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

Influência da insulina sobre vias de sinalização envolvidas na peritonite provocada por inoculação de *Staphylococcus aureus* em animais sadios e diabéticos

Mariana Cristina Ferreira Silva

Dissertação para obtenção do título de Mestre.

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

Influência da insulina sobre vias de sinalização envolvidas na peritonite provocada por inoculação de *Staphylococcus aureus* em animais sadios e diabéticos

Mariana Cristina Ferreira Silva

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

Dissertação para obtenção do título de Mestre.

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

S586i

SILVA, MARIANA CRISTINA FERREIRA
INFLUÊNCIA DA INSULINA SOBRE VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA PERITONITE PROVOCADA POR INOCULAÇÃO DE Staphylococcus aureus EM ANIMAIS SADIOS E DIABÉTICOS / MARIANA CRISTINA FERREIRA SILVA. - São Paulo, 2017.
111 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: MARTINS, JOILSON DE OLIVEIRA

1. Staphylococcus aureus. 2. Diabetes Mellitus. 3. Insulina. 4. Inflamação. 5. Vias de sinalização. I. T. II. MARTINS, JOILSON DE OLIVEIRA, orientador.

Mariana Cristina Ferreira Silva

Influência da insulina sobre vias de sinalização envolvidas na peritonite provocada por inoculação de *Staphylococcus aureus* em animais sadios e diabéticos

Comissão julgadora da

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

Orientador / Presidente

Prof. Dr. Jorge Luiz Freire Pinto

1. Examinador

Prof.ª Dr.ª Maristela Tsujita

2. Examinador

Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

3. Examinador

São Paulo, 14 de setembro de 2017.

DEDICATÓRIA

À minha amada mãe, Cleuza, por me ensinar, dentre tantas e tantas coisas, que o que aprendemos nessa vida é a única coisa que nunca ninguém poderá nos tirar, por me dar o exemplo de amor aos estudos, por sempre brilhar no que se propunha fazer, sem deixar de ser a incrível mãe que foi, por ser meu exemplo pra vida toda. Sei que me ama e torce por mim hoje, do plano espiritual. (*in memoriam*).

Aos meus irmãos, Vanessa, Fabio e Fernanda, por estarem sempre ao meu lado, em momentos bons e ruins, por me aturarem nessa fase do mestrado, onde fui impaciente por muitas vezes, por entenderem minhas ausências em todas as vezes em que eu disse: “não posso, preciso estudar”.

Aos meus sobrinhos gêmeos, Elvio e Julia, que nos últimos anos acharam graça de eu “ainda” ir para “a escola”, por entenderem quando não pude estar presente, por sentirem orgulho da tia que, como eles diziam a todos os amiguinhos, “é cientista da USP”, e por se espelharem em mim para estudar.

À minha afilhada Amanda, por entender minhas ausências e priorizar os momentos comigo da melhor forma possível, e por confiar em mim para ajudar a guiá-la em seus estudos e em suas escolhas pessoais.

Aos meus tios José e Neide, por serem segundos pais, ajudando a alicerçar minha vida desde a minha primeira infância até hoje, apoiando minhas escolhas todas, inclusive a de fazer o mestrado.

Ao meu pai, Marco Antônio por, apesar de uma relação conturbada na maior parte do tempo, sempre ter orgulho de mim e do que me tornei.

À minha família como um todo, pois é impossível nomear um a um, pela estrutura que me ajudou a ser quem sou hoje.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade da vida e do aprendizado e aos amigos do plano espiritual, por me auxiliarem a conciliar a minha vida material ao meu caminho espiritual, nunca me esquecendo do amor ao próximo, e que na verdadeira Pátria será contado o quanto eu aprendi em todos os campos, e quão bem eu fiz a quem pude.

Ao Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins, pelo convite e a oportunidade de fazer o mestrado e conciliar com o trabalho, durante dois anos, pela paciência que teve durante todo o processo e por ter sido compreensivo em alguns momentos difíceis durante esse período.

À professora Elsa Masae Mamizuka, pela colaboração e apoio neste trabalho.

À professora Elvira Maria Guerra-Shinohara, pela colaboração com as estatísticas e auxílio valioso no formato da dissertação, e pela amizade reforçada durante essa colaboração.

À professora Primavera Borelli, pelos 12 anos de convívio diário, quando trabalhei em seu laboratório, e por me ensinar o amor e a dedicação à pesquisa e ao ensino, sendo uma renomada pesquisadora, sem deixar de ser mãe, avó e amiga. Um exemplo a ser seguido.

Ao professor Antônio Altair Magalhães Oliveira (Táta), pelos anos em que trabalhamos juntos, e por ser um ponto de equilíbrio por tantas vezes.

À professora Dulcinéia Saes Parra Abdalla, pela colaboração no desenvolvimento do projeto, por abrir seu laboratório para que eu utilizasse a qualquer momento, e por permitir que sua aluna Jacqueline me auxiliasse.

À aluna Jacqueline Cavalcante, pela colaboração na execução dos experimentos de Western Blotting desse projeto, e pela amizade reforçada nos almoços e nas vezes em que pegou carona comigo na jornada São Bernardo-USP-São Bernardo, trajeto esse que pode durar horas.

Aos amigos do Laboratório de Imunoendocrinologia, Fernanda, Paula, Sabrina, Felipe, Leonardo, Fernando, Thaís, Eduardo, Ana Maria, Thatyane, Ísis, Maria Fernanda, pelo apoio durante o desenvolvimento do projeto, pelos momentos de descontração, e pela amizade desenvolvida nesse período.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Hematologia, onde trabalhei por 12 anos, Maristela, Graziela, Jackeline, Ed, Edson, Alexandra, Dalila, Daniela, Araceli, Marco Aurélio, Marcelo, pelas discussões acerca do projeto, e pela amizade tão grande e bonita que construí na convivência com eles, dentro e fora das paredes da FCF-USP.

Aos amigos do laboratório de bioquímica, Marcela, Soraya, Walter, Gustavo, que me adotaram durante o tempo que realizei experimentos lá, pelo apoio, pelas risadas, pelos almoços compartilhados e pela amizade que levarei comigo pra sempre.

A todos os professores, funcionários e alunos de pós graduação da FCF-USP, que realmente fica impossível nomear, após 17 anos de convivência, e que me farão saudosa em breve.

Ao meu cunhado Alexandre Manuel, que conseguiu recuperar o arquivo dessa Dissertação de Mestrado que meu computador simplesmente apagou, 4 dias antes da última correção do orientador, e me salvou de um ataque cardíaco iminente.

Aos amigos que fiz na FCF enquanto funcionária, Silene, Patrícia, Renata, Fabiana, Luana, Edna, Marilisa, Samantha e tantos outros, que tornaram minha vida mais feliz.

À minha amiga Cristina Moreno Fajardo, que conheci ainda no Instituto de Química, em 2000, e que se tornou grande amiga e também funcionária da FCF-USP

Às amigas de uma vida toda, do nosso grupo “tchatchas”, que tive a honra de conhecer na FCF-USP e que, mesmo cada qual tendo ido pra um lado, ainda continuamos juntas, Amanda Rabello, Martina Rudnicki, Luciane Faine, Karina Nakajima.

Aos amigos da minha vida toda, Guilherme Pauli, Thaís Pauli, Marco Antonio Bagarollo, Camila Machado Baldavira, Pedro Baldavira Neto, Luciana Miranda, Maria Carolina Borges.

Aos amigos Bianca Lupi, Mari Ogura, Paulo de Tarso Trazzi, Sheila Moalla, Nelson Rocha, que dividem comigo os ensinamento espirituais.

Ao Faisal Mahmood, com quem compartilhei minha vida por um período, e que acompanhou o desenvolvimento desse projeto desde a prova de seleção até a qualificação.

Ao Neco, que tive a sorte de encontrar em meu caminho no início desse ano, e que vem acompanhando a finalização desse projeto e suportando meus surtos de tensão, sempre me apoiando e equilibrando minhas energias, fazendo com que eu ainda acredite.

“Uma coisa que aprendi ao longo de minha vida: a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e infantil – e, mesmo assim, é a coisa mais preciosa que temos”

Albert Einstein

RESUMO

Silva, M.C.F. **influência da insulina sobre vias de sinalização envolvidas na peritonite provocada por inoculação de s*taphylococcus aureus* em animais sadios e diabéticos.** 2017. 111f. Defesa de dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Dentre tantas complicações do *diabetes mellitus* (DM), a infecção por bactérias comuns da microbiota superficial da pele como, por exemplo, a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, causadora de infecções como a peritonite, com altos índices de hospitalização e morte. A hipótese deste trabalho é a que o efeito da insulina na ativação das vias de sinalização MAPK, PKC e PI3K em peritonite induzida por *S. aureus* em animais diabéticos e não diabéticos possa regular a produção de citocinas. Foram utilizadas amostras de fígado, rim, linfonodos peritoniais e baço de animais oriundos de estudo anterior (Projeto FCF/USP-375), no qual animais diabéticos (aloxana, 42 mg/kg, i.v., 10 dias) e não-diabéticos com peritonite decorrente da infecção por *S. aureus* receberam uma dose de 4 UI e 1 UI de insulina NPH, respectivamente, por via subcutânea, 2 horas antes da infecção com *S. aureus*, e outras 3 doses de 2 UI e 0,5 UI às 17h00', respectivamente. A glicemia foi determinada no dia anterior, 10 dias após a injeção de aloxana e após os tratamentos com insulina. Em amostras de fígado, rim, linfonodo e baço dos animais supra citados foram avaliados a dosagem de citocinas (IL-1β, IL-4, IL-10, TNF-α, CINC-1, CINC-2 e CINC-3) por ensaios de enzima-imunoensaio (ELISA); em homogenato de fígado foram avaliadas a expressão das moléculas das vias MAPK (fosfo P-38, fosfo ERK p42/44), PKC (fosfo PKC-α, fosfo PKC-δ) e PI3K (fosfo-AKT) pelo método de *Western Blotting*. Na avaliação do fígado, a insulina foi capaz de aumentar a concentração das citocinas IL-4 e TNF-α que apresentavam-se diminuídas em animais não diabéticos, em relação aos animais não diabéticos e não infectados, mas nos animais diabéticos, na infecção pela cepa N315, a insulina diminuiu a concentração de IL-4, que não estava alterada pela infecção, e não foi capaz de aumentar a concentração de IL-1β que estava diminuída na infecção, em relação aos animais diabéticos e não infectados. Em linfonodos peritoniais de animais não diabéticos infectados pela cepa N315, a insulina diminuiu a produção de IL-1β e IL-10, que não estavam alteradas na infecção, e diminuiu a concentração de IL-4, que estava aumentada na infecção, em relação aos animais não diabéticos e não infectados; em animais diabéticos, a insulina diminuiu a produção das citocinas IL-1β e CINC-1, que estavam aumentadas, e aumentou a concentração de IL-10, que estava diminuída na infecção com a cepa N315, mas baixou a concentração de IL-4, em relação aos animais infectados, e na infecção pela cepa ATCC, a insulina aumentou a produção de IL-1β, CINC-1 e CINC-3 dos animais tratados, em relação aos infectados e não tratados. Em baço, a insulina diminuiu a produção de IL-10 na infecção pela cepa ATCC tanto em animais não diabéticos quanto em animais diabéticos e, nesse último grupo, também aumentou a produção de CINC-3 em relação aos animais diabéticos não infectados; na infecção com a cepa N315, a insulina não aumentou a concentração de IL-1β e TNF-α, que estavam diminuídas na infecção. Em rim, não houveram alterações

significativas na produção de citocinas na infecção com nenhuma das cepas estudadas, nem para os grupos diabéticos, nem para os não diabéticos. Verificou-se que os animais diabéticos apresentam maior alteração tanto nas vias de sinalização estudadas quando na produção de citocinas pró-inflamatórias, quando comparados aos animais não diabéticos, na infecção por ambas as cepas de *S. aureus* estudadas. Assim, os resultados obtidos sugerem que o tratamento com insulina possa modular parcialmente a produção das citocinas IL-1β, TNF-α e IL-10 no fígado e nos linfonodos peritoniais dos animais infectados principalmente pela cepa N315 de *S.aureus*, modulando parcialmente a expressão das moléculas da via de sinalização (MAPK e PKC), envolvidas na produção dessas citocinas.

Palavras-chave: *S. aureus*; *diabetes mellitus*; insulina; inflamação; citocinas; vias de sinalização; fígado; linfonodo peritonial.

Apoio Financeiro: Auxílio à Pesquisa – Regular FAPESP (2014/05214-1); CAPES; CNPq.

ABSTRACT

Silva, M.C.F. **Influence of insulin on signaling pathways involved in peritonitis caused by inoculation of *staphylococcus aureus* in healthy and diabetic animals**. 2017. 111f. Defesa de dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Among so many complications of diabetes mellitus (DM), infection by common bacteria of the superficial microbiota of the skin, for example, a gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*, causing infections like peritonitis, with high rates of hospitalization and death. The hypothesis of this study is that the effect of insulin on the activation of MAPK, PKC and PI3K signaling pathways in peritonitis induced by *S. aureus* in diabetic and non-diabetic animals may regulate the production of proinflammatory cytokines. Liver, kidney, peritonial lymph nodes and spleen samples of animals from the previous study (FCF / USP-375 Project) were used in this project; diabetic animals (alloxan, 42 mg / kg, iv, 10 days) and non-diabetic animals with peritonitis due to *S. aureus* infection received one dose of 4 IU and 1 IU of NPH insulin, respectively, subcutaneously, 2 hours before infection with *S. aureus*, and another 3 doses of 2 IU and 0.5 IU at 5:00 p.m., respectively. Blood glucose was determined the day before, 10 days after alloxan injection and after insulin treatments. In the liver, kidney, lymph node and spleen samples of the above-mentioned animals the cytokines (IL-1β, IL-4, IL-10, TNF-α, CINC- 2 and CINC-3) by enzyme-immunoassay (ELISA) assays; we avaliated, by Western Blotting, the signaling pathways MAPK (phospho-P-38, phospho ERK p42 / 44), PKC (phospho PKC-α and phospho PKC-δ) and PI3K (phospho AKT) in liver, insulin was able to increase the concentration of cytokines IL-4 and TNF-α that were decreased in non-diabetic animals, in relation to non-diabetic and non-infected animals, but in diabetic animals, in strain N315, insulin decreased the concentration of IL-4, which was not altered by the infection, and was not able to increase the concentration of IL-1β that was decreased in infection, relative to diabetic and uninfected animals. In peritonial lymph nodes from non-diabetic animals infected with the N315 strain, insulin decreased the production of IL-1β and IL-10, which were not altered in the infection, and decreased the concentration of IL-4, which was increased in infection, in relation to non-diabetic and non-infected animals; in diabetic animals, insulin decreased IL-1β and CINC-1 which were increased, and increased the concentration of IL-10, which was decreased in infection with strain N315, but decreased the concentration of IL-4 in Infected animals, and in infection by the ATCC strain, insulin increased the production of IL-1β, CINC-1 and CINC-3 of treated animals over infected and untreated animals. In spleen, insulin decreased IL-10 production on infection by the ATCC strain in both non-diabetic and diabetic animals and, in this last group, also increased the production of CINC-3 in relation to uninfected diabetic animals; in infection with the N315 strain, insulin did not increased the concentration of IL-1β and TNF-α, which were decreased in infection. In kidney, there were no significant changes in cytokine production in infection with any of the strains studied, neither for diabetic groups nor for non-diabetics. It was verified that diabetic animals present a greater alteration both in the signaling pathways studied and in the production of pro-inflammatory cytokines, when compared to

non-diabetic animals, in the infection by both strains of S. aureus studied. Thus, the results suggest that insulin treatment may partially modulate the production of IL-1β, TNF-α and IL-10 cytokines in the liver and in the peritonial lymph nodes of animals infected mainly with *S. aureus* strain N315, since they partially modulating the expression of signaling pathway molecules (MAPK and PKC), involved in the production of these cytokines.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; diabetes mellitus; insulin; inflammation; cytokines; signaling pathways; liver; peritonial lymph node.

Financial Support: Research Support - Regular FAPESP (2014 / 05214-1); CAPES; CNPq.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática das moléculas das vias de sinalização analisadas no presente estudo..... 26
Figura 2 – Concentrações da citocina IL-1β no fígado em ratos não diabéticos e diabéticos..... 33
Figura 3 – Concentrações da citocina TNF-α no fígado em ratos não diabéticos e diabéticos..... 34
Figura 4 – Concentrações da citocina IL-4 no fígado em ratos não diabéticos e diabéticos..... 35
Figura 5 – Concentrações da citocina IL-10 no fígado em ratos não diabéticos e diabéticos..... 36
Figura 6 – Resumo dos resultados encontrados da produção de citocinas em fígado de ratos não diabéticos..... 37
Figura 7 – Resumo dos resultados encontrados da produção de citocinas em fígado de ratos diabéticos..... 38
Figura 8 – Concentrações da citocina IL-1β nos linfonodos peritoniais em ratos não diabéticos e diabéticos..... 40
Figura 9 – Concentrações da citocina TNF-α nos linfonodos peritoniais em ratos não diabéticos e diabéticos..... 41
Figura 10 – Concentrações da citocina IL-4 nos linfonodos peritoniais em ratos não diabéticos e diabéticos..... 42
Figura 11 – Concentrações da citocina IL-10 nos linfonodos peritoniais em ratos não diabéticos e diabéticos..... 43
Figura 12 – Concentrações da quimiocina CINC-1 nos linfonodos peritoniais em ratos não diabéticos e diabéticos..... 44
Figura 13 – Concentrações da quimiocina CINC-2 nos linfonodos peritoniais em ratos não diabéticos..... 45
Figura 14 – Concentrações da quimiocina CINC-3 nos linfonodos peritoniais em ratos não diabéticos e diabéticos..... 47
Figura 15 – Resumo dos resultados encontrados da produção de citocinas em linfonodos peritoniais de ratos não diabéticos..... 49

Figura 16 – Resumo dos resultados encontrados da produção de citocinas em linfonodos peritoniais de ratos diabéticos..... 50
Figura 17 – Concentrações da citocina IL-1β no baço em ratos não diabéticos e diabéticos..... 51
Figura 18 – Concentrações da citocina TNF-α no baço em ratos não diabéticos e diabéticos..... 52
Figura 19 – Concentrações da citocina IL-4 no baço em ratos não diabéticos e diabéticos..... 53
Figura 20 – Concentrações da citocina IL-10 no baço em ratos não diabéticos e diabéticos..... 54
Figura 21 – Concentrações da quimiocina CINC-3 no baço em ratos não diabéticos e diabéticos..... 56
Figura 22 – Resumo dos resultados encontrados da produção de citocinas em baço de ratos não diabéticos..... 57
Figura 23 – Resumo dos resultados encontrados da produção de citocinas em baço de ratos diabéticos..... 58
Figura 24 – Concentrações da citocina IL-1β no rim em ratos não diabéticos e diabéticos..... 59
Figura 25 – Concentrações da citocina IL-4 no rim em ratos não diabéticos e diabéticos..... 61
Figura 26 – Concentrações da citocina IL-10 no rim em ratos não diabéticos e diabéticos..... 62
Figura 27 – Resumo dos resultados encontrados da produção de citocinas em rim de ratos diabéticos..... 63
Figura 28 – Análise de P38 em fígado, na infecção com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus*..... 64
Figura 29 – Análise de Fosfo-ERK em fígado, na infecção com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus*..... 65
Figura 30 – Análise de fosfo-PKC-α em fígado, na infecção com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus*..... 66
Figura 31 – Análise de fosfo-PKC-δ em fígado, na infecção com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus*..... 67

Figura 32 – Análise de fosfo-AKT em fígado, na infecção com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus*..... 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição dos grupos experimentais..... 29
Tabela 2 – Concentrações da quimiocina CINC-2 nos linfonodos peritoniais em ratos diabéticos..... 46
Tabela 3 – Concentrações da quimiocina CINC-3 nos linfonodos peritoniais em ratos diabéticos..... 48
Tabela 4 – Concentrações da quimiocina CINC-2 no baço em ratos não diabéticos e diabéticos..... 55
Tabela 5 – Concentrações da citocina IL-1β no rim em ratos diabéticos, infectados com a cepa N315..... 60
Tabela 6 – Resumo dos resultados obtidos na expressão das vias de sinalização estudadas no fígado de animais não diabéticos dos grupos infectados (ambas as cepas) e infectados e tratados, em relação ao seu controles não infectados (CS)..... 69
Tabela 7 – Resumo dos resultados obtidos na expressão das vias de sinalização estudadas no fígado de animais diabéticos dos grupos infectados (ambas as cepas) e infectados e tratados, em relação ao seu controles não infectados (DS)..... 70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS E FÓRMULAS

AKT - *Protein Kinase B*
ATCC - *American Type Culture Collection*
CFU - *Colony-forming unit*
CINC - *Cytokine Induced Neutrophil Chemoattractant*
DM - *Diabetes mellitus*
DM1 - *Diabetes mellitus* tipo 1
DM2 - *Diabetes mellitus* tipo 2
ICAM - *Intracelular adhesion molecule*
IDF - *International Diabetes Federation*
IL - Interleucina
INoS - *Inducible nitric oxide synthase*
i.p. - Intraperitonial
i.v. - Intravenoso
LPS - Lipopolissacarídeo
MA - Macrófagos alveolares
MAPK - *Mitogen-activated protein kinase*
MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina
N315 - Cepa de *S. aureus* N315 HLA^{+}
NPH - *Neutral protamine Hagedorn*
PAMP - *Pathogen Associated Molecular Pattern*
PBS - *Phospate Buffered Saline*
PKC - *Protein Kinase C*
PVL - *Panton-Valentine leukocidin* (PVL)
S. aureus - *Staphylococcus aureus*
SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes
s.c. - Subcutâneo
Th - T helper
TLR - *Toll-like receptors*
TNF - *Tumours Necrosis Factor*
TSB - *Tryptic Soy Broth*
WHO - World Health Organization

ÍNDICE

1. Introdução..... 20
1.1. *Diabetes mellitus*, peritonite e *Staphylococcus aureus*..... 20
1.2. *Staphylococcus aureus* e seus fatores de virulência..... 23
1.3. Diabetes e resposta imunológica em fígado..... 24
1.4. Vias de sinalização MAPK, PKC e PI3K..... 25
2. Justificativa..... 26
3. Objetivos..... 27
4. Material e Métodos..... 28
4.1. Animais..... 29
4.2. Preparo do homogenato de órgãos..... 30
4.3. Dosagem de proteínas por BCA..... 30
4.4. Quantificação de citocinas quimiocina por enzima-imunoensaio (ELISA). 30
4.5. Expressão de proteínas por técnica de *Western Blotting*..... 30
4.6. Análise estatística..... 31
5. Resultados..... 32
6. Discussão..... 71
7. Conclusões..... 75
8. Referências..... 76
9. Anexos..... 81
9. Anexo A – Certificado de aprovação do projeto “Efeito da insulina na ativação das vias de sinalização em peritonite induzida por *Staphylococcus aureus* em animais diabéticos e sadios” sob responsabilidade da pesquisadora Mariana Cristina Ferreira Silva (Protocolo CEUA/FCF/495)..... 82
9. Anexo B – Certificado de aprovação do projeto “Efeito da insulina na inflamação peritonial causada por *Staphylococcus aureus* na imunidade inata” sob responsabilidade da pesquisadora Paula Regina Knox de Souza (Protocolo CEUA/FCF/375)..... 83
9. Anexo C – Ficha do aluno..... 84
10.Apêndices..... 86

1. Introdução

1.1. *Diabetes mellitus*, peritonite e *Staphylococcus aureus*

O *Diabetes Mellitus* (DM) é um grupo de doenças metabólicas, que são caracterizadas por hiperglicemia resultante da deficiência na secreção de insulina (DM1), ou da deficiência na ação da insulina (DM2) (SBD 2015-2016).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), em 2016, mais de 422 milhões de pessoas no mundo sofrem de *diabetes mellitus* (DM); ainda segundo WHO, 2016, na última década, a prevalência de diabetes aumentou mais rapidamente nos países de baixa e média renda do que nos países de alta renda. A Federação Internacional de Diabetes (IDF), em 2015, estimou esse número superior a 400 milhões de pessoas com DM no mundo, sendo que 46,3% seriam não diagnosticadas. No Brasil, segundo dados da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), o número de pessoas com DM no Brasil é de 12 milhões (SBD, 2015-2016).

Atualmente, 8,5% dos adultos no mundo são diabéticos; é sabido que a maioria das pessoas portadoras de DM apresentam a DM tipo 2. Cerca de 1.5 milhões de mortes são atribuídas ao diabetes, anualmente. (WHO, 2016).

Dentre tantas complicações do *diabetes mellitus* (DM), a infecção por bactérias comuns da microbiota superficial da pele como, por exemplo, a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, que pode causar infecções como a peritonite, com altos índices de hospitalização e morte.

O *S. aureus* faz parte da microbiota nasal de cerca de 20% dos adultos saudáveis, assim sendo, há grande risco de disseminação em ambiente hospitalar (OLSEN *et al*., 2012a; WARREN, 2012), que pode acontecer por meio dos profissionais de saúde colonizados, e no meio ambiente (OLSEN *et al*., 2012b). Pesquisas apontam que pacientes com DM1 possuem colonização nasal por *Staphylococcus aureus* mais frequente do que pacientes não diabéticos (RICH, 2005).

A peritonite causada por *S. aureus* está associada a manifestações mais graves da doença, com alto risco de hospitalização e morte (ZIMMERMAN *et al*., 1988; GOVINDARAJULU *et al*., 2010; PIRAINO, 2010), principalmente em países da América Latina, especialmente no Brasil (BARRETTI *et al*., 2012).

As cepas *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (*MRSA*) veem se tornando mais frequentes nos ambientes hospitalares; cepas que apenas eram encontradas nas infecções de pele ou tecidos moles nos pacientes que não apresentam fatores de risco clássicos, chamadas de *MRSA* associadas à comunidade, mesmo resistentes à meticilina, não apresentavam resistência a diversas outras classes de drogas (VIDAL *et al*, 2009).

A resposta imunológica contra *S. aureus* é desencadeada por *Toll-like receptors* (TLR) *2* presentes na superfície celular, e *Toll-like receptors* (TLR) 9, presentes em compartimentos intracelulares, como endossomos, e iniciam uma cascata de sinalização inflamatória eficiente que leva a destruição da bactéria (EDDIE *et al*, 2010). O TLR-2 apresenta papel principal na destruição de *S. aureus* por sua capacidade de reconhecimento de estruturas presentes na parede celular bacteriana, tais como peptideoglicano, ácido lipoteicoico, ácido teicoico, e iniciar a resposta pró-inflamatória, com a ativação de *nuclear fator-kappa* B (NF-κB) (ANWAR *et al.*, 2009; FRODERMANN *et al.*, 2011).

As cepas MRSAs associadas à comunidade diferenciam-se das cepas MRSAS multirresistentes comuns em hospitais pela genotipagem, onde as cepas associadas à comunidade possuem menor quantidade de *staphylococcal chromosomal cassette mec* (*SCCmec*), um elemento que carrega o gene mecA e presença de genes *lukSF-PV* para uma citotoxina denominada *Panton-Valentine leukocidin* (PVL). (SHUKLA *et al*, 2012).

Dentre os fatores risco existentes para infecção hospitalar por MRSA, estão o tempo de hospitalização, uso contínuo de antibióticos e o uso de dispositivos invasivos como acessos e cateteres (GERBER *et al*., 2009; CARVALHO *et al*., 2010).

A inflamação é considerada a resposta adaptativa do tecido conjuntivo, frente a uma agressão ao organismo e caracteriza-se por eventos vasculares, linfáticos e celulares cujo objetivo é eliminar o agente da infecção, restituir o tecido lesionado e restaurar a homeostasia do organismo (KVIETYS & GRANGER, 2012). Tais eventos vasculares culminam no extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido intersticial, a fim de aumentar a viscosidade sanguínea e reduzir o fluxo de sangue, permitindo marginação

leucocitária e migração de leucócitos para o espaço extra vascular (KUMAR *et al.,* 2010).

O recrutamento dos leucócitos da corrente sanguínea para o tecido acontece através da expressão de inúmeras famílias de moléculas de adesão, como integrinas, selectinas e moléculas pertencentes à superfamília das imunoglobulinas, presentes na superfície endotelial e na superfície leucocitária (MULLER, 2009). O processo inflamatório ocorre pela ação de mediadores químicos e de citocinas que apresentam caráter pró ou anti-inflamatório (BENSINGER & TONTONOZ, 2008).

As citocinas são produzidas por diferentes tipos de células e apresentam diversificadas funções durante o processo inflamatório, compreendendo a ativação endotelial e leucocitária e indução de resposta na fase aguda (GREGHI, 2011). O fígado realiza síntese de proteínas de fase aguda, como as citocinas pró inflamatórias, como o TNF-α, modulador da permeabilidade vascular, e que também atua na proliferação, diferenciação e ativação celular, assim como IL-1α, IL-1β, que ativam a inflamação e causam febre; essas citocinas induzem a produção e secreção de proteínas de fase aguda, e também atuam sobre o endotélio, aumentando a expressão de moléculas de adesão; a IL-4 é importante para a expansão clonal de células B, e também na produção de anticorpos, proliferação de células T e na indução de células Th2. A citocina anti-inflamatória IL-10 apresenta como principal papel a supressão da resposta imunológica e inflamatória, inibindo a produção de IL-12 e reduzindo a expressão de coestimulantes e moléculas de MHC de classe II. (OLIVEIRA *et al*, 2011) (ABBAS, 2013).

Os linfócitos T tem papel importante na defesa contra as infecções por *S. aureus,* sendo a resposta dependente da subpopulação de linfócitos T ativada (BANCHEREAU *et al*, 2012).

A resposta imunológica efetiva contra as infecções causadas por *S. aureus* baseia-se no recrutamento de neutrófilos que culminam na eliminação da bactéria por meio de fagocitose (MATSUI & NISHIKAWA, 2012).

1.2. *Staphylococcus aureus* e seus fatores de virulência

Apesar da bactéria gram-positiva *S. aureus* não ser principal causadora de peritonite, está associada a manifestações mais graves da infecção (ZIMMERMAN *et al*., 1988; GOVINDARAJULU *et al*., 2010; PIRAINO, 2010).

S. aureus está presente em aproximadamente 40% da pele e mucosas dos seres humanos (MERRIMAN *et al*, 2014). *S. aureus* tem sido tradicionalmente considerado uma bactéria extracelular, mas vários estudos demonstraram sua capacidade de invadir uma série de células fagocíticas, como células endoteliais e osteoblastos. Esta localização intracelular pode contribuir para a evasão da resposta imunológica e proteção da atividade antibiótica (OVIDEO-BOYSO *et al*., 2011).

Fatores de virulência de bactérias são fatores que permitem a evasão do sistema imunológico; dentre os principais fatores de virulência do *S. aureus* estão a formação de cápsula extracelular polissacarídea, os inibidores de quimiotaxia de neutrófilos e da cascata complemento e enzimas que permitem a sobrevivência da bactéria dentro do fagossomo de neutrófilos e toxinas (como a toxina-α e a leucocidina *Panton-Valentine*) (ANDERSON *et al*., 2012).

A bactéria pode secretar toxinas, como a leucocidina *Panton-Valentine* (PVL), que formam poros nas membranas de células do sistema imunológico, causando lise celular e necrose tecidual. Cepas de *S. aureus* também podem secretar a toxina-α (também chamada de α-hemolisina ou HLA), que apresenta atividade citolítica ou citotóxica, causando, em altas dosagens, necrose e, em baixas dosagens, apoptose ou resposta inflamatória das células-alvo ANDERSON *et al*., 2012).

A PVL é uma citotoxina que possui a propriedade de induzir respostas pró inflamatórias, como a secreção de citocinas, e causa citólise de leucócitos, especialmente de neutrófilos, dependendo de sua concentração (RIGBY & DELEO, 2012) . A resposta de PVL não é igual para todas as espécies estudadas. Em ratos, diferente do que ocorre em humanos, a PVL não causa citólise em leucócitos.

As cepas de *S. aureus* inoculadas nos animais do projeto (SOUZA, 2015), cujos órgãos também foram utilizados no presente estudo, foram Cepa *American Type Culture Collection* (ATCC) 25923, e N315, cepas comuns em

ambientes hospitalares; no estudo supra citado, inicialmente também foi utilizada a cepa MR 108 PVL^+ porém, os animais que receberam inoculação por essa cepa apresentaram hemorragia no peritônio e coagulação do líquido peritonial, assim sendo, essa cepa foi removida do estudo.

1.3. Diabetes e resposta imunológica em fígado

Pacientes com DM apresentam risco aumentado a infecções que afetam mucosas, tecidos moles, trato urinário, respiratório e infecções nosocomiais (JOSHI *et al.*, 1999; PELEG *et al.*, 2006).

Em prévio estudo, ratos diabéticos infectados peritonialmente com as cepas N315 e ATCC 25923 apresentaram um aumento de cerca de 350% na contagem de leucócitos totais peritoniais quando comparados a ratos não diabéticos, infectados peritonialmente com as mesmas cepas (SOUZA, 2015).

Diferentes causas podem culminar no aumento da susceptibilidade a infecções em pacientes diabéticos, por exemplo, a baixa interação leucócito-endotélio, a reduzida expressão de *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), menores níveis de TNF-α e IL-1β e a reduzida migração de fagócitos para o foco inflamatório (ANJOS-VALOTA *et al.*, 2006; DE OLIVEIRA MARTINS *et al.*, 2006; DELAMAIRE *et al.*, 1997).

O fígado é conhecido como um órgão único para exercer efeito tolerogênico no sistema imunológico. Os hepatócitos participarn da modulação do sistema imunológica adaptativo, juntamente com outras células não-parenquimatosas no fígado. Cerca de 70-85% do volume do fígado é ocupado por hepatócitos parenquimatosos, que desempenham papéis fundamentais no metabolismo, desintoxicação e síntese de proteína, e também ativam a imunidade inata, através da secreção de proteínas, contra microorganismos invasores; estas proteínas incluem proteínas bactericidas, opsoninas que auxiliam na fagocitose de bactérias exógenas, vários fatores solúveis que regulam a sinalização de lipopolisacarídeos e fibrinogênio do factor de coagulação que ativa a imunidade inata. (ZHOU *et al*., 2016).

Muitas dessas proteínas são rapidamente produzidas após a estimulação, e são agrupados como proteínas de fase aguda. Muitas citocinas inflamatórias, Incluindo IL-1β, e TNF-α, regulam a produção das proteínas de

fase aguda. A IL-1β é principalmente liberada por células imunológicas inatas após estimulação por patógenos. Os hepatócitos respondem à estimulação por IL-1β e produzem uma grande quantidade de citocinas, que regulam a resposta imunológica. (ZHOU *et al*., 2016).

1.4. Vias de sinalização MAPK, PKC e PI3K

A via da MAP Kinase (Proteína-quinase ativadas por mitógenos) responde a mitógenos (estímulo extracelular), e regula atividades celulares como mitose, diferenciação, expressão gênica e apoptose. A sinalização pela via MAPK gera uma abundância de efeitos biológicos; Via MAPK, que é fortemente ativada pelo estresse, mas também desempenha papéis importantes na resposta imunológica, bem como na regulação da sobrevivência e diferenciação celular. A ativação da MAPK requer fosforilação. (CUADRADO & NEBREDA, 2010).

A via MAPK inclui kinase regulada por sinal extracelular (ERK) e p38. As vias MAPK são ativadas por diversos estímulos extracelulares e intracelulares, incluindo fatores de crescimento de peptídeos, citocinas, hormônios e vários estressores celulares, como o estresse oxidativo. Essas vias de sinalização regulam uma variedade de atividades celulares, incluindo proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte. (KIM & CHOI, 2010).

Os membros da superfamília da proteína quinase C (PKC) de mamíferos desempenham papéis regulatórios chave em uma infinidade de processos celulares, que vão desde o controle de atividades autônomas de células fundamentais, como a proliferação e a memória (MELLOR & PARKER, 1998).

PKC é mediador e modificador da ação metabólica da insulina. A PKC desempenha um papel importante no transporte e regulação da glicose estimulados por insulina (BOUCHER *et al*, 2014).. Muitas proteínas quinases estão envolvidas na ação da insulina, incluindo PI3K, PKC, e ERK; essa sinalização desempenha um papel importante na determinação da especificidade e da natureza da resposta a hormônios. A sinalização é atenuada pela ação de várias fosfatases, que desfosforilam os receptores,

proteínas PKCs e ERK. Além disso, as quinases com estresse, ERK, bem como PKCs, inibem a sinalização de insulina (BOUCHER *et al*, 2014).

A Figura 1 apresenta o resumo de um esquema das moléculas fosforiladas das vias de sinalização supra citadas, ativadas pela insulina e pelo *S. aureus*, que foram analisadas no presente estudo.

Figura 1 – Representação esquemática das moléculas das vias de sinalização analisadas no presente estudo.

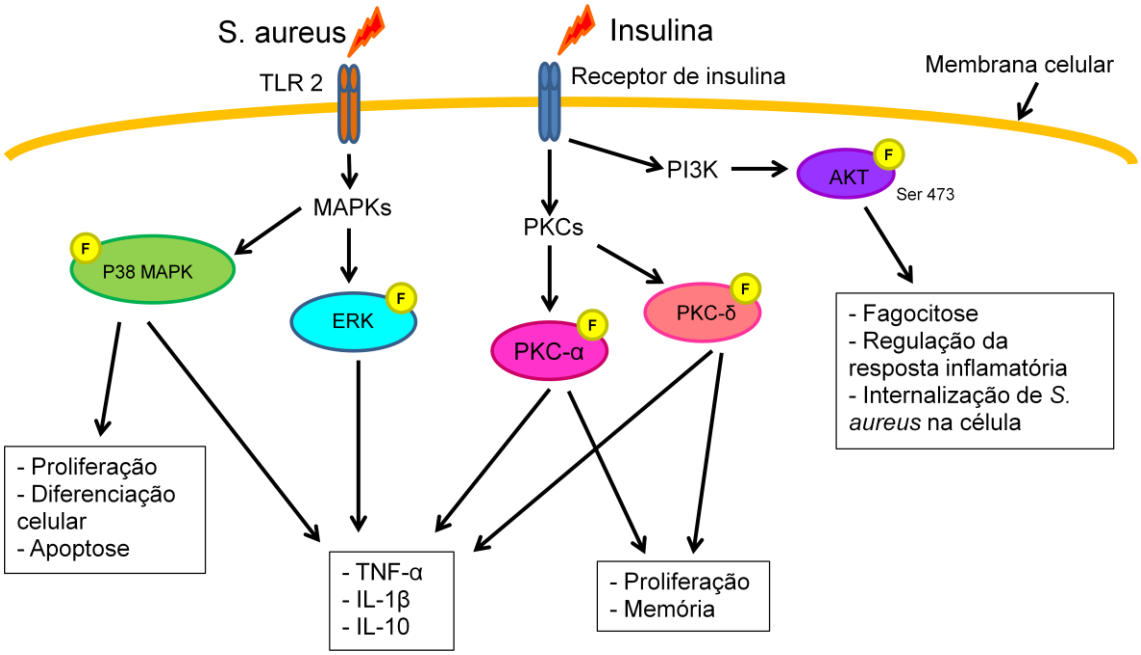


Figura 1. Representação esquemática das moléculas das vias de sinalização analisadas no presente estudo. A figura 1 representa as moléculas estudadas da via PI3K (fosfo-AKT) e da via PKC (fosfo PKC-α e fosfo PKC-δ), ativadas pelo receptor de insulina, assim como as moléculas da via MAPK (fosfo P38 e fosfo ERK), ativadas pelo *S.aureus* via TLR-2.

2. Justificativa

Segundo a WHO (2016) mais de 422 milhões de pessoas sofrem de diabetes em todo o mundo. No Brasil, a doença atinge mais de 4,5 milhões. Sendo o diabetes uma das dez doenças que mais vitimam a população mundial, ampliar o conhecimento sobre a resposta inflamatória e imunológica em indivíduos diabéticos é de fundamental relevância.

Infecções estafilocócicas invasivas são mais frequentes em pacientes diabéticos do que em pacientes não diabéticos, em parte devido à redução da função bactericida e da atividade fagocitária de neutrófilos desses pacientes.

Estudos com ratos diabéticos demonstram o mesmo panorama, uma vez que seus neutrófilos apresentam baixa expressão de *intracelular adhesion molecule* (ICAM) 1 e baixa produção de TNF-α e de IL-1β em comparação com neutrófilos de ratos não diabéticos (HANSES *et* al, 2011).

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 (MESSINA, 1999).

Em trabalho realizado em lavado peritonial desses mesmos animais utilizados nesse projeto, Souza, 2015 verificou que, em ratos diabéticos, a insulina modula a peritonite induzida pelas cepas N315 e ATCC 25923 de *S. aureus*, modificando a produção de CINC-1, CINC-2 e CINC-3, IL-1β IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α e o infiltrado infamatório. Assim, um melhor conhecimento de como a insulina atua na resposta inflamatória, nos receptores da imunidade inata e de como as diferentes vias de sinalização interferem umas com as outras no decorrer da inflamação causada por *S. aureus* permitiria contribuir não apenas para a discussão sobre o uso da insulina em pacientes com peritonite causada por *S. aureus*, mas também para aumentar a imunidade natural contra microrganismos patogênicos ou inibir os efeitos deletérios da inflamação.

3. Objetivos

A hipótese deste trabalho é de que a insulina pode modular a peritonite induzida pelas cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus*, ativando vias de sinalização e controlando a produção e liberação de citocinas em diferentes tecidos.

Com base nessa hipótese, nosso objetivo geral foi avaliar os efeitos da intervenção com insulina sobre vias de sinalização MAPK (fosfo P-38, fosfo ERK p42/44), PKC (fosfo PKC-α, fosfo PKC-δ) e PI3K (fosfo AKT) e nas concentrações de citocinas e quimiocinas (IL-4, IL-1β, TNF-α, IL-10, e CINC-1, 2 e 3) em ratos Wistar machos com peritonite induzida por duas diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 e N315) diabéticos e não diabéticos.

Para tanto enumeramos três objetivos específicos:

- Determinar se existem diferenças na expressão das vias de sinalização MAPK, PKC e PI3K no fígado e nas concentrações de citocinas e quimiocinas entre os animais não diabéticos infectados com duas cepas diferentes de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 ou N315) e os animais infectados não diabéticos infectados e tratados com insulina, em cada órgão estudado;

- Determinar se existem diferenças na expressão das vias de sinalização MAPK, PKC e PI3K no fígado e nas concentrações de citocinas e quimiocinas entre os animais diabéticos infectados com duas cepas diferentes de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 ou N315) e os animais infectados diabéticos infectados e tratados com insulina, em cada órgão estudado;

- Verificar se existem diferenças na expressão das vias de sinalização MAPK, PKC e PI3K no fígado e nas concentrações de citocinas e quimiocinas entre os animais não diabéticos infectados com duas cepas diferentes e os animais diabéticos infectados e tratados com insulina, em cada órgão estudado segundo cada cepa de *Staphylococcus aureus*.

4. Material e Métodos

Para auxiliar no entendimento do trabalho, o protocolo animal, bem como a caracterização do modelo experimental explanadas nesse capítulo são provenientes de uma tese de doutorado do nosso grupo, já defendida neste programa de pós graduação, onde se utilizou um modelo de carência relativa de insulina (DM experimental), onde foi estudada a intervenção da insulina na peritonite decorrente da infecção por *S. aureus*. Um grupo de animais diabéticos (aloxana, 42 mg/kg, i.v., 10 dias) e não-diabéticos com peritonite decorrente da infecção por *S. aureus* receberam uma dose de 4 UI e 1 UI de insulina NPH, respectivamente, por via subcutânea, 2 horas antes da infecção com *S. aureus*, e outras 3 doses de 2 UI e 0,5 UI às 17h00', respectivamente. A glicemia foi determinada no dia anterior, 10 dias após a injeção de aloxana e após os tratamentos com insulina (SOUZA, P.R.K. Papel da insulina na vigência da peritonite decorrente da infecção por *Staphylococcus aureus* em animais diabéticos e sadios. Defesa em 14/09/2015).

Nesse projeto foram utilizados os órgãos (fígado, rim, linfonodo e baço) dos animais do estudo supracitado; no momento da eutanásia dos animais para os experimentos da citada tese de doutorado, foram coletados os referidos órgãos, aliquotados e congelados em nitrogênio líquido, posteriormente mantidos refrigerados em ultrafreezer (-80ºC) até o momento do uso, para os experimentos da dissertação de mestrado em questão.

4.1. Animais

Para esse projeto não foram requisitados animais de experimentação (CEUA-FCF/USP-495 – anexo I), pois foram utilizados amostras de tecidos (fígado, rim, linfonodo peritonial e baço) de 70 (setenta) ratos Wistar machos, previamente utilizados no projeto de doutorado de nosso grupo, (SOUZA, 2015); a utilização dos animais foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética Animal (CEUA-FCF/USP-375).

Tabela 1 - Descrição dos grupos experimentais

Grupo	Descrição
C_S ***(n=5)***	TBS estéril (i.p.)
C_{ATCC} ***(n=7)***	Suspensão de ATCC 25923 (i.p.)
C_{ATCC+i} ***(n=7)***	*Suspensão de ATCC 25923 (i.p.), tratamento com insulina (s.c.)*
C_{N315} ***(n=7)***	Suspensão de N315 (i.p.)
C_{N315+i} ***(n=7)***	*Suspensão de N315 (i.p.), tratamento com insulina (s.c.)*
D_S ***(n=5)***	TSB estéril (i.p.)
D_{ATCC} ***(n=7)***	Suspensão de ATCC 25923 (i.p.)
D_{ATCC+i} ***(n=7)***	*Suspensão de ATCC 25923 (i.p.), tratamento com insulina (s.c.)*
D_{N315} ***(n=7)***	Suspensão de N315 (i.p.)
D_{N315+i} ***(n=7)***	*Suspensão de N315 (i.p.), tratamento com insulina (s.c.)*

Cepas de *Staphylococcus aureus*, *American Type Culture Collection* (ATCC) 25923 e N315.
TBS. *Tryptic-Soy Broth.*

4.2. Preparo do homogenato de órgãos.

Os órgãos selecionados para estudo foram coletados, seccionados e processados em homogeneizador de tecidos, com 1 mL de Tampão RIPA e coquetel inibidor de protease (Sigma), em ambiente gelado (tubos imersos em gelo úmido). Logo após este procedimento, foram armazenados em ultrafreezer (-80°C), para posterior uso.

4.3. Dosagem de proteínas por BCA.

Os homogenatos foram descongelados em temperatura ambiente, no momento do uso diluídos, em diluição de 1:10, para a realização da dosagem de proteínas pelo método de BCA, com o kit da PIERCE®.

4.4. Quantificação de citocinas e quimiocinas por enzima-imunoensaio (ELISA).

A determinação de quimiocinas e citocinas pró e anti-inflamatórias (IL1β, TNF-α, IL-4, IL-10, CINC-1, CINC-2 e CINC-3) foram realizadas em homogenato dos órgãos (fígado, rim, linfonodos e baço), por ensaios de enzima-imunoensaio (ELISA), utilizando-se kits comerciais (R & D Systems, Inc., Mineapolis, MN, USA).

4.5. Expressão de proteínas por técnica de *Western Blotting*

Os ensaios foram realizados por eletroforese em gel de gradiente de poliacrilamida (TGX 4% a 20% poliacrilamida) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Às amostras, foram adicionados tampão de amostras Laemmli 4x. Estas foram incubadas em banho seco por 10 min, e alíquotas de 24 µL (40 µg de proteína + 4 µL de tampão Laemmli), aplicadas no gel de poliacrilamida. Para controle da quantidade de proteína das amostras aplicadas ao gel, foram utilizados β-actina ou GAPDH Sigma.

A separação das proteínas foi feita em cuba de eletroforese (tampão de corrida Bio-Rad) a 100 mA (180V) por aproximadamente 30 minutos. O marcador de peso molecular utilizado foi o Precision Plus Duo Color, Bio-Rad.

As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de PVDF (membrana de transferência mini PVDF turbo) (Bio-Rad Laboratories, Hercules,

CA, USA), em cuba de transferência turbo Bio-Rad, por 7 minutos. Em seguida, a membrana foi colocada em solução de leite desnatado (5%) em tampão Tris-salina com 1% de Tween 20 (TBS-T) durante 1 hora, para bloquear as ligações inespecíficas, incubadas com anticorpo primário *overnight*, sob agitação em geladeira, e com anticorpo secundário durante 4 horas, sob agitação, em temperatura ambiente. A cada etapa de incubação a membrana foi lavada com TBS-T durante 5 minutos por 3 vezes consecutivas.

A revelação foi realizada utilizando *enhanced chemiluminescence* (ECL; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). As densidades relativas das bandas foram determinadas por meio de análise densitométrica utilizando o software NIH Image.

4.6. Análise estatística

Aos resultados foi aplicado teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov; os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de múltiplas comparações de Turkey-Kramer, para análises paramétricas, ou teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, para análises não paramétricas, considerando significativo $p < 0,05$.

5. Resultados

Neste projeto foi realizada a dosagem das seguintes citocinas: IL-1 β, IL-10, TNF-α e IL-4 e quimiocinas CINC-1, CINC-2 e CINC-3 pelo método de ELISA, para os tecidos coletados (rim, fígado, linfonodo e baço) em projeto anterior (SOUZA, 2015), onde se verificou que os animais apresentavam peso e glicemia normais para a idade e que, após a indução do diabetes, os grupos de animais diabéticos apresentaram aumento na glicemia e diminuição de ganho de massa corporal, e o tratamento com insulina mostrou diminuição da glicemia, mas não chegam à normoglicemia.

Os resultados obtidos nas análises de concentração de citocinas pelo método ELISA nos fígados dos animais estudados foram os seguintes:

Conforme mostrado na Figura 2, houve diferença significativa na produção de IL-1β apenas infecção com a cepa N315 de *S. aureus*, em ratos diabéticos (Fig. 2.d), onde a infecção diminuiu muito a produção dessa citocina, e o tratamento com insulina não alterou essa produção.

Figura 2 – Concentrações da citocina IL-1β no **fígado** em ratos não diabéticos e diabéticos.

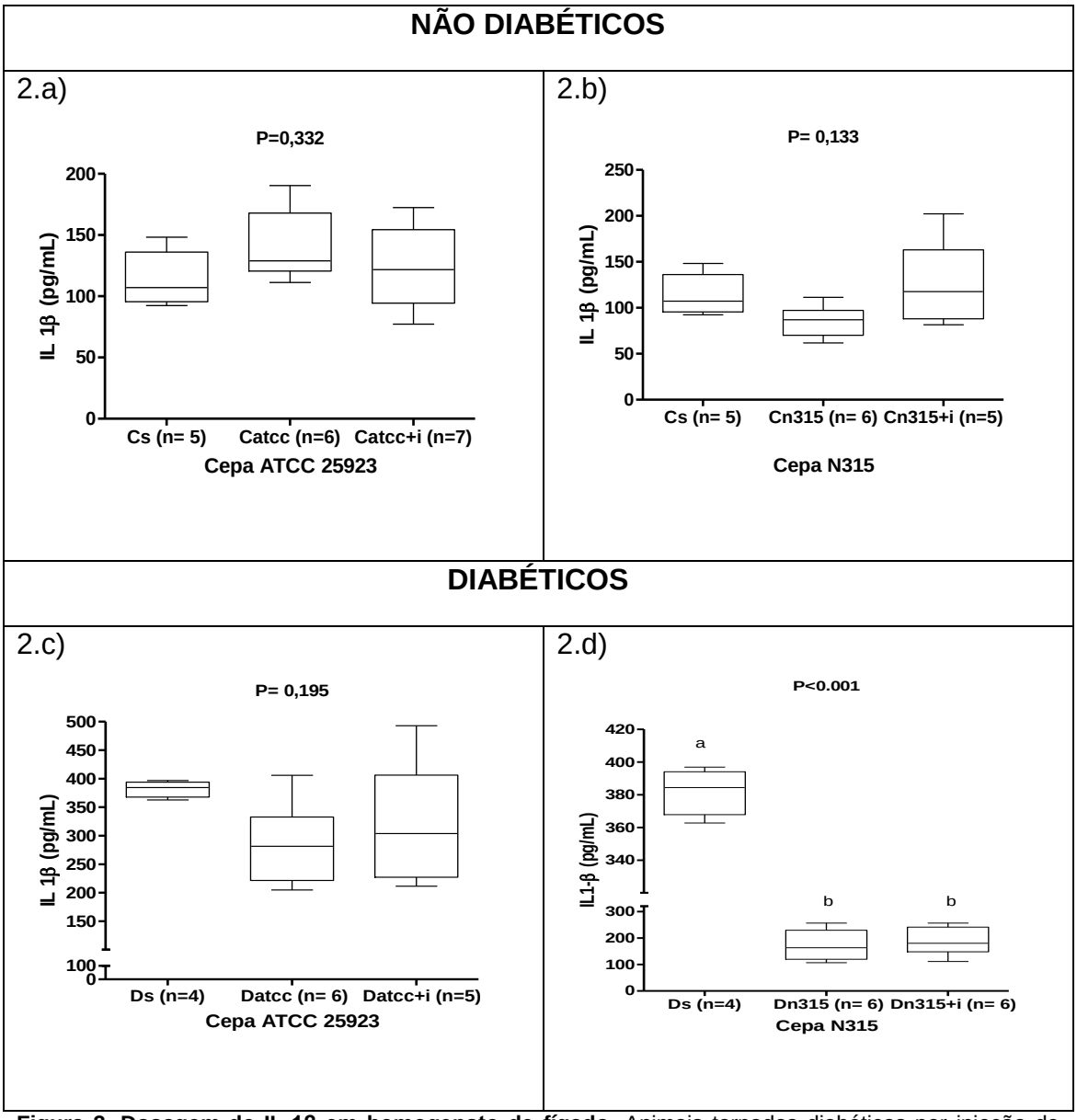


Figura 2. Dosagem de IL-1β em homogenato de fígado. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. **Cs:** não diabético e não infectado; **Catcc:** não diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Catcc+i:** não diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Cn315:** não diabético e infectado com cepa N315; **Cn315+i:** não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina; **Ds:** diabético e não infectado; **Datcc:** diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Datcc+i:** diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Dn315:** diabético e infectado com cepa N315; **Dn315+i:** diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina. Realizado teste Turkey's para todas as análises (paramétrica).

Pode-se observar também, na Figura 3, que a TNF-α mostrou diferença na comparação Cs vs CN315 (Fig. 3.b), onde a infecção diminuiu a produção dessa citocina, e o tratamento com insulina aumentou parcialmente essa produção, pois não há diferença na entre o grupo infectado e não tratado e o tratado (Cn315 vs Cn315+i), e também não há mais diferença entre o grupo não infectado e o infectado e tratado (Cs vs Catcc+i).

Figura 3 – Concentrações da citocina TNF-α no **fígado** em ratos não diabéticos e diabéticos.

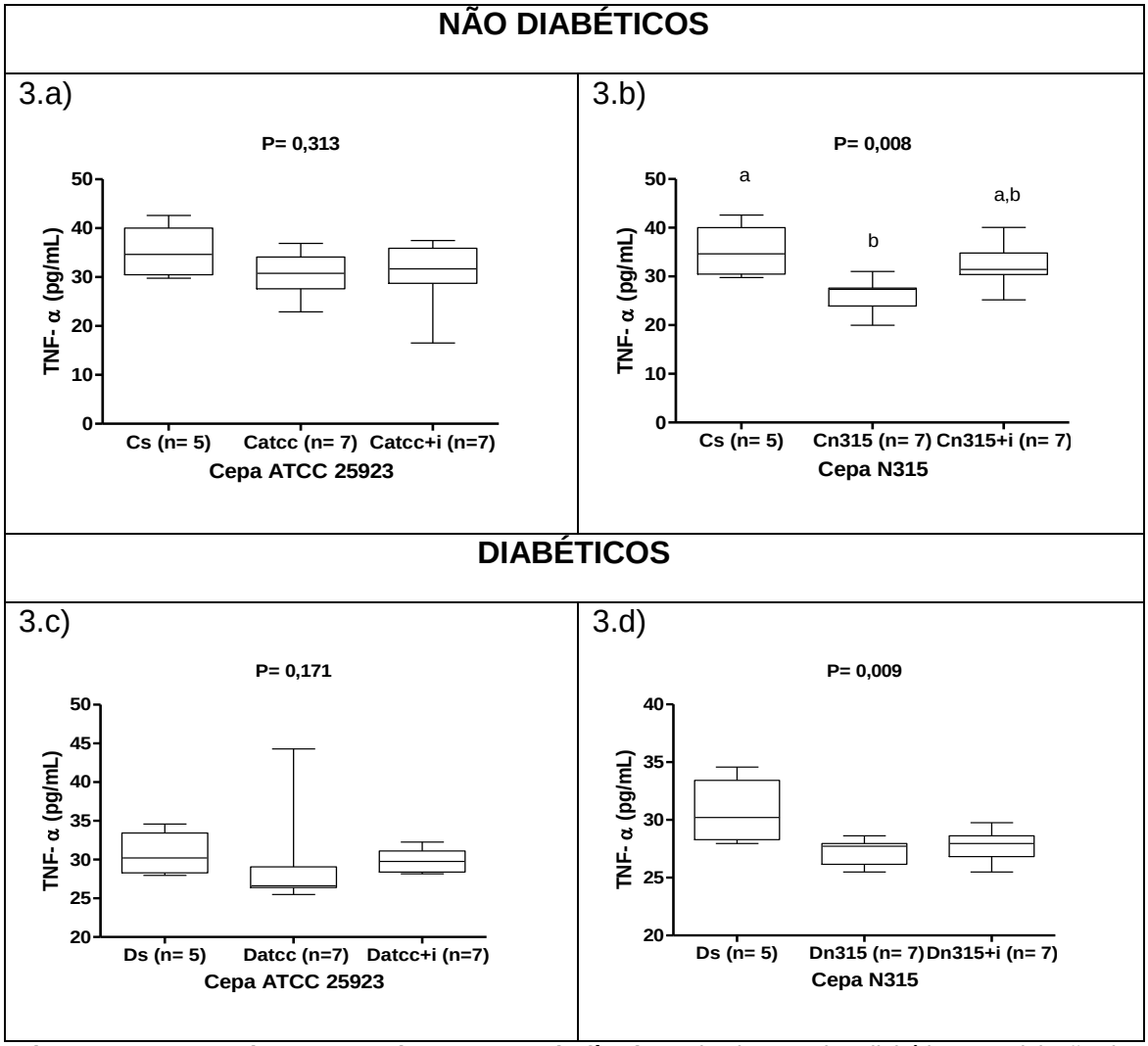


Figura 3. Dosagem de TNF-α em homogenato de fígado. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. **Cs:** não diabético e não infectado; **Catcc:** não diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Catcc+i:** não diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Cn315:** não diabético e infectado com cepa N315; **Cn315+i:** não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina; **Ds:** diabético e não infectado; **Datcc:** diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Datcc+i:** diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Dn315:** diabético e infectado com cepa N315; **Dn315+i:** diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina. Realizado teste Turkey's para todas as análises (paramétrica).

A Figura 4 mostra que a produção de IL-4 apresentou-se diminuída na comparação Cs vs Catcc (Fig. 4.a), e o tratamento aumentou parcialmente essa produção; observa-se também, em ratos diabéticos infectados pela cepa N315 (Fig. 4.d), que a infecção não alterou a produção dessa citocina, mas o tratamento diminuiu (Dn315 vs Dn315+i), o que mostra que a insulina pode suprimir resposta imunológica Th2.

Figura 4 – Concentrações da citocina IL-4 no **fígado** em ratos não diabéticos e diabéticos.

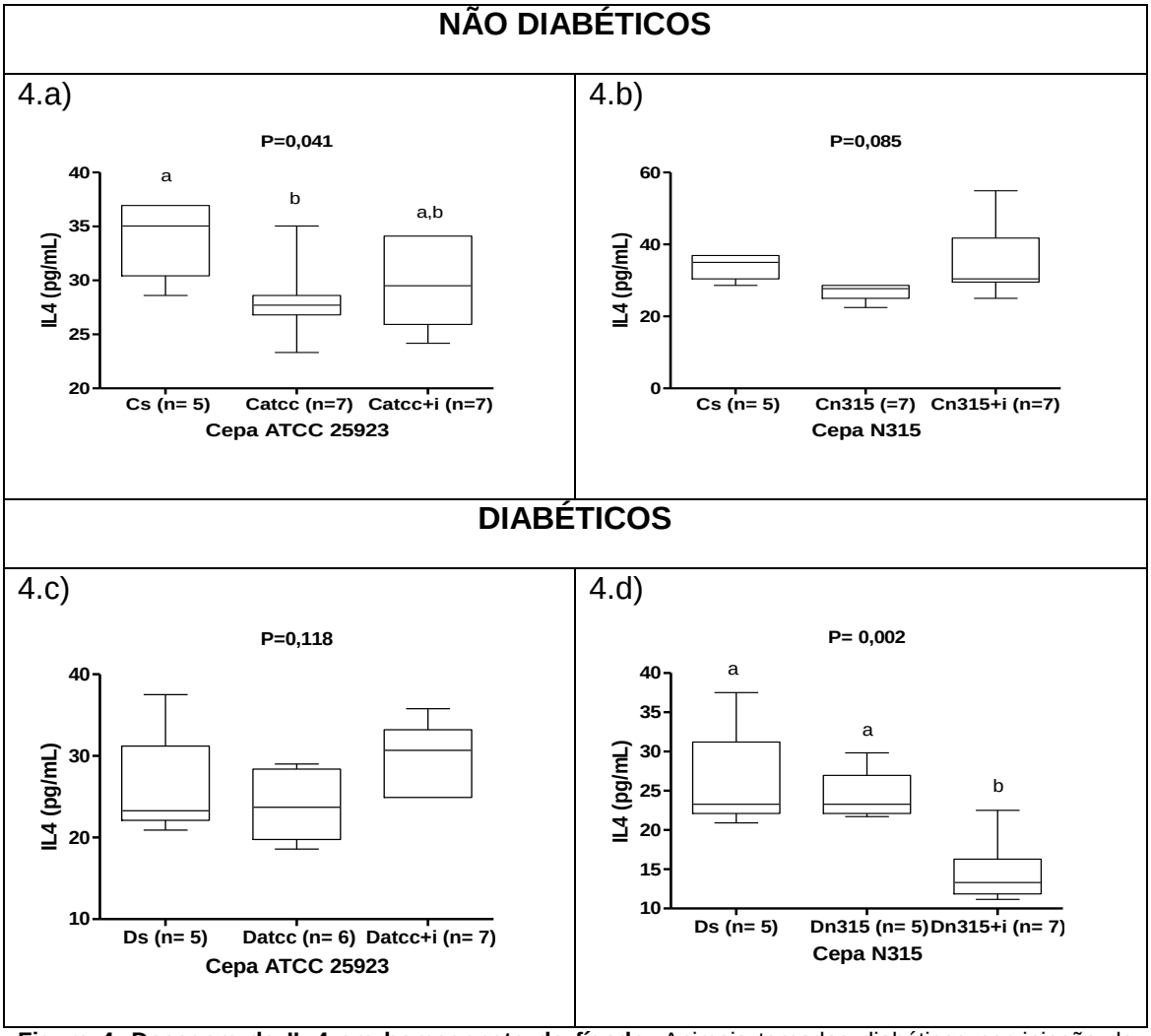


Figura 4. Dosagem de IL-4 em homogenato de fígado. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. **Cs:** não diabético e não infectado; **Catcc:** não diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Catcc+i:** não diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Cn315:** não diabético e infectado com cepa N315; **Cn315+i:** não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina; **Ds:** diabético e não infectado; **Datcc:** diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Datcc+i:** diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Dn315:** diabético e infectado com cepa N315; **Dn315+i:** diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina. Realizado teste Turkey's para todas as análises (paramétrica).

Na dosagem da concentração de IL-10 apresentada na Figura 5, observa-se que na vigência da infecção com a cepa ATCC 25923, em animais não diabéticos (Fig. 5.a), a infecção diminuiu essa produção (Cs vs Catcc), e a insulina não a aumentou, já em animais diabéticos (Fig. 5.c), o tratamento com insulina aumentou a produção de IL-10, que estava diminuída na infecção (Datcc vs Datcc+i). Na vigência da infecção pela cepa N315, tanto em animais não diabéticos (Fig. 5.b), quanto em animais diabéticos (Fig. 5.d), observa-se que a infecção diminuiu a produção de IL-10, e a insulina aumentou no grupo Dn315+i.

Figura 5 – Concentrações da citocina IL-10 no **fígado** em ratos não diabéticos e diabéticos

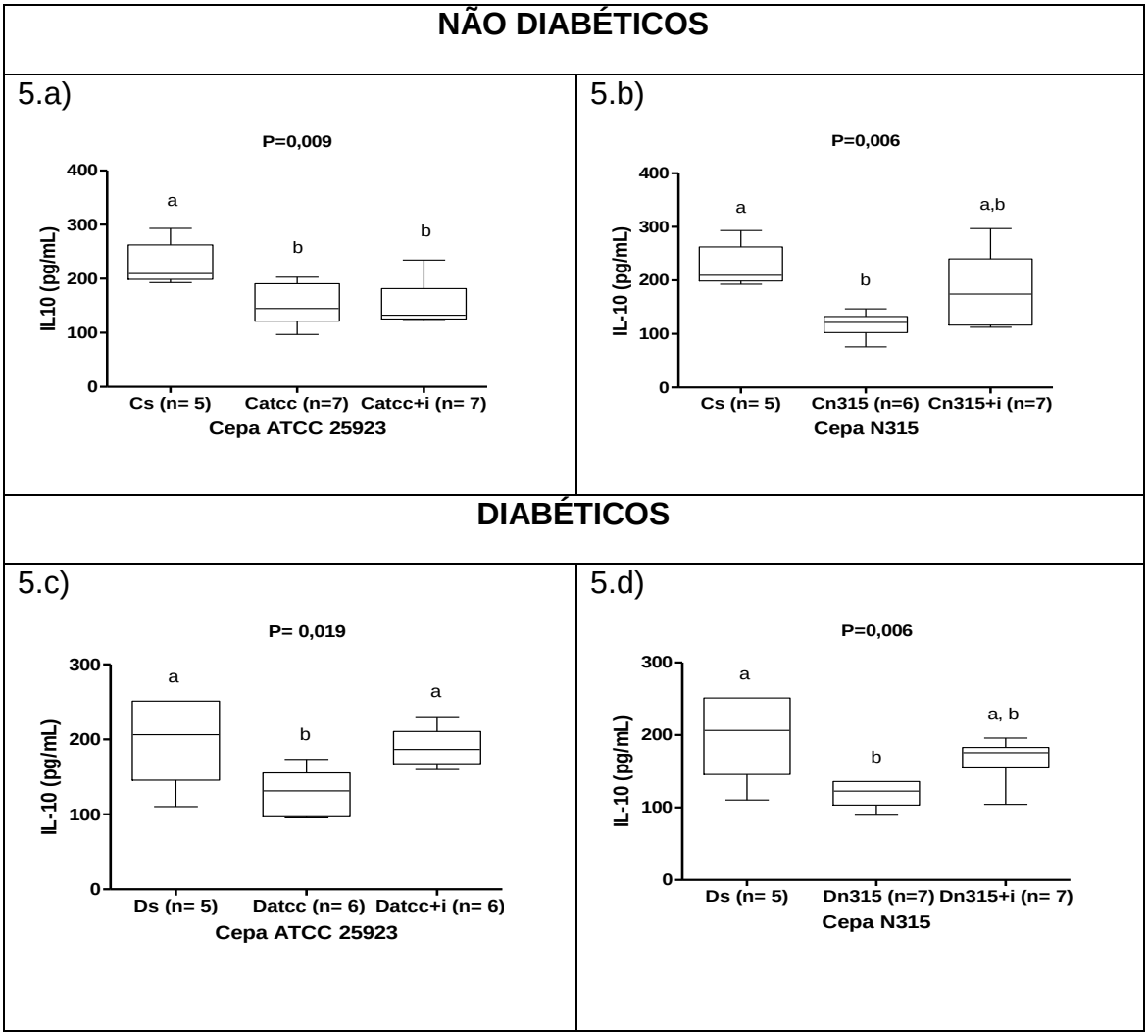


Figura 5. Dosagem de IL-4 em homogenato de fígado. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. **Cs:** não diabético e não infectado; **Catcc:** não diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Catcc+i:** não diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Cn315:** não diabético e infectado com cepa N315; **Cn315+i:** não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina; **Ds:** diabético e não infectado; **Datcc:** diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Datcc+i:** diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Dn315:** diabético e infectado com cepa N315; **Dn315+i:** diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina. Realizado teste Turkey's para todas as análises (paramétrica).

A Figura 6 representa um resumo dos resultados obtidos no fígado dos ratos não diabéticos, na vigência da infecção por ambas as cepas de *S. aureus*, onde é possível observar que na infecção pela cepa ATCC 25923 de *S. aureus*, a produção de IL-4 foi diminuída, e o tratamento com insulina aumentou essa produção, e que a produção de IL-10, que estava diminuída na vigência da infecção permaneceu diminuída mesmo após o tratamento; já na infecção pela cepa N315, a IL-10 também mostrou-se diminuída na infecção, mas o tratamento a aumentou, coisa que não aconteceu na vigência da infecção pela cepa ATCC, e a TNF-α, que estava diminuída na infecção pela cepa N315 também foi parcialmente aumentada.

Figura 6 – Resumo dos resultados encontrados da produção de citocinas em **fígado** de ratos não diabéticos.

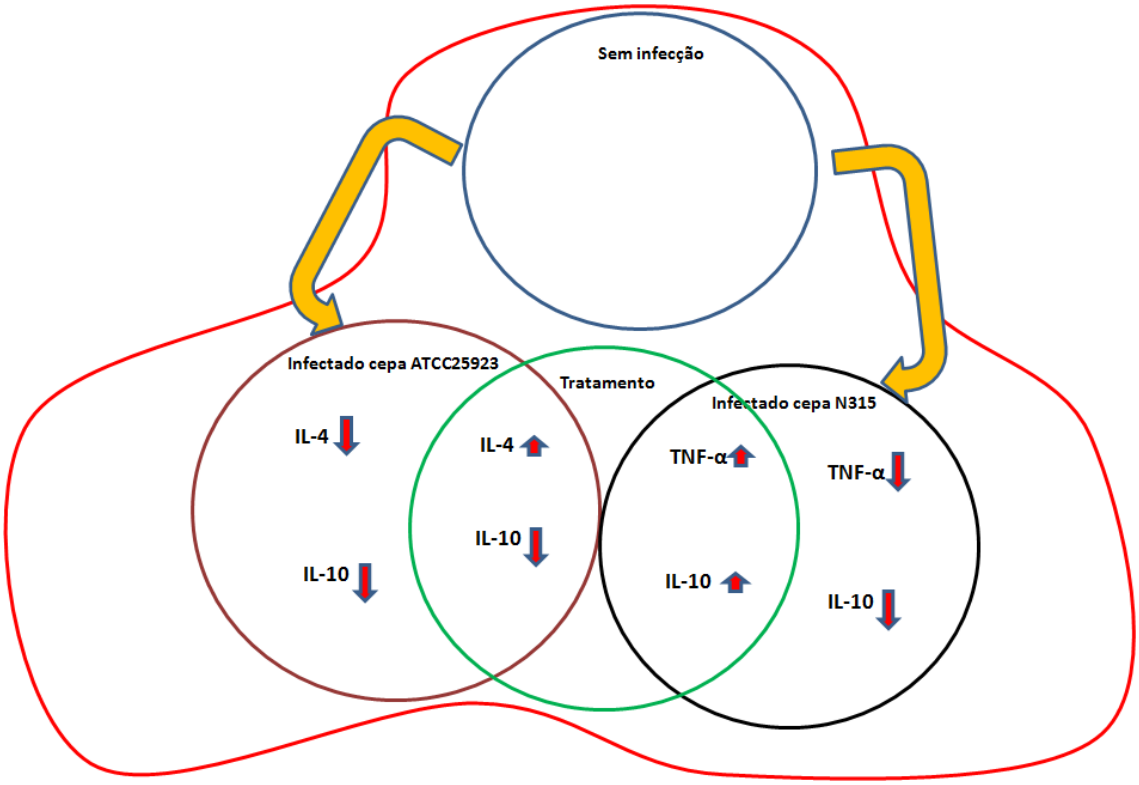


Figura 6. Representação dos resultados obtidos em fígado de ratos não diabéticos, durante a vigência da infecção pela cepa ATCC 25923 e da cepa N315 de *S. aureus*. **Círculo azul**: Cs; **Círculo marrom**: Catcc; **Círculo preto**: CN315; **Círculo verde**: Tratamento com insulina (Catcc+i e Cn315+i).

Temos na Figura 7 o resumo dos resultados obtidos no fígado dos ratos diabéticos, na vigência da infecção por ambas as cepas de *S. aureus*, e é possível verificar que na infecção pela cepa ATCC 25923, apenas a produção de IL-10 estava diminuída, e o tratamento com insulina aumentou essa produção; já na infecção pela cepa N315, a IL-10 também apresentou-se diminuída durante a infecção, e foi aumentada pelo tratamento com insulina; a produção de IL-1β também mostrou-se diminuída na infecção, e o tratamento a aumentou; já a produção da IL-4 não apresentou-se alterada durante a infecção pela cepa N315, porém o tratamento com insulina diminuiu a produção dessa citocina.

Figura 7 – Resumo dos resultados encontrados da produção de citocinas em **fígado** de ratos diabéticos.

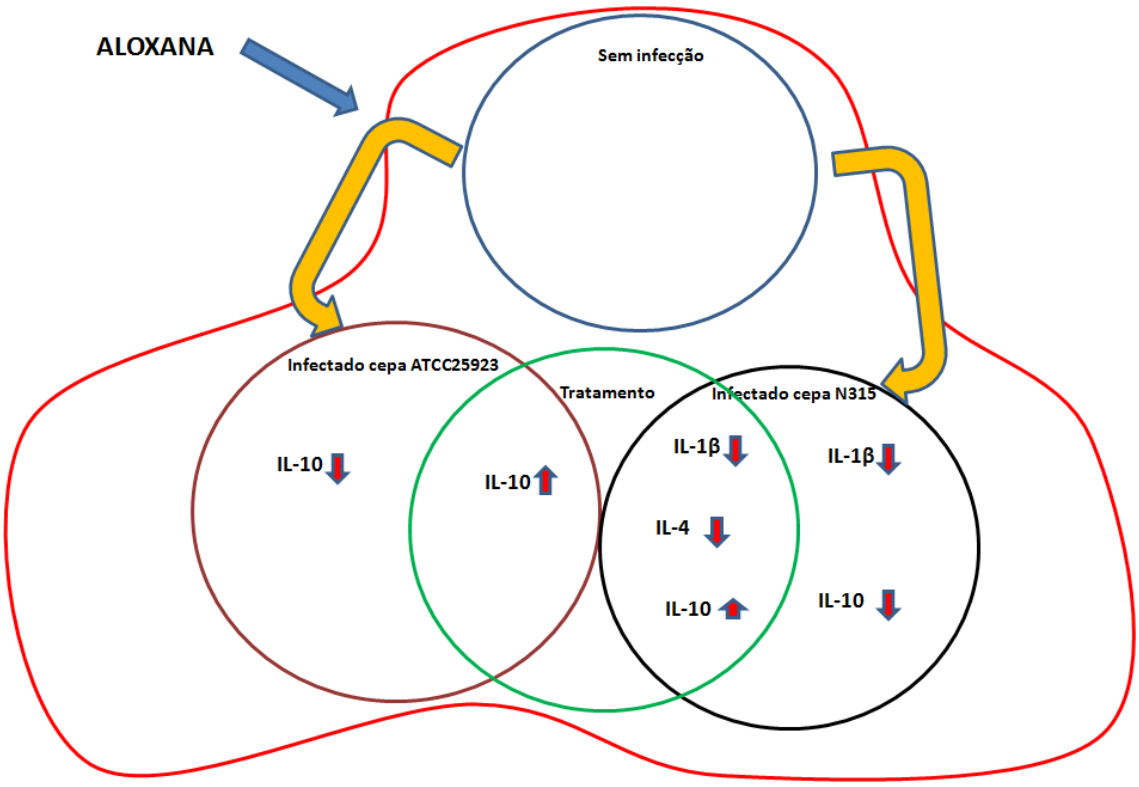


Figura 7. Representação dos resultados obtidos em fígado de ratos diabéticos, durante a vigência da infecção pela cepa ATCC 25923 e da cepa N315 de *S. aureus*. **Círculo azul**: Ds; **Círculo marrom**: Datcc; **Círculo preto**: DN315; **Círculo verde**: Tratamento com insulina (Datcc+i e Dn315+i).

Os resultados obtidos nas análises de concentração de citocinas pelo método ELISA nos linfonodos peritoniais dos animais estudados foram os mostrados nas figuras a seguir.

Na Figura 8, a produção de IL-1β em animais diabéticos (Fig. 8.c) não foi alterada pela infecção pela cepa ATCC 25923, mas o tratamento com insulina aumentou a produção dessa citocina. Já na vigência da infecção pela cepa N315 em animais não diabéticos (Fig. 8.b), a produção de IL-1β não mostrou-se alterada durante a infecção, mas foi diminuída com o tratamento, e nos animais diabéticos (Fig. 8.d), a infecção aumentou a produção dessa citocina, e o tratamento com insulina diminuiu essa produção para os níveis encontrados no grupo basal (CS).

Figura 8 – Concentrações da citocina IL-1β nos **linfonodos peritoniais** em ratos não diabéticos e diabéticos.

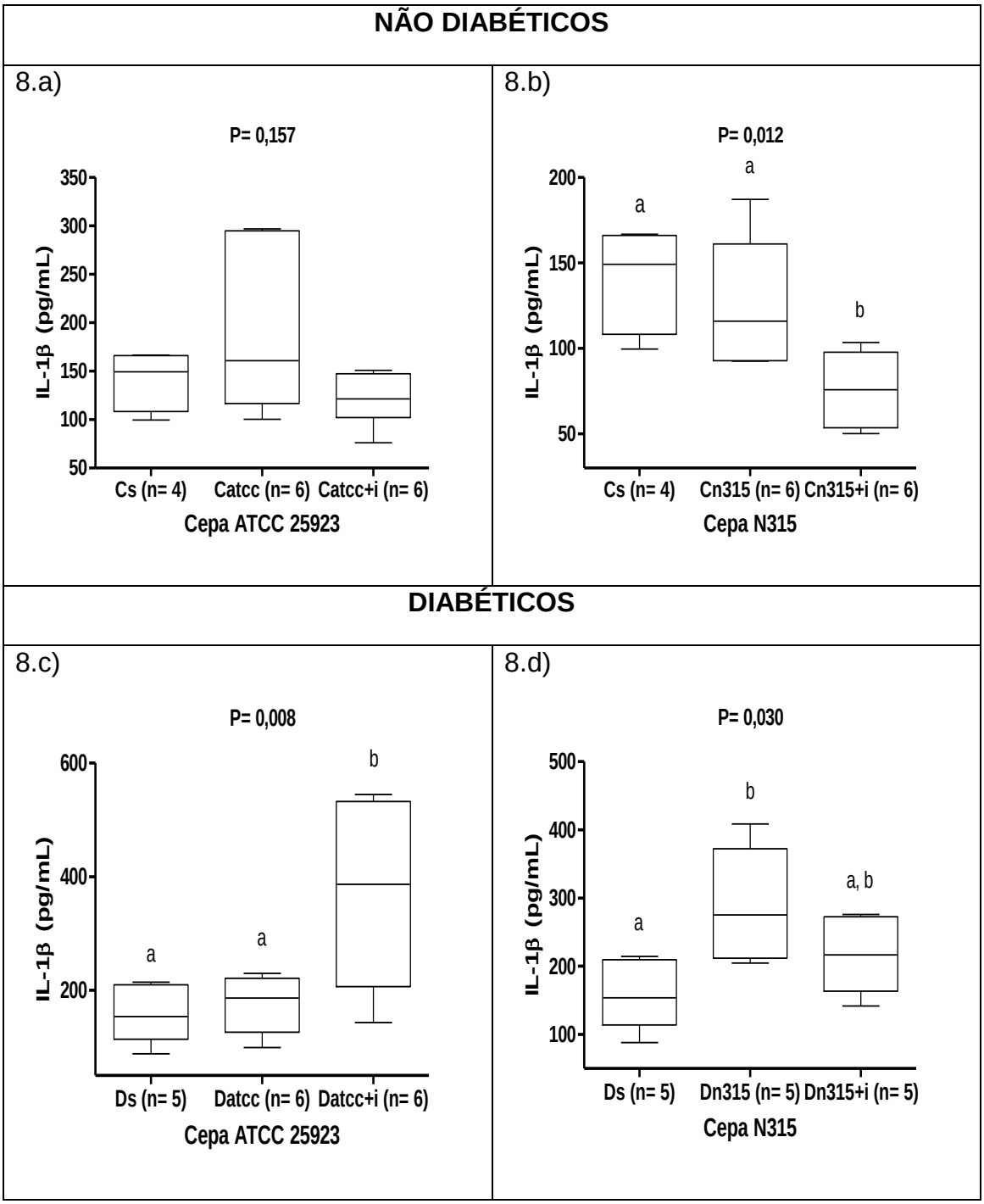


Figura 8. Dosagem de IL-1β em homogenato de linfonodo peritonial. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. **Cs:** não diabético e não infectado; **Catcc:** não diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Catcc+i:** não diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Cn315:** não diabético e infectado com cepa N315; **Cn315+i:** não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina; **Ds:** diabético e não infectado; **Datcc:** diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Datcc+i:** diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Dn315:** diabético e infectado com cepa N315; **Dn315+i:** diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina. Realizado teste Turkey's para todas as análises (paramétrica).

As dosagens de TNF-α nos linfonodos peritoniais não mostraram diferenças entre os grupos diabéticos e nem entre os não diabéticos, independente da cepa utilizada na infecção, como mostra a Figura 9.

Figura 9 – Concentrações da citocina TNF-α nos **linfonodos peritoniais** em ratos não diabéticos e diabéticos.

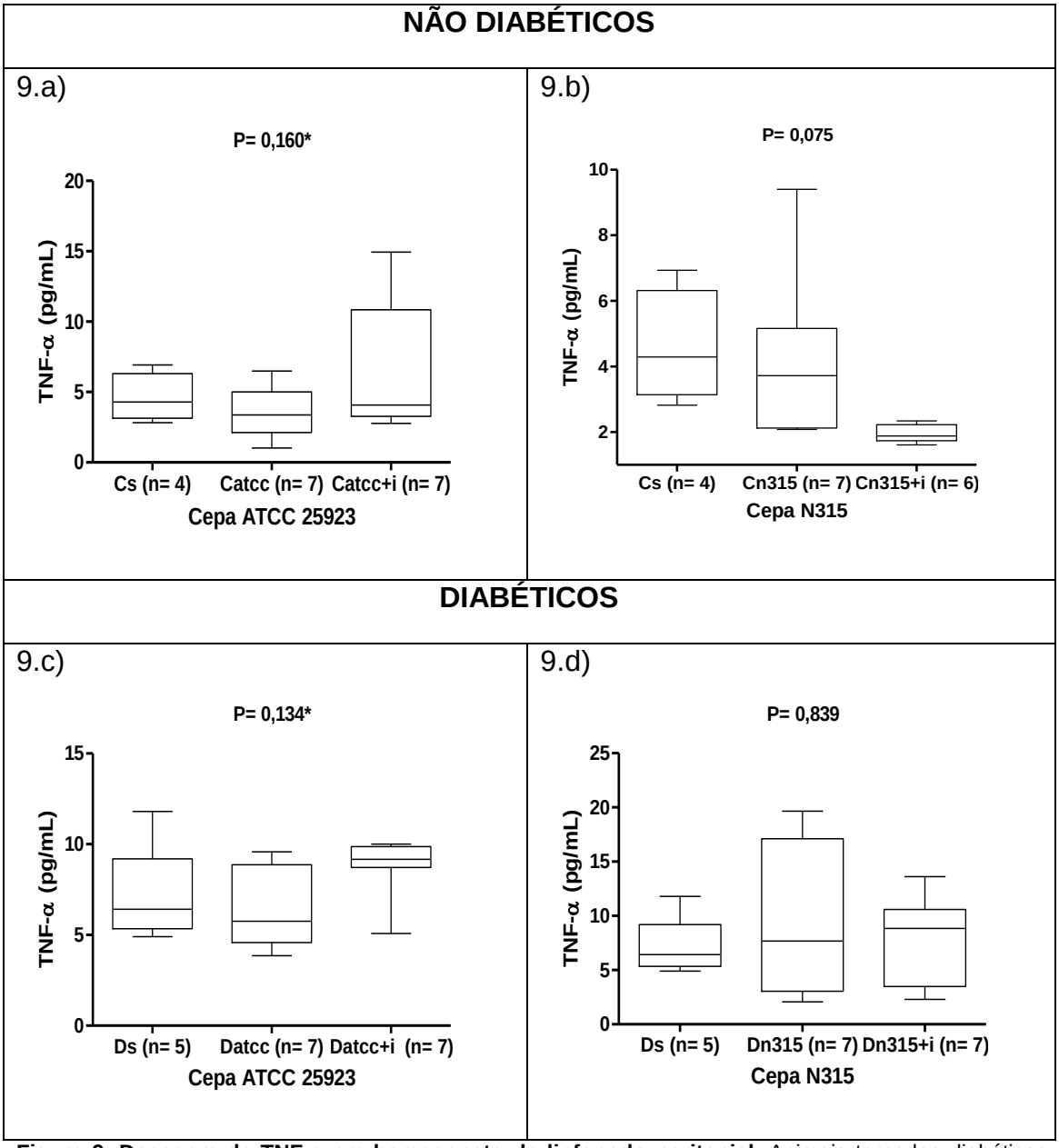


Figura 9. Dosagem de TNF-α em homogenato de linfonodo peritonial. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. **Cs:** não diabético e não infectado; **Catcc:** não diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Catcc+i:** não diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Cn315:** não diabético e infectado com cepa N315; **Cn315+i:** não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina; **Ds:** diabético e não infectado; **Datcc:** diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Datcc+i:** diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Dn315:** diabético e infectado com cepa N315; **Dn315+i:** diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina. Realizado teste Turkey's para todas as análises (paramétrica), exceto para os marcados com *, onde foi realizado teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico).

Na infecção pela cepa ATCC, em animais diabéticos (Fig. 10.c), a IL-4 mostrou-se diminuída na comparação Ds vs Datcc, e a insulina aumentou essa produção. Já na infecção pela cepa N315, em animais não diabéticos (Fig. 10.b), o tratamento com insulina diminuiu a produção de IL-4 na comparação CN315 vs CN315+i, que apresentou-se levemente aumentada na comparação Cs vs CN315; nos animais diabéticos, a produção dessa citocina apresentou-se diminuída na infecção, e o tratamento diminuiu essa produção ainda mais.

Figura 10 – Concentrações da citocina IL-4 nos **linfonodos peritoniais** em ratos não diabéticos e diabéticos.

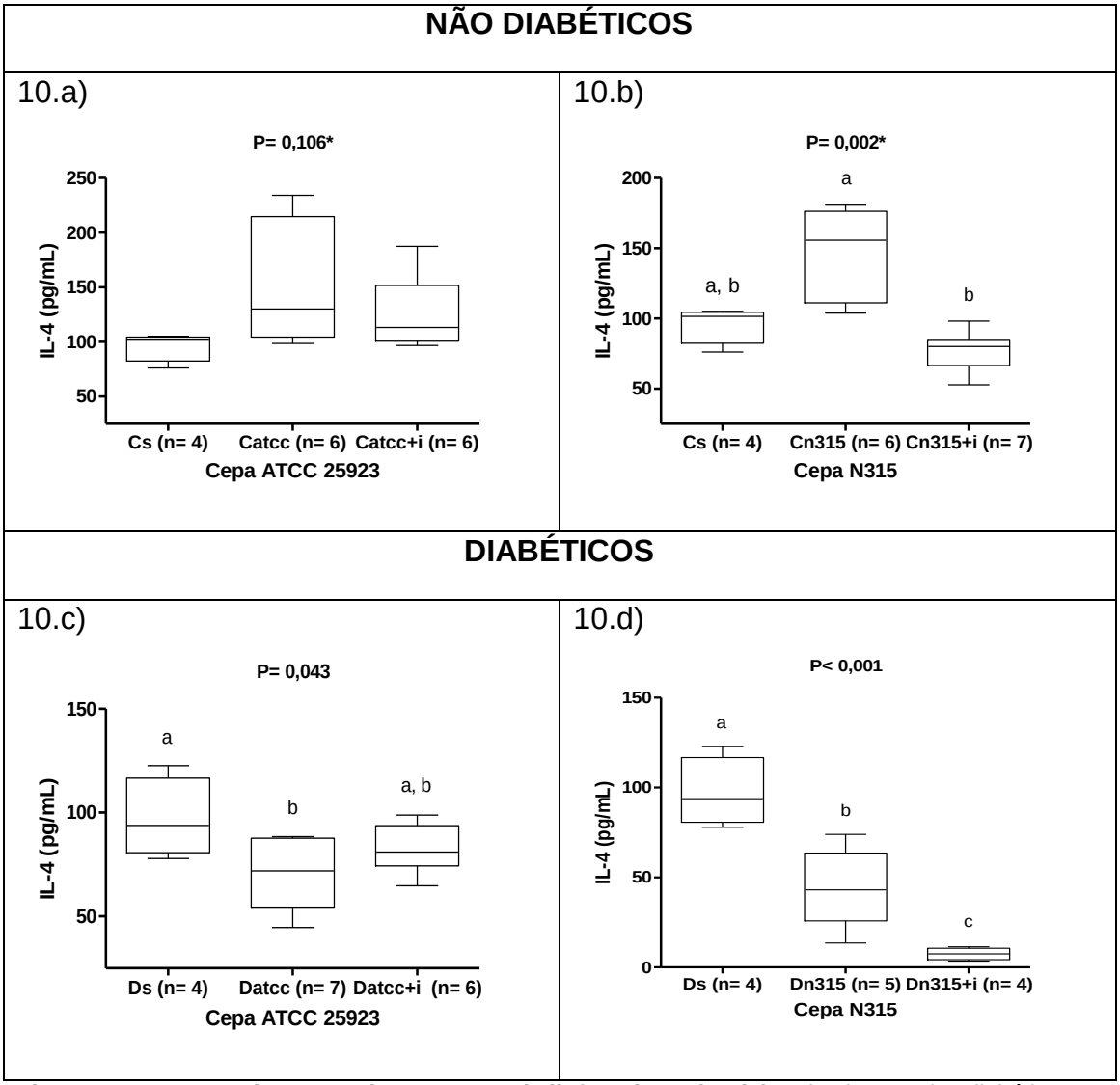


Figura 10. Dosagem de IL-4 em homogenato de linfonodo peritonial. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. **Cs:** não diabético e não infectado; **Catcc:** não diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Catcc+i:** não diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Cn315:** não diabético e infectado com cepa N315; **Cn315+i:** não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina; **Ds:** diabético e não infectado; **Datcc:** diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Datcc+i:** diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Dn315:** diabético e infectado com cepa N315; **Dn315+i:** diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina. Realizado teste Turkey's para todas as análises (paramétrica), exceto para os marcados com *, onde foi realizado teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico).

A Figura 11 mostra a produção de IL-10 nos linfonodos peritoniais, e na infecção com a cepa ATCC, não houve alteração na produção dessa citocina em nenhum dos grupos estudados; já na infecção pela cepa N315, os animais não diabéticos (Fig. 11.b) não apresentaram diferença significativa na produção de IL-10 durante a infecção, mas o tratamento diminuiu essa produção, e nos animais diabéticos (Fig. 11.d) a infecção diminuiu a produção de IL-10, e o tratamento com insulina a aumentou.

Figura 11 – Concentrações da citocina IL-10 nos **linfonodos peritoniais** em ratos não diabéticos e diabéticos.

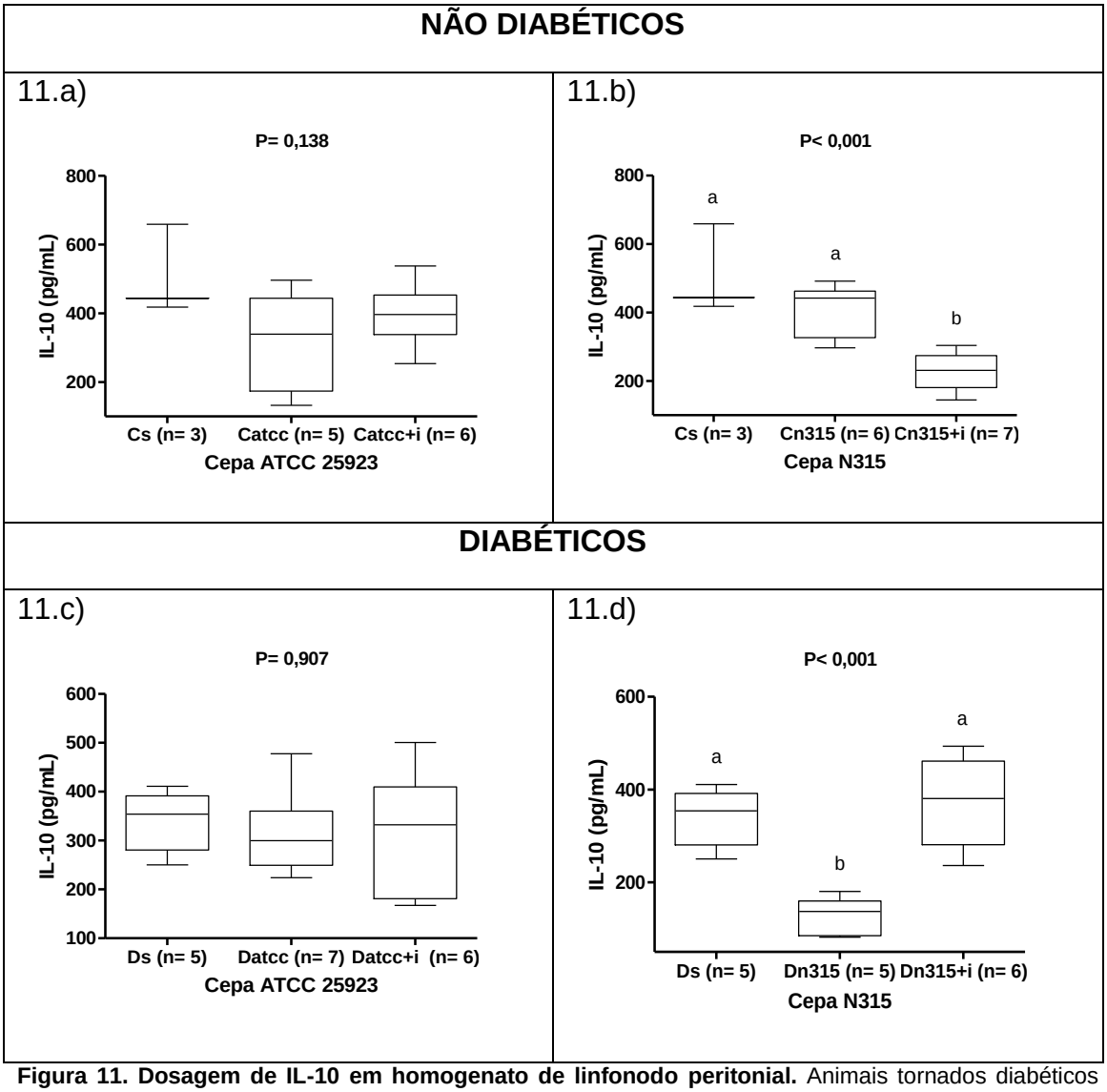


Figura 11. Dosagem de IL-10 em homogenato de linfonodo peritonial. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. **Cs:** não diabético e não infectado; **Catcc:** não diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Catcc+i:** não diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Cn315:** não diabético e infectado com cepa N315; **Cn315+i:** não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina; **Ds:** diabético e não infectado; **Datcc:** diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Datcc+i:** diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Dn315:** diabético e infectado com cepa N315; **Dn315+i:** diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina. Realizado teste Turkey's para todas as análises (paramétrica).

As dosagens de CINC-1 nos linfonodos mostrou-se alterada apenas nos grupos de animais diabéticos onde, na vigência da infecção pela cepa ATCC, o tratamento com insulina aumentou essa produção na comparação Catcc vs Catcc+i, que não estava alterada na infecção; durante a infecção com a cepa N315, a infecção aumentou a produção da CINC-1, e o tratamento a diminuiu.

Figura 12 – Concentrações da quimiocina CINC-1 nos **linfonodos peritoniais** em ratos não diabéticos e diabéticos.

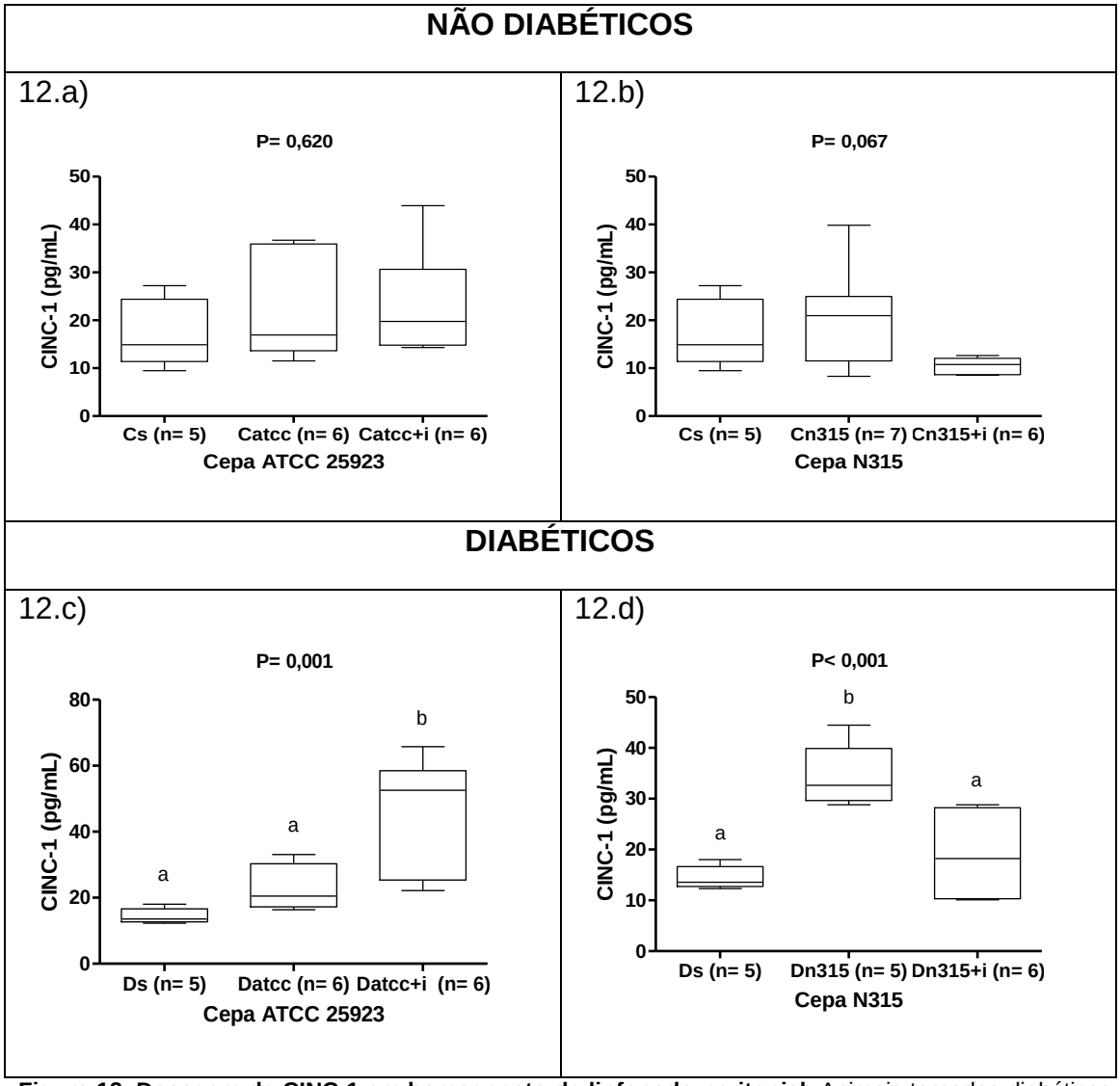


Figura 12. Dosagem de CINC-1 em homogenato de linfonodo peritonial. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. **Cs:** não diabético e não infectado; **Catcc:** não diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Catcc+i:** não diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Cn315:** não diabético e infectado com cepa N315; **Cn315+i:** não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina; **Ds:** diabético e não infectado; **Datcc:** diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Datcc+i:** diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Dn315:** diabético e infectado com cepa N315; **Dn315+i:** diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina. Realizado teste Turkey's para todas as análises (paramétrica).

As dosagens de CINC-2 nos animais não diabéticos não mostrou alteração, para ambas as cepas, como mostra a Figura 13.

Figura 13 – Concentrações da quimiocina CINC-2 nos **linfonodos peritoniais** em ratos não diabéticos.

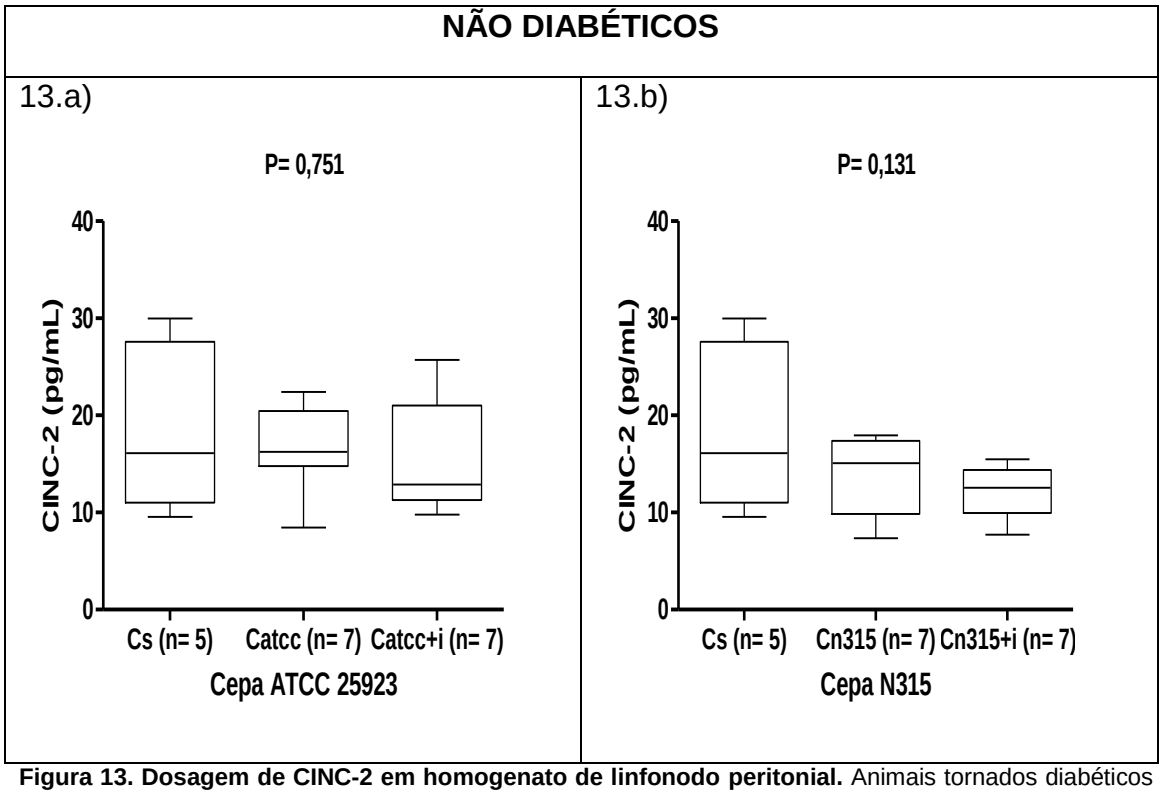


Figura 13. Dosagem de CINC-2 em homogenato de linfonodo peritonial. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. **Cs:** não diabético e não infectado; **Catcc:** não diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Catcc+i:** não diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Cn315:** não diabético e infectado com cepa N315; **Cn315+i:** não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina. Realizado teste Turkey's para todas as análises (paramétrica). Animais diabéticos não apresentaram dosagens suficientes para confecção de gráfico e análise estatística.

Já os animais diabéticos, a maioria dos animais de todos os grupos, tiveram dosagem indetectável para a quimiocina CINC-2, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Concentrações da quimiocina CINC-2 nos **linfonodos peritoniais** em ratos diabéticos.

Grupos	**CINC-2 (pg/mL)**
Ds (n= 1)	251,7
Datcc (n= 0)	Inferior ao limite de detecção
Datcc+i (n=1)	68,3
Dn315 (n= 1)	219,0
Dn315+I (n= 1)	15,9

Tabela 2. Dosagem de CINC-2 em homogenato de linfonodo peritonial. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a média ± desvio padrão da média (se n>1). Os demais indivíduos dos grupos não apresentaram dosagem detectável. Ds: diabético e não infectado; Datcc: diabético e infectado com cepa ATCC 25923; Datcc+i: diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; Dn315: diabético e infectado com cepa N315; Dn315+i: diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina.

A produção da quimiocina CINC-3 mostrou-se alterada apenas em animais diabéticos, na vigência da infecção com a cepa ATCC (Fig. 14.c), onde o tratamento aumentou a produção da CINC-3, em comparação com a produção dessa quimiocina antes da infecção (Ds vs Datcc+i).

Figura 14 – Concentrações da quimiocina CINC-3 nos **linfonodos peritoniais** em ratos não diabéticos e diabéticos.

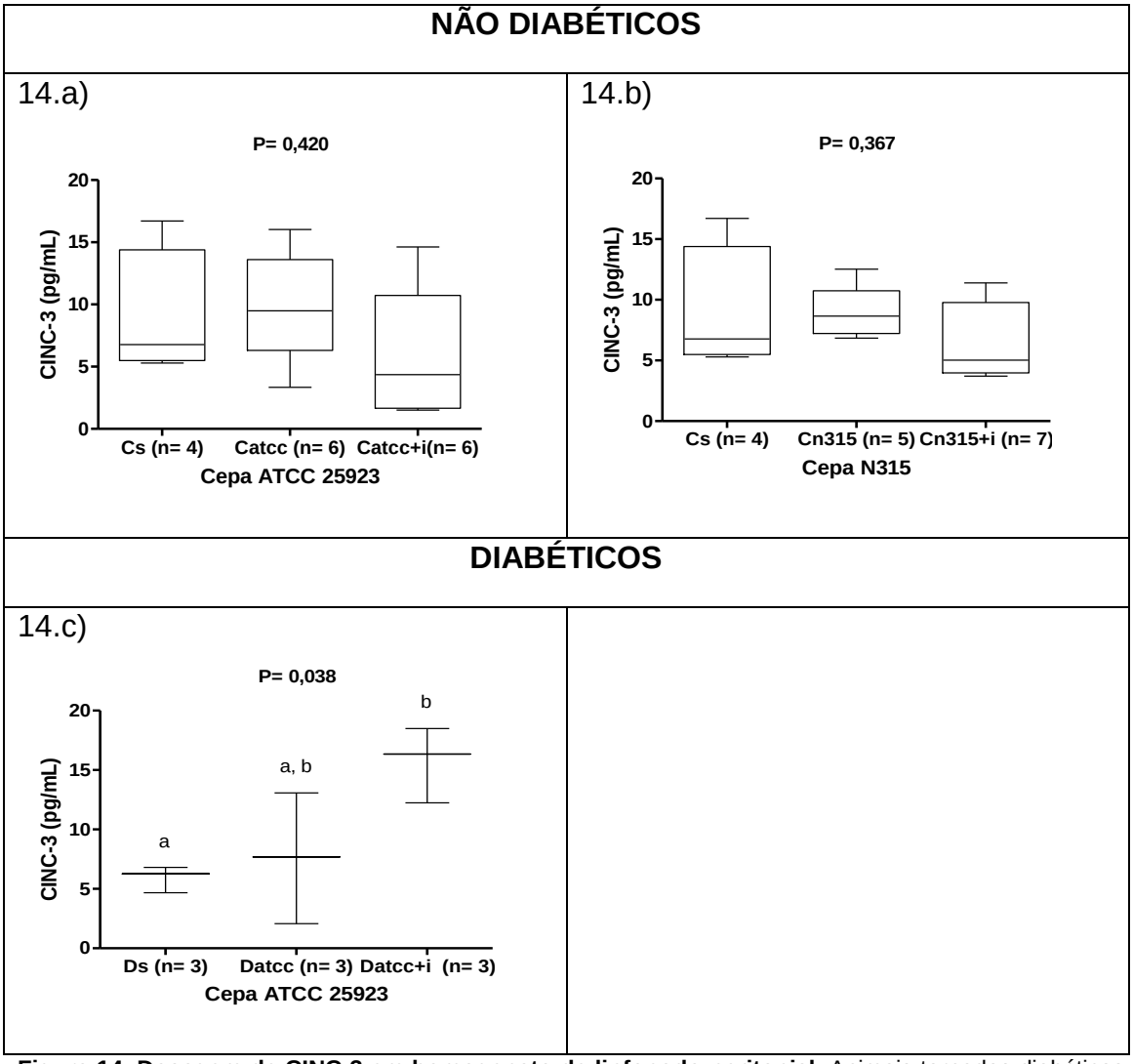


Figura 14. Dosagem de CINC-3 em homogenato de linfonodo peritonial. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. **Cs:** não diabético e não infectado; **Catcc:** não diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Catcc+i:** não diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Cn315:** não diabético e infectado com cepa N315; **Cn315+i:** não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina; **Ds:** diabético e não infectado; **Datcc:** diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Datcc+i:** diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina. Realizado teste Turkey's para todas as análises (paramétrica). Animais diabéticos infectados pela cepa N315 não apresentaram dosagens suficientes para confecção de gráfico e análise estatística. Animais diabéticos infectados com a cepa N315 não apresentaram dosagens suficientes para confecção de gráfico e análise estatística.

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos nas dosagens de CINC-3 nos grupos diabéticos, infectados pela cepa N315, onde a maior parte dos indivíduos dos grupos apresentou dosagem indetectável para essa quimiocina.

Tabela 3 – Concentrações da quimiocina CINC-3 nos **linfonodos peritoniais** em ratos diabéticos.

Grupos	**CINC-2 (pg/mL)**
Ds (n= 3)	5,9 (±1,11)
Dn315 (n= 2)	13,4 (±0,23)
Dn315+I (n= 2)	10,3 (±7,90)

Tabela 3. Dosagem de CINC-3 em homogenato de linfonodo peritonial. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a média ± desvio padrão da média (se n>1). Os demais indivíduos dos grupos não apresentaram dosagem detectável. Ds: diabético e não infectado; Datcc: diabético e infectado com cepa ATCC 25923; Datcc+i: diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; Dn315: diabético e infectado com cepa N315; Dn315+i: diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina.

A Figura 15 apresenta um resumo dos resultados obtidos na produção de citocinas em linfonodos peritoniais de animais não diabéticos. A infecção com a cepa ATCC 25923 e tratamento dessa infecção não apresentou diferenças significativas nas dosagens de nenhuma das citocinas estudadas. Já durante a infecção com a cepa N315, a IL-4 apresentou-se levemente aumentada, e o tratamento diminuiu isso para o encontrado antes da infecção; o tratamento também diminuiu a produção de IL-1β e de IL-10, que não estavam alteradas durante a infecção.

Figura 15 – Resumo dos resultados encontrados da produção de citocinas em **linfonodos peritoniais** de ratos não diabéticos.

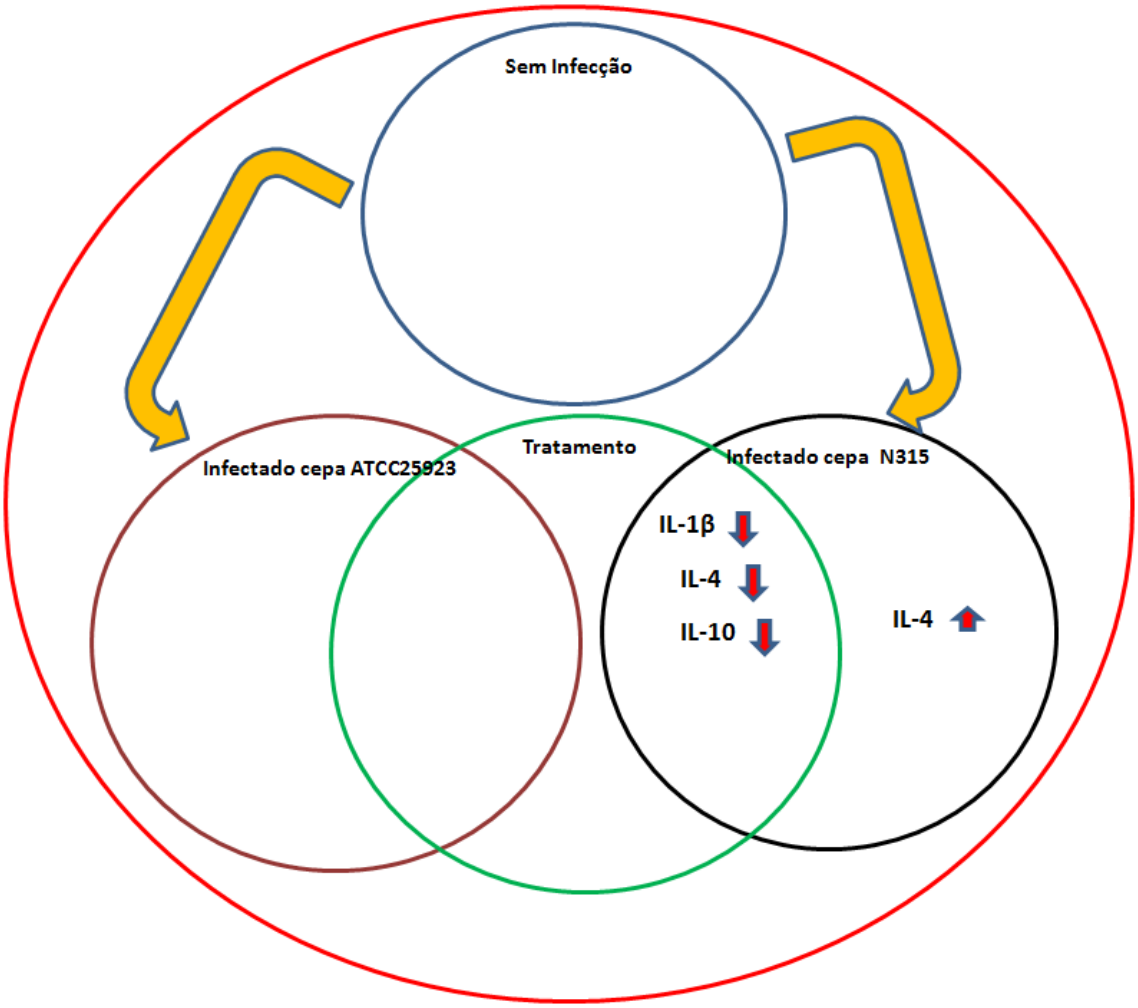


Figura 15. Representação dos resultados obtidos em linfonodos peritoniais de ratos não diabéticos, durante a vigência da infecção pela cepa ATCC 25923 e da cepa N315 de *S. aureus*. **Círculo azul**: Cs; **Círculo marrom**: Catcc; **Círculo preto**: CN315; **Círculo verde**: Tratamento com insulina (Catcc+i e Cn315+i).

Já em linfonodos peritoniais de ratos diabéticos, como mostra a Figura 16, a infecção com a cepa ATCC 25923 de *S. aureus* apresentou diminuição na produção de IL-4, que foi parcialmente aumentada no tratamento com insulina; a infecção com essa cepa não alterou a produção de mais nenhuma citocina, porém o tratamento aumentou a produção de IL-1β, CINC-1 e CINC-3. Na vigência da infecção pela cepa N315, a infecção diminuiu a produção de IL-10 e aumentou a produção de CINC-1, que foram restabelecidas às concentrações basais no tratamento com insulina; a produção de IL-1β também mostrou-se aumentada na infecção, e foi aumentada pelo tratamento, e a IL-4 mostrou-se diminuída na infecção, e o tratamento diminuiu ainda mais essa produção.

Figura 16 – Resumo dos resultados encontrados da produção de citocinas em **linfonodos peritoniais** de ratos diabéticos.

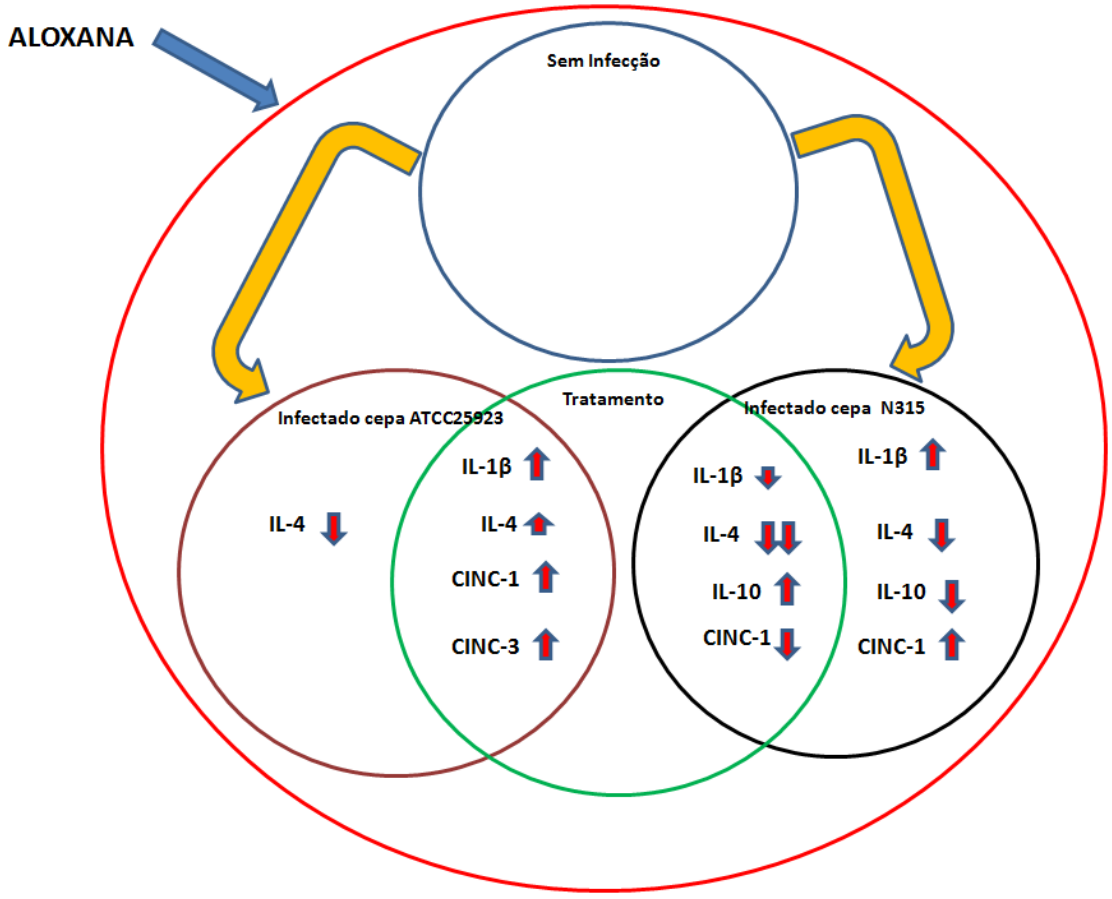


Figura 16. Representação dos resultados obtidos em linfonodos peritoniais de ratos diabéticos, durante a vigência da infecção pela cepa ATCC 25923 e da cepa N315 de *S. aureus*. **Círculo azul**: Ds; **Círculo marrom**: Datcc; **Círculo preto**: DN315; **Círculo verde**: Tratamento com insulina (Datcc+i e Dn315+i).

Os resultados obtidos nas análises de concentração de citocinas pelo método ELISA no baço dos animais estudados foram os seguintes:

A Figura 17 mostra a produção de IL-1β em baço; a infecção pela cepa ATCC 25923 em animais não diabéticos (Fig. 17.a) mostra que o tratamento com insulina diminuiu a produção dessa citocina (Catcc vs Catcc+i), e nos grupos diabéticos (Fig. 17.c) foi observado o mesmo fenômeno. Na infecção pela cepa N315, em animais diabéticos, observou-se que a infecção diminuiu a produção dessa citocina (Ds vs DN315), e que o tratamento não a aumentou.

Figura 17 – Concentrações da citocina IL-1β no **baço** em ratos não diabéticos e diabéticos.

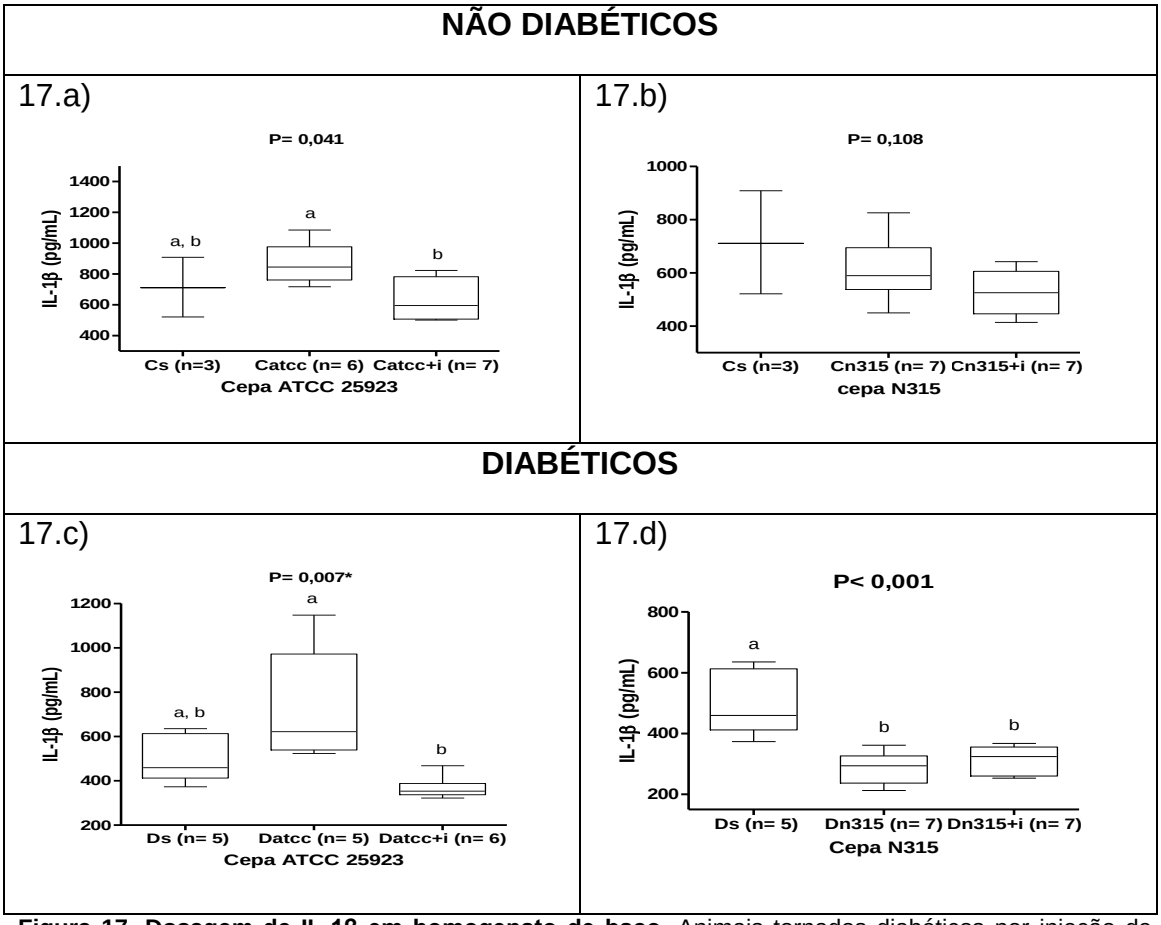


Figura 17. Dosagem de IL-1β em homogenato de baço. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. **Cs:** não diabético e não infectado; **Catcc:** não diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Catcc+i:** não diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Cn315:** não diabético e infectado com cepa N315; **Cn315+i:** não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina; **Ds:** diabético e não infectado; **Datcc:** diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Datcc+i:** diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Dn315:** diabético e infectado com cepa N315; **Dn315+i:** diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina. Realizado teste Turkey's para todas as análises (paramétrica), exceto para os marcados com *, onde foi realizado teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico).

Conforme mostrado na Figura 18, as dosagens de TNF-α mostraram-se alteradas apenas dentre os animais diabéticos, durante a infecção pela cepa N315 (Fig. 18.d), onde a infecção diminuiu a produção dessa citocina (Ds vs DN315), e o tratamento não a aumentou.

Figura 18 – Concentrações da citocina TNF-α no **baço** em ratos não diabéticos e diabéticos.

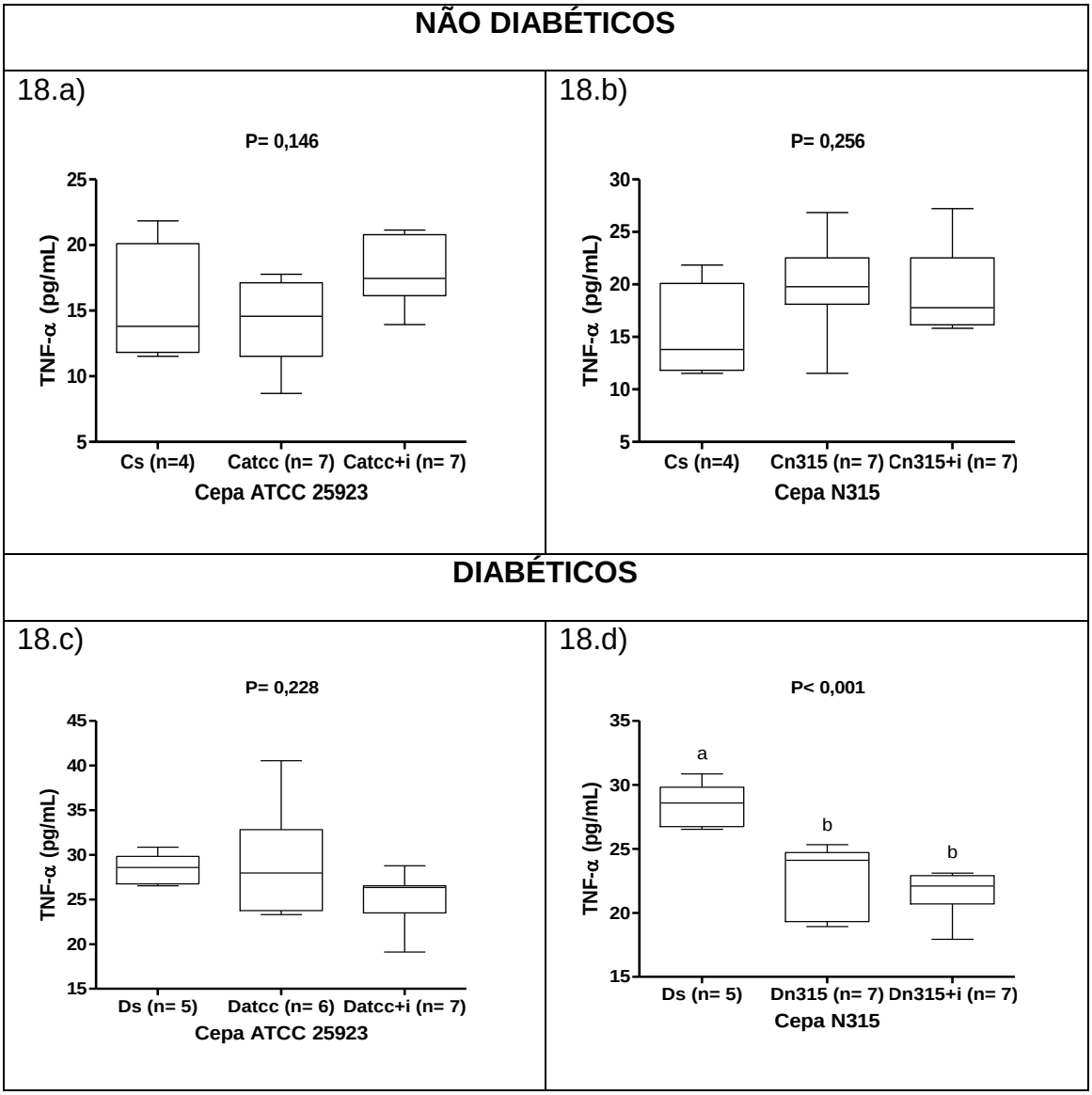


Figura 18. Dosagem de TNF-α em homogenato de baço. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. **Cs:** não diabético e não infectado; **Catcc:** não diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Catcc+i:** não diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Cn315:** não diabético e infectado com cepa N315; **Cn315+i:** não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina; **Ds:** diabético e não infectado; **Datcc:** diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Datcc+i:** diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Dn315:** diabético e infectado com cepa N315; **Dn315+i:** diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina. Realizado teste Turkey's para todas as análises (paramétrica).

A produção da citocina IL-4 não mostrou-se alterada no baço, independente do grupo estudado, como mostra a Figura 19.

Figura 19 – Concentrações da citocina IL-4 no **baço** em ratos não diabéticos e diabéticos.

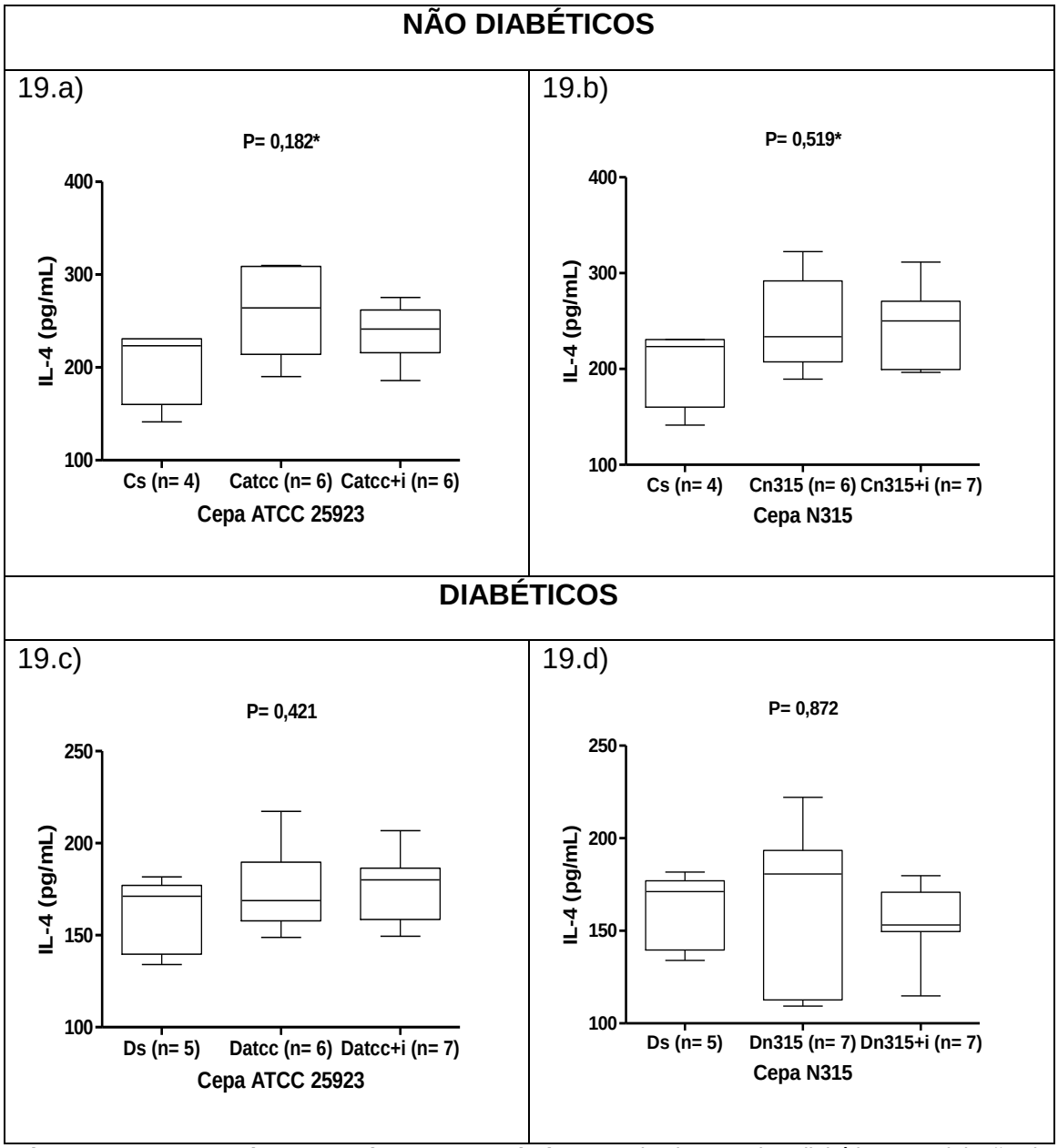


Figura 19. Dosagem de IL-4 em homogenato de baço. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. **Cs:** não diabético e não infectado; **Catcc:** não diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Catcc+i:** não diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Cn315:** não diabético e infectado com cepa N315; **Cn315+i:** não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina; **Ds:** diabético e não infectado; **Datcc:** diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Datcc+i:** diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Dn315:** diabético e infectado com cepa N315; **Dn315+i:** diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina. Realizado teste Turkey's para todas as análises (paramétrica), exceto para os marcados com *, onde foi realizado teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico).

A citocina IL-10 também não mostrou-se alterada no baço, em nenhuma circunstância estudada nesse projeto, como mostra a Figura 20.

Figura 20 – Concentrações da citocina IL-10 no **baço** em ratos não diabéticos e diabéticos.

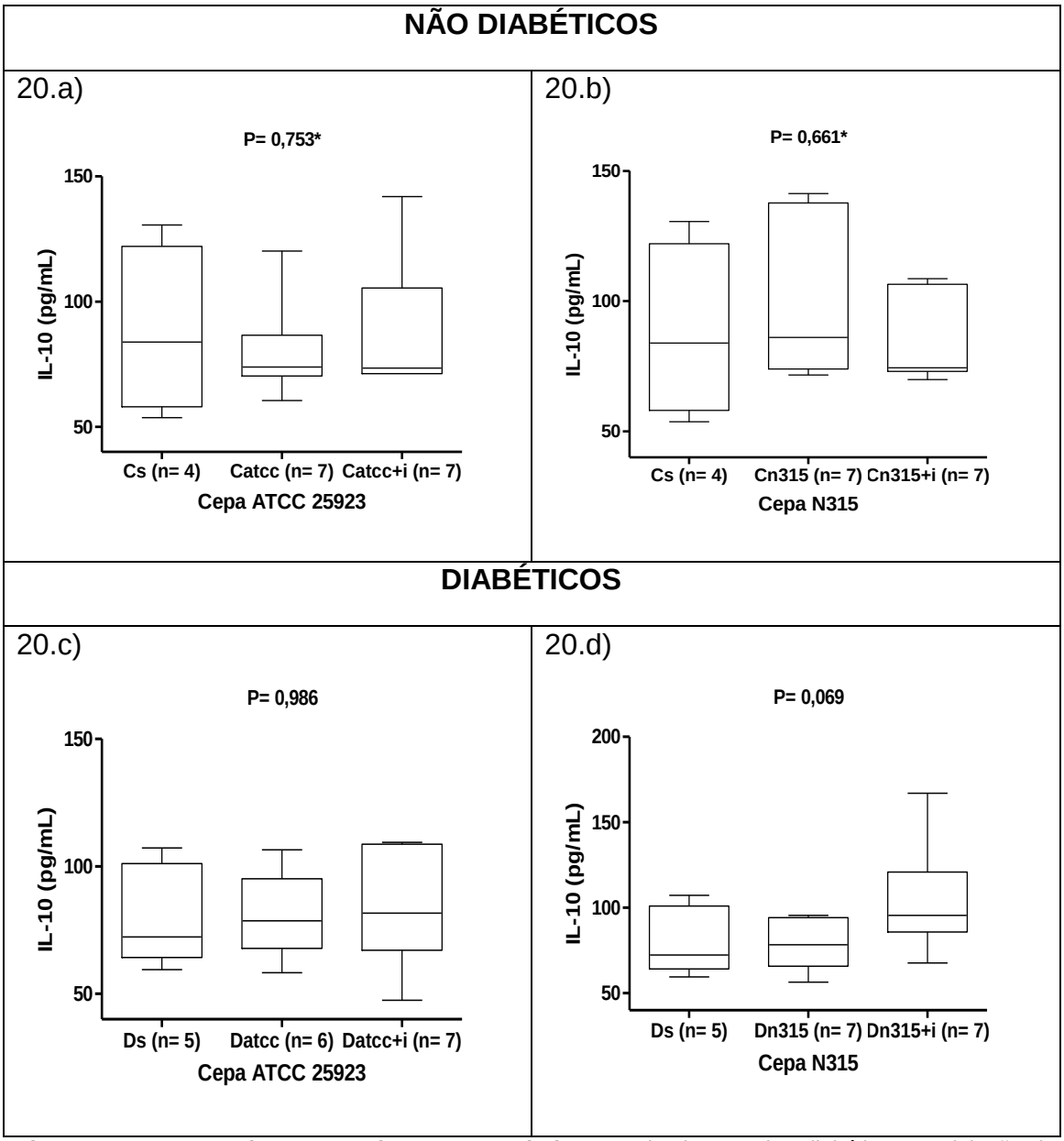


Figura 20. Dosagem de IL-10 em homogenato de baço. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. **Cs:** não diabético e não infectado; **Catcc:** não diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Catcc+i:** não diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Cn315:** não diabético e infectado com cepa N315; **Cn315+i:** não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina; **Ds:** diabético e não infectado; **Datcc:** diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Datcc+i:** diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Dn315:** diabético e infectado com cepa N315; **Dn315+i:** diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina. Realizado teste Turkey's para todas as análises (paramétrica), exceto para os marcados com *, onde foi realizado teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico).

As dosagens da quimiocina CINC-2 apresentaram vários indivíduos dos grupos com dosagens indetectáveis, e não foi possível realizar teste estatístico para esses grupos; os resultados são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Concentrações da quimiocina CINC-2 no **baço** em ratos não diabéticos e diabéticos.

Grupos	**CINC-2 (pg/mL)**
Cs (n= 2)	251,7 (±258,65)
Catcc (n= 1)	180,3
Catcc+i (n= 2)	69,6 (±85,99)
Cn315 (n= 7)	90,9 (±30,30)
Cn315+i (n= 2)	79,4 (±76,16)
Ds (n= 0)	0
Datcc (n= 3)	565,6 (±638,42)
Datcc+i (n= 1)	39,9
Dn315 (n= 3)	120,3 (±73,71)
Dn315+I (n= 0)	0

Tabela 4. Dosagem de CINC-2 em homogenato de baço. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a média ± desvio padrão da média (se n>1). Os demais indivíduos dos grupos não apresentaram dosagem detectável. Cs: não diabético e não infectado; Catcc: não diabético e infectado com cepa ATCC 25923; Catcc+i: não diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; Cn315: não diabético e infectado com cepa N315; Cn315+i: não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina; Ds: diabético e não infectado; Datcc: diabético e infectado com cepa ATCC 25923; Datcc+i: diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; Dn315: diabético e infectado com cepa N315; Dn315+i: diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina.

A Figura 21 mostra as dosagens da quimiocina CINC-3, onde houve alteração apenas no baço dos animais diabéticos, na vigência da infecção pela cepa ATCC 25923 (Fig. 21.c), onde o tratamento com insulina aumentou a produção dessa quimiocina.

Figura 21 – Concentrações da quimiocina CINC-3 no **baço** em ratos não diabéticos e diabéticos.

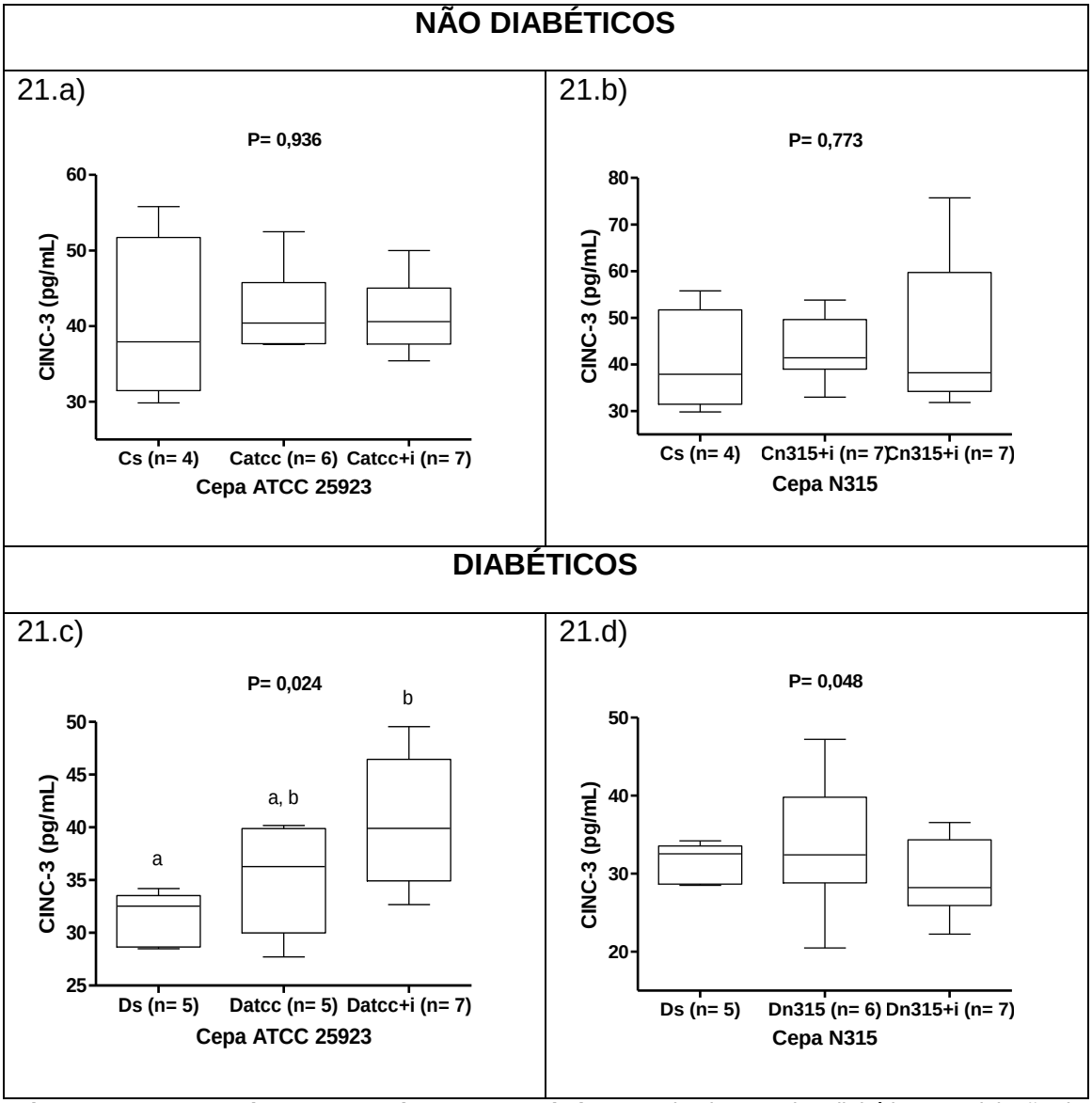


Figura 21. Dosagem de CINC-3 em homogenato de baço. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. **Cs:** não diabético e não infectado; **Catcc:** não diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Catcc+i:** não diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Cn315:** não diabético e infectado com cepa N315; **Cn315+i:** não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina; **Ds:** diabético e não infectado; **Datcc:** diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Datcc+i:** diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Dn315:** diabético e infectado com cepa N315; **Dn315+i:** diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina. Realizado teste Turkey's para todas as análises (paramétrica).

Na Figura 22, é apresentado um resumo das alterações apresentadas no baço dos animais não diabéticos; para esse órgão, nas condições apresentadas, apenas a citocina IL-1β apresentou diminuição em sua produção, no tratamento com insulina, dos animais infectados pela cepa ATCC 25923.

Figura 22 – Resumo dos resultados encontrados da produção de citocinas em **baço** de ratos não diabéticos.

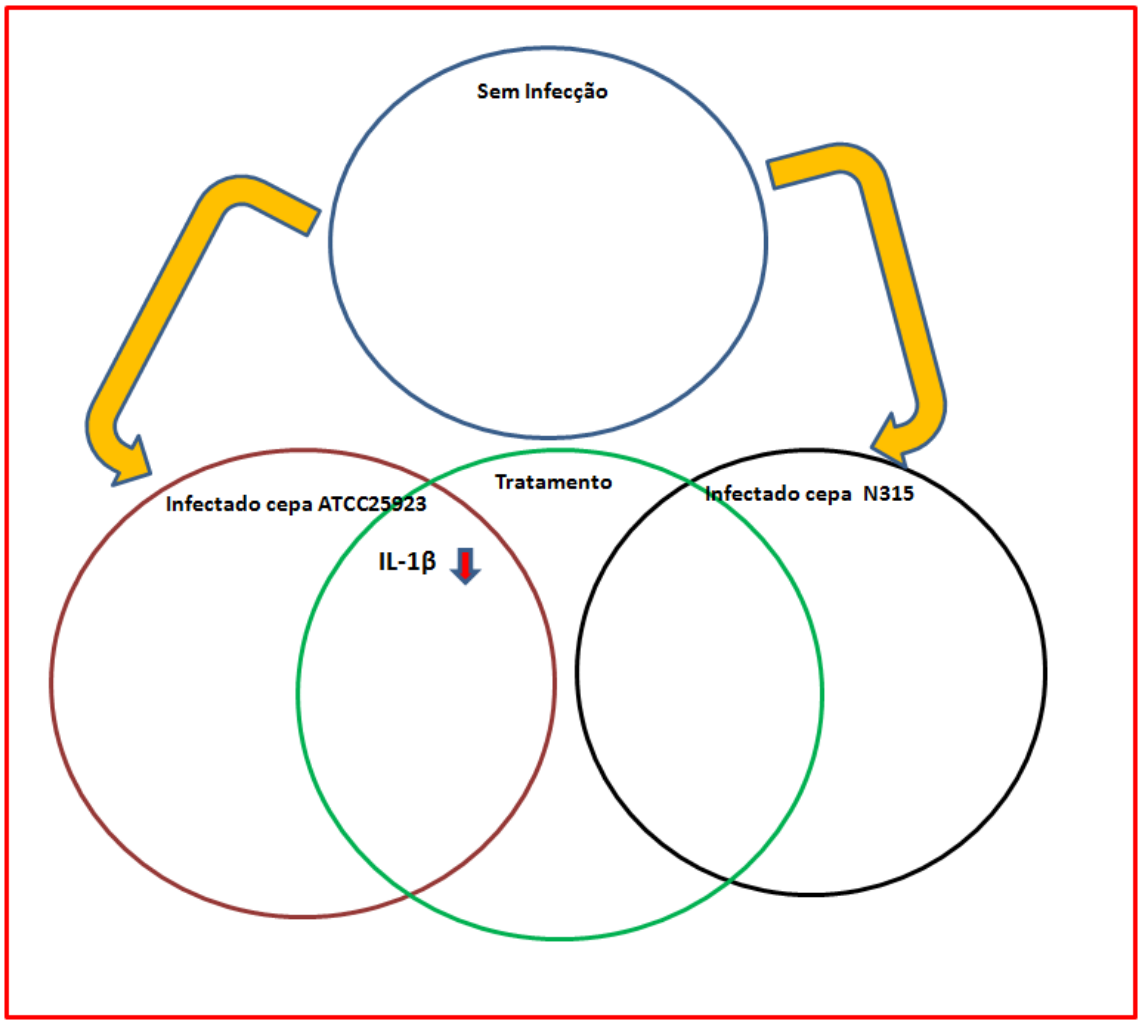


Figura 22. Representação dos resultados obtidos em baço de ratos não diabéticos, durante a vigência da infecção pela cepa ATCC 25923 e da cepa N315 de *S. aureus*. **Círculo azul**: Cs; **Círculo marrom**: Catcc; **Círculo preto**: CN315; **Círculo verde**: Tratamento com insulina (Catcc+i e Cn315+i).

A figura 23 mostra um resumo dos resultados obtidos no baço dos animais diabéticos do presente estudo. Durante a vigência da infecção com a cepa ATCC 25923, a IL-1β mostrou-se diminuída, e a CINC-3 aumentada, apenas no tratamento com insulina; já na infecção com a cepa N315, a IL-1β e a TNF-α apresentaram-se diminuídas durante a infecção, e o tratamento não as aumentou.

Figura 23 – Resumo dos resultados encontrados da produção de citocinas em **baço** de ratos diabéticos.

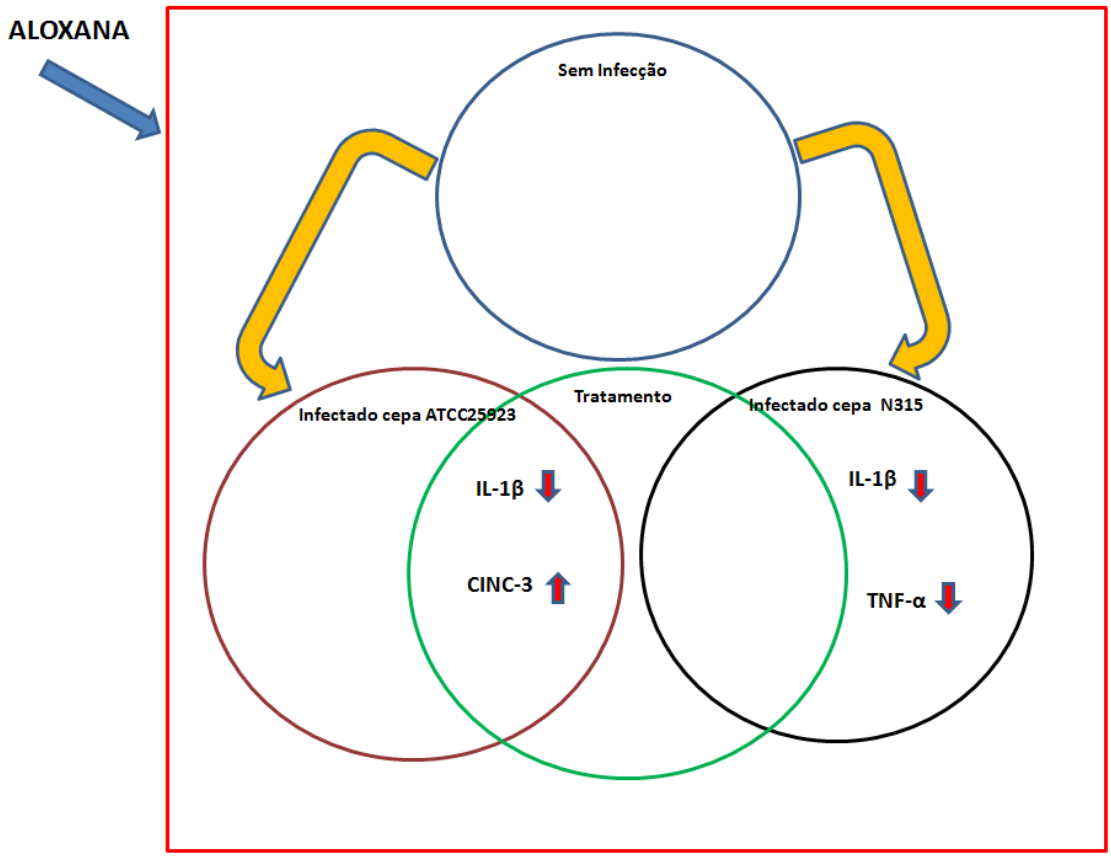


Figura 23. Representação dos resultados obtidos em baço de ratos diabéticos, durante a vigência da infecção pela cepa ATCC 25923 e da cepa N315 de *S. aureus*. **Círculo azul**: Ds; **Círculo marrom**: Datcc; **Círculo preto**: DN315; **Círculo verde**: Tratamento com insulina (Datcc+i e Dn315+i).

Os resultados obtidos nas análises de concentração de citocinas pelo método ELISA no rim dos animais estudados foram os seguintes:

Como mostrado na Figura 24, a produção de IL-1β não mostrou-se alterada no rim, em nenhum grupo estudado.

Figura 24 – Concentrações da citocina IL-1β no **rim** em ratos não diabéticos e diabéticos.

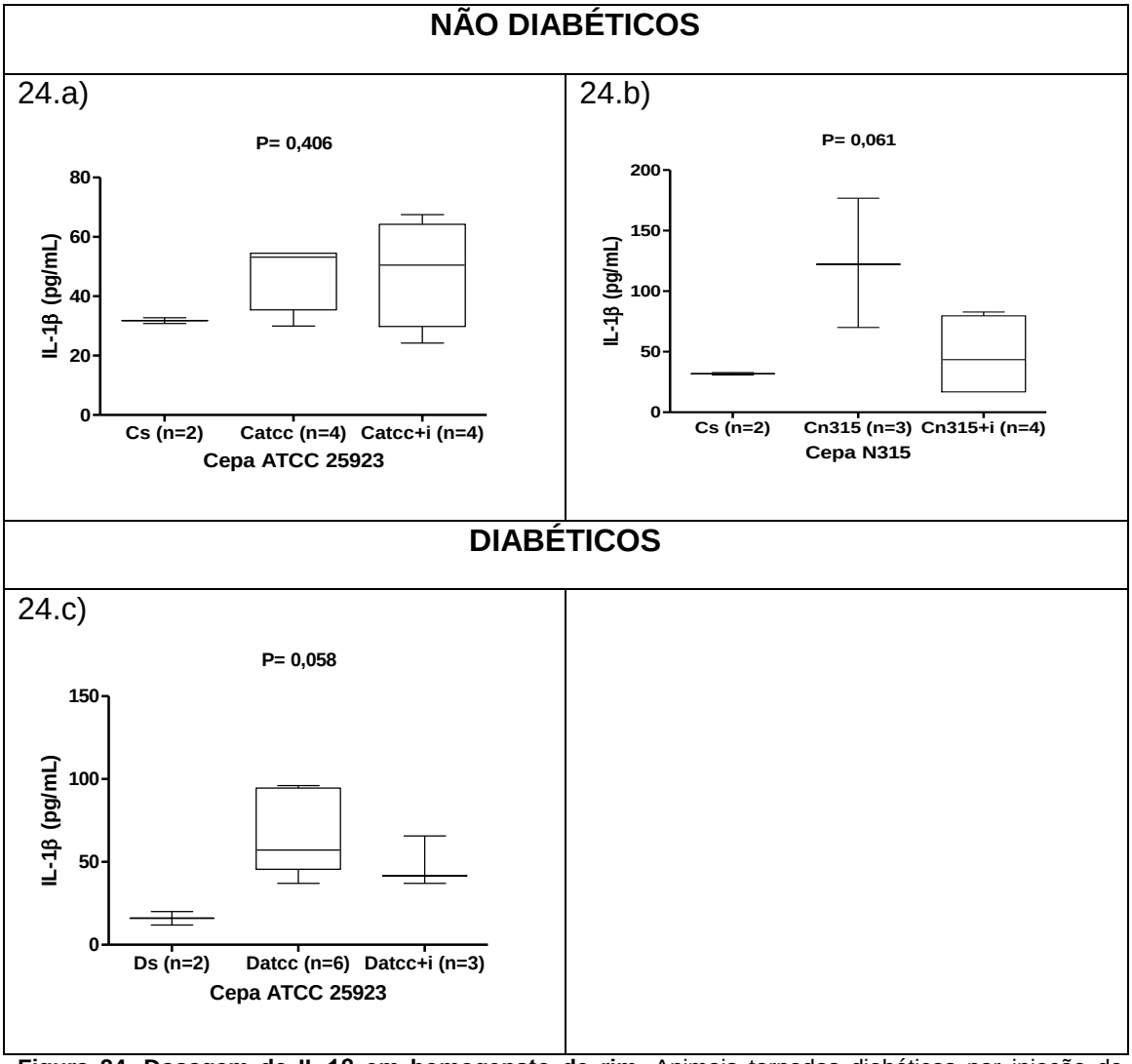


Figura 24. Dosagem de IL-1β em homogenato de rim. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. **Cs:** não diabético e não infectado; **Catcc:** não diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Catcc+i:** não diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Cn315:** não diabético e infectado com cepa N315; **Cn315+i:** não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina; **Ds:** diabético e não infectado; **Datcc:** diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Datcc+i:** diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Dn315:** diabético e infectado com cepa N315; **Dn315+i:** diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina. Realizado teste Turkey's para todas as análises (paramétrica). Animais diabéticos infectados pela cepa N315 não apresentaram dosagens suficientes para confecção de gráfico e análise estatística. Animais diabéticos infectados com a cepa N315 não apresentaram dosagens suficientes para confecção de gráfico e análise estatística.

As dosagens de IL-1β em rim dos ratos diabéticos, na vigência da infecção pela cepa N315 mostraram-se indetectáveis na maior parte dos indivíduos dos grupos estudados e, por esse motivo, não foi possível realizar teste estatístico nesses grupos, então os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Concentrações da citocina IL-1β no **rim** em ratos diabéticos, infectados com a cepa N315.

Grupos	**CINC-2 (pg/mL)**
Ds (n= 2)	16,0 (±5,73)
Dn315 (n= 3)	67,5 (±17,01)
Dn315+I (n= 1)	32,43

Tabela 5. Dosagem de IL-1β em homogenato de rim. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a média ± desvio padrão da média (se n>1). Os demais indivíduos dos grupos não apresentaram dosagem detectável Ds: diabético e não infectado; Dn315: diabético e infectado com cepa N315; Dn315+i: diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina.

A citocina TNF-α apresentou-se indetectável no rim de todos os indivíduos dos grupos estudados.

As dosagens de IL-4 no rim são mostradas na Figura 25, onde apenas os animais diabéticos infectados pela cepa N315 (Fig. 25.d) mostraram alteração, na comparação DN315 vs DN315+i.

Figura 25 – Concentrações da citocina IL-4 no **rim** em ratos não diabéticos e diabéticos.

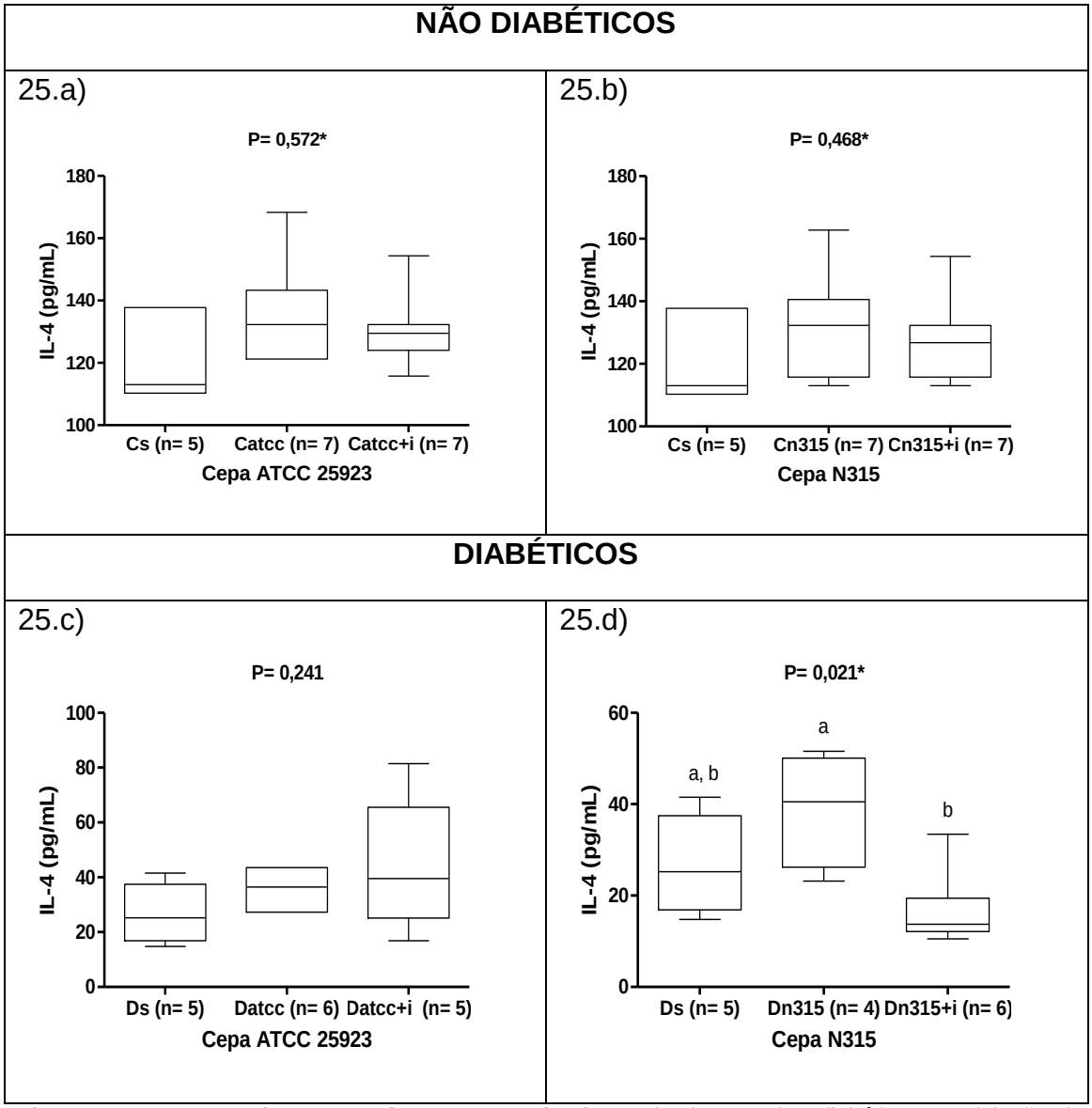


Figura 25. Dosagem de IL-4 em homogenato de rim. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. **Cs:** não diabético e não infectado; **Catcc:** não diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Catcc+i:** não diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Cn315:** não diabético e infectado com cepa N315; **Cn315+i:** não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina; **Ds:** diabético e não infectado; **Datcc:** diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Datcc+i:** diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Dn315:** diabético e infectado com cepa N315; **Dn315+i:** diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina. Realizado teste Turkey's para todas as análises (paramétrica), exceto para os marcados com *, onde foi realizado teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico).

As dosagens de IL-10 no rim não apresentaram alteração durante o estudo, conforme mostra a Figura 26.

Figura 26 – Concentrações da citocina IL-10 no **rim** em ratos não diabéticos e diabéticos.

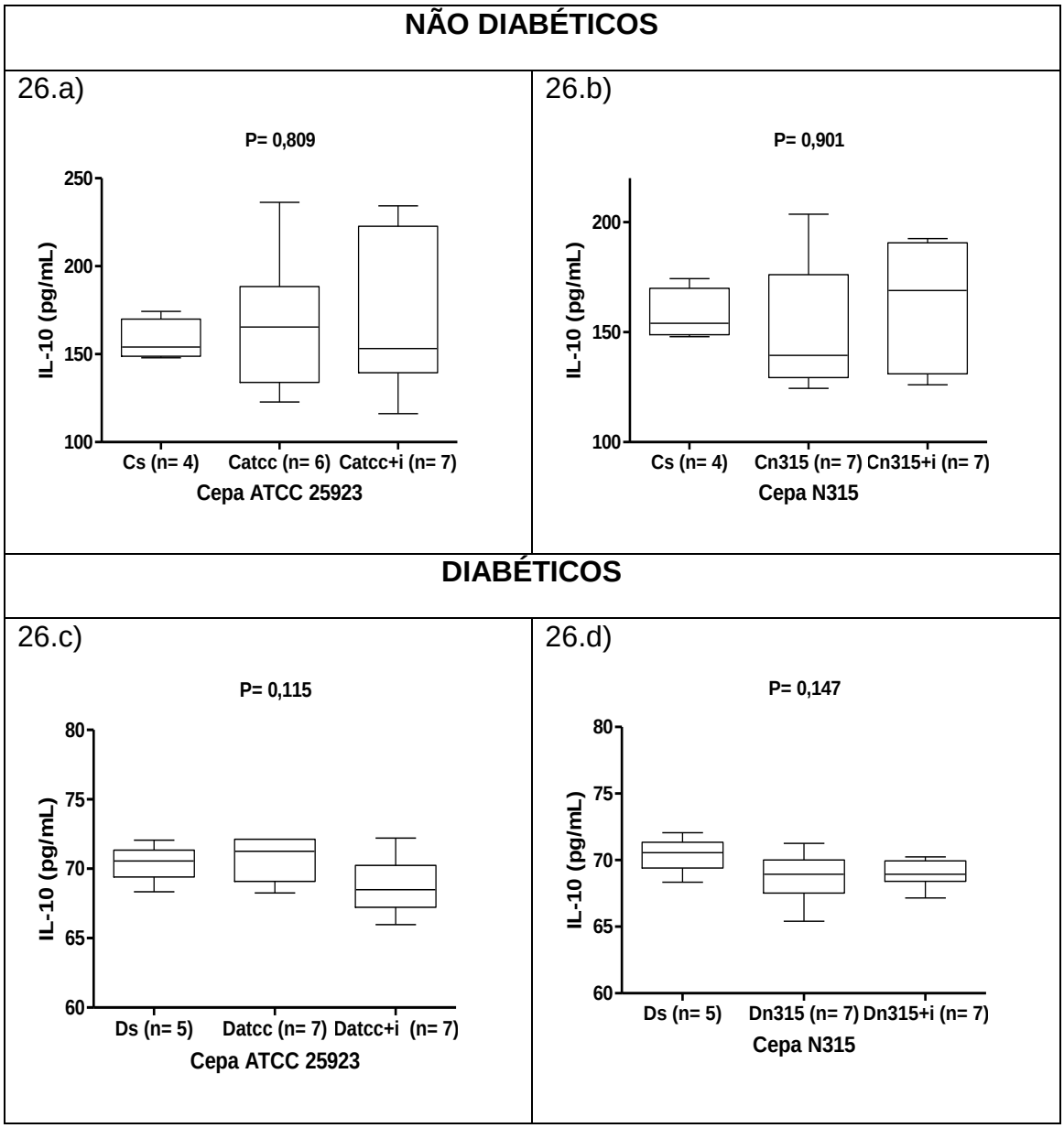


Figura 26. Dosagem de IL-10 em homogenato de rim. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. **Cs:** não diabético e não infectado; **Catcc:** não diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Catcc+i:** não diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Cn315:** não diabético e infectado com cepa N315; **Cn315+i:** não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina; **Ds:** diabético e não infectado; **Datcc:** diabético e infectado com cepa ATCC 25923; **Datcc+i:** diabético, infectado com cepa ATCC 25923 e tratado com insulina; **Dn315:** diabético e infectado com cepa N315; **Dn315+i:** diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina. Realizado teste Turkey's para todas as análises (paramétrica).

Conforme demostrado em gráficos, não houve alteração na produção de citocinas em rins de animais não diabéticos, independente da infecção ou tratamento.

A Figura 27 apresenta o que foi encontrado nas dosagens de citocinas em rim de animais diabéticos. Apenas a citocina IL-4 apresentou alteração, na vigência da infecção pela cepa N315, onde a infecção diminuiu a produção dessa citocina, e o tratamento não modificou esse quadro.

Figura 27 – Resumo dos resultados encontrados da produção de citocinas em **rim** de ratos diabéticos.

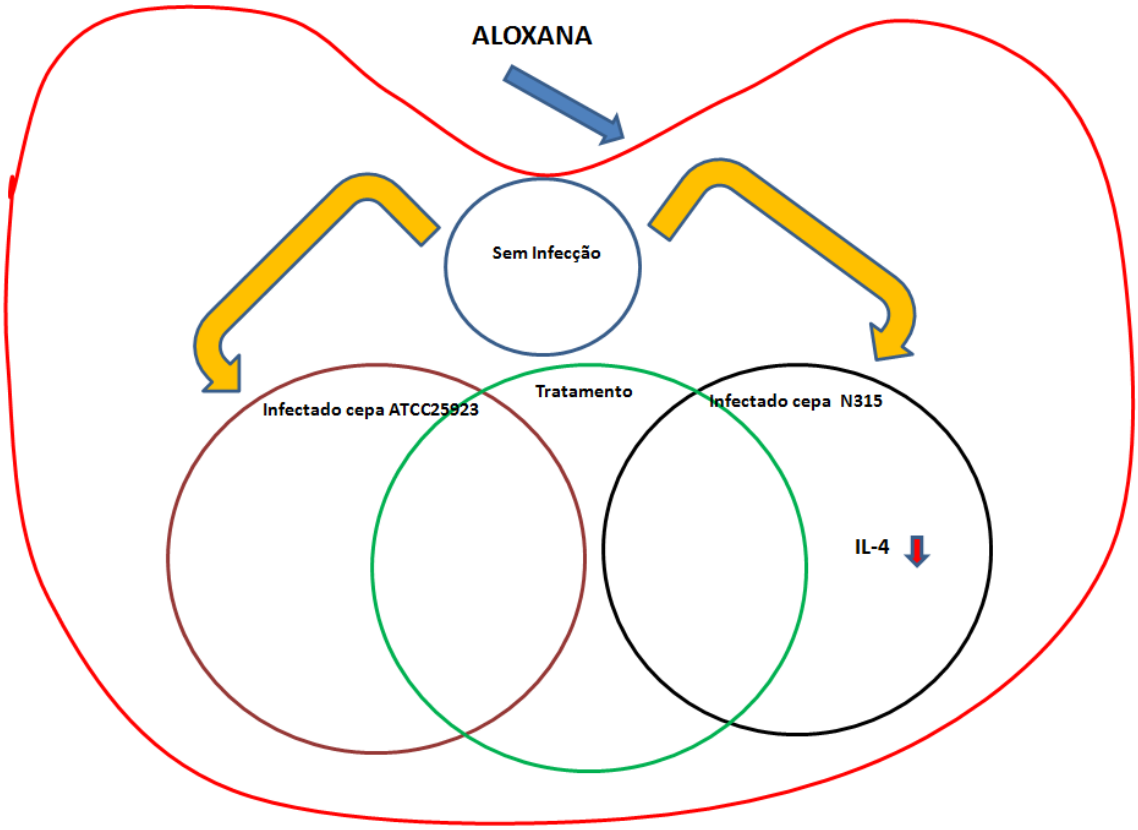


Figura 27. Representação dos resultados obtidos em rim de ratos diabéticos, durante a vigência da infecção pela cepa ATCC 25923 e da cepa N315 de *S. aureus*. **Círculo azul**: Ds; **Círculo marrom**: Datcc; **Círculo preto**: DN315; **Círculo verde**: Tratamento com insulina (Datcc+i e Dn315+i).

Foram avaliadas a expressão das moléculas das vias MAPK (fosfo-ERK, fosfo P-38, P-38 não fosforilada), PKC (fosfo PKC-α, fosfo PKC-δ), e PI3K (fosfo-AKT) pelo método de *Western Blotting* nas amostras de fígado do presente estudo.

Na observação da expressão da molécula Fosfo P-38 pelo método de *Western Blotting*, na infecção pela cepa ATCC, identificou-se que essa molécula mostrou-se aumentada no grupo não diabético infectado em cerca de 220%, e que o tratamento com insulina diminuísse para apenas 20% acima do encontrado no grupo não infectado; no grupo diabético, a infecção não alterou a expressão dessa molécula, mas o tratamento a aumentou cerca de 70%. Já na infecção pela cepa N315, a infecção aumentou essa expressão em cerca de 100%, e o tratamento o reduziu, para 50% acima do encontrado no grupo diabético não infectado.

Figura 28. Análise de P38 em fígado, na infecção com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus*.

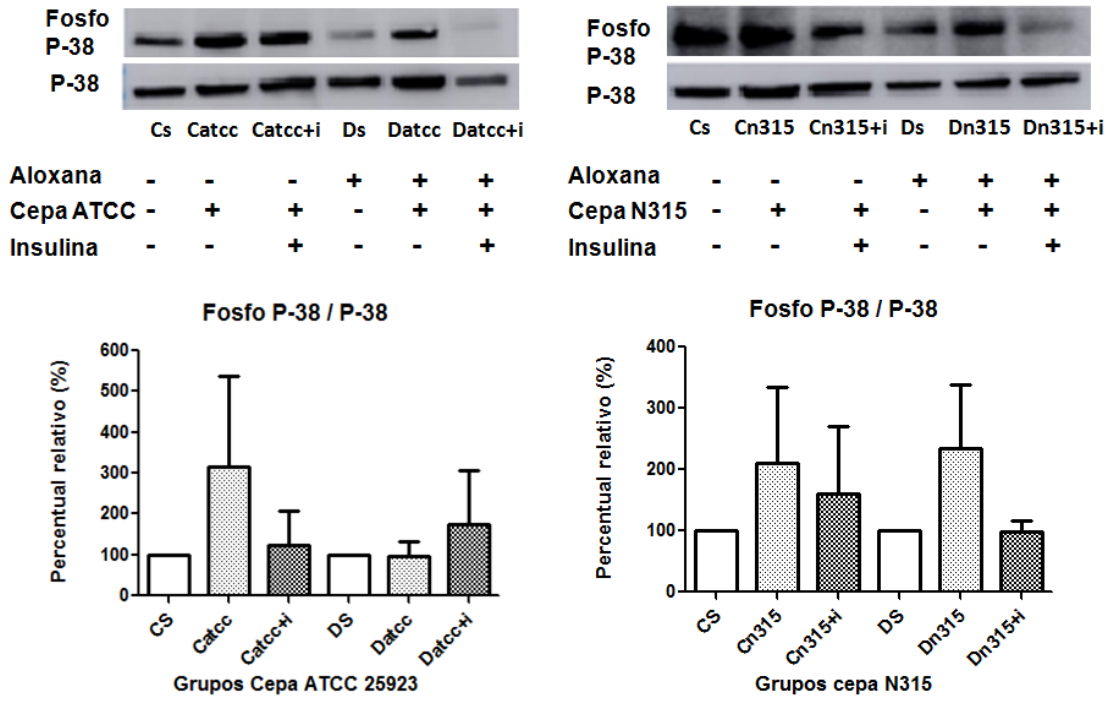


Figura 28. Análise de P38 MAPK em homogenato de fígado. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com a cepa ATCC 25923 ou a cepa N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a média e desvio padrão da média (n=3). CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insulina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insulina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insulina; Dn315=diabético infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insulina.

Na expressão da molécula fosfo ERK, na infecção pela cepa ATCC, o grupo não diabético infectado diminuiu em 15% a expressão dessa molécula, e que o grupo tratado não aumentou essa expressão; nos grupos diabéticos verificou-se que o grupo infectado apresentou aumento de 50% na expressão dessa molécula, e que o tratamento com insulina (Datcc+i) diminuiu essa expressão para 30% menos do que foi encontrado no grupo diabético não infectado. Na infecção pela cepa N315, constatou-se que o grupo infectado apresentou diminuição de cerca de 10% na expressão dessa molécula (DS vs DN315), e que a insulina não alterou esse quadro; nos grupos diabéticos verificou-se que a infecção não alterou a expressão, mas o diminuiu para 40%.

Figura 29. Análise de fosfo-ERK em fígado, na infecção com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus*.

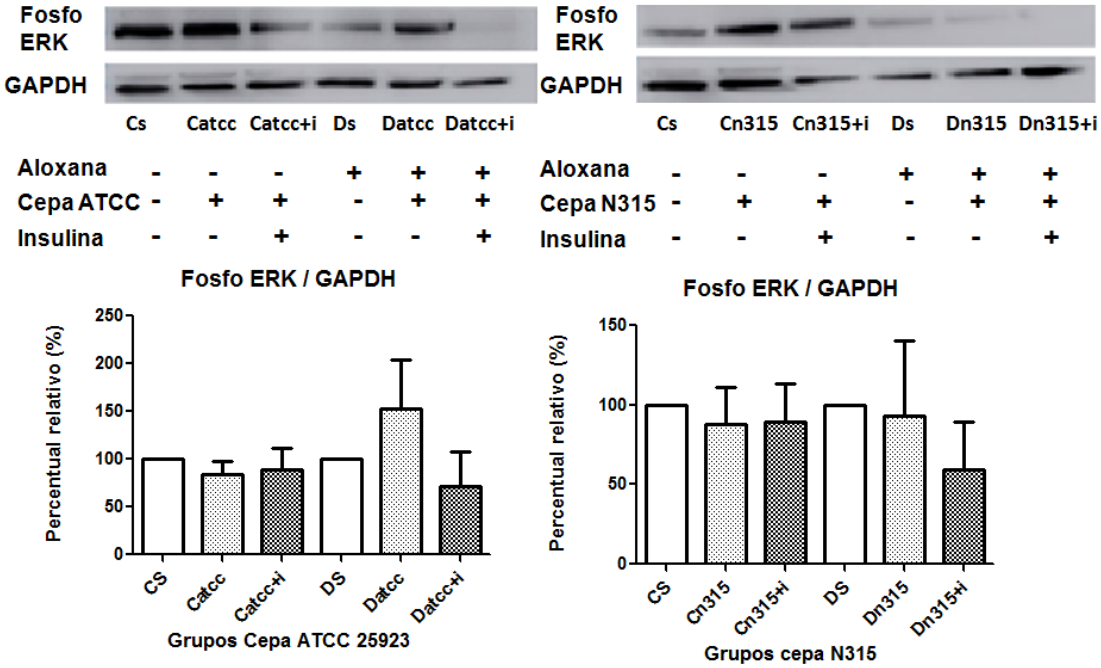


Figura 29. Análise de Fosfo ERK em homogenato de fígado. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com a cepa ATCC 25923 ou a cepa N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a média e desvio padrão da média (n=3). CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insulina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insulina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insulina; Dn315=diabético infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insulina.

A expressão da molécula PKC-α fosforilada na infecção pela cepa ATCC mostrou que o grupo Catcc diminuiu em 25% em comparação ao CS, e que o grupo Catcc+i apresentou uma elevação, ficando em 15%, quando comparadas ao CS; dentre os grupos diabéticos, observou-se que o Datcc apresentou diminuição de 20%, e que o tratamento com insulina (Datcc+i) não aumentou a expressão dessa molécula, mostrando uma diminuição de 30%, quando comparados ao DS. Na infecção pela cepa N315 não houve alteração na expressão dessa molécula no grupo Cn315, e o grupo Cn315+i apresentou diminuição de 30%; nos grupos diabéticos observou-se diminuição de 40% no grupo infectado, e o tratamento aumentou até os níveis basais.

Figura 30. Análise de Fosfo-PKC-α em fígado, na infecção com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus*.

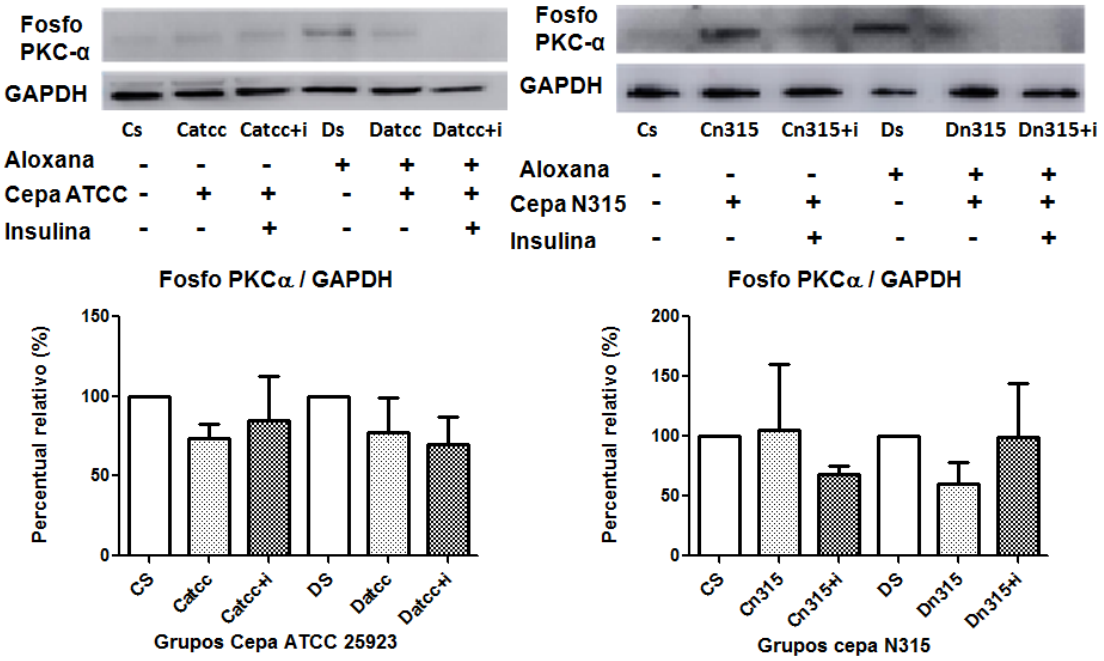


Figura 30. Análise de Fosfo PKCα em homogenato de fígado. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com a cepa ATCC 25923 ou a cepa N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a média e desvio padrão da média (n=3). CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insulina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insulina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insulina; Dn315=diabético infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insulina.

Foi observado na quantificação da expressão da molécula PKC-δ fosforilada, na infecção pela cepa ATCC, que o grupo Catcc diminuiu em 11%, na comparação com CS, e que a insulina diminuiu ainda mais essa expressão, ficando em 21%, quando comparadas ao CS; dentre os grupos diabéticos, observou-se que o Datcc apresentou diminuição de 10% na expressão dessa molécula, e que o tratamento com insulina (Datcc+i) diminuiu ainda mais essa expressão, apresentando diminuição de 46%, quando comparados ao DS. Na infecção pela cepa N315, o grupo Cn315 apresentou diminuição de 50% em relação ao CS, e o grupo Cn315+i, aumentou essa expressão, ainda que não para os níveis basais; no grupo DN315 observou-se que a infecção diminuiu essa expressão em 10% em relação ao grupo DS, e que o tratamento com insulina (Dn315+i) diminuiu ainda mais essa expressão, chegando a 50%.

Figura 31. Análise de Fosfo-PKC-δ em fígado, na infecção com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus*.

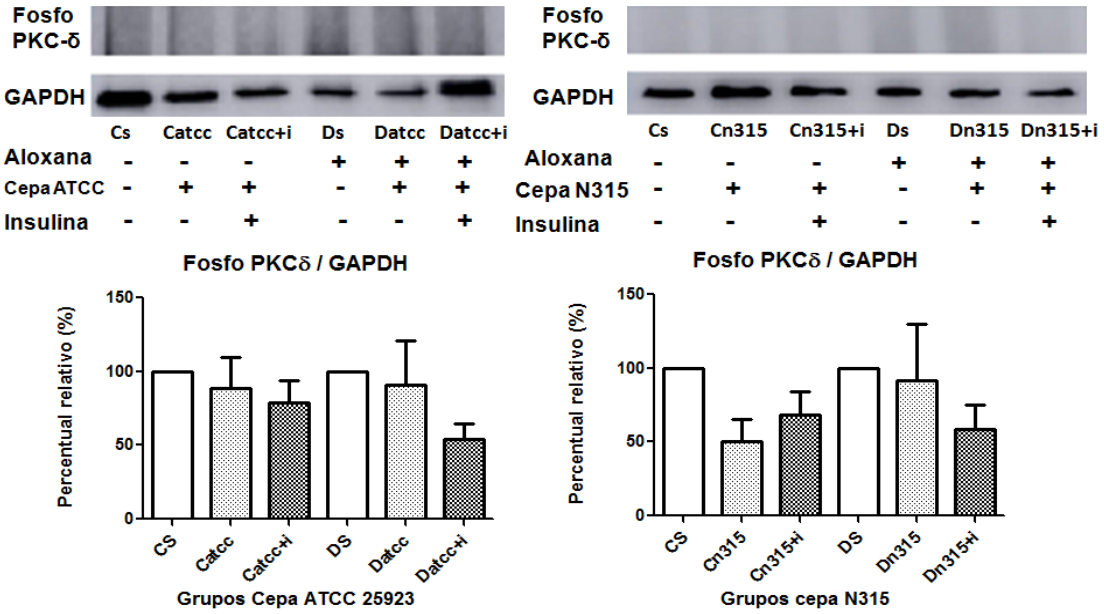


Figura 31. Análise de Fosfo PKCδ em homogenato de fígado. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com a cepa ATCC 25923 ou a cepa N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a média e desvio padrão da média (n=3). CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insulina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insulina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insulina; Dn315=diabético infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insulina.

Na observação da expressão da molécula fosfo AKT, na infecção pela cepa ATCC, identificou-se que a expressão dessa mostrou-se diminuída no grupo Catcc em 15%, e que o tratamento com insulina (Catcc+i) diminuiu ainda mais essa expressão, para 25%, quando comparadas ao CS; já entre os grupos diabéticos, observou-se que o Datcc apresentou aumento de 40% na expressão dessa molécula, e que o tratamento com insulina (Datcc+i) elevou muito mais essa expressão, chegando a um aumento de 430%, quando comparados ao DS. Já na infecção pela cepa N315, o grupo Cn315 diminuiu em cerca de 30%, enquanto o grupo Cn315+i aumentou essa expressão quase ao encontrado em CS; nos grupos diabéticos verificou-se aumento de 4600% no Dn315, e que o tratamento com insulina diminuiu para os níveis encontrados no DS.

Figura 32. Análise de Fosfo-AKT em fígado, na infecção com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus*.

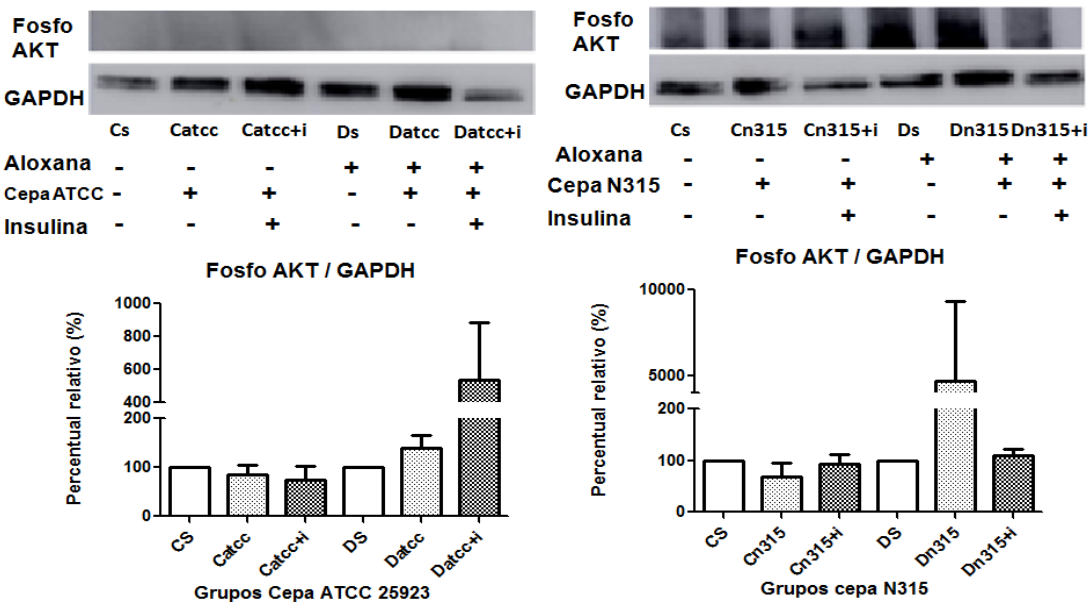


Figura 32. Análise de Fosfo AKT em homogenato de fígado. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com a cepa ATCC 25923 ou a cepa N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a média e desvio padrão da média (n=3). CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insulina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insulina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insulina; Dn315=diabético infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insulina.

A tabela 6 apresenta um resumo dos resultados do estudo das vias de sinalização por *W.B.* no fígado dos animais não diabéticos utilizados no projeto.

Na observação das moléculas da via MAPK, é possível perceber que a insulina diminuiu a expressão de fosfo P-38 que encontrava-se aumentado no grupo não diabético infectado pela cepa ATCC, e no grupo infectado pela cepa N315, a insulina diminuiu parcialmente o aumento encontrado na infecção; a expressão da fosfo ERK não se mostrou alterado nos grupos não diabéticos. Na via PKC, a insulina aumentou a expressão da PKC-α, que estava diminuída no grupo não diabético infectado pela cepa ATCC, mas no grupo infectado pela cepa N315, a insulina também baixou a expressão dessa molécula, mas ela não se encontrava aumentada antes do tratamento; na molécula fosfo PKC-δ, o grupo infectado pela cepa ATCC teve essa expressão diminuída, e a insulina baixou ainda mais; já no grupo infectado pela cepa N315, a insulina aumentou parcialmente a expressão dessa molécula, que estava diminuída na infecção. A molécula estudada da via PI3K (fosfo-AKT) não mostrou-se alterada na vigência das infecções ou tratamentos.

Tabela 6 – Resumo dos resultados obtidos na expressão das vias de sinalização estudadas no fígado de animais não diabéticos dos grupos infectados (ambas as cepas) e infectados e tratados, em relação ao seu controle não infectado (CS).

GRUPOS	Via MAPK		Via PKC		Via PI3K
	Fosfo P-38	Fosfo ERK	Fosfo PKC-α	Fosfo PKC-δ	Fosfo AKT
Catcc	↑		↓	↓	
Catcc+i	↓		↑	↓↓	
CN315	↑			↓	
CN315+i	↓ (parcial)		↓	↑ (parcial)	

Tabela 6. Resumo do encontrado no estudo de moléculas das vias MAPK, PKC e PI3K em homogenatos dos fígados. Animais infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Catcc: não diabético infectado com cepa ATCC; Catcc+i: não diabético, infectado com a cepa ATCC e tratado com insulina; Cn315: não diabético, infectado pela cepa N315; CN315+i: não diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle não infectado (CS). n= 3.

A tabela 7 mostra o resumo dos resultados do estudo das vias de sinalização por *W.B.* no fígado dos animais diabéticos utilizados no projeto.

Os resultados obtidos na quantificação de moléculas da via MAPK, percebe-se que a insulina aumentou a expressão da fosfo P-38, que não apresentava diferença na comparação DS vs Datcc, e diminuiu a expressão dessa molécula, que apresentou aumento na comparação DS vs DN315; na expressão da fosfo ERK, a insulina diminuiu a expressão dessa molécula, que estava aumentada na comparação DS vs DN315, e diminuiu a expressão, que não mostrava-se alterada comparação DS vs DN315. Na via PKC, a infecção pela cepa ATCC diminuiu a expressão da PKC-α em comparação com DS, e a insulina não modificou esse quadro, que permaneceu diminuído, e na infecção pela cepa N315, a insulina aumentou a expressão dessa molécula, que estava diminuída antes do tratamento; na molécula fosfo PKC-δ, ocorreu o mesmo fenômeno para as infecções com ambas as cepas, onde a infecção diminuiu a expressão dessa molécula em comparação ao encpntrado antes da infecção, e a insulina diminuiu isso ainda mais. A molécula estudada da via PI3K (fosfo-AKT) apresentou sua expressão aumentada na infecção pela cepa ATCC, e a insulina aumentou essa expressão ainda mais; já na infecção pela cepa N315, a insulina diminuiu a expressão dessa molécula, que estava aumentada na infecção.

Tabela 7 – Resumo dos resultados obtidos na expressão das vias de sinalização estudadas no fígado de animais diabéticos dos grupos infectados (ambas as cepas) e infectados e tratados, em relação ao seu controle não infectado (DS).

GRUPOS	Via MAPK		Via PKC		Via PI3K
	Fosfo P-38	Fosfo ERK	Fosfo PKC-α	Fosfo PKC-δ	Fosfo AKT
Datcc		↑	↓	↓	↑
Datcc+i	↑	↓	↓	↓↓	↑↑
DN315	↑		↓	↓	↑
DN315+i	↓	↓	↑	↓↓	↓

Tabela 7. Resumo do encontrado no estudo de moléculas das vias MAPK, PKC PI3K em homogenatos dos fígados. Animais infectados com as cepas ATCC 25923 e N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Datcc: diabético infectado com cepa ATCC; Datcc+i: diabético, infectado com a cepa ATCC e tratado com insulina; Dn315: diabético, infectado pela cepa N315; DN315+i: diabético, infectado com cepa N315 e tratado com insulina. Todos os grupos foram comparados ao grupo diabético não infectado (DS). n= 3.

Também foi realizado a dosagem de mieloperoxidase nas amostras de fígado, e os resultados não foram detectáveis.

6. Discussão

Nesse trabalho decidimos focar os estudos de expressão de moléculas de vias de sinalização no fígado, pois esse é um órgão muito importante para a síntese de proteínas da fase aguda da inflamação, e os animais utilizados nesse projeto receberam uma infecção aguda por duas diferentes cepas de *S. aureus.*

No desenvolvimento desse projeto foram vistas repostas diversas às diferentes linhagens da bactéria estudada; tanto a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 como a N315 possuem alguns fatores de virulência em comum, como cápsula polissacarídica (NANRA *et al*, 2013) que evita a fagocitose e HLA, uma citotoxina que causa citólise e reduz a capacidade fagocitica dos macrófagos (ONOGAWA, 2002), porém a cepa ATCC 25923 possui também uma leucocidina chamada PVL, que causa citólise pela formação de poros na membrana dos leucócitos (MONECKE *et al*, 2007).

A ativação anormal de proteína quinase C (PKC) e Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) resulta em inflamação e resistência à insulina (BI *et al*., 2013).

Várias respostas inflamatórias induzidas por patógenos são mediadas através de PKC e ERK. A maioria dos níveis de citocinas pró-inflamatórias são elevadas por ativação de PKC, e estão relacionadas à imunidade inata, indicando que a ativação de PKC é crucial para o mecanismo de defesa inicial contra patógenos (KIM, 2013).

Na observação da ativação das vias de sinalização estudadas nesse projeto, os animais diabéticos apresentaram maior ativação dessas vias, quando comparados aos animais não diabéticos, o que condiz com o resultado da IL-1β no fígado dos animais diabéticos, que é diminuída na infecção pela cepa N315 e não é revertida pelo tratamento com insulina, enquanto em fígado de animais não diabéticos, a citocina pró-inflamatória TNF-α, que estava diminuída na infecção pela cepa N315 foi parcialmente revertida pelo tratamento de insulina.

O TNF-α, é uma citocina bem conhecida que inicia inflamação, resposta imunológica e morte celular. A expressão de ICAM-1 induzida por TNF-α em células epiteliais das vias aéreas humanas é mediada por uma via regulada por

PKC (KIM, 2013). Também estudos sugeriram que o TNF-α também pode desempenhar um papel na proliferação celular e na anti-apoptose (KIM, 2013).

O fígado é crucial para a manutenção da homeostase normal da glicose, pois produz glicose durante o jejum e armazena glicose pós-prandialmente. No entanto, esses processos hepáticos são desregulados em DM tipo 1 e tipo 2, e esse desequilíbrio contribui para a hiperglicemia nos estados de jejum e pós-prandial (PETERSEN *et al*., 2017).

A ação direta da insulina no fígado ocorre através da sinalização do receptor de insulina e estimula a síntese de glicogênio hepático; a insulina altera o estado de fosforilação de enzimas. O AKT é um mediador de sinalização de insulina (PETERSEN *et al*., 2017).

A ativação da PKC resulta em diminuição da sinalização de insulina na em fígado, e a resistência à insulina hepática poderia ser atribuída à ativação da PKC, que é altamente expressa no fígado. O principal fator para determinar se a PKC está ativada levando a resistência à insulina hepática são as respostas inflamatórias, como a produção de TNF-α (BIRKENFELD & SHULMAN, 2014).

No presente estudo, verificamos em fígado, que a via da PKC foi diminuída na infecção pelas duas as cepas de *S. aureus* estudadas, tanto nos grupos diabéticos quanto nos grupos não diabéticos, e que a insulina aumentou essa expressão apenas nos grupos não diabético infectado pela cepa ATCC, e diabético infectado pela cepa N315; a produção de citocinas relacionadas à essa via, no fígado foi condizente apenas no grupo diabético infectado pela cepa N315, onde a infecção também diminuiu a produção de IL-1β, mas a insulina, apesar de ter aumentado a expressão da PKC-α que estava diminuída na infecção, não aumentou a produção dessa citocina, o que pode ser explicado pelo fato da expressão de PKC-δ ter sido diminuída na infecção desse mesmo grupo, enquanto o tratamento com insulina diminuiu ainda mais essa expressão.

Em estudo em modelo bovino infectado por S. aureus, foi encontrado que a internalização de S. aureus em células epiteliais bovinas é associada à atividade de AKT, assim como uma variedade de infecções são dependentes

da fosforilação de AKT. O AKT é uma via de sinalização importante em fagocitose e regulação da resposta inflamatória (OVIEDO-BOYSO, 2011).

Em relação à expressão da via PI3K em fígados dos animais deste estudo, não foram encontradas alterações nos animais não diabéticos, enquanto em animais diabéticos, as infecções com ambas as cepas aumentou a expressão dessa via porém, na infecção com a cepa ATCC 25923, o tratamento com insulina aumentou essa expressão ainda mais, enquanto na infecção com a cepa N315, a insulina fez com que essa expressão retornasse aos níveis basais.

Essa observação pode explicar o porquê, na visão geral, os animais infectados pela cepa ATCC produziram menos citocinas pró-inflamatórias que os animais infectados com a cepa N315; uma vez que a internalização do *S. aureus* pode ser entendido como um fator de virulência, pois funciona como uma forma de evadir do sistema imunológico, pode-se entender que as bactérias da cepa ATCC conseguiram evadir melhor do sistema imunológico que as bactérias da cepa N315, pois estimularam maior expressão da via PI3K.

Já o aumento na expressão da via PI3K apenas em grupos de animais diabéticos aponta que o DM faz com que os animais sejam mais suscetíveis à infecção, como observado também em humanos.

A exposição a produtos bacterianos (PAMPs) no fígado estimulam a resposta proliferativa e a secreção de citocinas como IL-1β, lL-6, TNF-α (STRAZZABOSCO *et al*, 2017).

Os estudos de SASAKI *et al* e ARAI *et al*, 1997, corroboram a teoria de que a ausência de IL-10 aumenta significativamente a inflamação induzida por S*. aureus*. Este fenômeno é provavelmente devido ao aumento da produção de citocinas Th1 tais como TNF-α, e uma carga bacteriana mais pesada. Como nesse estudo também encontramos dosagens indetectáveis dessa citocina (IL-10) no baço dos animais não diabéticos, e nos rins dos animais de todos os grupos, e ainda assim, não foi possível detectar a expressão de TNF-α em nenhum dos órgãos estudados, para nenhum grupo, torna-se interessante a busca de uma possível correlação entre os trabalhos, uma vez que a IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória, que atua na inibição da produção de IL-12 e na redução da expressão de moléculas de MHC classe II.

Na produção de citocinas em fígado de animais não diabéticos, a insulina aumentou, ainda que não às concentrações basais, as citocina que apresentaram-se diminuídas na infecção com ambas as cepas, exceto na produção da citocina anti inflamatória IL-10 na infecção pela cepa ATCC, onde a insulina não aumentou essa produção nesses animais não diabéticos. Já no fígado dos animais diabéticos, observa-se que o tratamento com insulina não foi eficaz na reversão do quadro inflamatório, na infecção com a cepa N315, o que sugere que o fígado dos animais diabéticos não responde ao tratamento com insulina tão bem quanto o fígado dos animais não diabéticos.

Em linfonodos peritoniais percebemos que, em animais não diabéticos, a insulina diminuiu a produção de IL-4, que estava aumenta na infecção pela cepa N315, quando comparado aos animais não infectados, mas também diminuiu a produção de IL-1β e IL-10, nessa mesma infecção. Nesse mesmo órgão em animais diabéticos é possível observar que a insulina aumentou a produção de citocinas alteradas na infecção pela cepa N315, exceto para a Il-4, e na infecção pela cepa ATCC, a insulina aumenta a produção de IL-4 diminuída na infecção, mas aumenta a produção de outras citocinas e quimiocinas. Nesse caso também podemos observar que os linfonodos peritoniais de animais diabéticos produziram mais citocinas na vigência das infecções que os dos animais não diabéticos.

No baço, verifica-se que a insulina aumentou a produção de IL-1β na vigência da infecção pela cepa ATCC, que não encontrava-se alterada pela infecção, tanto no grupo não diabético quanto no grupo diabético. Também é possível verificar que a insulina não alterou a produção de citocinas pró-inflamatórias na vigência da infecção pela cepa N315 no grupo diabético. Nesse órgão também podemos observar que os animais diabéticos foram mais afetados pelas infecções que os animais não diabéticos.

Com base nos resultados desse trabalho, verificamos que os órgãos que mais responderam tanto às infecções quanto ao tratamento, foram o fígado e os linfonodos peritoniais, e também podemos concluir que os animais diabéticos apresentaram maior suscetibilidade à infecção que os animais não diabéticos, para todos os órgãos estudados.

7. Conclusões

Os resultados obtidos sugerem que o tratamento com insulina possa modular parcialmente a produção das citocinas IL-1β, TNF-α e IL-10 no fígado e nos linfonodos peritoniais dos animais infectados principalmente pela cepa N315 de *S.aureus*, pois modulam parcialmente a expressão das moléculas da via de sinalização (MAPK e PKC) envolvidas na produção dessas citocinas.

- Não foram observadas diferenças estatisticas significativas na expressão das moléculas das vias de sinalização MAPK, PKC e PI3K em homogenatos de fígado estudadas.

- Em fígado dos animais diabéticos e não diabéticos, infectados pela cepa ATCC 25923, a infecção ativou a resposta inflamatória de fase aguda, e o tratamento mostrou produção de citocinas ligadas à resolução da infecção. Com a cepa N315 em animais não diabéticos, a insulina estimulou a produção de citocinas de fase aguda, que estavam prejudicadas na infecção, já em animais diabéticos, a insulina não melhorou a resposta inflamatória.

- Em baço, na infecção com a cepa ATCC 25923 em animais diabéticos e não diabéticos, a insulina diminuiu a produção de citocina de fase aguda. Na infecção com a cepa N315, em animais não diabéticos, nem a infecção e nem o tratamento alteraram a produção de citocinas; já em animais diabéticos, a infecção diminuiu a produção de citocinas de fase aguda, e o tratamento não modificou isso.

- Em rim, apenas o grupo diabético infectado pela cepa N315 mostrou diferença na produção de citocinas, onde a infecção diminuiu a produção de citocina de fase crônica, e a insulina não alterou essa produção.

- Em linfonodos de animais não diabéticos, a cepa ATCC 25923 não mostrou diferença na produção de citocinas nos diferentes grupos, em animais diabéticos, a insulina ativou a produção de citocinas de fase aguda. Na infecção com a cepa N315, a insulina ativou a resposta Th1 e diminuiu a produção de citocina anti-inflamatória; em animais diabéticos, a infecção gerou uma resposta de citocinas de fase aguda, e a insulina manteve a infecção nessa fase, e citocina anti-inflamatória começou a ser produzida.

8. Referências

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia básica**. 4. ed. Rio de Janeiro; Elservier, 2013.

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

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

ANWAR, S.; PRINCE, L. R.; FOSTER, S. J.; WHYTE, M. K. B.; SABROE, I. The rise and rise of *Staphylococcus aureus*: laughing in the face of granulocytes. **Clin Exper Immunol**. V.157: 216–224, 2009.

BANCHEREAU, R.; JORDAN-VILLEGAS, A.; ARDURA, M.; MEJIAS, A.; BALDWIN, N.; XU, H. *et al*. Host immune transcriptional profiles reflect the variability in clinical disease manifestations in patients with *Staphylococcus aureus* infections. **PLoS ONE**. 7(4): e34390. doi:10.1371/journal.pone.0034390, 2012.

BARRETI, P. *et al*. Peritonal dialyses-related peritonitis due to *Staphylococcus aureus*: A single-center experience over 15 years. **PLoS ONE**. San Francisco, V. 7, n. 2, e. 3178, 2012.

BENSINGER, J. S.; TONTONOZ, P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-actived nuclear receptors. **Nature.** 454(7203): 470-7, 2008.

BI, L.; CHIANG, J. Y. L.; DING, W. X., DUNN, W.; ROBERTS, B.; LI, T. Saturated fatty acids activate ERK signaling to downregulate hepatic sortilin 1 in obese and diabetic mice. **Journal of lipid research**; 54(10):2754-62, 2013.

BIRKENFELD, A. L.; SHULMAN, G. I. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. **Hepatology**. 59:713-723, 2014.

BOUCHER, J.; KLEINRIDDERS, A.; KAHN, R. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States, **Cold Spring Harb Perspect Biology**, 2014.

CARVALHO, K. S.; MAMIZUKA, E. M.; GONTIJO FILHO, P. P. Methicillin/Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. **Braz J Infect Dis**,14(1):71-76, 2010.

CUADRADO, A.; NEBREDA, A. R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. **Biochem. J**. 429, 403–417, 2010.

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

DELAMAIRE, M.; MAUGENDRE, D.; MORENO, M. L. E.; GOFF, M. C.; ALLANNIC, H.; GENETET, B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. **Diabetic Med**, 14(1):29-34, 1997.

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

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

FRODERMANN, V.; CHAU, T. A.; SAYEDYAHOSSEIN, S.; TOTH, J. M.; HEINRICHS, D. E.; MADRENAS, J. A modulatory interleukin-10 response to staphylococcal peptidoglycan prevents Th1/Th17 adaptive immunity to *Staphylococcus aureus*. **J Inf Dis**. 204(2): 253-62, 2011.

GERBER, J. S.; COFFIN, S. E.; SMATHERS, S. A.; ZAOUTIS, T. E. Trends in the Incidence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection in Children's Hospitals in the United States. **Clin Infect Dis**, 49(1): 65–71, 2009.

GOVINDARAJULU, S. *et al*. *Staphylococcus aureus* peritonitis in Australian peritonial dialyses peritonitis. **Peritonial Dialyses International**, Downsview, v. 30, n. 3, p. 311-319, 2010.

GREGHI, S. L. A. Ativação quantitativa das citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-1º e TGF-β, presentes na saliva de pacientes com periodontite, antes e após a submissão à psicoterapia: análise comparativa com pacientes controles. **Tese (Livre Docência em Periodontia). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo**, Bauru, 2011.

HANSES, F.; PARK, S.; RICH, J.; LEE, J. C. Reduced Neutrophil Apoptosis in Diabetic Mice during Staphylococcal Infection Leads to Prolonged TNF-alfa Production and Reduced Neutrophil Clearance. **PLoS ONE** 6(8): e23633. doi:10.1371/journal.pone.0023633, 2011.

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

KIM. E.K.; CHOI, E.J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases**. Biochim Biophys Acta.** 2010 Apr;1802(4):396-405, 2010.

KIM, H.; ZAMEL, R.; BAI, X. H.; LIU, M. PKC Activation Induces Inflammatory Response and Cell Death in Human Bronchial Epithelial Cells. **PLoS One**. 8(5): e64182, 2013.

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

KVIETYS, P.; NEIL GRANGER, D. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. **Free Radic Biol Med**. 52(3): 556-92, 2012.

MATSUI, K.; NISHIKAWA, A. Peptidoglycan From *Staphylococcus aureus* Induces TH2 Immune **Response in Mice. J Investig Allergol Clin Immunol**. 22(2): 80-86, 2012.

MELLOR, H; PARKER, P. J. The extended protein kinase C superfamily. **Biochem. J**. 332, 281–292, 1998.

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

MESSINA, J. L. Hormonal control of growth (Kostoyo J. L., ed). **Oxford University Press**, New York. V: 783-811, 1999.

MONECKE, S. *et al*. Comparative genomics and DNA array-based genotyping of pandemic *Staphylococcus aureus* strains encoding Panton-Valentine leucocidin. **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 13, n. 3, p. 263-249, 2007.

MULLER, W. A. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. **Circ Res**. 105(3): 223-30, 2009.

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

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

OLSEN, K; FALCH, B. M.; DANIELSEN, K.; JOHANNESSEN, M.; SOLLID, J. U. E.; THUNE, I.; GRIMNES, G.; JORDE, R.; SIMONSEN, G. S.; FURBERG, A-S. *Staphylococcus aureus* nasal carriage is associated with serum 25-hydroxyvitamin D levels, gender and smoking status. The Tromsø Staph and Skin Study. **Eur J Clin Microbiology Infect Diseases**, 31:465–473, 2012a.

OLSEN, K.; SANGVIK, M.; SIMONSEN, G. S.; SOLLID, J. U. E.; SUNDSFJORD, A.; THUNE, I.; FURBERG A-S. Prevalence and population structure of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in healthcare workers in a general population. **The Tromsø Staph and Skin Study. Epidemiol Infect**, 1-10. doi:10.1017/S0950268812000465, 2012b.

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

OVIDEO-BOYSO, J.; CORTE´S-VIEYRA, R.; HUANTE-MENDOZA, A.; YU, H. B.; VALDEZ-ALARCÓN, J. J.; BRAVO-PATIÑO, A.; CAJERO-JUÁREZ, M.; FINLAY, B. B.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M. The phosphoinositide-3-Kinase–Akt signaling pathway is important for *Staphylococcus aureusi* internalization by endothelial cells. **Infection and immunity**, p. 4569–4577. Volume 79, 2011.

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

PETERSEN, M. C.; VATNER, D. F.; SHULMAN, G. I. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**. Published Online. doi:10.1038/nrendo.2017.80, 2017.

PIRAINO, B. Can we reduce rates of *Staphylococcus aureus* and other peritonitis in peritonial dialyses patients? **Peritonial Dialyses**, Downsview, v. 30, n. 3, p. 277-279, 2010.

RICH, J.; LEE, J. C. The Pathogenesis of Staphylococcus aureus Infection in the Diabetic NOD Mouse. **Diabetes**, 54:2904-10, 2005.

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

SHUKLA, S. K.; PANTRANGI, M.; STAHL, B.; BRISKA, A. M.; STEMPER, M. E.; WAGNER, T. K. *et al*. Comparative whole-genome mapping to determine *Staphylococcus aureus* genome size, virulence motifs, and clonality. J**. Clin Microbiology**. 50(11): 3526-33, 2012.

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

SOUZA, P. R. K. **Papel da insulina na vigência da peritonite decorrente da infecção por *Staphylococcus aureus* em animais diabéticos e sadios**. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9136/tde-23102015-145645/>. Acesso em: 2016-02-24, 2015.

STRAZZBOSCO, M.; FIOROTTO, R.; CADAMURO, M.; SPIRLI, C.; MARIOTTI, V.; KAFFE, E.; SCIRPO, R.; FABRIS, L. Pathophysiologic implications of innate immunity and autoinflammation in the biliary epithelium. **BBA - Molecular Basis of Disease**. S0925-4439(17)30255-7, 2017.

VIDAL, P. M.; TRINDADE, P. A.; GARCIA, T. O.; PACHECO R. L.; COSTA, S. F.; REINERT, C. *et al*. Differences between “classical” risk factors for infections caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and risk factors for nosocomial bloodstream infections caused by multiple clones of the staphylococcal cassette chromosome mec type IV MRSA strain. Infect. **Control and Hosp. Epidemiology**. 30(2): 139-45, 2009.

WARREN, R. *Staphylococcus aureus*: A cross sectional study of prevalence and risk factors in one general practice. **Australian Family Physcian**, (5): 325-8, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Diabetes 2016: Fact Sheet**, 312. Disponível em: http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2016/en/ Acessado em 10 de junho de 2017.

ZHOU, Z. *et al*. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. **Cellular & Molecular Immunology**. 13, 301-325, 2016.

ZIMMERMAN, S. W. *et al*. *Staphylococcus aureus* peritonial catheter-related infections: A cause catheter loss and peritonitis. **Peritonial Dialyses International**, v.8, p. 191-4, 1998.

9. ANEXOS

9. Anexo A – Certificado de aprovação do projeto “Efeito da insulina na ativação das vias de sinalização em peritonite induzida por *Staphylococcus aureus* em animais diabéticos e sadios” sob responsabilidade da pesquisadora Mariana Cristina Ferreira Silva (Protocolo CEUA/FCF/495).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF **23.2015-P495**

CERTIFICADO

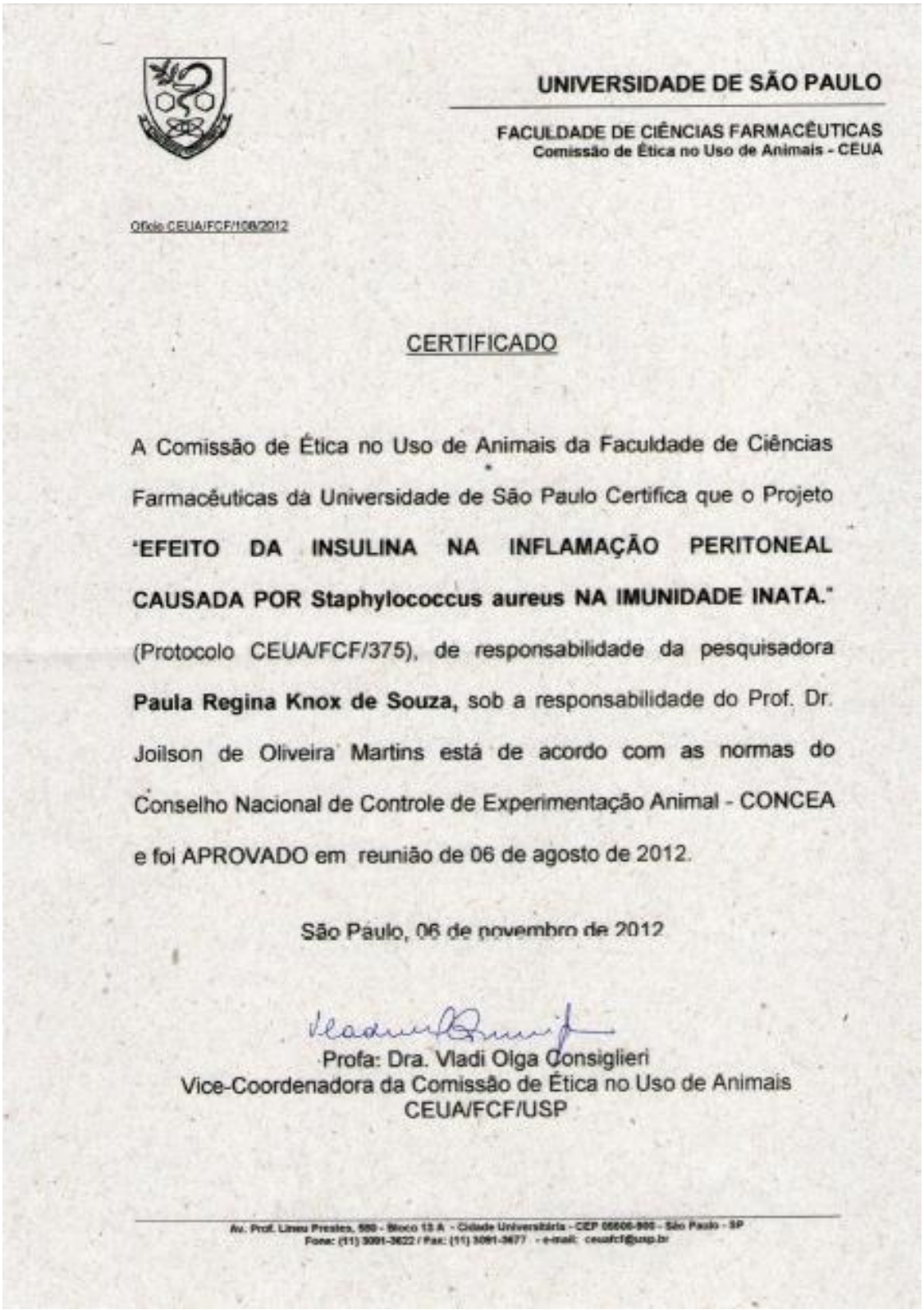
A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Efeito da insulina na ativação das vias de sinalização em peritonite induzida por Staphylococcus aureus em animais diabéticos e sadios**" (Protocolo CEUA/FCF/495), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Mariana Cristina Ferreira Silva**, sob orientação do(a) **Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de **10 de abril de 2015**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 15 de abril de 2015.

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

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

9. Anexo B – Certificado de aprovação do projeto “Efeito da insulina na inflamação peritonial causada por *Staphylococcus aureus* na imunidade inata” sob responsabilidade da pesquisadora Paula Regina Knox de Souza (Protocolo CEUA/FCF/375)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF/108/2012

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **"EFEITO DA INSULINA NA INFLAMAÇÃO PERITONEAL CAUSADA POR Staphylococcus aureus NA IMUNIDADE INATA."** (Protocolo CEUA/FCF/375), de responsabilidade da pesquisadora **Paula Regina Knox de Souza,** sob a responsabilidade do Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 06 de agosto de 2012.

São Paulo, 06 de novembro de 2012

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

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

9. Anexo C – Ficha do aluno.

22/07/2017

JUPITER - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

FICHA DO ALUNO

9142 - 33811181/1 - Mariana Cristina Ferreira Silva

Email:	marianac@usp.br
Data de Nascimento:	19/02/1982
Cédula de Identidade:	RG - 32.170.253-0 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Tecnólogo Ambiental Industrial - Faculdade Senai de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2008

Curso:	Mestrado
Programa:	Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área:	Fisiopatologia
Data de Matrícula:	06/02/2015
Início da Contagem de Prazo:	06/02/2015
Data Limite para o Depósito:	07/08/2017
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Jolson de Oliveira Martins - 10/08/2016 até o presente. Email: martinsj@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 06/02/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 06/04/2016
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 06/02/2015

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017
Impresso em: 22/07/2017 17:20:28

JUPITER - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

FICHA DO ALUNO

9142 - 33811181/1 - Mariana Cristina Ferreira Silva

22/07/2017

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5793-12/2	Tópicos em Análises Clínicas I	03/03/2015	16/06/2015	15	1	100	A	N	Concluída
BTC5743-3/3	Seminários Gerais (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	11/03/2015	23/06/2015	30	2	100	A	N	Concluída
BMF5879-1/2	Introdução à Segurança Química de Laboratório de Pesquisa (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	07/04/2015	08/06/2015	90	6	100	A	N	Concluída
BTC5828-1/2	Biossegurança em Laboratórios (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	10/04/2015	18/06/2015	60	4	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Publicação do trabalho no Cellular Physiology and Biochemistry, com o trabalho intitulado: "Insulin Modulates Liver Function in a Type I Diabetes Rat Model", v. 36, p. 1467 - 1479 - 2015 (1)	12/05/2015	12/05/2015	-	1	-	-	-	-
FBC5757-6/2	Tópicos em Análises Clínicas II	04/08/2015	16/11/2015	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5722-2/4	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	19/10/2015	08/11/2015	60	4	100	A	N	Concluída
BTC5818-1/2	Métodos de Estudo de Fatores de Virulência de Bactérias Patogênicas (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	06/04/2016	07/06/2016	90	6	87	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	25
Estágios:			
Total:	0	25	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o Artigo 64 do Regimento de Pós-Graduação e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 13/04/2016.

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 22/07/2017 17:20:28

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9142 - 3381191/1 - Mariana Cristina Ferreira Silva

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
2221164	Jolson de Oliveira Martins	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 22/07/2017 17:20:29

10. APÊNDICES

Valores individuais das concentrações de IL-1β em amostras de fígado. Tabela dos resultados individuais referentes à Figura 2. Os valores estão expressos em pg/mL.

	Concentração de IL-1β (pg/mL)									
Animal	**Cs**	**Catcc**	**Catcc+i**	**Cn315**	**Cn315+i**	**Ds**	**Datcc**	**Datcc+i**	**Dn315**	**Dn315+i**
1	148,31	129,95	129,95	i	i	383,22	204,88	243,02	169,10	160,18
2	98,71	111,32	121,71	61,85	123,78	362,77	227,30	211,60	106,83	111,26
3	107,13	127,90	94,46	85,91	81,60	385,49	405,99	i	i	160,18
4	92,34	i	117,56	88,06	94,46	396,87	270,02	319,70	124,58	i
5	123,78	190,34	77,27	111,32	202,19	i	i	492,87	256,51	236,28
6	NE	123,78	154,38	72,90	i	NE	292,58	303,87	220,56	256,51
7	NE	160,43	172,45	92,34	117,56	NE	308,39	i	157,95	200,40
Média	114,1	140,6	124,0	85,4	123,9	382,1	284,9	314,2	172,6	187,5
Desvio Padrão	22,5	29,3	32,7	17,0	47,0	14,2	71,0	109,1	56,9	54,1
Erro Padrão	10,1	11,7	12,4	6,9	21,0	7,1	29,0	48,8	23,2	22,1

CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.
NE= Animal não existente.
i= dosagem não detectável.

Valores individuais das concentrações de TNF-α em amostras de fígado. Tabela dos resultados individuais referentes à Figura 3 Os valores estão expressos em pg/mL.

	Concentração de TNF-α (pg/mL)									
Animal	**Cs**	**Catcc**	**Catcc+i**	**Cn315**	**Cn315+i**	**Ds**	**Datcc**	**Datcc+i**	**Dn315**	**Dn315+i**
1	42,62	31,83	35,91	27,62	34,80	27,95	29,07	29,53	27,05	29,75
2	31,17	30,78	37,46	23,92	31,17	34,58	25,49	28,17	25,49	27,72
3	37,46	27,62	32,23	27,49	25,20	28,62	26,38	29,75	27,72	28,62
4	29,75	22,90	28,74	26,76	32,89	30,21	26,38	28,40	27,72	25,49
5	34,66	28,61	31,30	27,37	31,43	32,27	44,28	32,27	28,62	28,40
6	NE	34,11	16,53	31,04	40,08	NE	29,07	31,12	27,95	27,95
7	NE	36,89	31,70	19,96	30,39	NE	26,60	29,75	26,16	26,82
Média	35,1	30,4	30,6	26,3	32,3	30,7	29,6	29,9	27,2	27,8
Desvio Padrão	5,2	4,6	6,8	3,5	4,5	2,7	6,6	1,4	1,1	1,4
Erro Padrão	2,3	1,7	2,6	1,3	1,7	1,2	2,5	0,5	0,4	0,5

CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.
NE= Animal não existente.
i= dosagem não detectável.

Valores individuais das concentrações de IL-4 em amostras de fígado. Tabela dos resultados individuais referentes à Figura 4. Os valores estão expressos em pg/mL.

	Concentração de IL-4 (pg/mL)									
Animal	**Cs**	**Catcc**	**Catcc+i**	**Cn315**	**Cn315+i**	**Ds**	**Datcc**	**Datcc+i**	**Dn315**	**Dn315+i**
1	35,05	27,71	24,18	28,60	54,93	37,52	18,58	30,68	29,84	14,06
2	36,94	28,60	34,11	22,46	31,33	23,30	25,72	24,91	22,50	11,16
3	36,94	26,81	27,71	25,05	25,05	23,30	28,18	24,91	23,30	13,32
4	28,60	23,32	25,93	28,60	30,41	24,91	29,01	33,21	21,71	11,87
5	32,25	35,05	30,41	28,60	29,51	20,92	i	35,78	24,10	13,32
6	NE	28,60	29,51	27,71	41,77	NE	20,14	26,54	i	16,30
7	NE	26,81	34,11	25,93	29,51	NE	21,71	31,52	i	22,50
Média	34,0	28,1	29,4	26,7	34,6	26,0	23,9	29,6	24,3	14,6
Desvio Padrão	3,6	3,5	3,8	2,4	10,3	6,6	4,4	4,3	3,2	3,8
Erro Padrão	1,6	1,3	1,4	0,9	3,9	3,0	1,8	1,6	1,4	1,4

CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.
NE= Animal não existente.
i= dosagem não detectável.

Valores individuais das concentrações de IL-10 em amostras de fígado. Tabela dos resultados individuais referentes à Figura 5. Os valores estão expressos em pg/mL.

	Concentração de IL-10 (pg/mL)									
Animal	**Cs**	**Catcc**	**Catcc+i**	**Cn315**	**Cn315+i**	**Ds**	**Datcc**	**Datcc+i**	**Dn315**	**Dn315+i**
1	293,15	150,08	181,98	i	240,09	110,42	149,40	204,32	122,63	177,68
2	232,07	202,81	178,74	75,98	174,43	206,47	124,68	159,82	89,26	159,82
3	209,49	144,88	122,43	111,46	116,42	180,85	173,46	i	134,93	175,57
4	192,89	96,81	125,45	146,95	202,81	251,24	95,28	178,74	117,53	104,35
5	205,03	190,70	127,47	126,46	164,82	251,24	i	194,68	135,96	154,60
6	NE	132,55	132,55	116,42	296,78	NE	138,02	229,24	135,96	182,97
7	NE	121,42	234,36	127,47	112,45	NE	97,29	170,30	103,34	195,75
Média	226,5	148,5	157,6	117,5	186,8	200,0	129,7	189,5	119,9	164,4
Desvio Padrão	39,9	37,4	42,3	23,7	66,2	58,5	30,4	25,3	18,1	29,9
Erro Padrão	17,8	14,1	16,0	9,7	25,0	26,2	12,4	10,3	6,8	11,3

CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.
NE= Animal não existente.
i= dosagem não detectável.

Valores individuais das concentrações de IL-1β em amostras de linfonodo peritonial. Tabela dos resultados individuais referentes à Figura 8. Os valores estão expressos em pg/mL.

	Concentração de IL-1β (pg/mL)									
Animal	**Cs**	**Catcc**	**Catcc+i**	**Cn315**	**Cn315+i**	**Ds**	**Datcc**	**Datcc+i**	**Dn315**	**Dn315+i**
1	166,74	177,30	150,94	92,92	103,43	153,60	135,41	227,86	218,89	216,87
2	99,61	296,80	146,13	152,34	54,82	214,41	218,26	i	i	185,45
3	164,05	100,42	130,89	i	69,82	205,7	183,46	454,65	335,57	275,96
4	134,45	i	110,68	92,54	95,91	139,7	229,7	528,27	i	i
5	i	122,13	i	132,14	50,73	88,17	99,43	143,32	275,32	141,60
6	NE	144,39	111,89	187,20	i	NE	189,18	318,79	204,73	269,05
7	NE	294,38	76,03	99,65	81,90	NE	i	544,72	408,69	i
Média	141,2	189,2	121,1	126,1	76,0	160,2	175,9	369,6	288,6	217,8
Desvio Padrão	31,4	86,2	27,7	38,4	21,6	51,5	49,8	165,5	84,7	56,7
Erro Padrão	15,7	35,5	11,1	15,7	8,8	23,0	20,3	67,6	37,9	25,4

CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.
NE= Animal não existente.
i= dosagem não detectável.

Valores individuais das concentrações de TNF-α em amostras de linfonodo peritonial. Tabela dos resultados individuais referentes à Figura 9. Os valores estão expressos em pg/mL.

	Concentração de TNF-α (pg/mL)									
Animal	**Cs**	**Catcc**	**Catcc+i**	**Cn315**	**Cn315+i**	**Ds**	**Datcc**	**Datcc+i**	**Dn315**	**Dn315+i**
1	4,10	2,12	2,77	3,72	2,34	4,91	3,86	9,17	8,19	10,59
2	6,93	3,07	3,27	2,12	1,97	5,78	6,14	5,08	3,06	13,61
3	i	3,37	5,42	9,40	1,79	11,81	4,58	8,72	3,65	9,05
4	2,82	1,02	4,08	2,12	1,78	6,57	8,87	9,04	2,08	3,49
5	4,47	5,01	14,94	5,05	1,61	6,42	5,27	9,18	17,11	4,98
6	NE	4,90	10,84	5,16	0,72	NE	5,75	10,01	7,68	8,84
7	NE	6,49	3,94	2,08	2,19	NE	9,58	9,87	19,65	2,31
Média	4,6	3,7	6,5	4,2	1,8	7,1	6,3	8,7	8,8	7,6
Desvio Padrão	1,7	1,9	4,6	2,6	0,5	2,7	2,1	1,7	7,0	4,1
Erro Padrão	0,9	0,7	1,7	1,0	0,2	1,2	0,8	0,6	2,6	1,5

CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.
NE= Animal não existente.
i= dosagem não detectável.

Valores individuais das concentrações de IL-4 em amostras de linfonodo peritonial. Tabela dos resultados individuais referentes à Figura 10. Os valores estão expressos em pg/mL.

	Concentração de IL-4 (pg/mL)									
Animal	**Cs**	**Catcc**	**Catcc+i**	**Cn315**	**Cn315+i**	**Ds**	**Datcc**	**Datcc+i**	**Dn315**	**Dn315+i**
1	101,78	106,41	96,77	174,86	98,09	---	44,66	---	73,91	3,45
2	105,19	132,36	123,60	146,14	67,78	89,16	88,40	64,71	43,06	i
3	76,07	98,65	101,97	180,64	80,10	122,70	55,36	98,84	53,13	i
4	101,30	i	103,02	i	81,66	77,90	87,89	78,50	i	8,26
5	i	127,98	i	103,82	66,47	98,47	71,89	77,47	i	11,44
6	NE	208,15	187,56	165,31	52,80	NE	54,40	91,97	13,59	i
7	NE	234,08	139,60	113,60	84,49	NE	79,71	83,52	38,21	6,86
Média	96,1	151,3	125,4	147,4	75,9	97,1	68,9	82,5	44,4	5,0
Desvio Padrão	13,5	56,2	34,5	34,5	14,7	19,1	17,5	12,0	22,0	4,6
Erro Padrão	6,7	22,9	14,1	14,1	5,6	9,5	6,6	4,9	9,8	2,3

CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.
NE= Animal não existente.
i= dosagem não detectável.

Valores individuais das concentrações de IL-10 em amostras de linfonodo peritonial. Tabela dos resultados individuais referentes à Figura 11. Os valores estão expressos em pg/mL.

	Concentração de IL-10 (pg/mL)									
Animal	**Cs**	**Catcc**	**Catcc+i**	**Cn315**	**Cn315+i**	**Ds**	**Datcc**	**Datcc+i**	**Dn315**	**Dn315+i**
1	444,03	496,13	366,43	442,62	274,41	411,11	223,84	167,47	i	326,45
2	418,20	391,95	408,84	441,86	180,55	250,39	249,58	334,47	180,46	450,75
3	i	339,65	253,70	491,45	272,84	310,79	360,22	330,19	81,87	434,73
4	i	215,00	425,36	i	303,82	372,12	285,25	500,64	137,46	236,13
5	659,05	i	i	336,88	231,04	354,16	336,46	185,40	87,99	296,40
6	NE	132,23	537,61	453,21	144,79	NE	477,53	379,58	138,69	493,41
7	NE	i	383,90	296,76	206,31	NE	299,84	i	i	i
Média	507,1	315,0	396,0	410,5	230,5	339,7	319,0	316,3	125,3	373,0
Desvio Padrão	132,2	143,8	92,0	75,8	57,0	61,6	84,2	124,7	40,8	101,1
Erro Padrão	76,3	64,3	37,6	31,0	21,6	27,5	31,8	50,9	18,2	41,3

CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.
NE= Animal não existente.
i= dosagem não detectável.

Valores individuais das concentrações de CINC-1 em amostras de linfonodo peritonial. Tabela dos resultados individuais referentes à Figura 12. Os valores estão expressos em pg/mL.

	Concentração de CINC-1 (pg/mL)									
Animal	**Cs**	**Catcc**	**Catcc+i**	**Cn315**	**Cn315+i**	**Ds**	**Datcc**	**Datcc+i**	**Dn315**	**Dn315+i**
1	14,88	11,51	14,33	24,98	12,66	13,56	i	22,15	32,63	28,80
2	21,58	16,03	14,97	18,54	8,68	18,04	17,48	i	i	21,72
3	9,46	14,35	23,25	39,86	11,84	15,27	16,37	51,53	30,52	28,03
4	13,32	i	16,27	8,30	10,98	12,30	23,24	26,45	i	10,09
5	27,21	17,84	i	20,97	8,52	13,16	17,77	56,04	44,49	14,72
6	NE	36,72	43,93	24,16	i	NE	29,36	53,57	28,81	10,38
7	NE	35,66	26,20	11,51	10,54	NE	33,08	65,79	35,32	i
Média	17,3	22,0	23,2	21,2	10,5	14,5	22,9	45,9	34,4	19,0
Desvio Padrão	7,1	11,2	11,3	10,3	1,7	2,3	7,0	17,5	6,2	8,5
Erro Padrão	3,2	4,2	4,3	3,9	0,6	1,0	2,6	6,6	2,3	3,2

CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.
NE= Animal não existente.
i= dosagem não detectável.

Valores individuais das concentrações de CINC-2 em amostras de linfonodo peritonial. Tabela dos resultados individuais referentes à Figura 13. Os valores estão expressos em pg/mL.

	Concentração de CINC-2 (pg/mL)									
Animal	**Cs**	**Catcc**	**Catcc+i**	**Cn315**	**Cn315+i**	**Ds**	**Datcc**	**Datcc+i**	**Dn315**	**Dn315+i**
1	25,21	20,45	12,90	17,37	15,49	i	i	i	i	i
2	9,55	19,75	21,01	17,94	12,56	i	i	i	i	i
3	12,47	15,52	9,79	9,86	12,80	i	i	i	i	i
4	16,11	8,44	11,27	7,35	12,53	i	i	i	i	i
5	29,97	14,79	25,70	15,09	9,95	i	i	i	i	i
6	NE	22,41	18,63	14,43	7,72	NE	i	68,27	i	i
7	NE	16,26	11,55	15,84	14,40	NE	i	i	i	i
Média	18,7	16,8	15,8	14,0	12,2	i	i	68,3	i	i
Desvio Padrão	8,6	4,6	6,0	3,9	2,6	i	i	i	i	i
Erro Padrão	3,9	1,8	2,3	1,5	1,0	i	i	i	i	i

CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.

NE= Animal não existente.

i= dosagem não detectável.

Valores individuais das concentrações de CINC-3 em amostras de linfonodo peritonial. Tabela dos resultados individuais referentes à Figura 14. Os valores estão expressos em pg/mL.

	Concentração de CINC-3 (pg/mL)									
Animal	**Cs**	**Catcc**	**Catcc+i**	**Cn315**	**Cn315+i**	**Ds**	**Datcc**	**Datcc+i**	**Dn315**	**Dn315+i**
1	16,71	i	4,11	7,62	9,77	6,27	2,08	12,24	13,55	i
2	6,11	7,58	4,61	8,95	6,00	4,67	i	18,49	i	15,89
3	7,45	7,29	1,50	8,66	11,40	i	7,69	i	13,23	i
4	5,29	3,35	14,62	6,84	3,70	i	i	16,34	i	i
5	i	11,41	i	i	3,97	6,80	13,08	i	i	i
6	NE	16,03	1,71	i	4,32	NE	i	i	i	i
7	NE	12,81	9,42	12,52	5,02	NE	i	i	i	4,78
Média	8,9	9,7	5,1	7,4	6,3	3,5	3,8	7,8	4,5	3,0
Desvio Padrão	5,3	4,5	5,2	4,1	3,1	3,3	5,4	8,8	6,9	6,0
Erro Padrão	2,6	1,9	2,1	1,8	1,2	1,9	2,7	4,4	4,0	4,2

CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.
NE= Animal não existente.
i= dosagem não detectável.

Valores individuais das concentrações de IL-1β em amostras de baço. Tabela dos resultados individuais referentes à Figura 17. Os valores estão expressos em pg/mL.

	Concentração de IL-1β (pg/mL)									
Animal	**Cs**	**Catcc**	**Catcc+i**	**Cn315**	**Cn315+i**	**Ds**	**Datcc**	**Datcc+i**	**Dn315**	**Dn315+i**
1	521,48	1085,05	507,51	561,51	414,27	373,31	554,34	322,36	212,38	260,49
2	i	776,55	595,67	825,92	533,47	459,41	1147,22	353,49	237,03	339,79
3	i	846,57	782,71	537,47	445,90	451,02	i	i	269,66	253,22
4	711,12	i	823,86	694,83	605,74	590,00	621,68	361,39	361,39	367,34
5	908,77	940,01	723,35	589,63	525,48	635,40	i	341,74	326,21	355,46
6	NE	717,23	549,48	449,86	525,48	NE	796,37	353,49	312,78	324,29
7	NE	844,50	501,53	601,71	642,09	NE	523,63	467,85	293,84	288,21
Média	713,8	868,3	640,6	608,7	527,5	501,8	728,6	366,7	287,6	312,7
Desvio Padrão	193,7	129,9	134,2	120,8	80,4	107,8	256,7	51,4	51,9	45,7
Erro Padrão	111,8	53,0	50,7	45,7	30,4	48,2	114,8	21,0	19,6	17,3

CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.
NE= Animal não existente.
i= dosagem não detectável.

Valores individuais das concentrações de TNF-α em amostras de baço. Tabela dos resultados individuais referentes à Figura 18. Os valores estão expressos em pg/mL.

	Concentração de TNF-α (pg/mL)									
Animal	**Cs**	**Catcc**	**Catcc+i**	**Cn315**	**Cn315+i**	**Ds**	**Datcc**	**Datcc+i**	**Dn315**	**Dn315+i**
1	12,72	11,53	17,45	11,53	22,54	26,94	28,78	26,33	18,93	23,10
2	i	14,26	13,95	26,84	16,15	26,53	40,53	28,78	25,32	22,10
3	11,53	16,80	21,15	18,11	20,46	28,58	66,64	24,51	24,10	22,90
4	21,84	8,69	16,15	19,78	17,78	28,78	30,23	23,50	21,70	20,70
5	14,88	14,57	20,80	19,78	27,21	30,85	27,15	26,53	19,32	22,90
6	NE	17,12	17,12	22,54	16,80	NE	23,30	26,53	24,71	21,30
7	NE	17,78	19,78	19,11	15,83	NE	23,90	19,12	24,51	17,94
Média	15,2	14,4	18,1	19,7	19,5	28,3	34,4	25,0	22,7	21,6
Desvio Padrão	4,6	3,3	2,6	4,6	4,2	1,7	15,3	3,1	2,7	1,8
Erro Padrão	2,3	1,2	1,0	1,8	1,6	0,8	5,8	1,2	1,0	0,7

CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.
NE= Animal não existente.
i= dosagem não detectável.

Valores individuais das concentrações de IL-4 em amostras de baço. Tabela dos resultados individuais referentes à Figura 19. Os valores estão expressos em pg/mL.

	Concentração de TNF-α (pg/mL)									
Animal	**Cs**	**Catcc**	**Catcc+i**	**Cn315**	**Cn315+i**	**Ds**	**Datcc**	**Datcc+i**	**Dn315**	**Dn315+i**
1	12,72	11,53	17,45	11,53	22,54	26,94	28,78	26,33	18,93	23,10
2	i	14,26	13,95	26,84	16,15	26,53	40,53	28,78	25,32	22,10
3	11,53	16,80	21,15	18,11	20,46	28,58	66,64	24,51	24,10	22,90
4	21,84	8,69	16,15	19,78	17,78	28,78	30,23	23,50	21,70	20,70
5	14,88	14,57	20,80	19,78	27,21	30,85	27,15	26,53	19,32	22,90
6	NE	17,12	17,12	22,54	16,80	NE	23,30	26,53	24,71	21,30
7	NE	17,78	19,78	19,11	15,83	NE	23,90	19,12	24,51	17,94
Média	15,24	14,39	18,06	19,67	19,54	28,34	34,36	25,04	22,65	21,56
Desvio Padrão	4,61	3,30	2,64	4,63	4,17	1,71	15,34	3,10	2,67	1,83
Erro Padrão	2,06	1,25	1,00	1,75	1,58	0,77	5,80	1,17	1,01	0,69

CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.
NE= Animal não existente.
i= dosagem não detectável.

Valores individuais das concentrações de IL-10 em amostras de baço. Tabela dos resultados individuais referentes à Figura 20. Os valores estão expressos em pg/mL.

	Concentração de IL-10 (pg/mL)									
Animal	**Cs**	**Catcc**	**Catcc+i**	**Cn315**	**Cn315+i**	**Ds**	**Datcc**	**Datcc+i**	**Dn315**	**Dn315+i**
1	96,55	120,21	141,93	71,67	73,47	107,24	91,35	47,49	94,18	67,73
2	i	70,78	105,41	141,32	98,09	69,02	58,27	81,65	72,28	166,96
3	53,66	70,34	73,47	137,70	106,48	59,51	i	71,63	56,43	94,89
4	130,57	60,50	71,23	73,92	108,62	72,28	106,50	67,09	65,81	95,60
5	71,23	75,74	72,57	74,82	73,02	94,89	70,97	109,46	81,65	85,77
6	NE	73,92	71,23	86,10	74,37	NE	80,29	108,72	78,27	120,80
7	NE	86,58	83,69	86,58	69,90	NE	76,92	89,94	95,60	119,27
Média	88,0	79,7	88,5	96,0	86,3	80,6	80,7	82,3	77,7	109,3
Desvio Padrão	33,4	19,5	26,6	30,3	17,3	19,8	16,7	22,6	14,3	32,2
Erro Padrão	16,7	7,4	10,0	11,5	6,5	8,8	6,8	8,5	5,4	12,2

CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.
NE= Animal não existente.
i= dosagem não detectável.

Valores individuais das concentrações de CINC-3 em amostras de baço. Tabela dos resultados individuais referentes à Figura 21. Os valores estão expressos em pg/mL.

	Concentração de CINC-3 (pg/mL)									
Animal	**Cs**	**Catcc**	**Catcc+i**	**Cn315**	**Cn315+i**	**Ds**	**Datcc**	**Datcc+i**	**Dn315**	**Dn315+i**
1	36,9	52,48	50,00	41,22	36,53	6,27	2,08	12,24	13,55	i
2	i	37,57	45,02	53,80	75,72	4,67	i	18,49	i	15,89
3	29,84	37,71	37,96	49,63	73,91	i	7,69	i	13,23	i
4	55,80	i	35,40	39,02	31,87	i	i	16,34	i	i
5	39,46	41,69	43,18	33,00	59,70	6,80	13,08	i	i	i
6	NE	39,10	39,63	41,44	34,23	NE	i	i	i	i
7	NE	43,51	40,59	41,52	38,21	NE	i	i	i	4,78
Média	40,4	42,0	41,4	42,8	45,7	3,5	3,8	7,8	4,5	3,0
Desvio Padrão	11,0	5,6	5,0	6,9	19,1	3,3	5,4	8,8	6,9	6,0
Erro Padrão	5,5	2,1	1,9	2,6	6,1	1,9	2,7	4,4	4,0	4,2

CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.
NE= Animal não existente.
i= dosagem não detectável.

Valores individuais das concentrações de IL-1β em amostras de rim. Tabela dos resultados individuais referentes à Figura 24. Os valores estão expressos em pg/mL.

	Concentração de IL-1β (pg/mL)									
Animal	**Cs**	**Catcc**	**Catcc+i**	**Cn315**	**Cn315+i**	**Ds**	**Datcc**	**Datcc+i**	**Dn315**	**Dn315+i**
1	i	29,97	i	i	i	11,97	54,99	65,63	i	32,43
2	i	51,83	i	i	16,83	i	96,07	i	i	30,05
3	30,86	i	i	176,73	i	i	59,28	i	i	i
4	i	i	46,49	122,18	i	20,08	i	i	86,13	i
5	32,79	54,48	54,48	70,07	16,83	i	48,43	37,12	i	i
6	NE	i	24,24	i	82,78	NE	37,12	i	63,53	i
7	NE	54,48	67,50	i	70,07	NE	94,09	41,71	52,82	i
Média	31,8	47,7	48,2	123,0	46,6	16,0	65,0	48,2	67,5	31,2
Desvio Padrão	1,4	11,9	18,2	53,3	34,8	5,7	24,5	15,3	17,0	1,7
Erro Padrão	1,0	5,9	9,1	30,8	17,4	4,1	10,0	8,8	9,8	1,2

CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.
NE= Animal não existente.
i= dosagem não detectável.

Valores individuais das concentrações de IL-4 em amostras de rim. Tabela dos resultados individuais referentes à Figura 25. Os valores estão expressos em pg/mL.

	Concentração de IL-4 (pg/mL)									
Animal	**Cs**	**Catcc**	**Catcc+i**	**Cn315**	**Cn315+i**	**Ds**	**Datcc**	**Datcc+i**	**Dn315**	**Dn315+i**
1	110,28	135,03	115,76	115,76	113,02	14,78	31,38	39,51	i	14,78
2	113,02	121,26	129,51	113,02	124,00	25,22	43,55	33,42	i	12,65
3	110,28	124,00	132,27	140,55	115,76	33,42	27,28	49,58	i	i
4	137,79	121,26	124,00	162,74	129,51	41,53	27,28	81,43	51,58	12,65
5	137,79	168,31	124,00	135,03	126,76	18,99	i	i	23,16	10,50
6	NE	132,27	132,27	132,27	154,40	NE	43,55	i	45,56	33,42
7	NE	143,32	154,40	124,00	132,27	NE	41,53	16,89	35,46	14,78
Média	121,8	135,1	130,3	131,9	128,0	26,8	35,8	44,2	38,9	16,5
Desvio Padrão	14,6	16,8	12,1	16,9	13,6	10,8	8,0	24,0	12,5	8,5
Erro Padrão	6,5	6,3	4,6	6,4	5,1	4,8	3,3	10,7	6,2	3,5

CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.
NE= Animal não existente.
i= dosagem não detectável.

Valores individuais das concentrações de IL-10 em amostras de rim. Tabela dos resultados individuais referentes à Figura 26. Os valores estão expressos em pg/mL.

	Concentração de IL-10 (pg/mL)									
Animal	**Cs**	**Catcc**	**Catcc+i**	**Cn315**	**Cn315+i**	**Ds**	**Datcc**	**Datcc+i**	**Dn315**	**Dn315+i**
1	147,97	158,38	116,23	134,38	126,05	70,48	70,48	68,49	69,86	68,94
2	151,42	172,54	139,44	129,36	187,03	70,63	72,13	65,98	67,52	68,94
3	156,63	137,74	222,69	176,14	168,97	72,05	72,13	72,21	65,41	68,41
4	174,34	122,75	203,70	176,14	131,03	70,56	69,09	67,22	70,01	68,79
5	i	236,27	234,32	139,44	134,38	68,34	68,26	70,24	67,82	69,94
6	NE	172,54	153,15	124,40	192,54	NE	71,73	69,32	68,94	70,24
7	NE	i	144,54	203,70	190,70	NE	71,26	68,26	71,26	67,15
Média	157,6	166,7	173,4	154,8	161,5	70,4	70,7	68,8	68,7	68,7
Desvio Padrão	11,7	39,4	46,0	30,3	30,1	1,3	1,5	2,0	1,9	1,0
Erro Padrão	173,4	49,0	17,4	11,5	11,4	0,6	0,6	0,8	0,7	0,4

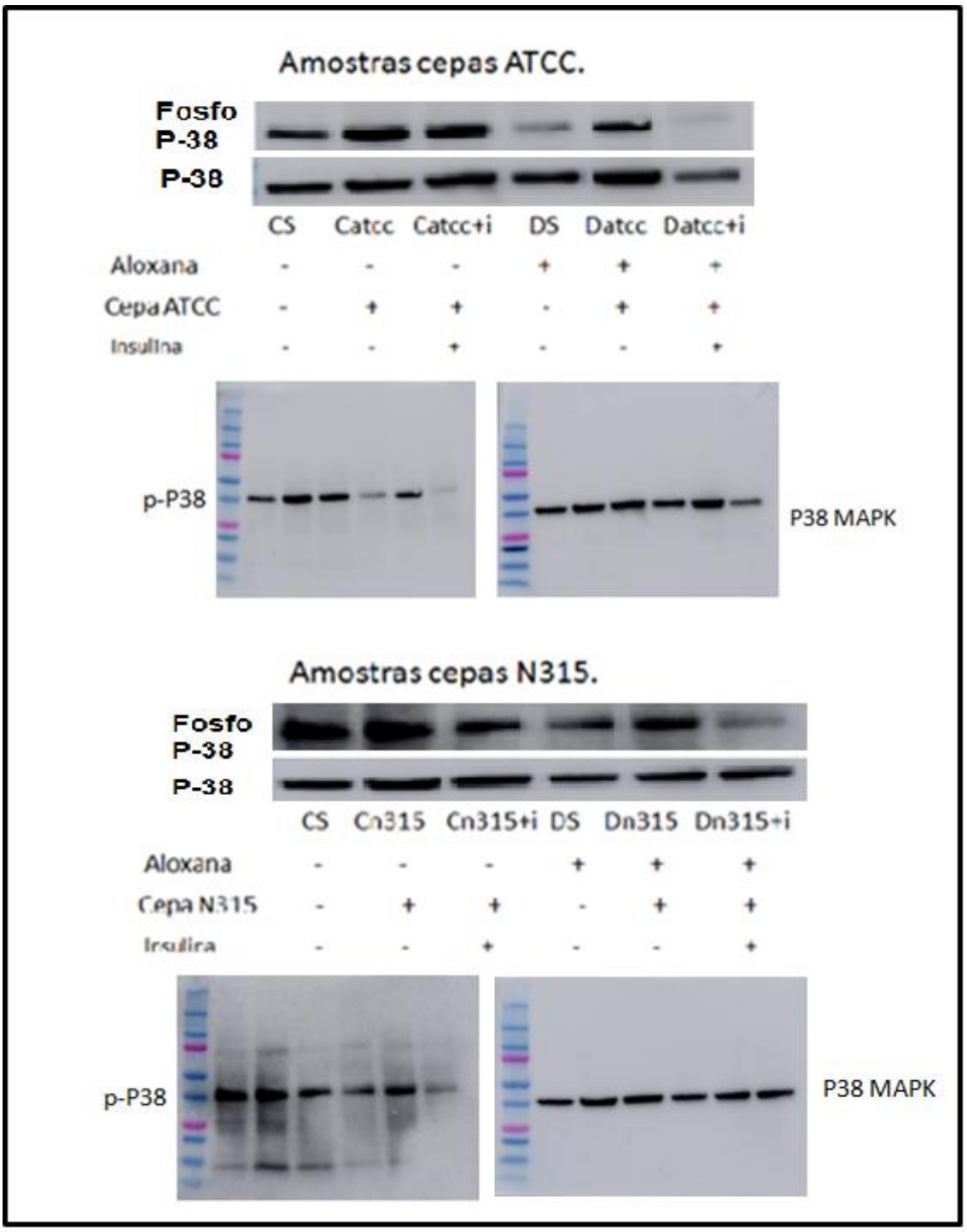
CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.
NE= Animal não existente.
i= dosagem não detectável.

Análise estatíticas das moléculas das vias de sinalização estudadas. Análise por Kruskal-Wallis.

GRUPOS	Fosfo P-38	Fosfo ERK	Fosfo PKC-α	Fosfo PKC-δ	Fosfo AKT
CS	100 (100 – 100)	100 (100 – 100)	100 (100 – 100)	100 (100 – 100)	100 (100 – 100)
Catcc	634 (105 – 1101)	97 (58 – 98)	65 (64 – 92)	83 (55 – 128)	79 (58 – 120)
Catcc+i	82 (20 – 1120)	102 (45 – 120)	95 (33 – 127)	87 (51 – 100)	65 (30 – 127)
Cn315	250 (177 – 286)	92 (46 – 126)	73 (31 – 213)	58 (21 – 72)	64 (28 – 115)
Cn315+i	210 (95 – 307)	97 (44 – 127)	61 (60 – 83)	72 (38 – 94)	106 (54 – 118)
DS	100 (100 – 100)	100 (100 – 100)	100 (100 – 100)	100 (100 – 100)	100 (100 – 100)
Datcc	130 (81 – 167)	112 (93 – 255)	59 (52 – 121)	82 (43 – 147)	114 (114 – 191)
Datcc+i	89 (19 – 235)	99 (0,1 – 116)	59 (46 – 104)	52 (37 – 74)	255 (111 – 1230)
Dn315	155 (153 – 416)	126 (0,1 – 153)	73 (24 – 83)	94 (24 – 157)	123 (89 – 13903)
Dn315+i	115 (105 – 171)	86 (0,1 – 92)	69 (40- 188)	73 (27 – 77)	118 (83 – 127)

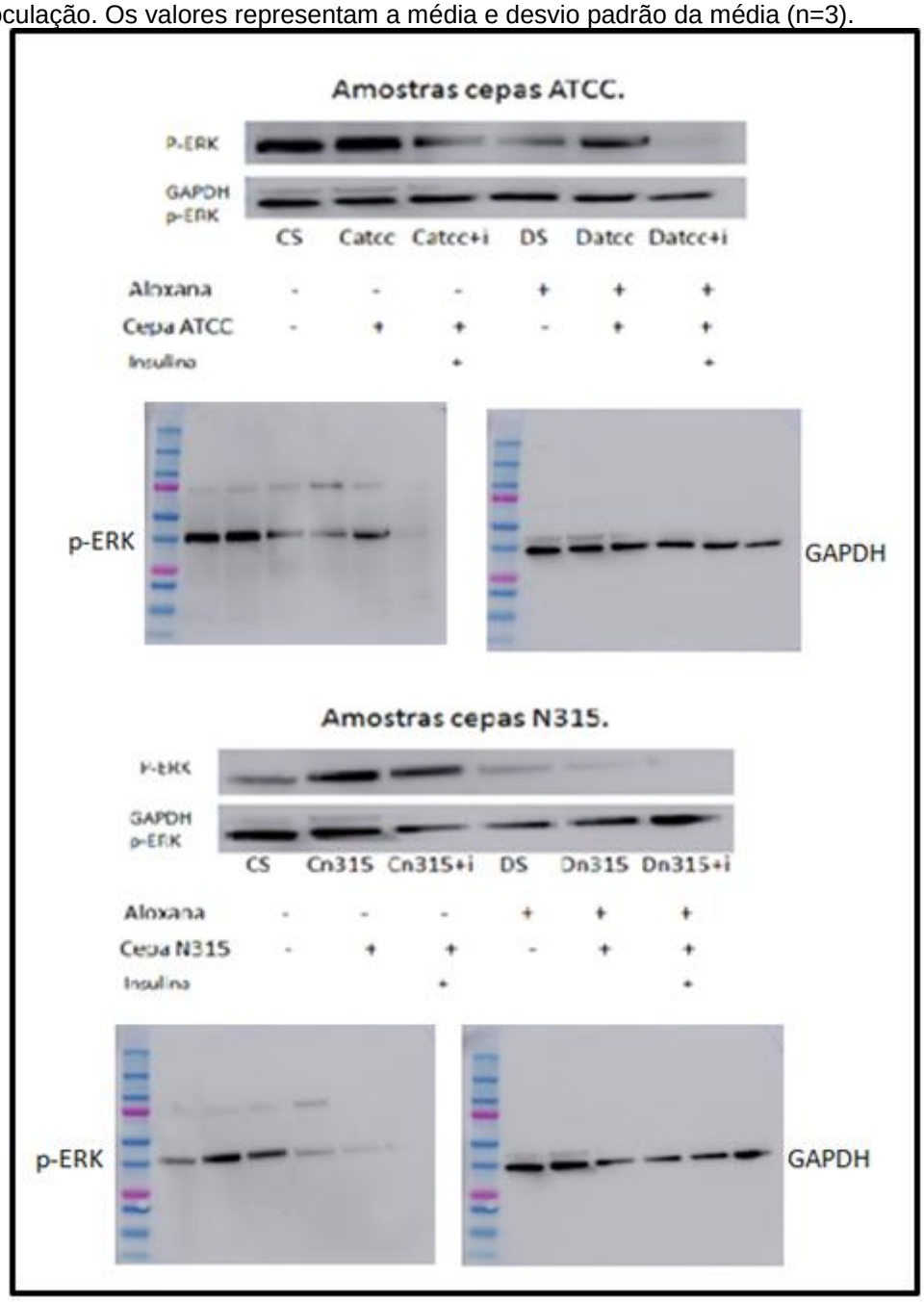
Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. n=3. CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.

Membranas referentes à Figura 29. Análise de Fosfo P38 em homogenato de fígado. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com a cepa ATCC 25923 ou a cepa N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a média e desvio padrão da média (n=3).



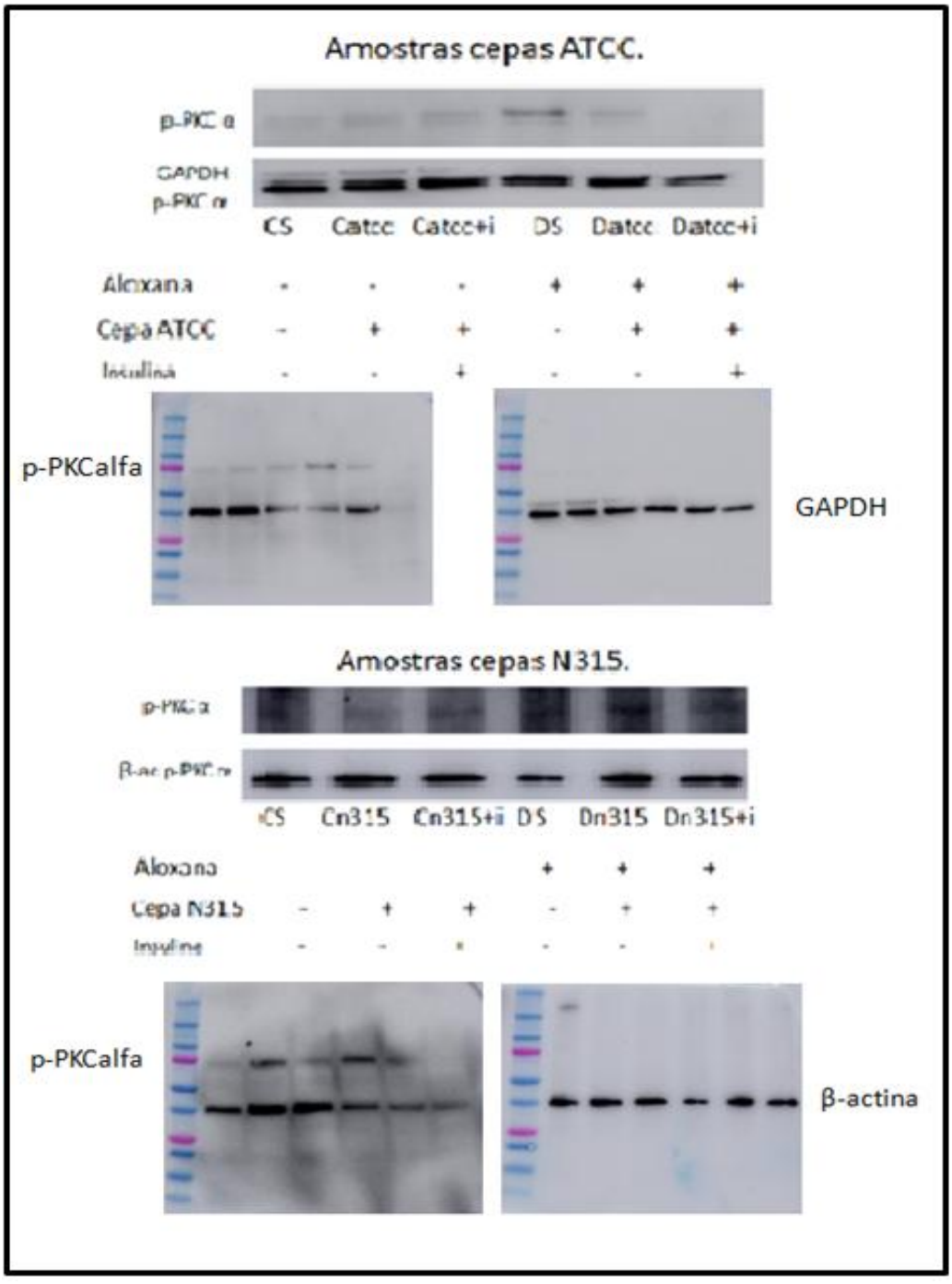
CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.

Membranas referentes à Figura 30. Análise de Fosfo ERK em homogenato de fígado. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com a cepa ATCC 25923 ou a cepa N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a média e desvio padrão da média (n=3).



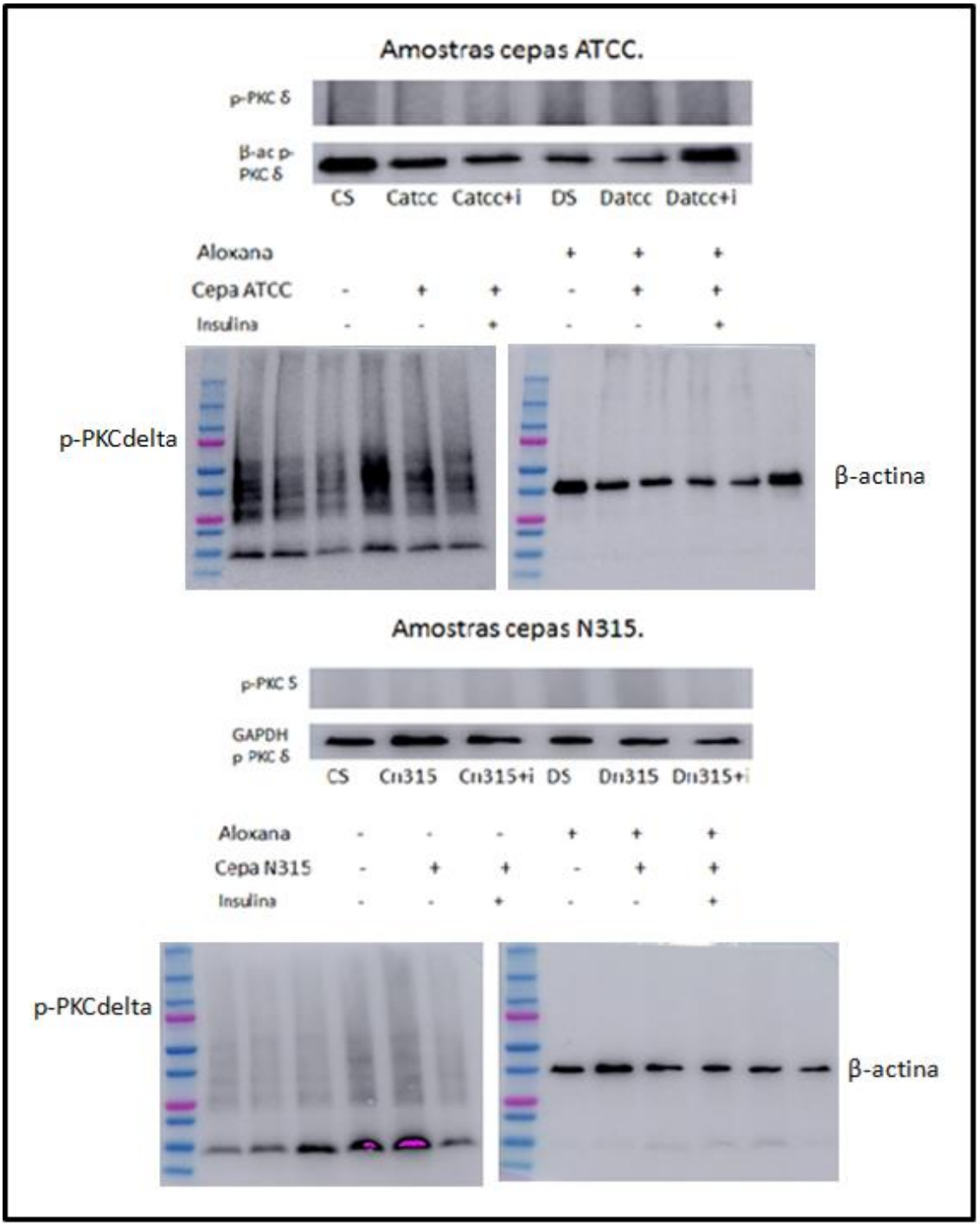
CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.

Membranas referentes à Figura 31. Análise de Fosfo PKCα em homogenato de fígado. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com a cepa ATCC 25923 ou a cepa N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a média e desvio padrão da média (n=3).



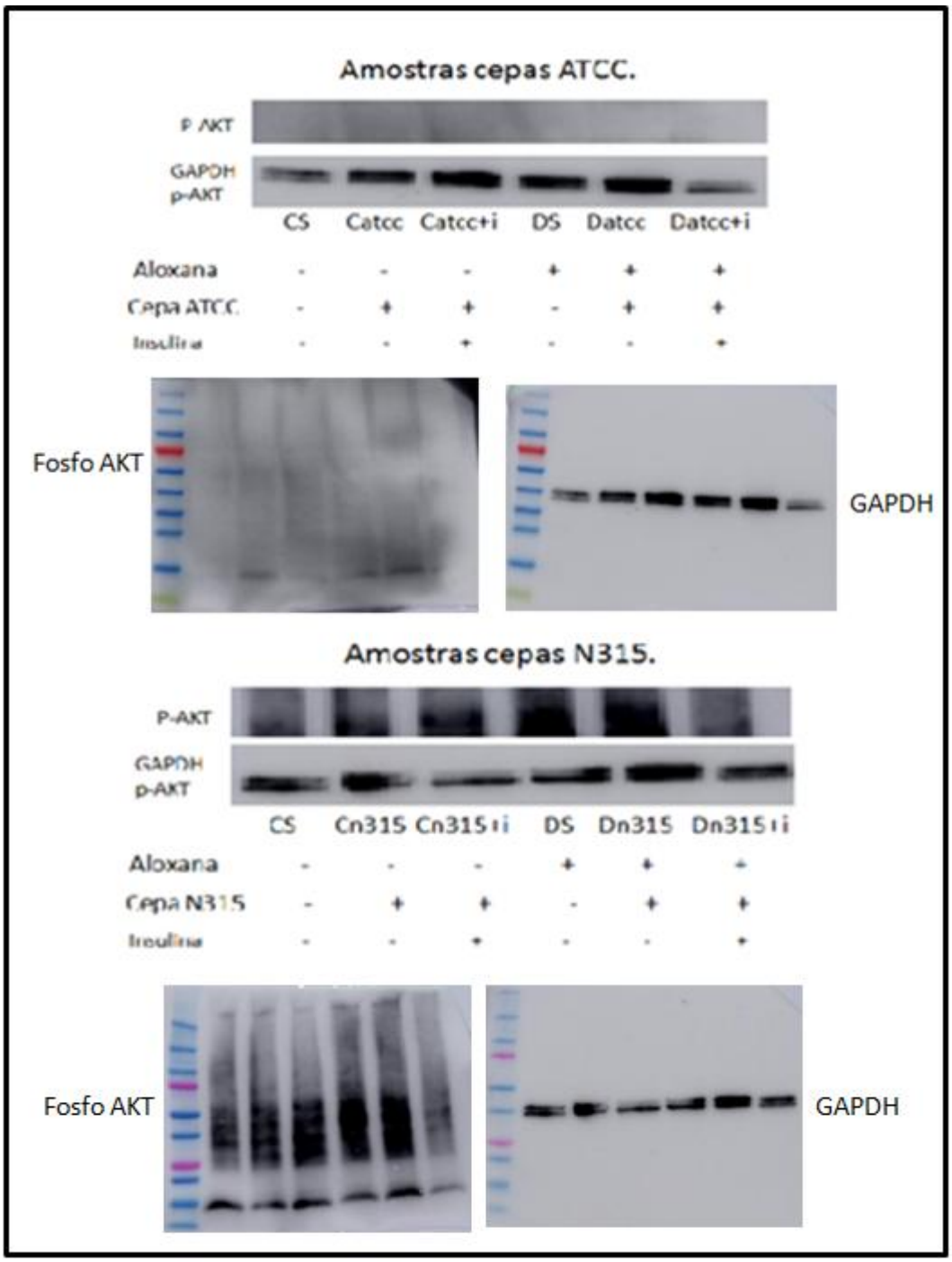
CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.

Membranas referentes à Figura 32. Análise de Fosfo PKCδ em homogenato de fígado. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com a cepa ATCC 25923 ou a cepa N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a média e desvio padrão da média (n=3).



CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.

Membranas referentes à Figura 33. Análise de Fosfo AKT em homogenato de fígado. Animais tornados diabéticos por injeção de aloxana (42 mg/kg i.v.) e infectados com a cepa ATCC 25923 ou a cepa N315 de *S. aureus* ($5x10^9$ CFU i.p.). Amostras dos tecidos foram obtidas 13 dias após inoculação. Os valores representam a média e desvio padrão da média (n=3).



CS=controle não infectado; Catcc=controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus*; Catcc+i= controle infectado pela cepa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; DS=diabético não infectado; Datcc=diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus*; Datcc+i= diabético infectado pela cpa ATCC de *S.aureus* e tratado com insuina; Cn315=controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus*; Cn315+i= controle infectado pela cepa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina; Dn315=diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus*; Dn315+i= diabético infectado pela cpa N315 de *S.aureus* e tratado com insuina.