsonizadas. Os macrófagos foram plaqueados sobre lamínulas e as hemácias foram opsonizadas com anticorpos anti-hemácias, em seguida os macrófagos permaneceram por 30 minutos nas diferentes concentrações de glicose para interagir com as hemácias opsonizadas, em seguida, as lamínulas foram coradas e foi realizado a contagem de 300 macrófagos e conseqüentemente, foi realizado o cálculo do índice fagocítico. * $p < 0,05$ vs diabéticos, + $p < 0,05$ vs outras concentrações de glicose. Os valores representam a média $\pm$ EPM. N=3.

5.11 Efeito da hiperglicemia na autofagia

Para verificar se a hiperglicemia promove alterações na via da autofagia dos BMDM, nós avaliamos por Western blot a expressão de LC3b e Beclin-1. Após 24 horas de incubação, os BMDM provenientes dos animais hiperglicêmicos expressaram maiores níveis da relação LC3b-I/II. A expressão de beclin foi modificada quando os ND-BMDM foram expostos a alta concentração de glicose *in vitro* e estimulados por LPS, onde ocorreu uma diminuição na expressão desta proteína em alta concentração de glicose.

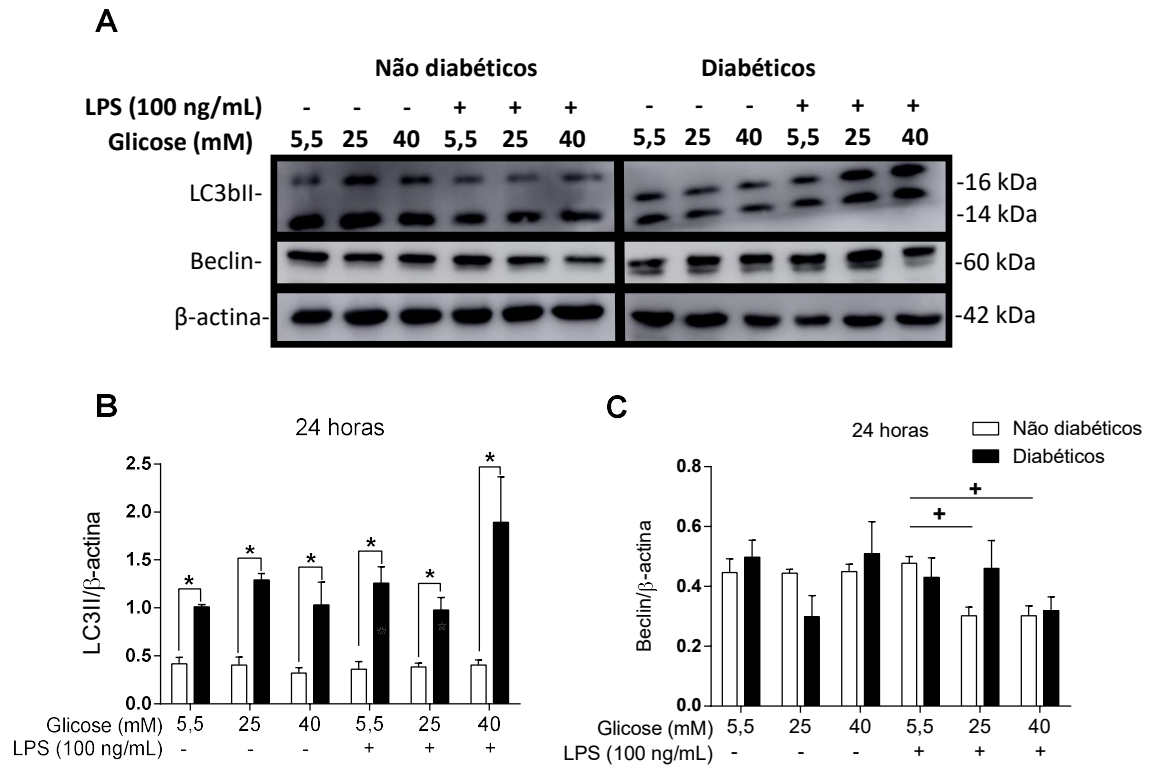


Figura 21 – Avaliação da via da autofagia após 24 horas de incubação. (A) Expressão (B) Relação LC3b/β-actina (C) Relação Beclin/β-actina * $p < 0,05$ vs diabéticos, + $p < 0,05$ vs outras concentrações de glicose. Os valores representam a média $\pm$ EPM. N=3.

5.12 Cinética da liberação de citocinas pelos MP

5.12.1 Liberação de TNF- α por ND-MP e D-MP

Avaliamos o efeito da hiperglicemia na liberação de TNF- α pelos MP nos tempos de 3 e 6 horas (Figura 22). Após 3 horas, os ND-MP liberaram mais TNF- α em relação aos D-MP quando mantidos nas diferentes concentrações de glicose (Figura 22A). Já no tempo de 6 horas o fenômeno foi oposto, os D-MP secretaram mais TNF- α comparado aos ND-MP (Figura 22B).

Após 6 horas de estímulo, a alta concentração de glicose *in vitro* e estímulo por LPS, 25 e 40 mM de glicose promoveram uma maior liberação de TNF- α pelos D-MP quando comparado as mesmas células mantidas em 5,5 mM de glicose sob o mesmo estímulo.

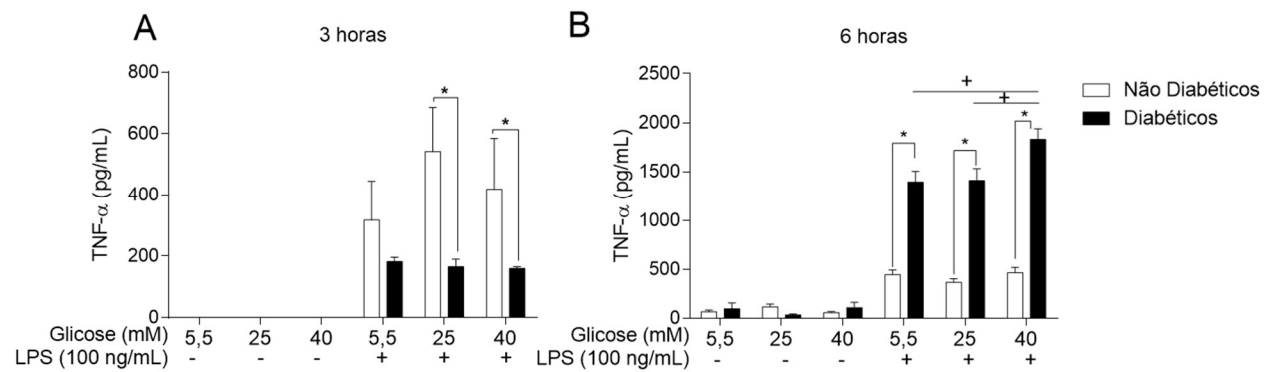


Figura 22 – Liberação de TNF- α por MP. Liberação de TNF- α após (A) 3 horas de estímulo com diferentes concentrações glicose. (B) 6 horas de estímulo com diferentes concentrações glicose. * <0,05 vs não diabéticos, + <0,05 vs outras concentrações de glicose. Os valores representam a média $\pm$ EPM, N=5.

5.12.2 Liberação de IL-6 por ND-MP e D-MP

Avaliamos o efeito da hiperglicemia na liberação de IL-6 pelos MP nos tempos de 3 e 6 horas. Nos tempos de 3 e 6 horas de estímulo por LPS, os D-MP produziram mais IL-6 comparado aos ND-MP mantidos em 5,5 mM glicose no tempo de 3 horas, e quando mantidos em 5,5, 25 e 40 mM para 6 horas.

Após 6 horas de estímulo, o meio contendo 40 mM de glicose com LPS elevou a produção e liberação de IL-6 por ND-MP comparado os mesmos MPs, porém mantidas em 5,5 e 25 mM de glicose sob o mesmo estímulo.

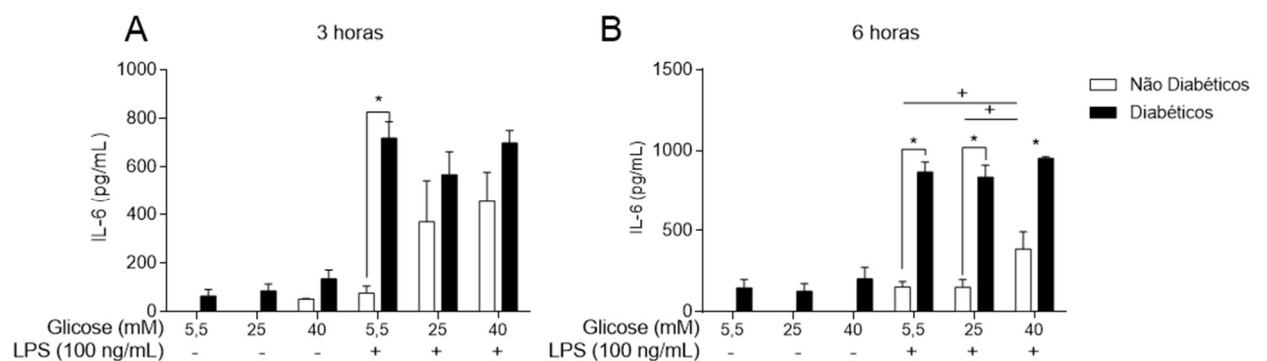


Figura 23– Produção de IL-6 pelos MP. Liberação de IL-6 após (A) 3 horas de estímulo com diferentes concentrações glicose. (B) 6 horas de estímulo com diferentes concentrações glicose. * <0,05 vs não diabéticos, + <0,05 vs outras concentrações de glicose. Os valores representam a média $\pm$ EPM, N=5.

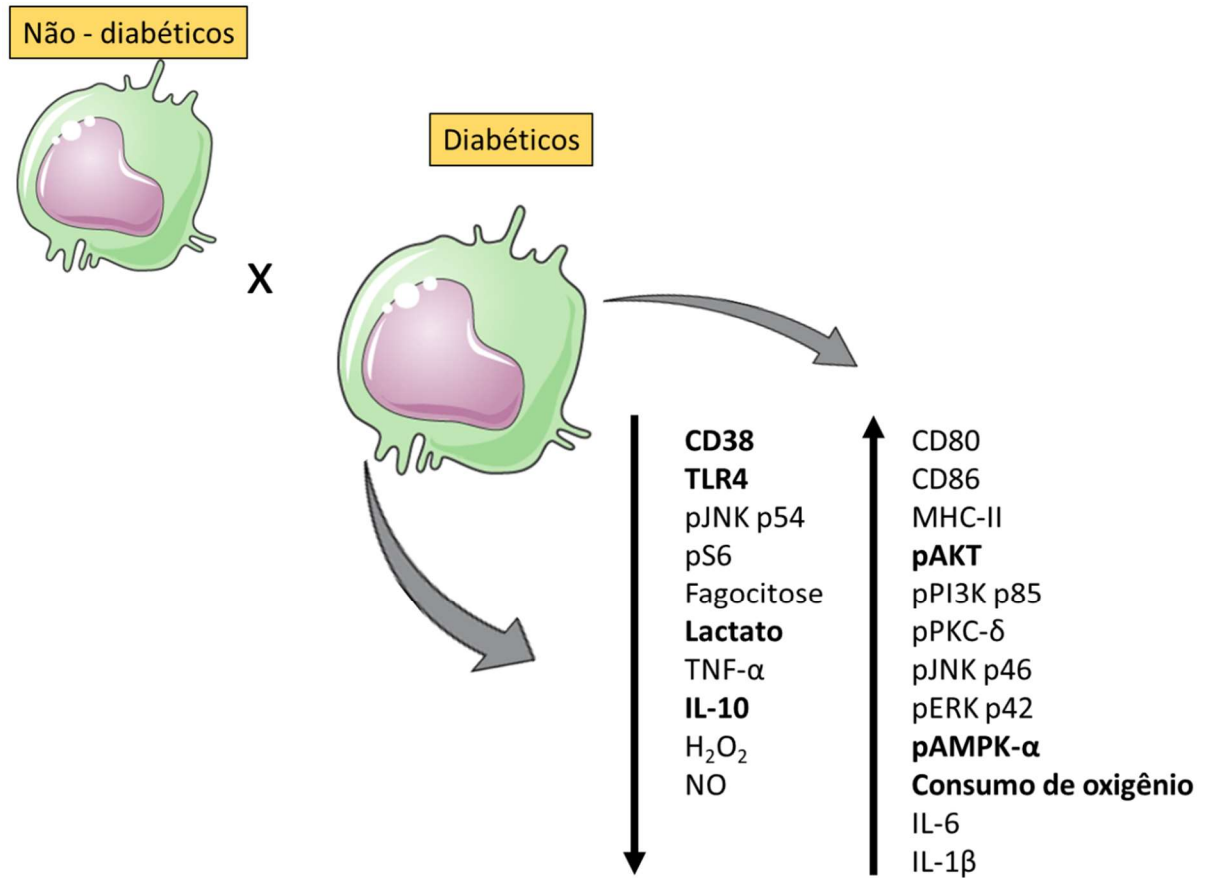


Figura 24— Resumo dos resultados na comparação entre ND- e D-BMDM. Os D-BMDM expressaram menos CD38 e TLR4 na superfície, menor fosforilação em JNKp54 e em S6, menor fagocitose além de menor secreção de lactato, TNF-α, IL-10, H₂O₂ e NO, porém expressaram mais CD80, CD86 e MHC-II, além de fosforilarem mais em AKT, PI3Kp86, PKC-δ, JNKp46, ERKp42, AMPK-α, além de consumirem mais oxigênio e secretarem mais IL-6 e IL-1β, comparado aos ND-BMDM.

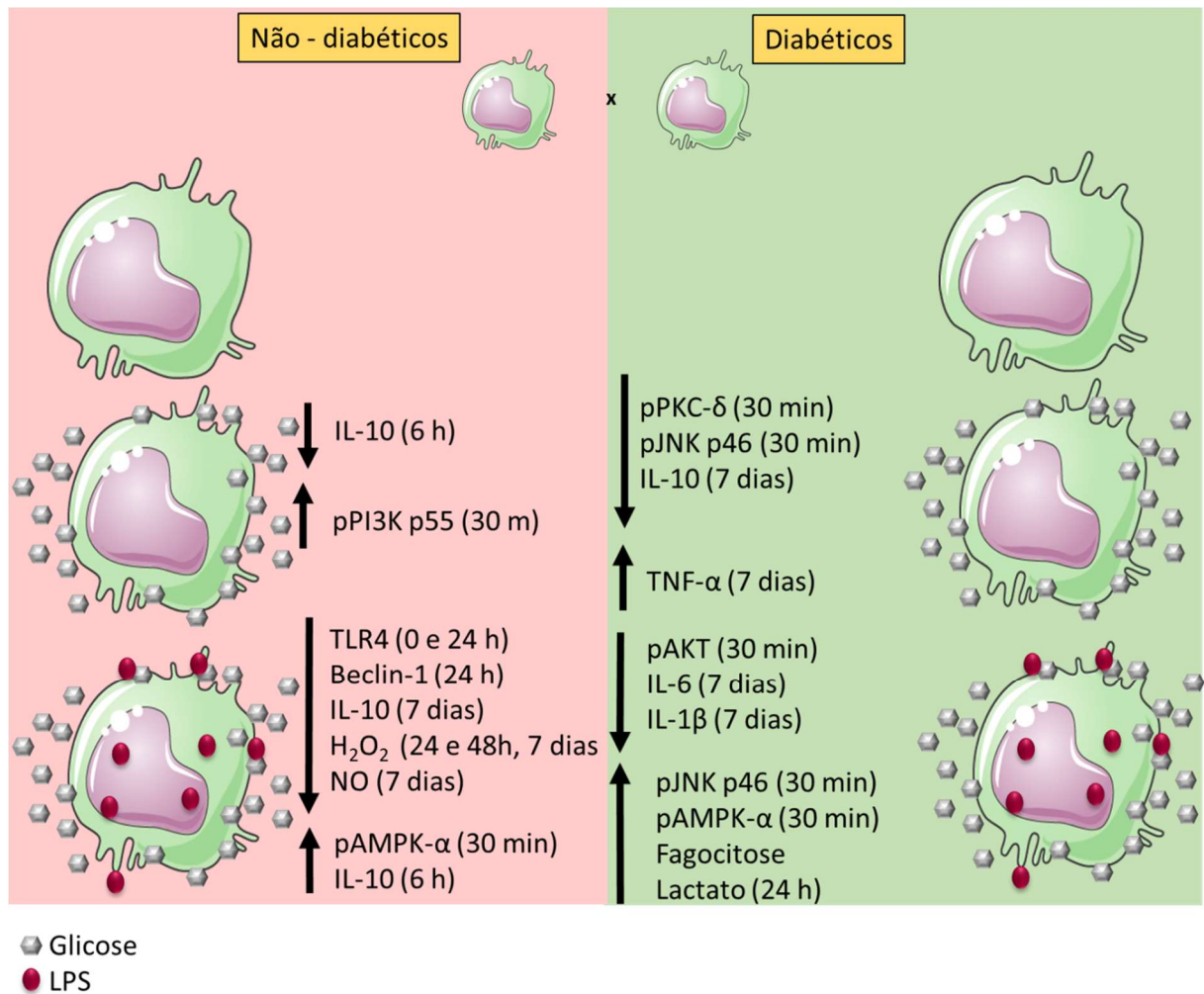


Figura 25– Resumo dos resultados comparandos os ND- ou os D-BMDM foram cultivados em alta concentração de glicose *per se* ou concomitante ao estímulo por LPS. Em ND-BDMD a alta concentração de glicose *per se* promove menor secreção de IL-10 e maior fosforilação em PI3Kp55, já sob estímulo por LPS, a alta concentração de glicose promoveu menor expressão de TLR4, Beclin-1 e menor secreção de IL-10, H₂O₂, e NO, porém promoveu maior fosforilação em AMPK-α e IL-10. Em D-BMDM a alta concentração de glicose *per se* promoveu menor fosforilação em PKC-δ, JNKp46 e menor secreção em IL10, porém promoveu aumento na secreção de TNF-α, já sob estímulo por LPS, a alta concentração de glicose promoveu menor fosforilação em AKT com menor secreção de IL-6 e IL-1β, porém aumentou a fosforilação em JNKp46 e AMPK-α, fagocitose e secreção de lactato.

6. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que a hiperglicemia promove uma sensibilização dos BMDM, alterando o seu estado basal para a resposta inflamatória. Nós encontramos que os D-BMDM expressaram menos CD38 (Fig. 10A e B), TLR4 (Fig. 11A e B), fosforilaram menos em JNK subunidade p54 (13C), fosforilaram menos em S6 (Fig. 14C), apresentaram menor capacidade fagocítica (Fig. 20) e liberam menos lactato (Fig. 14D), TNF- α (Fig. 15), IL-10 (Fig. 18), H₂O₂ e NO (Fig. 19), porém, expressaram mais CD80, CD86 e MHC-II (Fig. 10 D, E e F) na superfície celular, além de fosforilarem mais em AKT (Fig. 12B), PI3K subunidade p85 (Fig. 12C), PKC- δ (Fig. 12F), JNK subunidade p46 (Fig. 13B), ERK subunidade p42 (Fig. 13E) e em AMPK α (Fig. 14B), além de consumirem mais oxigênio (Fig. 14E) e liberarem mais IL-6 (Fig. 16) e IL-1 β (Fig. 17), comparado aos ND-BMDM. Além disso, vimos que a alta concentração de glicose *in vitro* nos ND-BMDM promoveu diminuição na expressão do TLR4 (Fig. 11B), de Beclin-1 (Fig. 21C), e diminuição na liberação de IL-10 após 7 dias (Fig. 18), H₂O₂ e NO (Fig. 19), porém, induziu aumento na fosforilação em PI3K subunidade p55 (Fig. 12D), em AMPK α (Fig. 14B), além de aumentar a secreção de IL-10 após 6 horas de estímulo (Fig. 18). Já para os D-BMDM, a alta concentração de glicose *in vitro*, *per se*, ou seja, sem estímulo por LPS, promoveu menor fosforilação em PKC- δ (Fig. 12F) e JNK subunidade p46 (Fig. 12C), menor secreção de IL-10 (Fig. 18) e maior secreção de TNF- α após 7 dias (Fig. 15), já em conjunto ao estímulo por LPS, a alta concentração de glicose *in vitro* promoveu menor liberação de IL-6 (Fig. 16) e IL-1 β após 7 dias (Fig. 17). No entanto, sob estímulo por LPS, promoveu aumento na fosforilação em JNK subunidade p46 e em AMPK α , além de promover maior índice fagocítico e maior liberação de lactato.

A hiperglicemia é um dos principais fatores desencadeantes das complicações do DM1 (THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1993). O diabetes prejudica o controle glicêmico em todo o corpo, e uma parte das células não consegue internalizar e metabolizar glicose devido à falta de insulina, enquanto outros tipos celulares permanecem em constante contato com altas concentrações de glicose, o que promove a hiperglicemia intracelular (MELENDEZ-RAMIREZ; RICHARDS; CEFALU, 2010). Nós utilizamos o modelo animal de DM1 induzido por ALX, no qual após 10 dias, a hiperglicemia somado a perda de peso, confirma o estado insulinopênico e indução do DM1 com o modelo utilizado (TESSARO et al, 2017; KING 2012). A indução do diabetes por aloxana ocorre após sua administração intravenosa, onde a captação da aloxana pelas células β pancreáticas

promove a formação de radicais livres e como consequência, estas células são destruídas, conduzindo a uma carência de insulina (LENZEN 2008).

O material medular diferenciado *in vitro* com LCCM origina os BMDM. O BMDM é o precursor dos macrófagos que são recrutados para o local da inflamação (MARIM et al., 2010), e essas células são diferentes dos macrófagos específicos do tecido (DAVIES et al., 2013). Inicialmente, nem o diabetes nem as diferentes concentrações de glicose utilizados alteraram a viabilidade celular. O ensaio de MTT mede a atividade da succinato desidrogenase e também é utilizado para avaliar a viabilidade celular, pois as células viáveis convertem o MTT em cristais de formazan (RISS, 2004). Ainda assim, nossos resultados mostraram que o LPS promoveu um aumento na conversão do MTT após 24 horas por ND-BMDM, e em 48 horas por D-BMDM. O LPS é conhecido por promover um aumento na atividade mitocondrial, e aqui parece que os D-BMDM apresentam um atraso para gerar este aumento.

As diferentes concentrações de glicose utilizadas *in vitro* não alteraram a viabilidade celular dos macrófagos, quando mensurado por PI. A habilidade da marcação por PI através da citometria de fluxo para distinguir células viáveis de restos celulares e células intactas não viáveis é excelentemente eficaz (ROSS et al., 1989). Fato importante, já que os meios utilizados não foram tóxicos para os macrófagos e provavelmente os efeitos promovidos pela alta concentração de glicose *in vitro* não foram decorrentes de toxicidade do meio de cultura utilizado. Em macrófagos, o LPS possui efeito estimulante (CHAO et al., 2005), o que auxilia na manutenção da sobrevivência e funções celulares (LOMBARDO et al., 2007). As junções das técnicas de marcação por PI e MTT apresentam de modo satisfatório a ausência de toxicidade das concentrações de glicose utilizada, como já descrito anteriormente por RISS e colaboradores (2016).

A polarização dos macrófagos é descrita como uma capacidade plástica dessas células em comportar-se como anti-inflamatórias ou pro-inflamatórias de acordo com o microambiente (MURRAY, 2014). Encontramos que os D-BMDM expressam níveis mais baixos do marcador M1, CD38, no entanto, os níveis de CD206, que é determinado como marcador M2, permaneceram inalterados. Além disso, a atividade da arginase, que é considerada como um marcador de M2, está reduzida nos D-BMDM, pelo menos em 5.5 e 25 mM de glicose sob estímulo por LPS, porém, aumentada em 40 mM também sob estímulo por LPS. Juntos, a análise dos marcadores M1 e M2 não esclareceu se a hiperglicemia promove uma alteração clássica (M1) ou alternativa (M2), sem poder definir que o BMDM diabético está polarizado para um fenótipo específico, já Wang e colaboradores, 2017, mostraram que células RAW 264.7

cultivadas em alta concentração de glicose, uma tendência à polarização para M2 (WANG et al., 2006). Sun e colaboradores, 2012, também mostraram um aumento na atividade de arginase quando os macrófagos peritoneais foram cultivados sob alta concentração glicose *in vitro* (SUN et al., 2012).

O metabolismo da glicose tem um papel fundamental na ativação e modulação da função dos macrófagos (MUNDER et al., 1998) e a via de sinalização LPS-TLR4 desencadeia alterações metabólicas nessas células. Como um sensor de energia que ativa a disponibilidade de nutrientes para a condução das vias inflamatórias e metabólicas, o mTORC1 tem a S6 como uma das suas proteínas alvo para induzir a síntese proteica (SCHAEFFER et al., 2011), envolvendo assim a síntese de citocinas como IL-6 e IL-10 (COVARRUBIAS; AKSOYLAR; HORNG, 2015). Em nosso trabalho, a fosforilação na proteína S6 foi maior nos ND-BMDM (25 mM e 5,5 mM + LPS) comparado aos D-BMDM. Em conjunto com esse marcador, a AMPK α 1 que é uma proteína que também está envolvida na regulação de energia e metabolismo e que quando fosforilada ativa mecanismos de ação anti-inflamatória, incluindo a inibição da cascata de mTOR, diminuindo a síntese de proteínas inflamatórias (ZHU et al., 2014). Vimos aqui que a alta concentração de glicose, *in vivo* e *in vitro*, ativa a fosforilação da AMPK α 1. Sabe-se que o LPS promove um aumento no consumo de glicose, e esse fato inibiria a AMPK α 1, porque ela conduz a uma via catabólica objetivando a produção de ATP, e desta forma, quando ativada, esta proteína também tenta poupar o ATP (FREEMERMEN et al., 2014) o que sugere que a hiperglicemia promove alteração via AMPK α 1, desregulando o processo de homeostasia energética.

A glicólise é responsável por metabolizar glicose e gerar energia para as células como ATP, tendo o lactato, convertido a partir do piruvato, o seu produto final. O LPS leva a uma maior demanda energética, aumentando a glicólise a fim de fornecer a quantidade de energia necessária para secretar uma série de mediadores imunológicos (den BOSSCHE; O'NEILL; MENON, 2017). Os D-BMDM quando estimulados por LPS e cultivados em alta concentração de glicose, aumentaram a secreção de lactato no meio. Ainda assim, os D-BMDM produziram menos lactato e consumiram mais oxigênio comparado aos ND-BMDM, o que significa que a hiperglicemia afetou a eficiência da metabolização de glicose.

Como a glicólise é crucial para a função das células imunes (KELLY e O'NEILL, 2017), um comprometimento da liberação de lactato pode evidenciar que essas células priorizaram OXPHOS (PEARCE e PEARCE, 2013) ou podem estar metabolizando a glicose por vias diferentes. Inevitavelmente, mudanças no metabolismo da glicose nos macrófagos podem

modificar sua resposta ao estímulo patogênico. Nossos resultados corroboram com Pavlou e colaboradores (2018) que demonstraram que a alta concentração de glicose sensibiliza os macrófagos e promove um impedimento da sua capacidade glicolítica alterando a resposta inflamatória desses macrófagos (PAVLOU et al., 2018).

Como o TLR4 é a principal maneira pela qual o LPS é reconhecido, sua ativação e sinalização devem ser rigorosamente controladas em nível celular (MOHAMMAD et al., 2006). Vimos aqui que a alta concentração de glicose *in vivo* e *in vitro* regula negativamente o TLR4, e esse fato prejudica não só o reconhecimento do patógeno pelo BMDM, mas também a sinalização intracelular envolvida na depuração de antígenos. Enquanto Dasu e colaboradores (2008) verificaram um aumento na expressão de TLR4 em monócitos humanos quando expostos a 25 mM de glicose com o comprometimento da via dependente de Myd88, ativação de NF- κ B e liberação de citocinas pró-inflamatórias (DASU et al., 2008).

Sinalizada pela ativação de TLR4, a via PI3K/AKT está envolvida em vários processos celulares que sustentam a resposta inflamatória, principalmente pela ativação do LPS (LUYENDYK et al., 2008). Em alta concentração de glicose, encontramos que os ND-BMDM apresentaram um aumento na fosforilação na PI3K, subunidade p85, mesmo sem o estímulo por LPS. A PI3K apresenta muitas subunidades (VERGARDI et al., 2007) e a PI3K p85 é uma subunidade reguladora e está envolvida na transdução do sinal via MYD88, visto que macrófagos deficientes nesta subunidade sob estímulo com LPS tendem a secretar mais TNF- α e IL-6 (LUYENDYK et al., 2008).

Em conjunto a isso, a AKT realiza a regulação do metabolismo inflamatório e energético dos macrófagos (COVARRUBIAS et al., 2015). O excesso crônico de glicose ativa de forma exacerbada o mTORC1 que promove um feedback da inibição de AKT, e essa inibição pode influenciar na polarização dos macrófagos (COVARRUBIAS et al., 2015). Da mesma forma, a estimulação por LPS nos D-BMDM levou a uma maior fosforilação na AKT em comparação com ND-BMDM quando mantidos em 5,5 mM de glicose; no entanto, quando este mesmo D-BMDM foi mantido em 25 mM e concomitantemente estimulado por LPS, houve uma diminuição da fosforilação de AKT comparado aos D-BMDM mantidos em 5,5 mM de glicose sob o mesmo estímulo de LPS. Wang et al., 2017, demonstraram que uma alta concentração de glicose leva à ativação alternativa da via de sinalização via PI3K/AKT induzindo os macrófagos para o fenótipo M2 (arginina e expressão de CD206), sendo ambos os fatores M2 bloqueados quando a PI3K foi inibida (WANG et al., 2006). Da mesma forma, Nandy e colaboradores (2011) verificaram um aumento na fosforilação de AKT em células THP-1 expostas a um meio

com alta concentração de glicose (NANDY et al., 2011). Provavelmente, a PI3K/AKT desempenha um papel importante no comportamento de macrófagos sob hiperglicemia podendo limitar a resposta inflamatória, alterando a cascata de sinalização via TLR4.

Embora estudos demonstrem que a fosforilação da AKT influencie na viabilidade celular dos macrófagos (NANDY et al., 2011), em nosso estudo, não observamos alteração deste parâmetro. LI e colaboradores (2015) também verificaram que a elevada concentração de glicose promove a inibição da AKT de maneira dose-dependente em macrófagos peritoneais, porém eles constataram que o mesmo meio que levou a diminuição da fosforilação da AKT, levou a uma maior morte celular, visto por PI e Anexina (LI et al., 2015). A fosforilação da AKT contribui para a proliferação celular e por ser componente *downstream* do TLR, participa da resposta dos macrófagos à patógenos (WANG et al., 2014), além disso ela envolve a ativação em mTORC1 para síntese proteica, mas também está envolvida na ativação em AMPK, atuando como regulador central na via inflamatória e metabólica. A AKT também atua aumentando o influxo de glicose para a célula, podendo ter papel fundamental nos macrófagos durante a hiperglicemia.

Também ativadas via TLR4-LPS, moléculas como ERK1/2, p38 MAPK e SAPK/JNK, complexo das MAPK, medeiam a ativação de AP1 promovendo aumento de síntese e secreção de citocinas inflamatórias (KIM et al., 2005). Nossos resultados mostraram que os D-BMDM fosforilam mais em SAPK/JNK p46 e ERK p44, mas nenhuma alteração foi observada em P38 MAPK. No entanto, nos D-BMDM, a alta concentração de glicose *in vitro*, 25 mM, conduziu a uma redução na fosforilação de SAPK/JNK p46; mas quando as células foram estimuladas por LPS, em vez de diminuir sua fosforilação, a alta concentração de glicose promoveu um aumento em seus níveis. Embora as subunidades SAPK/JNK, p46 e p54, compartilhem os mesmos substratos, elas podem ter funções distintas (SUN et al., 2012).

A ERK1/2 desempenha um papel na promoção da proliferação e síntese da matriz extracelular, e o LPS pode ativar essa proteína por diferentes vias na célula (MEBRATU et al., 2009). Sun e colaboradores (2012), mostraram que a ERK1/2 estava envolvida na polarização de macrófagos para M2 em estudos com RAW 264,7, principalmente quando estas células são estimuladas com TGF- β em um ambiente hiperglicêmico. ERK 1/2, ou ERK 42/44, são isoformas homólogas que compartilham o mesmo substrato, elas são importantes para manter a célula viva e responsiva aos estímulos do ambiente (MELOCHE et al., 1995), e apesar da modificação dos níveis de fosforilação da ERK p42, estes BMDM não tiveram nenhuma mudança em sua viabilidade.

Dessa forma, os D-BMDM fosforilam as MAPK em diferentes níveis, o que poderia levar a uma alteração na translocação de AP1 e NF- κ B para o núcleo, consequentemente com alteração na liberação dos mediadores inflamatórios. Sendo assim, os D-BMDM diabéticos secretaram uma menor concentração de TNF- α e IL-10, porém apresentaram maior secreção de IL-6. Então, parece que a via inflamatória é ativada em um ambiente hiperglicêmico, mas de alguma forma este aumento não resulta em uma maior secreção dos mediadores inflamatórios. Sun e colaboradores, 2012, mostraram que as alterações presentes em macrófagos sob hiperglicemia são relacionadas a via AKT-mTOR e ERK (SUN et al., 2012).

Juntamente com a modificação de proteínas envolvidas com a via do LPS-TLR4, a hiperglicemia alterou a secreção de alguns mediadores inflamatórios. Citocinas como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL10, e os mediadores H₂O₂ e NO são secretados pelos macrófagos para eliminar a invasão bacteriana (DAVIES et al., 2013). Em nossos experimentos, os D-BMDM secretaram uma maior concentração de IL-6 e IL-1 β , e uma menor concentração de TNF- α , IL-10, H₂O₂ e NO.

Diversos estudos sugerem que a alta concentração de glicose modifica a liberação de TNF- α (SUN et al., 2012; CHENG et al., 2015; HUA et al., 2012), IL-6 (DEVARAJ et al., 2005), IL-1 β (HILL et al., 1998) e IL-10 (EDDIE et al., 2017) pelos macrófagos. Em conjunto, essas citocinas desempenham um papel fundamental na inflamação, e a interrupção desse mecanismo promove um desequilíbrio no microambiente. Com nossos resultados, o feedback anti-inflamatório parece estar prejudicado, pois a liberação de IL-10 é interrompida e retardada pelos D-BMDM. De um modo geral, a hiperglicemia *in vitro* altera a secreção de alguns mediadores, afetando principalmente os macrófagos expostos por longos períodos de tempo (7 dias).

A alta concentração de glicose no meio de cultura celular, sem estímulo por LPS, não promoveu liberação de mediadores imunes nos tempos iniciais analisados, apenas após o período de 7 dias de cultura celular. Este resultado implica em um papel estimulatório da hiperglicemia a longo prazo, já que a alta concentração de glicose *per se* não promoveu efeitos antes de 48 horas.

Sun e colaboradores, 2012, mostraram uma menor secreção de TNF- α por macrófagos de animais diabéticos quando comparados aos macrófagos de animais saudáveis após 24 horas de cultura celular e estímulo com LPS e/ou INF- γ (SUN et al., 2012). Nossos animais após injeção com aloxana, permanecem por aproximadamente 10 dias em hiperglicemia, é possível que, dez dias em hiperglicemia seja suficiente para alterar a resposta dos macrófagos, visto a diferença

da liberação desta citocina quando comparamos ND-BMDM e D-BMDM, além disso o protocolo de hiperglicemia utilizado por Sun e colaboradores durou quatro semanas (SUN et al., 2012), o que pode contribuir para promover modificações mais consistentes no modelo utilizado por eles. Possivelmente, ocorrem alterações epigenéticas que levam a modificações nos BMDM de animais hiperglicêmicos.

Os macrófagos em hiperglicemia permanecem em um estado de inflamação basal, liberando quantidades de citocinas pró-inflamatórias mesmo sem um estímulo inflamatório, entretanto quando são desafiados, o nível de secreção dos mediadores é reduzido, o que é um dos fatores responsáveis pelo estado inflamatório de diabéticos com a glicemia descontrolada (GEERLINGS; HOEPELMAN, 1999). Também tem o fator do tempo, sete dias pode ser suficiente para que a hiperglicemia *in vitro* atue como fator estimulante, então, mesmo sem estímulo patogênico, a alta concentração de glicose em período prolongado pode ser *per se* uma fonte de estímulo. Além disso, no terceiro dia da cultura celular foi adicionado um novo meio de cultura (com os mesmos tratamentos), e assim essa reposição pode ter atuado como um re-estímulo para as células.

A diminuição na liberação de TNF- α prejudica o início de uma resposta a um antígeno, (CHENG et al., 2015). Em estudos realizados em células RAW 264.7, Cheng e colaboradores, (2015) viram que após 24 horas de tratamento, um meio com elevada concentração de glicose promoveu o aumento na liberação de TNF- α comparado ao meio contendo concentrações normais de glicose (CHENG et al., 2015). Enquanto isso Hua e colaboradores (2012) mostraram também que células RAW 264.7 cultivadas em meio contendo 25 mM de glicose e estimuladas com LPS produziram uma menor concentração de TNF- α após 48 horas de cultivo em relação às células mantidas em meio normal de glicose (HUA et al., 2012). Nossos achados corroboram com ambos os resultados de Hua e Cheng, do ponto de vista em que a alta concentração de glicose *in vitro* promove alteração na liberação de TNF- α pelos macrófagos (CHENG et al., 2015; HUA et al., 2012).

Os D-BMDM produziram maiores níveis de IL-6 em relação aos ND-BMDM em toda a evolução temporal. Já, Yamasawa e colaboradores (2012) verificaram em macrófagos alveolares de animais diabéticos uma menor liberação de IL-6 em relação aos macrófagos de animais saudáveis (YAMASAWA et al., 2012). Ainda, há constatações de que o soro de indivíduos diabéticos apresenta uma maior concentração de IL-6 comparado ao soro de indivíduos não diabéticos (KANTER et al., 2011).

Em nossos experimentos com BMDM observamos alterações na liberação de IL-6 após 7 dias por D-BMDM, onde houve diminuição desta citocina em alta concentração de glicose *in vitro*. Sun e colaboradores (2012), também verificaram este fenômeno, mas em macrófagos provenientes do exsudato peritoneal e com 24 horas de cultura celular (SUN et al., 2012). Mais uma vez, o efeito da hiperglicemia *in vitro* foi observado após 7 dias de cultura, corroborando a hipótese de que a glicose em excesso altera a liberação de citocinas nos BMDM após longos períodos de exposição.

Além das citocinas TNF- α e IL-6, a IL-1 β desempenha um papel importante no percurso da inflamação. Os D-BMDM produziram mais IL-1 β em comparação aos de animais não diabéticos após sete dias de estímulo com LPS. Assim como Devaraj e colaboradores, (2006), verificaram maior concentração de IL-1 β em soro de indivíduos diabéticos comparado aos indivíduos não diabéticos. Esses achados são consistentes com aqueles encontrados para a citocina IL-6.

Comparando a resposta dos macrófagos nas diferentes concentrações de glicose. A alta concentração de glicose *in vitro* diminuiu a liberação de IL-1 β por D-BMDM. Corroborando com os nossos resultados, Hill e colaboradores (1998) encontraram em células RAW 264.7 que uma alta concentração de glicose *in vitro* promove uma redução na secreção de IL-1 β após 24 horas em comparação ao meio contendo concentrações basais de glicose, além disso, encontraram que este fenômeno é dependente da ação da PKC (HILL et al., 1998).

Para auxiliar na contenção e também resolução da resposta inflamatória, os macrófagos também liberam citocinas e mediadores que possuem papel anti-inflamatório, um exemplo é a IL-10. Os ND-BMDM liberaram mais IL-10 comparado aos D-BMDM nos tempos de 6 e 12 horas. Em 48 horas e 7 dias o fenômeno evidenciado foi o contrário para o meio sem o estímulo por LPS. Novoselova e colaboradores (2016) verificaram que a IL-10 estava diminuída no plasma de animais diabéticos comparados ao dos animais controle (NOVOSELOVA et al., 2016). Já após 7 dias de cultura, a liberação de IL-10 foi menor quando os D-BMDM e ND-BMDM foram mantidos em alta concentração de glicose, 25 mM, com ou sem estímulo por LPS. Fato que corrobora com Chung e colaboradores (2015), que mostraram que BMDM expostos à alta concentração de glicose apresentavam diminuição da liberação de IL-10 (CHUNG et al., 2015). O tempo de exposição parece ser crucial para as alterações promovidas pela alta concentração de glicose.

A alta concentração de glicose *in vivo* e *in vitro*, por longo período, promove uma diminuição nos níveis de IL-10. Esse fenômeno pode estar relacionado diretamente à alta

susceptibilidade de diabéticos a infecções, já que existe um prejuízo na resolução da inflamação relacionada a infecção, pois a IL-10 deve auxiliar na diminuição de sinais pró-inflamatórios gerados por TNF- α e IL-6 (CHUNG et al., 2015).

Compilando as alterações na secreção de citocinas pela hiperglicemia, é perceptível observar um importante papel da IL-6 e da IL-10 nas alterações dos D-BMDM. A hiperglicemia parece prejudicar o curso da secreção de IL-10, mostrando um retardo na liberação desta citocina anti-inflamatória, o que prejudica a ação e os passos da inflamação.

Além disto, verificamos que a hiperglicemia promove prejuízo na liberação de H₂O₂ e NO. Guha e colaboradores (2000) demonstraram que elevadas concentrações de glicose promovem um aumento basal na produção de espécies reativas de oxigênio (GUHA et al., 2000). Espécies reativas de oxigênio como o H₂O₂, ânion superóxido e também radicais hidroxila são reguladores de diversas sinalizações celulares em resposta ao microambiente. O H₂O₂ é um importante mensageiro secundário na manutenção da homeostasia celular em diferentes condições (HOLMSTROM et al., 2014). Tanto o H₂O₂ quanto o NO são mediadores importantes na morte e consequente eliminação do antígeno. Uma deficiência na liberação desse mediador pode promover a permanência de antígenos no ambiente inflamatório.

O processo de autofagia tem por objetivo sequestrar proteínas ou organelas senescentes ou danificadas para assim realizar a reciclagem de seus produtos (LEVINE, KROEMER, 2008), também é um processo que está envolvido na remoção de células que estão em processo de morte celular programada do tipo 1, tendo desta maneira papel protetor, ou no processo de morte celular programada do tipo 2, uma morte não apoptótica (PYO et al., 2007). Sendo assim, o processo autofágico pode proteger as células ou promover morte celular, depende do contexto em que se encontra (GONZALEZ et al., 2011). Em nosso estudo, a alta concentração de glicose promoveu diminuição na expressão de Beclin-1 em ND-BMDM, a Beclin-1 faz parte de um complexo que inicia a formação do autofagossoma para o processo autofágico. Uma menor expressão desta proteína pode indicar um menor processo autofágico quando esses ND-BMDM foram incubados com alta concentração de glicose, 25 e 40 mM, e LPS comparado aos ND-BMDMD mantidos em 5,5 mM e estimulados por LPS. Além disso, os D-BMDM expressaram maiores níveis de LC3b, proteína autofagossômica essencial para a formação do autofagossomo, e é também marcador da ocorrência de autofagia. Desregulações na via da autofagia estão associadas a doenças infecciosas (LEVINE, MIZUSHIMA, VIRGIN, 2011), sendo assim, alterações promovidas pela hiperglicemia, tanto em Beclin-1 como nos níveis LC3b, podem ter relação com uma resposta inadequada dos D-BMDM.

Os macrófagos são essenciais para promover e manter a resposta inflamatória em níveis necessários, quando há desregulação no reconhecimento de patógenos com consequente prejuízo na sinalização intracelular para secreção de citocinas, a eliminação dos patógenos é prejudicada (DAVIES et al., 2013). Desta forma, se BMDM provenientes de animais hiperglicêmicos apresentam alteração no receptor de reconhecimento do LPS, com alteração na sua via de sinalização e alteração no modo como a glicose é metabolizada, unindo o fato de que esses animais são caracterizados por excesso de glicose, é provável que o aumento basal da fosforilação em AKT assim como a diminuição nesta fosforilação devido alta concentração de glicose *in vitro* esteja envolvido na performance dos D-BMDM em realizar suas funções inflamatórias, já que esta proteína é central para a ativação de outras moléculas intracelulares envolvidas na inflamação, incluindo o aumento da expressão de GLUT1 para internalizar glicose (FREEMERMAN et al., 2014).

Ainda, com alterações na via da oxidação da glicose, esses D-BMDM possivelmente apresentam prejuízo no shift metabólico para suprir a demanda energética de uma resposta inflamatória, o que desregula, de uma maneira não linear, a síntese e secreção de citocinas e também de espécies reativas de oxigênio, mediador dependente das vias de oxidação da glicose (O'NEILL et al., 2015).

Através da análise dos nossos resultados, a glicose *per se* parece não ser capaz de estimular os macrófagos e promover a liberação de mediadores inflamatórios, pelo menos em curto período de tempo (até 48 horas). Após um longo período de tratamento (7 dias), a alta concentração de glicose *in vitro* promove redução na secreção de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β .

Esta diferença de comportamento entre BMDM de camundongos não diabéticos e diabéticos quando estimulados por LPS pressupõe que a hiperglicemia *in vivo* promove mudanças nos precursores de macrófagos. Após 10 dias em um ambiente hiperglicêmico e 7 dias de diferenciação do componente da medula óssea em uma condição normal de glicose, os D-BMDM ainda apresentavam um perfil inflamatório diferente.

Parece que essas células estão comprometidas desde sua origem na medula óssea, mas simplesmente não se encaixam em uma das classificações de macrófagos M1 ou M2. Este fato reforça a hipótese de que, em um estado hiperglicêmico, os precursores de macrófagos já estão comprometidos quando recrutados, e isso pode estar correlacionado com a alta suscetibilidade a infecções em indivíduos diabéticos. Assim, parece que o ND-BMDM são mais resistente a alterações desencadeadas pela hiperglicemia persistente em relação aos D-BMDM, sendo

necessária uma exposição prolongada para promover mudanças substanciais nos níveis de citocinas.

O mecanismo pelo qual a alta concentração de glicose *in vitro* altera a liberação de citocinas nos macrófagos peritoneais podem ser diferentes daqueles que promovem alterações nos BMDMs. Além disso, em curto período de tempo, a hiperglicemia já promove alterações nos MP, diferente dos BMDM, que sofreram a ação do excesso de glicose quando expostos à longos períodos de tempo. Os MP possuem uma resposta mais rápida frente a estímulos, além disso, são células coletadas do peritônio onde possivelmente estão em contato com uma maior diversidade de moléculas.

Dessa forma, a hiperglicemia interrompe muitas funções celulares que pode estar relacionada a um curto ou longo período de exposição (TESTA et al., 2017). Possivelmente o BMDM diabético já está de alguma forma comprometido e não pode suportar a alta concentração de glicose do microambiente para manter a função inflamatória regular, indicando o estabelecimento de uma “memória glicêmica”.

7. CONCLUSÕES

Concluimos que a alta concentração de glicose altera as vias inflamatórias e metabólicas em macrófagos estimulados por LPS. Visto a diferença dos macrófagos de animais saudáveis e diabéticos. Ainda, o excesso de glicose *per se* promove efeitos nos BMDM após um longo período de exposição (7 dias). Em macrófagos que possuem resposta rápida a estímulos, como os MP, a alta concentração de glicose promove efeitos em curto período de tempo (6 horas).

Não há um perfil de polarização definido nos D-BMDM, a hiperglicemia altera o perfil fenotípico dessas células, mas não pré-dispõe esses macrófagos a um perfil definido M1 ou M2.

A hiperglicemia induz a uma memória glicêmica, que prejudica a expressão do TLR4 assim como a sua via de sinalização principalmente via AKT, promovendo também alteração na liberação dos mediadores imunes, alterando o perfil de resposta inflamatória dos BMDM, assim como o perfil imunometabólico, podendo ser causa das repostas alteradas dos macrófagos à infecções em indivíduos hiperglicêmicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity, **Cell**, v. 124, p. 783-801, 2006.
- ALVES, C., CASQUEIRO, J., CASQUEIRO, J. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. **Indian J Endocr Metab**, v. 16, p. 189-195, 2012.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. v. 41, 2018.
- ANJOS-VALOTTA, E. A.; MARTINS, J. O.; OLIVEIRA, M. A.; CASOLARI, D. A.; BRITTO, L. R. G.; TOSTES, R. C.; FORTES, Z. B.; SANNOMIYA, P. Inhibition of tumor necrosis factor- α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression in diabetic rats: role of insulin. **Inflammation Research**, v. 55, p. 16-22, 2006.
- ARONOFF, S. L., BERKOWITS, K., SHREINER, B., WANT, L. Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon. **Diabetes Spectrum**, v. 17, p. 183-190, 2004.
- ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v.383, p. 69-82, 2014.
- ATKINSON, M. A.; MACLAREN, N. K. The pathogenesis of insulin dependent diabetes. **N Engl J Med**, v. 331, p. 1428-1436, 1994.
- AURON, P. E.; WEBB, A. C.; ROSENWASSER, L. J.; MUCCIT, S. F.; RIXH, A.; WOLFFO, S. M.; DINARELLO, A. C. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin-1 precursor cDNA. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 81, p. 7907-7911, 1984.
- AUSTYN, J. M.; GORDON, S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. **Eur J Immunol.**, v. 11, p. 805-815, 1981.
- BAGDADE, J. D.; WALTERS, E. Impaired granulocyte adherence in mildly diabetic patients. Effects of tolazamide treatment. **Diabetes**, v. 29, p. 309-311, 1980.
- BAIN, C. C.; HAWLEY, C. A.; GARNER, H.; *et al.* Long-lived self-renewing bone marrow-derived macrophages displace embryo-derived cells to inhabit adult serous cavities. **Nature Communications**, 2016.
- BANNER, D. W.; D'ARCY, A.; JANES, W.; *et al.*, Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. **Cell**, v. 73, p. 431-445, 1993.
- BANSAL, R.; AHMAD, N.; KIDWAI, J. R. Alloxan-glucose interaction: effect of incorporation of ¹⁴C-leucine into pancreatic islets of rats. **Acta Diabetol Lat**, v. 17, p. 135-143, 1980.
- BAUERFELD, C. P.; RASTOGI, R.; PIROCKINAITE, G.; *et al.* TLR4-mediated AKT activation is MyD88/TRIF dependent and critical for induction of oxidative phosphorylation and mitochondrial transcription factor A in murine macrophages. **J Immunol**, v. 15, p. 2847-2857, 2012.

BENFIELD, T., JENSEN, J. S., NORDESTGAAR, B. G., Influence of diabetes and hyperglycaemia on infectious disease hospitalization and outcome. **Diabetologia**. V. 50, p. 549-554, 2007.

BIRNBAUM, S.; FRANCHI, L.; NUNES, G.; LEE, L. I. Murine Macrophages Mitochondrial Transcription Factor A in Induction of Oxidative Phosphorylation and MyD88/TRIF Dependent and Critical for TLR4-Mediated AKT Activation. **J Immunol**, v. 188, p. 2847-2857, 2012.

BLAGIH, J.; JONES, R. G. Polarizing macrophages through reprogramming glucose metabolism, **Cell Press Metabolism**, v. 15, p. 793-795, 2012.

BLUM, S. K.; et al., An inhibitory role of the phosphatidylinositol 3-kinase-signaling pathway in vascular endothelial growth factor-induced tissue factor expression. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 33428-33434, 2001.

BODE, J. G.; EHLTING, C.; HAUSSINGER, D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38MAPK-STAT3 axis. **Cellular Signalling**, v. 24, p. 1185-1194, 2012.

BONIAKOWSKI, A. E., et al. Macrophage-Mediated Inflammation in Normal and Diabetic Wound Healing. **J Immunol**, v. 199, p. 17-24, 2017.

BONIZZU, G.; KARIN, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **Trends Immunol.** v. 25, p. 280-288, 2004.

BRADY, N. J.; CHUNTOVA, P.; SCHWERTFEGGER, K. L. Macrophages: regulators of the inflammatory microenvironment during mammary gland development and breast cancer. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 1-13, 2016.

BUCK, M. D.; SOWELL, R. T.; KAECH, S. M.; PEARCE, E. L. Metabolic Instruction of Immunity. **Cell**, v. 168, p. 570-586, 2017.

BYLES, V. et al. The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. **Nat. Commun.**, v. 4, p. 2834, 2013.

CALLIARI, L. E. P., NORONHA, R. M. Diabetes mellitus: fisiopatologia, diagnóstico e tratamento. In: **Damiani D. Endocrinologia na Prática Pediátrica**. São Paulo: Manole; 2016.

CAREY, B., TRAPNELL, B. C. The molecular basis of pulmonary alveolar proteinosis. **Clin. Immunol**, v. 135, p. 223-235, 2010.

CARMILY, Y.; VORONOV, E.; DOTAN, S.; LAHAT, N.; RAHAT, M. A.; FOGEL, M.; et al. The role of macrophage-derived IL-1 in induction and maintenance of angiogenesis. **J Immunol**, v. 183, p. 4705-4714, 2009.

CASTEJON, L. G. BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 22, p. 189-195, 2011.

CHAO, W.; SHEN, Y.; ZHU, X.; et al., Lipopolysaccharide Improves Cardiomyocyte Survival and Function after Serum Deprivation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 21997-22005, 2005.

- CHENG, C. L.; CHEN, P. H.; LIN, Y. C.; KAO, Y. H. High glucose activates Raw264.7 macrophages through RhoA kinase-mediated signaling pathway. **Cell Signal**, v. 27, p. 283-292, 2015.
- CHUNG, S. RANJAN, R. LEE, Y. G. *et al.*, Distinct role of FoxO1 in M-CSF- and GM-CSF-differentiated macrophages contributes LPS-mediated IL-10: implication in hyperglycemia. **J Leukoc Biology**, V. 97, P. 327-339, 2015.
- CONCANNON, P., RICH, S. S., NEPOM, G. T. Genetics of type 1A diabetes. **N Engl J Med**, v. 360, p. 1646-1654, 2009.
- COOPER, M. N., O'CONNELL, S. M., DAVIS, E. A., JONES T. W. A population-based study of risk factors for severe hypoglycaemia in a contemporary cohort of childhood-onset type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 56, p. 2164-2170, 2013.
- CORRALIZA, I. M., CAMPO, M. L.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. **J. Immunol. Methods**. v.14, p.174-231, 1994.
- COVARRUBIAS, A. J.; AKSOYLAR, H. I.; HORNG, T. Control of macrophage metabolism and activation by mTOR and AKT signaling. **Semin Immunol**, v. 27, p. 286-296, 2015.
- COVARRUBIAS, A. J.; AKSOYLAR, H. I.; YU, J.; *et al.* AKT-mTORC1 signalling regulates Acly to integrate metabolic input to control of macrophage activation. **Elife Research Article**, v.5, p. 1-19, 2016.
- CRITCHLEY, J. Diabetes and infection: assessing the association with glycaemic control in population based studies. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 4, p. 148-158, 2016.
- da SILVA, C. J., SOLDATU, K., CHRISTEN, U., TOBIAS, P. S., ULEVITCH,
- DANDONA, P.; GHANIM, H.; GREEN, K.; SIA, C. L.; ABUAYSHEH, S.; KUHADIYA, N.; BATRA, M.; DRINDSA, S.; CHAUDHURI. Insulin infusion suppresses while glucose infusion induces Toll-like receptors and high-mobility group-B1 protein expression in mononuclear cells of type 1 diabetes patients. *Endocrinology and Metabolism*. **American Journal of Physiology**, v. 304, p. 810-818, 2013.
- DASHTY, M. A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism. **Clinical Biochemistry**, v. 46, p. 1339-1352, 2013.
- DASU, M. R. DEVARAJ, S. JIALAL, I. High glucose induces IL-1 β expression in human monocytes: mechanistic insights. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 293, p. 337-346, 2007.
- DASU, M. R.; DEVARAJ, S.; ZHAO, L.; HWANG, D. H.; JIALAL, I. High glucose induces Toll-Like expression in human monocytes mechanism of activation. **Diabetes**, v. 57, p. 3090-3098, 2008.
- DAVIES, L. C. *et al.* A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage population after acute inflammation. **Eur. J. Immunol**. V. 41, p. 2155-2164, 2011.
- DAVIES, L. C.; JENKINS, S. J.; ALLEN, J. E.; TAYLOR, P. R. Tissue-resident macrophages. **Nature Immunology**, v. 14, p. 986-995, 2013.

de FRONZO R. A., DAVIDSON J. A., DEL P. S. The role of the kidneys in glucose homeostasis: a new path towards normalizing glycaemia. **Diabetes Obes Metab**, v. 14, p. 5-14, 2012.

DEVARAJ, S.; VENUGOPAL, S. K.; SINGH, U.; JIALAL, I. Hyperglycemia Induces Monocytic Release of Interleukin-6 via Induction of Protein Kinase C. **DIABETES**, v. 54, 2005.

DIAZ-GUERRA, M. J., CASTRILLO, A., MARTIN-SANZ, P., BOSCA, L. Negative regulation by phosphatidylinositol 3-kinase of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. **J Immunol**, v. 162, p. 6184-6190, 1999.

DISKIN, C.; McDERMOTT, E. P. Metabolic Modulation in Macrophage Effector Function. *Front, Immunol.* v. 19, 2018.

DOYLE, S. L.; O'NEILL, L. A. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. **Biochem. Pharmacol.** v.72, p. 1102–1113, 2006.

DUFRANE, D.; et al. Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/primates): role of GLUT2 transporter and beta-cell plasticity. **Transplantation**, v. 81, p. 36-45, 2006.

DUNN, J. D.; MCLEITCHIE, N. G. B. Experimental alloxan diabetes in the rat. **Lancet**, v. 245, p. 384-387, 1943.

DUQE, G. A.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases Guillermo. **Frontiers in Immunology**, v. 5. P. 1-12, 2014.

EDDIE, W. K.; HOSHI, N.; SHOUVAL, D. S.; SNAPPER, S.; MEDZHITOV, R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. **Sci.** v. 356, p. 513-519, 2017.

EISENBARTH, G. S. Update in type 1 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 92, p. 2403-2407, 2007.

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

ESPOSTI, M. D., NGO, A., MYERS, M. A. Inhibition of mitochondrial complex I may account for IDDM induced by intoxication with the rodenticide Vacor. **Diabetes**, v. 45, p. 1531-1534, 1996.

FAIRCHILD, T. J., ARMSTRONG, A. A., RAO, A., LIU, H., LAWRENCE, S., FOURNIER, P. A. Glycogen synthesis in muscle fibers during active recovery from intense exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 35, p. 595-602, 2003.

FANG, H.; et al., Lipopolysaccharide-Induced Macrophage Inflammatory Response Is Regulated by SHIP1. **J Immunol.**, v. 173, p. 360-366, 2004.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M.; ELLIOT, M.; *et al.*; TNF alpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis. **Circ Shock**, v. 43, p. 179-184, 1994.

FITZGERALD, K. A.; ROWE, D. C.; GOLENBOCK, D. T. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD-2 complex. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 1361-1367, 2004.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of Diabetic Complications, **Physiological Reviews**, v. 93, p. 137-188, 2013.

FOULIS, A. K., STEWART, J. A. The pancreas in recent-onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: insulin content of islets, insulinitis and associated changes in the exocrine acinar tissue. **Diabetologia**, v. 26, p. 456-461, 1984.

FREEMERMAN, A. J.; JOHNSON, A. R.; SACKS, G. N.; MILNER, J. J.; KIRK, E. L.; TROESTER, M. A.; MACINTYRE, A. N.; GORAKSHA-HICKS, P.; RATHMELL, J. C.; MAKOWSKI, L. Metabolic reprogramming on macrophages, glucose transporter1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. **J. Biol. Chem.** v. 289, p. 7884-7896, 2014.

FRONHOFFER, V.; LENNARTZ, M. R.; LOEGERING, D. J. Role of PKC isoforms in the Fc(gamma)R-mediated inhibition of LPS-stimulated IL-12 secretion by macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, p. 408-415, 2006.

FU, Z., GILBERT, E. R., LIU, D. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. **Curr Diabetes Rev**, v. 9, p. 25-53, 2013.

FUKUZUMI, M.; SHINOMIYA, H.; SHIMIZU, Y.; OHISHI, K.; UTSUMI, S. Endotoxin-induced enhancement of glucose influx into murine peritoneal macrophages via GLUT1. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 108-112, 1996.

GALE, E. A., BENNETT, T., GREEN, J. H., MACDONALD, I. A. Hypoglycaemia, hypothermia and shivering in man. **Clin Sci (Lond)**, v. 61, p. 463-469, 1981.

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

GIANANI, R., CAMPBELL-THOMPSON, M., SARKAR, S. A., et al. Dimorphic histopathology of long-standing childhood-onset diabetes. **Diabetologia**. v. 53, p. 690-698, 2010.

GLASGOW, A. M. Diabetes Mellitus. Clinic Pediatric Endocrinology. St

GLASS, C. K.; NATOLI, G. Molecular control of activation and priming in macrophages. **Nat. Immunol**, v. 17, p. 26-33, 2015.

GONZALEZ, Y.; HERRERA, M. T.; SOLDEVILA, G. *et al.*, High glucose concentrations induce TNF- α production through the down-regulation of CD33 in primary human monocytes. **BMC Immunology**, v. 19, p. 1-14, 2012.

GORDIN, D., et al. Acute hyperglycaemia induces an inflammatory response in young patients with type 1 diabetes. **Ann Med**, v. 40, p. 627-611, 2008.

GORDON, S. TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat. Ver. Immunol.**, v. 5, p. 953-964, 2005.

GRIFFIN, J. D.; LOWENBERG, B. Clonogenic cells in acute myeloblastic leucemia. **Blood**, v. 668, p. 1185-1195, 1986.

GRIFFIN, J. D.; LOWENBERG, B. Clonogenic cells in acute myeloblastic leucemia. **Blood**, v. 668, p. 1185-1195, 1986.

GUHA, M.; BAI, W.; NADLER, J. L.; NATAJARAN, R. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress-dependent and -independent pathways. **J Biol Chem**, v. 275, p. 17728-17739, 2000.

GUPTA, S.; KOIRALA, J.; KHARDORI, R.; KHARDORI, N. Infections in diabetes mellitus and hyperglycemia. **Infect Dis Clin North Am**, v. 21, p. 617-638, 2007.

HAGEMANN, T.; LAWRENCE, T.; McNEISH, I. "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappa B. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, p. 1261-1268, 2008.

HALLER, M. J., ATKINSON, M. A., SCHATZ, D. Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation, and management. **Pediatr Clin North Am**, v. 52, p. 1553-1578, 2005.

HARDIE, D. G., CARLING, D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? **Eur J. Biochem.**, p. 246-259, 1997.

HARRIS, J.; HARTMAN, M.; ROCHE, C.; *et al.* Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. **J Biol Chem**, v. 18, p. 9587-9597, 2011.

HAZEKI, K. NIGORIKAWA, K.; HAZEKI, O. Role of phosphoinositide 3-kinase in innate immunity. **Biol Pharm Bull**, v. 30, p. 1617-1623, 2007.

HERS, H. G. Mechanisms of blood glucose homeostasis. **J Inherit Metab Dis**, v. 13, p. 395-410, 1990.

HESSMAN, Y., THOREN, L. Glycogen storage in rat liver and skeletal muscle in thermal trauma. I. Effect of exogenous insulin. **Acta Chir Scand**, v. 141, p. 385-892.

HILL, J. R.; KWON, G.; MARSHALL, C. A.; MCDANIEL, M. L. Hyperglycemic Levels of Glucose Inhibit Interleukin 1 Release from RAW 264.7 Murine Macrophages by Activation of Protein Kinase C. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 3308-3313, 1998.

HOLMSTROM, K. M.; FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 15, p. 411-421, 2014.

HOTAMISLIGIL, G. S.; ARNER, P.; CARO, J. F.; ATKINSON, R. L.; SPIEGELMAN, B. M. Increased adipose tissue expression. Of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 95, p. 2409-2415, 1995.

HOWELL, J. J.; MANNING, B. D. mTOR couples cellular nutrient sensing to organismal metabolic homeostasis. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 22, p. 94-102, 2011.

HUA, K. F.; WANG, S.; DONG, W. C. High glucose increases nitric oxide generation in lipopolysaccharide-activated macrophages by enhancing activity of protein kinase C- α/δ and NF-kappa B. **Inflammation Research**, v. 61, p. 1107-1116, 2012.

INOKI, K.; ZHU, T.; GUAN, K. L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. **Cell**, v. 115, p. 577-590, 2003.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas, 7th edn. Brussels, Belgium: **International Diabetes Federation**, 2015.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas, 8th edn. **International Diabetes Federation**, 2015.

IVASHKIV, L. B. Inflammatory signaling in macrophages: Transitions from acute to tolerant and alternative activation states. **Eur J Immunol.**, v. 41, p. 2477-2481, 2011.

JAYARAMAN, P.; SADA-OVALLE, I.; NISHIMURA, T.; ANDERSON, A. C.; KYCGROO, V. K.; RELMON, H. G.; BEHAR, S. M. IL-1 β promotes antimicrobial immunity in macrophages by regulating TNFR signaling and caspase-3 activation. **J Immunol**, v. 190, p. 4196-4204, 2013.

KÄHLER, P., GREVSTAD, B., ALMDAL, T., GLUUD, C. Targeting intensive versus conventional glycaemic control for type 1 diabetes mellitus: a systematic review with meta-analyses and trial sequential analyses of randomised clinical trials. **BMJ**, v. 4, p. 1-21, 2014.

KANTER, J. E.; KRAMER, F.; BARNHART, S. *et al.* Diabetes promotes an inflammatory macrophage phenotype and atherosclerosis through acyl-CoA synthetase 1. **PNAS**, v. 17, p. 715-724, 2012.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Seminars in Immunology**, v. 19; p. 24-32, 2007.

KENNY, E. F.; O'NEIL, A. Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update. **Cytokine**, v. 43, p. 342-349, 2008.

KIM, J.I.; et al. Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 11347-11351, 2005.

KING, J. F. The use of animal models in diabetes research. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, p. 877-894, 2012.

KONTNY, E.; KUROWSA, M.; SZCZEPANSKA, K.; MASLINSKI, W. Rottlerin, a PKC isozyme-selective inhibitor, affects signaling events and cytokine production in human monocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 67, p. 249-259, 2000.

KORBECKI, J. BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; DUTOWSKAM U., CHLUBEK, D. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. **J Physiol Pharmacol**, v. 64, p. 409-421, 2013.

KOYASU, S. The role of PI3K in immune cells. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 313-319, 2003.

KRAUSGRUBER, T.; BLAZEK, K.; SMALLIE, T.; Irf5 promotes inflammatory macrophage polarization and th1/th17 response. **Rheumatology**, v. 50, p. 54-54, 2011.

KRAWCZYK, C. M. et al. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. **Blood**, v. 115, p.4742-4749, 2010.

KRISTIANSES, O. P.; POULSEN, T. M. Interleukin-6 and Diabetes The Good, the Bad, or the Indifferent?. **DIABETES**, v. 54, 2005.

KUMAR, H; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition in the innate immune response. **Biochemical Journal**, v. 420, p. 1-16, 2009a.

KUMAR, H; KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 388, p. 621-625, 2009b.

LACHMANDAS, E.; et al. The effect of hyperglycaemia on in vitro cytokine production and macrophage infection with mycobacterium tuberculosis. **Plos One**, v. 10, p. 1-13, 2015.

LAIRD, M. H., et al. TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling. **J Leukoc Biol**, v. 85, p. 966-977, 2009.

LAMERS, M. L. ALMEIDA, M. S.; VICENTE-MANZANARES, M.; HORWITZ, A. F.; SANTOS, M. F. High glucose-mediated oxidative stress impairs cell migration. **Plos One**, v. 6, p. 1-6, 2011.

LANGSTON, P. K.; SHIBATA, M. HORNG, T. Metabolism Supports Macrophage Activation. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1-7, 2017.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, v. 149, p. 274- 293, 212.

LAWRENCE, T., GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **Int J Exp Pathol**, v. 88, p. 85-94, 2007.

LEE, J. Y.; YE, J.; GAO, Z., YOUN, H. S.; LEE, W. H.; ZHAO, L.; SIZEMORE, N.; HWANG, D. H. Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 37041-37051, 2003.

LEE, Y. G.; LEE, J.; BYEON, S. E.; YOO, D. S.; KIM, M. H.; LEE, S. Y.; CHO, J. Y. **Front Biosci**, v. 16, p. 517-530, 2011.

LEE, Y. S.; WOLLAM, J.; OLEFSKY, J. M. An Integrated View of Immunometabolism. **Cell**, v. 172, p. 22-40, 2018.

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

LEVINE, B.; MIZUSHIMA, N.; VIRGIN, H. W. Autophagy in immunity and inflammation. **Nature**, v. 469, p. 323-335, 2011.

LI, L; COUSART, S.; HU, J.; McCALL, C. E. Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 23340-23345, 2000.

LI, M.; LIN, D.; LIN, Y.; PENG, W. Extracellular polysaccharide from Bordetella species reduces high glucose-induced macrophage apoptosis via regulating interaction between caveolin-1 and TLR4. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 466, p. 748-754, 2015.

- LI, S.; STRELOW, A.; FONTANA, E. J.; WESCHE, H. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 5567-5572, 2002.
- LIEW, F. Y.; XU, D.; BRINT, E. K. O'NEIL, L. A. J. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 446-458, 2005.
- LO, C. J. Upregulation of cyclooxygenase-II gene and PGE(2) production of peritoneal macrophages in diabetic rats. **Journal of Surgical Research**, v. 125, p. 121-127, 2005.
- LOEGERING, D. J.; LENNARTZ, M. Protein Kinase C and Toll-Like Receptor Signaling. **Enzyme Res.**, v. 2011, p. 1-7, 2011.
- LOMBARDO, E.; ALVARES-BARRIENTOS, A.; MAROTO, B.; BOSCA, L.; KNAUS, U. G. TLR4-mediated survival of macrophages is MyD88 dependent and requires TNF-alpha autocrine signalling. **J. Immunol.**, v. 178, p. 3731-3739, 2007.
- LU, Y. C.; YEH, W. C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, p. 145-155, 2008.
- LUOPAJÄRVI, K., SAVILAHTI, E., VIRTANEN, S. M., ILONEN J., KNIP, M., AKERBLUM, H. K., VAARALA, O. Enhanced levels of cow's milk antibodies in infancy in children who develop type 1 diabetes later in childhood. **Pediatr Diabetes**, v. 9, p. 434-441, 2008.
- MACDONALD, P. E., JOSEPH, J. W., RORSMAN, P. Glucose-sensing mechanisms in pancreatic β -cells. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 360, p. 2211-2225, 2005.
- MANTEGAZZA, A. R.; MAGALHAES, J. G.; AMIGORENA, S.; MARKS, M. S. Presentation of Phagocytosed Antigens by MHC Class I and II. **Traffic**, v. 14, p. 135-152, 2013.
- MANTOVANI, A. From phagocyte diversity and activation to probiotics: Back to Metchnikoff. **European Journal of Immunology**, v. 38, p. 3269-3273, 2008.
- MARIM, F. M.; SILVEIRA, T. N.; LIMA Jr, D. S.; ZAMBONI, D. S. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **Plos One**, v. 5, p. 1-8, 2010.
- MARTINEZ, F. O., HELMING, L., GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu Rev Immunol.** v. 27, p. 451-483, 2009.
- MARTINS, J. O.; FERRACINI, M.; RAVANELLI, N.; LANDGRAF, R. G.; JANCAR, S. Insulin inhibits LPS-induced signaling pathways in alveolar macrophages. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 21, p. 297-304, 2008a.
- MARTINS, J. O.; FERRACINI, M.; RAVANELLI, N.; LANDGRAF, R.G.; JANCAR, S. Insulin Suppresses LPS-Induced iNOS and COX-2 Expression and NF-kB Activation In Alveolar Macrophages. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 22, p. 279-286, 2008b.
- MATTHEWS V. B.; ALLEN T. L.; RISIS S.; CHAN M. H. S.; HENSTRIDGE D. C.; WATSON N.; *et al.* Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. **Diabetologia**, v. 53, p. 2431-2441, 2010.

- MATTHEWS, V. B.; ALLEN, T. L.; RISIS, S.; *et al.*, , Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. **Diabetologia.**, v. 53, p. 2431-2441, 2010.
- MATZINGER, P. An innate sense of danger. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 961, p. 341-342, 2002.
- MAUER, J.; CHAURASIA, B.; GOLDAU, J. *et al.* Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. **Nat Immunol**, v. 15, p. 423-430, 2014.
- MEDZHITOV, R.; HORNG, T. Transcriptional control of the inflammatory response. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 691-703, 2009.
- MELLENDEZ-RAMIREZ, L. Y., RICHARDS, R. J., CEFALU, W. T. Complications of type 1 diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 39, p. 625-640, 2010.
- MELOCHE, S. Cell cycle reentry of mammalian fibroblasts is accompanied by the sustained activation of p44mapk and p42mapk isoforms in the G1 phase and their inactivation at the G1/S transition. **J Cell Physiol.**, v. 163, p. 986-995, 1995.
- MILLS, E. L. *et al.* Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. **Cell**, v. 167, p. 457-470, 2016.
- MOORE, K. W.; MALEFYT, R. W.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Ann. Rev. Immunol.** V. 19, p. 683, 2001.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol.**, v. 8, p. 958-969, 2008.
- MUNDER, M.; *et al.* Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4⁺ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. **J. Immunol**, v. 160, p. 5347–5354, 1998.
- MURRAY, P.; *et al.* Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, v. 41, p. 14-20, 2014.
- NAGY, C.; HASCHEMI, A. Time and demand are two critical dimensions of immunometabolism: the process of macrophage activation and the pentose phosphate pathway. **Front. Immunol.**, v. 6, p. 164, 2015.
- NANDY, D.; JANARDHANAN, R.; MUKHOPADHYAY, D.; BASU, A. Effect of Hyperglycemia on Human Monocyte Activation. **J Investig Med.**, v. 59, p. 661-667, 2011.
- NEEFJES, J.; JONGSMA, M. L. M.; PAUL, P.; BAKKE, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation, **Nature Review Immunology**, v. 11, p. 823-836, 2011.
- NEWTON, A. C. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. **Biochemical Journal**, v. 370, p. 361-371, 2003.
- NISHIMOTO N, KISHIMOTO T. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. **Curr Opin Pharmacol**, v.4, p. 386–91, 2004.

- NOVOSELOVA, E. G.; GLUSHKOVA, O. V.; LUNIN, S. M.; KHRENOV, M. O.; NOVOSELOVA, T. V.; PARFENYUK, S. B.; FESENKO, E. E. Signaling, stress response and apoptosis in pre-diabetes and diabetes: restoring immune balance in mice with alloxan-induced type 1 diabetes mellitus. **International Immunopharmacology**, v. 31, p. 24-31, 2016.
- NUNES, F. P. B. ; SAMPAIO, S. C.; SANTORO, M. L. ; SOUZA-e-SILVA, M. C. C. S. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. **Toxicon**, v. 49, p. 1090-1098, 2007.
- O'NEILL, K. A. J.; PEARCE, E. J. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. **JEM**, v. 213, p. 15-23, 2015.
- O'NEILL, L. A. J.; KISHTON, R. J.; RATHMELL, J. A guide to immunometabolism for immunologists. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 553-565, 2016.
- O'NEILL, L. A.; HARDIE, D. G. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. **Nature**, v. 493, p. 346-355, 2013.
- OHNO Y.; AOKI N.; NISHIMURA A. In vitro production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in insulin-dependent diabetes mellitus. **Clin Endocrinol Metab.**, v. 77, p. 1072-1077, 1993.
- ORCHARD, T. J., COSTACOU, T., KRETOWSKI, A., NESTO, R. W. Type 1 diabetes and coronary artery disease. **Diabetes Care**, v. 29, p. 2528-2538, 2006.
- OSBORN, O.; OLEFSKY, J. M.; The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. **Nat Med**, v. 18, p. 363-374, 2012.
- PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. **Crit Rev Eukaryot Gene**, v. 20, p. 87-103, 2010.
- PAVLOU, S.; LINDSAY, J.; INGRAM, R.; XU, H.; CHEN, M. Sustained high glucose exposure sensitizes macrophage responses to cytokine stimuli but reduces their phagocytic activity. **BMC Immunology**, p. 19-24, 2018.
- PEARCE, E.L.; PEARCE, E. J. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. **Immunity**, v. 38, p. 633– 643, 2013.
- PEARSON-STUTTARD, J., BLUNDELL, S., HARRIS, T., COOK, D. G.,
- PELEG, A. Y., WEERARATHNA, T., MCCARTHY, J. S., DAVIS, T. M. E. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 23, p. 3-13, 2007.
- PILLAY T. S.; XIAO S.; OLEFSKY J. M. Glucose-induced phosphorylation of the insulin receptor. Functional effects and characterization of phosphorylation sites. **J Clin Invest.**, v. 97, p. 613-620, 1996.
- PLÓCIENNIKOWSKA, A.; HROMADA-JUDYCKA, A.; BORZECKA, K.; KWIATKOWSKA, K. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 72, p. 557-581, 2015.

PLÓCIENNIKOWSKA, A.; HROMADA-JUDYCKA, A.; BORZECKA, K.; KWIATKOWSKA, K. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci.*, v. 72, p. 557-581, 2014.

POOLE, A. W.; PULA, G.; HERS, I.; CROSBY, D.; JONES, M. L. PKC-interacting proteins: From function to pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 25, p. 528-535, 2004.

PRESTON, A. M. Modification of streptozotocin-induced diabetes by protective agents. *Nutr Res*, v. 5, p435-446, 1985.

PYO, J. O.; et al. Essential roles of atg5 and FADD in autophagic cell death: Dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *J Biol Chem*, v. 2080, p. 207222-20729, 2007.

QADAN, M.; WELLER, E. B.; GARNER, S. A.; MALDONADO, C.; FRY, D. E.; POLK Jr, H. C. Glucose and surgical sepsis: a study of underlying immunologic mechanisms. *Journal American College of Surgeons*, v. 210, p. 966-974, 2010.

R. J. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem*, v. 276, p. 21129-21135, 2001.

RASSIAS, A. J.; MARRIN, C. A.; ARRUDA, J.; WHALEN, P. K.; BEACH, M.; YAGER, M. P. Insulin infusion improves neutrophil function in diabetic cardiac surgery patients. *Anesthesia and Analgesia*, v. 88, p. 1011-1016, 1999.

RE, F., STROMINGER, J. L. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 37692-37699, 2001.

REWERS, M.J., et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. Assessment and monitoring of glycemic control in children and adolescents

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc.*, v. 1, p. 1458-1461, 2006.

RICHES, D. W.; CHAN, E. D.; WINTSON, B. W. Tnf-alpha-induced regulation and signaling in macrophages. *Immunobiology*, v. 195, p. 477-490, 1996.

RISS, T. L.; et al. Cell Viability assays. *Assay Guidance Manual*, 2004.

RODRIGUEZ-PRADOS, J. C. et al. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic and alternative activation. *J. Immunol.* v. 185, p. 605-614, 2010.

ROSS, D. D.; JONECKIS, C. C. ORDONEZ, J. V.; et al. Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide viable cell number. *Cancer Res.*, v. 49, p. 3776-3782, 1989.

SABAUSTE, C. S.; WAAL MALEFYT, R.; FUH, F. Role of CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) in the immune response to an intracellular pathogen. *J Immunol.*, v. 160, p. 1831-1840, 1998.

SAG, D.; CARLING, D. AMP-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. v. 15, p. 8633-8641, 2008.

SAIEPOUR, D.; SEHLIN, J.; OLDENBORG, P. A. hyperglycemia-induced Protein kinase c activation inhibits phagocytosis of c3b- and immunoglobulin g-opsonized yeast particles in normal human neutrophils. **Experimental Diab. Res.**, v. 4, p. 425-435, 2003.

SCHAEFFER, V.; et al. Role of the mTOR pathway in LPS-activated monocytes: influence of hypertonic saline. **J Surg Res**, v. 171, p. 769-776, 2011.

SCHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, p. 878-888, 2011.

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

SHANMUGAM, N.; REDDY, M. A.; GUHA, M.; NATAJARAN, R. High Glucose-Induced Expression of Proinflammatory Cytokine and Chemokine Genes in Monocytic Cells. **Diabetes**, v. 52, p. 1256-1264, 2003.

SHEPPERD, P. R.; NAVE, B. T.; RINCON, J.; HAIGH, R. J.; FOULSTONE, E.; PROUD, C.; ZIERATH, J. R.; SIDDLE, K.; WALLBERG-HENRIKSSON, H. Involvement of phosphoinositide 3-kinase in insulin stimulation of MAP-kinase and phosphorylation of protein kinase-B in human skeletal muscle: implications for glucose metabolism. **Diabetologia**. v. 40, p. 1171-1177, 1997.

SHERRY, C. L.; O'CONNOR, J. C.; KRAMER, J. M.; FREUND, G. G. Augmented lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production by peritoneal macrophages in type 2 diabetic mice is dependent on elevated glucose and requires p38 MAPK. **J Immunol**, v. 178, p.663-670, 2007.

SHILLING, A. M.; RAPHAEL, J. Diabetes, hyperglycemia, and infections. **Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology**. v. 22, p. 519-535, 2008.

SICA, A., MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **J Clin Invest**, v. 122, p. 787-795, 2012.

SIMONSEN, J. R., et al. Bacterial infections in patients with type 1 diabetes: a 14-year follow-up. **BMJ Open Diabetes Research and Care**, v. 3, 2014.

SO, L.; FRUMAN, D. A.; PI3K signalling in B- and T-lymphocytes: new developments and therapeutic advances. **Biochem**, v. 442, p. 465-481, 2012.

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

SONG, P.; WU, Y.; XU, J.; XIE, Z.; DONG, Y.; ZHANG, D. M.; ZOU, M. H. Reactive nitrogen species induced by hyperglycemia suppresses AKT signaling and triggers apoptosis by upregulating phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) in a LKB1-dependent manner. **Journal of the American Heart Association**. v. 116, p. 1585-1595, 2007.

SOUZA, L. F.; BARRETO, F.; da SILVA, E. G.; ANDRADES, M. E.; GUIMARÃES, E. L. M.; BEHR, G. A.; MOREIRA, J. C. F.; BERNARD, E. A. Regulation of LPS stimulated ROS

production in peritoneal macrophages from alloxan-induced diabetic rats: Involvement of high glucose and PPAR γ , **Life Sciences**, p. 153-159, 2007.

SPERLING, M. A. Diabetes Mellitus. **Peditric endocrinology**. 2^o edição, p. 323-366, 2002.

SPILLER, F.; CARLOS, D.; SOUTO, F. O.; de FREITAS, A.; SOARES, F. S.; VIEIRA, S. M.; PAULA, F. J.; ALVES-FILHO, J. C.; CUNHA, F. Q. α 1-Acid Glycoprotein decreases neutrophil migration and decreases susceptibility to sepsis in diabetic mice. **Diabetes**, v. 61, p. 1584-1591, 2012.

STUTTARD, P. J., BLUNDELL, S., HARRIS, T., COOK, D. G., CRITCHLEY, J. Diabetes and infection: assessing the association with glycaemic control in population based studies. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 4, p. 148-158, 2016.

SUN, C; SUN, L; MA, H; PENG, J; ZHEN, Y; DUAN, K; LIU, G; DING, W; ZHAO, Y. The Phenotype and Functional Alterations of Macrophages in Mice with Hyperglycemia for Long Term. **Journal of Cellular Physiology**. v. 227, p. 1670-1679, 2012.

SWANTEK, J. L.; COBB, M. H.; GEPPERT, T. D. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. **Mol Cell Biol.**, v. 17, p. 6274-6282, 1997.

SWEET, M. J.; HUME, D. A. Endotoxin signal transduction in macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 60, p. 8-26, 1996.

TARGHER, G., et al. Increased plasma markers of inflammation and endothelial dysfunction and their association with microvascular complications in Type 1 diabetic patients without clinically manifest macroangiopathy. **Diabetic Med**, v. 22, p. 999-1004, 2005.

TESSARO, F. H. G. Ação da insulina na liberação de citocinas por macrófagos residentes de camundongos diabéticos estimulados com lipopolissacarídeo. 19 de setembro de 2014. p. 64. **Dissertação de mestrado**. Universidade de São Paulo, 2014.

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

TESTA, R.; et al. The “Metabolic Memory” Theory and the Early Treatment of Hyperglycemia in Prevention of Diabetic Complications. **Nutrients**, v. 9, p. 1-9, 2017.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. **N Engl J Med**. v. 353, p. 2643-2653, 2005.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med**. v. 86, p. 329-977, 1993.

TSCHOPP, J.; SCHRODER, K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? **Nat Rev Immunol.**, v. 10, p. 210-215, 2010.

TURINA, M.; FRY, D.; POLK, H. C. Acute hyperglycemia and innate immune system: clinical, cellular and molecular aspects. **Crit Care Med.**, v. 337, p. 1624-1633, 2005.

TURINA, M.; MILLER, F. N.; TUCKER, C.; POLK, H. C. Effects of hyperglycemia, hyperinsulinemia, and hyperosmolality on neutrophil apoptosis. **Surgical Infections**, v. 7, p. 111-121, 2006a.

TURINA, M.; MILLER, F. N.; TUCKER, C.; POLK, H. C. Short-term hyperglycemia in surgical patients and a study of related cellular mechanisms. **Annals of Surgery**, v. 243, p. 845-851, 2006b.

VAN BELLE, T. L.; TAYLOR, P.; VOHNERRATH, M. G. Mouse model for type 1 diabetes. **Drug Discovery Today Dis Models**, v. 6, p. 41-45, 2009.

VAN DER WERF, N.; KROESE, F. G.; ROZING, J.; HILLEBRANDS, J. L. Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 23, p. 169-183, 2007.

VELD, P. I. Insulinitis in human type 1 diabetes: the quest for an elusive lesion. **Islets**, v. 3, p. 131-138, 2011.

WALRAND, S.; GUILLET, C.; BOIRIE, Y.; VASSON, M. P. In vivo evidences that insulin regulates human polymorphonuclear neutrophil functions. **J Leukoc Biol.**, v. 76, p. 1104-1110, 2004.

WANG, C., et al. The ϵ 3 ubiquitin ligase Nrdp1 'preferentially' promotes TLR-mediated production of type I interferon. **Nat. Immunol.**, v. 10, p. 744-752, 2009.

WANG, C.; DENG, L.; HONG, M.; AKKARAJU, G. R.; INOUE, J.; CHEN, Z. J. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. **Nature**, v. 412, p. 346-351, 2001.

WANG, C.; ZHANG, X.; TENG, Z.; ZHANG, T.; LI, Y. Downregulation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in curcumin-induced autophagy in APP/PS1 double transgenic mice. **Eur J Pharmacol**, v. 740, p. 312-320, 2014.

WANG, Z. J.; ZHANG, F. M.; WANG, L. S.; *et al.* Lipopolysaccharides can protect mesenchymal stem cells (MSCs) from oxidative stress-induced apoptosis and enhance proliferation of MSCs via Toll-like receptor (TLR)-4 and PI3K/AKT. **Cell Biol.** v. 33, p. 665-674, 2006.

WEI, Y.; CHEN, K.; WHALEY-CONNEL, A. T.; STUMP, C. S.; IBDH, J. A.; SOWERS, J. R. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. **International Immunopharmacology**, v. 31, p. 24-31, 2007.

WEISS, R. B. Streptozocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. **Cancer Treat Rep**, v. 66, p. 427-438, 1982.

WILCOX, A.; RICHARDSON, S. J.; BONE, A. J.; FOULIS, A. K.; MORGAN, N. G., Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. **Clin Exp Immunol**, v. 155, p. 173-81, 2009.

WYNN T. A.; CHAWLA A.; POLLARD JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v. 496, p. 445-455, 2013.

XIU, F.; STANOJCIC, M.; DIAO, L.; JESSCHKE, M. G. Stress hyperglycemia, insulin treatment, and innate immune cells. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

XU, X.; QI, X.; SHA, Y.; *et al.* High glucose induced-macrophage activation through TGF- β -activated kinase 1 signaling pathway. **Inflammation Research**, v. 65, p. 655-664, 2016.

YAMASAWA, H.; NAKAYAMA, M.; BANDO, M.; SUGIYAMA, Y. Impaired inflammatory responses to multiple Toll-like receptor ligands in alveolar macrophages of streptozotocin-induced diabetic mice. **Inflamm. Res.** V. 61, p. 417-426, 2012.

YARILINA, A.; PARK-MIN, K. H.; ANTONIY, T.; *et al.* TNF activates an IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1-dependent type I interferon-response genes. **Nat Immunology**, v. 9, p. 378-387, 2008.

YOU, W. P., HENNEBERG, M. Type 1 diabetes prevalence increasing globally and regionally: the role of natural selection and life expectancy at birth. **BMJ Open Diabetes Research and Care**, v. 4, p. 1-7, 2016.

ZHANG, X.; MOSSER, D. M. Macrophage activation by endogenous danger signals. **J. Pathol.**, v. 214, p. 161-178, 2008.

ZHANG, Y.; PILON, G.; MARRETE, A.; BARACOS, V. E. Cytokines and endotoxin induce cytokine receptors in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 279, p. 196-205, 2005.

ANEXOS

Anexo 1



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF 9.2015-P488

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa **"Efeito da hiperglicemia na ativação das vias de sinalização dos macrófagos residentes de animais diabéticos e não diabéticos"** (Protocolo CEUA/FCF/488), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Thais Soprani Ayala**, sob orientação do(a) **Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de **6 de fevereiro de 2015**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 10 de fevereiro de 2015.


Prof. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto
Vice-Coordenadora da CEUA/FCF/USP



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



Ofício CEUA/FCF 095.2018

São Paulo, 05 de outubro de 2018.

Prezada Senhora,

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), em reunião realizada em 02 de outubro de 2018, aprovou as alterações propostas para o projeto de pesquisa "Efeito da hiperglicemia na ativação das vias de sinalização dos macrófagos residentes de animais diabéticos e não diabéticos" (Protocolo CEUA nº 488), conforme constante nos documentos apresentados:

- a. Alteração do título do projeto para **"A hiperglicemia altera o perfil inflamatório e imunometabólico de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos"**.
- b. Prorrogação da data de término para **30/06/2019**.
- c. A realização de 5 novas técnicas com a quantidade restante de animais (36), sendo elas: dosagem de lactato, mensuração do consumo de oxigênio dos macrófagos plaqueados, fagocitose por hemácia opsonizada, dosagem de glicose no sobrenadante da cultura celular e atividade da arginase
- d. A realização de um novo tempo de incubação de 7 dias para dosar citocinas.
- e. A inclusão de novas concentrações de tratamento de glicose *in vitro*, para 5,5, 25 e 40 mM de glicose.

Cordialmente,

Prof. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto
 Coordenadora CEUA/FCF/USP

Iima, Sra.
 Pesquisadora: Thais Soprani Ayala
 Orientador: Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
 FBC/FCF/USP

10/01/2019

SISAD - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



**Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9142 - 9055050/1 - Thais Soprani Ayala

Email: thaissoprani@usp.br
Data de Nascimento: 27/06/1991
Cédula de Identidade: RG - 8.538.259-4 - PR
Local de Nascimento: Estado do Paraná
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmácia - Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Paraná - Brasil - 2014

Curso: Doutorado Direto
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Fisiopatologia
Data de Matrícula: 09/02/2015
Início da Contagem de Prazo: 09/02/2015
Data Limite para o Depósito: 10/06/2019
Orientador: Prof(a). Dr(a). Jolison de Oliveira Martins - 10/08/2016 até o presente. Email: martinsj@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 09/02/2015
Prorrogação(ões): 120 dias
 Período de 09/02/2019 até 09/06/2019
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 22/09/2016
Estágio no Exterior: Karolinska Institutet, Suécia - Período de 01/10/2016 até 30/09/2017
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 09/02/2015
 Prorrogação em 12/09/2018

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

Última ocorrência: Prorrogação em 12/09/2018

Impresso em: 10/01/2019 15:24:39

10/01/2019

FAPS - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9142 - 9055050/1 - Thais Soprani Ayala

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5792-3/2	Tópicos em Análises Clínicas III	03/03/2015	16/06/2015	15	1	100	A	N	Concluída
BMP5773-3/1	Bases Imunológicas da Relação Parasita-Hospedeiro (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/03/2015	29/04/2015	120	8	93	A	N	Concluída
MCM5772-7/1	Temas Básicos de Imunologia (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	06/04/2015	03/05/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5734-3/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	03/08/2015	09/08/2015	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5766-4/2	Tópicos em Análises Clínicas IV	04/08/2015	16/11/2015	15	1	90	A	N	Concluída
BTC5743-3/4	Seminários Gerais (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	12/08/2015	24/11/2015	30	2	85	B	N	Concluída
FBC5722-2/4	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	19/10/2015	08/11/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5793-12/3	Tópicos em Análises Clínicas I	08/03/2016	20/06/2016	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5748-4/2	Trabalhos Científicos: da Elaboração a Publicação	05/04/2016	17/05/2016	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5757-8/2	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	02/08/2018	14/11/2018	15	1	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	25	28
Estágios:			
Total:	0	25	28

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Prorrogação em 12/09/2018

Impresso em: 10/01/2019 15:24:39



Thais Soprani Ayala

Bolsista de Doutorado do CNPq

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/5576750114963342>

Última atualização do currículo em 25/01/2019

Farmacêutica pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) (2010-2014). Doutoranda na Universidade de São Paulo na Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Área de Fisiopatologia, no Laboratório de Imunoendocrinologia. Em 2017 realizou 1 ano de estágio Doutorado Sanduíche no Instituto Karolinska, trabalhando com células de linhagem, biologia molecular, ensaios imunológicos, microscopia entre outras atividades de pesquisa laboratorial. Experiência em pesquisa, principalmente nas áreas de imunologia, bioquímica, microbiologia e biologia molecular. Atualmente trabalha com diferentes tipos de macrófagos e modelo animal de diabetes mellitus do tipo 1. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Thais Soprani Ayala
Nome em citações bibliográficas	AYALA, T. S.; AYALA, THAIS SOPRANI; THAIS S. AYALA; AYALA, THAIS S.

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2015	Doutorado em andamento em Ciências Farmacêuticas (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. com período sanduíche em Karolinska Institutet (Orientador: Christopher Barker-Per-Olof Berggren). Título: A Hiperglicemia Altera o Perfil Inflamatório e Imunometabólico de Macrófagos Derivados de Medula Óssea de Camundongos, Orientador:  Joilson de Oliveira Martins. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Palavras-chave: Imunoendocrinologia; Imunologia; macrófagos; Hiperglicemia. Grande área: Ciências Biológicas Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Farmacologia. Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico.
2010 - 2014	Graduação em Farmácia. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Brasil. Título: Produção de anticorpos anti-polissacarídeos fúngicos em modelo animal. Orientador: Rafael Andrade Menolli.

Formação Complementar

2018 - 2018	PRE COURSE - HOW TO STUDY IMMUNOMETABOLISM. (Carga horária: 4h). Sociedade Brasileira de Imunologia, SBI, Brasil.
2017 - 2017	Radiation safety for laboratory work. (Carga horária: 2h). Karolinska Institutet, KI, Suécia.
2015 - 2016	Extensão universitária em Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2015 - 2015	Células Tronco e Terapia Celular. (Carga horária: 4h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2014 - 2014	I Curso de Férias em Imunologia. (Carga horária: 47h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2014 - 2014	III Curso de Verão em Farmacologia. (Carga horária: 60h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2013 - 2013	Anemia- Casos Clínicos. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Brasil.

2013 - 2013	Gestão empresarial/ da Ind. Farmacêutica. (Carga horária: 80h). Prati-Donaduzzi, PRATI-DONADUZZI, Brasil.
2012 - 2012	Introdução à análise proteômica. (Carga horária: 12h). Universidade Federal do Paraná, UFPR, Brasil.
2012 - 2012	III Curso de Inverno e Biomol. Universidade Federal do Paraná, UFPR, Brasil.
2012 - 2012	Idioma: Alemão. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Brasil.
2012 - 2012	Estágio Observatório. (Carga horária: 29h). Instituto Butantan, IBU, Brasil.
2010 - 2010	Análise Forense de DNA. (Carga horária: 8h). Renova Cursos, R.C, Brasil.
2007 - 2007	English Language Study. Oxford Study Centre, ISIS, Inglaterra.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2015 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Doutoranda

Vínculo institucional

2016 - 2016

Outras informações

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 6
Monitora da disciplina de Imunodiagnóstico, Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino-PAE.

Vínculo institucional

2014 - 2014

Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 30

Vínculo institucional

2013 - 2014

Vínculo: Estágio voluntário, Enquadramento Funcional: Estagiário

Atividades

02/2015 - Atual

Pesquisa e desenvolvimento , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .
Linhas de pesquisa
Imunoendocrinologia
Farmacologia
Imunologia

Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Brasil.

Vínculo institucional

2013 - 2014

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluno de iniciação científica, Carga horária: 20

Vínculo institucional

2011 - 2012

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluno de iniciação científica, Carga horária: 20

Karolinska Institutet, KI, Suécia.

Vínculo institucional

2016 - 2018

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Visiting PhD Student, Carga horária: 40,
Regime: Dedicção exclusiva.

Linhas de pesquisa

1.	Imunoendocrinologia
2.	Farmacologia
3.	Imunologia

Projetos de pesquisa

2015 - Atual

Efeito da hiperglicemia na ativação das vias de sinalização de macrófagos residentes de animais diabéticos e não diabéticos
Descrição: Avaliar o efeito da hiperglicemia no metabolismo de macrófagos de medula óssea, macrófagos alveolares e macrófagos peritoneais coletados de animais diabéticos e não diabéticos..
Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Doutorado: (2) .

2014 - Atual

Integrantes: Thais Soprani Ayala - Integrante / Fernando Henrique Galvão Tessaro - Integrante / Joilson de Oliveira Martins - Coordenador.

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa. Efeito da insulina nas vias de sinalização induzidas por LPS em macrófagos alveolares de camundongos diabéticos

Descrição: Indivíduos diabéticos ou com hiperglicemia apresentam incidência elevada de doenças infecciosas. Isto pode estar relacionado a alterações da capacidade de resposta aos agentes agressores destes indivíduos. Em animais diabéticos, algumas destas alterações já foram descritas, assim como sua reversão pela administração de insulina exógena. A insulina regula o metabolismo celular modulando a atividade de proteínas envolvidas na sinalização intracelular. Nós encontramos recentemente que o lipopolissacarídeo (LPS) estimula em macrófagos alveolares (MAS) de animais não-diabéticos as vias de sinalização intracelular MAPK, PKC, PI3K e NF-κB e induz a expressão de iNOS e COX-2 e que o pré-tratamento dos MAS com insulina inibiu todos estes efeitos do LPS. Neste projeto pretendemos ampliar este estudo, agora utilizando MAS de animais diabéticos.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Doutorado: (2) .

Integrantes: Thais Soprani Ayala - Integrante / Fernando Henrique Galvão Tessaro - Integrante / Joilson de Oliveira Martins - Coordenador.

2013 - 2014

Número de produções C, T & A: 2

Avaliação dos efeitos de polissacarídeos extraídos de fungos sobre macrófagos peritoneais de camundongos.

Descrição: Observar e descrever a possível atividade imunoestimulante ou imunodepressória de polissacarídeos obtidos a partir de fungos ambientais, *Curvularia brachyspora*, *Paecilomyces variotti* e *Aspergillus terreus*.

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Doutorado: (1) .

Integrantes: Thais Soprani Ayala - Integrante / Rafael Andrade Menolli - Coordenador.

Financiador(es): Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa.

Número de produções C, T & A: 1

Produção de anticorpos anti-polissacarídeos fúngicos em modelo animal

Descrição: Os fungos são responsáveis por uma variedade de doenças, atingindo tanto animais quanto humanos, podendo ser desde uma manifestação pulmonar aguda auto-limitada e lesões cutâneas em indivíduos com o sistema imune intacto (imunocompetentes) a doenças inflamatórias e infecções severas em pacientes com algum comprometimento do sistema imune (imunocomprometidos). Essas infecções ainda representam uma séria ameaça, particularmente em pacientes com algum comprometimento imune. Um diagnóstico precoce com a rápida introdução da terapia antifúngica é essencial para melhorar o prognóstico de pacientes com infecções fúngicas sistêmicas, e infecções fúngicas invasivas. Objetivo: verificar a presença de anticorpos anti-polissacarídeos fúngicos em um animal imunizado pelo EPS deste fungo.

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Doutorado: (1) .

Integrantes: Thais Soprani Ayala - Integrante / Rafael Andrade Menolli - Coordenador.

2013 - 2014

Número de produções C, T & A: 2

Ação da insulina na liberação de citocinas por macrófagos residentes de camundongos diabéticos estimulados com lipopolissacarídeo

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Mestrado acadêmico: (1) .

Integrantes: Thais Soprani Ayala - Integrante / Fernando Henrique Galvão Tessaro - Integrante / Joilson de Oliveira Martins - Coordenador.

2012 - 2012

Número de produções C, T & A: 1

Monitoramento microbiológico de superfície de equipamentos, de materiais de acondicionamento primário, do ambiente de produção e das mãos dos funcionários de uma indústria de cosméticos da região Oeste do Paraná

Descrição: Para garantir a qualidade dos produtos cosméticos, é essencial cumprir as diretrizes regulamentadas pelo Ministério da Saúde do Brasil, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. A contaminação microbiana nas etapas do processo produtivo deve ser uma preocupação constante dos fabricantes, pois isto influenciará direta ou indiretamente a qualidade do produto final.

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) .

Integrantes: Thais Soprani Ayala - Integrante / Helena Teru Takahashi Mizuta - Coordenador.

2011 - 2012

Número de produções C, T & A: 2

Extração, Isolamento e Caracterização Parcial do Polissacarídeo do corpo de frutificação de Basidiomiceto isolado da mata atlântica do Oeste do Paraná

Descrição: Os basidiomicetos compreendem uma classe de organismos com alta relevância comercial, devido a sua capacidade de produzir complexos polissacarídeo-proteínas que são importantes biopolímeros que possuem relevantes atividades biológicas, podendo também ser utilizados em vários processos industriais farmacêuticos e de alimentos. A presente proposta tem como objetivo extrair, isolar e caracterizar polissacarídeos do basidioma de fungo selecionado e coletado na Mata Atlântica da região Oeste do Paraná..

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) .

Integrantes: Thais Soprani Ayala - Integrante / Marina Kimiko Kadowaki - Coordenador / Clarice Aoki Osaku - Integrante.

Financiador(es): Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa.

Número de produções C, T & A: 2

Outros Projetos

2013 - 2013

Monitoria em Bacteriologia Clínica

Descrição: Auxílio ao docente na disciplina Bacteriologia Clínica. Auxílio no preparo das aulas, e dúvidas dos alunos..

Situação: Concluído; Natureza: Outra.

2011 - 2011

Integrantes: Thais Soprani Ayala - Integrante / Luzia Neri Cosmo Machado - Coordenador. Monitoria em Imunologia e Tópicos de Virologia.

Descrição: Atividades de monitoria na disciplina de Imunologia Geral e Tópicos de Virologia, sob orientação de Alex Sandro Jorge, no período de março a novembro de 2011, com uma carga horária total de 107 horas..

Situação: Concluído; Natureza: Outra.

Integrantes: Thais Soprani Ayala - Integrante / Alex Sandro Jorge - Coordenador / Rafael Andrade Menolli - Integrante.

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia.
2. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Imunologia.
3. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.
4. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biologia Geral / Subárea: Biologia celular.
5. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Fisiologia.
6. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Clínica Médica/Especialidade: Endocrinologia.

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Português	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Espanhol	Compreende Pouco, Fala Pouco, Lê Pouco, Escreve Pouco.

Prêmios e títulos

2016	XXI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia - FCF/USP-SP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade de São Paulo.
-------------	---

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica ▼

1. ★ TESSARO, FERNANDO H. G. ; **AYALA, THAIS S.** ; NOLASCO, EDUARDO L. ; BELLA, LEONARDO M. ; MARTINS, JOILSON O. . Insulin Influences LPS-Induced TNF- α and IL-6 Release Through Distinct Pathways in Mouse Macrophages from Different Compartments. CELLULAR PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY **JCR**, v. 15, p. 2093-2104, 2017.
2. RAJASEKARAN, S. S. ; ILLIES, C. ; SHEARS, S. B. ; WANG, H. ; **AYALA, T. S.** ; MARTINS, J. O. ; DARE, E. ; BERGGREN, P. O. ; BARKER, C. J. . Protein kinase- and lipase inhibitors of inositide metabolism deplete IP 7 indirectly in pancreatic β -cells: Off-target effects on cellular bioenergetics and direct effects on IP6K activity. CELLULAR SIGNALLING **JCR**, v. 42, p. 127-133, 2017.
3. DE MELO, RENAN HENRIQUE ; DO AMARAL, ALEX EVANGELISTA ; MENOLLI, RAFAEL ANDRADE ; **AYALA, THAIS SOPRANI** ; DE CASSIA GARCIA SIMAO, RITA ; DE SANTANA-FILHO, ARQUIMEDES PAIXAO ; SASSAKI, GUILHERME LANZI ; KADOWAKI, MARINA KIMIKO ; DA CONCEICAO SILVA, JOSE LUIS . β -(1 $\rightarrow$ 3)-Glucan of the Southern Bracket Mushroom, Ganoderma australe (Agaricomycetes), Stimulates Phagocytosis and Interleukin-6 Production in Mouse Peritoneal Macrophages. INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICINAL MUSHROOMS **JCR**, v. 18, p. 313-320, 2016.
Citações: **SCOPUS** 1
4. ★ FERNANDO H. G. TESSARO ; **THAIS S. AYALA** ; JOILSON O. MARTINS . Lipid Mediators Are Critical in Resolving Inflammation: A Review of the Emerging Roles of Eicosanoids in Diabetes Mellitus. BIOMED RES INT **JCR**, v. 2015, p. 1-8, 2015.
Citações: **WEB OF SCIENCE** 4 | **SCOPUS** 11
5. ★ MENOLLI, RAFAEL ANDRADE ; **AYALA, THAIS SOPRANI** ; ROSA, PABLO RODRIGO DA ; MACEDO COSTA, CLAUDIA REJANE LIMA DE ; OSAKU, ERICA FERNANDA ; MELLO ZIBETTI, ROSIANE G. . Production, Detection and Cross-Reactivity of Anti-Polysaccharide Antibodies from Environmental Fungi. Advances in Bioscience and Biotechnology, v. 05, p. 815-822, 2014.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. **AYALA, T. S.** ; MENOLLI, R. A. . AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DE FUNGOS SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS. In: Universidade Estadual de Londrina, 2014, Londrina. Anais do XXIII EAIC, 2014.
2. ROSA, P. R. ; **AYALA, T. S.** ; OSAKU, E. F. ; MACEDO COSTA, CLAUDIA REJANE LIMA DE ; MENOLLI, RAFAEL ANDRADE . Produção de anticorpos anti-polissacarídeos fúngicos em modelo animal. In: 22 Encontro Anual de Iniciação Científica- EAIC, 2013, Foz do Iguaçu. Anais do 22º EAIC, 2013.
3. **AYALA, T. S.** ; MIZUTA, H. T. T. . Monitoramento microbiológico de embalagens primárias, da sala de produção e das mãos dos funcionários de uma indústria de cosméticos da região oeste do Paraná. In: 22º Encontro Anual de Iniciação Científica- EAIC, 2013, Foz do Iguaçu. Anais do 22º EAIC, 2013.
4. TRAMONTINA, R. ; **AYALA, T. S.** ; da Conceição, J.L.S. ; PEREIRA, V.A.A.C. ; OSAKU, C. A. ; SPIASSI, A. ; CORRÊA, J.M. ; TORRE, C. L. D. ; Professora orientadora . Cellulolytic activity of fungi isolated from the Atlantic forest of west of Paraná. In: XLI Annual Meeting of SBBq- The Brazilian biochemistry and Molecular Biology Society, 2012, Foz do Iguaçu. XLI Annual Meeting of SBBq, 2012.
5. **AYALA, T. S.** ; OSAKU, C. A. ; Professora orientadora ; CORRÊA, J.M. ; HENN, C. ; PEREIRA, V.A.A.C. . Caracterização parcial de polissacarídeos extraídos do corpo de frutificação do fungo Ganoderma australe. In: XXI Encontro Anual de Iniciação Científica, 2012, Maringá. Anais do XXI EAIC, 2012.

Resumos publicados em anais de congressos

1. **AYALA, T. S.** ; ROSA, P. R. ; MENOLLI, RAFAEL ANDRADE . PRODUCTION, DETECTION AND CROSS-REACTIVITY OF ANTI-POLYSACCHARIDE ANTIBODIES FROM ENVIRONMENTAL FUNG. In: XXXIX Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2014, Búzios. Annals of XXXIX Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2014.
2. **AYALA, T. S.** ; MIZUTA, H. T. T. . Monitoramento Microbiológico de Embalagens Primárias de uma Indústria de Cosméticos da Região Oeste do Paraná. In: 5º COSIMP- 5 Congresso de Ciências Farmacêuticas do Mercosul, 2013, Cascavel. Anais do 5º COSIMP, 2013.
3. **AYALA, T. S.** ; TRAMONTINA, R. ; OSAKU, C. A. ; da Conceição, J.L.S. ; HENN, C. ; PEREIRA, V.A.A.C. . Isolation and Partial Characterization of Polysaccharide from the Fruiting Body of Ganoderma sp. In: XLI Annual Meeting of SBBq- The Brazilian biochemistry and Molecular Biology Society, 2012, Foz do Iguaçu. Annals of XLI Annual Meeting of SBBq- The Brazilian biochemistry and Molecular Biology Society, 2012.

Apresentações de Trabalho

1. **AYALA, T. S.** . Imunometabolismo em macrófagos: o papel da glicose. 2018. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
2. **AYALA, THAIS SOPRANI** ; FERNANDO H. G. TESSARO ; PEREIRA, G. J. ; LEONARDO M. BELLA ; FERREIRA, K. S. ; JOILSON O. MARTINS . MACROPHAGES BEHAVIOR IS INFLUENCED BY HIGH GLUCOSE UNDER LPS STIMULUS. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. **AYALA, THAIS SOPRANI** ; FERNANDO H. G. TESSARO ; BELLA, L. M. ; PEREIRA, G. J. ; FERREIRA, K. S. ; JOILSON O. MARTINS . HYPERGLYCEMIA LEADS TO AN ALTERED MACROPHAGE RESPONSE UNDER LPS STIMULATION, COMPROMISING TLR4 SIGNALLING PATHWAY AND LACTATE RELEASE. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. **AYALA, THAIS SOPRANI** ; FERNANDO H. G. TESSARO ; BELLA, L. M. ; PEREIRA, G. J. ; FERREIRA, K. S. ; JOILSON O. MARTINS . HYPERGLYCEMIA LEADS TO AN ALTERED MACROPHAGE RESPONSE UNDER LPS STIMULATION,

5. COMPROMISING TLR4 SIGNALLING PATHWAY AND LACTATE RELEASE. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso). **AYALA, T. S.**; TESSARO, FERNANDO H. G. ; PEREIRA, G. J. ; BELLA, LEONARDO M. ; FERREIRA, K. S. ; JOILSON O. MARTINS . ?HIGH GLUCOSE MODIFIES MACROPHAGES RESPONSE UNDER LIPOPOLYSACCHARIDE STIMULUS?. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
6. **AYALA, T. S.**. Imunocromatografia. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
7. BELLA, L. M. ; QUIRINO, T. C. ; FERNANDO H. G. TESSARO ; **AYALA, T. S.** ; NOLASCO, E. L. ; AZEVEDO, C. B. ; JOILSON O. MARTINS . Cholecalciferol Modulates Lypopolisaccharide-induced immune response in raw 264.7 macrophages. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
8. **AYALA, T. S.**; FERNANDO H. G. TESSARO ; BELLA, L. M. ; JOILSON O. MARTINS . Hyperglycemia Impairs Function of Diabetic Bone Marrow-Derived Macrophages. 2016. (Apresentação de Trabalho/Outra).
9. FERNANDO H. G. TESSARO ; **AYALA, T. S.** ; NOLASCO, E. L. ; BELLA, L. M. ; JOILSON O. MARTINS . Insulin Enhances LPS-Induced Mapk Kinases Phosphorylation and TNF-Alpha and IL-6 Release Via Akt Phosphorylation on Ser473 in Macrophages from Diabetic Mic. 2016. (Apresentação de Trabalho/Outra).
10. BELLA, L. M. ; QUIRINO, T. C. ; FERNANDO H. G. TESSARO ; NOLASCO, E. L. ; **AYALA, T. S.** ; AZEVEDO, C. B. ; JOILSON O. MARTINS . Vitamin D Improves Lipopolysaccharide-Induced Immune Response in Raw 267.4 Macrophages. 2016. (Apresentação de Trabalho/Outra).
11. **AYALA, T. S.**; FERNANDO H. G. TESSARO ; BELLA, L. M. ; JOILSON O. MARTINS . IMPAIRED CYTOKINE RELEASE BY BONE MARROW DERIVED MACROPHAGES FROM DIABETIC MICE IS RELATED TO HIGH GLUCOSE ENVIRONMENT. 2016. (Apresentação de Trabalho/Outra).
12. FERNANDO H. G. TESSARO ; **AYALA, T. S.** ; BELLA, L. M. ; NOLASCO, E. L. ; JOILSON O. MARTINS . INSULIN ENHANCES LPS-INDUCED CYTOKINES AND SIGNALING PATHWAYS IN BONE MARROW-DERIVED MACROPHAGES FROM DIABETIC MICE. 2016. (Apresentação de Trabalho/Outra).
13. FERNANDO H. G. TESSARO ; **AYALA, T. S.** ; BELLA, L. M. ; NOLASCO, E. L. ; JOILSON O. MARTINS . Insulin Increases Cytokines Levels of LPS-Induced Bone Marrow-Derived Macrophages from Diabetic Mice. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).
14. BELLA, L. M. ; FERNANDO H. G. TESSARO ; NOLASCO, E. L. ; **AYALA, T. S.** ; AZEVEDO, C. B. ; JOILSON O. MARTINS . MODULATION OF LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED IMMUNE RESPONSE IN RAW 267.4 MACROPHAGES: ROLE OF INSULIN AND CHOLECALCIFEROL. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).
15. BELLA, L. M. ; FERNANDO H. G. TESSARO ; **AYALA, T. S.** ; NOLASCO, E. L. ; AZEVEDO, C. B. ; JOILSON O. MARTINS . Modulation of Lipopolysaccharide-Induced Immune Response in Peritoneal Macrophages: Role of Cholecalciferol. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).
16. ★ **AYALA, T. S.**; MENOLLI, RAFAEL ANDRADE . Avaliação dos efeitos de polissacarídeos fúngicos sobre macrófagos peritoneais de camundongos. 2014. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
17. ★ **AYALA, T. S.**; ROSA, P. R. ; MENOLLI, R. A. . Production, detection and cross-reactivity of anti-polysaccharide antibodies from environmental fungi. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
18. FERNANDO H. G. TESSARO ; NOLASCO, E. L. ; BELLA, L. M. ; **AYALA, T. S.** ; JOILSON O. MARTINS . Insulin acts on LPS-induced cytokines releasad by resident diabetic macrophages. 2014. (Apresentação de Trabalho/Outra).
19. **AYALA, T. S.**; MIZUTA, H. T. T. ; DESSANTE, C.M. ; SILVA, E. M. P. . Monitoramento Microbiológico de Embalagens Primárias de uma Indústria de Cosméticos da Região Oeste do Paraná. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
20. **AYALA, T. S.**. Monitoramento microbiológico de embalagens primárias, da sala de produção e das mãos dos funcionários de uma indústria de cosméticos da região oeste do paraná. 2013. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
21. ROSA, P. R. ; **AYALA, T. S.** ; MENOLLI, R. A. ; COSTA, C. R. L. M. ; OSAKU, E. F. ; DUARTE, P. A. D. ; OSAKU, C. A. . Produção de anticorpos anti-polissacarídeos fúngicos em modelo animal. 2013. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
22. **AYALA, T. S.**; TRAMONTINA, R. ; OSAKU, C. A. ; da Conceição, J.L.S. ; HENN, C. ; PEREIRA, V.A.A.C. ; Professora orientadora . Isolation and Partial Characterization of Polysaccharide from the Fruiting Body of Ganoderma sp. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
23. **AYALA, T. S.**; OSAKU, C. A. ; PEREIRA, J. M. ; HENN, C. ; PEREIRA, V.A.A.C. ; Professora orientadora . Caracterização parcial de polissacarídeos extraídos do corpo de frutificação do fungo Ganoderma australe. 2012. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

Bancas

Participação em bancas de comissões julgadoras

Outras participações

1. **THAIS S. AYALA**. 24º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP- SIICUSP. 2016. Universidade de São Paulo.
2. **THAIS S. AYALA**. 23º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP- SIICUSP. 2015. Universidade de São Paulo.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. EVCI_2018_XXVI Simpósio Internacional de Hemoterapia e Terapia Celular. 2018. (Simpósio).
2. FEBRACE. Avaliado. 2018. (Feira).
3. IV ABCF Congress. MACROPHAGES BEHAVIOR IS INFLUENCED BY HIGH GLUCOSE UNDER LPS STIMULUS. 2018. (Congresso).
4. VIII SIMPAC and III ISPAT. Abstracts evaluator. 2018. (Simpósio).
5. VIII SIMPAC and III ISPAT. Poster evaluator. 2018. (Simpósio).
6. XIX Encontro Nacional de Profissionais em Pesquisa Clínica "Aspectos técnicos da Pesquisa Clínica em tempos de transformação e integração. 2018. (Encontro).
7. XLIII Congress of the Brazilian Society of Immunology and XI Extra Section of Clinical Immunology. HYPERGLYCEMIA LEADS TO AN ALTERED MACROPHAGE RESPONSE UNDER LPS STIMULATION, COMPROMISING TLR4 SIGNALLING PATHWAY AND LACTATE RELEASE. 2018. (Congresso).
8. XXIII SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. HYPERGLYCEMIA ALTERS THE BEHAVIOR OF MACROPHAGES UNDER STIMULATION BY LPS. 2018. (Outra).
9. 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics and the 21st Latin American Congress of Pharmacology. IMPAIRED CYTOKINE RELEASE BY BONE MARROW DERIVED MACROPHAGES FROM DIABETIC MICE IS RELATED TO HIGH GLUCOSE ENVIRONMENT. 2016. (Congresso).
10. LI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. 2016. (Outra).
11. XXI SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. Hyperglycemia Impairs Function of Diabetic Bone Marrow-Derived Macrophages. 2016. (Outra).
12. 23º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP. Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP. 2015. (Simpósio).
13. 7º Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas. 2015. (Simpósio).
14. First Workshop on Green Nanotechnology, Molecular Imaging, Theranostics and Bio-Inspiration. 2015. (Outra).
15. VI SIMPAC and I ISPAT. 2015. (Simpósio).
16. XX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. Insulin Increases Cytokines Levels of LPS-Induced Bone Marrow-Derived Macrophages from Diabetic Mice. 2015. (Congresso).
17. XXIII Encontro Anual de Iniciação Científica- EAIC. Avaliação dos efeitos de polissacarídeos fúngicos sobre macrófagos peritoneais de camundongos. 2014. (Encontro).
18. XXXIX Congress of the Brazilian Society of Immunology. PRODUCTION, DETECTION AND CROSS-REACTIVITY OF ANTI-POLYSACCHARIDE ANTIBODIES FROM ENVIRONMENTAL FUNGI. 2014. (Congresso).
19. 5º COSIMP- 5º Congresso de Ciências Farmacêuticas do Mercosul. Monitoramento Microbiológico de Embalagens Primárias de uma Indústria Cosméticos da Região Oeste do Paraná. 2013. (Congresso).
20. XXII Encontro Anual de Iniciação Científica- EAIC. Monitoramento microbiológico de embalagens primárias, da sala de produção e das mãos dos funcionários de uma indústria de cosméticos da região oeste do paraná. 2013. (Encontro).
21. XLI Annual Meeting of SBBq- The Brazilian biochemistry and Molecular Biology Society. Isolation and Partial Characterization of Polysaccharide from the Fruiting Body of Ganoderma sp. 2012. (Congresso).
22. XXI Encontro Anual de Iniciação Científica- EAIC. CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DO FUNGO Ganoderma australe. 2012. (Encontro).
23. Campanha Nacional Pelo Uso Correto do Medicamento. campanha pelo uso correto do medicamento. 2011. (Outra).
24. Doação de Sangue e Medula Óssea. 2011. (Outra).
25. IV Congresso de Ciências Farmacêuticas do Mercosul. 2011. (Congresso).
26. IV Jornada Acadêmica de Farmácia. 2011. (Outra).
27. XXXVI Congress of the Brazilian Society of Immunology IV Extra Section of Clinical Immunology-ESCI. 2011. (Congresso).
28. Cultivando Água Boa. 2010. (Outra).
29. Seminário de Inovação Tecnológica e 1º Feira de Inovação Tecnológica. 2010. (Seminário).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **AYALA, T. S.**. III ISPAT e VIII SIMPAC. 2018. (Congresso).
2. **THAIS S. AYALA**. II International Symposium on Pathophysiology and Toxicology e VII Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas. 2016. (Congresso).

Educação e Popularização de C & T

Apresentações de Trabalho

1. **AYALA, T. S.**. Imunocromatografia. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
2. **AYALA, T. S.**. Imunometabolismo em macrófagos: o papel da glicose. 2018. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **THAIS S. AYALA**. II International Symposium on Pathophysiology and Toxicology e VII Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas. 2016. (Congresso).
2. **AYALA, T. S.**. III ISPAT e VIII SIMPAC. 2018. (Congresso).

APÊNDICES

APÊNDICE A - Tabela contendo valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referente à figura 7.

Figura 7: Caracterização do estado diabético				
Animal	PESO (gramas)			
	Dia 0		Dia 10	
	Veículo	Aloxana	Veículo	Aloxana
1	23	29,2	24,2	25,2
2	25,2	27,5	26,1	24,3
3	26,4	27,7	26,7	24,5
4	27,2	28,1	28,4	24,9
5	22,3	27	25,4	23,6
6	24	27,7	24,9	26,1
7	23,4	28,8	26,5	24,1
8	24,8	30	23,6	27,9
9	25,1	31,7	27,8	28,2
10	25	27,9	26,2	25,1
11	26	27	27	25,5
12	27	28	28,5	26,1
Média	24,95	28,38	26,28	25,46
Desvio Padrão	1,56	1,36	1,56	1,43
Erro Padrão da Média	0,45	0,39	0,45	0,41
Animal	Glicemia (mg/dL)			
	Dia 0		Dia 10	
	Veículo	Aloxana	Veículo	Aloxana
1	143	180	138	600
2	158	179	167	600
3	168	170	172	559
4	139	172	164	573
5	123	172	146	478
6	161	195	162	600
7	155	181	162	529
8	158	141	124	595
9	140	173	144	596
10	161	185	156	565
11	170	163	154	600
12	156	163	150	595
Média	152,67	172,83	153,25	574,17
Desvio Padrão	13,71	13,52	13,67	37,68
Erro Padrão da Média	3,96	3,90	3,94	10,88

APÊNDICE B - Tabela contendo valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referente à figura 9.

Figura 9: Viabilidade celular

Iodeto de Propídeo						
Não-diabéticos	5.5 mM	25 mM	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
Animal						
1	100,0	94,7	87,0	104,6	99,7	100,6
2	100,0	104,1	97,1	108,2	106,2	108,9
3	100,0	70,6	90,6	101,9	110,6	96,0
4						
5						
Média	100	90	92	105	106	102
Desvio padrão	0,00	17,26	5,10	3,18	5,49	6,51
Erro padrão da média	0,00	9,97	2,94	1,84	3,17	3,76

MTT - 24 horas						
Não-diabéticos	5.5 mM	25 mM	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
Animal						
1	100,0	106,4	105,3	113,7	109,4	98,2
2	100,0	123,0	137,1	161,5	149,3	142,1
3	100,0	112,9	108,3	142,2	126,5	119,5
4	100,0	94,7	101,9	126,1	124,0	120,9
5	100,0	94,1	94,0	127,0	140,0	149,9
6	100,0	99,2	92,1	99,9	110,9	107,1
7	100,0	94,7	101,9	126,1	124,0	120,9
8	100,0	94,1	94,0	127,0	140,0	149,9
9	100,0	99,2	92,1	99,9	110,9	107,1
Média	100,0	102,0	103,0	124,8	126,1	124,0
Desvio padrão	0,00	10,16	14,13	19,45	14,47	19,19
Erro padrão da média	0,00	3,39	4,71	6,48	4,82	6,40

MTT - 48 horas						
Não-diabéticos	5.5 mM	25 mM	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
Animal						
1	100,0	108,0	112,2	118,2	149,2	134,0
2	100,0	114,7	119,2	128,5	136,0	140,6
3	100,0	109,9	113,3	111,6	116,4	114,8
4						
5						
Média	100,0	110,8	114,9	119,4	133,8	129,8
Desvio padrão	0,00	3,44	3,76	8,53	16,50	13,39
Erro padrão da média	0,00	1,98	2,17	4,92	9,53	7,73

MTT - 7 dias						
Não-diabéticos	5.5 mM	25 mM	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
Animal						
1	100	92,5	104,2	84,5	131,4	148,5
2	100	93,5	93,9	81,8	103,5	114,3
3	100	95,9	97,3	82,4	93,7	95,5
4	100	96,7	90,1	136,3	124,2	116,5
5	100	96,8	92,6	118,9	121,1	109,5
6	100	110,2	109,1	138,6	123,9	137,5
7	100	93,3	113,4	131,1	121,8	110,1
8	100	99,1	122,4	147,7	138,3	146,7
9	100	125,3	126,3	152,5	150,5	151,5
10	100	106,8	110,6	139,4	132,6	175,8
11	100	90,2	104,9	123,1	139,9	194,4
12	100	99,3	102,9	120,7	152,9	310,7
Média	100,0	100,0	105,6	121,4	127,8	150,9
Desvio padrão	0,00	9,86	11,42	25,33	17,32	58,17
Erro padrão da média	0,00	2,85	3,30	7,31	5,00	16,79

Diabéticos						
Iodeto de Propídeo						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	100,0	93,6	88,8	94,8	93,1	86,0
2	100,0	96,0	115,4	102,9	98,3	92,3
3	100,0	109,4	104,9	104,1	106,5	104,3
4						
5						
Média	100	100	103	101	99	94
Desvio padrão	0,00	8,47	13,40	5,04	6,76	9,29
Erro padrão da média	0,00	4,89	7,74	2,91	3,90	5,36
Diabéticos						
MTT - 24 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	100,0	105,4	106,4	121,4	105,2	107,2
2	100,0	120,7	118,7	132,0	138,0	136,1
3	100,0	101,3	111,9	122,6	125,5	121,7
4	100,0	109,1	112,3	125,3	122,9	121,7
5						
6						
7						
8						
9						
Média	100,0	109,1	112,3	125,3	122,9	121,7
Desvio padrão	0,00	8,35	5,03	4,74	13,52	11,80
Erro padrão da média	0,00	4,17	2,52	2,37	6,76	5,90
Diabéticos						
MTT - 48 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	100,0	106,0	118,3	270,8	294,2	242,2
2	100,0	118,3	142,3	234,6	263,8	221,6
3	100,0	100,8	94,6	278,0	212,6	236,1
4	100,0	93,4	93,5	161,5	124,7	148,7
5						
Média	100,0	104,6	112,2	236,2	223,8	212,2
Desvio padrão	0,00	10,51	23,09	53,28	74,17	43,16
Erro padrão da média	0,00	5,26	11,54	26,64	37,09	21,58
Diabéticos						
MTT - 7 dias						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	100	98,5	112,3	139,4	152,2	176,8
2	100	106,6	104,5	132,0	125,4	134,0
3	100	117,2	84,6	126,7	191,0	191,9
4	100	103,3	104,1	135,3	148,1	186,7
5	100	106,5	102,7	136,5	130,0	147,3
6	100	105,4	85,7	145,0	131,8	162,9
7	100	68,4	87,4	94,0	99,0	113,3
8	100	81,3	87,8	119,0	114,6	139,8
9	100	82,8	88,7	105,8	139,5	116,2
10	100	80,0	78,1	111,1	146,7	138,7
11	100	95,0	118,7	138,6	170,5	239,4
12	100	90,3	93,8	127,0	123,2	146,3
Média	100,0	94,6	95,7	125,9	139,3	157,8
Desvio padrão	0,00	14,25	12,50	15,47	24,81	36,00
Erro padrão da média	0,00	4,11	3,61	4,47	7,16	10,39

APÊNDICE C - Tabela contendo valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referente à figura 10.

Figura 10: Alterações fenotípicas comparando BMDM de animais não diabéticos e diabéticos

Não diabético		Antes do tratamento					
Animal	F4/80	CD11b	CD38	CD206			
1	57,6	37,3	55,8	29,9			
2	52,9	37,7	65,8	26,8			
3	58,6	37,3	53,8	30,9			
4							
5							
Média	56,4	37,5	58,5	29,2			
Desvio padrão	3,04	0,24	6,43	2,17			
Erro padrão da média	1,76	0,14	3,71	1,25			
Não diabéticos		CD38 após 24 horas					
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	60,1	79,2	76,5	76,0	81,1	84,0	
2	85,1	83,7	82,9	74,8	86,4	85,3	
3	75,2	74,1	74,2	77,1	82,1	78,6	
4							
5							
6							
7							
8							
9							
Média	73,5	79,0	77,9	76,0	83,2	82,6	
Desvio padrão	12,59	4,79	4,51	1,15	2,84	3,57	
Erro padrão da média	7,27	2,76	2,60	0,66	1,64	2,06	
Não diabéticos		CD206 após 24 horas					
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	20,1	16,7	14,8	26,8	13,8	22,0	
2	8,3	7,3	4,9	42,1	8,9	8,3	
3	13,7	12,2	12,9	11,5	16,1	13,0	
4							
5							
Média	14,0	12,1	10,9	26,8	12,9	14,4	
Desvio padrão	5,90	4,67	5,26	15,31	3,65	6,95	
Erro padrão da média	3,40	2,70	3,03	8,84	2,11	4,02	
Não diabéticos		Atividade de arginase após 24 horas					
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	100,0	98,1	129,9	114,2	111,3	88,4	
2	100,0	119,1	117,8	149,5	126,1	149,2	
3	100,0	92,7	106,8	138,5	112,9	101,0	
4	100,0	106,0	94,7	129,3	125,3	73,8	
5	100,0	105,8	127,1	118,1	107,3	127,7	
6	100,0	125,7	116,7	158,2	147,0	128,6	
7	100,0	112,8	102,3	152,8	121,8	147,4	
8	100,0	125,8	114,0	137,9	130,6		
Média	100,0	110,7	113,7	137,3	122,8	116,6	
Desvio padrão	0,00	12,28	11,97	16,01	12,74	29,30	
Erro padrão da média	0,00	4,34	4,23	5,66	4,51	11,07	

Não diabéticos		CD80 após 24 horas					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1		80,0	86,0	82,2	85,2	87,6	83,3
2		82,3	83,1	82,8	84,7	61,0	79,5
3		81,2	84,6	82,5	85,0	74,3	81,4
4							
5							
6							
7							
8							
Média		81,2	84,6	82,5	85,0	74,3	81,4
Desvio padrão		1,15	1,45	0,30	0,25	13,30	1,90
Erro padrão da média		0,66	0,84	0,17	0,14	7,68	1,10
Não diabéticos		CD86 após 24 horas					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1		32,7	28,3	36,8	44,4	40,2	32,4
2		28,7	36,5	34,3	38,6	37,6	42,8
3		29,7	30,6	27,1	50,1	37,3	44,8
4							
5							
6							
7							
8							
Média		30,4	31,8	32,7	44,4	38,4	40,0
Desvio padrão		2,08	4,23	5,04	5,75	1,59	6,66
Erro padrão da média		1,20	2,44	2,91	3,32	0,92	3,84
Não diabéticos		MHC-II após 24 horas					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1		65,0	74,1	64,5	74,1	79,2	71,0
2		62,4	60,4	53,8	70,1	68,5	54,9
3		68,9	60,3	62,2	78,0	70,3	70,3
4							
5							
6							
7							
8							
Média		65,5	64,9	60,1	74,1	72,7	65,4
Desvio padrão		3,27	7,91	5,65	3,93	5,76	9,13
Erro padrão da média		1,89	4,57	3,26	2,27	3,32	5,27

Diabéticos		Antes do tratamento					
Animal		F4/80	CD11b	CD38	CD206		
1		69,1	51,5	36,4	27,9		
2		68,8	48,0	38,0	26,3		
3		64,4	46,6	43,3	28,2		
4		64,2	47,9	45,6	29,3		
5		70,2	49,3	27,2	23,7		
Média		67,3	48,6	38,1	27,1		
Desvio padrão		2,82	1,85	7,16	2,17		
Erro padrão da média		1,26	0,83	3,20	0,97		
Diabéticos		CD38 após 24 horas					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1		56,6	58,1	58,1	71,6	55,4	54,8
2		52,1	56,4	52,6	58,5	59,6	65,6
3		71,3	63,5	62,5	61,9	70,6	66,4
4							
5							
6							
7							
8							
9							
Média		60,0	59,3	57,7	64,0	61,8	62,3
Desvio padrão		10,04	3,70	5,00	6,81	7,87	6,47
Erro padrão da média		5,80	2,14	2,89	3,93	4,54	3,74
Diabéticos		CD206 após 24 horas					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1		11,4	9,4	8,8	11,8	8,6	7,3
2		7,3	8,5	8,7	6,6	10,6	11,7
3		12,6	11,4	9,3	11,0	12,0	9,5
4							
5							
Média		10,4	9,8	8,9	9,8	10,4	9,5
Desvio padrão		2,79	1,48	0,30	2,79	1,71	2,21
Erro padrão da média		1,61	0,85	0,17	1,61	0,99	1,27
Diabéticos		Atividade de arginase após 24 horas					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1		100,0	95,2	72,6	88,2	109,8	160,1
2		100,0	137,7	107,9	131,3	72,7	134,9
3		100,0	108,6	105,5	110,5	82,2	147,5
4		100,0	117,7	123,9	101,4	121,2	147,5
5		100,0	79,7	102,5	107,8	96,5	147,5
6							
7							
8							
Média		100,0	107,8	100,0	100,0	100,0	100,0
Desvio padrão		0,00	22,03	22,03	22,03	22,03	22,03
Erro padrão da média		0,00	9,85	0,00	0,00	0,00	0,00

Diabéticos		CD80 após 24 horas					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1		97,0	97,5	97,8	97,8	97,2	97,9
2		97,7	97,8	97,4	97,6	97,7	97,8
3		97,4	96,7	96,5	97,7	95,9	97,1
4		96,5	96,1	96,1	97,2	96,6	97,2
5							
6							
7							
8							
Média		97,2	97,0	97,0	97,6	96,9	97,5
Desvio padrão		0,52	0,77	0,79	0,26	0,78	0,41
Erro padrão da média		0,26	0,39	0,39	0,13	0,39	0,20
Diabéticos		CD86 após 24 horas					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1		37,0	31,1	40,5	44,8	47,4	40,5
2		42,4	48,9	39,6	42,0	45,3	52,5
3		39,1	36,0	42,7	46,2	56,6	52,2
4		96,5	96,1	96,1	97,2	96,6	97,2
5							
6							
7							
8							
Média		53,8	53,0	54,7	57,6	61,5	60,6
Desvio padrão		28,59	29,68	27,61	26,49	23,93	25,03
Erro padrão da média		14,29	14,84	13,81	13,25	11,96	12,52
Não diabéticos		MHC-II após 24 horas					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1		86,2	70,7	81,6	87,5	82,8	75,9
2		83,2	84,8	75,8	71,2	74,0	82,7
3		79,8	73,9	79,7	81,6	89,5	83,8
4							
5							
6							
7							
8							
Média		83,1	76,4	79,0	80,1	82,1	80,8
Desvio padrão		3,23	7,43	2,93	8,25	7,75	4,28
Erro padrão da média		1,87	4,29	1,69	4,76	4,47	2,47

APÊNDICE D - Tabela contendo valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referente à figura 11.

Figura 11 - Expressão de TLR-4 nos BMDM

Não diabético		Diabético	
Animal	TLR4	Animal	TLR4
1	0,79	1	0,79
2	0,8	2	0,65
3	0,81	3	0,76
4		4	0,6
5		5	0,47
Média	0,800	Média	0,733
Desvio padrão	0,01	Desvio padrão	0,13
Erro padrão da média	0,01	Erro padrão da m	0,06

Não diabético		TLR4 após 24 horas					
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	4,00	2,75	2,51	3,12	1,65	1,26	
2	3,29	3,10	3,34	2,65	2,07	2,36	
3	2,62	2,51	2,64	3,59	1,88	3,03	
4							
5							
6							
7							
8							
9							
Média	3,3	2,8	2,8	3,1	1,9	2,2	
Desvio padrão	0,69	0,30	0,45	0,47	0,21	0,89	
Erro padrão da média	0,40	0,17	0,26	0,27	0,12	0,51	

Diabéticos		TLR4 após 24 horas					
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	3,28	2,50	3,33	1,97	1,86	1,66	
2	2,42	2,62	3,12	1,04	1,57	1,52	
3	2,95	1,78	3,02	1,37	1,48	1,65	
4							
5							
6							
7							
8							
9							
Média	2,9	2,3	3,2	1,5	1,6	1,6	
Desvio padrão	0,43	0,45	0,16	0,47	0,20	0,08	
Erro padrão da média	0,25	0,26	0,09	0,27	0,12	0,04	

APÊNDICE E - Tabela contendo valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referente à figura 12.

Figura 12: Via de sinalização do TLR4.

pAKT/ β -actina							
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	0,3569	0,2084	0,2511	0,2872	0,2456	0,3614	
2	0,1991	0,2645	0,2721	0,4950	0,2206	0,4991	
3	0,1603	0,2858	0,2283	0,3969	0,2916	0,2895	
4	0,1671	0,1153	0,1618	0,4086	0,2373	0,5750	
5							
6							
7							
8							
9							
Média	0,2208	0,2185	0,2283	0,3969	0,2488	0,4312	
Desvio padrão	0,09	0,08	0,05	0,09	0,03	0,13	
Erro padrão da média	0,05	0,04	0,03	0,05	0,02	0,07	

pPI3K p 55/ β -actina							
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	0,1574	0,4357	0,7764	0,1136	0,5197	0,2353	
2	0,1339	0,3502	0,6727	0,4672	0,2625	0,3253	
3	0,1488	0,3571	0,4292	0,2874	0,2279	0,3324	
4							
5							
6							
7							
8							
9							
Média	0,1467	0,3810	0,6261	0,2894	0,3367	0,2977	
Desvio padrão	0,01	0,05	0,18	0,18	0,16	0,05	
Erro padrão da média	0,01	0,03	0,10	0,10	0,09	0,03	

pPI3K p 85/ β -actina							
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	0,07514000	0,0556	0,085983	0,04181818	0,05464789	0,07301038	
2	0,06022727	0,047005	0,0733	0,07007299	0,07551622	0,06618357	
3	0,05109983	0,051101	0,076031	0,04444445	0,06094675	0,07051282	
4	0,04182042	0,058929	0,046512	0,04267054	0,03547008	0,04500684	
5							
6							
7							
8							
9							
Média	0,0571	0,0532	0,0705	0,0498	0,0566	0,0637	
Desvio padrão	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	
Erro padrão da média	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	

Não diabético							
pPKC- α/β II/ β -actina							
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	0,2239	0,1123	0,2649	0,2563	0,6359	0,5792	
2	0,1721	0,2540	0,4514	0,2545	0,2415	0,6477	
3	0,2393	0,2740	0,1632	0,4917	0,2757	0,1820	
4	0,1735	0,1102	0,1023	0,1089	0,3462	0,2747	
5	0,3867	0,0606	0,5812	0,6069	0,4868	0,4201	
6							
7							
8							
9							
Média	0,2391	0,1622	0,3126	0,3437	0,3972	0,4207	
Desvio padrão	0,09	0,10	0,20	0,20	0,16	0,20	
Erro padrão da média	0,04	0,04	0,09	0,09	0,07	0,09	
pPKC- δ/β -actina							
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	0,23636	0,40855	0,24158	0,39592	0,52451	0,67026	
2	0,53497	0,27936	0,28505	0,41445	0,63559	0,27362	
3	0,31238	0,42158	0,70535	0,34570	0,37255	0,13571	
4							
5							
6							
7							
8							
9							
Média	0,3612	0,3698	0,4107	0,3854	0,5109	0,3599	
Desvio padrão	0,16	0,08	0,26	0,04	0,13	0,28	
Erro padrão da média	0,09	0,05	0,15	0,02	0,08	0,16	
pFOXo1/ β -actina							
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	0,264098	0,3309	0,2154822	0,3918269	0,2781457	0,1980723	
2	0,431005	0,531496	0,571977	0,5458515	0,3625304	0,2849462	
3	0,245103	0,308824	0,1891447	0,4565916	0,4006849	0,2351852	
4							
5							
6							
7							
8							
9							
Média	0,3101	0,3904	0,3255	0,4648	0,3471	0,2394	
Desvio padrão	0,10	0,12	0,21	0,08	0,06	0,04	
Erro padrão da média	0,06	0,07	0,12	0,04	0,04	0,03	

Diabéticos		pAKT/ β -actina					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1		0,1362	0,2276	0,1876	0,7793	0,4182	0,4753
2		0,1625	0,1680	0,2801	0,6194	0,2868	0,3282
3		0,3008	0,2722	0,2059	0,6660	0,5486	0,3750
4		0,4767	0,2630	0,1536	0,8500	0,4325	0,3094
5		0,3296	0,1000	0,1839	0,5813	0,1470	0,3218
6							
7							
8							
9							
Média		0,2690	0,2327	0,2068	0,7287	0,4215	0,3720
Desvio padrão		0,14	0,07	0,05	0,11	0,15	0,07
Erro padrão da média		0,06	0,03	0,02	0,05	0,07	0,03

Diabéticos		pPI3K p 55/ β -actina					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1		0,2309	0,2844	0,3720	0,3088	0,3236	0,3325
2		0,2885	0,3495	0,2163	0,2163	0,2350	0,1392
3		0,3156	0,4985	0,3343	0,4615	0,3515	0,6432
4		0,2258	0,2517	0,7631	0,2562	0,2435	0,2251
5		0,2752	0,5223	0,3543	0,5535	0,4755	0,7221
6		0,8926		0,3283	0,6930		0,3750
7							
8							
9							
Média		0,2652	0,3775	0,4214	0,3107	0,2884	0,3350
Desvio padrão		0,26	0,12	0,19	0,19	0,10	0,23
Erro padrão da média		0,11	0,05	0,08	0,08	0,04	0,09

Diabéticos		pPI3K p 85/ β -actina					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1		0,269	0,359	0,579	0,395	0,550	0,364
2		0,685	0,684	0,233	0,211	0,683	0,308
3		0,196	0,538	0,578	0,148	0,367	0,211
4		0,114	0,260	0,277	0,512	0,281	0,160
5		0,151	0,312	0,417	0,316	0,147	0,239
6		0,219	0,382	0,346	0,451	0,531	0,256
7							
8							
9							
Média		0,2722	0,4227	0,4050	0,3389	0,4266	0,2565
Desvio padrão		0,21	0,16	0,15	0,14	0,20	0,07
Erro padrão da média		0,09	0,06	0,06	0,06	0,08	0,03

Diabéticos						
pPKC- α/β II/ β -actina						
Animal	5.5 mM	25 mM	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	0,2295	0,5841	0,6025	0,3244	0,3185	0,3310
2	0,1116	0,3905	0,6008	0,2076	0,0429	0,4570
3	0,2526	0,0449	0,2726	0,5363	0,5331	0,0898
4	0,0562	0,0308	0,4640	0,1149	0,0824	0,0834
5	0,0962	0,1060	0,1370	0,2134	0,5207	0,2053
6						
7						
8						
9						
Média	0,1625	0,2626	0,4154	0,2958	0,2442	0,2333
Desvio padrão	0,09	0,25	0,21	0,16	0,23	0,16
Erro padrão da média	0,04	0,11	0,09	0,07	0,10	0,07

Diabéticos						
pPKC- δ/β -actina						
Animal	5.5 mM	25 mM	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	3,3068	1,5485	0,6981	2,6804	1,1600	0,7254
2	2,6439	1,7560	0,8122	1,4762	1,8156	1,7723
3	2,9750	0,7152	0,5702	2,0710	0,8923	1,4268
4	3,1100	3,1618	0,6961	1,0171	0,7741	1,6430
5						
6						
7						
8						
9						
Média	3,0089	1,3399	0,6935	2,0759	1,2893	1,3082
Desvio padrão	0,28	1,02	0,10	0,72	0,47	0,47
Erro padrão da média	0,14	0,51	0,05	0,36	0,23	0,23

Diabéticos						
pFOXo1/ β -actina						
Animal	5.5 mM	25 mM	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	0,333333	0,323024	0,333333	0,2819383	0,3052209	0,365019
2	0,629353	0,572854	0,1626866	0,2020362	0,41133	0,4387528
3		0,957854	1,417624	1,14876	0,8345324	0,6122449
4	0,640411	0,932203	1,126316	1,164384	0,9117647	0,5816327
5						
6						
7						
8						
9						
Média	0,5344	0,6179	0,8755	0,5442	0,5170	0,4720
Desvio padrão	0,17	0,30	0,56	0,53	0,30	0,12
Erro padrão da média	0,09	0,15	0,28	0,26	0,15	0,06

APÊNDICE F - Tabela contendo valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referente à figura 13.

Figura 13- Via de sinalização do TLR4: fosforilação das MAPKs.

pJNK p54/ β -actina						
Não diabético						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	0,4470	1,1658	1,2384	1,2891	1,3103	1,0474
2	0,5377	0,5801	0,7402	0,6667	0,9143	1,3852
3	0,2971	0,5289	0,6780	0,8446	1,1823	0,7316
4	0,8047	1,2442	0,8546	1,3186	1,7946	1,2500
5	0,2306	0,3409	0,3178	0,4589	0,5951	0,8155
6	0,3637	0,4818	0,9752	0,9145	1,1429	0,8580
7	0,4527	0,6551	0,7919	0,6905	1,0522	1,6343
8	0,4545	0,6360	0,7692	0,4673	1,0060	0,7435
9						
Média	0,4485	0,7041	0,7957	0,8313	1,1247	1,0582
Desvio padrão	0,17	0,32	0,26	0,33	0,34	0,33
Erro padrão da média	0,06	0,11	0,09	0,12	0,12	0,12

pJNK p46/ β -actina						
Não diabético						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	0,280	0,379	0,554	0,815	0,752	1,066
2	0,227	0,366	0,311	0,398	0,457	0,700
3	0,553	0,895	0,586	0,801	0,843	0,755
4	0,229	0,182	0,239	0,343	0,311	0,646
5	0,205	0,155	0,274	0,540	0,364	0,487
6	0,179	0,290	0,423	0,450	0,599	0,780
7	0,340	0,341	0,365	0,412	0,633	0,394
8						
9						
Média	0,2876	0,3727	0,3930	0,5368	0,5657	0,6896
Desvio padrão	0,13	0,25	0,14	0,19	0,20	0,22
Erro padrão da média	0,05	0,09	0,05	0,07	0,07	0,08

pERK p 44/ β -actina						
Não diabético						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	0,9745	0,7698	0,7014	0,8311	0,9172	1,5103
2	1,9204	0,8528	1,0690	1,1517	1,3284	1,5941
3	1,6901	1,0672	0,9605	1,5006	1,5392	0,8153
4	0,6070	0,5785	0,5710	0,6944	0,4462	0,5747
5	0,7655	0,5399	0,6458	0,6612	0,8143	1,5941
6	0,9603	1,5520	0,7240	0,9678	0,8298	0,6578
7	1,1520	1,1538	0,7786	1,2087	0,8971	1,5155
8						1,1712
9						
Média	1,1528	0,9306	0,7786	1,0022	0,9675	1,1791
Desvio padrão	0,48	0,36	0,18	0,30	0,36	0,44
Erro padrão da média	0,18	0,13	0,07	0,11	0,14	0,17

Diabéticos		pJNK p54/ β -actina					
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	0,5116	0,9126	0,6354	0,7448	0,7256	0,7295	
2	1,4722	0,4879	0,3427	0,4119	0,7346	0,7812	
3	0,3000	0,3570	0,6298	0,5735	0,4485	2,2612	
4	1,2734	1,4289	0,5359	0,5767	0,7074	2,2639	
5							
6							
7							
8							
9							
Média	0,8893	0,7966	0,5360	0,5767	0,6540	1,5089	
Desvio padrão	0,57	0,48	0,14	0,14	0,14	0,87	
Erro padrão da média	0,29	0,24	0,07	0,07	0,07	0,44	

Diabéticos		pJNK p46/ β -actina					
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	3,0935	1,9256	1,2320	1,9536	1,2693	1,9208	
2	2,9571	1,6193	0,7831	1,1905	1,2923	2,3821	
3	3,1050	2,8431	0,9006	1,2222	1,2778	2,6649	
4							
5							
6							
7							
8							
9							
Média	3,0519	2,1294	0,9719	1,4554	1,2798	2,3226	
Desvio padrão	0,08	0,64	0,23	0,43	0,01	0,38	
Erro padrão da média	0,05	0,37	0,13	0,25	0,01	0,22	

Diabéticos		pPI3K p 55/ β -actina					
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	1,1876	1,5485	0,7806	2,0316	1,2648	0,6468	
2	1,3551	0,4928	0,5279	1,0158	1,4454	0,7784	
3	1,3325	1,7156	1,5631	1,6981	1,2509	1,2130	
4	0,8078	0,4617	1,0569	0,9421	1,4775	0,8073	
5							
6							
7							
8							
9							
Média	1,1708	1,0546	0,9822	1,4219	1,3596	0,8614	
Desvio padrão	0,25	0,67	0,44	0,53	0,12	0,24	
Erro padrão da média	0,13	0,34	0,22	0,27	0,06	0,12	

Diabéticos						
pERK p 42/β-actina						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	1,670	1,622	0,766	1,824	1,332	1,361
2	1,708	0,558	2,167	1,708	1,370	1,129
3	0,960	1,406	1,179	1,255	1,502	1,136
4	1,255	0,362	1,239	1,699	1,897	0,459
Média	1,3981	0,9869	1,3378	1,6218	1,5251	1,0214
Desvio padrão	0,36	0,62	0,59	0,25	0,26	0,39
Erro padrão da média	0,18	0,31	0,30	0,13	0,13	0,19

Diabéticos						
pP38/β-actina						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	0,3513	0,7904	0,8197	0,6852	0,7054	1,1377
2	0,2449	0,3286	0,5512	1,3416	1,1275	0,1348
3	0,3823	0,6151	0,8430	1,3228	0,6948	0,8624
Média	0,3262	0,5781	0,7380	1,1165	0,8425	0,7116
Desvio padrão	0,07	0,23	0,16	0,37	0,25	0,52
Erro padrão da média	0,04	0,13	0,09	0,22	0,14	0,30

APÊNDICE G - Tabela contendo valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referente à figura 14.

Não diabético						
AMPK/β-actina						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	0,0760	0,0669	0,1076	0,0832	0,1981	0,3387
2	0,0430	0,0566	0,1069	0,0824	0,1179	0,2516
3	0,0449	0,0420	0,0656	0,0397	0,1098	0,2590
4						
5						
6						
7						
8						
9						
Média	0,055	0,055	0,093	0,068	0,142	0,283
Desvio padrão	0,02	0,01	0,02	0,02	0,05	0,05
Erro padrão da média	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,03

Diabéticos		AMPK/ β -actina					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1		0,0885	0,1633	0,1013	0,1329	0,1837	0,4473
2		0,0470	0,0873	0,1110	0,0797	0,1177	0,4409
3		0,0239	0,0364	0,0328	0,0519	0,1124	0,5809
4		0,0246	0,0248	0,0402	0,0447	0,0385	0,4897
5							
6							
7							
8							
9							
Média		0,046	0,078	0,071	0,077	0,113	0,490
Desvio padrão		0,03	0,06	0,04	0,04	0,06	0,06
Erro padrão da média		0,02	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03
Não diabético		pS6/ β -actin					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1		0,4899	1,0505	0,6161	1,0687	0,6866	0,7195
2		0,4890	0,4016	0,4985	0,6939	0,4920	0,5493
3		0,3736	0,9358	0,7451	1,2143	0,9771	0,6370
4		0,4920	0,9156	0,4775	0,5640	0,6143	0,6233
5							
6							
Média		0,461	0,826	0,584	0,885	0,693	0,632
Desvio padrão		0,06	0,29	0,12	0,31	0,21	0,07
Erro padrão da média		0,03	0,14	0,06	0,15	0,10	0,03
Diabéticos		pS6/ β -actin					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1		0,5614	0,2782	0,3070	0,2274	0,3401	0,4756
2		0,7427	0,4105	0,5143	0,6709	0,6024	0,4293
3		0,3354	0,5702	0,5175	0,6677	0,8249	0,4781
4		0,5756	0,2933	0,1319	0,1152	0,7981	0,4904
5		0,6621	0,3880	0,3293	0,4200	0,7596	0,4176
6							
Média		0,575	0,388	0,360	0,420	0,665	0,458
Desvio padrão		0,15	0,12	0,16	0,25	0,20	0,03
Erro padrão da média		0,07	0,05	0,07	0,11	0,09	0,01
Não diabético		Lactato					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1		407,54	414,89	454,96	502,02	505,51	553,31
2		371,69	377,57	385,11	396,69	498,16	508,27
3		308,82	321,32	324,26	436,21	543,20	524,82
Média		363	371	388	445	516	529
Desvio padrão		49,97	47,10	65,40	53,21	24,16	22,78
Erro padrão da média		28,85	27,19	37,76	30,72	13,95	13,15

Diabéticos		Lactato					
Animal	5.5 mM	25 mM	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	192,10	245,59	273,71	325,00	419,67	435,11	
2	184,01	228,31	258,64	339,00	439,15	420,22	
3	210,29	291,18	273,35	317,00	425,74	446,88	
Média	195	255	269	327	428	434	
Desvio padrão	13,46	32,48	8,60	11,14	9,97	13,36	
Erro padrão da média	7,77	18,75	4,96	6,43	5,76	7,71	

Consumo de oxigênio na primeira hora de incubação									
Non-diabetic	5.5 mM			25 mM			40 mM		
Animal/Time (s)	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	69601	70975	74316	80120	81060	80131	81584	71458	77058
1,5	68325	70234	73302	70841	80705	83709	82665	71035	76191
3	65681	67364	70582	77541	80141	78846	81389	71851	76414
4,5	65573	68010	69749	76362	78625	79204	78763	69500	75079
6	62466	65374	67971	76607	76792	78629	74806	66801	73754
7,5	62346	64851	68221	86175	76189	77003	76104	67679	73660
9	62787	65896	67284	73933	76088	76019	75602	68869	73046
10,5	60602	63391	67301	73454	71949	75404	73592	67083	
12	59449	62225	65357	72404	74035	74356	71015	68284	69610
13,5	59775	62843	65076	71640	72414	73592	72921	72734	70115
15	60806	62775	65031	70371	77229	71545	73334	68239	70266
16,5	60091	61556	64206	71155	72678	72415	73162	71574	64568

Non-diabetic	5.5 mM + LPS			25 mM + LPS			40 mM + LPS		
Animal/Time (s)	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	84153	83186	82107	84954	69596	86950	89980		75726
1,5	86035	82189	80670	83244	69877	85699	87935	88096	72963
3	81893	80312	78832	80042	69238	84706	85656	81242	73682
4,5	81461	78001	77837	78832	66713	81038	83501	74437	72127
6	76009	76625	77274	78569	70723	81632	90607	76445	70566
7,5	77908	76508	75681	75439	67585	78576	79063	76044	69776
9	74908	75698	75159	76097	67136	78819	78852	76574	69907
10,5	78099	71869	73639	74669	64485	78421	75796	75228	69648
12	75122	73213	74826	74930	64603	78615	76955	74712	69279
13,5	73708	70787	75034	74186	63771	78102	69395	72780	67381
15	75221	70585	74514	74414	63530	77415	74952	69833	67003
16,5	72006	71058	71458	72916	63778	76571	75490	72573	66764
Diabetic	5.5 mM			25 mM			40 mM		
Animal/Time (s)	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	72249,5	72236	72263	74493,5	74480	74507	88265,5	88252	88279
1,5	70162,5	70149	70176	72199,5	72186	72213	88218,5	88205	88232
3	70534,5	70521	70548	73106,5	73093	73120	85866,5	85853	85880
4,5	69050,5	69037	69064	71578,5	71565	71592	83025,5	83012	83039
6	68420,5	68407	68434	70686,5	70673	70700	82319,5	82306	82333
7,5	65919,5	65906	65933	67430,5	67417	67444	82707,5	82694	82721
9	66105,5	66092	66119	67502,5	67489	67516	80541,5	80528	80555
10,5	65087,5	65074	65101	66861,5	66848	66875	79065,5	79052	79079
12	65158,5	65145	65172	66653,5	66640	66667	78139,5	78126	78153
13,5	63396,5	63383	63410	65688,5	65675	65702	76069,5	76056	76083
15	63728,5	63715	63742	64997,5	64984	65011	76247,5	76234	76261
16,5	64237,5	64224	64251	63401,5	63388	63415	76597,5	76584	76611

Diabetic	5.5 mM + LPS			25 mM + LPS			40 mM + LPS		
Animal/Time (s)	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	72323,5	72310	72337	74194,5	74181	74208	69553,5	69540	69567
1,5	70522,5	70509	70536	81941,5	81928	81955	68316,5	68303	68330
3	68600,5	68587	68614	71664,5	71651	71678	66300,5	66287	66314
4,5	65331,5	65318	65345	69058,5	69045	69072	65699,5	65686	65713
6	65327,5	65314	65341	60257,5	60244	60271	63260,5	63247	63274
7,5	65216,5	65203	65230	67021,5	67008	67035	62828,5	62815	62842
9	62144,5	62131	62158	66953,5	66940	66967	62625,5	62612	62639
10,5	67965,5	67952	67979	58442,5	58429	58456	62045,5	62032	62059
12	64793,5	64780	64807	66705,5	66692	66719	60443,5	60430	60457
13,5	61475,5	61462	61489	66359,5	66346	66373	62242,5	62229	62256
15	63050,5	63037	63064	72891,5	72878	72905	61726,5	61713	61740
16,5	61733,5	61720	61747	65934,5	65921	65948	61614,5	61601	61628

APÊNDICE H - Tabela contendo valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referente à figura 15, 16, 17 e 18.

APÊNDICE I - Tabela contendo valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referente à figura 19.

Não diabéticos						
TNF-α 3 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd	45,6	53,4	57
2	nd	nd	nd	56,8	47,9	39,2
3	nd	nd	nd	51,2	50,6	48,1
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	51	51	48
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	5,60	2,75	8,90
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	3,23	1,59	5,14
Não diabéticos						
TNF-α 6 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd	1279,3	1360,6	1507
2	nd	nd	nd	1169,2	1281,5	1380,5
3	nd	nd	nd	1571	1718,9	1790,8
4						
5						
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1340	1454	1559
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	207,63	233,08	210,12
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	119,87	134,57	121,31
Não diabéticos						
TNF-α 12 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd	1059,8	999	1228,2
2	nd	nd	nd	1304,8	1265,7	1297,3
3	nd	nd	nd	1329,8	1316,5	1408,2
4	nd	nd	nd	1171,5	1075,7	1275,7
5	nd	nd	nd	1431,5	1458,2	1507,3
6	nd	nd	nd	1700,7	1400,1	1510,2
7	nd	nd	nd	1677,1	1653,6	839,4
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1382	1310	1295
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	240,80	224,26	229,71
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	91,01	84,76	86,82
Não diabéticos						
TNF-α 24 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd	1150,7	1202,9	1312,9
2	nd	nd	nd	1341,4	1360,7	1411,4
3	nd	nd	nd	1289,3		1334,3
4	nd	nd	nd	1118,6	1195	1161,4
5	nd	nd	nd	1291,4	1325	1344,3
6	nd	nd	nd	1502,8	1528,9	1584,4
7	nd	nd	nd	1262,1	1546,2	1408
8	nd	nd	nd	1687,5	1809,2	1698
9	nd	nd	nd	1764,6	1909,2	1996,9
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1379	1485	1472
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	226,36	266,04	251,01
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	75,45	88,68	83,67

TNF- α 48 horas						
Não diabéticos	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
Animal						
1	275,21	158,17	337,27	1373	1279,1	1381,3
2	215,31	75,287	252,95	1291	1368,4	1373,1
3	245,26	116,7285	295,11	1545,6	1464,7	1388,2
Média	245	117	295	1403	1371	1381
Desvio padrão	29,95	41,44	42,16	129,96	92,82	7,56
Erro padrão da média	17,29	23,93	24,34	75,03	53,59	4,36
IL-6 3 horas						
Não diabéticos	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
Animal						
1	nd	nd	nd	45,6	53,4	57
2	nd	nd	nd	56,8	47,9	39,2
3	nd	nd	nd	51,2	50,65	48,1
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	51	51	48
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	5,60	2,75	8,90
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	3,23	1,59	5,14
IL-6 6 horas						
Não diabéticos	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
Animal						
1	nd	nd	nd	687,1	742,8	837,3
2	nd	nd	nd	618,7	655,8	657,6
3	nd	nd	nd	725,8	862,4	883,6
4	nd	nd	nd	943,7	1057,5	977,2
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	744	830	839
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	140,41	173,93	134,16
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	70,21	86,96	67,08
IL-6 12 horas						
Não diabéticos	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
Animal						
1	nd	nd	nd	792,9	797	867,3
2	nd	nd	nd	892	964,4	940,2
3	nd	nd	nd	1026,7	937,9	1062
4	nd	nd	nd	717,3	706,4	823,2
5	nd	nd	nd	850,8	883,2	920,2
6	nd	nd	nd	900,5	845,2	984,9
7	nd	nd	nd	987,7	816,4	845
8	nd	nd	nd	965,4	786,8	734,7
9	nd	nd	nd	1045,8	835,2	790,8
10	nd	nd	nd	1032,4	845,8	829,7
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	921	842	880
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	110,39	74,58	97,51
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	49,37	33,35	43,61

Não diabéticos						
IL-6 24 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd	933,9	923,4	993,1
2	nd	nd	nd	1039,2	1027,2	986
3	nd	nd	nd	989,2	985,4	968,6
4	nd	nd	nd	838,6	858,4	758,4
5	nd	nd	nd	861	872,2	895,7
6	nd	nd	nd	917,5	939,5	990,1
7	nd	nd	nd	1080,2	945	898
8	nd	nd	nd	1012,4	1013,2	935,1
9	nd	nd	nd	1147,2	1031,8	943,5
10	nd	nd	nd	1034	993,4	956,2
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	985,32	958,95	932,47
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	101,75	64,18	74,22
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	32,18	20,29	23,47
Não diabéticos						
IL-6 48 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	41	0	62,2	812,3	747,4	766,8
2	26	20,6	118,1	763,2	788,5	787,2
3	31,3	7,8	39,1	842,2	820,0	792,3
4				1252,1	1252,5	1241,4
5				1242,9	1281,0	1226,4
Média	33	9	73	983	978	963
Desvio padrão	7,61	10,40	40,62	243,56	265,16	247,71
Erro padrão da média	4,39	6,00	23,45	108,92	118,58	110,78
Não diabéticos						
IL-1 β - 24 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd	192,1	179,7	92,3
2	nd	nd	nd	174,0	181,2	163,3
3	nd	nd	nd	183,0	180,5	127,8
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	183	180	128
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	9,07	0,73	35,54
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	5,24	0,42	20,52
Não diabéticos						
IL-1 β - 48 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd	289,2	249,0	239,6
2	nd	nd	nd	346,7	345,4	409,2
3	nd	nd	nd	317,9	297,2	324,4
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	318	297	324
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	28,73	48,20	84,80
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	16,59	27,83	0,00

Não diabéticos						
IL-10 6 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	52,7	54,3	57,7	116	147,7	167,7
2	56	54,3	61	104,3	137,7	172,7
3	39,3	52,7	46	110,15	146	181
Média	49	54	55	110	144	174
Desvio padrão	8,84	0,92	7,88	5,85	5,35	6,72
Erro padrão da média	5,11	0,53	4,55	3,38	3,09	3,88
Não diabéticos						
IL-10 12 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	89,7	104,7	123	281,3	324,7	409,7
2	121,3	136,3	176,3	339,7	424,7	388
3	78	88	108	333	224,7	458
Média	96	110	136	318	325	419
Desvio padrão	22,40	24,53	35,90	31,96	100,00	35,83
Erro padrão da média	12,93	14,16	20,72	18,45	57,74	20,69
Não diabéticos						
IL-10 24 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	127,6	132,6	293,6	639,6	677,6	660,6
2	94,6	132,6	189,6	511,6	464,6	497,6
3	47,6	67,6	200,6	466,6	419,6	469,6
Média	90	111	228	539	521	543
Desvio padrão	40,20	37,53	57,13	89,76	137,82	103,15
Erro padrão da média	23,21	21,67	32,99	51,82	79,57	59,55
Não diabéticos						
IL-10 48 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	41,00	-0,80	62,20	219,50	167,57	201,55
2	26,00	20,60	118,10	152,12	256,85	201,18
3	31,30	7,80	39,10	244,81	131,19	175,96
4						
Média	33	9	73	1034	993,4	956,2
Desvio padrão	7,61	10,77	40,62	47,91	64,66	14,67
Erro padrão da média	4,39	6,22	23,45	27,66	37,33	8,47

Diabéticos						
TNF-α 3 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd	164,6	187,6	239,2
2	nd	nd	nd	128,1	224,7	188,8
3	nd	nd	nd	128,3	123,2	126,5
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	140	179	185
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	21,02	51,36	56,45
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	12,13	29,65	32,59
Diabéticos						
TNF-α 6 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd	1188,3	1123,4	510,6
2	nd	nd	nd	1366,6	1251,6	1133,9
3	nd	nd	nd	1389,2	1271,1	1219,7
4	nd	nd	nd	1072	1015,8	1034,2
5	nd	nd	nd	1199	1166,9	1005,6
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1315	1215	955
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	133,06	103,38	276,16
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	59,51	46,23	123,50
Diabéticos						
TNF-α 12 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd	1255,1	1140,6	1149
2	nd	nd	nd	1403,7	1212,7	819,4
3	nd	nd	nd	1169,7	1181,6	1067,1
4	nd	nd	nd	1102,3	1108,7	1172,2
5	nd	nd	nd	1197,1	1326	
6						
7						
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1226	1194	1052
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	113,72	83,75	161,44
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	50,86	37,45	72,20
Diabéticos						
TNF-α 24 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd	1145,49	1034,68	629,95
2	nd	nd	nd	1211,65	1223,07	957,72
3	nd	nd	nd	1040,35	1099,62	968,09
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1132	1119	852
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	86,39	95,70	192,30
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	49,87	55,25	111,03
Diabéticos						
TNF-α 48 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	50,69215	63,17973	93,03615	915,5533	935,6517	892,1693
2	29,90946	32,37392	70,0115	847,9946	848,5562	877,1776
3	87,68977	31,07354	35,99646	902,439	853,1759	919,7461
Média	56	42	66	889	879	896
Desvio padrão	29,27	18,17	28,70	35,82	49,01	21,59
Erro padrão da média	16,90	10,49	16,57	20,68	28,29	12,47

Diabéticos						
IL-6 3 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd	128,1	187,6	239,2
2	nd	nd	nd	164,6	224,7	188,8
3	nd	nd	nd	128,3	123,2	126,5
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	140	179	185
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	21,02	51,36	56,45
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	12,13	29,65	32,59
Diabéticos						
IL-6 6 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd	760	802,6	617
2	nd	nd	nd	772,8	670,8	543,4
3	nd	nd	nd	648,5	498,1	752,5
4	nd	nd	nd	628,6	682	674
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	702	663	647
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	74,44	125,30	88,49
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	37,22	62,65	44,25
Diabéticos						
IL-6 12 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd	1014,2	948,8	1041,1
2	nd	nd	nd	1081,5	1053,5	999,3
3	nd	nd	nd	998,3	994,3	1072,7
4	nd	nd	nd	1037,3	1003,2	1100,3
5	nd	nd	nd	1079,8	1098,8	
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1042	1020	1053
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	37,73	57,76	43,40
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	16,87	25,83	19,41
Diabéticos						
IL-6 24 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd	960,3	975,6	758,7
2	nd	nd	nd	996,1	952,4	988,5
3	nd	nd	nd	1030,8	1002	957,5
4	nd	nd	nd	961,3	956,8	970
5	nd	nd	nd	937	909,6	875,2
6						
7						
8						
9						
10						
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	977,1	959,28	909,98
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	36,69	33,96	95,03
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	16,41	15,19	42,50
Diabéticos						
IL-6 48 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	30,5	30,6	38,7	1212,3	1097,5	1164,0
2	33,1	83,9	74,0	1599,7	1593,5	1510,5
3	60,7	111,8	248,5	1620,3	1619,5	1623,5
4				1594,6	1614,0	1607,8
5				1283,2	1286,5	1361,7
6				1283,0	1349,6	1242,1
7				1304,7	1312,2	1312,3
Média	41,4523	75,41042	120,4102	1413,948286	1410,417857	1403,137429
Desvio padrão	16,75	41,27	112,36	180,99	202,19	180,30
Erro padrão da média	9,67	23,83	64,87	73,89	82,55	73,61

Erro padrão da média	9,67	23,83	64,87	73,89	82,55	73,61
Diabéticos						
IL-1β - 24 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd	181,7	175,3	152,2
2	nd	nd	nd	225,6	193,9	99,8
3	nd	nd	nd	203,7	184,6	126,0
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	204	185	126
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	21,95	9,33	26,22
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	12,67	5,39	15,14
Diabéticos						
IL-1β - 48 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd	243,3	254,5	
2	nd	nd	nd	237,0	235,2	216,5
3	nd	nd	nd	464,4	373,5	279,0
4	nd	nd	nd	377,3	355,5	335,4
5	nd	nd	nd	379,5	312,2	341,0
6	nd	nd	nd	375,6	273,4	344,4
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	346	301	303
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	88,82	55,87	55,38
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	39,72	24,99	24,77
Diabéticos						
IL-10 6 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd	100,4	103,8	139,8
2	nd	nd	nd	120,6	76,1	102,3
3	nd	nd	nd	110,5	89,95	121,05
Média						
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	10,10	13,85	18,75
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	5,83	8,00	10,83
Diabéticos						
IL-10 12 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	40,6	31	43,5	285	304,9	356
2	33,9	55,8	47,2	236,3	285,6	344,3
3	39,2	41,7	40,9	156,2	204,8	200,1
Média	38	43	44	226	265	300
Desvio padrão	3,53	12,44	3,17	65,03	53,11	86,83
Erro padrão da média	2,04	7,18	1,83	37,55	30,66	50,13
Diabéticos						
IL-10 24 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	167,1	122,6	163	458,8	471,3	486,2
2	185,9	125,6	86,9	418,2	381,1	426,8
3	226,4	199,1	244,3	719,7	691,3	547,4
4	171	143	216,2	529,2	421,9	491,9
Média	194	156	182	556	498	489
Desvio padrão	27,11	35,51	69,23	133,60	138,28	49,30
Erro padrão da média	13,55	17,75	34,62	66,80	69,14	24,65
Diabéticos						
IL-10 48 horas						
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	30,55	30,56	38,67	259,48	280,64	302,74
2	33,07	83,86	74,02	348,64	350,19	335,75
3	60,74	111,80	248,54	477,06	377,22	398,89
4				429,20	365,82	336,53
Média	41	75	120	379	343	343
Desvio padrão	16,75	41,27	112,36	95,47	43,33	40,16
Erro padrão da média	9,67	23,83	64,87	55,12	25,01	23,19

Não diabéticos		TNF- α 7 dias				
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	305	2119,2	1695,2	1562,7
2	nd	nd	300,5	1547,5	1379,9	1123,8
3	nd	nd	529,8	1792,7	1568,3	1421,6
4				1718,1	1514,7	1390,2
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	378	1794	1540	1375
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	131,11	239,61	130,59	183,24
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	75,69	119,80	65,29	91,62
Não diabéticos		IL-6 - 7 dias				
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	80,3985	10,5558	99,3432	753,1	726,3	705,5
2	161,3789	106,6013	36,1465	764,1	755,9	769,7
3	157,8633	133,3159	212,0809	793,6	759,2	797,3
Média	133	83	116	770	747	758
Desvio padrão	45,77	64,56	89,12	20,94	18,12	47,10
Erro padrão da média	26,43	37,27	51,45	12,09	10,46	27,19
Não diabéticos		IL-1 β - 7 dias				
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd	nd	nd	18,4
2	nd	nd	nd	nd	nd	18,5
3	nd	nd	nd	nd	nd	18,3
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	18
Desvio padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	0,09
Erro padrão da média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	0,05
Não diabéticos		IL-10 - 7 dias				
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	190,3	60,9	256,2	507,8	371,5	457,1
2	157,7	40,7	288,1	477,1	415,8	468,2
3	123,4	85,2	300,0	455,1	354,1	544,1
Média	157	62	281	480	380	490
Desvio padrão	33,47	22,25	22,67	26,47	31,83	47,34
Erro padrão da média	19,32	12,85	13,09	15,28	18,38	27,33
Não diabéticos		H2O2 7 dias				
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	36,2	18,9	21,7	32,0	9,0	17,9
2	32,7	10,5	25,4	46,1	14,2	23,4
3	34,0	19,2	27,9	24,6	13,2	15,3
Média	34	16	25	34	12	19
Desvio padrão	1,78	4,92	3,09	10,90	2,75	4,15
Erro padrão da média	1,03	2,84	1,78	6,30	1,58	2,40

Diabéticos		TNF- α 7 dias					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd		1241,2	1177,4	1079,4
2	nd	nd	nd		1237,2	1281,4	1297
3	nd	nd	nd		1347,5	1321,9	1356,6
Média							
Desvio padrão		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	62,56	74,54	145,91
Erro padrão da média		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	36,12	43,04	84,24
Diabéticos		IL-6 - 7 dias					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	157,0	112,1	565,0			1284,1	1301,0
2	123,7	59,0	554,0		1543,0	1180,0	1102,2
3	114,3	138,6	709,9		1452,4	1179,2	1189,8
4					1441,0	1160,9	1176,5
Média							
Desvio padrão		22,44	40,53	87,01	55,93	56,07	82,03
Erro padrão da média		12,95	23,40	50,23	32,29	28,04	41,01
Diabéticos		IL-1 β - 7 dias					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	nd	nd	nd		302,2	171,6	146,1
2	nd	nd	nd		300,3	259,9	168,2
3	nd	nd	nd		301,3	184,5	152,9
Média		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	301	205	156
Desvio padrão		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	0,96	47,73	11,32
Erro padrão da média		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	0,55	27,56	6,54
Diabéticos		IL-10 - 7 dias					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	437,3	144,3	314,1		265,3	238,4	182,9
2	491,8	309,2	504,2		211,1	216,2	174,2
3	472,4	227,0	409,2		257,3	271,2	229,2
Média		467	227	409	245	242	195
Desvio padrão		27,64	82,47	95,02	29,25	27,69	29,56
Erro padrão da média		15,96	47,62	54,86	16,89	15,99	17,07
Diabéticos		H2O2 7 dias					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	5,0	3,6	4,8		4,7	5,1	5,1
2	5,0	1,6	4,8		4,3	4,4	4,4
3	5,2	4,8	4,2		4,6	5,4	5,4
Média		5	3	5	5	5	5
Desvio padrão		0,12	1,66	0,36	0,19	0,51	0,51
Erro padrão da média		0,07	0,96	0,21	0,11	0,30	0,30
Diabéticos		NO 7 dias					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	2,37	2,15	2,17		3,53	4,06	3,80
2	2,66	2,72	2,56		5,01	5,41	5,48
3	2,34	2,44	3,74		4,01	4,93	4,64
Média		2	2	3	4	5	5
Desvio padrão		0,18	0,28	0,82	0,75	0,69	0,84
Erro padrão da média		0,10	0,16	0,47	0,44	0,40	0,49

Diabéticos		H2O2 após 24 horas					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1		30,2	18,0	25,2	30,2	18,0	25,2
2		24,8	19,0	15,8	24,8	19,0	15,8
3		26,7	19,7	23,0	26,7	19,7	23,0
4		23,8	29,2	20,3	23,8	29,2	20,3
Média		26,4	21,5	21,1	26,4	21,5	21,1
Desvio padrão		2,8	5,2	4,0	2,8	5,2	4,0
Erro padrão da média		1,4	2,6	2,0	1,4	2,6	2,0
Diabéticos		H2O2 após 48 horas					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1		6,0	5,5	5,6	6,7	6,6	6,7
2		6,0	5,1	5,5	6,6	6,6	6,4
3		5,4	5,8	5,8	7,0	6,6	6,8
Média		5,8	5,5	5,6	6,8	6,6	6,6
Desvio padrão		0,32	0,32	0,15	0,24	0,03	0,24
Erro padrão da média		0,19	0,19	0,09	0,14	0,02	0,14
Diabéticos		H2O2 7 dias					
Animal		5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1		5,0	3,6	4,8	4,7	5,1	5,1
2		5,0	1,6	4,8	4,3	4,4	4,4
3		5,2	4,8	4,2	4,6	5,4	5,4
Média		5	3	5	5	5	5
Desvio padrão		0,12	1,66	0,36	0,19	0,51	0,51
Erro padrão da média		0,07	0,96	0,21	0,11	0,30	0,30

APÊNDICE J - Tabela contendo valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referente à figura 20.

Não diabético		Índice fagocítico		
Animal		5,5 mM	25 mM	40 mM
1		850,0	997,0	1115,5
2		890,5	1160,0	1147,5
3		900,0	1323,0	1412,5
Média		880,2	1160,0	1225,2
Desvio padrão		26,55	163,00	163,02
Erro padrão da média		15,33	94,11	94,12
Diabéticos		Índice fagocítico		
Animal		5,5 mM	25 mM	40 mM
1		221,0	544,0	515,0
2		250,5	534,5	512,5
3		192,0	472,0	513,0
Média		221,2	516,8	513,5
Desvio padrão		29,25	39,12	1,32
Erro padrão da média		16,89	22,58	0,76

APÊNDICE K - Tabela contendo valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referente à figura 21.

Não diabético		LC3b/ β -actina					
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	0,46	0,24	0,29	0,38	0,46	0,5	
2	0,53	0,69	0,22	0,21	0,28	0,31	
3	0,22	0,34	0,31	0,49	0,39	0,4	
4	0,46	0,25	0,47		0,41		
5		0,5					
Média	0,4175	0,3800	0,3225	0,3600	0,3850	0,4033	
Desvio padrão	0,14	0,19	0,11	0,14	0,08	0,10	
Erro padrão da média	0,07	0,10	0,05	0,07	0,04	0,05	
Diabéticos		LC3b/ β -actina					
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	1,035714	1,358921	1,268657	1,427445	1,107143	2,365854	
2	1,010428	1,292364	1,032018	1,2594035	0,9772557	1,42132	
3	0,985141	1,225806	0,79538	1,091362	0,8473684		
Média	1,0104	1,2924	1,0320	1,2594	0,9773	1,8936	
Desvio padrão	0,03	0,07	0,24	0,17	0,13	0,67	
Erro padrão da média	0,01	0,04	0,14	0,10	0,07	0,39	
Não diabético		Beclin/ β -actina					
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	0,5025126	0,4111675	0,3995157	0,5245901	0,3211009	0,3190184	
2	0,5625	0,4516129	0,4311111	0,4539877	0,2714571	0,207191	
3	0,3293651	0,4518273	0,5036855	0,412	0,396728	0,3274854	
4	0,3516874	0,4227642	0,3950382	0,463526	0,298494	0,3558052	
5	0,485	0,4836363	0,5145229	0,5323864	0,2231156		
Média	0,4462	0,4442	0,4488	0,4773	0,3022	0,3024	
Desvio padrão	0,10	0,03	0,06	0,05	0,06	0,07	
Erro padrão da média	0,05	0,01	0,03	0,02	0,03	0,03	
Diabéticos		Beclin/ β -actina					
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	0,5789474	0,4403409	0,6164874	0,4238227	0,5431235	0,3652968	
2	0,3624454	0,1062663	0,4020888	0,4787234	0,3633027	0,2727273	
3	0,6020942	0,297037	0,5092881	0,562	0,6756757	0,31901205	
4	0,4448529	0,3501683		0,2562674	0,2594203		
Média	0,4971	0,2985	0,5093	0,4302	0,4604	0,3190	
Desvio padrão	0,11	0,14	0,11	0,13	0,19	0,05	
Erro padrão da média	0,06	0,07	0,05	0,06	0,09	0,02	

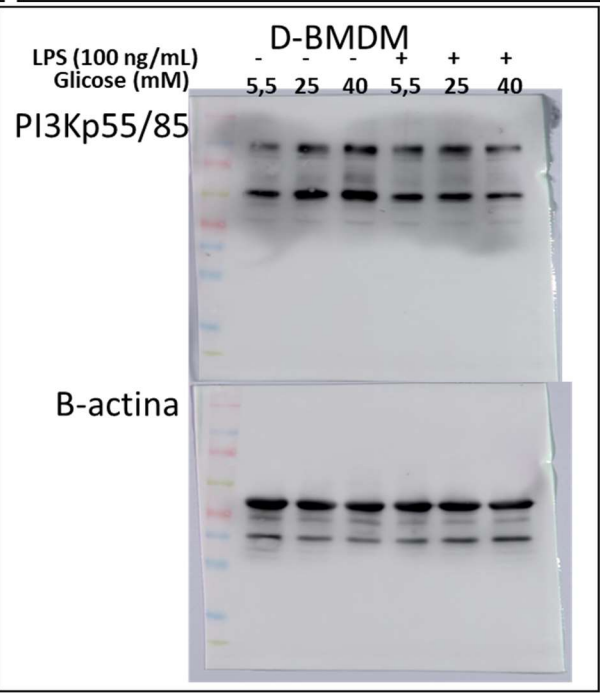
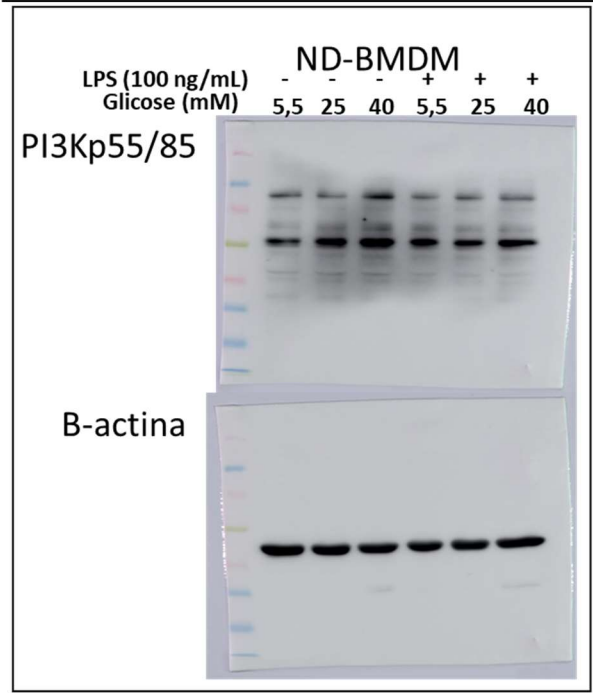
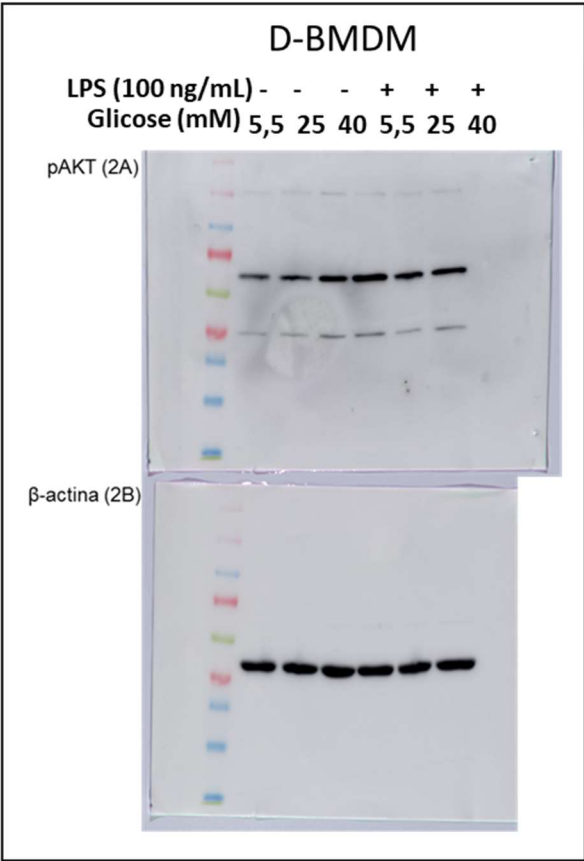
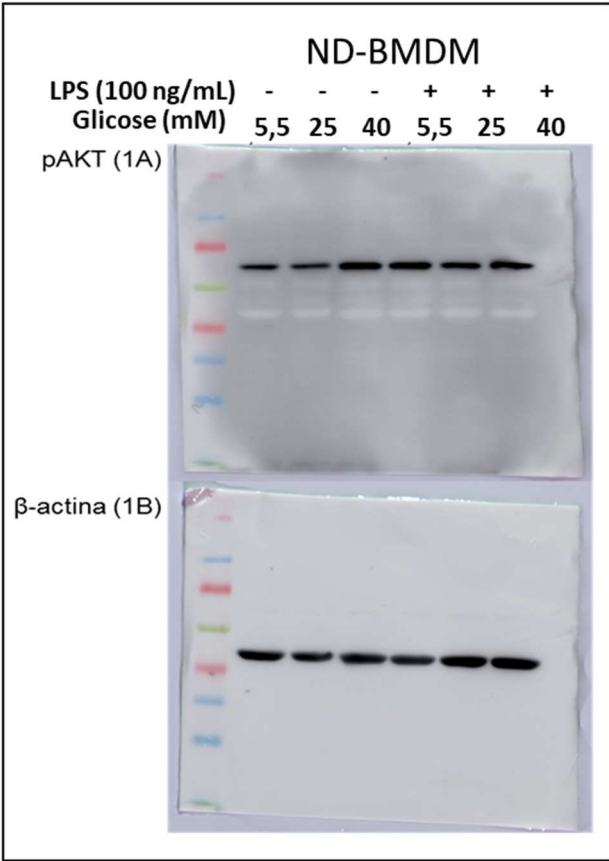
APÊNDICE L - Tabela contendo valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referente à figura 22.

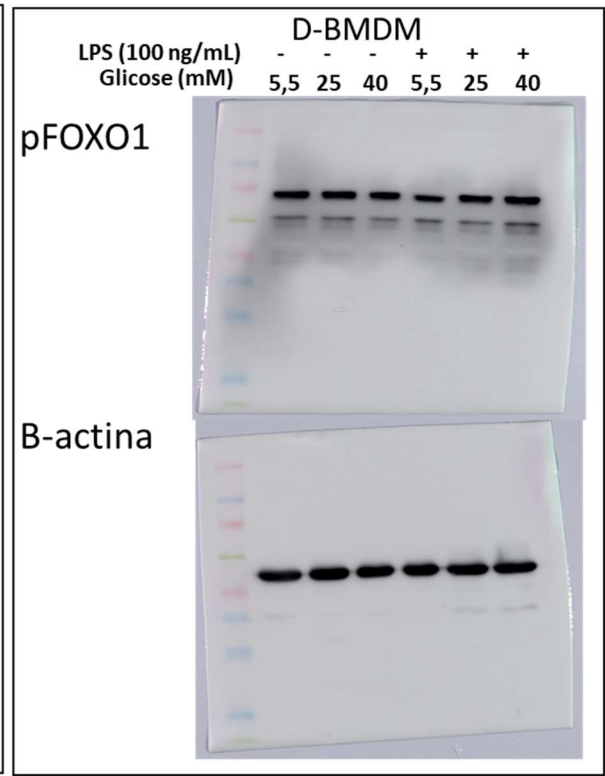
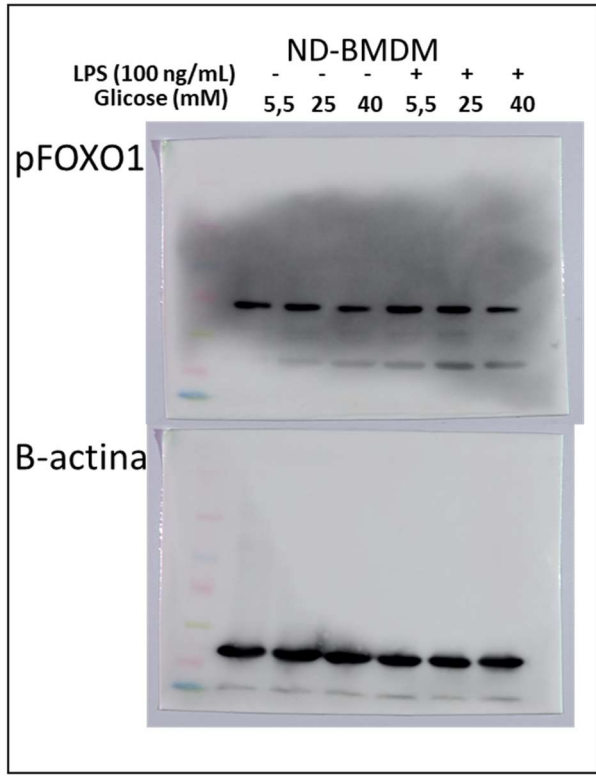
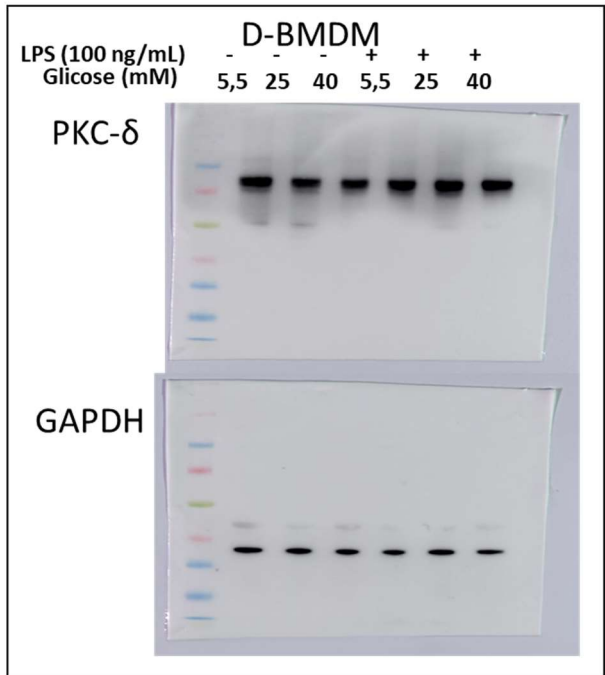
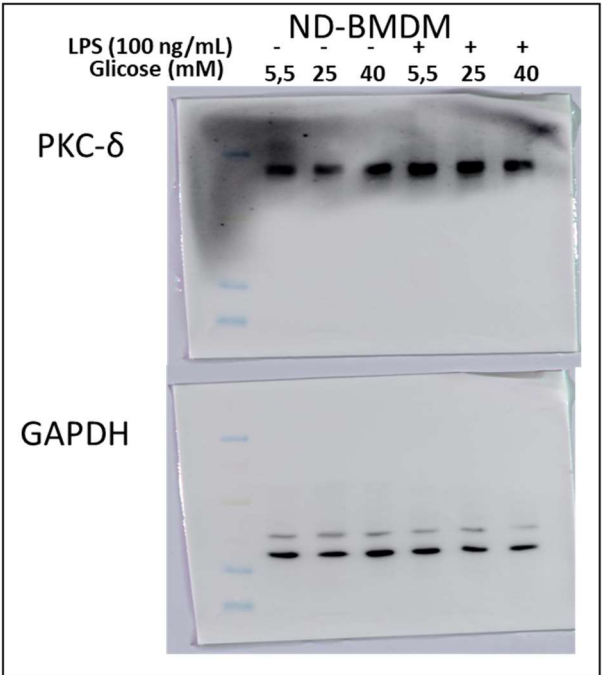
Não diabético		TNF- α 3 horas					
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	0	0	0	559	400,7	178,3	
2	0	0	0	271	829,9	719,9	
3	0	0	0	122,6	395,4	688,1	
4	0	0	0			91	
5							
Média	0,0000	0,0000	0,0000	317,5333	542,0000	419,3250	
Desvio padrão	0,00	0,00	0,00	221,89	249,34	330,90	
Erro padrão da média	0,00	0,00	0,00	128,11	143,96	165,45	
Diabéticos		TNF- α 3 horas					
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	0	0	0	152,6		170,7	
2	0	0	0	166,3	119	168,1	
3	0	0	0	199,5	181,9	157	
4	0	0	0	211,4	196,7	141,9	
Média	0,0000	0,0000	0,0000	182,4500	165,8667	159,4250	
Desvio padrão	0,00	0,00	0,00	27,57	41,26	13,11	
Erro padrão da média	0,00	0,00	0,00	13,79	20,63	6,55	
Não diabético		TNF- α 6 horas					
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	34,0416	69,9214	87,2176	362,112	280,9314	295,8552	
2	36,715	64,5058	86,8614	346,3942	319,4482	293,1448	
3	115,6698	216,6726	58,0286	381,5742	335,158	502,7894	
4	122,636	191,6704	57,049	378,6758	303,8818	545,5	
5	45,2094	81,8332	33,8442	587,4088	472,912	606,62	
6	46,1596	76,915	29,2472	615,436	495,4798	545,8586	
Média	66,7386	116,9197	58,7080	445,2668	367,9685	464,9613	
Desvio padrão	40,93	68,30	24,88	121,94	92,07	136,12	
Erro padrão da média	16,71	27,88	10,16	49,78	37,59	55,57	
Diabéticos		TNF- α 6 horas					
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS	
1	64,9	64,1	81,7	983,4	946,4	2150,7	
2	274,3	39,6	305,4	1513,7	1431	1987,4	
3	36,1	9,4	140,4	1442,8	1605,4	1705,2	
4			8,552357	1621,407	1551,628	1767,829	
5	8,313	21,86743	9,934786	1422,017	1525,364	1546,151	
Média	95,9033	33,7419	109,1974	1396,6648	1411,9584	1831,4560	
Desvio padrão	121,15	23,73	122,69	243,81	267,81	238,55	
Erro padrão da média	54,18	10,61	54,87	109,03	119,77	106,68	

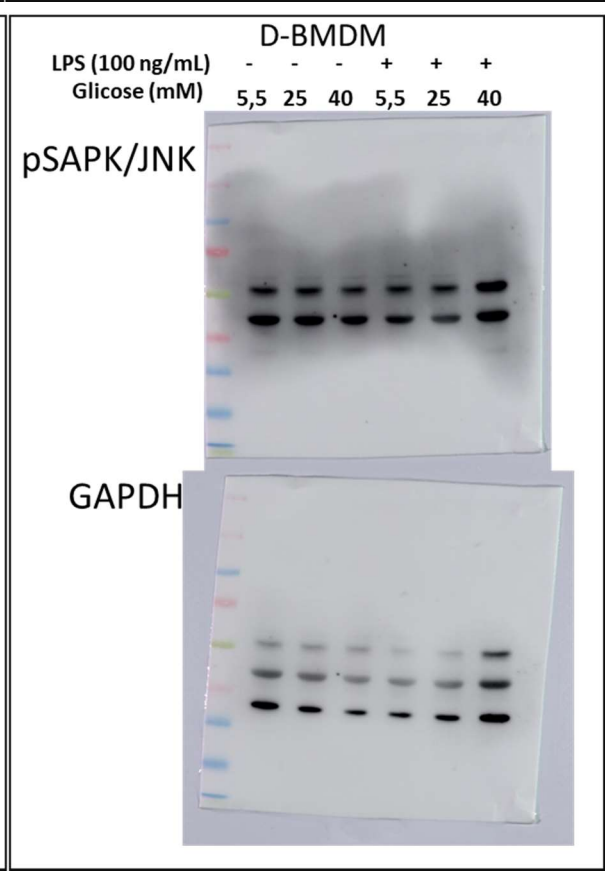
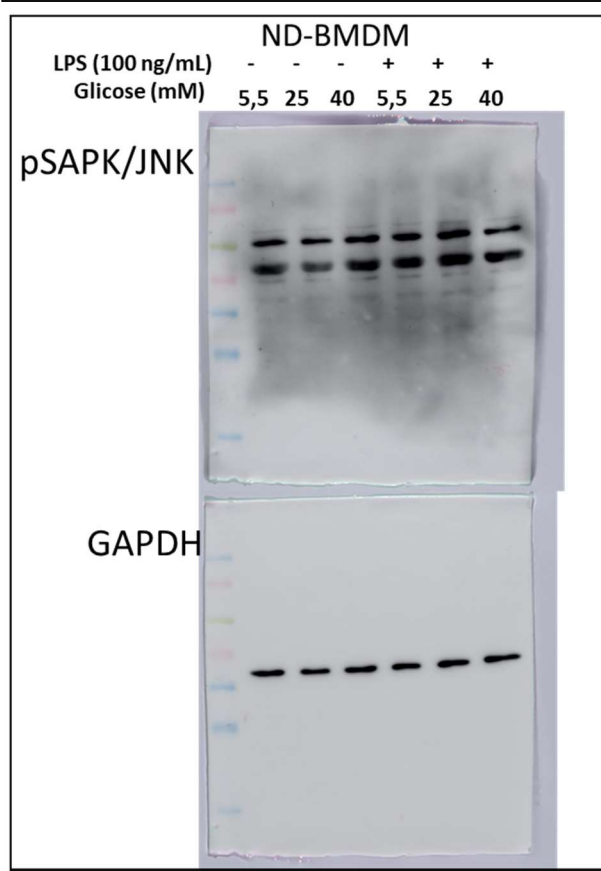
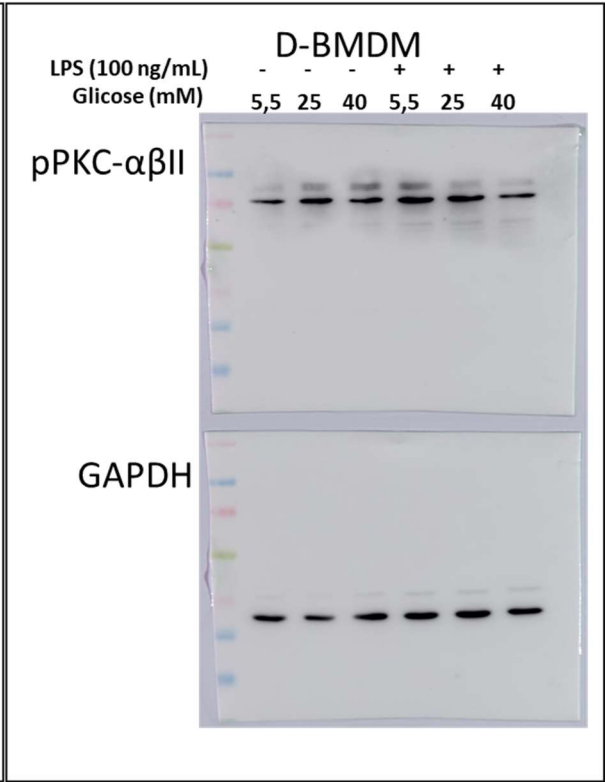
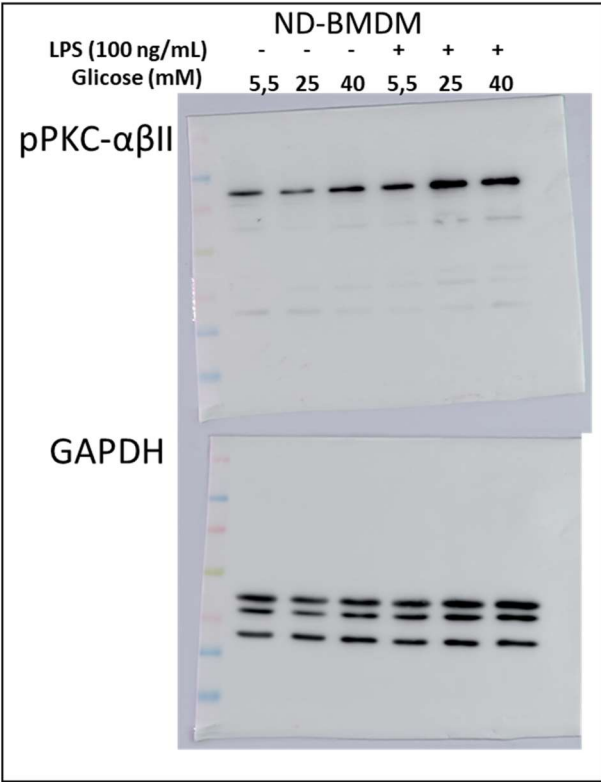
APÊNDICE M - Tabela contendo valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referente à figura 23.

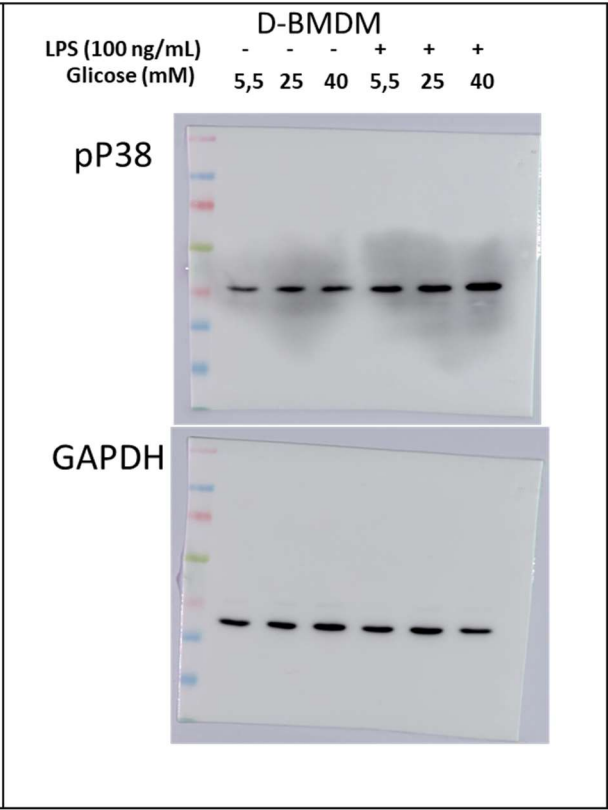
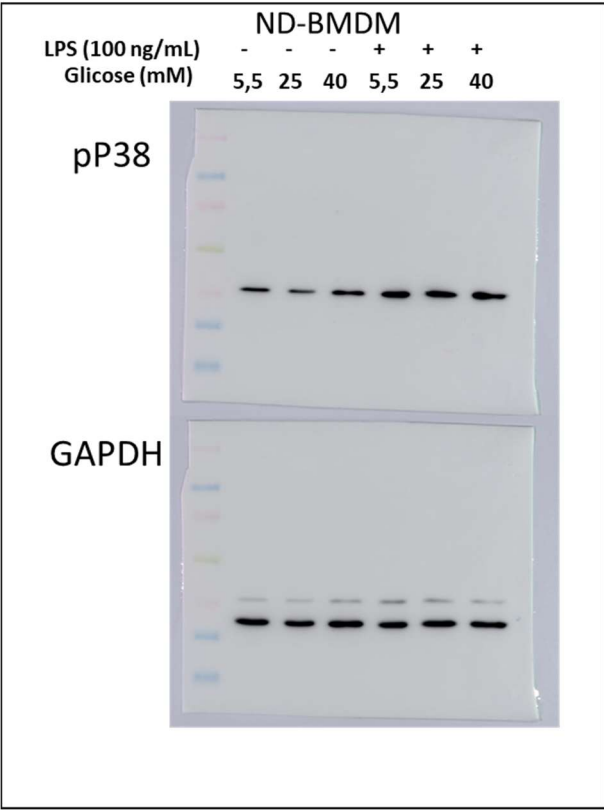
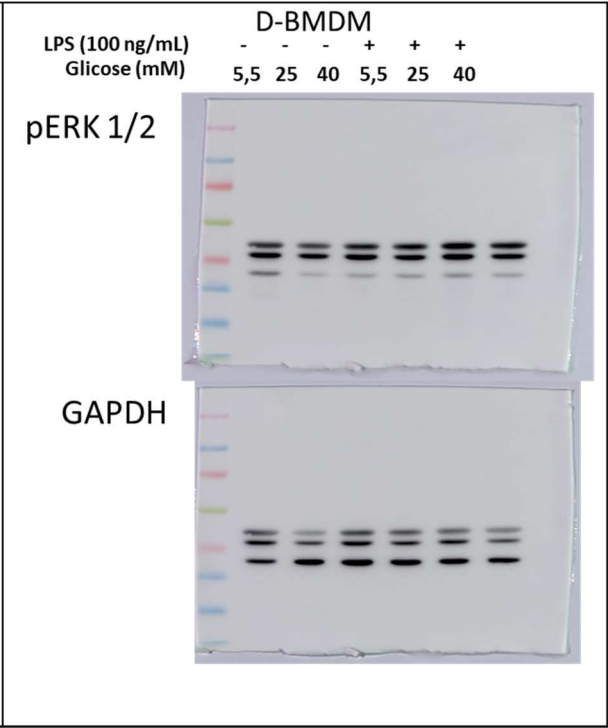
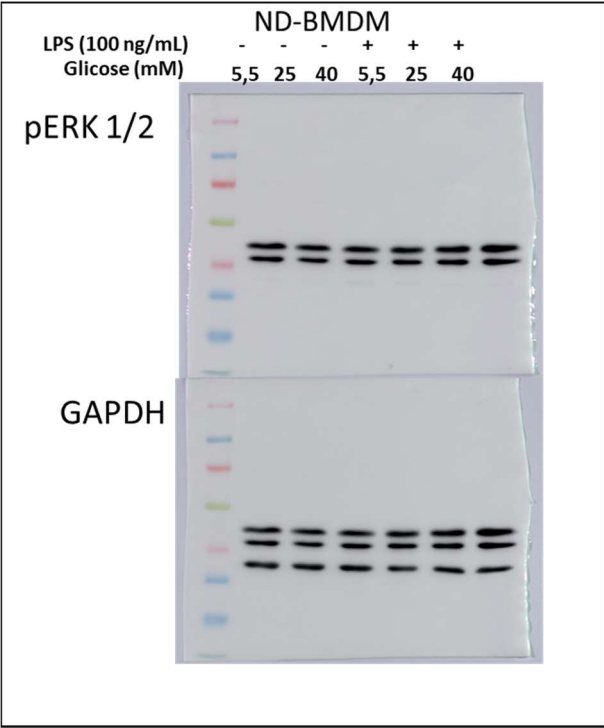
Não diabético		IL-6- α 3 horas				
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	0	0	49,6	22,1	487,1	655,4
2	0	0	54	86,4	591,5	678,2
3	0	0	51,8	120,5	31	260,5
4	0	0				226,9
5						
Média	0,0000	0,0000	51,8000	76,3333	369,8667	455,2500
Desvio padrão	0,00	0,00	2,20	49,97	298,07	244,84
Erro padrão da média	0,00	0,00	1,27	28,85	172,09	122,42
Diabéticos		IL-6- α 3 horas				
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	36		46,9	553	348,8	573,5
2	5,1	29,8	101,9	661,4	475,5	663,4
3	88,7	116,2	203,1	820	696,3	816,5
4	128,5	111,3	188,7	836,5	751,6	737
Média	64,5750	85,7667	135,1500	717,7250	568,0500	697,6000
Desvio padrão	54,84	48,53	73,89	135,25	188,66	103,70
Erro padrão da média	27,42	24,27	36,94	67,62	94,33	51,85
Não diabético		IL-6- α 6 horas				
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	0	0	0	200,7	196,7	589
2	0	0	0	62,2	155,6	125,8
3	0	0	0	192,2	233,7	217,6
4	0	0	0	128,8	14,2	323,5
5	0	0	0	269,2		674,1
6	0	0	0	54,9		
Média	0,0000	0,0000	0,0000	151,3333	150,0500	386,0000
Desvio padrão	0,00	0,00	0,00	84,56	96,02	236,74
Erro padrão da média	0,00	0,00	0,00	34,52	48,01	105,87
Diabéticos		IL-6- α 6 horas				
Animal	5.5 mM	25 Mm	40 mM	5.5 mM + LPS	25 mM + LPS	40 mM + LPS
1	6,8	4	89,1	639,3	569,4	965,2
2	303,3	284,3	411,4	840,1	773,9	978,3
3	210,9	132,1	345,5	945,5	951,8	931,7
4	88,70894	92,18325	66,02733	959,8837	939,2133	961,0963
5	124,0776	118,2236	96,23903	951,6632	941,6656	923,464
Média	146,7573	126,1614	201,6533	867,2894	835,1958	951,9521
Desvio padrão	114,12	101,47	163,45	136,50	165,95	23,32
Erro padrão da média	51,04	45,38	73,10	61,04	74,21	10,43

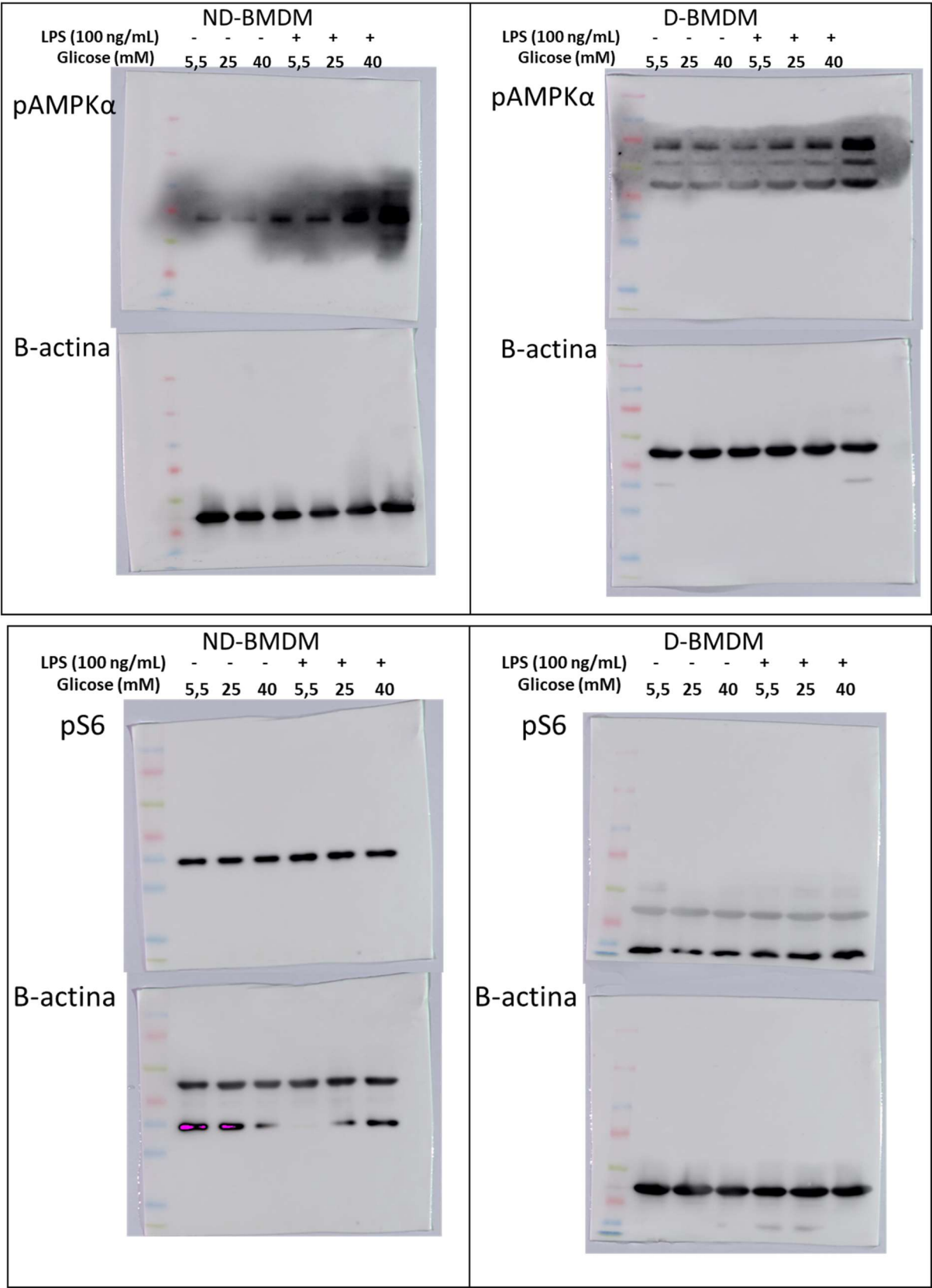
APÊNDICE N – Membranas representativas dos Western blot realizados nesta tese.



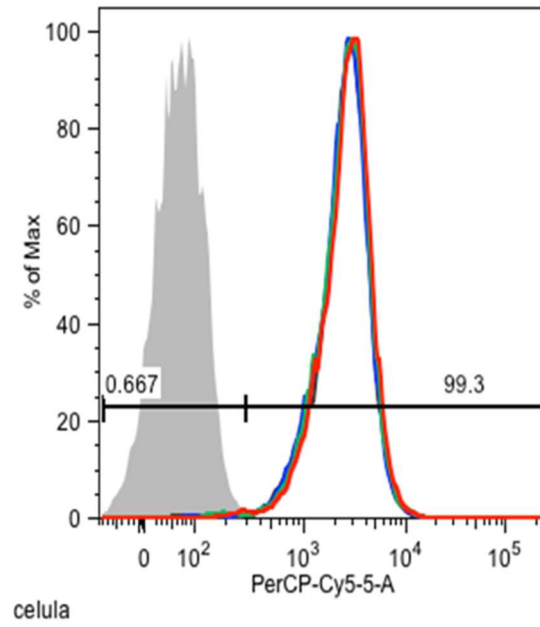








APÊNDICE O – Marcação negativa e positiva para F4/80



	Sample	Median:PerCP-Cy5-5-A
■	AMOSTRAS_F4,2f,80.fcs	2759
■	AMOSTRAS_3.fcs	2633
■	AMOSTRAS_2.fcs	2569
■	AMOSTRAS_1.fcs	2613
■	AMOSTRAS_SM.fcs	65.5