

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
Área de Fisiopatologia

Insulina regula a translocação nuclear de NF- $\kappa$ B p65,  
inflamação e morte celular em modelo experimental de sepse  
em camundongos diabéticos

Eduardo Lima Nolasco

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

São Paulo  
2017

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
Área de Fisiopatologia

Insulina regula a translocação nuclear de NF- $\kappa$ B p65,  
inflamação e morte celular em modelo experimental de sepse  
em camundongos diabéticos

Eduardo Lima Nolasco

Versão Original

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

São Paulo  
2017

**Ficha Catalográfica**  
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

---

Nolasco, Eduardo Lima  
N789i Insulina regula a translocação nuclear de NF- $\kappa$ B p65,  
inflamação e morte celular em modelo experimental de  
sepse em camundongos diabéticos / Eduardo Lima Nolasco.  
-- São Paulo, 2017.  
135p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas  
e Toxicológicas.

Orientador: Martins, Joilson de Oliveira

1. Diabetes Mellitus 2. Fisiopatologia. I. T. II. Martins,  
Joilson de Oliveira, orientador.

616.462 CDD

---

Eduardo Lima Nolasco

Insulina regula a translocação nuclear de NF- $\kappa$ B p65,  
inflamação e morte celular em modelo experimental de sepse  
em camundongos diabéticos

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do título de DOUTOR

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

---

1º Examinador

---

2º Examinador

---

3º Examinador

---

4º Examinador

São Paulo, 18 de maio de 2017.

## DEDICATÓRIA

*Dedico o presente trabalho à minha **Mãe** e a minha **Vó Luzia** pelo eterno apoio incondicional em tudo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço à minha grande pequena família por conviver com a distância e apoiar incondicionalmente todas as minhas decisões. Em seguida, todos os meus agradecimentos devem ser direcionados ao meu orientador, o Prof. Joilson por todos ensinamentos, supervisões, oportunidades, sugestões, conselhos e puxões de orelha. Sem a menor dúvida, se cheguei até aqui foi graças a ele.

Agradeço também a todos os membros do laboratório que de uma forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho. Um agradecimento especial aos membros de Pato Branco, Fernando e Thaís e ao meu parceiro de cidade Leonardo “Bonner”. Além disso agradeço aos supervisores e alunos de outros laboratórios como o Prof. Anderson, Prof. Rildo, Prof. Edson, Prof Sandro a Dr<sup>a</sup> Carla, Priscila Lara, Marcus Buri e ao meu grande amigo André “Salsa”. Um especial agradecimento ao Alexandre que realizou as análises bioquímicas com muita paciência, à Renata com toda sua gentileza, inteligência e paciência para realizar as análises de citometria e a Bete do laboratório de multiusuários da UNIFESP que me ajudou nas análises de microscopia confocal.

Um especial agradecimento a todos os colegas e amigos que eu deixei no Rolf Luft Centrum for Diabetes Research no Karolinska Institutet em Estocolmo. Um enorme muito obrigado para o Dr. Christopher Barker e a Dr<sup>a</sup> Elisabetta Daré que me ensinaram a pensar e agir como um pesquisador. A questionar o mundo a nossa volta e muito além disso, fazer a pesquisa pensando sempre no impacto positivo que isso pode causar na sociedade. Agradeço a ambos por me ensinar a importância de um elemento básico na pesquisa, saber onde queremos chegar e descobrir os caminhos para percorrer essa jornada.

Agradeço a todos os funcionários da USP, das meninas da limpeza que sempre nos recebem com um bom dia caloroso, dos técnicos, das meninas que trabalham na secretaria, de todos os membros das comissões que sempre me ajudaram.

Por fim, agradeço também às agências de fomento como a CNPq, FAPESP, CAPES e PROEX por darem o apoio necessário à realização desse projeto. Bem como a todos os docentes que participaram da minha formação.

**O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processos 2010/02272-0 e 2014/05214-1.**

## RESUMO

NOLASCO, E. L. **Insulina regula a translocação nuclear de NF- $\kappa$ B p65, inflamação e morte celular em modelo experimental de sepse em camundongos diabéticos** 2017. 135f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Sepse é uma resposta sistêmica e deletéria do indivíduo a uma infecção, sendo um importante problema de saúde pública. Pacientes diabéticos são bastante afetados representando cerca de 22% de todos os pacientes sépticos. A suscetibilidade para o desenvolvimento de sepse no diabetes, bem como a ação da insulina em modular alguns parâmetros imunológicos necessitam de maiores esclarecimentos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com insulina em um modelo murino de diabetes e sepse. Camundongos C57BL/6 foram tornados diabéticos por administração de aloxana. Os seguintes parâmetros foram analisados vinte e quatro horas após a ligadura cecal e punção (CLP): (a) *interleukine* (IL)-6, IL-10, *chemokine* (C-C motif) *ligand* 2 (CCL2) e *tumor necrosis factor* (TNF) - $\alpha$  no soro; (b) os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, *chemokine* (C-X-C motif) *ligand* (CXCL) -1 e CXCL2 no lavado peritoneal (LPe) e broncoalveolar (LBA), bem como nos rins e fígado; (c) contagens celulares totais e diferenciais em LPe e LBA; (d) capacidade endocítica de neutrófilos e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO); (e) níveis de apoptose e necrose no baço e níveis relativos de células CD4+ e CD8+; (f) resultados histopatológicos de pulmão, rim e fígado; e (g) níveis de translocação nuclear de NF- $\kappa$ B p65. Camundongos diabéticos-CLP exibiram concentrações séricas aumentadas de TNF- $\alpha$ , IL-6, CCL2, IL-1, IL-6, CXCL1, CXCL2 e IL-10 e contagens de neutrófilos em LPe. A capacidade endocítica dos neutrófilos e a produção de ERO apresentavam-se reduzidas em animais CLP-diabéticos e os níveis de IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL1 e CXCL2 em LBA e IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL1 e CXCL2 nos homogenizados renais aumentaram diabéticos -CLP. O tratamento destes com insulina reduziu os níveis de citocinas séricas, aumentou a concentração de citocinas e a migração celular para o Lpe, restaurou a capacidade endocítica e a produção de ERO e reduziu a translocação nuclear NF- $\kappa$ B p65 no tecido renal. Estes dados sugerem que a insulina modula a produção/libertação de citocinas, regula a migração celular, a apoptose, a necrose e a translocação nuclear de NF- $\kappa$ B p65 na sepse induzida por CLP em camundongos diabéticos.

**Palavras-chave:** Diabetes mellitus, CLP, Sepses, Citocinas, disfunção de órgãos, lesão renal

## ABSTRACT

NOLASCO, E. L. **Insulin regulates NF- $\kappa$ B p65 nuclear translocation, inflammation and cell death in septic diabetic mice.** 2017. 135f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Sepsis is a systemic and harmful response of the individual to infection and is an important public health problem. Diabetic patients are greatly affected representing about 22% of all septic patients. The susceptibility to sepsis development in diabetic individuals and insulin action in modulating some immunological parameters require further clarification. The aim of this study was to evaluate the effects of insulin treatment in a mouse model of diabetes and sepsis. C57BL/6 mice were rendered diabetic by alloxan administration. The following parameters were analyzed twenty-four hours after a cecal ligation and puncture (CLP): (a) interleukin (IL)-6, IL-10, chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  levels in serum; (b) IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)1 and CXCL2 levels in peritoneal lavage (PeL) and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid, as well as in the kidneys and liver; (c) total and differential cell counts in PeL and BAL fluid; (d) neutrophil endocytic capacity and reactive oxygen species (ROS) production; (e) spleen cell apoptosis and necrosis levels and relative CD4+ and CD8+ T cell levels; (f) lung, kidney, and liver histopathological results; and (g) NF- $\kappa$ B p65 nuclear translocation levels. Diabetic-CLP mice exhibited increased serum TNF  $\alpha$ , IL-6, CCL2, IL-1, IL-6, CXCL1, CXCL2, and IL-10 concentrations and neutrophil counts in PeL fluid. Neutrophil endocytic capacity and ROS production were decreased in diabetic-CLP mice, and IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL1 and CXCL2 levels in BAL fluid and IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL1 and CXCL2 levels in kidney homogenates were increased in diabetic-CLP mice. Treatment of these mice with insulin reduced serum cytokine levels increased cytokine and cell migration into PeL fluid, and restored neutrophil endocytic capacity and ROS production and NF- $\kappa$ B p65 nuclear translocation in the kidney. These data suggest that insulin modulates cytokine production/release, regulates cellular migration, apoptosis, necrosis and NF- $\kappa$ B p65 nuclear translocation in CLP-induced sepsis in diabetic mice.

**Keywords:** Diabetes mellitus, CLP, Sepsis, Cytokines, organ dysfunction, kidney injury

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AGE	<i>Advanced Glycation End Products</i> (Produtos de Glicação Avançada)
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
ALT	Alanina Aminotransferase
AKI	<i>Acute Kidney Injury</i> (Lesão Aguda Renal)
ALI	<i>Acute Lung Injury</i> (Lesão Aguda Pulmonar)
AP	<i>Activator Protein</i> (Proteína ativadora)
AST	Aspartato Aminotransferase
BB	<i>Bio Breeding</i>
BPM	Batimentos por minuto
CARS	<i>Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome</i> (Síndrome da Resposta Anti-inflamatória Compensatória)
CCL2	<i>Chemocine c-c Motif Ligand-2</i> (C-C quimiocina ligante 2)
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Grupo de diferenciação)
CLP	<i>Cecal Ligation and Puncture</i> (Ligadura e perfuração do Ceco)
COX	Ciclooxigenase
CXCL	<i>C-X-C motif ligand</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i> (Padrões Moleculares Associados a Dano Celular)
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated kinase</i> (Quinase Regulada por um Sinal Extracelular)
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FAL	Fosfatase Alcalina
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
FiO <sub>2</sub>	Fração inspirada de oxigênio
GLUT	<i>Glucose Transporter</i> (Transportador de Glicose)
HNF	<i>Hepatocyte Nuclear Factor</i> (Fator Nuclear do Hepátocito)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Virus da Imunodeficiência humana)

HMGB-1	<i>High Mobility group-B1</i> (Proteína do grupo de alta mobilidade B1)
ICAM	<i>Intracellular Adhesion Molecule</i> (Molécula de Adesão Intracelular)
IFN	<i>Interferon</i>
I $\kappa$ -B	<i>Inhibitory kappa-B</i>
IL	<i>Interleukin</i> (Interleucina)
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> (Óxido Nítrico Sintetase Induzível)
IPF	<i>Insulin Promoter-Factor</i>
IRF	<i>Interferon Regulatory Factors</i> (Fator Regulador de Interferon)
LBP	<i>Lipopolysaccharide-Binding Protein</i> ( Proteína ligante de LPS)
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i> (Lipopolisacarídeo)
LTA	<i>Lipoteichoic Acid</i> (Ácido Lipoteicóico)
MA	Macrófagos Alveolares
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemotatic Protein-1</i> (Proteína Quimiotática de Monócito 1)
MHC-II	<i>Major Histocompatibility Complex Class II</i> (Complexo de Histocompatibilidade da Classe 2)
MODS	<i>Multiple Organs Dysfunction Syndrome</i> (Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos)
MODY	<i>Maturity-Onset Diabetes of the Young</i> )
MyD88	<i>Myeloid Differentiation factor 88</i> (Fator de Diferenciação Mielóide 88)
MPO	Mieloperoxidase
NAFLD	<i>Nonalcoholic Fatty Liver Disease</i> (Esteatose Hepática Não-Alcoólica)
NET	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor-kappa B</i> (Fator de Transcrição Nuclear kappa B)
NO	<i>Nitric Oxide</i> (Óxido Nítrico)
NOD	<i>Nucleotide-binding Oligomerisation Domain</i> (Domínio de Oligomerização de Ligação de Nucleotídeo)
NOD	<i>Non-Obese Diabetes</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	<i>Platelet Activator Factor</i> (Fator Ativador de Plaquetas)

PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor type 1</i> (Inibidor do Ativador de Plasminogênio 1)
PAM	Pressão Arterial Média
PAMP	<i>Pathogens Associated Molecular Pattern</i> (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)
PaO <sub>2</sub>	Pressão Parcial de Oxigênio
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PcR	Proteína-C reativa
PK	<i>Protein Kinase</i> (Proteína Quinase)
PMN	Polimorfonucleares
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i> (Receptores que reconhecem padrões)
RNI	Relação Normalizada Internacional
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica)
SSC	<i>Surviving Sepsis Campaign</i> (Campanha Sobrevivendo a Sepsis)
SREBP-1	<i>Sterol Response Element-Binding Protein-1c</i> (Protéina Ligadora do Elemento Regulado por Esteróis-1c)
TIR	<i>Toll interleukin-1 receptor</i> (Receptor <i>Toll</i> -IL-1)
TLR	Toll-Like Receptors (Receptores do tipo <i>Toll</i> )
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
TRAM	<i>TRIF-Related Adapter Molecule</i> (Molécula Adaptadora Relacionada ao <i>Trif</i> )
TREM	<i>triggering receptor expressed on myeloid cells</i>
TRIF	<i>Toll interleukin-1 Receptor Domain-Containing Adapter Inducing IFN</i> (Adaptador Contendo o Domínio TIR induzindo <i>Interferon</i> )
TTP	Tempo de Tromboplastina Parcial
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Resposta Imunológica na Sepse	21
<b>Figura 2.</b>	Resposta imunológica a trauma e sepse	23
<b>Figura 3.</b>	Delineamento experimental	45
<b>Figura 4.</b>	Animais diabéticos apresentam menor ganho de peso e hiperglicemia após 10 dias do estabelecimento da doença	55
<b>Figura 5.</b>	O tratamento cirúrgico para indução da sepse (CLP) e a insulina provocaram redução da glicemia.	56
<b>Figura 6.</b>	Insulina previne o aumento das concentrações sanguíneas de citocinas pró-inflamatórias e reduz a razão IL6:IL10	57
<b>Figura 7.</b>	Insulina aumenta a quimiotaxia de polimorfonucleares e mononucleares para o lavado peritoneal	58
<b>Figura 8.</b>	Insulina aumenta a concentração de citocinas/quimiocinas e reduz a razão IL6:IL10 no lavado peritoneal.	59
<b>Figura 9.</b>	Insulina restaura a capacidade endocítica e a produção de espécie reativas de oxigênio de neutrófilos do lavado peritoneal	60
<b>Figura 10.</b>	Insulina previne a depleção celular total por apoptose e necrose em tecido esplênico	61
<b>Figura 11.</b>	Insulina restaura a porcentagem de células CD4+ mas não CD8+ em tecido esplênico.	62
<b>Figura 12.</b>	Insulina previne o acúmulo de polimorfonucleares no lavado broncoalveolar	63
<b>Figura 13.</b>	Insulina reduz o perfil pró-inflamatório e aumenta a concentração de IL-10 no lavado broncoalveolar	64
<b>Figura 14.</b>	Insulina previne o acúmulo proteico em lavado broncoalveolar.	65
<b>Figura 15.</b>	Insulina previne o aumento da concentração de AST sem interferir nos demais parâmetros bioquímicos hepáticos	66
<b>Figura 16.</b>	Insulina reduz o perfil pró-inflamatório em tecido hepático.	67
<b>Figura 17.</b>	Insulina reduz a concentração sanguínea de creatinina	69
<b>Figura 18.</b>	Insulina reduz o perfil pró-inflamatório e aumenta a concentração de IL-10 em tecido renal	70
<b>Figura 19.</b>	Insulina protege o tecido renal de alterações histopatológicas	71
<b>Figura 20.</b>	Insulina previne a translocação nuclear da fração p65 do NF-κB	72

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	16
<b>1.1 Sepses: Definições, aspectos patofisiológicos e epidemiológicos</b>	18
1.1.1 Sepses e a Tempestade de Citocinas	24
<b>1.2 Diabetes mellitus: Aspectos etiológicos e epidemiológicos</b>	26
1.2.1 Diabetes e inflamação	28
1.2.2 Diabetes, insulina e sepses	32
<b>1.3 Modelos experimentais de diabetes e sepses</b>	34
<b>1.4 Justificativa do estudo</b>	38
<b>2 OBJETIVOS</b>	41
2.1 Objetivo geral	41
2.2 Objetivos específicos	41
<b>3 Material e Métodos</b>	43
3.1 Animais	43
3.2 Indução do DM	43
3.3 Modelo CLP de sepses e tratamento com insulina	43
3.4 Tratamentos com insulina	44
3.5 Delineamento experimental	44
3.6 Análises Bioquímicas	45
3.7 Coleta e Análise dos Lavados Broncoalveolar e Peritoneal	45
3.8 Análise Histopatológicas	46
3.9 Fenotipagem de neutrófilos	47
3.10 Capacidade endocítica <i>in vitro</i>	47
3.11 Detecção intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio	48
3.12 Quantificação de citocinas e quimiocinas séricas por <i>Cytometric Bead Array</i>	48
3.13 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ensaio imunoenzimático em amostras de LBA, LPe, Rim e Fígado	49
3.14 Ensaio de apoptose (Anexina V/Iodeto de propídio) em baço	50
3.15 Marcação de CD4/CD8 no baço	50
3.16 Expressão de NF- $\kappa$ B subunidade p65 por microscopia confocal	50
3.17 Obtenção e análise histológica dos cortes de tecido pulmonar, renal e hepático	51
3.18 Vias de sinalização em rim, fígado e pulmão por <i>Immunoblot</i>	52
3.19 Análise Estatística	52
<b>4 RESULTADOS</b>	55
4.1 Caracterização do modelo de DM e CLP	55
4.2 Insulina previne o aumento dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias	56
4.3 Insulina intensifica a migração leucocitária e a liberação de citocinas/quimiocinas no LPe	57
4.4 Insulina restaura a capacidade endocítica e a produção de EROs dos neutrófilos de animais diabéticos sépticos	60
4.5 Insulina previne a depleção celular total e aumenta a quantidade de células CD4 <sup>+</sup> mas não CD8 <sup>+</sup> no baço	61
4.6 Insulina restaura parâmetros pró-inflamatórios e aumenta a produção de IL-10 no tecido pulmonar	62
4.7 Insulina restaura parâmetros pró-inflamatórios e aumenta a produção de IL-10 no tecido hepático	65

4.8 Insulina bloqueia o perfil pró-inflamatório e aumenta a produção de IL-10 no tecido renal .....	68
4.9 Insulina protege o tecido renal de alterações histopatológicas ao inibir a translocação nuclear de NF- $\kappa$ B .....	70
5 DISCUSSÃO .....	74
6 CONCLUSÃO .....	88
REFERÊNCIAS .....	89
APÊNDICES .....	109
ANEXOS .....	134

# 1 INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

Sepse é uma síndrome com múltiplas facetas causada por uma infecção acompanhada por uma resposta imune desregulada do hospedeiro que leva à disfunção orgânica potencialmente fatal (SINGER et al., 2016) causando mais óbitos mundialmente por ano que doenças como câncer de próstata, de mama e HIV/AIDS combinados (REINHART et al., 2012).

Devido à significativa heterogeneidade clínica e biológica, a sepsé é a principal causa de morte por infecção e esta entre as quatro condições clínicas mais caras do EUA, representando mais de 20 bilhões de dólares em despesas hospitalares totais. A incidência desta síndrome está aumentando devido ao envelhecimento da população geral, aumento da incidência de comorbidades, como *diabetes mellitus* (DM) e outras doenças crônicas que apresentam maior risco de infecção (MAGLIANO et al., 2015; TREVELIN et al., 2017). Além disso, estudos mostraram que indivíduos diabéticos são mais susceptíveis a infecções de corrente sanguínea e mais propensos a desenvolver complicações decorrentes da sepsé do que pacientes não-diabéticos (STOECKLE et al., 2008).

Os mecanismos para esta susceptibilidade aumentada à infecção ainda não foi totalmente elucidado, no entanto, vários estudos têm demonstrado que o DM compromete o sistema imunológico (YANO et al., 2012). Desas forma, a redução das funções neutrofílicas (fagocitose reduzida, *killing* bacteriano e a produção de citocinas) (YANO et al., 2012; SCHUETZ; CASTRO; SHAPIRO, 2012), a disfunção das células T e a diminuição da produção de anticorpos contra antígenos (SCHUETZ; CASTRO; SHAPIRO, 2012), pode explicar parcialmente o aumento da susceptibilidade às infecções exibidas por pacientes com DM. Além disso, a reduzida capacidade de migração neutrofílica para o foco da infecção esta diretamente relacionada com a alta taxa de mortalidade de sepsé (RIMMELÉ et al., 2016).

Estudos mostraram que a quimiotaxia dos neutrófilos na sepsé diminui com o aumento da gravidade da síndrome. Esse parâmetro pode ser útil para o diagnóstico da gravidade da sepsé (ALVES-FILHO; SPILLER; CUNHA, 2010), assim como o aumento da apoptose de células

efetoras imunes é um importante achado fisiopatológico relacionado à mortalidade (PATIL et al., 2017). A perda de células CD4 + e CD8 + afetam diversas funções imunes adaptativas que podem alterar o prognóstico de pacientes com sepse (UNSINGER et al., 2010; CABRERA-PEREZ et al., 2014).

Dentro do perfil de pacientes que evoluem para sepse, os diabéticos tem sido objetivo de vários estudos devido à maior susceptibilidade às infecções e, além disso, a presença dessa morbidade já foi demonstrada de estar relacionada com o maior risco de disfunção de órgãos causados pela sepse (VIEIRA et al., 2014).

Comparados com não-diabéticos o risco relativo de desenvolvimento de sepse por indivíduos com DM é de 2,5 a 6. Assim, essa síndrome permanece como um importante problema clínico, particularmente para esse tipo de pacientes (STEGENGA et al., 2010).

A heterogeneidade da síndrome engloba diversas interações entre estímulo imunológico, inflamação sistêmica e coagulopatias que variam em grau e intensidade entre os indivíduos (BOOMER; GREEN; HOTCHKISS, 2014). Nesse contexto, pode ser que novas intervenções que afetem vias de sinalização e revertam essa série de eventos adversos promovendo uma imunomodulação seja uma alternativa possível (BOSMANN; WARD, 2013).

A insulina geralmente é usada no tratamento clínico como um regulador metabólico ao reduzir os efeitos deletérios da hiperglicemia e melhorar a regulação anabólica de proteínas e lipídios. No entanto, a ação desse peptídeo em receptores e em células relacionadas ao sistema imune demonstraram efeito na regulação da inflamação e da resposta imunológica (DENG; CHAI, 2009). O perfil anti-inflamatório da insulina já foi demonstrado tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Assim, em concentrações fisiológicas relevantes ela suprime o *nuclear factor – kappa B* (NF- $\kappa$ B), que é principal fator de transcrição nuclear pró-inflamatório, reduz a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), a expressão de *toll-like receptor* (TLR) –4, TLR-2 e TLR-1 bem como da molécula CD14, *high mobility group-B1* (HMGB-1), *p-38 mitogen-activated protein* (MAP) *kinase*, *c-jun NH2-terminal kinase* (DANDONA et al., 2013).

Além do aspecto imunomodulatório, um estudo de 2001 utilizando a insulinoterapia para um controle restrito da glicemia (entre 80 mg/dL – 100 mg/dL) em pacientes pós-cirúrgicos de uma UTI, reduziram de 8 para 4,6% a mortalidade (VAN den BERGHE et al., 2001). Até esse ano, a hiperglicemia em pacientes não diabéticos era pouco avaliada nas UTI (MEYFROIDT; INGELS; VAN den BERGHE, 2011) e, baseado nesses estudos, vários grupos médicos passaram a recomendar o controle glicêmico com uma intensiva insulinoterapia em pacientes críticos (ANGUS; ABRAHAM, 2005). Tradicionalmente, antes desse estudo, a insulina só era administrada quando os níveis glicêmicos excedessem 180 - 200 mg/dL em pacientes não diabéticos (ANGUS; ABRAHAM, 2005).

Em 2009, o THE NICE-SUGAR STUDY INVESTIGATORS mostrou que a normoglicemia não necessariamente beneficiaria pacientes em estado crítico e ainda poderia ter um efeito danoso uma vez que os resultados demonstraram que valores entre 81 – 108 mg/dL apresentavam maiores mortalidades que se permanecesse menor que 180 mg/dL (THE NICE-SUGAR STUDY INVESTIGATORS, 2009).

Apesar da controvérsia a respeito da insulinoterapia e o controle da glicemia em pacientes de UTIs, sabe-se dos efeitos anti-inflamatórios desse hormônio e, além disso, já foi demonstrado que a indução de hiperglicemia produz um poderoso efeito pró-inflamatório o que implica dizer que pacientes diabéticos estão em um frágil estágio e vulneráveis a qualquer flutuação da quantidade de glicose na ausência de uma adequada dose de insulina (DANDONA et al., 2013).

### **1.1 Sepses: Definições, aspectos patofisiológicos e epidemiológicos**

Há não mais de 3 décadas atrás, a sepse ainda permanecia não definida, não reconhecida, pouco estudada e o conhecimento dessa síndrome era ínfimo. Nenhuma sociedade científica ou médica a estudava e, apenas alguns pesquisadores estavam interessados nas fundamentações clínicas e fisiológicas da sepse, além disso, devido à dificuldade de tratamento e diagnóstico, a prioridade para a indústria farmacêutica era muito baixa. No entanto, em 1992, o conceito de sepse

foi definido como parte da *American Thoracic Society/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference*, e 5 anos depois, o Fórum Internacional da Sepsis foi fundado. A partir dessas iniciativas surgiu o *Surviving Sepsis Campaign (SSC)* em 2002 com financiamento das indústrias (STEHR; REINHART, 2013).

O conceito moderno de sepse é baseado na resposta humana aos organismos invasores. É uma síndrome sistêmica representada por uma resposta deletéria do hospedeiro para infecções levando a sepse grave (aguda disfunção de órgãos) e choque séptico (sepse grave acrescida de hipotensão não reversível com reposição volêmica ou uso de fármacos vasoativos) (SINGER et al., 2016; DELLINGER et al., 2012).

A sepse, apesar de grandes avanços no entendimento dos processos patofisiológicos, ainda permanece como um grande desafio terapêutico principalmente devido a múltiplas anormalidades fisiológicas e imunológicas (MOHR et al., 2012). Isso ocorre, principalmente, em decorrência de uma progressão heterogênea de cada paciente séptico dispensando uma enorme quantidade de recursos investida no desenvolvimento e avaliação de métodos de diagnóstico precoce, tratamentos eficazes (ANGUS et al., 2001) e medidas de controle da sua disseminação (MOHR et al., 2012).

A sepse agora é definida como uma disfunção de órgãos com risco de vida causada por uma desregulada resposta do hospedeiro a uma infecção (RHODES et al., 2017). Esta situação pode ter como desfecho a Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (MODS) (ENDO et al., 2008), que é a principal causa de morte nas UTI, principalmente, em pacientes sépticos (KOURY; LACERDA; NETO, 2007).

A heterogeneidade da síndrome engloba uma diversificada interação entre estímulo imunológico, inflamação sistêmica e coagulopatia que varia em intensidade de paciente para pacientes (BOOMER; GREEN; HOTCHKISS, 2014).

Estudos no decorrer das décadas mostraram que os receptores que reconhecem padrões (PRR), como os TLR e os *nucleotide-binding oligomerisation domain* (NOD) iniciam essa distinta resposta celular. Essa resposta distinta associada é o que provoca os variados fenótipos na

sepsis (VINCENT et al., 2013). Esses receptores são ativados por estruturas microbianas conservadas, como endotoxina ou ácido lipoteicoico e também por alarminas que são produzidas pelo tecido do hospedeiro indicando lesão celular (BOOMER; GREEN; HOTCHKISS, 2014; VINCENT et al., 2013; DEUTSCHMAN; TRACEY, 2014).

A resposta sistêmica a uma infecção é acompanhada por uma fase inicial de maciça liberação de mediadores pró-inflamatórios seguida de uma Síndrome da Resposta Anti-inflamatória Compensatória (CARS) ou imunoparalisia (LEWIS et al., 2012), que incapacita vários aspectos da resposta imune do indivíduo, principalmente da resposta imunológica adaptativa, ao provocar um aumento da apoptose de células T, suprimir a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade da classe 2 (MHC II), aumentarem a expressão de moléculas coestimulatórias negativas, elevar os níveis de citocinas anti-inflamatórias e provocarem o aumento dos níveis de células T regulatórias (HOTCHKISS; OPAL, 2010).

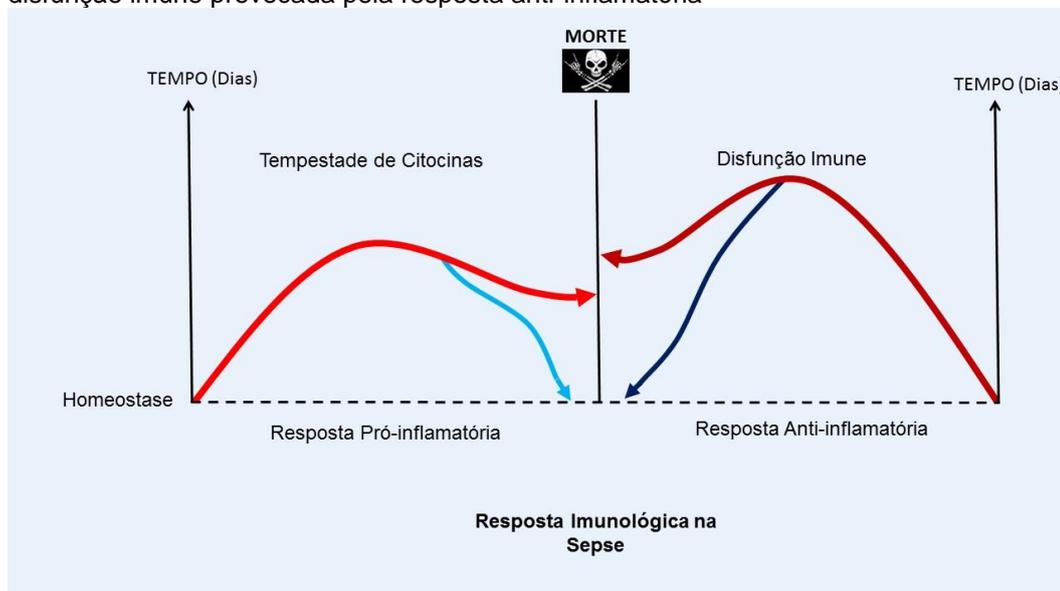
O balanço apropriado que ocorre na maioria das vezes em que os mecanismos de defesa são acionados é perdido durante a sepsis, culminando com uma incontrolável reação pró-inflamatória que pode resultar na disfunção de órgãos bem como em uma resposta anti-inflamatória que irá comprometer o sistema imune permitindo, assim, infecções secundárias (MOHR et al., 2012; LEWIS et al., 2012).

Esses dois estágios eram considerados entidades diferentes temporalmente no processo patológico, no entanto, a maioria das terapias experimentais foram inicialmente direcionadas contra o perfil pró-inflamatório da síndrome séptica. Essa abordagem terapêutica era baseada na premissa que altas concentrações de mediadores a favor da inflamação causariam lesão e disfunção de órgãos o que culminaria com o agravamento do paciente (HUTCHINS et al., 2014).

Agentes imunomodulatórios como anti-endotoxina, anti-TNF- $\alpha$  e inibidores de TLR-4 e IL-1 $\beta$  se mostraram sem sucesso nos testes clínicos. Isso ocorreu provavelmente, porque ao contrário do que se pensava, estudos recentes demonstraram que os estágios pró e anti-inflamatório ocorrem simultaneamente. Apesar de o acúmulo de citocinas pró-inflamatórias estar relacionado com a mortalidade precoce, as mortes

tardias devido à sepse crônica estão mais associadas com disfunção e supressão imunológica (HUTCHINS et al., 2014) (Fig. 1).

**Figura 1. Resposta Imunológica na Sepse.** Apesar das respostas pró e anti-inflamatória ocorrerem simultaneamente, a mortalidade precoce está relacionada com a resposta pró-inflamatória inicial as mortes tardias devido à sepse crônica se devem a disfunção imune provocada pela resposta anti-inflamatória



O sistema imune inato é a primeira linha de defesa a reconhecer e responder a incursão de um patógeno. A rapidez em que ocorre essa resposta pode ser explicada pela presença de receptores que reconhecem padrão (PPR) e a natureza ubíqua na qual se encontram distribuídas no indivíduo, sendo encontrados em células imunológicas (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos), em células epiteliais, endoteliais e miócitos (LEWIS et al., 2012).

O primeiro PPR ativado durante qualquer interação patógeno-hospedeiro são os membros da família dos receptores do tipo Toll (TLR) que são responsáveis pelo reconhecimento de produtos microbianos, chamados moléculas padrões associadas a patógenos (PAMPs) e são responsáveis pela indução da resposta inata e adaptativa (ZANONI et al., 2011).

O principal TLR responsável pela resposta inflamatória na ligadura e perfuração do ceco (CLP) é o TLR do tipo 4/MD-2 (TLR-4) que reconhece, por exemplo, o LPS presente nas bactérias gram-negativas. Esse PAMP é elemento essencial no desencadeamento do episódio

séptico. O LPS liga-se a uma proteína de fase aguda, denominada proteína de ligação ao LPS (LBP) formando um complexo 1.000 vezes mais ativo que o LPS livre (MATHISON et al., 1992). Este complexo, por sua vez, liga-se à glicoproteína de membrana, CD14, expressa em várias, mas não todas, as células que expressam TLR-4 (WRIGHT et al., 1990; TOBIAS et al., 1993; ZANONI et al., 2011).

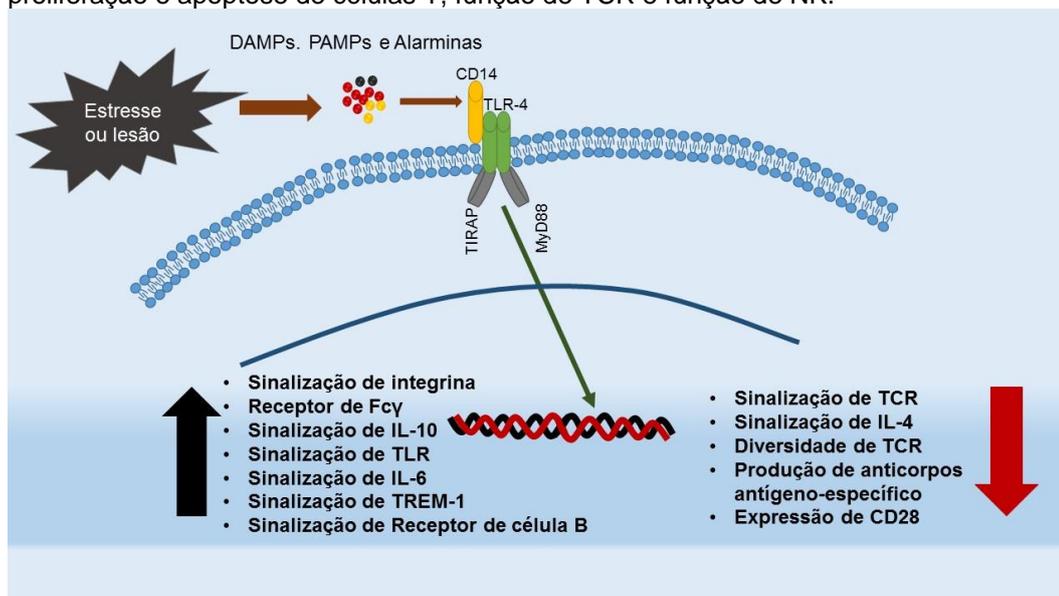
A ativação da célula é resultado da transferência do LPS dos receptores CD14 para os TLR (ZANONI et al., 2011). MD-2 é uma glicoproteína pequena que se associa ao TLR-4 numa maneira dependente de gp96 no retículo endoplasmático (RE). Essa molécula é necessária tanto para a translocação do TLR4 do Golgi para a superfície celular como na ativação (HUSEBYE et al., 2006). Após a entrega do LPS pelo CD14 ao TLR4/MD-2 a cascata de sinalização inicia-se pela *Toll Interleukin-1 receptor* (TIR) -adaptors MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM (HUSEBYE et al., 2006; KAWAI; AKIRA, 2010).

O complexo formado pelo CD14, TLR e o LPS inicia uma série de eventos intracelulares envolvendo proteínas e fatores de transcrição como *activator protein* (AP) -1, *interferon regulatory factors* (IRF) - 3 e *nuclear factor-kappa B* (NF-κB) que transcrevem diversos genes que codificam citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, enzimas como a ciclooxigenase (COX) -2 e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (AKIRA; TAKEDA; KAISHO, 2001; TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, 2003). Mais especificamente, a cascata de sinalização é feita por duas vias principais e distintas: *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) e a *toll interleukin-1 receptor domain-containing adapter-inducing IFN* (TRIF) (HARGREAVES; MEDZHITOV, 2005; FILGUEIRAS et al., 2012).

Na primeira via, o domínio *Toll Interleukin-1 receptor* (TIR) se associa à molécula adaptadora MyD88, comum a quase todos os TLR, e numa sinalização análoga a do receptor de IL-1, leva à ativação denominada *early phase* (KAWAI et al., 1999; TAKEUCHI et al., 2000), com expressão de centenas de genes de resposta pro-inflamatória induzidos pelo fator de transcrição NF-κB. A segunda via se vale das moléculas adaptadoras (TRIF) e *TRIF-related adapter molecule* (TRAM), que além da sinalização via NF-κB (*late phase*), é também responsável

pela ativação do fator IRF-3, resultando na ativação e síntese de interferons  $\alpha$  e  $\beta$  (YAMAMOTO et al., 2003) (Fig. 2).

**Figura 2. Resposta imunológica a trauma e sepse.** A resposta genômica para a sepse ou trauma não só induz a ativação de um elevado número de mediadores inflamatórios, genes envolvidos no reconhecimento de padrões e de funções antimicrobianas com também suprime o aparato genético envolvido na apresentação de antígenos, na proliferação e apoptose de células T, função de TCR e função de NK.



A resposta amplificada que resulta na inflamação sistêmica, afeta vários órgãos, dentre eles o rim, fígado e o pulmão são comumente lesados.

A lesão renal aguda do inglês *acute kidney injury* (AKI) é uma frequente e grave complicação da sepse nas UTI que afeta principalmente pacientes idosos. A patogênese, no entanto, é complexa e multifatorial e inclui alterações hemodinâmicas intrarrenais, disfunção endotelial, infiltração de células inflamatórias no parênquima renal, trombose intraglomerular e obstrução dos túbulos renais com células necróticas. Tudo isso causado, principalmente, pela ativação desordenada do sistema imune inato (ZARJOU; AGARWAL, 2011). AKI é geralmente definida como um rápido declínio do índice de filtração glomerular (IGF), resultando na retenção de resíduos nitrogenados, primariamente, ureia e creatinina. Em virtude disso, o nível sanguíneo dessas substâncias serve como um indicador da redução da função renal (BASILE; ANDERSON; SUTTON, 2012). Devido aos elevados índices de mortalidade, é

fundamental de se reconhecer prontamente a AKI induzida pela sepse e escolher a modalidade terapêutica mais apropriada (ZARJOU; AGARWAL, 2011).

O pulmão, assim como o rim, é um dos órgãos frequentemente afetado na sepse podendo desenvolver a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) e, em uma manifestação menos severa, a lesão aguda pulmonar do inglês *Acute Lung Injury* (ALI) (SURATT; PARSONS, 2006; BHARGAVA; WENDT, 2012) que é caracterizada por edema pulmonar e infiltração de células inflamatórias como os neutrófilos que, conseqüentemente, levam a uma redução das trocas gasosas. Na forma severa, o agravamento da hipóxia pode levar à falência múltipla de órgãos (HOTCHKISS; KARL, 2003; FILGUEIRAS et al, 2012).

Apesar de inúmeros mecanismos patofisiológicos no curso da sepse já foram descritos, aparentemente, existe um inadequado entendimento em processos chaves no decorrer da síndrome séptica. As falhas de inúmeros testes clínicos para o tratamento dessa desordem levaram os pesquisadores a buscarem novas direções para o estudo da sepse (HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013a).

#### 1.1.1 Sepse e a Tempestade de Citocinas

A resposta imune na sepse foi, tradicionalmente, caracterizada como uma fase inicial hiper-inflamatória que evolui através de vários dias para uma resposta imunossupressora. No entanto, estudos recentes demonstraram que ambas as respostas ocorrem inicialmente e simultaneamente à instalação do quadro séptico. Apesar disso, os efeitos iniciais desse processo competitivo são, tipicamente, manifestados por uma fase inicial dominante e hiper-inflamatória caracterizada pelo choque, febre e hiper-metabolismo (HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013b) (Fig. 1).

A ativação inicial de inúmeros PPRs, tanto por PAMPs, DAMPs e alarminas, resultam na produção de numerosas moléculas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8 e IFN- $\gamma$ , bem como de citocinas anti-inflamatórias. Isso leva a respostas celulares, como aumento da atividade fagocítica, lesão endotelial vascular com vazamento

capilar, síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado, quimiotaxia de leucócitos para os locais da inflamação/infecção, e a ativação do sistema de coagulação (BOOMER; GREEN; HOTCHKISS, 2014).

A descoberta que várias citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 estão em concentrações elevadas em pacientes com sepse e, quando injetadas em animais reproduzem várias características clínicas e laboratoriais dos pacientes sépticos levaram a esse conceito de “cytokine storm” ou tempestade de citocinas. Baseado nessa teoria e encorajado pelos resultados em modelos animais, as indústrias farmacêuticas iniciaram vários testes clínicos com antagonistas dessas citocinas, de receptores e de endotoxinas. No entanto, os resultados não foram satisfatórios, uma vez que não reduziram os índices de mortalidade (HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013a).

Em relação à imunidade adquirida, observa-se uma supressão genética, em genes relacionados com a apresentação de antígenos e ativação de células T, além de um aumento da apoptose de linfócitos T e B (XIAO et al., 2011).

Estudos recentes reportaram um novo paradigma para descrever a resposta imunológica em resposta a trauma e sepse. A expressão gênica de leucócitos circulantes de pacientes com trauma e queimaduras mostraram uma rápida e constante regulação positiva de genes que regulam a resposta imunológica inata e uma simultânea regulação negativa do aparato genético que regula a imunidade adaptativa (XIAO et al., 2011) (Fig. 2). Essas alterações que ocorrem em 80% do transcriptoma dos leucócitos ocorrem rapidamente (4 – 12 horas) e pode permanecer por vários dias e até semanas (XIAO et al., 2011). Isso sugere que é improvável a identificação de um único agente para o tratamento de uma desordem imunológica dessa magnitude.

A Figura 1 mostra as duas teorias, na qual a primeira mostra a ativação tanto da resposta pró e anti-inflamatória. Células da imunidade inata liberam elevados níveis de citocinas pro-inflamatórias e a intensidade da resposta inicial varia individualmente entre os pacientes e depende de múltiplos fatores como carga patogênica e virulência, comorbidades dos indivíduos e fatores genéticos do paciente. As mortes

precoces na síndrome séptica ocorrem devido a esses fatores hiper-inflamatórios, no entanto, se a sepse persistir a falha de elementos cruciais tanto da imunidade inata quanto da adaptativa leva o indivíduo a um estado de imunossupressão. Nesse caso, as mortes são ocasionadas pela incapacidade do indivíduo de reagir a infecções secundárias (HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013b).

## **1.2 Diabetes mellitus: Aspectos etiológicos e epidemiológicos**

*Diabetes mellitus* comporta um grupo heterogêneo de desordens metabólicas em que o ponto comum entre todas é uma hiperglicemia constante de difícil controle, ocasionada quer seja por defeitos na secreção ou na ação da insulina (SBD, 2015-2016). Em vista disso, se trata de uma complexa e crônica enfermidade que requer uma contínua assistência médica baseada em uma estratégia de redução de riscos que vai muito além do controle glicêmico (ADA, 2017).

A classificação atual preconizada pela Sociedade Brasileira de Diabetes não se baseia no tipo de tratamento recebido pelo paciente, mas sim na etiologia (SBD, 2015-2016). Em virtude disso a classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela *American Diabetes Association* (ADA) é a mesma utilizada pela SBD.

A classificação do diabetes segundo a ADA (2017) inclui quatro classes:

- DM tipo 1: resulta da destruição das células beta pancreáticas que, geralmente, leva à deficiência total de insulina.
- DM tipo 2: resulta de uma secreção defeituosa e progressiva de insulina causada por uma resistência insulínica periférica.
- Outros tipos específicos de DM: Manifestações menos comuns cujos defeitos ou processos causadores podem ser identificados (SBD, 2015-2016). Podem ser devido a: defeito genético no funcionamento das células beta pancreáticas, defeito genético na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino e outras condições descritas na Tabela 2
- DM gestacional: diabetes diagnosticado durante a gravidez.

Há 200 anos, a deficiência grave de insulina dominava as apresentações clínicas do diabetes. No entanto, o perfil da doença encontrado hoje é bem diferente. Apesar dessa grave deficiência ainda ocorrer, atualmente, ela corresponde a 10% de todos os casos e pode ser rapidamente tratada com a reposição insulínica (POLONSKY, 2012). A grande maioria dos pacientes diabéticos está acima do peso e possuem uma combinação de resistência à insulina e uma secreção deficiente da mesma (POLONSKY, 2012). Características presentes nos pacientes com DM do tipo 2 que representam cerca de 90 a 95 % de todos os casos desse distúrbio (SCHNEIDER et al., 2009; SBD, 2015-2016). No caso desse tipo de paciente e na presença de hiperglicemia, ambos os defeitos podem surgir, mas o mais comum é um se sobrepor ao outro (SBD, 2015-2016).

O DM causado pela destruição das células beta-pancreáticas, apesar de representar de 5 a 10% de todos os casos e de o tratamento ser realizado pela reposição insulínica ainda é uma desordem de difícil controle. São múltiplas injeções, controle alimentar, exercícios constantes e o balanço entre episódios de hiper e hipoglicemia são alguns dos parâmetros a serem considerados, especialmente em crianças (AATHIRA; JAIN, 2014).

A incidência de DM tipo 1 varia entre os diferentes países o que reflete a importância de fatores como genética e meio-ambiente. Além disso, o número de indivíduos que a adquirem está aumentando, por causas ainda não estabelecidas, mas relacionadas com mudanças em fatores ambientais de risco, eventos precoces no útero, infecções virais e o tipo de dieta nos anos iniciais de vida (IDF, 2015; AATHIRA; JAIN, 2014).

O DM causa um enorme impacto econômico nos países devido ao elevado número de internações, o tempo longo de permanência nos hospitais e os elevados gastos com produtos e serviços destinados a esses pacientes. Além disso, com o aumento da expectativa de vida, diminuição da atividade física e alimentação inadequada (DIAS; CAMPOS, 2012) estima-se que em 2015 o número pessoas adultas com diabetes chegou a 415 milhões em todo o mundo além de 318 milhões de

pessoas com tolerância a glicose alterada, o que os coloca com alto risco de desenvolver DM no futuro (IDF, 2015)

Na América do Sul e Central, para a população adulta (20 – 79 anos), a prevalência é de 8,0% que representa cerca de 24 milhões de pessoas. Uma estimativa para o ano 2035 acredita que esse número chegará a 9,8%, representando um aumento de 60% (ASCHNER et al., 2014). O Brasil, levando em consideração a população total, é o país com a maior prevalência com cerca de 11 milhões de indivíduos (ASCHNER et al., 2014).

No entanto, apesar da relevância do DM na saúde pública brasileira, existe uma escassez de estudos de base populacional para o desenvolvimento de um planejamento epidemiológico para a implantação de medidas assistenciais em saúde (MORAES et al., 2010). Entre os anos de 1986 e 1989 foi realizado o primeiro estudo multicêntrico de base populacional que utilizou os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o diagnóstico da diabetes (TORQUATO et al., 2003). Essa pesquisa foi realizada em nove capitais brasileiras e chegou à conclusão que a prevalência no Brasil era de 7,4% (MALERBI; FRANCO, 1992).

### 1.2.1 Diabetes e inflamação

O impacto econômico e social causado pelo DM é evidente, no entanto, esse distúrbio está associado com diversas complicações que incluem doenças vasculares e falhas renais (KNAPP, 2012). Além disso, o DM tem sido associado com elevados índices de infecções recorrentes (SHAH; HUX, 2003; MULLER et al., 2005) apesar dos índices de mortalidade serem menos claros (YENDE et al., 2010).

As dificuldades em se estimar o atual risco de infecções nesses pacientes devem-se principalmente ao fato do diabetes não se tratar apenas de um distúrbio do metabolismo de glicose, mas uma condição inflamatória crônica na qual as diversas manifestações concomitantes como, alterações nos perfis lipídicos, neuropatias, doenças crônicas vasculares e falhas renais, podem causar respostas diferenciadas à incursão de patógenos (KNAPP, 2012).

A grande maioria dos estudos buscaram analisar o risco de morte por infecção em pacientes diabéticos (KNAPP, 2012). Um estudo analisou esses índices em mais de 800.000 participantes e, além do risco adicional de doenças vasculares, os dados concluíram que o diabetes está associado a uma substancial morte prematura por vários tipos de câncer, doenças infecciosas e desordens degenerativas (SESHASAI et al., 2011). Foi demonstrado também uma contínua relação entre a glicemia de jejum acima de 100 mg/dL e o risco de morte. Em conclusão, esse estudo mostrou que além de doenças cardiovasculares e câncer, a associação entre infecção e diabetes contribui para a redução da expectativa de vida nesses pacientes (SESHASAI et al., 2011).

Esse estudo indicou apenas que as doenças infecciosas são complicações potencialmente fatais em pacientes diabéticos, não mostrando, entretanto, a predisposição a infecção nesses indivíduos (KNAPP, 2012). Para esse fim, foi realizada uma análise retrospectiva no Canadá que demonstrou uma elevada incidência de infecção em pessoas portadoras do diabetes com índices maiores para osteomielite, pielonefrite, cistite, pneumonia, celulite, sepse e peritonite, ou seja, infecções bacterianas principalmente (SHAH; HUX, 2007).

Estudos clínicos e experimentais indicam que o diabetes exerce um efeito protetor contra o desenvolvimento de ALI/SDRA, talvez pelos efeitos da hiperglicemia na resposta inflamatória, anormalidades metabólicas da doença, carência relativa do hormônio e as interações dos agentes terapêuticos utilizados em pacientes diabéticos (HONIDEN; GONG, 2009; FILGUEIRAS et al., 2012; FILGUEIRAS et al., 2014). No entanto, em outro estudo, foi mostrado que pacientes com DM possuíam índices elevados de mortalidade por pneumonia (KORNUN et al., 2007), justamente em função desta maior susceptibilidade às infecções.

Nesse contexto, pacientes diabéticos representam cerca de 22% de todos os pacientes sépticos (STEGENGA et al., 2010; KOH et al., 2012) e, a associação com condições crônicas podem alterar o desfecho da sepse e, assim, ter um importante papel na escolha do melhor tratamento (SCHUETZ et al., 2011). Um recente estudo utilizando 1.104

pacientes com sepse mostrou que 21,8% possuíam um histórico de DM (van VUGHT et al., 2016).

O mecanismo pelo qual existe esse aumento de susceptibilidade necessita de maiores elucidações. A hiperglicemia constante pode ter um papel preponderante nesse aumento talvez por prejudicar as funções tanto de neutrófilos quanto de macrófagos (MICHALIA, 2009). Em virtude disso e com o surgimento de diretrizes para o controle glicêmico nas UTIs, surgiu uma questão em relação aos pacientes diabéticos em estado grave, que se o controle restrito da glicemia reduziria o risco de infecções e se esses pacientes apresentariam um nível de susceptibilidade semelhante aos pacientes não diabéticos. Um estudo demonstrou que pacientes em estado crítico com DM possuem um elevado risco em desenvolverem infecções na corrente sanguínea quando comparados com não-diabéticos apesar dos índices de mortalidade não diferirem significativamente (MICHALIA et al., 2009).

Na tentativa de buscar esses esclarecimentos, o sistema imune está sendo estudado em detalhes, especialmente, o sistema imune inato (PELEG et al., 2007). Um aspecto importante para o controle de infecções é a transmigração de polimorfonucleares (PMN) para o sítio da inflamação. A sequência para que isso ocorra depende da adesão ao endotélio mediada por moléculas como L-selectina e integrinas, seguido da transmigração pela parede do vaso, que depende de um gradiente quimiotático e a expressão de integrinas pelos neutrófilos (CD11a/CD18 e CD11b/CD18) que se ligam às moléculas de adesão expressas pelo endotélio como a *intracellular adhesion molecule* (ICAM) -1 e, após isso, a fagocitose e morte do microrganismo (PELEG et al., 2007). Apesar de ter sido demonstrado que há um aumento na adesão dos PMN ao endotélio em pacientes diabéticos, o significado desse resultado em relação à susceptibilidade às infecções ainda não está claro (STEGENGA et al., 2010; KOH et al., 2012) mas poderia predispor a complicações vasculares devido a uma possível lesão endotelial (PELEG et al., 2007).

A maior evidência de disfunção neutrofílica nesses indivíduos está relacionada com a capacidade de matar patógenos. Algumas das

substâncias microbidas produzidas por PMN estão reduzidas no diabetes, como, por exemplo, o superóxido (PELEG et al., 2007).

Apesar do DM estar implicado em uma maior susceptibilidade às infecções, a influência no percurso clínico e desfecho subsequente, ainda necessitam de muitas elucidações (KOH et al., 2012). Entretanto, pacientes sépticos com histórico médico de diabetes não possuem um índice de mortalidade elevado em relação aos pacientes não diabéticos (STEGENGA et al., 2010). Outro estudo buscou avaliar o impacto do DM no desenvolvimento da disfunção de órgãos secundária à sepse. Nessa avaliação, pacientes diabéticos com sepse grave quando comparados com pacientes não diabéticos, apresentaram um menor risco em desenvolver uma falha respiratória aguda (ESPER; MOSS; MARTIN, 2009).

No diabetes então, temos uma disfunção dos PMN associada com concentrações alteradas de citocinas, uma vez que esse indivíduo apresenta elevados índices de marcadores inflamatórios como a P<sub>CR</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 (KOH et al., 2012) tanto em um estado basal quanto em uma inflamação. Isso, sem dúvida, contribui para influenciar a resposta imunológica do paciente diabético durante uma infecção local ou sistêmica (STEGENGA et al., 2010). Além disso, em pacientes diabéticos ou em estados hiperglicêmicos induzidos com infusão de glicose, notáveis alterações pró-inflamatórias ocorrem. Essas mudanças estão associadas com o aumento da expressão de TLR-2, TLR-4, JNK-1 e HMGB-1 (DEVARAJ et al, 2008; DANDONA, 2013). Os dados sugerem que a infusão de glicose ou qualquer macronutriente em pacientes com DM do tipo podem causar não só uma significativa hiperglicemia e inflamação como também a indução de outros mediadores que podem interferir drasticamente na sinalização de insulina (DANDONA, 2013).

Em geral, é consenso que um defeito na resposta imune inata do diabético explica a maior susceptibilidade a infecções bacterianas. Funções fagocíticas como quimiotaxia, fagocitose, *burst* respiratório são deficientes apesar da existência de muitos dados conflitantes, provavelmente pelas diferentes metodologias e modelos (GAN, 2013). No entanto, tanto em modelos animais quanto em seres-humanos a

hiperglicemia provoca a glicação de proteínas e a formação *advanced glycation end products* (AGE) que possui um impacto diversificado na função celular imunológica, causando diminuição das proteínas envolvidas na ativação do complemento, captação de bactérias, morte por fagocitose e alteração nos PPRs (GAN, 2013).

### 1.2.2 Diabetes, insulina e sepse

A insulina regula vários processos celulares, como o transporte de glicose (KHAM; PESSIN, 2002), a síntese de glicogênio (SRIVASTAVA; PANDLEY, 1998), a mitogênese (ISH-SHALOM et al., 1997) e a transcrição de vários genes (MOUNIER; POSNER, 2006). Atualmente, existem amplas evidências que suportam a ideia que os efeitos da insulina vão além do controle glicêmico (HONIDEN; GONG, 2009) e por isso nas últimas décadas, outras importantes características desse peptídeo têm sido elucidadas, especialmente, em relação às células endoteliais, plaquetas e leucócitos (DANDONA et al., 2007).

Em ensaios clínicos e experimentais já foi demonstrado um forte efeito anti-inflamatório exercido pela terapia intensiva com insulina em pacientes críticos (HANSEN et al., 2003), efeitos como a vasodilatação, a supressão da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), efeito antiagregante plaquetário, antitrombótico e profibrinolítico também já foram demonstrados em humanos (DANDONA et al., 2009).

Em estudos *in vitro*, o tratamento prévio de MAs ativados pelo LPS com insulina, diminui a expressão de *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) p38, *extracellular signal-regulated kinases* (ERK)1/2, *protein kinase* (PK) -B ou Akt, proteína kinase C (PKC) - $\alpha$  e PKC- $\delta$ , e a produção de TNF (MARTINS et al., 2008a). Estes dados sugerem que a administração de insulina na sepse com envolvimento pulmonar possa ter um efeito protetor por bloquear uma segunda onda de mediadores liberados pelos MAs (MARTINS et al., 2008a). Além disso, a administração de insulina após o desafio com LPS suprime a expressão de *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) e ciclo-oxigenase (COX) -2, diminui a produção de NO e prostaglandina (PG) -E<sub>2</sub>, bem como inibe a ativação de p65NF-kB nuclear. A insulina também foi capaz de diminuir a

fosforilação de *inhibitory kappa-B* (I $\kappa$ -B) $\alpha$  citoplasmático. Estes dados mostram que, em MAs estimulados por LPS, a insulina é capaz de inibir a translocação nuclear de NF- $\kappa$ B, provavelmente por bloquear a degradação de I- $\kappa$ B $\alpha$  e, assim, suprimir a produção de NO e PGE<sub>2</sub> — dois mediadores que contribuem para o choque séptico (MARTINS et al. 2008b).

Outro trabalho, mostrou que ratos wistar machos diabéticos ao serem instilados com LPS intratraqueal exibiam reduzida fosforilação de ERK, p38, Akt, PKC- $\alpha$  e pPKC- $\delta$ , além de uma reduzida expressão de iNOS e COX-2, concentração baixa de NO e IL-6 e aumento de CINC-2 no LBA. O tratamento com insulina, antes da instilação restaurou os padrões de fosforilação dessas moléculas sinalizadoras, a expressão de enzimas e os níveis de citocinas (MARTINS et al., 2010)

Em estudos *in vivo*, observou-se que ratos diabéticos induzidos por aloxana possuíam menores níveis de RNAm para IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  nos pulmões e em linfonodos mesentéricos, quando comparados com animais controle, 6 horas após a instilação de LPS. Após o tratamento desses animais com insulina, a expressão desses genes de citocinas foi restaurada aos níveis dos animais não-diabéticos (MARTINS et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que hiperinsulinemia reduz fortemente a atividade fibrinolítica induzida pela inflamação devido a uma exagerada indução de PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor type 1*) (STEGENGA et al., 2008).

A insulina regula a atividade metabólica, a transcrição gênica e o crescimento de várias células pela modulação da atividade de diversas proteínas envolvidas na sinalização intracelular (KEETON et al., 2002). O NF- $\kappa$ B é um dos fatores de transcrição mais estudados na expressão de citocinas, também importante na resposta imune às infecções pulmonares (FAN et al., 2001), sendo normalmente encontrado no citoplasma associado com uma proteína inibidora, o I $\kappa$ -B. Após estímulos inflamatórios, o I $\kappa$ -B é fosforilado e o NF- $\kappa$ B é liberado, move-se para núcleo, onde favorece a transcrição de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. DANDONA e colaboradores (2001) verificaram um potencial

efeito inibitório da insulina pela redução intracelular de NF- $\kappa$ B e um aumento de I $\kappa$ B em monócitos obtido do sangue de pessoas obesas.

Estudos *in vitro* tem demonstrado que a insulina suprime a expressão das ICAM-1, das *Chemokine C-C Motif Ligand (CCL) -2* também conhecidas como *Monocyte Chemotactic Protein (MCP) -1* também impede a ligação do NF- $\kappa$ B ao núcleo (KARAMITSOS, 2011). Além disso, em modelo murino, foi demonstrado uma redução na lesão de órgãos secundária à sepse após tratamento com insulina (BARKHAUSEN et al., 2009).

Um estudo realizado em humanos demonstrou que a insulina exerce um efeito anti-inflamatório em pacientes com diabetes do tipo 1 ao suprimir a expressão de TLR-1, TLR-2 e TLR-4 e a expressão de HMGB-1 e da p38. Essa ação pode mediar um efeito protetor na patogênese da inflamação por agentes infecciosos e potencialmente oferece uma poderosa maneira de controlar as condições inflamatórias nesse tipo de paciente (DANDONA et al., 2013).

Assim, o mecanismo da imunodeficiência e a suscetibilidade para o desenvolvimento de sepse no diabetes, bem como a ação da insulina em modular alguns parâmetros imunológicos e a sua importância no controle da glicemia em não diabéticos ainda necessitam de maiores elucidações. Além disso, outros aspectos benéficos em relação a esse hormônio já foram relatados e também necessitam de maiores esclarecimentos, como por exemplo, a redução na lesão de alguns órgãos.

### **1.3 Modelos experimentais de diabetes e sepse**

Um dos pilares da pesquisa biomédica moderna é a utilização de modelos experimentais com camundongos no intuito de explorar as bases dos mecanismos patofisiológicos, avaliar novas abordagens terapêuticas e transferir para ensaios clínicos candidatos a novas drogas. Baseado em vários fracassos na tentativa de transferir para testes em humanas numerosas drogas com ação comprovada em modelos animais, estudos sistemáticos que avaliam o quanto esses modelos mimetizam as respostas em seres humanos estão sendo conduzidos (SEOK et al, 2013).

A utilização de camundongos como modelo animal de desordens em humanos por muito tempo tem sido considerada essencial para elucidar os mecanismos básicos das doenças além auxiliar na transposição de protocolos da bancada para o leito do paciente. No entanto, essa noção foi fortemente desafiada pelo estudo recente de Seok et al. (TAKAO, 2013).

Nesse estudo foi feita uma sistemática comparação da resposta genômica entre doenças inflamatórias humanas e nos modelos murinos. Primeiramente, foi comparado a correlação entre as mudanças na expressão gênica no trauma, queimaduras e endotoxemia em humanos e nos modelos correspondentes em camundongos. Em segundo lugar, foram caracterizados e comparados os padrões temporais de resposta genética observados nessas condições em humanos e nos modelos. Em seguida, foi identificada a principal via de sinalização que é significativamente regulada na resposta inflamatória a lesões em humanos e comparada com modelo de endotoxemia *in vivo* em seres-humanos e três modelos murinos. Por fim, foi avaliado pacientes representativos e estudos com murinos de várias doenças inflamatórias agudas adicionais (SEOK et al., 2013).

O estudo conclui que a resposta genômica a diferentes estresses inflamatórios agudos são altamente similares em humanos, mas muito pouco reproduzíveis nos modelos em camundongos correspondentes. As poucas correlações entre as alterações das expressões genéticas entre humanos e camundongos a alta correlação entre os padrões de expressão genômica entre os diferentes tipos de inflamação em humanos levou a conclusão que a prioridade deveria ser em estudar essas complexas condições diretamente ao invés da utilização de modelos experimentais para avaliar doenças inflamatórias humanas (SEOK et al., 2013). Esse estudo atraiu muita atenção de pesquisadores e da mídia em geral, em virtude disso, outro foi conduzido na tentativa de avaliar e comprovar os resultados apresentados.

Algumas diferenças críticas dessa nova reavaliação foi ter focado em genes cujos níveis de expressão alteraram significativamente tanto em humanos quanto em camundongos. O estudo anterior analisou grupos de

genes que tiveram uma significativa alteração em humanos independentemente da significância dessa alteração nos modelos em camundongos, o que não é um método convencional de comparação da expressão de dois genes. Supondo que modelos em camundongos simulam apenas parcialmente alguns aspectos das desordens humanas, a inclusão de genes que mostram nenhuma resposta significativa ao estímulo irão, geralmente, diminuir a sensibilidade de detectar as respostas compartilhadas pelas desordens em cada modelo. Em virtude disso, esses genes devem ser excluídos da análise (TAKAO, 2013).

Outra diferença é que cada uma das condições foi comparada em apenas um modelo de estudo em camundongo independente com a condição humana de referência. Uma vez que humanos e camundongos são diferentes, a condição ótima que mais se aproxima de simular uma condição humana deve ser rigorosamente procurada e considerada o melhor modelo ao tentar estabelecer qualquer relação entre animal e uma desordem humana (TAKAO, 2013).

Após essas adaptações e com a utilização de análises estatísticas mais convencionais, ao contrário do reportado por Seok et al. (2013), o estudo demonstrou que a expressão de níveis genéticos em modelos com camundongos de doenças humanas é altamente correlacionada com as mesmas desordens em pacientes humanos (TAKAO, 2013).

A sepse é um dos mais complicados modelos animais para representar as condições clínicas, portanto, diferentes modelos foram desenvolvidos desde a administração de toxinas exógenas como o zimosan ou o LPS, passando pela infusão de patógenos viáveis e chegando ao modelo de lesar a barreira intestinal que é o caso da CLP. Este modelo tem sido largamente utilizado no estudo da patofisiologia da sepse e comparado com outros, possui uma melhor representação da complexidade que é a sepse em humanos (DEJAGER et al., 2011).

A lesão tecidual causada pela laparotomia, a necrose causada pela ligação do ceco e a infecção devido às perfurações que permitem o vazamento da microbiota para o peritônio, são os três pilares do modelo CLP. A peritonite causada evolui para a translocação das enterobactérias para a corrente sanguínea, ativando assim, a resposta inflamatória

sistêmica que culminará, com o choque séptico. Esse modelo apresenta várias vantagens, pois se trata de um procedimento cirúrgico simples, possui a presença de um foco infeccioso, simula bem a progressão da sepse em humanos com fases hemodinâmicas e metabólicas semelhantes e, além disso, alterna fases hiper-inflamatórias como hipoinflamatórias, assim como em humanos. Algumas desvantagens são a formação de abscesso e as variações da severidade da sepse, devido principalmente aos procedimentos experimentais (ROCHA et al., 2007; DEJAGER et al., 2011).

O DM do tipo 1 é uma desordem autoimune multifatorial que envolve fatores genéticos e ambientais e é marcada pela destruição das células beta pancreáticas mediada por linfócitos T e macrófagos resultando numa deficiência de insulina irreversível (CHATZIGEORGIOU et al., 2009). Nesse caso, para estabelecer um modelo de DM do tipo 1 o animal deve desenvolver um estado insulinopênico. Dentro desse contexto, existem animais que desenvolvem DM do tipo 1 espontaneamente e aqueles que necessitam de indução através do tratamento com alguma substância química.

Os camundongos *non-obese diabetic* (NOD) e os ratos *bio breeding* (BB) são os animais mais comumente usadas que desenvolvem DM do tipo 1 espontaneamente com uma grande similaridade com a DM humana (REES; ALCOLADO, 2004).

As substâncias mais utilizadas para a indução do DM do tipo 1 são a estreptozotocina e aloxana, devido à toxicidade nas células beta pancreáticas quando administradas em altas doses ou em doses pequenas repetitivamente (CHATZIGEORGIOU et al., 2009).

A estreptozotocina é um análogo da nitrosureia e sua toxicidade requer a captação pela célula beta-pancreática que ocorre via a ligação de baixa afinidade com o transportador de glicose GLUT-2 na membrana plasmática. Assim, células produtoras de insulina que não expressam esse transportador são resistentes a esse agente. A toxicidade dessa substância se deve à transferência de um grupo metil da estreptozotocina para a molécula de DNA resultando na fragmentação do material genético. Na tentativa do reparo genético provoca uma depleção

energética na célula beta-pancreática levando a necrose (REES; ALCOLADO, 2004; LENZEN, 2008; CHATZIGEORGIOU et al., 2009).

Apesar de menos tóxica que a aloxana, foi demonstrado que a indução de DM tipo 1 pelo uso da estreptozotocina levou a uma depleção de linfócitos circulantes e timócitos o que inviabilizaria seu uso para estudos do sistema imunológico (WELLHAUSEN, 1986; MULLER, et al., 2011; NAGARAJU, et al., 2014).

A aloxana exerce o efeito diabetogênico quando administrada intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea e possui dois efeitos patológicos distintos. Ela seletivamente inibe a secreção de insulina induzida pela glicose através de uma inibição específica da glucoquinase, que seria o sensor de glicose da célula beta. Além disso, causa um estado de insulinopenia através da habilidade de induzir a formação de EROs que provoca a necrose seletiva das células beta pancreáticas. A especificidade da aloxana se deve a semelhança estrutural com a glicose o que permite que o transportador GLUT-2 a transfira para o citosol da célula beta (SZKUDELSKI, 2001; REES; ALCOLADO, 2004; CHATZIGEORGIOU et al., 2009; CHATZIGEORGIOU et al., 2009).

#### **1.4 Justificativa do estudo**

A disfunção de órgãos, um desfecho comum e perigoso na sepse por provocar elevados índices de mortalidade, indicando um mau prognóstico para o paciente. O rim é um órgão comumente afetado na sepse somado a isso, o diabético já possui um agravante nesse caso que é o desenvolvimento da nefropatia diabética que é causada por vários fatores incluindo hiperglicemia persistente (ELMARAQBY; SULLIVAN, 2012).

Novos conceitos indicam que o dano renal não é totalmente explicado pelas modificações moleculares causadas pela hiperglicemia ou pelo aumento da pressão sistêmica e intra-glomerular secundária a fatores metabólicos e hemodinâmicos (NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2011). Nesse contexto, a inflamação, emergiu como um fator patofisiológico chave no desenvolvimento do acometimento renal. Moléculas e mediadores inflamatórios são fatores importantes nos

estágios iniciais na doença renal diabética (NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2011).

A presença de co-morbidades na sepse, como o caso da nefropatia diabética, potencializa os já elevados índices de mortalidade pela síndrome séptica. Em um estudo de DOI et al., 2008, camundongos tiveram uma lesão renal induzida antes do procedimento cirúrgico para desenvolvimento da sepse. Esse trabalho mostrou que os animais com doença renal prévia tiveram um aumento substancial da AKI e da gravidade do choque séptico.

Em estudo anterior, realizado no mestrado, observamos que uma CLP de 6 horas com 2 furos, ratos diabéticos com sepse apresentavam um nível de disfunção renal e hepático e que o tratamento com insulina melhorou os parâmetros bioquímicos AST, AST e FAL e não interferiu nos níveis de ureia (NOLASCO et al., 2015). Após esses resultados, buscamos padronizar um modelo de CLP que apresentasse o acometimento renal, hepático ou pulmonar em camundongos. Foram realizados procedimentos cirúrgicos com 2, 4 e 6 furos nos tempos de 24 e 48 horas. Nessa evolução temporal da sepse, observamos que no animal com 6 furos em 24 horas já observamos um infiltrado inflamatório composto predominantemente por neutrófilos no lavado broncoalveolar (LBA) tanto do animal diabético como controle. Em virtude disso, escolhemos esse tempo e quantidade de furos para observar os efeitos do tratamento com insulina nos animais diabéticos com sepse (Dados não mostrados).

## **2 OBJETIVOS**

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a influência de uma sepse de 24 horas em animais sadios e diabéticos e analisar as consequências do tratamento com insulina em camundongos sépticos tornados diabéticos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar e comparar a evolução da sepse em animais diabéticos e não diabéticos;
- Avaliar o tratamento com insulina;
- Avaliar a influência do DM, CLP e tratamento com insulina no foco primário da inflamação; e
- Avaliar a influência do modelo de CLP, do diabetes e a da insulina em possíveis focos secundário da sepse (pulmão, rim e fígado).

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/410–anexo). Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, com peso médio torno de 25 gramas e idade de, aproximadamente, 9 semanas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Nesse mesmo local, os camundongos foram acondicionados em gaiolas coletivas, contendo no máximo cinco roedores, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a temperatura ambiente constante de 22°C. Os suprimentos de água e alimento ficaram disponíveis todo o tempo.

#### **3.2 Indução do DM**

Para indução do DM, os animais foram submetidos a jejum de 12 horas. A aloxana (60 mg/kg), dissolvida em 60 µL solução salina fisiológica, foi administrada por via endovenosa. Os animais controles receberam volume equivalente de solução salina, pela mesma via. A glicemia foi determinada dez dias após administração da aloxana, através de um monitor de glicose (Accu-Check Active–Roche Diagnosis®). As amostras de sangue foram obtidas da extremidade da cauda dos animais e apenas camundongos com glicemia superior a 300 mg/dL (16,6 mM) e menor ganho de peso corporal (Fig. 4) foram utilizados nos grupos diabéticos (modificado de SPILLER et al., 2012).

#### **3.3 Modelo CLP de sepse e tratamento com insulina**

Após os dez dias da indução do diabetes, animais controles e diabéticos foram preparados para o procedimento cirúrgico. Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal com cloridrato de cetamina (100 mg/kg) associado ao cloridrato de xilasina (10 mg/kg) e procedeu-se uma laparotomia mediana de aproximadamente 2 cm. O ceco foi exteriorizado e realizado uma ligadura abaixo da válvula íleo-cecal. Esta região foi seis vezes perfurada com agulha 21 gauge (BENJAMIN;

FERREIRA; CUNHA, 2000). A incisão abdominal foi suturada e o abdome fechado. Os animais foram recolocados em suas dependências e após 24 horas do procedimento cirúrgico foram realizados os experimentos. Os camundongos foram divididos em 5 grupos de acordo com o tipo de cirurgia e o tratamento: controle-sham (ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração); controle-CLP (ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes); diabético-sham (ceco exteriorizado sem ligadura); diabético-CLP (ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes); diabético-CLP + insulina (ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina).

### **3.4 Tratamentos com insulina**

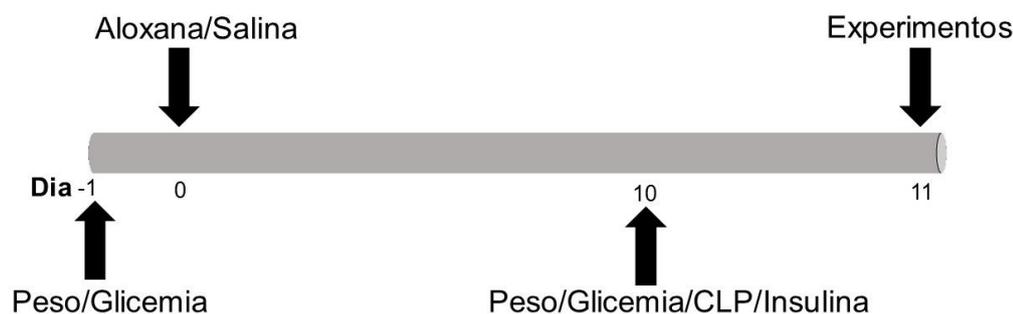
Animais diabéticos foram tratados com uma dose única de insulina NPH (1UI) imediatamente após o procedimento cirúrgico descrito anteriormente. Apenas os camundongos diabéticos que tiveram o ceco perfurado receberam esse tratamento modificado de SPILLER et al., 2012).

### **3.5 Delineamento experimental**

O DM foi induzido após uma injeção de aloxana e após dez dias a sepse por CLP, como descrito anteriormente. Animais sham foram anestesiados, procedeu-se uma laparotomia, o ceco foi exteriorizado, porém não submetidos à ligadura e perfuração.

Grupo controle possuía animais sham e CLP, enquanto os diabéticos sham, CLP e CLP + i (tratados com dose única de insulina no momento do procedimento cirúrgico).

**Figura 3. Delineamento experimental**



### 3.6 Análises Bioquímicas

Decorridos 24 horas após o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados através da administração subcutânea de uma solução composta por cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg), para a posterior coleta sanguínea através de punção intracardíaca.

O sangue coletado foi acondicionado em tubo isento de anticoagulante e a amostra centrifugada, 1500 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos, para obtenção do soro que foi utilizado, pelo analisador automático (LabMax 240®), na análise dos seguintes parâmetros bioquímicos: AST, ALT, bilirrubina total e frações, ureia, creatinina e alfa-1 glicoproteína ácida (AGP). Amostras de sangue periférico, coletadas da cauda do animal, foram utilizadas para a determinação da glicemia (monitor de glicose Accu-Check Active-Roche Diagnosis®) após as 24 horas do procedimento cirúrgico.

### 3.7 Coleta e Análise dos Lavados Broncoalveolar (LBA) e Peritoneal (LPe)

Após, anestesia, a pele da região abdominal foi removida, a cavidade peritoneal foi lavada inicialmente com 5mL de tampão fosfato salina, pH 7.4 (PBS + EDTA). Após a massagem do abdômen as amostras de LPe foram coletadas e devidamente armazenadas para posterior contagem celular e quantificação de citocinas. Em seguida, a cavidade abdominal foi novamente lavada com 10 ml de PBS+EDTA para a coleta de células para a realização imediata da citometria de fluxo.

Na coleta do LBA, os pulmões foram lavados com 5mL (5 infusões de 1 mL) de PBS, utilizando-se tubo de polietileno de 1 mm de diâmetro, inserido na traqueia. Após a coleta, o material (LPe e LBA) foi centrifugado (1500 rpm, 10 min, 4°C) e as células ressuspensas em PBS e o sobrenadante da primeira lavagem foi mantido a -70°C, para a posterior dosagem de citocinas e quimiocinas. Para a determinação do número de células utilizamos as amostras recolhidas em todas as lavagens.

Após a centrifugação as células foram ressuspensas em PBS. A suspensão de células do LPe e do LBA foi diluída na proporção 1/20 (v:v) com líquido de Turk e a contagem total de células foi determinada em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada em amostras (Citocentrífuga CITOSPIN) coradas (Leishman). Em cada lâmina foram avaliadas 100 células, diferenciando-se os tipos celulares (células mononucleares, polimorfonucleares).

### **3.8 Análise Histopatológicas**

Amostras de pulmão, fígado e rim foram coletadas e fixadas por aproximadamente 12 h em formalina 3,7% e, posteriormente, desidratadas em séries graduadas de concentrações de etanol (70-100%), diafanizadas em xilol e, por fim, embebidas em parafina. Após isso, cortes de 5 µm foram corados com hematoxilina-eosina. Após a coloração, o material foi desidratado, diafanizado e montado com Entellan® e coberto com lamínula para a formação de cortes permanentes. A histomorfometria foi feita com imagens obtidas por microscópio capturados em vídeo via AxioVision; Carl Zeiss, Eching, Germany. Dentre os tecidos avaliados, apenas o rim apresentou alterações histopatológicas logo a graduação da proporção do dano renal (edema tubular epitelial, degeneração vacuolar, necrose, infiltrado): 0, <0,5; I, 0,5 – 0,25; II, 0,26 – 0,5; III, 0,51 – 0,75; IV, >0,75. Para reduzir o viés da análise morfométrica, o observador estava “cego” para os tratamentos dos grupos. O score médio foi calculado por camundongo e grupo.

### 3.9 Fenotipagem de neutrófilos

A fenotipagem de neutrófilos do LPe foi feita por citometria de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Suspensões celulares com  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com anti-mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc BLOCK™, BD Biosciences) por 15 minutos, 4°C no escuro para bloquear interações inespecíficas de anticorpos FcR. Após isso, as células foram marcadas com anti-mouse LY-6G APC-Cy7™ (BD Biosciences) por 30 minutos a 4°C no escuro. Neutrófilos foram caracterizados por tamanho, complexidade e positividade para o marcador LY-6G. Os dados foram analisados usando FlowJow, versão 7.5.5 (Tree Star, Ashland, OR, USA) e os resultados foram expressos por intensidade de fluorescência média (MFI do inglês *median fluorescence intensity*).

### 3.10 Capacidade endocítica *in vitro*

Após a marcação de neutrófilos descrita acima,  $2,5 \times 10^5$  células peritoneais de animais controle (Sham e CLP) ou diabéticos (Sham, CLP, CLP+insulina) foram transferidas em duplicata para tubos de 5 mL de poliestireno e incubados com 250µL de RPMI contendo 0,5µg/µL de partículas sólidas de 0.431- µm de dextran acoplado com FITC (Molecular Probes™, cod D1844) a 4°C por 30 minutos (controle negativo) ou a 37°C por 90 minutos (amostras) em placas de 6 poços em meio RPMI-1640 contendo 10% de Soro Bovino Fetal (Gibco Life Technologies). FITCH conjugado com dextran e incubados a 4°C por 30 minutos (controle negativo) ou a 37°C por 90 minutos (amostras). Após isso, as células foram lavadas 3 vezes com PBS quente e ressuspensas em 100 µL de PBS + 1% de soro fetal bovino (SFB). As análises foram feitas por citometria de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os dados foram analisados usando FlowJow, versão 7.5.5 (Tree Star, Ashland, OR, USA) e os resultados foram expressos por intensidade de fluorescência média (MFI do inglês *median fluorescence intensity*).

### 3.11 Detecção intracelular de Espécie Reativas de Oxigênio

Após a marcação de neutrófilos descrita acima,  $2,5 \times 10^5$  células peritoneais de animais controle (Sham e CLP) ou diabéticos (Sham, CLP, CLP+insulina) foram lavadas com *Hanks Balanced Saltt Solution* (HBSS) contendo  $100 \mu\text{M}$  de Diethylenetriamine Pentaacetic Acid (DTPA) (Sigma Aldrich). Após centrifugação ( $450 \text{ g}$ ,  $10 \text{ min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) a suspensão celular foi incubada com  $1 \text{ mL}$  de HBSS com  $100 \mu\text{M}$  de DTPA por  $10 \text{ min}$  a  $4^\circ\text{C}$ . Após isso,  $0,5 \mu\text{L}$  de *Dihydroethidium* (DHE) (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) foi adicionado à suspensão e incubado por  $30 \text{ min}$  a  $37^\circ\text{C}$  no escuro. A produção de ERO nos neutrófilos é determinada pelo DHE, que possui a habilidade de permear livremente a membrana celular e interagir com anions superóxidos formando um produto fluorescente que podem ser quantificadas utilizando um detector de PE em citômetro de fluxo. As análises foram feitas por citometria de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e os dados foram analisados usando FlowJow, versão 7.5.5 (Tree Star, Ashland, OR, USA) e os resultados foram expressos por intensidade de fluorescência média (MFI do inglês *median fluorescence intensity*).

### 3.12 Quantificação de citocinas e quimiocinas séricas por Cytometric Bead Array

Os animais foram anestesiados como descrito previamente e exsanguinados através de punção cardíaca. Soro foi separado por centrifugação ( $1000\text{g}$ ,  $10 \text{ min}$ ) após  $30 \text{ minutos}$  de descanso em temperatura ambiente para coagulação. As amostras foram armazenadas em  $-80^\circ\text{C}$  antes da análise. As citocinas/quimiocinas IL-6, IL-10, CCL2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12p70 foram quantitativamente avaliados através do *CBA Mouse Inflammation Kit* (BD, Biosciences). Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante e as amostras foram mensuradas por citometria de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), e analisadas usando *BD CBA Software* (BD, Biosciences). O intervalo de detecção para esses testes variou entre  $20 - 5000 \text{ pg/mL}$  para cada proteína avaliada.

### 3.13 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ensaio imunoenzimático em amostras de LBA, LPe, Rim e Fígado

A quantificação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, e das quimiocinas C-X-C motif ligand (CXCL) - 1 e CXCL-2 foi realizada em amostras do sobrenadante do LBA, LPe, macerado de rim e fígado 24 horas após o CLP, utilizando-se o método de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) por Duo-set (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). Inicialmente, na placa com 96 poços, foram adicionados 100  $\mu$ L/poço do anticorpo de captura, anti-IL-1 $\beta$ , anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-6, anti-IL-10, anti-CXCL-1 ou anti-CXCL-2. Após incubação por uma noite a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e a placa lavada 3 vezes com o tampão de lavagem (aproximadamente 300  $\mu$ L/poço). Em seguida, foi realizada a reação de bloqueio adicionando-se 200  $\mu$ L/poço de albumina sérica bovina a 2% em PBS e incubação por 1 hora à temperatura ambiente (20 a 26°C). A placa foi novamente lavada 3 vezes com o tampão de lavagem. Foi adicionado 100  $\mu$ L/poço do padrão ou das amostras, procedendo-se à incubação da placa por 2 horas à temperatura ambiente. Após repetir o procedimento de lavagem da placa, foram adicionados 100  $\mu$ L/poço do anticorpo de detecção biotilado para IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, CXCL-1 ou 2 e a placa incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Ao término da incubação, o ciclo de lavagem da placa foi repetido e, em seguida, adicionaram-se 100  $\mu$ L/poço da enzima estreptoavidina peroxidase na proporção 1:200 de enzima: PBS com 0,05% de tween<sub>20</sub>, e incubação por 1 hora à temperatura ambiente protegida da luz. Em seguida, o ciclo de lavagem da placa foi repetido e a reação revelada pela adição de 100  $\mu$ L/poço de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina e incubação (30-60 minutos) à temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi bloqueada adicionando-se 50  $\mu$ L/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1N), avaliando-se a densidade óptica das amostras a 450 nm, imediatamente após o bloqueio da reação.

No caso do macerado de órgãos (rim e fígado) o valor obtido das citocinas foi multiplicado pelo inverso do valor da quantidade de proteínas

em cada órgão dosadas pela técnica de BCA, obtendo um resultado em pg de citocina por µg de proteína do tecido.

### 3.14 Ensaio de apoptose (Anexina V/Iodeto de propídio) em baço

Baços recém-coletados após 24 horas de CLP foram gentilmente pressionados entre duas lâminas para a obtenção de uma suspensão celular. Eritrócitos foram lisados com uma solução de NaCl 0,2% e NaCl 0,7%, respectivamente. Uma suspensão celular foi obtida após a passagem por um filtro de nylon de 100µM. Os esplenócitos coletados foram lavados duas vezes com PBS, contados e reconstituídos em *Ca<sup>2+</sup>-rich Annexin V binding buffer* (BD Pharmingen) com 10<sup>5</sup> células/mL. 100 µL da suspensão celular foi marcada com 2,5 µL *Annexin V-FITC* e/ou 1 µL iodeto de propídio (PI) por 15 minutos e o volume total ajustado para 500 µL com o *binding buffer*. As amostras foram mensuradas por citometria de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e células *Annexin V-FITC+/PI-* foram consideradas apoptóticas e *Annexin V-FITC-/PI+* necróticas.

### 3.15 Marcação de CD4/CD8 no baço

Após a preparação da suspensão celular no baço descrita acima, 1 x 10<sup>6</sup> células foram incubadas com *anti-mouse* CD16/CD32 (BD Biosciences) por 15 min, 4°C no escuro para o bloqueio de ligações inespecíficas. Após isso, as células foram marcadas com *anti-mouse* CD4 and CD8 (BD Biosciences) por 30 minutos, 4°C no escuro. CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram caracterizadas por tamanho, complexidade, e positividade para esses marcadores. As análises foram feitas por citometria de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os dados foram analisados usando FlowJow, versão 7.5.5 (Tree Star, Ashland, OR, USA) e os resultados foram expressos por intensidade de fluorescência média (MFI do inglês *median fluorescence intensity*).

### 3.16 Expressão de NF-κB subunidade p65 por microscopia confocal

A expressão de NF-κB p65 foi detectado em amostras de tecido renal utilizando *anti-mouse* NF-κB p65 (diluição 1:100, Cell Signaling,

Danvers, MA, USA) de acordo com as instruções do fabricante, uma vez que dentre os tecidos avaliados (pulmão, fígado e rim) este foi o único com alterações histopatológicas. Secções de tecido renal embebidos em parafina foram rehidratados e três horas após recuperação antigênica em 10mM de citrato de sódio (ph 6.0) os cortes foram incubados com tampão de bloqueio (5% BSA em PBS) por 1 hora, temperatura ambiente. A marcação com NF- $\kappa$ B p65 foi realizada *overnight* a 4°C. Após lavagem, os cortes foram incubados por 1 hora, temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-rabbit (1:1000). A identificação nuclear foi feita por uma contracoloração com corante fluorescente DAPI por 3 minutos. Em todos os casos, controles negativos foram avaliados para garantir que os resultados não foram consequências de reações cruzadas ou ligações inespecíficas provocadas pelo anticorpo secundário. Todas as imagens foram produzidas usando microscópio confocal Leica SP8 equipado com uma objetiva Plan-Apochromat x63 (abertura numérica 1.4). Foram analisados por volta de 8 rins por cada grupo utilizando 100 núcleos em cada lâmina como região de interesse (ROI, do inglês, *Region of interest*). Foi utilizado o coeficiente de correlação de Manders para quantificar o índice de correlação entre os dois corantes.

### **3.17 Obtenção e análise histológica dos cortes de tecido pulmonar, renal e hepático**

Após 24 horas da indução da sepse por CLP, os animais sépticos e seus respectivos controles foram anestesiados como descrito anteriormente para a posterior realização de laparotomia e sangria total pela aorta abdominal. Na sequência, os rins, o fígado e o pulmão dos animais foram removidos e fixados em formaldeído.

Para a análise histológica, os tecidos pulmonar, hepático e renal foram fixados em formaldeído (3,7%), por aproximadamente 12 horas. Após a fixação, o material foi desidratado em etanol, utilizando-se concentrações crescentes (70% a 100%), diafanizado em xilol e incluído em parafina. Após a inclusão, foram obtidos cortes transversais, com aproximadamente 5 $\mu$ m de espessura, os quais foram posteriormente corados com hematoxilina e eosina (H/E).

Diante da importância de se obter um preparado permanente, após a coloração, o material foi desidratado, diafanizado e montado com Entellan® entre lâmina e lamínula.

A análise histológica das lâminas contendo os tecidos foram observadas e fotografadas em microscópio de luz DM LS (Leika) com captador de imagem DF420 (Leika) e programa de imagem Leika Application Suite, versão 3.1.0.

### **3.18 Vias de sinalização em rim, fígado e pulmão por *Immunoblot***

As análises por Immunoblot foram realizadas no Laboratório de Imunologia Experimental (LIE) localizado no Instituto de Ciências Biomédica IV da USP com auxílio do Prof. Dr Anderson de Sá Nunes e pela doutoranda Priscila Guirão Lara.

Os órgãos foram lisados com tampão de lise RIPA (Tris-HCl 50 mM pH = 7,5 – 8,0; NaCl 150 mM; Triton X-100 1%; deoxicolato de sódio 1%; SDS 0,1 % e coquetel inibidor de protease – Sigma Aldrich) e a concentração de proteínas foi determinada utilizando o kit comercial BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology) de acordo com as instruções do fabricante. Quantidades iguais de proteínas foram separadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com leite 7% em tampão tris com 0,1% de Tween (TBS-T) e incubadas *overnight* com os seguintes anticorpos em tampão TBS-T com 2% de BSA: TLR-4, TLR-2, p38 e beta-actina. Posteriormente após lavagem as membranas foram incubadas com anticorpo secundário apropriado conjugado com peroxidase e reagente quimioluminescente para finalmente ser exposto a filme fotográfico.

### **3.19 Análise Estatística**

Os dados obtidos, inicialmente foram testados quanto ao tipo de distribuição gaussiana, caso passassem no teste de normalidade os resultados seriam avaliados através de teste t ou ANOVA de uma via seguido de teste de múltiplas comparações de Tukey-Kramer. Os resultados obtidos nos experimentos foram representados por média  $\pm$

erro padrão da média (e.p.m.). Os dados foram processados e analisados utilizando o programa GraphPad Prisma 6 e SPSS 21, admitindo como significativo um valor de  $p < 0,05$ , sendo representado por um traço com asterisco acima (\*).

## **4 RESULTADOS**

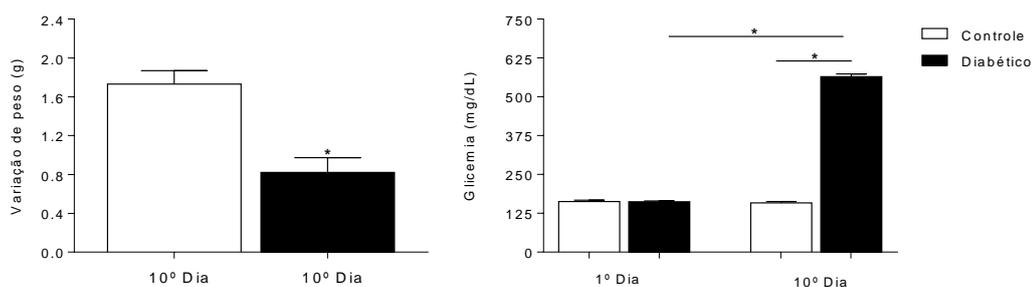
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização do modelo de DM e CLP

Os animais tornados diabéticos apresentaram um menor ganho de peso corporal e hiperglicemia (Fig. 4) em comparação com os respectivos controles após os dez dias do estabelecimento da doença.

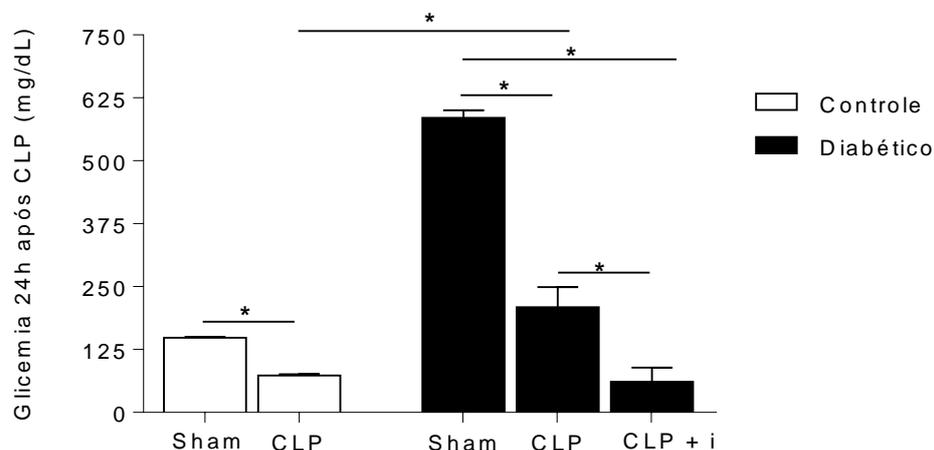
Após a caracterização dos animais diabéticos (menor ganho de peso corporal e glicemia acima de 300 mg/dL) e controle (ganho de peso corporal e glicemia inferior a 300 mg/dL sem jejum), estes foram separados para a caracterização do modelo de sepse induzido por CLP.

**Figura 4. Animais diabéticos apresentam menor ganho de peso e hiperglicemia após 10 dias do estabelecimento da doença.** Dados são apresentados com média e e.p.m. \* $p < 0,05$  versus grupo indicado. Foram utilizados de 12 a 21 animais por grupo.



A Figura 5 mostra a variação da glicemia após 24 horas da realização da cirurgia. Tanto animais controle e diabéticos-CLP apresentaram uma redução da glicemia quando comparados aos animais que sofreram apenas a manipulação do ceco sem a ligação e perfuração (sham), além disso, o tratamento com insulina nos camundongos diabéticos-CLP (CLP + i) restaurou o perfil glicêmico a níveis semelhantes ao controle-CLP.

**Figura 5. O tratamento cirúrgico para indução da sepse (CLP) e a insulina provocaram redução da glicemia.** Sham (ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração); CLP (ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes); CLP + i (ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina). Dados são apresentados com média e e.p.m. \* $p < 0,05$  versus grupo indicado. Foram utilizados de 5 a 8 animais por grupo.

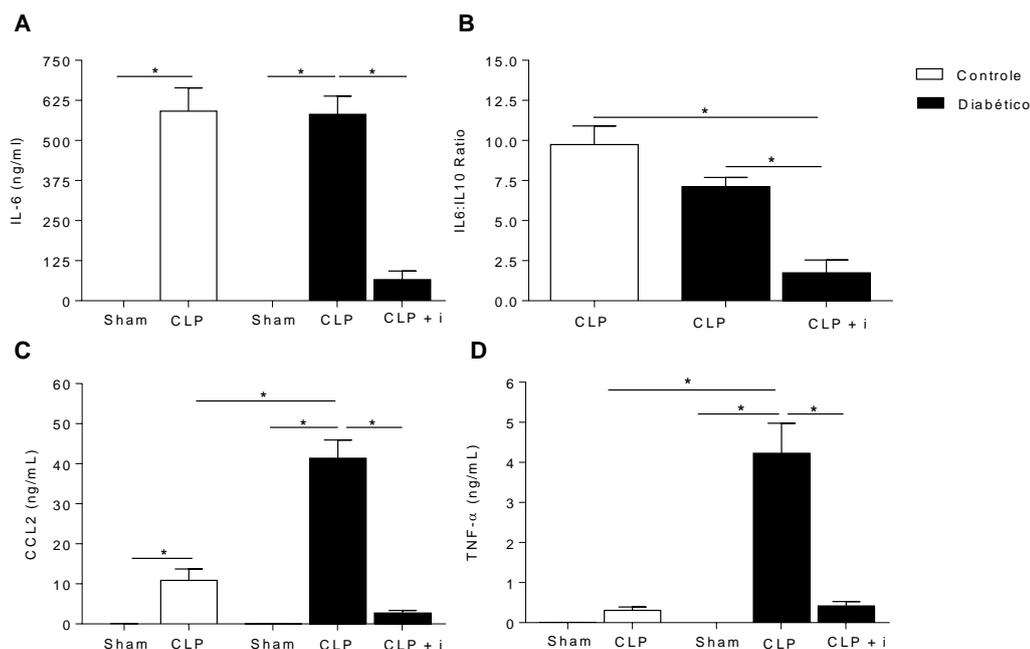


#### 4.2 Insulina previne o aumento dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias

A resposta pró-inflamatória inicial na sepse é a responsável pelas mortes precoces nesses pacientes, no entanto, um concomitante estado imunossupressivo iniciado junto com a tempestade de citocinas atinge a maioria dos sobreviventes e, pode levar, às mortes tardias.

A figura 6 mostra as alterações no perfil de citocinas dos animais analisados. Comparado com os camundongos sham, tanto controle e diabéticos CLP apresentaram aumentos similares nos níveis de IL-6 e da razão IL6:IL10 (Fig. 6A e 6B, respectivamente). No entanto, houve um aumento sérico significativo nos animais diabéticos-CLP das citocinas pró-inflamatórias CCL2 (Figura 6C) e TNF- $\alpha$  (Figura 6D) ao compará-los com o controle. O tratamento com uma única dose de insulina (CLP + i) reduziu significativamente os níveis séricos dessas citocinas (Fig. 6).

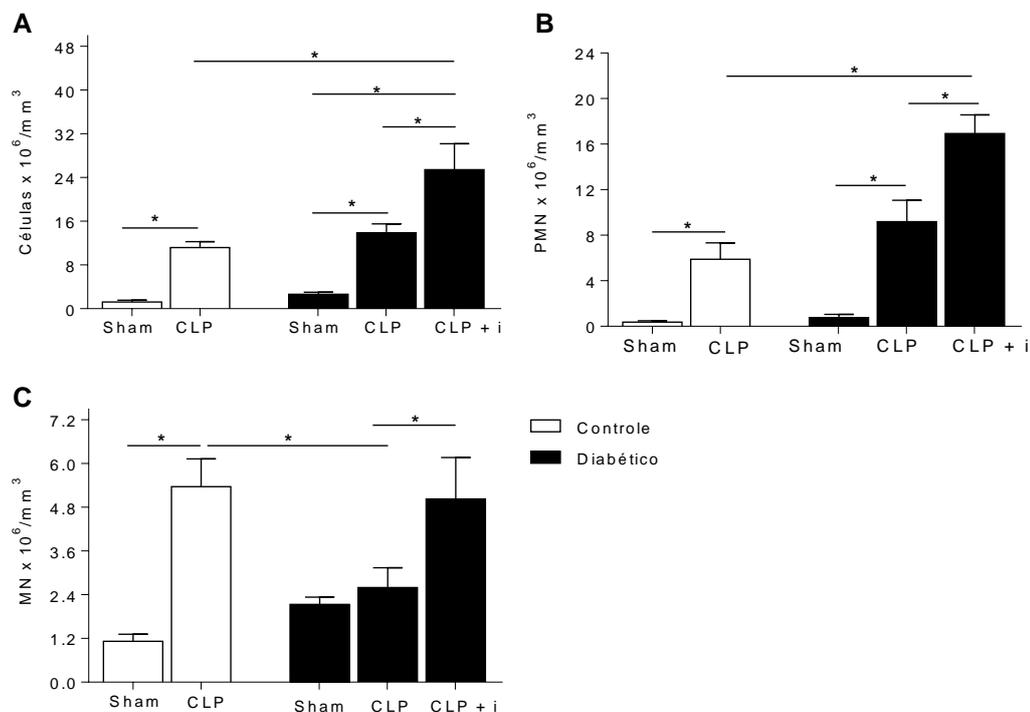
**Figura 6. Insulina previne o aumento das concentrações sanguíneas de citocinas pró-inflamatórias e reduz a razão IL6:IL10.** A) IL-6; B) IL6:IL10; C) MCP-1; D) TNF- $\alpha$  em amostras de soro. Sham (ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração); CLP (ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes); CLP + i (ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina). Dados são apresentados com média e e.p.m. \* $p < 0,05$  versus grupo indicado. Foram utilizados de 4 a 8 animais por grupo.



### 4.3 Insulina intensifica a migração leucocitária e a liberação de citocinas/quimiocinas no LPe

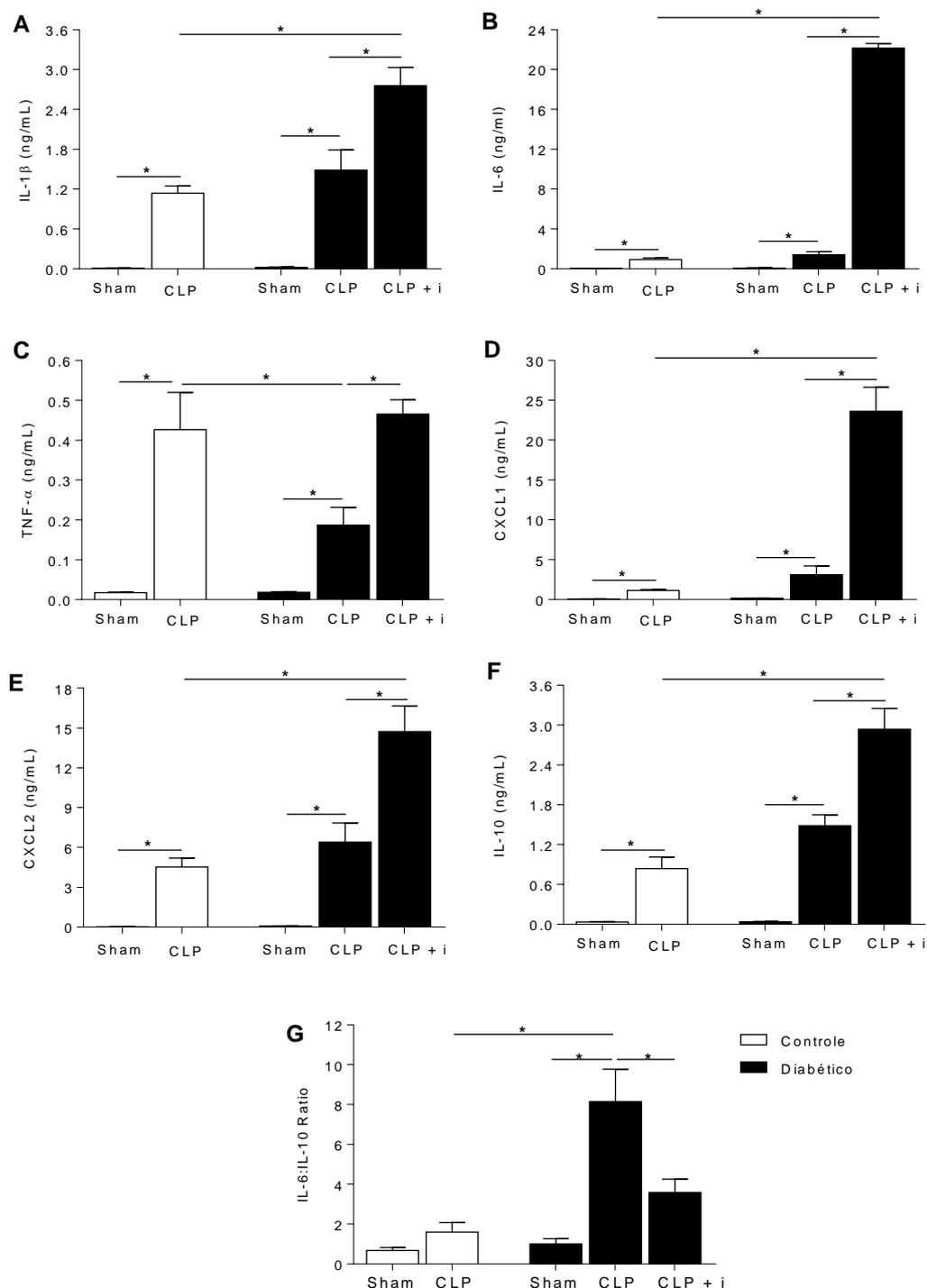
A inflamação causa pela perfuração do ceco aumenta, significativamente, a celularidade total do fluido peritoneal em animais diabéticos e controles quando comparados com o sham (Fig. 7). Nesse contexto, neutrófilos correspondem a 84% da contagem celular total em ambos os grupos CLP (controle e diabetes), no entanto, não foi observado uma mobilização semelhante nas células mononucleares dos animais diabéticos-CLP (Fig. 7C). Após o tratamento com insulina (CLP + i), observamos uma maior migração de neutrófilos concomitantemente com a restauração da mobilização de células mononucleares para o peritônio (Fig. 7B e 7C, respectivamente)

**Figura 7. Insulina aumenta a quimiotaxia de polimorfonucleares e mononucleares para o lavado peritoneal.** A) Contagem celular total; B) Contagem de polimorfonucleares; C) Contagem de mononucleares em lavado peritoneal. Sham (ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração); CLP (ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes); CLP + i (ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina). Dados são apresentados com média e e.p.m. \* $p < 0,05$  versus grupo indicado. Foram utilizados de 4 a 8 animais por grupo.



O perfil de citocinas no LPe foi semelhante ao que ocorreu com a mobilização celular, a inflamação causada pelo CLP aumentou a concentração das citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  (Fig. 8A), IL-6 (Fig. 8B), TNF- $\alpha$  (Fig. 8C), CXCL1 (Fig. 8D), CXCL2 (Fig. 8E) e da citocina anti-inflamatória IL-10 (Fig. 8F) e da razão IL6:IL10 (Figura 8G). Os animais diabéticos tratados com insulina (CLP + i) exibiram um aumento ainda maior nessas citocinas, no entanto, foi observado uma redução na razão IL6:IL10.

**Figura 8. Insulina aumenta a concentração de citocinas/quimiocinas e reduz a razão IL6:IL10 no lavado peritoneal.** A) IL-1 $\beta$ ; B) IL-6; C) TNF- $\alpha$ ; D) CXCL-1; E) CXCL-2; F) IL-10; G) IL6:IL10 em lavado peritoneal. Sham (ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração); CLP (ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes); CLP + i (ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina). Dados são apresentados com média e e.p.m. \* $p < 0,05$  versus grupo indicado. Foram utilizados de 4 a 8 animais por grupo.

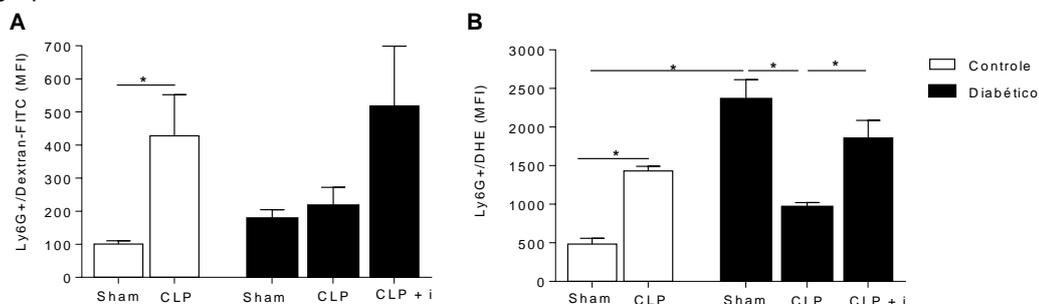


#### 4.4 Insulina restaura a capacidade endocítica e a produção de EROs dos neutrófilos de animais diabéticos sépticos

Analizamos a função neutrofílica em animais diabéticos tratados com insulina e controle, 24 horas após o procedimento cirúrgico. Animais controle-CLP apresentaram um aumento da capacidade endocítica de partículas de Dextran-FITC ao serem comparados com camundongos controle-sham (Fig. 9A). A mesma análise ao ser realizada com animais diabético-CLP mostrou que esse mesmo aumento na endocitose não ocorreu quando comparados aos camundongos diabético-sham (Figura 9A), sugerindo que essas células não respondem ao estímulo inflamatório. O tratamento com insulina, 24 horas após o procedimento cirúrgico restaurou, aparentemente, esse parâmetro (Fig. 9A).

A análise da produção intracelular de ERO mostrou que os animais controle-CLP possuíam uma maior quantidade ao serem comparados com os controle-sham (Figura 9B), no entanto, camundongos diabético-sham já apresentavam uma quantidade exacerbada dessas moléculas, indicando um estresse oxidativo decorrente da hiperglicemia. Os animais diabéticos-CLP mostraram uma redução na produção de ERO e, o tratamento com insulina, não só restaurou esse parâmetro como intensificou a síntese dessas moléculas (Figura 9B).

**Figura 9. Insulta restaura a capacidade endocítica e a produção de espécie reativas de oxigênio de neutrófilos do lavado peritoneal.** A) Média da intensidade de fluorescência de partículas de Dextran-FITC; B) Média da intensidade de fluorescência DHE em neutrófilos peritoneais. Sham (ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração); CLP (ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes); CLP + i (ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina). Dados são apresentados com média e e.p.m. \* $p < 0,05$  versus grupo indicado. Foram utilizados de 4 a 8 animais por grupo.

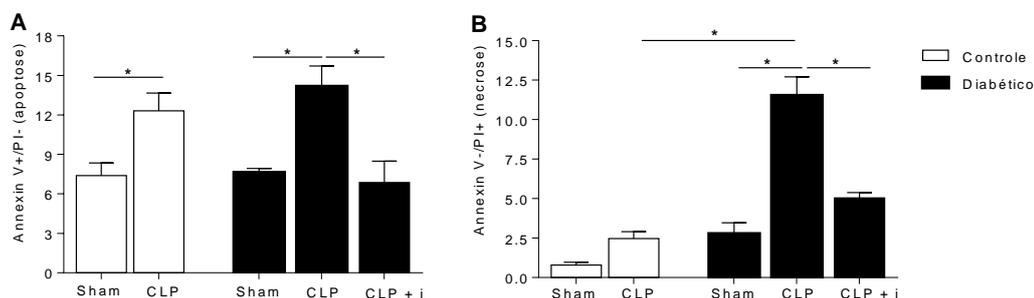


#### 4.5 Insulina previne a depleção celular total e a aumenta a quantidade de células CD4<sup>+</sup> mas não CD8<sup>+</sup> no baço

O baço dos animais que sofreram o procedimento cirúrgico (CLP) apresentou apoptose aumentada na comparação com camundongos sham (Fig. 10A). Apesar do mesmo resultado ter sido encontrado em animais controle e diabéticos, esses últimos apresentaram tanto um aumento de apoptose quanto de necrose (Fig. 10A e 10B).

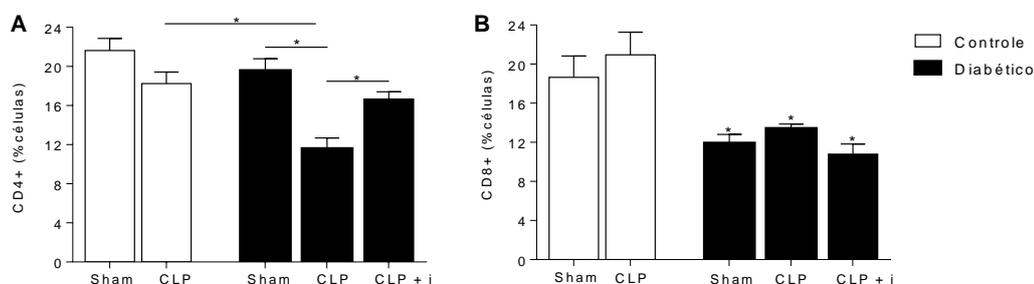
O tratamento com insulina dos camundongos diabéticos CLP reduziu tanto o número de células apoptóticas quanto necróticas (Fig. 10A e 10B).

**Figura 10. Insulina previne a depleção celular total por apoptose e necrose em tecido esplênico.** A) Porcentagem de apoptose; B) Porcentagem de necrose em amostras de baço. Sham (ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração); CLP (ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes); CLP + i (ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina). Dados são apresentados com média e e.p.m. \* $p < 0,05$  versus grupo indicado. Foram utilizados de 4 a 8 animais por grupo.



Na tentativa de avaliar se a insulina previne a perda de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no decorrer da sepse, a contagem absoluta dessas populações foi quantificada 24 horas após o CLP. Os resultados obtidos mostram que os animais controles não sofreram alterações na quantidade de CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> após essas 24 horas (Fig. 11A e 11B). No entanto, em animais diabéticos, o CLP induziu a redução no total de células CD4<sup>+</sup>, evento este prevenido pelo tratamento com insulina (Fig. 11A). O mesmo fenômeno não foi observado em relação às células CD8<sup>+</sup>, uma vez que todos os grupos diabéticos apresentaram uma porcentagem reduzida comparados com controle-sham e controle-CLP (Fig. 11B).

**Figura 11. Insula restaura a porcentagem de células CD4+ mas não CD8+ em tecido esplênico.** A) Porcentagem de células CD4+; B) Porcentagem de células CD8+ em amostras de baço. Sham (ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração); CLP (ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes); CLP + i (ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina). Dados são apresentados com média e e.p.m. \* $p < 0,05$  versus grupo indicado. Foram utilizados de 4 a 8 animais por grupo.



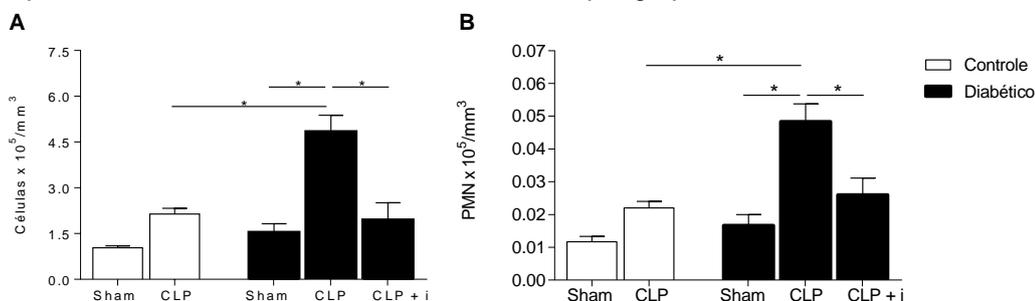
#### 4.6 Insulina restaura parâmetros pró-inflamatórios e aumenta a produção de IL-10 no tecido pulmonar

No presente estudo buscamos avaliar se um modelo de CLP de 24 horas com seis perfurações do ceco provocaria manifestações inflamatórias pulmonares e se existe diferenças entre animais controle e diabéticos. Essa avaliação foi feita através da contagem total e específica de células coletadas do LBA, perfil de citocinas e quimiocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL1, CXCL2 e IL-10), quantificação de proteínas e análises histomorfológicas.

A primeira análise realizada foi a contagem total e específica de células presentes no LBA. Podemos observar que a celularidade total dos animais diabético-CLP está aumentada em relação ao diabético-sham e ao controle-CLP, no entanto, o tratamento com insulina restaurou esse parâmetro em níveis próximos aos animais controle-CLP (Fig. 12A).

Na contagem específica, foi observado um aumento de PMN no diabético-CLP em relação aos animais sham (Fig. 12B). No entanto, como ocorrido anteriormente, o tratamento com insulina restaurou esse parâmetro a níveis próximos ao dos animais controle-CLP (Fig. 12B).

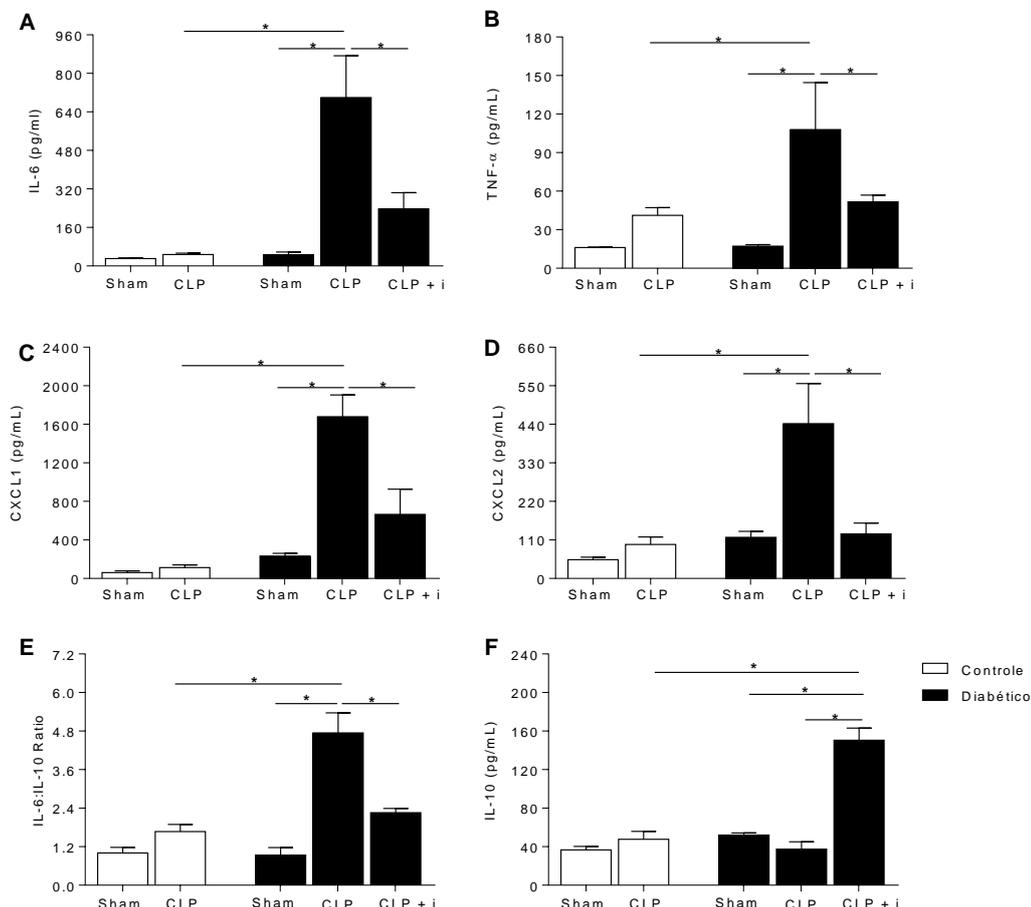
**Figura 12. Insulina previne o acúmulo de polimorfonucleares no lavado broncoalveolar.** A) Celularidade total; B) Polimorfonucleares em lavado broncoalveolar. Sham (ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração); CLP (ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes); CLP + i (ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina). Dados são apresentados com média e e.p.m. \* $p < 0,05$  versus grupo indicado. Foram utilizados de 4 a 8 animais por grupo.



Os mononucleares dos animais controle-sham ( $0,12 \pm 0,01$  células  $\times 10^6/\text{mm}^3$ ), controle-CLP ( $0,18 \pm 0,02$  células  $\times 10^6/\text{mm}^3$ ), diabético-sham ( $0,26 \pm 0,09$  células  $\times 10^6/\text{mm}^3$ ), diabético-CLP ( $0,36 \pm 0,07$  células  $\times 10^6/\text{mm}^3$ ) e diabético-CLP + i ( $0,23 \pm 0,06$  células  $\times 10^6/\text{mm}^3$ ) não mostraram diferenças estatísticas. Em relação ao perfil de citocinas e quimiocinas avaliado no sobrenadante dos LBA, observamos um perfil semelhante entre IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL-1, CXCL2 e a razão IL6:IL10. Essas proteínas pró-inflamatórias apresentaram um aumento significativo nos animais diabético-CLP ao compará-los com o grupo controle-CLP. No entanto, o tratamento com insulina reduziu a produção dessas moléculas (Fig. 13A a 13E).

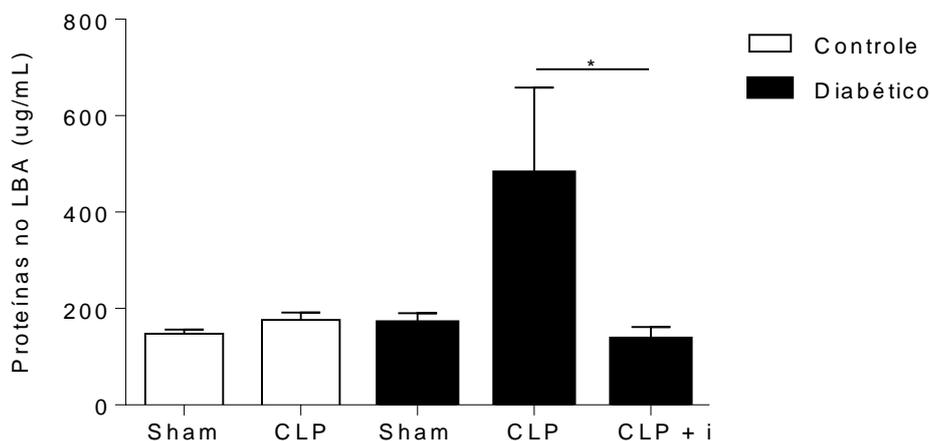
A análise da citocina anti-inflamatória IL-10 mostrou um perfil diferente das apresentadas pelas pró-inflamatórias. Nesse caso, observamos uma elevação na produção apenas após o tratamento com insulina (Fig. 13F).

**Figura 13. Insulina reduz o perfil pró-inflamatório e aumenta a concentração de IL-10 no lavado broncoalveolar.** A) IL-6; B) TNF- $\alpha$ ; C) CXCL-1; D) CXCL-2; E) IL6:IL10; F) IL-10 em lavado broncoalveolar. Sham (ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração); CLP (ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes); CLP + i (ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina). Dados são apresentados com média e e.p.m. \* $p < 0,05$  versus grupo indicado. Foram utilizados de 4 a 8 animais por grupo.



Na tentativa de avaliar edema pulmonar, uma das tradicionais fases da ALI (FILGUEIRAS et al., 2014), o extravasamento proteico foi avaliado no sobrenadante do LBA. Podemos observar que o animal diabético-CLP possui um valor elevado de proteína em comparação com os demais grupos apesar de a única diferença estatística significativa tenha sido em relação ao grupo tratado com insulina. Entretanto, observa-se uma tendência de aumento desse parâmetro nos camundongos diabético-CLP e que o tratamento com insulina restaura esse padrão (Fig. 14).

**Figura 14. Insulina previne o acúmulo proteico em lavado broncoalveolar.** Sham (ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração); CLP (ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes); CLP + i (ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina). Dados são apresentados com média e e.p.m. \* $p < 0,05$  versus grupo indicado. Foram utilizados de 4 a 8 animais por grupo.

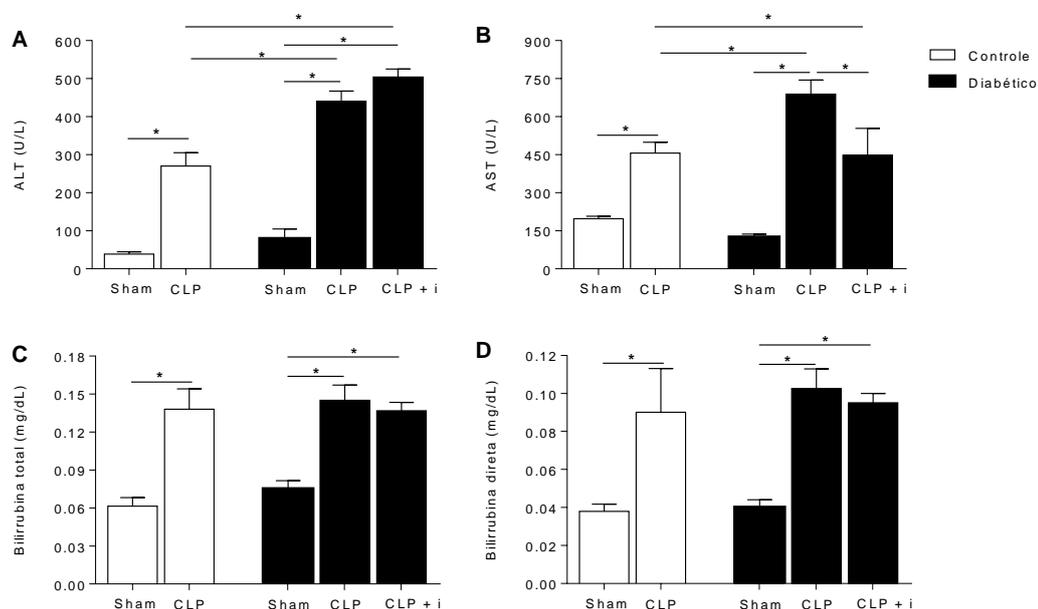


#### 4.7 Insulina restaura parâmetros pró-inflamatórios e aumenta a produção de IL-10 no tecido hepático

A disfunção múltipla de órgãos é um desfecho comum para os pacientes sépticos, sendo os rins e fígado afetados mais constantemente. Inicialmente realizamos as dosagens de marcadores de função hepática como as enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e bilirrubina total e frações.

Podemos observar na Figura 15A e 15B que os animais controle-CLP apresentam níveis elevados de ALT e AST em comparação com controle-sham. No entanto, o nível de ALT nos camundongos diabéticos-CLP tratados ou não com insulina apresenta-se ainda mais elevado ao compará-los com o animal controle-CLP. O uso desse hormônio reduziu apenas os níveis de AST no grupo diabético-CLP (Fig. 15B).

**Figura 15. Insulina previne o aumento da concentração de AST sem interferir nos demais parâmetros bioquímicos hepáticos.** A) ALT; B) AST; C) Bilirrubina total; D) Bilirrubina direta em soro. Sham (ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração); CLP (ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes); CLP + i (ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina). Dados são apresentados com média e e.p.m. \* $p < 0,05$  versus grupo indicado. Foram utilizados de 4 a 8 animais por grupo.



A análise da bilirrubina total mostrou também um aumento nos animais com sepse em relação ao sham tanto em diabéticos quanto no controle. No entanto, nesse caso, observamos que o tratamento com insulina não restaurou os níveis das bilirrubinas (Fig. 15C e 15D).

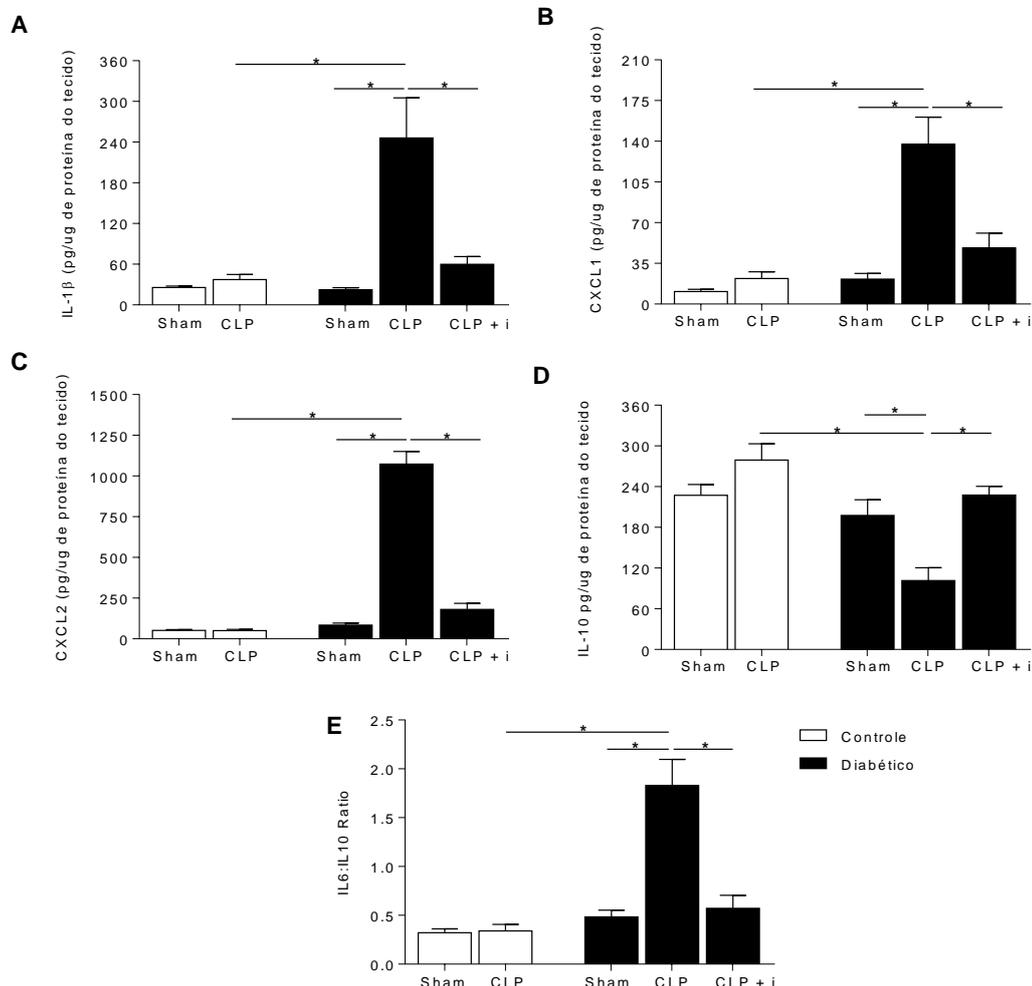
A avaliação das frações da bilirrubina indicou que essa variação estava ocorrendo devido a bilirrubina direta que é um dos indicadores de obstrução hepática. Na análise desse parâmetro, observamos também um aumento em relação aos animais sham, tanto nos diabéticos tratados ou não como nos controles com sepse (CLP) (Fig. 15D).

A análise do perfil de citocinas e quimiocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL1, CXCL2 e IL-10) também foi realizada nas amostras de fígados dos animais após 24 horas da cirurgia.

Em relação às citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias observamos um perfil semelhante entre IL-1 $\beta$ , CXCL1 e CXCL2.

A IL-1 $\beta$  apresentou um aumento significativo entre os animais diabéticos-CLP em relação ao respectivo sham e ao controle-CLP, no entanto, o tratamento com insulina reduziu a produção dessa citocina em níveis próximos ao controle (Fig. 16A).

**Figura 16. Insulina reduz o perfil pró-inflamatório em tecido hepático.** A) IL-1 $\beta$ ; B) CXCL-1; C) CXCL-2; D) IL10; E) IL6:IL-10 em amostra de tecido hepático. Sham (ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração); CLP (ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes); CLP + i (ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina). Dados são apresentados com média e e.p.m. \* $p < 0,05$  versus grupo indicado. Foram utilizados de 4 a 8 animais por grupo.



As quimiocinas CXCL1 (Fig. 16B) e CXCL2 (Fig. 16C), assim como a IL-1 $\beta$  mostraram um aumento significativo apenas nos animais diabéticos-CLP e, o tratamento com insulina reduziu a produção de ambas quimiocinas em níveis comparáveis ao controle-CLP.

A análise da citocina anti-inflamatória IL-10 mostrou um perfil diferente das apresentadas pelas pró-inflamatórias. Nesse caso, observamos níveis elevados nos animais controle (sham e CLP) e nos diabético-sham. No entanto, o mesmo não foi observado nos animais diabético-CLP nos quais os níveis de IL-10 permaneceram reduzidos quando comparados com os demais grupos. Após o tratamento com insulina não só foi demonstrado o aumento na produção de IL-10 como

essa elevação se equipara aos níveis do controle (sham e CLP) (Fig. 16D). O último parâmetro avaliado foi a razão entre IL6:IL10 e nesse caso observamos que os animais diabético-CLP apresentam uma significativa elevação, que é restaurada após o tratamento com insulina (Fig. 16E).

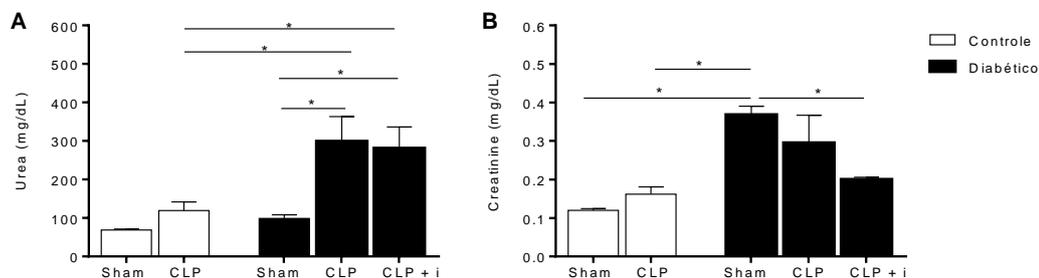
As demais citocinas avaliadas (TNF- $\alpha$  e IL-6) não tiveram diferenças estatísticas significantes entre os grupos.

#### **4.8 Insulina bloqueia o perfil pró-inflamatório e aumenta a produção de IL-10 no tecido renal**

O rim é um dos locais afetados constantemente na disfunção de órgãos provocada pela sepse e, além disso, a própria diabetes pode causar algum grau de lesão renal devido a hiperglicemia persistente que além de induzir o estresse oxidativo e a inflamação (DANDONA et al., 2013) induz também uma disfunção mitocondrial renal que é corrigida com a normoglicemia. Na análise das alterações renais foram utilizadas as dosagens bioquímicas de ureia e creatina bem como do perfil de citocinas e quimiocinas presentes nesse órgão.

Na análise bioquímica do soro dos animais estudados, observamos que o camundongo diabético-sham já possui níveis séricos de ureia e creatinina elevados em relação ao controle. O nosso modelo de sepse de 24 horas não foi suficiente para provocar alterações bioquímicas renais nos animais controle-CLP, no entanto, nos camundongos com diabetes, a sepse aumentou os níveis séricos de ureia (Fig. 17A) e o tratamento com insulina restaurou a concentração de creatinina (Fig. 17B).

**Figura 17. Insulina reduz a concentração sanguínea de creatinina.** A) Urea; B) Creatinina em amostras de soro. Sham (ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração); CLP (ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes); CLP + i (ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina). Dados são apresentados com média e e.p.m. \* $p < 0,05$  versus grupo indicado. Foram utilizados de 4 a 8 animais por grupo.

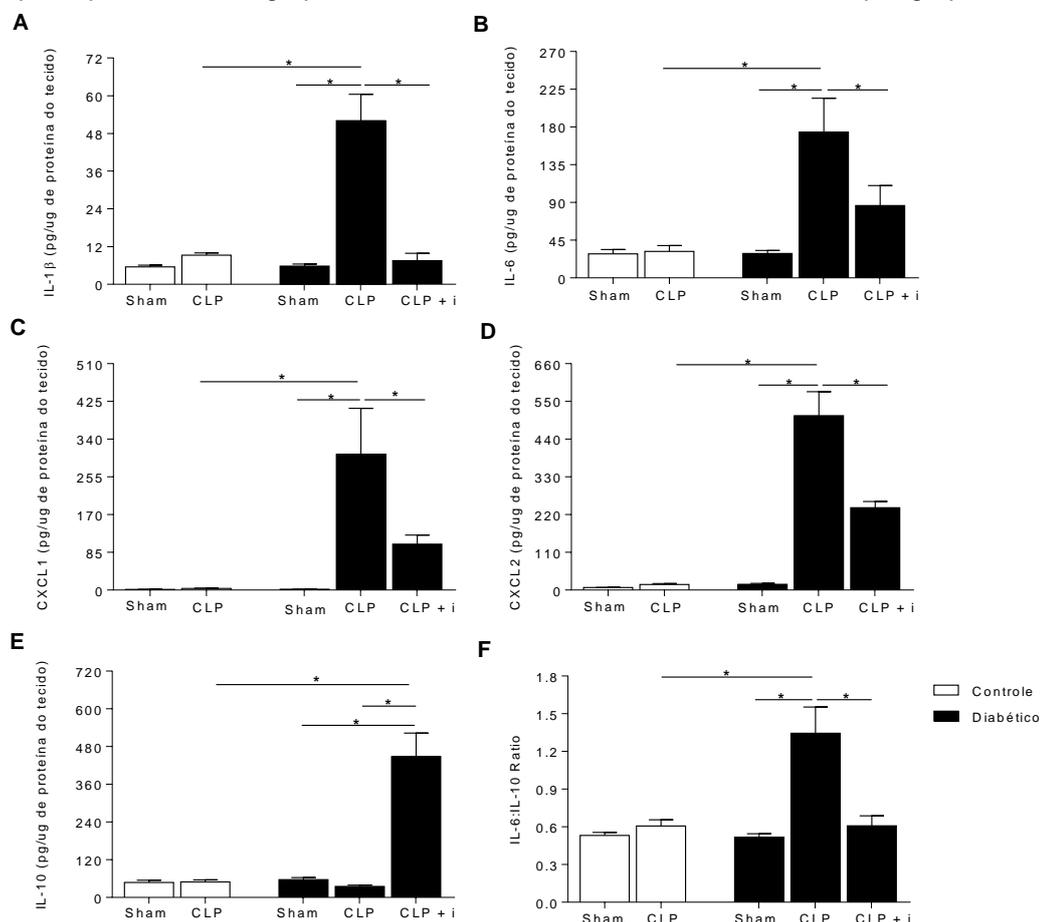


A análise do perfil de citocinas/quimiocinas mostrou algo parecido com o que havia ocorrido no tecido pulmonar e hepático. A primeira molécula avaliada foi a IL-1 $\beta$  e podemos observar que nos animais diabético-CLP há um aumento na produção em comparação ao respectivo sham e controle-CLP. Nesse caso, o tratamento com insulina restaurou os níveis no tecido a valores semelhantes ao do controle (Fig. 18A).

A análise da IL-6, CXCL1 e CXCL-2 mostraram um perfil um pouco diferente do apresentado pela IL-1 $\beta$ , houve produção significativa dessas citocina/quimiocinas nos animais diabético-CLP, no entanto, o tratamento com insulina apesar de ter reduzido o nível, este ainda permaneceu elevado em comparação ao controle CLP (Fig. 18B, 18C e 18D).

Em relação à citocina anti-inflamatória IL-10 e a razão IL6:IL10, o mesmo perfil apresentado no pulmão e no fígado também ocorre no tecido renal. O tratamento com insulina dos animais diabético-CLP estimulou a produção de IL-10 e reduziu a razão IL6:IL10 (Fig. 18E e 18F).

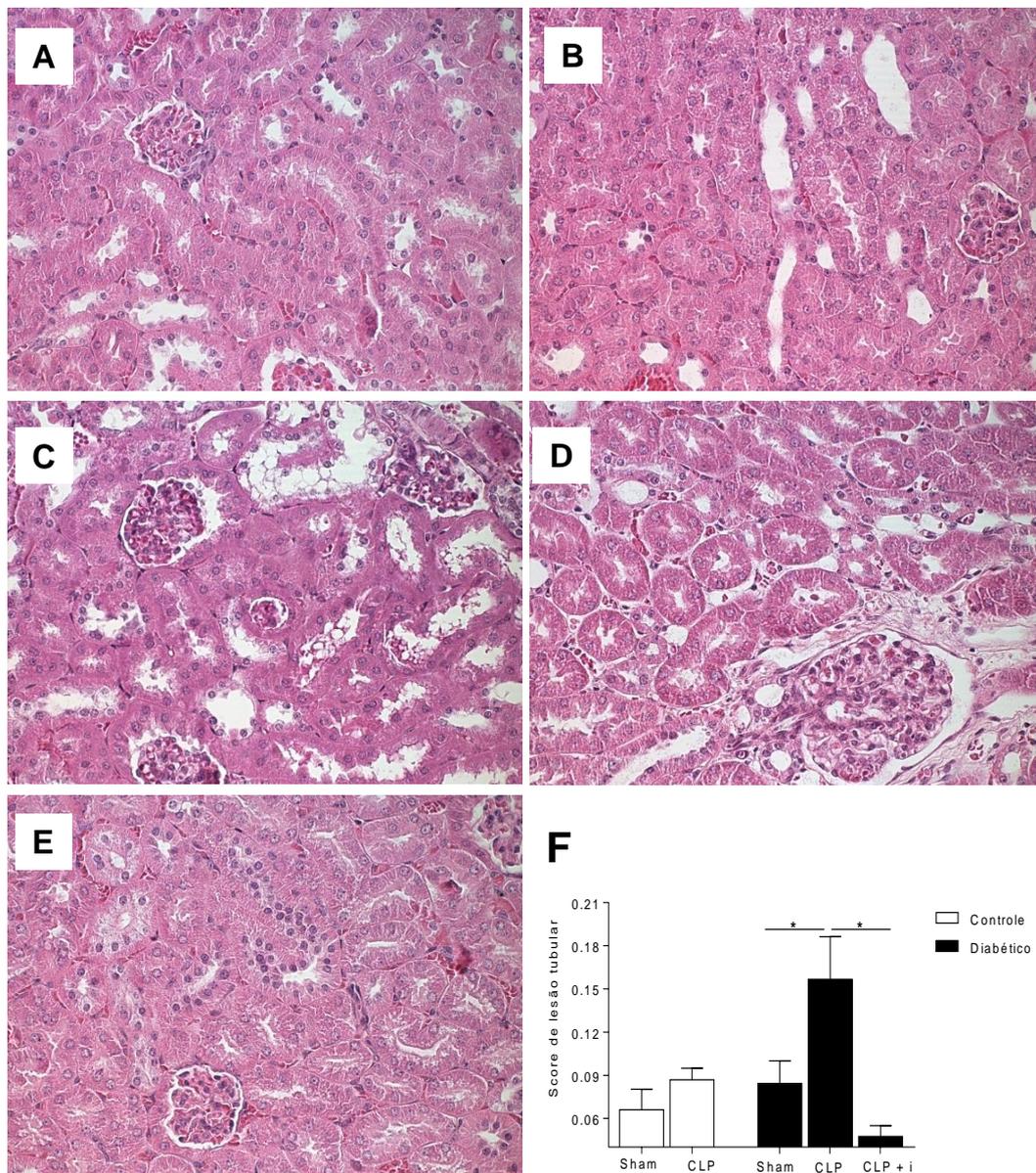
**Figura 18. Insulina reduz o perfil pró-inflamatório e aumenta a concentração de IL-10 em tecido renal.** A) IL-1 $\beta$ ; B) IL-6; C) CXCL-1; D) CXCL-2; E) IL10; F) IL6:IL-10 em amostras de tecido renal. Sham (ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração); CLP (ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes); CLP + i (ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina). Dados são apresentados com média e e.p.m. \* $p < 0,05$  versus grupo indicado. Foram utilizados de 4 a 8 animais por grupo.



#### 4.9 Insulina protege o tecido renal de alterações histopatológicas ao inibir a translocação nuclear de NF- $\kappa$ B

O efeito protetivo da insulina foi avaliado através de observações histopatológicas de cortes histológicos de tecido pulmonar, hepático e renal. Dentre esses diferentes órgãos, apenas o rim apresentou alterações histopatológicas causadas pela sepse em animais diabéticos (Fig. 19D). Ao avaliar o score de lesão tubular (Fig. 19F) observamos que o tratamento com insulina protegeu o tecido renal de alterações histopatológicas causadas pela sepse. Baseado nesse parâmetro e no perfil de citocinas buscamos avaliar dois aspectos nas vias de sinalização inflamatórias envolvidas nesse processo de lesão aguda renal.

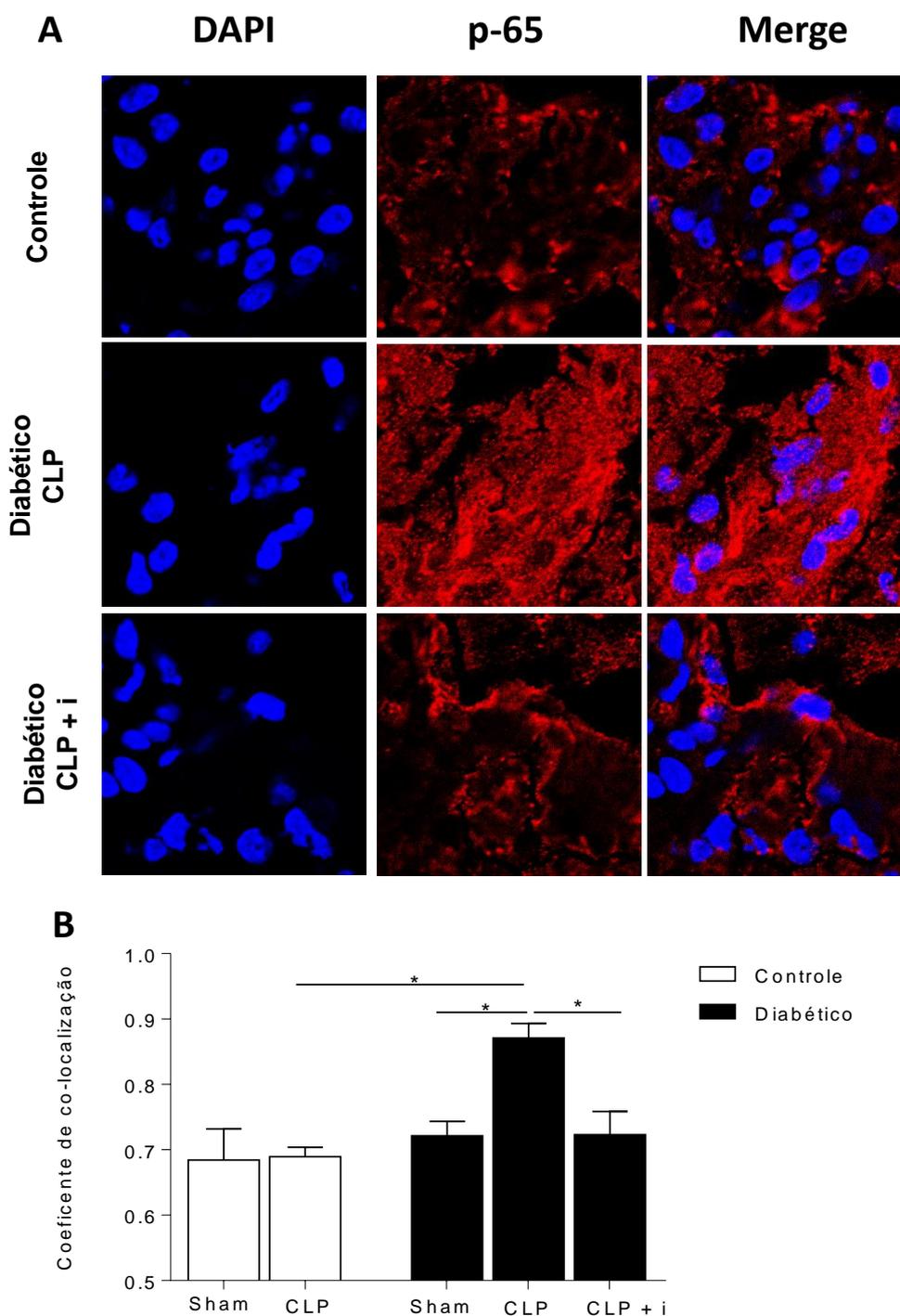
**Figura 19. Insulina protege o tecido renal de alterações histopatológicas.** A) Controle-Sham; B) Controle-CLP; C) Diabético-Sham; D) Diabético-CLP; E) Diabético-CLP + insulina. Sham (ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração); CLP (ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes); CLP + i (ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina). Dados são apresentados com média e e.p.m. \* $p < 0,05$  versus grupo indicado. Foram utilizados de 4 a 8 animais por grupo.



O primeiro parâmetro analisado foi a expressão de TLR-4 e não conseguimos observar diferenças significativas entre os tecidos normais e lesados. No entanto, observamos um aumento da translocação nuclear da unidade p65 do NF- $\kappa$ B (Fig. 20A) e ao quantificarmos a co-localização dessa molécula, notamos uma maior quantidade no tecido renal de

animais diabético-CLP e o tratamento com insulina restaurou esse parâmetro (Fig. 20B).

**Figura 20. Insulina previne a translocação nuclear da fração p65 do NF- $\kappa$ B.** Sham (ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração); CLP (ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes); CLP + i (ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina). Dados são apresentados com média e e.p.m. \* $p < 0,05$  versus grupo indicado. Foram utilizados de 4 a 8 animais por grupo.



## **5 DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

Um dos pilares da pesquisa biomédica moderna é a utilização de modelos experimentais com animais para desvendar mecanismos patofisiológicos, elucidar novas abordagens terapêuticas e por fim, conseguir transportar protocolos da bancada para o paciente. A utilização de camundongos como modelo animal de desordens em humanos por muito tempo tem sido considerada essencial para descobrir os mecanismos básicos das doenças além auxiliar na medicina translacional (SEOK et al., 2013).

O DM do tipo 1 trata-se de uma desordem autoimune marcada pela deficiência de insulina irreversível provocada pela destruição das células beta pancreáticas devido a ação, principalmente de linfócitos T, e macrófagos (CHATZIGEORGIOU et al., 2009). Nesse caso, o animal necessita desenvolver um estado de carência de insulina para estabelecer um modelo de DM do tipo 1. Dentro desse contexto, existem animais que desenvolvem esse estado espontaneamente e aqueles que necessitam de indução através do tratamento com alguma substância química.

A estreptozotocina e a aloxana, quando administradas em altas doses ou em dosagens repetidas, possuem uma toxicidade seletiva para as células beta pancreáticas, levando a um estado insulinopênico. Devido a essas características, essas substâncias são as mais utilizadas para a indução do DM do tipo 1 (CHATZIGEORGIOU et al., 2009).

A estreptozotocina, apesar de menos tóxica, levou a uma depleção de linfócitos circulantes e timócitos o que inviabilizaria seu uso para estudos do sistema imunológico (WELLHAUSEN, 1986; MULLER, et al., 2011; NAGARAJU, et al., 2014), em virtude disso, a droga de escolha utilizada nesse estudo foi a aloxana, utilizando uma dose única na concentração de 60 mg/kg do animal diluída em salina para a indução do DM tipo 1 (modificado SPILLER et al., 2012).

Após dez dias para o estabelecimento da doença os animais foram separados em controle e diabéticos baseado em sintomas clássicos do DM insulino-dependente, como hiperglicemia persistente (acima de 300 mg/dL), polifagia, polidipsia, e menor ganho de peso corporal quando

comparados com os camundongos que receberam 60  $\mu$ L de salina pela mesma via endovenosa.

Uma glicemia mal controlada, como no caso dos diabéticos tipo 1, leva um estado catabólico intenso com aumento da lipólise, excessiva degradação de aminoácidos e utilização das reservas energéticas do organismo, levando a uma menor variação de peso dos camundongos tratados com aloxana quando comparados ao controle (OLIVEIRA; BRAGA; FERNANDES, 2013).

A hiperglicemia apresentada após os 10 dias de estabelecimento da doença, comprova a eficácia da aloxana na destruição das células beta-pancreáticas e possibilita a separação dos animais em controle e diabéticos antes do procedimento cirúrgico para torna-los sépticos.

A sepse trata-se de uma síndrome complexa e dinâmica com uma heterogeneidade enorme entre os pacientes o que a torna um importante desafio médico e econômico para cientistas e médicos e, além disso, um melhor entendimento dos processos fundamentais envolvidos nessa complexa patologia é essencial para identificar novas abordagens terapêuticas (DEJAGER et al., 2011). Para tanto é necessário utilizar um modelo animal reprodutível com ajustes controláveis para reduzir o número de variáveis no intuito de um estudo detalhado dos mecanismos responsáveis por qualquer alteração imunológica, cardiovascular e metabólicas (HUBBARD et al., 2005).

Diferentes modelos foram desenvolvidos para o estudo da sepse desde a administração de toxinas exógenas como o zimosan ou o LPS, passando pela infusão de patógenos viáveis e chegando ao modelo de lesar a barreira intestinal que é o caso da CLP. Este modelo tem sido largamente utilizado no estudo da patofisiologia da sepse e comparado com outros, possui uma melhor representação da complexidade que é a sepse em humanos (DEJAGER et al., 2011).

O modelo de CLP foi descrito há um pouco mais de 30 anos atrás e se baseia em uma peritonite polimicrobiana através de uma ligação cirúrgica do ceco seguida de uma punção por agulha que permitirá o extravasamento do conteúdo cecal na cavidade abdominal (DEJAGER et al., 2011; STARR et al., 2014). É um procedimento baseado em três

pilares: lesão tecidual, necrose e infecção. A peritonite causada evolui para a translocação das enterobactérias para a corrente sanguínea, ativando assim, a resposta inflamatória sistêmica que culminará, com o choque séptico. O procedimento cirúrgico simples, a presença de um foco primário de infecção simula bem a progressão da sepse em humanos com fases hemodinâmicas e metabólicas semelhantes (WICHTERMAN; BAUE; CHAUDRY, 1980; DEJAGER et al., 2011).

A gravidade da sepse por CLP é altamente dependente do nível da infecção que pode ser influenciado pelo volume, rapidez e duração da liberação do conteúdo cecal no abdome, e da flora bacteriana presente no ceco. Portanto, em experimentos com animais que possuem em média o mesmo tamanho e forma cecal, bem como, uma flora semelhante, o CLP deve ser o modelo de escolha (STARR et al., 2014).

Há tempos é reconhecido que a sepse induz alterações no metabolismo que tendem a promover hiperglicemia de causas multifatoriais como a elevação dos níveis de hormônios contrarregulatórios como as catecolaminas, glucagon, cortisol hormônio de crescimento (GH) que promovem a glicogenólise e gliconeogênese hepática (BRIERRE et al., 2004). No entanto, esse aumento da produção de glicose resulta em uma simultânea liberação aumentada de insulina com uma concomitante resistência à insulina induzida por citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF. Esses fatores combinados levam a um estado hiperglicêmico de animais ou pacientes sem diabetes (BRIERRE et al., 2004).

A produção excessiva de glicose temporariamente excede a razão da disposição para os tecidos periféricos, no entanto, em algum momento durante o episódio séptico um novo estado metabólico estável é atingido no qual a elevação na captação da glicose pelo tecido periférico se equipara à elevada produção. Nesse momento, existe pequena ou nenhuma diferença na concentração glicêmica quando comparado com o controle. Finalmente, em condições de sepse grave a razão na utilização da glicose excede a produção, resultando em hipoglicemia (MAITRA; WOJNAR; LANG, 2000; JACOB et al., 2008).

No presente estudo, utilizamos um modelo de CLP de 24 horas e observamos que nossos dados estão de acordo com a literatura, uma vez que os animais controle-CLP apresentaram uma queda significativa da glicose sanguínea quando comparados aos camundongos controle falso operados, apresentando uma hipoglicemia moderada.

Em relação aos animais diabético-CLP, a mesma queda da glicemia foi observada, condizendo com alguns estudos consultados. Em um trabalho com animais DM tipo 2, (JACOB et al., 2008) demonstraram uma queda significativa da glicemia após uma CLP de 20 horas. Em outro estudo, (OSUCHOWSKI et al., 2010) utilizando animais AKITA, que são um modelo espontâneo de DM tipo 1, demonstraram também a queda da glicemia após uma CLP de 24 horas para níveis próximos ao controle.

O animal diabético-CLP mostrou redução da glicemia em relação ao animal sham, porém, esse valor foi acima do apresentado pelo controle-CLP. O tratamento com insulina reduziu ainda mais essa glicose chegando a níveis semelhantes ao animal controle-CLP.

Um importante achado deste estudo foi a resposta inflamatória exacerbada nos animais diabético-CLP. A rápida secreção de citocinas em infecções agudas é bem menos compreendida do que a resposta inflamatória intensa no diabetes crônico. Nossos dados indicam que a resposta inflamatória exacerbada pode estar relacionada a mau prognóstico nos animais diabéticos. Especificamente, os resultados mostraram que as concentrações aumentadas de TNF- $\alpha$ , CCL2, IL-6 e uma razão IL-6: IL-10 diminuída estão associadas com esse mau prognóstico. Outros estudos demonstraram que o aumento dos níveis séricos de IL-6 e IL-6: IL-10 estão relacionados com a gravidade da sepse e com a falha de órgãos (TAKAHASHI; NAKADA; YAZAKI, 2016; GREALY et al., 2013) e que maiores níveis de IL-6 e CCL2 contribuem para a morte precoce por sepse (HONG et al., 2014).

Outro estudo mostrou que as citocinas IL1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e CCL2, cujas concentrações são aumentados em animais diabéticos submetidos à CLP, são bons marcadores de mortalidade precoce (BOZA et al., 2007; SURBATOVIC et al., 2015) e que os níveis de CCL2 correlacionado com a disfunção de órgãos (BOZA et al., 2007). Dentro desse contexto, a

resposta inflamatória exacerbada induzida pela sepse foi atenuada pelo tratamento com insulina melhorando o prognóstico dos animais em questão e provocando reduções significativas nas concentrações de IL-6, TNF- $\alpha$  e CCL2 circulantes e na razão de IL-6:IL-10.

A transmigração leucocitária para o foco infeccioso é o componente crítico da resposta imune à sepse (ALVES-FILHO et al., 2008). Os mecanismos subjacentes ao comprometimento funcional dos leucócitos, especialmente dos neutrófilos, não estão bem estabelecidos. A diminuição da migração de neutrófilos para locais de infecção está directamente relacionada com a mortalidade na sepse. Isso geralmente acontece apesar de altos níveis de mediadores quimiotáticos locais e pode causar a acumulação de neutrófilos em outros órgãos resultando em disfunção e aumento da gravidade da sepse (ALVES-FILHO et al., 2008; ALVES-FILHO; SPILLER; CUNHA, 2010).

A atividade biológica do LPe ainda não é bem caracterizada, no entanto, alguns estudos mostram que devido a excessiva produção e concentração de citocinas pró-inflamatórias e, a reabsorção para a corrente sanguínea via circulação linfática, esse fluido atua como um contínuo estímulo de ativação de neutrófilos o que pode contribuir para manifestações sistêmicas posteriores (SHAH et al, 2012).

Na sepse já foi observada a falha na migração neutrofílica e resposta antimicrobiana inadequada em diferentes modelos de animais, que foram associadas a um aumento da elevação de bactérias no peritônio e sangue, seguido de uma inflamação sistêmica e redução dos índices de sobrevivência. Apesar dos elevados níveis de mediadores quimiotáticos no foco da infecção, a ativação sistêmica dos TLR leva a uma hiperprodução de citocinas, quimiocinas e NO no soro que atuam no endotélio e no neutrófilo reduzindo a expressão de moléculas e receptores de adesão dificultando a migração para o foco infeccioso (BENJAMIM et al., 2002; BENJAMIM; FERREIRA; CUNHA, 2000; ALVES-FILHO; SPILLER; CUNHA, 2010; SPILLER et al., 2012). Em animais diabéticos, além da disfunção quimiotática, neutrófilos apresentam disfunções de fagocitose e *killing*. Alguns estudos demonstraram que o

aumento de ROS devido à hiperglicemia pode gerar um estresse oxidativo nessas células (KOH et al., 2012).

No presente estudo, verificou-se que o tratamento com insulina aumenta a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, aumentando a quantidade de PMN e MN. Além disso, foi observado que os animais diabéticos-CLP apresentaram diminuição da migração de leucócitos, que foi restaurada pelo tratamento com insulina. Esta alteração foi seguida por aumentos nos níveis de mediadores inflamatórios no LPE, os quais, durante longos períodos de tempo, podem facilitar a resolução local da inflamação. Em alguns estudos semelhantes o tratamento dos animais sépticos com substâncias químicas que atuam na melhora da quimiotaxia de neutrófilos também aumentam a sobrevivência à sepse (BENJAMIN et al., 2002; ISHII et al., 2012; GUAN et al., 2014). Em um estudo do nosso grupo, foi demonstrado que a insulina pode modular a expressão de ICAM-1 e com isso a adesão e migração de leucócitos para o foco infeccioso (ANJOS-VALOTTA et al., 2006).

A citocina IL-10, uma importante proteína imunoreguladora, está envolvida no controle da inflamação durante a sepse. Nesse estudo, observamos um aumento dessa citocina no LPe com o tratamento insulínico. Essa elevação pode ser explicada pela maior marginalização de neutrófilos para o foco da infecção, uma vez que esses PMN são responsáveis por grande parte da produção de IL-10 (KASTEN; MUENZER; CALDWELL, 2010).

Os neutrófilos após transmigrarem para o tecido inflamatório, em respostas aos estímulos pró-inflamatórios no foco infeccioso, se tornam totalmente ativados, um estado caracterizado pela liberação de grânulos proteicos, aquisição de capacidade fagocítica e a produção das *neutrophil extracellular traps* (NET), que são destinadas a aumentar a capacidade celular em destruir patógenos. O reconhecimento de micro-organismos nos neutrófilos é feito por receptores de superfície e intracelulares que se ligam a moléculas específicas dos patógenos (MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2013). Esses receptores se ligam a carboidratos, lipídios e proteínas antigênicas que não são expressas nas células e tecidos

hospedeiros, e desempenham um papel preponderante no reconhecimento e remoção de micro-organismos não-opsonizados (KENNEDY et al., 2007).

Nos neutrófilos, os receptores de lectina tipo-C são os PPR endocíticos primários e, dentre eles, o mais importante é o Dectina-1 que reconhece as  $\beta$ -glucanas fúngicas para internalização e eliminação (KENNEDY et al., 2007). Outro receptor endocítico importante, seria o *triggering receptor expressed on myeloid cells* (TREM) – 1 que se liga a vários patógenos e apresenta-se *up-regulated* em neutrófilos peritoneais de pacientes com sepse microbiana (FORD; McVIVAR, 2009).

No presente estudo, ao avaliar a capacidade endocítica e a produção de EROs de neutrófilos isolados dos LPe após 24 horas do procedimento cirúrgico observamos que o aumento esperado não ocorreu nos animais diabéticos-CLP. Além disso, verificou-se que os camundongos diabéticos sham apresentavam uma elevada produção de EROs, provavelmente devido ao estresse oxidativo. O tratamento com insulina restaurou ambos parâmetros nessas células.

A análise das células do baço mostrou uma apoptose aumentada nos animais controle-CLP, no entanto, os níveis de células CD4+ e CD8+ permaneceram inalterados. No entanto, camundongos diabéticos-CLP apresentaram não só apoptose como a necrose aumentada, bem como uma reduzida presença de células CD4+ e CD8+. O tratamento com insulina foi capaz de restaurar os níveis de CD4+ mas não interferiu nas células CD8+. Tanto a redução das células linfóides como a diminuição da funcionalidade das células mielóides pode aumentar a susceptibilidade a infecções subsequentes e esta diretamente relacionada com a gravidade e evolução da sepse (CABRERA-PEREZ et al., 2014; DUONG et al., 2014).

Em relação a disfunção de órgãos isso pode ocorrer devido à ativação inapropriada e acúmulo de neutrófilos dentro da microcirculação próxima a determinados órgãos e à migração neutrofílica para regiões diferentes do foco primário (BROWN et al., 2006). Nesse contexto, o pulmão é um dos órgãos frequentemente afetado na sepse podendo desenvolver a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) e,

em uma manifestação menos severa, a lesão aguda pulmonar (ALI) (PARSONS, 2006; BHARGAVA; WENDT, 2012; SURATT) que é caracterizada por edema pulmonar e infiltração de células inflamatórias que levam a uma redução das trocas gasosas. Na forma severa, o agravamento da hipóxia pode levar à falência múltipla de órgãos (HOTCHKISS; KARL, 2003; FILGUEIRAS et al., 2012).

O primeiro parâmetro avaliado no pulmão foi a contagem celular total no LBA e, podemos observar que apesar de um aumento do infiltrado de células dos animais com CLP em relação ao sham, o camundongo diabético-CLP exibiu uma elevação muito mais intensificada. O tratamento com insulina reduziu esse infiltrado celular a valores semelhantes ao controle. Apesar dessa infiltração ser predominantemente causada por MN, esse tipo celular não apresentou diferenças entre os grupos, no entanto, o uso da insulina provocou uma menor migração de PMN, diferentemente do observado no LPe o que pode indicar um efeito protetor desse tratamento.

Nas observações realizadas por Filgueiras et al. (2014) o infiltrado inflamatório foi reduzido nos animais diabéticos e a insulina provocou um aumento a níveis próximos ao controle CLP, um resultado semelhante ao encontrado no LPe. Nesse caso, a migração leucocitária foi prejudicada pelos mesmos fatores mencionados no LPe, excesso de citocinas e quimiocinas bem como *down-regulation* de receptores de membrana envolvidos na quimiotaxia, sendo esses fatores corrigidos pelo tratamento com insulina. No presente estudo, observamos um fenômeno diferente, uma vez que ao não existir um foco inflamatório pulmonar (baixa celularidade e baixa concentração de citocinas e quimiocinas inflamatórias) a insulina apresentou uma ação protetora.

A análise de citocinas e quimiocinas mostra um início de produção exacerbada pelo animal diabético-CLP, principalmente de IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL1 e CXCL2, o que indicaria um início de processo inflamatório, ou seja, uma maior susceptibilidade do camundongo diabético após a instalação da sepse. No entanto, o tratamento com insulina não só reduziu os níveis desses agentes pró-inflamatórios como elevou a quantidade da citocina imunomodulatória IL-10. Além disso, a própria

quantidade proteínica, aparentemente, elevado no animal diabético também foi diminuída após a utilização desse peptídeo.

A expressão e função dos TLRs influenciam largamente a qualidade e o controle da resposta imune em indivíduos com doenças infecciosas e crônicas. Além da sensibilidade para reconhecer patógenos, os TLRs também atuam como receptores de sinais tóxicos endógenos que levam a dano tecidual, especialmente em órgãos distantes do foco da infecção (TSUJIMOTO et al., 2008). Já foi mencionada anteriormente os efeitos pró-inflamatórios causados pela hiperglicemia (DANDONA et al., 2013) e no presente estudo demonstramos a presença de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no tecido pulmonar. Uma explicação para isso poderia ser a elevada expressão dos TLR-4 observado nos animais diabético-CLP, no entanto, isso não foi observado bem como nenhuma alteração histopatológica.

A disfunção de órgãos, um desfecho comum e perigoso na sepse, atinge o tecido hepático com uma certa frequência. Isso, além de representar elevados índices de mortalidade, indica um mau prognóstico para o paciente. O fígado desempenha um importante papel na regulação de uma variedade de atividades metabólicas, homeostáticas e de defesa do organismo, em virtude disso, a lesão hepática pode ser considerada um dos fatores preponderantes na gênese e amplificação da falha de múltiplos órgãos (NESSELER et al., 2012).

A lesão hepática induzida pela sepse pode ser classificada em três categorias: colestática, hepatocelular e choque hepático (KOBASHI; TOSHIMOR; YAMAMOTO, 2013). No presente estudo buscamos avaliar a disfunção desse órgão através da dosagem das transaminases e bilirrubinas totais e frações séricas. Podemos observar que existe uma elevação significativa de ambas as transaminases (ALT e AST) dos animais sham para os camundongos sépticos diabéticos ou não. Além disso, existe uma concentração maior de AST em relação a ALT, o que pode indicar um estado de choque hepático (KOBASHI; TOSHIMOR; YAMAMOTO, 2013), uma vez que esses valores ultrapassam em cerca de três o limite de 200 UI/mL.

A concentração de bilirrubina total, apesar de não estar no valor característico de hiperbilirrubinemia, podemos notar um aumento significativo na concentração nos animais CLP. E, além disso, essa elevação foi causada pela fração indicativa de colestase que seria a bilirrubina direta. No caso das enzimas hepáticas, o tratamento com insulina não interferiu nas concentrações, mas é em relação a bilirrubina direta, esse peptídeo reduziu os valores em comparação com os animais diabéticos sépticos.

O perfil de citocinas e quimiocinas avaliado mostrou uma intensa produção de IL-1 $\beta$ , CXCL1 e CXCL2 apenas pelo animal diabético séptico. Essa citocina, associada a possíveis endotoxinas circulantes levam a uma redução no fluxo da bile produzida pelo fígado, além de promover estresse oxidativo e alteração do citoesqueleto dos hepatócitos. Todas essas alterações contribuem para uma hiperbilirrubinemia associada a uma colestase intra-hepática. As quimiocinas CXCL1 e CXCL2 podem promover a migração de leucócitos para o tecido hepático que somados a hipóxia e hiperfusão tecidual, intensificam ainda mais a disfunção do órgão (RAMADORI; ARMBUST, 2001; MOSELEY, 2004; FUCHS; SANYAL, 2008; NESSELER et al., 2012).

A insulina não só reduziu os níveis dos agentes pró-inflamatórios, como também elevou a quantidade de IL-10 no tecido hepático. Ambas as ações podem ter contribuído para a redução nos níveis de bilirrubina direta e, conseqüentemente, uma melhora nessa colestase inicial.

Outro órgão comumente afetado pela sepse é o rim, o que leva a uma lesão renal aguda (AKI). É uma frequente e grave complicação da síndrome séptica uma vez que está associada com elevada mortalidade. A patofisiologia da AKI na sepse é complexa e multifatorial, incluindo mudanças hemodinâmicas intrarrenais, infiltração de células inflamatórias no parênquima renal, trombose intraglomerular, e obstrução dos túbulos com a presença de células necróticas (ZARJOU; AGARWAL, 2011).

Geralmente, a AKI é definida como um rápido declínio do índice de filtração glomerular (IGF), resultando na retenção resíduos nitrogenados, primariamente, ureia e creatinina. Nesse contexto, o nível sanguíneo dessas substâncias serve como um indicador da redução da função renal

(BASILE; ANDERSON; SUTTON, 2012). Em virtude disso, o presente estudo inicialmente avaliou ambos os marcadores.

Nos animais controles sepse não houve uma elevação significativa em relação aos animais sham, no entanto, os camundongos diabéticos sham já apresentavam níveis elevados de ureia e creatinina quando comparados aos controles. Após a indução da sepse, esses valores aumentaram ainda mais e o tratamento com insulina foi ineficaz na tentativa de restaurar para níveis próximos ao controle. Essa alteração apenas nos animais diabéticos pode ser indicativa de uma nefropatia diabética que é causada por vários fatores incluindo hiperglicemia persistente (ELMARAKBY; SULLIVAN, 2012). Apesar de ser um fator importante na gênese da nefropatia, novos conceitos indicam que o dano renal não é totalmente explicado pelas modificações moleculares causadas pela hiperglicemia ou pelo aumento da pressão sistêmica e intra-glomerular secundária a fatores metabólicos e hemodinâmicos (NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2011).

Estudos demonstraram a etiologia da nefropatia diabética em nível celular e molecular e, a inflamação, emergiu como um fator patofisiológico chave no desenvolvimento do acometimento renal. Moléculas e mediadores inflamatórios, nesse contexto, são fatores importantes nos estágios iniciais na doença renal diabética (NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2011).

A presença de comorbidades na sepse, como o caso da nefropatia diabética, potencializa os já elevados índices de mortalidade pela síndrome séptica. Em um estudo de (DOI et al., 2008), camundongos tiveram uma lesão renal induzida antes do procedimento cirúrgico para desenvolvimento da sepse. Esse trabalho mostrou que os animais com doença renal prévia tiveram um aumento substancial da AKI e da gravidade do choque séptico (DOI et al., 2008). Um resultado semelhante ao encontrado no presente estudo.

As citocinas IL-1, IL-6, IL-18 e TNF- $\alpha$  apresentam papéis importante na patogênese da nefropatia diabética. Avaliamos o perfil de citocinas no tecido renal na tentativa de explicar a alteração dos marcadores ureia e creatinina. Não foi observada alterações nos níveis de

TNF- $\alpha$ , no entanto, IL-1 $\beta$  e IL-6 apresentaram uma concentração elevada nos animais diabéticos com sepse quando comparados ao camundongo sham e ao controle com sepse (CLP). O tratamento com insulina, nesse caso, reduziu os níveis de ambas citocinas. Alta concentração de IL-1  $\beta$  está associada com elevação na expressão de outras moléculas pró-inflamatórias como ICAM-1, V-CAM-1 e E-selectina, bem como de fatores quimiotáticos (NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2011). Alterações na permeabilidade da célula endotelial glomerular, proliferação de células mesangiais e aumento da expressão de fibronectina são anormalidades causadas pela IL-6 (NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2011).

Quimiocinas são mediadores diretos da quimiotaxia e ativação de células imunológicas, uma vez que guiam neutrófilos e macrófagos para o local da lesão, potencializando a AKI (JANG; RABB, 2015). Nesse contexto, observamos que os níveis das quimiocinas CXCL1 e CXCL2 apresentaram-se elevadas nos animais diabéticos com sepse em relação a todos os demais grupos. O tratamento com insulina reduziu drasticamente a concentração de ambas quimiocinas.

A lesão renal, portanto, parece provir da associação entre alterações hemodinâmicas e fatores não-hemodinâmicos como os elementos imunológicos, no entanto, iniciando com o reconhecimento dos produtos bacterianos pelos TLRs. A presença de PAMPs e DAMPs aumentam o processo inflamatório renal durante a sepse, resultando em grande dano e necrose tecidual (CASTOLDI et al., 2012). Nesse contexto, o presente estudo avaliou a expressão de TLR-4 nos rins e não observou a exacerbação em animais diabéticos com sepse apesar de alterações histopatológicas. No entanto, observamos uma maior translocação nuclear da porção p65 do fator de transcrição NF $\kappa$ B. O tratamento com insulina inibiu essa translocação, reduzindo a concentração de citocinas e quimiocinas que por consequência exerceram um efeito protetor no tecido renal. Isso pode emergir como uma poderosa ferramenta de controle da nefropatia diabética, uma vez que estudos semelhantes com substâncias que bloqueiam a sinalização via TLR mostraram melhoras na lesão renal (CHA et al., 2013).

Em resumo, os dados aqui apresentados mostram que o diabetes pré-existente contribui para o aparecimento de marcadores indicativos de um pior prognóstico em animais com sepse, uma vez que observamos que camundongos diabético-CLP apresentam: níveis elevados de citocinas circulantes e de marcadores pró-inflamatórios no pulmão, fígado e rim; reduzido número de leucócitos e citocinas/quimiocinas na cavidade peritoneal; menor capacidade endocítica e produção de ERO em neutrófilos peritoneais; maior apoptose e necrose com reduzida porcentagem de células CD4 e CD8 em tecido esplênico.

## **6 CONCLUSÃO**

## 6 CONCLUSÃO

O tratamento com insulina melhorou os níveis circulantes de citocinas, reduziu a concentração dessas nos órgãos indicados, aumentou a migração celular para a cavidade peritoneal, restaurou a capacidade endocítica e a produção de ERO dos neutrófilos, reduziu a morte celular no baço e assim restaurou os níveis de células CD4+, melhorou as alterações histopatológicas no tecido renal ao reduzir a translocação nuclear de NF- $\kappa$ B. Assim, em camundongos diabéticos submetidos a CLP a insulina desempenha um papel central na evolução de marcadores de mau prognóstico na sepse.

## REFERÊNCIAS

- AATHIRA, R; JAIN, V. Advances in management of type 1 diabetes mellitus. **World Journal of Diabetes**. v. 5, n. 5, p. 689 – 696, 2014.
- AKIRA S.; TAKEDA K.; KAISHO T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature Immunology**. v. 2, p. 675-680, 2001.
- ALBA-LOUREIRO, T. C; MUNHOZ, C. D; MARTINS, J. O; CERCHIARO, G. A; SCAVONE, C; CURI, R; SANNOMYIA, P. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 40, p. 1037 – 1044, 2007.
- ALVES-FILHO, J. C; SPILLER, F; CUNHA, F. Q. Neutrophil paralysis in sepsi. **Shock**. v. 34, s. 1; pp. 15 – 21, 2010.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes – 2017. **Diabetes Care**. v. 40, s.1, p. S1 – S135, 2017.
- ANGUS, D. C; LINDE-ZWIRBLE, W. T; LIDICKER, J; CLERMONT, G; CARCILLO, J; PINSKY, M.R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**. v. 27, n. 7, p. 1303-1310, 2001.
- ANGUS, D. C; ABRAHAM, E. Intensive insulin therapy in critical illness – When is the evidence enough? **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 172, p. 1358 – 1359, 2005.
- 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- $\alpha$ -induced intercellular adhesion molecule-1 expression in diabetic rats: role of insulin. **Inflammation Research**. v. 55, p. 16 – 22, 2006.
- ASCHNER, P; AGUILAR-SALINAS, C; AGUIRRE, L; FRANCO, L; GAGLIADIRNO, J. J; LAPERTOSA, S. G; SECLLEN, S; VINOCUR, M. Diabetes in South and Central America: an uptade. **Diabetes Research and Clinical Practice**. i. 03, p. 238 – 243, 2014.
- BAPTISTE, E. J. Cellular Mechanism in Sepsis. **Journal of Intensive Care Medicine**. v. 22, p. 63 – 72, 2007.
- BARKHAUSEN, T; PROBST, C; HILDEBRAND, F; PAPE, H. C; KRETTEK, C; van GRIENSVEN, M. Insulin therapy induces changes in the inflammatory response in a murine 2-hit-model. **Injury**. v.40, p. 806 – 814, 2009.
- BASILE, D. P; ANDERSON, M. D; SUTTON, T. A. Pathophysiology of acute kidney injury. **Comprehensive Physiology**. v. 2, n. 2, 2012.

BENJAMIN, C. F; FERREIRA, S. H; CUNHA, F. Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **The Journal of Infectious Diseases.** n. 182, p. 214 – 223, 2000.

BENJAMIM, C. F; SILVA, J. S; FORTES, Z. B; OLIVEIRA, M. A; FERREIRA, S. H; CUNHA, F. Q. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. **Infection and Immunity.** v. 70, n. 7, p. 3602 – 3610, 2002.

BHARGAVA, M; WENDT, C. H. Biomarkers in acute lung injury. **Translational Research.** v. 159, n.4, p. 205 – 217, 2012.

BLEUTER, B. Toll-like receptors: how they work and what they do. **Current Opinion in Hematology.** v. 9, p. 2-10, 2002.

BOCHUD, P. Y.; GLAUSER, M. P.; CALANDRA, T. Antibiotics in sepsis. **Intensive Care Medicine.** v. 27, p. S33 – S48, 2001.

BOOMER, J. S; GREEN, J. M; HOTCHKISS, R. S. The changing immune system in sepsis – is individualized immune-modulatory therapy the answer? **Virulence.** v. 5, n. 1, p. 45 – 56, 2014.

BOSMANN, M; WARD, P. A. The inflammatory response in sepsis. **Trends Immunology.** v. 34, n. 3, p. 129 – 136, 2013.

BOZZA, F. A; SALLUH, J. I; JAPIASSU, A. M; SOARES, M; ASSIS, E. F; GOMES, R. N; BOZZA, M. T; CASTRO-FARIA-NETO, H. C; BOZZA, P. T. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. **Critical Care.** v. 11, p. 1 -8, 2007.

BRADLEY, P. P; PRIEBAT, D. A; CHRISTENSEN, R. D; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of Investigative Dermatology.** v, 78, p. 206 – 209, 1982.

BRIERRE, S; KUMARI, R; DEBOISBLANC, B. P. The endocrine system during sepsis. **The American Journal of the Medical Science.** v. 328, n. 4, p. 238 – 247, 2004.

BROWN, K. A; BRAIN, S. D; PEARSON, J. D; EDGEWORTH, J. D; LEWIS, S. M; TREACHER, D. F. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. **The Lancet** v. 368, p. 157 – 169, 2006.

CABRERA-PEREZ, J; CONDOTTA, S. A; BADOVINAC, V. P; GRIFFITH, T. S. Impact of sepsis on CD4 T cell immunity. **Journal of Leukocyte Biology.** v. 96, p. 1 – 11, 2014.

CASTOLDI, A; BRAGA, T. T; CORREA-COSTA, M. AGUIAR, C. F; BASSI, E. J; CORREA-SILVA, R; ELIAS, R. M; SALVADOR, F; MORAES-VIEIRA, P. M; CENEDEZE, M. A; REIS, M. A; HIYANE, M. I; PACHECO-

SILVA, A; GONÇALVES, G. M; CÂMARA, N. O. S. TLR2, TLR4 and the MYD88 signaling pathway are crucial for neutrophil migration in acute kidney injury induced by sepsis. **Plos One**. .v. 7, i. 5, p. e37584, p. 1 – 14, 2012.

CHA, J. J; HYUN, Y. Y; LEE, M. H; KIM, J. E; NAM, D. H; SONG, H. K; KANG, Y. S; LEE, J. E; KIM, H. W; HAN, J. Y; CHA, D. R. Renal protective effects of toll-like receptors 4 signaling blockade in type 2 diabetic mice. **Endocrinology**. v. 154, n. 6, p. 2144 – 2155, 2013.

CHATZIGEORGIU, A; HALAPAS, A; KALAFATAKIS, K; KAMPER, E. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. **In Vivo**. v. 23, p. 245 – 258, 2009.

COHEN, J. Non-antibiotic strategies for sepsis. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 15, n. 4, p. 302 - 307, 2009.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**. v. 420 n. 19, p. 885 – 891, 2002.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; MOHANTY, P.; GHANIM, H.; HAMOUDA, W.; ASSIAN, E.; AHMAD, S. Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kB and stimulates IκB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 86, p. 3257-3265, 2001.

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

DANDONA, P; CHAUDHURI, A; GHANIM, H; MOHANTY, P. Insulin as an anti-inflammatory and antiatherogenic modulator. **Journal of The American College of Cardiology**. v. 53, n. 5, s. S, p. S14 – S20, 2009.

DANDONA, P; GHANIM, H; GREEN, K; SIA, C. L; ABUAYSHEH, S; KUHADIYA, N; BATRA, M; DHINDSA, S; CHAUDHURI, A. Insulin infusion suppresses while glucose infusion induces toll like receptors and high mobility group-B1 protein expression in mononuclear cells of type 1 diabetics. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**. v. 304, p. E810 – E818, 2013.

DEAR, J. W; YASUDA, H; HU, X; HIENY, S; YUEN, P. S. T; HEWITT, S. M; SHER, A; STAR, R. A. Sepsis-induced organ failure is mediated by different pathways in the kidney and liver: acute renal failure is dependent on MyD88 but not renal cell apoptosis. **Kidney International**. v. 69, p. 832 – 836, 2006.

DEJAGER, L; PINHEIRO, I; DEJONCKHEERE, E; LIBERT, C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends in Microbiology**. v. 19, n.4, p. 198 – 208, 2011.

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

De OLIVEIRA MARTINS, J; MEYER-PFLUG, A. R; ALBA-LOUREIRO, T. C; MELBOSTAD, H; COSTA DA CRUZ, J. W; COIMBRA, R; CURI, R; SANNOMIYA, P. Modulation of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation: Role of insulin. **Shock**. v. 25, n. 3, p. 260-266, 2006.

DELLINGER, R. P; LEVY, M. M; RHODES, A; ANNANE, D; GERLACH, H; OPAL, S. M; SEVRANSKY, J. E; SPRUNG, C. L; DOUGLAS, I. S; JAESCHKE, R; OSBORN, T. M; NUNNALLY, M. E; TOWNSEND, S. R; REINHART, K; KLEINPELL, R. M; ANGUS, D; DEUTSCHMAN, C. S; MACHADO, F. R; RUBENFELD, G. D; WEBB, S. A; BEALE, R. J; VINCENT, J; MORENO, R; THE SURVIVING SEPSIS CAMPAING GUIDELINES COMMITTEE INCLUDING THE PEDIATRIC SUBGROUP. Surviving Sepsis Campaing: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. **Critical Care Medicine**. v. 41, n. 2, p. 580 – 637, 2012.

DEUTSCHMAN, C. S; TRACEY, K. J. Sepsis: current dogma and new perspectives. **Immunity**. n. 40, p. 463 – 475, 2014

DEVARAJ, S; DASU, M. R; ROCKWOOD, J; WINTER, W; GRIFFEN, S. C; JIALAL, I. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. **Endocrine Research**. v. 93, n. 2, p. 578 – 583, 2008.

DIAS, J. C. R; CAMPOS, J. A. D. B. Diabetes mellitus: razão de prevalências nas diferentes regiões geográficas no Brasil, 2002 – 2007. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 17, n.1, p. 239 – 244, 2012.

DOI, K; LEELAHAVANICHKUL, A; HU, X; SIDRANSKY, K. L; ZHOU, H; QIN, Y; EISNER, C; SCHNERMANN, J; YUEN, P. S. T; STAR, R. A. Pre-existing renal disease promotes sepsis-induced acute kidney injury and worsen outcomes. **Kidney International**. v. 74, p. 1017 – 1025, 2008.

DUONG, S; CONDOTTA, S. A; RAI, D; MARTIN, M. D; GRIFFITH, T. S; BADOVINAK, V. P. Polymicrobial sepsis alters antigen-dependent and independent memory CD8 T cell functions. **The Journal of Immunology**. v. 192, p. 3618 – 3625, 2014.

ELMARAKBY, A. A; SULLIVAN, J. C. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. **Cardiovascular Therapeutics**. v. 30, p. 49 – 59, 2012.

ENDO, S; AIKAWA, N; FUJISHIMA, S; SEKINE, I; KOGAWA, K; YAMAMOTO, Y; KUSHIMOTO, S; YUKIOKA, H; KATO, N; TOTSUKA, K;

ESPER, A. M; MOSS, M; MARTIN, G. S. The effect of diabetes mellitus on organ dysfunction with sepsis: an epidemiological study. **Critical Care**. v. 13, n. 1, p. 1 – 6, 2009.

FAN, J.; YE, R. D.; MALIK, A. B. Transcriptional mechanisms of acute lung injury. **American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology**. v. 281, p. L1037-L1050, 2001.

FILGUEIRAS, L. R. Jr; MARTINS, J. O; SEREZANI, C. H; CAPELOZZI, V. L; MONTES, M. B. A; JANCAR, S. Sepsis-induced acute lung injury (ALI) is milder in diabetic rats and correlates with impaired NF $\kappa$ B activation. **Plos One**. v. 7, i. 9, p. 1 – 9, 2012.

FILGUEIRAS, L. R; CAPELOZZI, V. L; MARTINS, J. O; JANCAR, S. Sepsis-induced lung inflammation is modulated by insulin. **BMC Pulmonary Medicine**. v. 14, n. 177, p. 1 – 8, 2014.

FORD, J. W; McVIVAR, D. W. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. **Current Opinion in Immunology**. v. 21, p. 38 – 46, 2009.

FUCHS, M; SANYAL, A. J. Sepsis and cholestasis. **Clinics in Liver Disease**. v. 12, p. 151 – 172, 2008.

GAN, Y. Host susceptibility factors to bacterial infections in type 2 diabetes. **Plos Pathogens**. v. 9, i. 12, p. e. 1003794, p. 1 – 3, 2013.

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

GEERLINGS, S. E; BROUWER, E. C; VAN KESSEL, K. C; GAASTRA, W; STOLK, R. P; HOEPELMAN, A. L. Cytokine secretion is impaired in women with diabetes mellitus. **European Journal of Clinical Investigation**. v. 30, p. 995-1001, 2000.

GHANIM, H; MOHANTY, P; DEOPURKAR, R; SIA; C. L; KORZENIEWSKI, K; ABUAYSHEH, S; CHAUDHURI, A; DANDONA, P. Acute modulation of toll-like receptors by insulin. **Diabetes Care**. v. 31, p. 1827 – 1831, 2008.

GREALLY, R; WHITE, M; STORDEUR, P; KELLECHER, D; DOHERTY, D. G; McMANUS R; RYAN, T. Characterising cytokines gene expression signatures in patients with sepsis. **Mediators of Inflammation**. v. 2013, p. 1 – 9, 2013.

GROSS, J. L; SILVEIRO, S. P; CAMARGO, J. L; REICHEL, A. J; AZEVEDO, M. J. Diabetes melito: diagnostico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v. 66, n. 1, p. 16 – 26, 2002.

GUAN, S; GUO, C; ZINGARELLI, B; WANG, L; HALUSHKA, P. V; COOK, J. A; FAN, H. Combined treatment with a CXCL 12 analogue and antibiotics improves survival and neutrophil recruitment and function in murine sepsis. **Immunology**. v. 144, p. 405 – 411, 2014.

HANSEN, T. K; THIEL, S; WOUTERS, P. J; CHRISTIANSEN, J. S; VAN den BERGHE, G. Intensive insulin therapy exerts anti-inflammatory effects in critically ill patients and counteracts the adverse effect of low mannose-binding lectin levels. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 88, n. 3, p. 1082 – 1088, 2003.

HARGREAVES, D. C; MEDZHITOV, R. Innate sensors if microbial infection. **Journal of Clinical Immunology**. v. 25, n. 6, p. 503 – 510, 2005.

HOESEL, L. M.; GAO, H.; WARD, P. A. New Insights into cellular mechanisms during sepsis. **Immunologic Research**. v. 34, n. 2, p.133–141, 2006.

HONG, T; CHANG, C; KO, W; LIN, C; LIU, H; CHOW, L; HUANG, C; YU, S; CHEN, Y. Biomarkers of early sepsis may be correlated with outcome. **Journal of Translational Medicine**. v. 12, p. 1 – 8, 2014.

HONIDEN, S; GONG, M. N. Diabetes, insulin, and development of acute lung injury. **Critical Care Medicine**. v. 37, n. 8, p. 2455 – 2464, 2009.

HORTON, J. D; GOLDSTEIN, J. L; BROWN, M. S. SREPBs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 109, n. 9, p. 1125 – 1131, 2002.

HOTCHKISS R. S; KARL I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. **The New England Journal of Medicine**. v. 348, p. 138-150, 2003.

HOTCHKISS R, S; OPAL, S. Immunotherapy for sepsis – a new approach against an ancient foe. **The New England Journal of Medicine**.v. 363, n. 1, p. 87 – 89, 2010.

HOTCHKISS, R. S; MONNERET, G; PAYEN, D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. **The Lancet** v. 13, p. 260 – 268, 2013a.

HOTCHKISS, R. S; MONNERET, G; PAYEN, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. **Nature Reviews**. v. 13, p. 862 – 874, 2013.

HUBBARD, W. J; CHOUDHRY, M; SCHWACHA, M. G; KERBY, J. D; RUE III, L. W; BLAND, K. I; CHAUDRY, I. H. Cecal ligation and puncture. **Shock**. v. 24, s. 1, pp. 52 – 57, 2005.

HUSEBYE, H; HALAAS, O; STENMARK, H; TUNHEIM, G; SANDANGER, O; BOGEN, B; BRECH, A; LATZ, E; ESPEVIK, T. Endocytic pathways regulates toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. **The Embo Journal**. v. 25, p. 683 – 692, 2006.

HUTCHINS, N. A; UNSINGER, J; HOTCHKISS, R. S; AYALA, A. The new normal: immunomodulatory agents against sepsis immune suppression. **Trends in Molecular Medicine**. v. 20, n. 4, p. 224 – 233, 2014.

IM, S. S; KANG, S. Y; KIM, S. Y; KIM, H. K. I; KIM, J. W; KIM, K. S; A, Y. H. Glucose-stimulated upregulation of glut-2 gene is mediated by sterol response element-binding protein-1c in the hepatocytes. **Diabetes**. v. 54, p. 1684 – 1691, 2005

INTERNATIONAL DIABETES FOUNDATION. **IDF Diabetes atlas**. 6<sup>a</sup> edição, 2013. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org>>. Acesso em: 17 jun, 2014.

INZUCCHI, S. E; SIEGEL, M. D. Glucose control in the icu – how tight is too tight? **The New England Journal of Medicine**. v. 360, n. 13, p. 1346 - 1349, 2009.

ISH-SHALOM, D; CHRISTOFFERSEN, C. T; VORWERK, P; SACERDOTI-SIERRA, N; SHYMKO, R. M; NAOR, D; De MEYTS, P. Mitogenic properties of insulin analogues mediated by the insulin receptor. **Diabetologia**. v. 40, p. S25 – S31, 1997.

ISHII, M; ASANO, K; NAMKOONG, H; TASAKA, S; MIZOGUCHI, K; ASAMI, T; KAMATA, H; KIMIZUKA, Y; FUJIWARA, H; FUNATSU, Y; KAGAWA, S; MIYATA, J; ISHII, K; NAKAMURA, M; HIRAI, H; NAGATA, K; KUNKEL, S. L; HASEGAWA, N; BETSUYAKU, T. CRTH2 is critical regulator of neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. **The Journal of Immunology**. v. 118, n. 11, p. 5655 – 5654, 2012.

JACOB, A; STEINBERG, M. L; YANG, J; DONG, W; JI, Y; WANG, P. Sepsis-induced inflammation is exacerbated in an animal model of type 2 diabetes. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**. n. 1, p. 22 – 31, 2008.

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

JESCHKE, M. G; KLEIN, D; BOLDER, U; EINSPANIER, R. Insulin attenuates the systemic inflammatory response in endotoxemic rats. **Endocrinology**. v. 145, n. 9, p. 4084 – 4093, 2004.

KARAMITSOS, D. T. Antiatheromatic effects of insulin. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v. 93S, p. S105 – S108, 2011.

KASTEN, K. R; MUENZER, J. T; CALDWELL, C. C. Neutrophils are significant producers of il-10 during sepsis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 393, p. 28 – 31, 2010.

KAWAI T; ADACHI, O; OGAWA, T; TAKEDA, K; AKIRA, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. **Immunity**. v. 11, p. 115 - 122, 1999.

KAWAI, T; AKIRA, T. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. **Nature Immunology**. v. 11, n. 5, p. 373 – 384, 2010.

KEETON, A. B.; AMSLER, M. O.; VENABLE, D. Y.; MESSINA, J. L. Insulin signal transduction pathways and insulin-induced gene expression. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, n. 50, p. 48565-48573, 2002.

KENNEDY, A. D; WILLMENT, J. A; DORWARD, D. W; WILLIAMS, D. L; BROWN, G. D; DeLEO, F. R. Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. **European Journal of Immunology**. v. 37, p. 467 – 478, 2007.

KHAM, A. H; PESSIN, J. E. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signaling pathways. **Diabetologia**. v. 45, p. 1475 – 1483, 2002.

KIKUCHI, K; IKEDA, T; IKEDA, K; YAMADA, H; HARADA, K; SATOMURA, S. Usefulness of procalcitonin serum level for the discrimination of severe sepsis from sepsis: a multicenter prospective study. **Journal of Infection and Chemotherapy**. v. 14, p. 244–249, 2008.

KNAAP, S. Diabetes and infection: is there a link? – A mini-review. **Gerontology**. v. 59, p. 99 – 104, 2012.

KOBASHI, H; TOSHIMORI, J; YAMAMATO, K. Sepsis-associated liver injury: incidence, classification and clinical significance. **Hepatology Research**. v. 43, p. 255 – 266, 2013.

KOH, G. C; PEACOCK, S. J; van der POLL, T; WIERSINGA, W. J. The impact of diabetes on the pathogenesis of sepsis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious**. v. 31, p. 379 – 388, 2012.

KORNUN, J. B; THOMSEN, R. W; RIIS, A; LERVANG, H; SCHONEYDER, H. C; SORENSEN, H. T. Type 2 diabetes and pneumonia outcomes. **Diabetes Care**. v. 30, n. 9, p. 2251 – 2257, 2007.

KOURY, J. C. A.; LACERDA, H. R; NETO, A. J. B. Fatores de risco associados à mortalidade em pacientes com sepse em unidade de terapia intensiva de hospital privado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. V.19 n.1 p. 23-30. 2007.

KOVACH, M. A; STANDIFORD, T. J. The functions of neutrophils in sepsis. **Current Opinion in Infectious Diseases**. v. 25, p. 321 – 327, 2012.

LAAT, M. A; GRUNTMEIR, K. J; POLLITT, C. C; McGOWAN, C. M; SILENCE, M. N; LACOMBE, V. A. Hyperinsulinemia down-regulates TLR4 expression in the mammalian heart. **Frontiers in Endocrinology**. v. 5, article 120, p. 1 – 8, 2014.

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

LEVY, M. M; FINK, M. P; MARSHALL, J. C; ABRAHAM, E; ANGUS, D; COOK, D; COHEN, J; OPAL, S. M; VINCENT, J. L; RAMSAY, G; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions conference. **Critical Care Medicine**. v. 31, n. 4, p. 1250 – 1256, 2003.

LEVY, M. M; DELLINGER, R. P; TOWNSEND, S. R; LINDE-ZWIRBLE, T. W; MARSHALL, J. C; BION, J; SCHORR, C; ARTIGAS, A; RAMSAY, G; BEALE, R; PARKER, M. M; GERLACH, H; REINHART, K; SILVA, E; HARVEY, M; REGAN, S; ANGUS, D. The surviving sepsis campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. **Intensive Care Medicine**. v. 36, p. 222 – 231, 2010.

LEWIS, D. H; CHAN, D. L; PINHEIRO, D; CHAN-ARMITAGE, E; GARDEN, O. A. The immunopathology of sepsis: pathogen recognition, systemic inflammation, the compensatory anti-inflammatory response, and regulatory t cells. **Journal of Veterinary Internal Medicine**.v. 26, p. 457 – 482, 2012.

LI, H; HU, D; FAN, H; ZHANG, Y; LeSAGE, G; CAUDLE, Y; STUART, C; LIU, Z; YIN, D.  $\beta$ -arrestin 2 negatively regulates toll-like receptor 4 (TLR4)-triggered inflammatory signaling via targeting p38 MAPK and interleukin10. **The journal of Biological Chemistry**. v. 289, n. 33, pp. 23075 – 23085, 2014.

MAITRA, S. R; WOJNAR, M. M; LANG, C. H. Alterations in tissue glucose uptake during the hyperglycemic and hypoglycemic phases of sepsis. **Shock**. v. 13, n.15, pp. 379 – 385, 2000.

MADONNA, R; PANDOLFI, A; MASSARO, M; CONSOLI, A; De CATERINA, R. Insulin enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in human cultured endothelial cells through a pro-atherogenic pathway mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. **Diabetologia**. v. 47, p. 532 – 536, 2004.

MAGLIANO, D. J; HARDING, J. L; COHEN, K; HUXLEY, R. R; DAVIS, W. A; SHAW, J. E. Excess risk of dying from infectious cause in those with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care*. v.38, p. 1274 – 1280, 2015.

MALERBI, D. A; FRANCO, L. J. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban brazilian population aged 30 – 69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. **Diabetes Care**. v. 15, n. 11, p. 1509 – 1516, 1992.

MARTINS J. O; ZANONI, F. L; MARTINS, D. O; COIMBRA, R; KRIEGER, J. E; JANCAR, S; SANNOMIYA, P. Insulin regulates cytokines and intercellular adhesion molecule-1 gene expression through Nuclear Factor- $\kappa$ B activation in LPS-induced acute lung injury in rats. **Shock**. v. 31, n. 4, p. 404-409, 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- $\kappa$ B Activation In Alveolar Macrophages. **Cellular Physiology and Biochemistry**. v. 22. p. 279-86, 2008b.

MARTINS, J.O, FERRACINI, M; ANGER, D.B.C; MARTINS, D. O; FILGUEIRAS, L.R. Jr; SANNOMIYA, P; JANCAR, S. Signaling pathways and mediators in LPS-induced lung inflammation in diabetic rats: role of insulin. **Shock**. v. 33, n. 1, pp. 76 – 82, 2010.

MATHISON J.C; TOBIAS, P. S; WOLFSON, E; ULEVITCH, R. J. Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. A key component in macrophages recognition of Gram-negative bacteria. **The Journal of Immunology**. v. 149, p. 200-206, 1992.

MAYADAS, T. N; CULLERE, X; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annual Review of Pathology Mechanism of Disease**. v. 9, p. 181 – 218, 2013.

MEYFROIDT, G; INGELS, C; VAN den BERGHE, G. Glycemic control in the icu. **The New England Journal of Medicine**. v. 364, n. 13, p. 1280, 2011.

MENG, A; ZHANG, X; SHI, Y. Role of p38 MAPK and STAT3 in lipopolysaccharide-stimulated mouse alveolar macrophages. **Experimental and Therapeutic Medicine**. v. 8, p. 1772 – 1776, 2014.

MICHALIA, M; KOMPOTI, M; KOUTSIKOU, A; PARIDOU, A; GIANNOPOULOU, P; TRIKKA-GRAPHAKOS, E; CLOUVA-MOLYVDAS, P. Diabetes mellitus is an independent risk facto for ICU-acquired bloodstream infections. **Intensive Care Medicine**. v. 35, p. 448 – 454, 2009.

MOHR, A; POLZ, J; MARTIN, E. M; GRIEBL, S; KAMMLER, A; PÖTSCHKE, C; LECHNER, A; BRÖKER, B. M; MOSTBÖCK S; MÄNNEL, D. N. Sepsis leads to a reduced antigen-specific primary antibody response. **European Journal of Immunology**. v. 42, p. 341 – 352, 2012.

MORAES, S. A; de FREITAS, I. C; GIMENO, S. G; MONDINI, L. Prevalência de diabetes mellitus e identificação de fatores associados em adultos residentes em área urbana de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 2006: Projeto OBEDIARP. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 26, n. 5, p. 929 – 941, 2010.

MOSELEY, R. H; Sepsis and cholestasis. **Clinics in Liver Disease**. v. 8, p. 83 – 94, 2004.

MOUNIER, C; POSNER, B. I. Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. v.84, p. 713 – 724, 2006.

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

MUENZER, J. T; DAVIS, C. G; DUNNE, B. S; UNSINGER, J; DUNNE, W. M; HOTCHKISS, R. S. Pneumonia after cecal ligation and puncture: a clinically relevant “two-hit” model of sepsis. **Shock**. v. 26, n. 6, p. 565 – 570, 2006.

MULLER, L. M. A. J; GORTER, K. J; GOUDZWAARD, W. L; SCHELLEVIS, F. G; HOEPELMAN, A. I. M; RUTTEN, G. E. H. Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Clinical Infectious Diseases**. v. 41, p. 281 – 288, 2005.Ü

MULLER, Y. D; GOLSHAYAN, D; EHIRCHIOU, D; WYSS, J. C; GIOVANNONI, L; MEIR, R; SERRE-BEINIER, V; YUNG, G. P; MOREL, P; BÜHLER, L. H; SEEBACH, J. D. Immunosuppressive effect of streptozotocin-induced diabetes result in absolute lymphopenia and a relative increase of T regulatory cells. **Diabetes**. v. 6, p. 2331 – 2340, 2011

MUNFORD, R. S. Severe sepsis and septic shock: The role of gram-negative bacteremia. **Annual Review of Pathology: Mechanism of Disease**. v. 1, p. 467 – 496. 2006.

NAGARAJU, S; BERTERA, S; FUNAIR, A; WIJKSTROM, M; TRUCCO, M; COOPER, D. K. C; BOTTINO, R. Streptozotocin-associated lymphopenia in cynomolgus monkeys. **Islets**. v. 6, i. 3, p. 1 – 6, 2014.

NAKAGAWA, N. K; NOGUEIRA, R. A; CORREIA, C. J; SHIWA, S. R; COSTA CRUZ, J. W; POLI DE FIGUEIREDO, L. F; ROCHA E SILVA, M; SANNOMIYA, P. Leukocyte-endothelium interactions after hemorrhagic shock/reperfusion and cecal ligation/puncture: an intravital microscopic study in rat mesentery. **Shock**. v. 26, n. 2, p. 180 – 186, 2006.

NAVARRO-GONZÁLEZ, J. F; MORA-FERNÁNDEZ, C; FUENTES, M. M; GARCÍA-PÉREZ, J. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Nature Reviews. Nephrology**. v. 7, p. 327 – 340, 2011.

NESSELER, N; LAUNEY, Y; ANINAT, C; MOREL, F; MALLÉDANT, Y; SEGUIN, P. Clinical review: the liver in sepsis. **Critical Care**. v. 16, n. 235, p. 1 – 8, 2012.

NOLASCO, E. L; ZANONI, F. L; NUNES, F. P. B; FERREIRA, S. S; FREITAS, L. A; SILVA, M. F. C; MARTINS, J. O. Insulin modulates liver function in a type I diabetes rat model. **Cellular Physiology and Biochemistry**. v. 36, p. 1467 – 1479, 2015.

OLIVEIRA, G.O.; BRAGA, C.P.; FERNANDES, A.A. Improvement of biochemical parameters in type 1 diabetic rats after the roots aqueous extract of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.& Endl.)] treatment. **Food and Chemical Toxicology**. v.59, p.256–260, 2013.

OSUCHOWSKI, M. F; CRACIUN, F. L; SCHULLER, E; SIMA, C; GYURKO, R; REMICK, D. G. Untreated type 1 diabetes increases sepsis-induced mortality without inducing a prelethal cytokine response. **Shock**. v. 34, n. 4, pp. 369 – 376, 2010.

PATIL, N. K; BOHANNON, J. K; LUAN, L; GUO, Y; FENSTERHEIM; B; HERNANDEZ, A; WANG, J; SHERWOOD, E. R. Ftl3 ligand treatment attenuates T cell dysfunction and improves survival in a murine model of burn wound sepsis. **Shock**. v. 47, n. 1, pp. 40 – 51, 2017.

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

POLONSKY, K. The past 200 years in diabetes. **The New England Journal of Medicine**. v. 367, n. 14, p. 1332 – 1340, 2012.

RAMADORI, G; ARMBRUST, T. Cytokines in the liver. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**. v. 13, p. 777 – 784, 2001.

REES, D. A; ALCOLADO, J. C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**. v. 22, p. 359 – 370, 2005.

REGNELL, S. E; LERNMARK, A. Hepatic steatosis in type 1 diabetes. **The Review of Diabetic Studies**. v. 8, n. 4, p. 454 – 467, 2011.

REINHART, K; KISSOON, N. T; DANIELS, R; JIMENZES, E. J. Stop sepsis – save lives: a call to join the global coalition for the world sepsis day. **Journal of Critical Care**. v. 27, i. 4, p. 410 – 413, 2012.

RHODES, A; EVANS, L. E; ALHAZZANI, W; LEVY, M. M; ANTONELLI, M; FERRER, R; KUMAR, A; SEVRANSKY, J; SPRUNG, L. C; NUNNALLY, M. E; ROCHWERG, B; RUBENFELD, G. D; ANGUS, D. C; ANNANE, D; BEALE, R. J; BELLINGHAN, G. J; BERNARD, G. R; CHICHE, J; COOPERSMITH, C; De BACKER, D. P; FRENCH, C. J; FUJISHIMA, S; GERLACH, H; HIDALGO, J. L; HOLLENBERG, S. M; JONES, A. E; KARNARD, D. R; KLEINPELL, R. M; KOH, Y; LISBOA, T. C; MACHADO, F. R; MARINI, J. J; MARSHALL, J. C; MAZUSKI, J. E; McLNTYRE, L. A; McLEAN, A. S; MEHTA, S; MORENO, R. P; MYBURGH, J; NAVALESI, P; NISHIDA, O; OSBORN, T. M; PERNER, A; PLUNKETT, C. M; RANIERI, M; SCHORR, C. A; SECKEL, M. A; SEYMOUR, C. W; SHIEH, L; SHUKRI, K. A; SIMPSON, S. Q; SINGER, M; THOMPSON, B. T; TOWNSEND, S. R; VAN der POLL, T; VINCENT, J; WIERSINGA, W. J; ZIMMERMAN, J. L; DELLINGER, R. P. Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. **Intensive Care Medicine**. v. 43, p. 304 – 377, 2017.

RICE, T. W; BERNARD, G. R. Therapeutic intervention and targets for sepsis. **Annual Review of Medicine**. V.56, p.225-248, 2005.

RIMMELÉ, T; PAYEN, D; CANTALUPPI, V; MARSHALL, J; GOMEZ, HERNANDO; GOMEZ, A; MURRAY, P; KELLUM, J. A; Immune cell phenotype and function in sepsis. **Shock**. v. 45, n. 3, pp. 282 – 291, 2016.

RISCO, A; FRESNO, C; MAMBOL, A; ALSINA-BEAUCHAMP, D; MACKENZIE, K. F; YANG, H; BARBER, D. F; MORCELLE, C; ARTHUR, J. S. C; LEY, S. C; ARDAVIN, C; CUENDA, A. p38 $\gamma$  and p38 $\delta$  kinases regulate the toll-like receptor 4 (TLR4) – induced cytokine production by controlling ERK1/2 protein kinase pathway activation. **PNAS**. v. 109, n. 28, p. 11200 – 11205, 2012.

ROCHA, S. L; de SOUZA, G. R. M. R; ABUJAMRA, K. B; OSTROWSKY, M. A. B; de SOUZA, M. C. M. R. Gasometria arterial e inflamação pulmonar de ratos com diferentes tempos de sepse abdominal. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**. v. 20, n. 1, p. 28 – 33, 2007.

SAHA, J.K; XIA, J; GRONDIN, J. M; ENGLE, S. K; JAKUBOWSKI, J. A. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. **Experimental Biology and Medicine**. v. 230, p. 777 – 784, 2005.

SESHASAI, S. R. K; KAPTOGE, S; THOMPSON, A; Di ANGELANTONIO, E; GAO, P; SARWAR, N; WHINCUP, P. H; MUKAMAL, K. J; GILLUM, R. F; HOLME, I; NJOLSTAD, I; FLETCHER, A; NILSSON, P. Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. **The New England Journal of Medicine**. v. 364, n. 9, p. 829 – 841, 2011.

SCHNEIDER, C; MOSSMANN, F; COLETTI, F; POSSAS, M; DAUDT, M. Taxa de mortalidade e morbidade por diabetes mellitus. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 41, n. 4, p. 287 – 288, 2009.

SCHUETZ, P; YANO, K; SORASAKI, M; NGO, L; HILAIRE, M. St; LUCAS, J. M; AIRD, W; SHAPIRO, N. I. Influence of diabetes on endothelial cell response during sepsis. **Diabetologia**. v. 54, p. 996 – 1103, 2011.

SCHUETZ, P; CASTRO, P; SHAPIRO, N. I. Diabetes and sepsis: preclinical findings and clinical relevance. **Diabetes Care**. v. 34, p. 771 – 778, 2012.

SHAH B. R.; HUX J. E. Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. **Diabetes Care**. v. 3, p. 26:510, 2003.

SHAH, S. K; JIMENEZ, F; WALKER, P. A; XUE, H; FEELEY, T. D; URAY, K. S; NORBURY, K. C; STEWART, R. H; LAINE, G. A; COX JR, C. S. Peritoneal fluid: a potential mechanism of systemic neutrophil priming in experimental intra-abdominal sepsis. **The American Journal of Surgery**. v. 203, p. 211 – 216, 2012.

SHAW, J.E; SICREE, R.A.; ZIMMET, P.T. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v. 87, p. 4 – 14, 2010.

SEOK, J; WARREN, H. S; CUENCA, A. G; MINDRINOS, M. N; BAKER, H. V; XU, W; RICHARDS, D. R; McDONALD-SMITH, G. P; GAO, H;

HENNESSY, L; FINNERTY, C. C; LÓPEZ, C. M; HONARI, S; MOORE, E. E; MINEI, J. P; CUSCHIERI, J; BANKEY, P. E; JOHNSON, J. L; SPERRY, J; NATHENS, A. B; BILLIAR, T. R; WEST, M. A; JESCHKE, M. G; KLEIN, M. B; GAMELLI, R. L; GIBRAN, N. S; BROWNSTEIN, B. H; MILLER-GRAZIANO, C; CALVANO, S. E; MASON, P. H; COBB, J. P; RAHME, L. G; LOWRY, S. F; MAIER, R. V; MOLDAWER, L. L; HERNDON, D. N; DAVIS, R. W; XIAO, W; TOMPKINS, R. G; INFLAMMATION AND HOST RESPONSE TO INJURY LARGE SCALE COLLABORATIVE RESEARCH PROGRAM. Genomic response in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. **PNAS**. v. 110, n. 9, p. 3507 – 3512, 2013.

SILVA, E; PEDRO, M. A; SOGAYAR, A. C; MOHOVIC, T; SILVA, C. L; JANISZEWSKI, M; CAL, R. G; de SOUZA, E. F; ABE, T. P; de ANDRADE, J; de MATOS, J. D; REZENDE, E; ASSUNÇÃO, M; AVEZUM, A; ROCHA, P. C; de MATOS, G. F; BENTO, A. M; CORRÊA, A. D; VIEIRA, P. C; KNOBEL, E; BRAZILIAN SEPSIS EPIDEMIOLOGICAL STUDY. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**. v. 8, p.R251-R260. 2004.

SINGER, M; DEUTSCHMAN, C. S; SEYMOUR, C. W; SHANKAR-HARI, M; ANNANE, D; BAUER, M; BELLOMO, R; BERNARD, G. R; CHICHE, J; COOPERSMITH, C. M; HOTCHKISS, R. S; LEVY, M. M; MARSHALL, J. C; MARTIN, G. S; OPAL, S. M; RUBENFELD, G. D; VAN DER POLL, T; VINCENT, J; ANGUS, D. C. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *Jama*. v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. São Paulo, SP, 2015 - 2016.

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.  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein decreases neutrophil migration and increases susceptibility to sepsis in diabetic mice. **Diabetes**. v. 61, p. 1584 – 1591. 2012.

SRISKANDAN, S.; COHEN, J. Gram – Positive Sepsis. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 13, n. 2, p. 397 – 412, 1999.

SRIVASTAVA, A. K; PANDLEY, S. K. Potential mechanism (s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 182, p. 135 – 141, 1998.

STEGENGA, M. E; van der CRABEN, S. N; BLÜMER, R. M. E; LEVI, M; MEIJERS, J. C. M; SERLIE, M. J; TANCK, M. W. T; SAUERWEIN, H. P; van der POLL, T. Hyperglycemia enhances coagulation and reduces neutrophil degranulation, whereas hyperinsulinemia inhibits fibrinolysis during human endotoxemia. **Blood**. v. 112, p. 82 – 89, 2008.

STARR, M. E; STEELE, A. M; SAITO, M; HACKER, B. J; EVERS, B. M; SAITO, H. A new cecal slurry preparation protocol with improved long-term

reproducibility for animal model of sepsis. **PlosOne**. v. 9, n. 12, e115705, p. 1 – 15, 2014.

STEGENGA, M. E; VINCENT, J. L; VAIL, G. M; XIE, J; HANEY, D. J; WILLIAMS, M. D; BERNARD, G. R; van der POLL, T. Diabetes does not alter mortality or hemostatic and inflammatory responses in patients with severe sepsis. **Critical Care Medicine**. v. 38, n. 2, p.539 – 545, 2010.

STEHR, S. N; REINHART, K. Sepsis as global health problem - why we need a global sepsis alliance. **Shock**. v. 39, n. 7, pp. 3 – 4, 2013.

STOECKLE, M; KAECH, C; TRAMPUZ, A; ZIMMERLI, W. The role of diabetes mellitus in patients with bloodstream infection. *Swiss Medical Weekly*. v. 138, p. 512 – 519, 2008

SURATT, B. T; PARSONS, P. E. Mechanisms of acute lung/injury acute respiratory distress syndrome. **Clinics in Chest Medicine**. v. 27, p. 579 – 589, 2006.

SURBATOVIC, M; POPOVIC, VOJVODIC, D; MILOSEVIC, I; ACIMOVIC, G; STOJICIC, M; VELJOVIC, M; JEVDJIC, J; DJORDJEVIC, D; RADAKOVIC, S. Cytokine profile in severe gram-positive and gram-negative abdominal sepsis. *Nature/Scientific report*. p. 1 – 12, 2015.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b cells of the rat pancreas. **Physiological Research**. v. 50, p. 536 – 546, 2001.

TAKAHASHI, W; NAKADA, T; YAZAKI, M; ODA, S. Interleukin-6 level act as a diagnostic marker for infection and a prognostic marker in patients with organ dysfunction in intensive care units. **Shock**. v. 46, n. 3, pp. 254 – 260, 2016.

TAKAO, K; MIYAKAWA, T. Genomic response in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. **PNAS Early Edition**. p. 1 – 6, 2013.

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

TAKEUCHI O; TAKEDA, K; HOSHINO, K; ADACHI, O; OGAWA, T; AKIRA, S. Cellular response to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. **International Immunology**. v. 12, n. 1, p. 113 - 117, 2000.

THE NICE-SUGAR STUDY INVESTIGATORS. Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients. **The New England Journal of Medicine**. v. 360, n. 13, p. 1283 – 1297, 2009.

TOBIAS O. S; SOLDAU, K; KLINE, L; LEE, J. D; KATO, K; MARTIN, T. P; ULEVITCH, R. J. Crosslinking of lipopolysaccharide to CD14 on THP-1 cells mediated by lipopolysaccharide binding protein. **The Journal of Immunology**. v. 150, p. 3011-3021, 1993.

TORQUATO, M. T; MONTENEGRO JÚNIOR, R. M; VIANA, L. A; de SOUZA, R. A; LANNA, C. M; LUCAS, J. C; BIDURIN, C; FOSS, M. C. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30 – 69 years in Ribeirao Preto ( São Paulo), Brazil. **São Paulo Medical Journal**. v. 121, n. 6, p. 224 – 230, 2003.

TREVELIN, S. C; CARLOS, D; BERETTA, M; da SILVA, J. S; CUNHA, F. Q. Diabetes mellitus and sepsis: a challenging association. **Shock**. v. 47, n.3, pp. 276 – 287, 2017.

TSUJIMOTO, H; ONO, S; EFRON, P. A; SCUMPIA, P. O; MOLDAWER, L. L; MOCHIZUKI, H. Role of toll-like receptors in the development of sepsis. **Shock**.v. 29, n. 3, p. 315 – 321, 2008.

UNSINGER, J; McGLYNN, M; KASTEN, K. R; HOEKZEMA, A. S; WATANABE, E; MUENZER, J. T; McDONOUGH, J. S; TSCHOEP, J; FERGUSON, T. A; McDUNN, J. E; MORRE, M. HILDEMAN, D. A; CALDWELL, C. C; HOTCHKISS, R. IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. **The Journal of Immunology**. v. 184, p. 3768 – 3779, 2010.

VAN den BERGHE, G; WOUTERS, P; WEEKERS, F; VERWAEST, C; BRUYNINCKK, F; SCHETZ, M; VLASSELAERS, D; FERDINANDE, P; LAUWERS, P; BOUILLON, R. Intensive insulin therapy in critically ill patients. **The New England Journal of Medicine**. v. 345, n. 19, p. 1359 – 1367, 2001.

VAN den BERGHE, G; WILMER, A; HERMANS, G; MEERSSEMAN, W; WOUTERS, P. J; MILANTS, I; WIJNGAERDEN, E. V; BOBBAERS, H; BOUILLON, R. Intensive insulin therapy in the medical icu. **The New England Journal of Medicine**. v. 354, n. 5, p. 449 – 461, 2006.

van VUGHT, L. A; SCICLUNA, B. P; HOOGENDIJK, A. J; WIEWEL, M. A; KLOUWENBERG, P. M. C. K; CREMER, O. L; HORN, J; NÜRNBERG, P; BONTEN, M. M. J; SCHULTZ, M. J; van der POLL, T. Association of diabetes and diabetes treatment with the host response in critically ill sepsis patients. **Critical Care**. v. 20, n. 252, p. 1 – 15, 2016.

VIEIRA, A; MICHELS, M; FLORENTINO, D; LAURIANO, A. A; DANIELSKI, L. G; FORTUNATO, J. J; BARICHELLO, T; DAL-PIZZOL, F; QUEVEDO, J; PETRONILHO, F. Increased on oxidative brain injury in the diabetic rats following sepsis. **Synapse**. v. 68, p. 410 – 418, 2014.

VINCENT, J; OPAL, S. O; MARSHALL, J. C; TRACEY, K, J. Sepsis definitions: time for change. **Lancet** v. 381, p. 774 – 775, 2013.

VONHOREBEEK, I; GUNST, J; ELLGER, B; BOUSSEMAERE, M; LERUT, E; DEBAVEYE, Y; RABBANI, N; THORNALLEY, P. J; SCHETZ, M; VAN den BERGHE, G. Hyperglycemic kidney damage in an animal model of prolonged critical illness. **Kidney International**. v. 76, p. 512 – 520, 2009.

WELLHAUSEN, S. R. Definitions of streptozotocin toxicity for primary lymphoidal tissue. **Diabetes**. v. 35, p. 1404 – 1411, 1986.

WICHTERMAN, K. A; BAUE, A. E; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock – a review of laboratory models and a proposal. **Journal of Surgical Research**. v. 29, p. 189 – 201, 1980.

WRIGHT, S. D; RAMOS, R. A; TOBIAS, P. S; ULEVITCH, R. J; MATHISON, J. C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding proteins. **Science**. v. 249, p. 1431-1433, 1990.

XIAO, W; MINDRINOS, M. N; SEOK, J; CUSCHIERI, J; CUENCA, A. G; GAO, H; HAYDEN, D. L; HENNESSY, L; MOORE, E. E; MINEI, J. P; BANKEY, P. E; JOHNSON, J. L; SPERRY, J; NATHENS, A. B; BILLIAR, T. R; WEST, M. A; BROWNSTEIN, B. H; MASON, P. H; BAKER, H. V; FINNERTY, C. C; JESCHKE, M. G; LÓPEZ, M. C; KLEIN, M. B; GAMELLI, R. L; GIBRAN, N. S; ARNOLDO, B; XU, W; ZHANG, Y; CALVANO, S. E; MACDONALD-SMITH, G. P; SCHOENFELD, D. A; STOREY, J. D; COBB, J. P; WARREN, H. S; MOLDAWER, L. L; HERNDON, D. N; LOWRY, S. F; MAIER, R. V; DAVIS, R. W; TOMPKINS, R. G; THE INFLAMMATION AND HOST RESPONSE TO INJURY LARGE-SCALE COLLABORATIVE RESEARCH PROGRAM. A genomic storm in critically injured humans. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 208, n. 13, p. 2581 – 2590, 2011.

YAMAMOTO M; SATO, S; HEMMI, H; HOSHINO, K; KAISHO, T; SANJO, H; TAKEUCHI, O; SUGIYAMA, M; OKABE, M; TAKEDA, K; AKIRA, S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. **Science**. v. 301, p. 640-643, 2003.

YANO, H; KINOSHITA, M; FUJINO, K; NAKASHIMA, M; YAMAMOTO, Y; MIYAZAKI, H; HAMADA, K; ONO, S; IWAYA, K; SAITOH, D; SEKI, S; TANAKA, Y. Insulin treatment directly restore neutrophil phagocytosis and bactericidal activity in diabetic mice and thereby improves surgical site *Staphylococcus aureus* infection. *Infection and Immunity*. v. 80, n. 12, p. 4409 – 4416, 2012.

YENDE, S; VAN der POLL, T; LEE, M; HUANG, D. T; NEWMAN, A. B; KONG, L; KELLUM, J. A; HARRIS, T. B; BAUER, D; SATTERFIELD, S; ANGUS, D. C. The influence of pre-existing diabetes mellitus on the host immune response and outcome of pneumonia: analysis of two multicenter cohort studies. **Thorax**. v. 65, p. 870 – 877, 2010.

ZANONI, I; OSTUNI, R; MAREK, L. R; BARRESI, S; BARBALAT, R; BARTON, G. M; GRANUCCI, F; KAGAN, J. C. CD14 Control the LPS-induced endocytosis of toll-like receptor 4. **Cell**. v. 147, p. 868 – 880, 2011.

ZARJOU, A; AGARWAL, A. Sepsis and acute kidney injury. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 22, p. 999 – 1006, 2011.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICES

APÊNDICE A – Valores individuais, média, desvio padrão (D.P) e erro padrão da média (e.p.m) referente à figura 4 da seção Resultados: Animais diabéticos apresentam menor ganho de peso e hiperglicemia após 10 dias do estabelecimento da doença.

Animal	Controle			Diabéticos		
	Variação de peso	Glicemia (1º dia)	Glicemia (10º dia)	Variação de peso	Glicemia (1º dia)	Glicemia (10º dia)
1	1.6	172	150	NR	187	600
2	2.0	181	170	1.0	175	NR
3	1.2	165	136	-0.5	165	568
4	NR	NR	183	NR	NR	516
5	2.8	134	133	0.6	160	NR
6	2.0	183	180	NR	186	546
7	1.1	164	179	NR	158	600
8	1.8	142	160	1.2	NR	600
9	1.9	NR	146	NR	163	600
10	1.6	NR	150	1.2	159	NR
11	NR	168	146	0.6	170	466
12	1.6	170	162	0.6	157	544
13	1.4	152	156	1.4	170	532
14	2.4	152	190	1.4	157	NR
15	1.1	173	151	NR	159	537
16	NR	NR	146	0.4	146	561
17	NR	NR	NR	NR	154	NR
18	NR	NR	NR	NR	149	600
19	NR	NR	NR	NR	144	524
20	NR	NR	NR	1.5	156	600
21	NR	NR	NR	0.1	175	566
22	NR	NR	NR	0.8	152	600
23	NR	NR	NR	1.2	168	600
Média	1,731	163,0	158,6	0,8214	162,4	564,4
e.p.m	0,1389	4,359	4,308	0,1516	2,557	9,285
D.P	0,5006	15,10	17,23	0,5673	11,72	39,39

NR – Não realizado

APÊNDICE B – Valores individuais, média, desvio padrão (D.P) e erro padrão da média (e.p.m) referente à figura 5 da seção Resultados: O tratamento cirúrgico para indução da sepse (CLP) e a insulina provocaram redução da glicemia

Animal	Glicemia após CLP				
	Controle		Diabético		
	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	150	80	192	NR	561
2	149	58	600	175	337
3	148	70	600	NR	600
4	145	74	NR	276	524
5	NR	79	527	326	600
6	146	75	600	NR	566
7	143	70	NR	108	600
8	159	82	NR	159	600
Média	148,6	73,50	585,4	208,8	60,67
e.p.m	1,962	2,712	14,60	40,02	28,47
D.P	5,192	7,672	32,65	89,49	69,73

NR – Não realizado

Sham – ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração CLP (); CLP + i ()

CLP - ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes

CLP + i - ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina

APÊNDICE C – Valores individuais, média, desvio padrão (D.P) e erro padrão da média (e.p.m) referente à figura 6 da seção Resultados: Insulina previne o aumento das concentrações sanguíneas de citocinas pró-inflamatórias e reduz a razão IL6:IL10.

	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>				
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
9	NR	332,54	NR	2480,6	707,52
10	6,82	179,84	7,67	3561,38	205,43
11	9,74	NR	2,01	7016,39	NR
12	NR	680,74	NR	1503,92	NR
13	9,4	NR	NR	6385,14	443,61
14	3,08	121,89	0,7	4703,21	NR
15	2,37	556,94	3,43	NR	314,52
16	NR	139,33	NR	3944,77	NR
17	NR	137,12	NR	NR	NR
Média	6,282	306,9	3,453	4228	417,8
e.p.m	1,542	85,94	1,512	750,4	108,2
D.P	3,447	227,4	3,025	1985	216,3
	<b>CCL2</b>				
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
9	42,78	11686,15	49,49	NR	NR
10	51,33	7519,28	162,08	NR	NR
11	70,75	NR	101,77	37161,85	3883,66
12	NR	NR	NR	50409,19	3616,97
13	57,99	NR	NR	NR	2261,22
14	NR	NR	32,83	36612,25	1061,03
15	0,00	18520,27	18,38	NR	NR
16	39,24	NR	41,78	NR	NR
17	NR	5871,6	-	NR	NR
Média	43,68	10899	67,72	41394	2706
e.p.m	9,873	2820	22,15	4510	653,2
D.P	24,18	5639	54,26	7812	1306
	<b>IL-6</b>				
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
9	79,22	NR	0,00	671962,90	135540,80
10	13,71	NR	43,30	NR	88873,13
11	86,20	659149,60	29,63	604569,80	6825,65
12	NR	629573,20	NR	362158,30	4425,48
13	9,15	699026,10	NR	693928,30	21712,04
14	22,75	NR	34,14	457291,50	20077,99
15	80,33	377706,60	4,39	NR	182364,60
16	15,63	NR	13,39	697999,30	NR
17	NR	NR	NR	NR	NR
Média	43,86	591364	20,81	581318	65689
e.p.m	13,57	72627	7,116	57291	26843
D.P	35,89	145253	17,43	140333	71019

	IL-10				
	Controle		Diabético		
	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
<b>9</b>	ND	NR	ND	79203,33	56052,70
<b>10</b>	ND	NR	ND	NR	NR
<b>11</b>	ND	88201,19	ND	NR	NR
<b>12</b>	ND	55291,77	ND	NR	63267,03
<b>13</b>	ND	67520,00	ND	87276,29	25140,65
<b>14</b>	ND	NR	ND	75989,16	NR
<b>15</b>	ND	NR	ND	NR	50089,06
<b>16</b>	ND	NR	ND	127388,20	NR
<b>17</b>	NR	NR	ND	7763,33	NR
Média	-	70338	-	75524	48637
e.p.m	-	9604	-	19279	8283
D.P	-	16635	-	43108	16565

NR – Não realizado

ND – Não detectável pela metodologia utilizada

Sham – ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração CLP (); CLP + i ()

CLP - ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes

CLP + i - ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina

TNF – tumor necrosis factor

CCL2 – chemokine (C-C motif) ligand 2

IL - interleukin

APÊNDICE D – Valores individuais, média, desvio padrão (D.P) e erro padrão da média (e.p.m) referente à figura 7 da seção Resultados: Insulina aumenta a quimiotaxia de polimorfonucleares e mononucleares para o lavado peritoneal.

<b>Celularidade total – Lavado Peritoneal (células x mL)</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	1	NR	2,4	NR	NR
2	NR	8,4	1,3	10,3	NR
3	0,5	NR	2,7	13,9	21,2
4	2,08	10,4	NR	18,24	NR
5	NR	NR	NR	NR	21,8
6	1,34	NR	3,4	NR	NR
7	NR	12,92	3,4	13	19,2
8	NR	12,98	-	NR	39,6
Média	1,230	11,18	2,640	13,86	25,45
e.p.m	0,3317	1,103	0,3881	1,648	4,749
D.P	0,6634	2,206	0,8678	3,296	9,499
<b>Polimorfonucleados – Lavado Peritoneal (células x mL)</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	0,05	NR	0,288	5,22	NR
2	NR	3,36	0,195	NR	NR
3	0,15	2,304	0,270	10,425	18,02
4	0,541	NR	NR	14,592	NR
5	NR	9,312	1,98	4,704	19,402
6	0,402	NR	0,68	NR	NR
7	NR	5,42	1,19	11,05	12,096
8	0,714	9,086	NR	NR	18,216
Média	0,3714	5,896	0,7672	9,198	16,93
e.p.m	0,1224	1,439	0,2864	1,872	1,641
D.P	0,2736	3,217	0,7016	4,185	3,282
<b>Mononucleados – Lavado Peritoneal (células x mL)</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	0,95	5,04	2,112	0,78	NR
2	NR	5,04	1,105	NR	NR
3	0,35	NR	2,430	3,475	3,18
4	1,539	NR	1,952	3,648	NR
5	1,582	NR	2,420	3,136	NR
6	0,938	NR	2,720	NR	4,8
7	NR	7,5	2,210	1,95	7,104
8	1,386	3,894	NR	NR	NR
Média	1,124	5,369	2,136	2,598	5,028
e.p.m	0,1928	0,7601	0,1959	0,5425	1,138
D.P	0,4721	1,520	0,5182	1,213	1,972

NR – Não realizado

Sham – ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração CLP (); CLP + i ()

CLP - ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes

CLP + i - ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina

APÊNDICE E – Valores individuais, média, desvio padrão (D.P) e erro padrão da média (e.p.m) referente à figura 8 da seção Resultados: Insulina aumenta a concentração de citocinas/quimiocinas e reduz a razão IL6:IL10 no lavado peritoneal.

<b>IL-1<math>\beta</math> – Lavado Peritoneal</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	0,0132	1,1859	0,0275	NR	2,0708
2	0,0077	1,0000	NR	2,5748	2,5739
3	0,0148	1,5453	0,0309	0,8777	3,6139
4	NR	NR	0,0262	2,2345	NR
5	0,0111	1,0152	NR	1,1909	3,1356
6	0,0077	0,9441	0,0101	0,8068	NR
7	0,0165	NR	0,0229	NR	2,3956
8	0,0046	NR	NR	1,2357	NR
Média	0,0108	1,138	0,02352	1,487	2,758
e.p.m	0,001633	0,1095	0,003591	0,3015	0,2750
D.P	0,004320	0,2449	0,008031	0,7385	0,6149
<b>IL-6 – Lavado Peritoneal</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	0,1095	1,1630	0,0511	0,8648	NR
2	0,0286	NR	0,0317	2,1603	21,2272
3	0,0572	0,6426	0,0849	0,6330	22,6702
4	NR	0,6668	0,2436	NR	NR
5	0,0192	1,5990	0,0074	NR	22,5317
6	0,0137	NR	0,0278	NR	NR
7	0,0704	0,6318	0,1772	1,3974	NR
8	0,0052	0,8648	0,0000	2,0218	NR
Média	0,0434	0,9280	0,07796	1,415	22,14
e.p.m	0,01417	0,1578	0,03099	0,3032	0,4597
D.P	0,03749	0,3865	0,08764	0,6779	0,7962
<b>TNF-<math>\alpha</math> – Lavado Peritoneal</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	0,0222	NR	NR	0,1183	0,5466
2	0,0172	0,6570	0,0187	NR	0,3757
3	0,0161	0,4921	0,0209	0,1274	0,4463
4	NR	NR	0,0155	NR	NR
5	0,0134	0,2354	NR	0,3122	NR
6	0,0202	0,3204	0,0189	NR	NR
7	0,0151	NR	NR	0,1887	0,4920
8	NR	NR	NR	NR	NR
Média	0,01737	0,4262	0,0185	0,1867	0,4652
e.p.m	0,001340	0,09363	0,001117	0,04467	0,03618
D.P	0,003283	0,1873	0,002233	0,08935	0,07237

<b>CXCL-1 – Lavado Peritoneal</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	NR	1,0000	NR	NR	19,9039
2	0,1618	0,9774	0,1494	2,5289	17,1951
3	NR	NR	NR	NR	NR
4	NR	1,3672	0,2218	NR	27,4085
5	0,0401	1,4368	NR	5,2376	29,9610
6	0,0378	NR	0,1466	NR	NR
7	0,0235	NR	0,1786	1,5434	NR
8	0,0111	0,9404	NR	NR	NR
Média	0,05486	1,144	0,1741	3,103	23,62
e.p.m	0,02724	0,1062	0,01747	1,104	3,023
D.P	0,06092	0,2374	0,03494	1,913	6,046
<b>CXCL-2 – Lavado Peritoneal</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	NR	NR	0,1177	1,2083	17,5494
2	0,0363	5,3326	0,0507	5,7997	15,6992
3	NR	5,9795	NR	1,9536	NR
4	NR	NR	0,0578	10,	NR
5	0,0327	3,7125	0,0578	10	16,5972
6	0,0363	3,0486	0,0918	10	NR
7	0,0290	NR	NR	2,2717	9,0555
8	0,0103	NR	NR	1	NR
Média	0,02892	4,518	0,07516	6,404	14,73
e.p.m	0,004847	0,6836	0,01282	1,439	1,927
D.P	0,01084	1,367	0,02867	4,070	3,855
<b>IL-10 – Lavado Peritoneal</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	0,0619	NR	0,0619	NR	NR
2	0,0448	1,2668	0,0415	NR	3,4490
3	0,0473	0,9784	0,0437	1,0257	3,1567
4	NR	NR	0,0386	1,7241	NR
5	0,0287	0,5909	0,0217	1,7082	3,6682
6	0,0245	0,5165	0,0245	1,4789	2,3527
7	0,0217	NR	NR	NR	NR
8	0,0182	NR	NR	NR	2,0604
Média	0,0353	0,8382	0,03865	1,484	2,937
e.p.m	0,006132	0,1751	0,005949	0,1628	0,3126
D.P	0,01622	0,3502	0,01457	0,3256	0,6991
<b>Razão IL6:IL10 – Lavado Peritoneal</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	NR	NR	0,83	NR	NR
2	0,64	NR	0,76	NR	NR
3	1,21	0,66	1,94	NR	NR

<b>4</b>	NR	2,06	NR	6,51	5,16
<b>5</b>	0,67	2,71	0,34	8,25	NR
<b>6</b>	0,56	0,95	1,13	5,18	4,24
<b>7</b>	NR	NR	NR	12,66	2,31
<b>8</b>	0,29	NR	NR	NR	2,63
Média	0,6740	1,595	1,000	8,150	3,585
e.p.m	0,1498	0,4787	0,2667	1,629	0,6738
D.P	0,3350	0,9574	0,5964	3,259	1,348

NR – Não realizado

Sham – ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração CLP (); CLP + i ()

CLP - ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes

CLP + i - ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina

TNF – tumor necrosis factor

CXCL – chemokine (C-X-C motif) ligand

IL - interleukin

APÊNDICE F – Valores individuais, média, desvio padrão (D.P) e erro padrão da média (e.p.m) referente à figura 9 da seção Resultados: Insulta restaura a capacidade endocítica e a produção de espécie reativas de oxigênio de neutrófilos do lavado peritoneal.

<b>LY6G+/DEXTRAN-FITC</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
<b>9</b>	NR	406	232	NR	407
<b>10</b>	NR	653,3	NR	NR	NR
<b>11</b>	81,2	NR	NR	NR	872
<b>12</b>	113	NR	156	NR	276
<b>13</b>	NR	NR	142	285	NR
<b>14</b>	108	NR	NR	NR	NR
<b>15</b>	NR	224,00	NR	104	NR
<b>16</b>	NR	NR	NR	258	NR
<b>17</b>	NR	NR	NR	NR	NR
Média	100,7	427,8	176,7	215,7	518,3
e.p.m	9,873	124,4	27,96	56,37	180,8
D.P	17,10	215,5	48,43	97,64	313,2
<b>LY6G+/DHE</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
<b>9</b>	469	1516	1957	835	1886
<b>10</b>	NR	1465	NR	NR	NR
<b>11</b>	622	NR	NR	1022	NR
<b>12</b>	363	1316	2277	NR	NR
<b>13</b>	NR	NR	2835	1020	NR
<b>14</b>	NR	NR	NR	NR	2238
<b>15</b>	NR	NR	NR	NR	1451
<b>16</b>	NR	NR	NR	NR	NR
<b>17</b>	NR	NR	NR	NR	NR
Média	484,7	1432	2356	959	1858
e.p.m	75,18	60	256,5	62	227,6
D.P	130,2	103,9	444,3	107,4	394,2

NR – Não realizado

Sham – ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração CLP (); CLP + i ()

CLP - ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes

CLP + i - ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina

APÊNDICE G – Valores individuais, média, desvio padrão (D.P) e erro padrão da média (e.p.m) referente à figura 10 da seção Resultados: Insulina previne a depleção celular total por apoptose e necrose em tecido esplênico.

<b>% de Apoptose - Baço</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
<b>9</b>	8,83	8,31	NR	17,2	9,75
<b>10</b>	8,27	11,5	6,31	11,5	NR
<b>11</b>	9,94	11,1	8,07	NR	NR
<b>12</b>	NR	14,8	NR	18,3	2,2
<b>13</b>	4,12	15,8	7,18	NR	NR
<b>14</b>	8,35	NR	7,57	NR	NR
<b>15</b>	4,8	NR	8,06	NR	7,310
<b>16</b>	NR	NR	8,47	13,4	8,16
<b>17</b>	NR	NR	NR	10,4	NR
Média	7,385	12,3	7,61	14,16	6,855
e.p.m	0,9604	1,351	0,3178	1,552	1,632
D.P	2,353	3,021	0,7785	3,47	3,264

<b>% de Necrose - Baço</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
<b>9</b>	NR	NR	0,814	NR	5,45
<b>10</b>	0,5	NR	6,9	NR	5,77
<b>11</b>	NR	3,62	1,24	9,26	NR
<b>12</b>	0,4	NR	2	NR	NR
<b>13</b>	1,36	NR	3,56	NR	NR
<b>14</b>	0,663	2,61	1,38	12	NR
<b>15</b>	1,04	2,07	2,78	13,3	4,44
<b>16</b>	NR	1,57	3,52	NR	4,5
<b>17</b>	NR	NR	NR	NR	NR
Média	0,7926	2,468	2,774	11,52	5,04
e.p.m	0,1788	0,4389	0,6935	1,191	0,3357
D.P	0,3999	0,8779	1,962	2,062	0,6715

NR – Não realizado

Sham – ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração CLP (); CLP + i ()

CLP - ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes

CLP + i - ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina

APÊNDICE H – Valores individuais, média, desvio padrão (D.P) e erro padrão da média (e.p.m) referente à figura 11 da seção Resultados: Insula restaura a porcentagem de células CD4+ mas não CD8+ em tecido esplênico.

%CD4 - Baço					
	Controle		Diabético		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
9	NR	NR	NR	9,2	NR
10	NR	NR	NR	7,57	17,8
11	18,7	14,5	NR	11,1	18,2
12	19,6	23,7	20,2	NR	14,2
13	24,7	19,1	17,1	NR	16,6
14	20,9	19,7	16,3	14,5	19,6
15	24,3	14,9	22,1	14,1	15,4
16	NR	18,6	22,1	NR	14,8
17	NR	17,2	NR	12,9	NR
Média	21,64	18,24	19,56	11,56	16,66
e.p.m	1,220	1,186	1,225	1,134	0,7467
D.P	2,729	3,137	2,738	2,778	1,976
%CD8 - Baço					
	Controle		Diabético		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
9	17,1	NR	14,9	NR	9,24
10	23	15,4	13,6	14,1	13,6
11	24,4	18,9	NR	14,8	NR
12	12,9	25,4	10,6	13,2	15
13	NR	24,1	9,51	NR	11,4
14	15,9	NR	9,58	14,1	10,4
15	NR	NR	13,1	11,7	8,010
16	NR	NR	NR	12,5	7,86
17	NR	NR	NR	NR	NR
Média	18,66	20,95	11,88	13,4	10,79
e.p.m	2,18	2,323	0,933	0,4719	1,033
D.P	4,874	4,645	2,285	1,156	2,734

NR – Não realizado

Sham – ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração CLP (); CLP + i ()

CLP - ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes

CLP + i - ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina

APÊNDICE I – Valores individuais, média, desvio padrão (D.P) e erro padrão da média (e.p.m) referente à figura 12 da seção Resultados: Insulina previne o acúmulo de polimorfonucleares no lavado broncoalveolar.

<b>Celularidade total – Lavado Broncoalveolar (células x 10<sup>-5</sup>/mL)</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	1,20	1,8	1,6	5,3	NR
2	1	NR	NR	5	3,8
3	NR	2,3	2	5	2,1
4	1,2	1,6	NR	6,8	NR
5	1	NR	1	4,1	NR
6	0,8	NR	NR	NR	1,11
7	NR	2,4	NR	NR	0,45
8	1	2,6	NR	2,8	2,25
Média	1,033	0,23	1,533	4,833	1,942
e.p.m	0,06146	0,02946	0,1887	0,542	0,5697
D.P	0,1506	0,08332	0,4219	1,328	1,274
<b>Polimorfonucleares – Lavado Broncoalveolar (células x 10<sup>-5</sup>/mL)</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	0,01	0,02	0,02	0,05	NR
2	0,01	NR	NR	0,05	0,04
3	NR	0,02	0,02	0,05	0,02
4	0,01	0,02	NR	0,07	NR
5	0,01	NR	0,01	0,04	NR
6	0,01	NR	NR	NR	0,03
7	NR	0,02	NR	NR	0,01
8	0,01	0,03	NR	0,03	0,03
Média	0	0,022	0,01667	0,04833	0,026
e.p.m	0	0,002	0,003333	0,005426	0,005099
D.P	0,0004629	0,004472	0,005774	0,01329	0,01140

NR – Não realizado

Sham – ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração CLP (); CLP + i ()

CLP - ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes

CLP + i - ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina

APÊNDICE J – Valores individuais, média, desvio padrão (D.P) e erro padrão da média (e.p.m) referente à figura 13 da seção Resultados: Insulina reduz o perfil pró-inflamatório e aumenta a concentração de IL-10 no lavado broncoalveolar

<b>IL-6 – Lavado Broncoalveolar</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	34,60	43,90	32,30	NR	290,40
2	NR	NR	46,80	NR	59,50
3	41,90	NR	NR	NR	NR
4	33,60	66,70	30,70	417,40	103,50
5	17,60	42,80	78,60	1000,00	NR
6	22,90	62,60	NR	1000,00	323,80
7	33,40	36,10	NR	382,40	410,50
8	NR	34,60	NR	NR	NR
Média	30,67	47,78	47,10	700,0	237,5
e.p.m	3,600	5,561	11,11	173,4	67,01
D.P	8,818	13,62	22,21	346,8	149,8
<b>TNF-<math>\alpha</math> – Lavado Broncoalveolar</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	15,9	25,2	16,3	NR	36,4
2	17,4	21,8	20,6	NR	55,5
3	16,1	41,7	15,1	NR	61
4	15,9	53,3	16,5	40,1	39,1
5	14,2	57,3	NR	210,2	NR
6	17,2	NR	NR	75,7	69,4
7	NR	47,7	NR	NR	36,4
8	NR	NR	NR	105,6	63,8
Média	16,12	41,17	17,13	107,9	51,66
e.p.m	0,4686	6,001	1,199	36,63	5,317
D.P	1,148	14,7	2,398	73,27	14,07
<b>CXCL-1 – Lavado Broncoalveolar</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	NR	NR	246,5	NR	1505,4
2	NR	NR	308,7	1959,8	299,4
3	NR	NR	NR	NR	NR
4	NR	NR	200,4	1000	259,1
5	86,5	131,6	173,2	1707,6	NR
6	84,5	185,1	NR	2324,1	NR
7	60	68,5	NR	NR	198,8
8	11,1	68,5	NR	1399,6	1062,4
Média	60,53	113,4	232,2	1678	665
e.p.m	17,54	28,14	29,65	227,5	262,7
D.P	35,08	56,29	59,3	508,7	587,4

<b>CXCL-2 – Lavado Broncoalveolar</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
<b>Animal</b>	<b>Sham</b>	<b>CLP</b>	<b>Sham</b>	<b>CLP</b>	<b>CLP+i</b>
<b>1</b>	NR	NR	78,5	NR	NR
<b>2</b>	71,6	NR	117,7	239,2	44,9
<b>3</b>	71,6	NR	NR	NR	NR
<b>4</b>	50,7	NR	114,5	484,2	86,9
<b>5</b>	29	142,3	160	818,3	NR
<b>6</b>	61,3	124	NR	NR	229,9
<b>7</b>	NR	68,2	NR	496,6	141,6
<b>8</b>	36,3	54,2	NR	171,4	133,2
<b>Média</b>	53,42	97,18	117,7	441,9	127,3
<b>e.p.m</b>	7,348	21,3	16,67	114,2	30,97
<b>D.P</b>	18	42,59	33,35	255,3	69,26

NR – Não realizado

Sham – ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração CLP (); CLP + i ()

CLP - ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes

CLP + i - ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina

TNF – tumor necrosis factor

CXCL – chemokine (C-X-C motif) ligand

IL - interleukin

APÊNDICE K – Valores individuais, média, desvio padrão (D.P) e erro padrão da média (e.p.m) referente à figura 14 da seção Resultados: Insulina previne o acúmulo proteico em lavado broncoalveolar.

Animal	<b>Proteínas totais – Lavado Broncoalveolar</b>				
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
<b>1</b>	119,9	119,9	102,8	171,4	82,2
<b>2</b>	150,8	178,3	205,8	NR	130,2
<b>3</b>	140,5	209,2	154,3	NR	168
<b>4</b>	NR	147,4	161,1	NR	NR
<b>5</b>	130,2	185,2	222,9	150,8	NR
<b>6</b>	171,4	NR	NR	851,3	216,1
<b>7</b>	171,4	NR	NR	971,4	82,2
<b>8</b>	NR	219,5	NR	257,3	NR
Média	147,4	176,6	169,4	480,4	135,7
e.p.m	8,686	15,33	21,12	177,8	25,75
D.P	21,28	37,54	47,22	397,7	57,58

NR – Não realizado

Sham – ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração CLP (); CLP + i ()

CLP - ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes

CLP + i - ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina

APÊNDICE L – Valores individuais, média, desvio padrão (D.P) e erro padrão da média (e.p.m) referente à figura 15 da seção Resultados: Insulina previne o aumento da concentração de AST sem interferir nos demais parâmetros bioquímicos hepáticos

<b>Enzimas hepáticas - ALT</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	52,0	296,0	60,0	NR	500,0
2	47,0	NR	12,0	456,0	563,0
3	NR	NR	112,0	NR	492,0
4	40,0	150,0	51,0	434,0	462,0
5	NR	291,0	NR	NR	NR
6	38,0	NR	160,0	500,0	NR
7	16,0	365,0	NR	370,0	NR
8	NR	NR	NR	NR	NR
Média	38,60	270,0	79,00	440,0	504,3
e.p.m	6,177	35,37	25,77	27,07	21,22
D.P	13,81	79,10	57,63	54,14	42,45
<b>Enzimas hepáticas - AST</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	168,0	558,0	118,0	NR	508,0
2	167,0	526,0	116,0	717,0	242,0
3	207,0	NR	159,0	553,0	NR
4	226,0	321,0	107,0	666,0	594,0
5	NR	470,0	NR	NR	NR
6	216,0	NR	NR	819,0	NR
7	200,0	NR	NR	NR	NR
8	NR	407,0	NR	NR	NR
Média	197,3	456,4	125,0	688,8	448,0
e.p.m	10,09	42,50	11,58	55,31	105,9
D.P	24,70	95,03	23,17	110,6	183,5
<b>Bilirrubina Total</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	0,05	0,14	NR	0,16	0,13
2	0,04	0,15	0,07	0,15	NR
3	0,06	NR	NR	NR	0,13
4	0,08	0,19	0,06	NR	0,15
5	0,06	NR	0,08	0,16	NR
6	0,05	0,11	0,09	0,11	NR
7	0,09	0,10	NR	NR	NR
8	NR	NR	NR	NR	NR
Média	0,06143	0,1380	0,0750	0,1450	0,1367
e.p.m	0,006701	0,01594	0,006455	0,01190	0,006667
D.P	0,01773	0,03564	0,01291	0,02380	0,01155

<b>Bilirrubina Direta</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
<b>1</b>	0,04	NR	0,04	0,10	0,09
<b>2</b>	0,03	0,13	0,04	0,13	0,11
<b>3</b>	0,04	NR	NR	NR	0,09
<b>4</b>	NR	0,05	0,03	NR	0,09
<b>5</b>	0,05	NR	NR	0,10	NR
<b>6</b>	0,03	0,09	0,05	0,08	NR
<b>7</b>	NR	NR	NR	NR	NR
<b>8</b>	NR	NR	NR	NR	NR
Média	0,0380	0,0900	0,0400	0,1025	0,0950
e.p.m	0,008367	0,0400	0,008165	0,02062	0,01000
D.P	0,003742	0,02309	0,004082	0,01031	0,005000

NR – Não realizado

Sham – ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração CLP (); CLP + i ()

CLP - ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes

CLP + i - ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina

APÊNDICE M – Valores individuais, média, desvio padrão (D.P) e erro padrão da média (e.p.m) referente à figura 16 da seção Resultados: Insulina reduz o perfil pró-inflamatório em tecido hepático

<b>IL-1 – Tecido Hepático</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	27,3	NR	30,5	NR	NR
2	NR	60,4	21,8	363	63,4
3	29,1	NR	14,5	389,3	NR
4	22,2	NR	32,5	252,1	36,3
5	30,9	44,7	14,3	102,9	NR
6	NR	35,5	17,4	124	49,9
7	NR	16,9	26	NR	89,5
8	18,3	29,7	NR	NR	NR
Média	25,56	37,44	22,43	246,3	59,78
e.p.m	2,325	7,299	2,82	59	11,35
D.P	5,198	16,32	7,46	131,9	22,7
<b>IL-10 – Tecido Hepático</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	264	266	287,4	NR	NR
2	179,1	246	194,4	NR	254,5
3	254,9	253,2	158,7	NR	198,3
4	201,3	350,2	NR	99,8	251,8
5	236,3	NR	122	49,3	NR
6	NR	NR	220,1	133,1	193,8
7	NR	NR	202,8	124	239
8	NR	NR	NR	NR	NR
Média	227,1	279,1	197,6	101,6	227,5
e.p.m	16,11	24,11	22,98	18,78	13,12
D.P	36,02	48,21	56,28	37,56	29,33
<b>CXCL1 – Tecido Hepático</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	NR	26,4	13,2	NR	NR
2	9,2	15,5	NR	163,6	30,4
3	17,6	48	NR	157,6	64,1
4	10,9	19,1	30,8	NR	23,3
5	16,7	NR	NR	91,3	NR
6	9,3	12,9	29,2	NR	NR
7	4,2	NR	12,2	NR	NR
8	8	10	NR	NR	75,3
Média	10,84	21,98	21,35	137,5	48,28
e.p.m	1,808	5,695	5,009	23,16	12,66
D.P	4,783	13,95	10,02	40,12	25,32
<b>CXCL2 – Tecido Hepático</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	60	NR	63,6	NR	NR

<b>2</b>	52,6	67,6	130,4	918	130
<b>3</b>	67,6	NR	NR	1132,2	NR
<b>4</b>	52,3	79,7	64,8	1167,7	103,1
<b>5</b>	71,9	41,7	NR	NR	NR
<b>6</b>	26,7	46,3	75,8	NR	220,4
<b>7</b>	33,8	30	86	NR	266,5
<b>8</b>	49,6	40,6	NR	NR	NR
Média	51,81	50,98	84,12	1073	180,0
e.p.m	5,478	7,653	12,27	77,99	38,22
D.P	15,49	18,75	27,43	135,1	76,44

NR – Não realizado

Sham – ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração CLP (); CLP + i ()

CLP - ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes

CLP + i - ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina

TNF – tumor necrosis factor

CXCL – chemokine (C-X-C motif) ligand

IL - interleukin

APÊNDICE N – Valores individuais, média, desvio padrão (D.P) e erro padrão da média (e.p.m) referente à figura 17 da seção Resultados: Insulina reduz a concentração sanguínea de creatinina

<b>Bioquímica renal - Urea</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	63	89	NR	NR	170
2	76	152	80	366	329
3	71	244	116	113	343
4	67	85	84	312	NR
5	67	87	NR	404	NR
6	NR	95	114	NR	NR
7	NR	NR	NR	NR	NR
8	NR	82	NR	NR	NR
Média	68,80	119,1	98,50	298,8	280,7
e.p.m	2,2	22,75	9,570	64,73	55,48
D.P	4,919	60,19	19,14	129,5	96,10
<b>Bioquímica renal – Creatinina</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	0,13	0,17	NR	NR	0,21
2	0,11	NR	0,29	0,21	0,19
3	0,13	NR	0,36	NR	NR
4	NR	NR	0,4	0,24	0,20
5	NR	0,13	0,42	0,51	NR
6	0,11	0,11	0,37	NR	NR
7	0,12	0,21	NR	0,22	NR
8	NR	0,19	NR	NR	NR
Média	0,12	0,162	0,3680	0,2950	0,2000
e.p.m	0,004472	0,01855	0,02223	0,07194	0,005774
D.P	0,01	0,04147	0,04970	0,1439	0,01000

NR – Não realizado

Sham – ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração CLP (); CLP + i ()

CLP - ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes

CLP + i - ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina

APÊNDICE M – Valores individuais, média, desvio padrão (D.P) e erro padrão da média (e.p.m) referente à figura 18 da seção Resultados: Insulina reduz o perfil pró-inflamatório e aumenta a concentração de IL-10 em tecido renal.

<b>IL-1 – Tecido Renal</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	5	NR	6,5	NR	NR
2	7	NR	7	74,7	NR
3	7,6	NR	4,1	NR	NR
4	3,6	NR	4,4	70,9	7,3
5	5,9	7,7	NR	66,4	NR
6	4,7	8,5	5,1	35,9	14,1
7	5,2	9,9	7,8	32,8	3,2
8	NR	11	NR	31,6	5,5
Média	5,571	9,275	5,817	52,05	7,525
e.p.m	0,5204	0,7330	0,6129	8,414	2,347
D.P	1,377	1,466	1,501	20,61	4,694
<b>IL-6 – Tecido Renal</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	41,2	39,1	40,5	NR	NR
2	25,8	NR	38,1	209,1	NR
3	46,2	69,3	29,9	NR	NR
4	13	27,2	29,1	180,2	24,9
5	21,2	26,6	12,9	246,6	137,9
6	16,2	15,9	22,9	58,4	111,1
7	15,3	21,6	31,3	NR	124,8
8	50	22	NR	NR	32,3
Média	28,61	31,67	29,24	173,6	86,2
e.p.m	5,283	6,832	3,509	40,73	23,92
D.P	14,94	18,08	9,284	81,45	53,49
<b>CXCL1 – Tecido Renal</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
Animal	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	1,43	1,67	1,1	NR	129,9
2	1,59	NR	1,6	209,8	123,3
3	2,29	NR	1,6	NR	NR
4	0,62	4,89	1,8	504,3	NR
5	0,99	6,48	3,2	NR	100,2
6	0,71	5,93	1,6	448,4	36,8
7	0,74	2,22	3,8	61	172,7
8	4,28	0,9	NR	NR	57,5
Média	1,581	3,682	2,1	305,9	103,4
e.p.m	0,434	0,9707	0,3761	103,6	20,37
D.P	1,228	2,378	0,9950	207,3	49,91

<b>CXCL-2 – Tecido Renal</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
<b>Animal</b>	<b>Sham</b>	<b>CLP</b>	<b>Sham</b>	<b>CLP</b>	<b>CLP+i</b>
<b>1</b>	9,5	27,6	13,4	NR	NR
<b>2</b>	NR	NR	15,3	623,7	226,4
<b>3</b>	9,3	NR	11,5	NR	NR
<b>4</b>	5,8	13,9	13,5	633,6	NR
<b>5</b>	8,6	17,3	NR	NR	289,3
<b>6</b>	5,3	15,8	16,7	375,1	202,9
<b>7</b>	6,0	11,4	29,8	NR	NR
<b>8</b>	NR	11,7	NR	401,5	242,2
<b>Média</b>	7,417	16,28	16,7	508,5	240,2
<b>e.p.m</b>	0,7829	2,449	2,719	69,62	18,25
<b>D.P</b>	1,918	5,998	6,659	139,2	36,5
<b>IL-10 – Tecido Renal</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
<b>Animal</b>	<b>Sham</b>	<b>CLP</b>	<b>Sham</b>	<b>CLP</b>	<b>CLP+i</b>
<b>1</b>	44,9	46,6	71,5	47,3	585,3
<b>2</b>	49	88,7	74,2	NR	539,7
<b>3</b>	76,4	58,1	50,3	40,7	251,8
<b>4</b>	27,1	49,4	47,4	NR	NR
<b>5</b>	42,1	43,6	26,9	NR	NR
<b>6</b>	31,7	27,7	57,1	30,6	NR
<b>7</b>	33,3	43,7	70,2	30,9	415,2
<b>8</b>	78,1	38,2	NR	27,1	NR
<b>Média</b>	47,83	49,50	56,8	35,32	448
<b>e.p.m</b>	6,913	6,395	6,405	3,754	74,63
<b>D.P</b>	19,55	18,09	16,95	8,394	149,3

NR – Não realizado

Sham – ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração CLP (); CLP + i ()

CLP - ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes

CLP + i - ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina

TNF – tumor necrosis factor

CXCL – chemokine (C-X-C motif) ligand

IL - interleukin

APÊNDICE O – Valores individuais, média, desvio padrão (D.P) e erro padrão da média (e.p.m) referente à figura 19 da seção Resultados: Insulina protege o tecido renal de alterações histopatológicas

Animal	Score de Lesão Tubular Renal				
	Controle		Diabético		
	Sham	CLP	Sham	CLP	CLP+i
1	NR	NR	NR	NR	0,04
2	0,03	0,1	0,067	0,1	NR
3	0,1	0,067	0,12	NR	NR
4	0,067	NR	0,05	NR	0,05
5	0,067	0,1	NR	NR	0,067
6	NR	NR	0,1	NR	0,033
7	NR	0,08	NR	0,17	NR
8	NR	NR	NR	0,2	NR
Média	0,066	0,08675	0,08425	0,1567	0,0475
e.p.m	0,0143	0,008097	0,01580	0,02963	0,007377
D.P	0,0286	0,01619	0,03161	0,05132	0,01475

NR – Não realizado

Sham – ceco exteriorizado sem ligadura e perfuração CLP (); CLP + i ()

CLP - ceco exteriorizado, ligado e perfurado seis vezes

CLP + i - ceco exteriorizado, ligado, perfurado seis vezes e tratamento com insulina

APÊNDICE P – Valores individuais, média, desvio padrão (D.P) e erro padrão da média (e.p.m) referente à figura 19 da seção Resultados: Insulina previne a translocação nuclear da fração p65 do NF-κB

<b>Colocalização nuclear – NFκB (p65)</b>					
	<b>Controle</b>		<b>Diabético</b>		
<b>Animal</b>	<b>Sham</b>	<b>CLP</b>	<b>Sham</b>	<b>CLP</b>	<b>CLP+i</b>
<b>1</b>	0,7692	NR	NR	NR	NR
<b>2</b>	0,7464	0,7062	0,7363	0,8059	0,7252
<b>3</b>	0,6622	0,6553	0,7087	0,9013	NR
<b>4</b>	0,5603	NR	0,7724	0,8872	0,6224
<b>5</b>	NR	0,6753	0,6677	0,8898	0,7699
<b>6</b>	NR	0,7202	NR	NR	0,7748
<b>7</b>	NR	NR	NR	NR	NR
<b>8</b>	NR	NR	NR	NR	NR
<b>Média</b>	0,6845	0,6893	0,7213	0,8711	0,7231
<b>e.p.m</b>	0,04737	0,01470	0,02211	0,02193	0,03536
<b>D.P</b>	0,09474	0,02940	0,04423	0,04386	0,07073



## ANEXOS

## ANEXO A



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

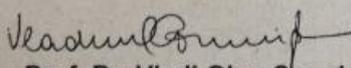
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 392013

**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP) CERTIFICA que o Projeto de Pesquisa "**Modulação da insulina na expressão das moléculas CD14, TLR-4, MHC-II e CD 64 em modelo experimental de sepse**" (Protocolo CEUA/FCF/410), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Eduardo Lima Nolasco**, sob orientação/supervisão do(a) **Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de 08 de abril de 2013.

São Paulo, 09 de abril de 2013.

  
**Prof. Dr. Vladi Olga Consiglieri**  
Vice-Coordenadora da CEUA/FCF/USP

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

## ANEXO B

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



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

9142 - 7910679/1 - Eduardo Lima Nolasco

**Email:** eduardo-nolasco@usp.br  
**Data de Nascimento:** 26/11/1984  
**Cédula de Identidade:** RG - MG-5.567.916 - MG  
**Local de Nascimento:** Estado de Minas Gerais  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Farmacêutico - Universidade Federal de Juiz de Fora - Minas Gerais - Brasil - 2009  
**Mestrado:** Mestre em Ciências - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2013

**Curso:** Doutorado  
**Programa:** Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
**Área:** Fisiopatologia  
**Data de Matrícula:** 05/03/2013  
**Início da Contagem de Prazo:** 05/03/2013  
**Data Limite para o Depósito:** 03/07/2017  
**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 05/03/2013  
**Prorrogação(ões):** 120 dias  
 Período de 05/03/2017 até 03/07/2017  
**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 01/04/2015  
**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 05/03/2013  
 Prorrogação em 18/01/2017

Aluno matriculado no Regulamento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).  
 Última ocorrência: Prorrogação em 18/01/2017  
 Impresso em: 20/03/2017 18:22:06

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



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

9142 - 7910679/1 - Eduardo Lima Nolasco

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred. Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5793-11/1	Tópicos em Análises Clínicas I	05/03/2013	17/06/2013	15	1	90	A	N Concluída
FBC5722-2/2	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	06/03/2013	26/03/2013	60	4	100	A	N Concluída
ICB5722-1/1	A História Imunológica do Indivíduo é Única e Irreversível. (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	02/04/2013	06/05/2013	75	5	90	A	N Concluída
MCM5716-5/5	Atualização em Diabetes Mellitus Tipo 1 e 2 e Síndrome Metabólica (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	12/08/2013	15/09/2013	75	5	89	A	N Concluída
FBC5705-4/4	Tópicos em Microscopia Quantitativa	03/02/2014	09/02/2014	30	2	100	B	N Concluída
FBC5780-2/2	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	10/03/2014	20/04/2014	90	6	88	A	N Concluída
FBC5792-3/1	Tópicos em Análises Clínicas II	11/03/2014	23/06/2014	15	1	90	A	N Concluída
FBC5766-4/2	Tópicos em Análises Clínicas IV	04/08/2015	16/11/2015	15	1	90	A	N Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	25
Estágios:			
<b>Total:</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>25</b>

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 18/01/2017  
 Impresso em: 20/03/2017 18:22:06