

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Fisiopatologia

Insulina modula o fenótipo de células imunes na inflamação alérgica pulmonar, aumentando a resistência pulmonar de camundongos diabéticos.

SABRINA DE SOUZA FERREIRA

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

SÃO PAULO

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Fisiopatologia

Insulina modula o fenótipo de células imunes na inflamação alérgica pulmonar, aumentando a resistência pulmonar de camundongos diabéticos.

SABRINA DE SOUZA FERREIRA

Versão Corrigida

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

SÃO PAULO

2019

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

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

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

F38311 Ferreira, Sabrina
 Insulina modula o fenótipo de células imunes na
 inflamação alérgica pulmonar, aumentando a
 resistência pulmonar de camundongos diabéticos. /
 Sabrina Ferreira. - São Paulo, 2019.
 129 p.

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

 1. asma. 2. diabetes mellitus. 3. insulina. 4.
 células imunes. 5. hiperresponsividade. I. T. II.
 Martins, Jolison, orientador.

Sabrina de Souza Ferreira

Insulina modula o fenótipo de células imunes na inflamação alérgica pulmonar, aumentando a resistência pulmonar de camundongos diabéticos.

Versão corrigida

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
orientador/presidente

Dra. Fernanda Magalhães Arantes Costa

1º. examinador

Dr. Alexandre de Castro Keller

2º. examinador

Dr. Wothan Tavares de Lima

3º. examinador

São Paulo 27 de março de 2019

Dedico esse trabalho:

A meus pais queridos, Antônio e Iolanda,

Por sempre estarem ao meu lado. Que mesmo sem entender sobre a pesquisa, me trouxeram até aqui, com todos os ensinamentos sobre vida, por me ensinarem ser um ser humano descecente e ético. Por me ensinarem sobre o que é amor.

A meus irmãos, Jefferson, Wellington, Jessica e Vanessa,

Dizem que irmãos são os nossos primeiros amigos. Vocês são meus primeiros e eternos amigos. Que me dão a mão e nunca pediram nada em troca. Cada um tem sua história, suas batalhas e suas conquistas, e nos orgulhamos como fossem nossas. Obrigada por sempre estarem presentes.

Ao meu melhor amigo, meu companheiro, Victor

Que sorte a minha, você ter me encontrado. Obrigada por sempre me fazer acreditar, por me levantar tantas vezes, e por me acompanhar em todos os meus passos, sei que em você posso procurar abrigo.

A vocês dedico com muito carinho e amor, mais uma conquista, pois sei que sem vocês nada disso seria possível. Cada um de vocês tem uma parte importante nesse ciclo que hoje se encerra.

Agradecimentos

Aos animais utilizados nesse experimento, meu respeito e agradecimento, sem eles esse trabalho não seria realizado.

Ao meu professor Dr. Joilson de Oliveira Martins, obrigada pela orientação pelas críticas, por todos esses anos construindo minha formação. Obrigada pela insistência para que eu explorasse “o mundo lá fora”. Ajudou muito no meu crescimento, profissional e pessoal.

À Dra Maristela Tsujita, obrigada por toda a colaboração, ensinamento e conversas. Foi uma grande satisfação trabalhar junto com você. E mais ainda por poder dividir um tempo com conversas.

À Renata Albuquerque, por toda a ajuda com o FACs, incansáveis dias, passando minhas amostras. Por me ensinar as análises e pelas conversas.

À Dra. Fernanda Nunes e Felipe Casagrande, obrigada pela colaboração nesse trabalho.

À Dra. Maria Aparecida Oliveira, obrigada pela colaboração, por dias trabalhados e conversados. Foi uma grande satisfação trabalhar ao seu lado.

Ao professor Dr. Wothan Tavares de Lima, por conceder seu laboratório para que eu pudesse finalizar meu trabalho.

Ao laboratório do professor Dr. Momtchillo Russo, por ceder o espaço, e principalmente a Eliane por me ajudar com a técnica de BUXCO.

A todos meus colegas de laboratório, que foram se tornando amigos. Obrigada por todas as risadas, pelas lamentações, fomos crescendo juntos, ao longo da nossa formação.

À Silene Migliorini, pelo suporte técnico, pelas conversas e pela amizade.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela oportunidade da realização do curso de doutorado.

Aos meus colegas que fiz no Instituto Karolinska, e meus supervisores, obrigada por toda ajuda no meu crescimento profissional.

À CAPES, e ao Cnpq pela concessão da bolsa de doutorado, e de doutorado sanduíche, e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria”

Paulo Freire

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

RESUMO

FERREIRA, S.S. **Insulina modula o fenótipo de células imunes na inflamação alérgica pulmonar, aumentando a resistência pulmonar de camundongos diabéticos.** 2019. 129f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Dados mostram que o aparecimento do *diabetes mellitus* (DM), em pacientes previamente asmáticos, diminui os sintomas da asma, enquanto a insulina agrava a asma. Devido a dados na literatura e por dados prévios do nosso grupo, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito modulatório da insulina na inflamação alérgica pulmonar em camundongos diabéticos e saudáveis. Camundongos machos diabéticos BALB/c (aloxana, 50mg/kg, iv, 10 dias) foram sensibilizados com ovalbumina (OVA, 20 µg e Al (OH)₃, 2 mg) 10 dias após a injeção de aloxana e uma dose reforço foi dada, após 12 dias da primeira de sensibilização, após 6 dias da dose reforço, os animais foram expostos a nebulização durante 7 dias com solução de OVA (1mg/mL) ou solução salina (SAL). Animais diabéticos foram tratados com doses múltiplas de *Protamine Hagedorn Neutro* (NPH) 2UI e 1UI, respectivamente, por via subcutânea 12 horas antes do desafio com OVA (às 19h) e 1UI (às 7h) 2h antes de cada desafio com OVA. Os animais não diabéticos receberam 1UI de insulina, pela mesma via 2h antes de cada desafio (às 7h), 24h após o último desafio, realizaram-se as seguintes análises: a) expressão de proteína quinase p38, proteína quinase regulada por sinais extracelulares 1 e 2 (ERK 1/2), proteína quinase ativada por estresse ou c-jun NH2-terminal (JNK), transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT 3) e transdutor de sinal e ativador de transcrição 6 (pSTAT 6) no homogenato de pulmão; b) perfil de imunoglobulinas presentes no soro; c) concentrações de interleucina (IL) IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformador beta (TGF-β) e *interferon-gamma* IFN-γ em homogenato de pulmão; d) migração celular em fluido do lavado broncoalveolar (LBA); e) perfil de células imunes na medula óssea, pulmão, timo e baço; f) mecânica pulmonar por BUXCO e FlexiVent. Em comparação com camundongos não diabéticos desafiados com OVA, os animais diabéticos desafiados com OVA mostraram diminuição em: ERK 1, ERK 2, JNK (fosfo54), JNK / SAPK, STAT3, pSTAT6 estava ausente; concentração da imunoglobulinas IgE, IgG1; perfil de citocinas Th2 como IL-4, IL-5, IL-13, TNF-α, VEGF, TGF-β; infiltrado inflamatório e ausência de eosinofilia no LBA; células T, células B e eosinófilos na medula óssea, pulmão, timo e baço, e hiper-reatividade das vias aéreas. O tratamento com insulina restaurou todos os parâmetros estudados. Portanto, sugerem que a insulina modula a inflamação alérgica pulmonar tardia em camundongos diabéticos.

Palavras-chave: Asma, *diabetes mellitus*, insulina, células imunes, hiper-reatividade

ABSTRACT

FERREIRA, S.S. Insulin modulates immune cell phenotype in pulmonary allergic inflammation, increasing the pulmonary resistance of diabetic and healthy mice. 2019. 129. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Data show that the onset of diabetes mellitus (DM) in previously asthmatic patients decreases asthma symptoms while insulin worsens asthma. Due to data in the literature and previous data from our group, the present study aimed to evaluate the modulatory effect of insulin on pulmonary allergic inflammation in diabetic and healthy mice. Ovalbumin (OVA, 20 µg and Al (OH)₃, 2 mg) were sensitized at 10 days after alloxan injection and a booster dose was given, after 12 days of the first sensitization, after 6 days of booster dose, the animals were exposed to nebulization for 7 days with OVA solution (1mg / mL) or saline solution (SAL). Diabetic animals were treated with multiple doses of Protamine Hagedorn Neutral (NPH) 2UI and 1UI, respectively, subcutaneously 12 hours prior to challenge with OVA (at 7pm) and 1UI (at 7h) 2h before each challenge with OVA. Non-diabetic animals received 1UI of insulin, via the same route 2h before each challenge (at 7h), 24h after the last challenge, the following analyzes were performed: a) expression of protein kinase p38, protein kinase regulated by extracellular signals 1 and 2 (ERK 1/2), stress-activated or c-jun NH2-terminal protein kinase (JNK), signal transducer and transcriptional activator 3 (STAT 3) and signal transducer and transcriptional activator 6 (pSTAT 6) in the lung homogenate; b) profile of immunoglobulins present in serum; c) concentrations of interleukin (IL) IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, tumor necrosis factor alpha (TNF-α), vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming TGF-β and interferon-gamma IFN-γ in lung homogenate; d) cell migration in bronchoalveolar lavage fluid (BAL); e) profile of immune cells in the bone marrow, lung, thymus and spleen; f) Pulmonary mechanics by BUXCO and FlexiVent. In contrast to non-diabetic mice challenged with OVA, diabetic animals challenged with OVA showed decrease in: ERK 1, ERK 2, JNK (phospho54), JNK / SAPK, STAT3, pSTAT6 was absent; IgE immunoglobulin levels, IgG1; profile of Th2 cytokines such as IL-4, IL-5, IL-13, TNF-α, VEGF, TGF-β; inflammatory infiltrate e) absence of eosinophilia in BAL; T cells, B cells and eosinophils in the bone marrow, lung, thymus and spleen, and airway hyperreactivity. The insulin treatment restored all parameters studied. Therefore, they suggest that insulin modulates late pulmonary allergic inflammation in diabetic mice.

Key words: Asthma, diabetes mellitus, insulin, immune cells, hyperreactivity.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Considerações gerais sobre resposta inflamatória, hipersensibilidade do tipo I e asma	21
1.2 <i>Diabetes Mellitus</i> e <i>Diabetes Mellitus</i> tipo I.....	31
1.3 <i>Diabetes mellitus</i> , asma e insulina.....	32
2. OBJETIVO.....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Animais	39
3.2 Indução de <i>diabetes mellitus</i>	40
3.3 Modelo de inflamação alérgica pulmonar	40
3.3.1 Sensibilização	40
3.3.2 Desafio.....	40
3.4 Tratamento com insulina	41
3.5. Protocolo experimental.....	41
3.6 Eletroforese e Imunoblotting.....	42
3.7 Determinação da concentração de insulina	43
3.8 Determinação da concentração de IgE, IgG1 e IgG2a.....	43
3.9 Quantificação de citocinas por enzima-imunoensaio	43
3.10 Fluido do lavado broncoalveolar.....	44
3.11 Contagem celular do LBA.....	44
3.12 Obtenção das células de medula óssea	44
3.13 Obtenção das células do pulmão, timo e baço	45
3.14 Análise das populações celulares por FACS em medula óssea, pulmão, timo e baço	45
3.15 Hiper-reatividade brônquica.....	47
3.16 Mécânica pulmonar por FlexiVent.....	48
3.17. Análise estatística.....	49
4. RESULTADOS.....	52

4.1 Caracterização do modelo de DM	52
4.2 Determinação da concentração de insulina	53
4.3 Expressão das moléculas de sinalização após imunização	54
4.4 Determinação da concentração de IgG1, IgG2a e IgE.....	57
4.5 Avaliação das citocinas por enzima imunoensaio	59
4.6 Efeito da insulina na migração celular no LBA.....	61
4.7 Análise do perfil de linfócitos recrutados para o pulmão, baço, timo e MO após imunização	63
4.8 Papel da insulina na fenotipagem das células imunes.....	64
4.9 Avaliação da hiper-reatividade brônquica	69
4.10 Efeito da insulina na resistência das vias aéreas e na resistência das pequenas vias aéreas.....	71
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
ANEXOS.....	94

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura.1: Diferença entre brônquios normais e com inflamação alérgica pulmonar.....	23
Figura. 2. Ilustração do desenvolvimento da asma.....	26
Figura 3. Delineamento experimental	36
Figura 4. Estratégia de seleção das populações de CD4.....	42
Figura 5. Protocolo experimental com BUXCO e FlexiVent... ..	44
Figura 6. Determinação de variação de peso (10 e 36 dias).. ..	46
Figura 7. Determinação dos níveis glicêmicos (10 e 36 dias).	47
Figura 8. Avaliação da concentração de insulina.....	48
Figura 9. Expressão de moléculas em homogenato de pulmão.....	47
Figura 10. Avaliação da concentração de IgG1, IgG2a e IgE.....	50
Figura 11. Efeito da insulina sobre a secreção de citocinas em homogenato de pulmão de camundongos	54
Figura 12. Caracterização dos leucócitos no LBA: papel da insulina.	56
Figura 13. Análise de perfil de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ recrutados.	59
Figura 14. Análise de perfil de linfócitos T NK T e T $\gamma\delta$ recrutados.....	60
Figura 15. Análise de perfil de linfócitos B recrutados	61
Figura 16. Análise de perfil de eosinófilos recrutados	62
Figura 17. Avaliação da hiper-reatividade brônquica por Buxco	64
Figura 18. Curva dose-resposta para solução de metacolina inalada (Mch)	65

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Relação dos grupos estudados.....	34
Tabela 2. Relação dos anticorpos.....	41
Tabela 3. Valores de células totais encontrados em Pulmão, Baço, Timo e MO	57

LISTA DE ABREVIATURAS

ALX	Aloxana
APC	Células apresentadoras de antígeno / <i>Antigen-presenting cell</i>
AUC	Area Under the Curve / Área Sob a Curva
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDs	Células Dendríticas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DM	<i>Diabetes meliitus</i>
DM1	<i>Diabetes meliitus</i> tipo 1
DM2	<i>Diabetes meliitus</i> tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EPM	Erro Padrão da Média
ERK1/2	Proteína quinase regulada por sinais extracelulares 1 e 2
FACS	<i>Fluorescence-actived cell sorting</i>
FWBP	Fluxo pletismógrafo de corpo inteiro
G	viscância
H	elastância
IDF	Federação Internacional de Diabetes
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF	<i>Interferon</i>
iNOS	óxido nítrico-sintase induzida

ip	intraperitoneal
JNK	Proteína quinase ativada por estresse ou c-jun NH2- terminal
LB	Límfócito B
LBA	Lavado broncoalveolar
LT	Linfócito T
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MHC	Complexo de histocompatibilidade
MO	Medula Óssea
NPH	<i>Neutral Protamine Hagedorn</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OVA	Ovalbumina
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> –Tampão fosfato-salino
PEEP	<i>positive end-expiratory pressure</i>
Pef	Pico de fluxo respiratório
Penh	<i>enhanced Pause</i>
Pif	Pico de fluxo inspiratório
RPM	Rotação por minuto
Rn	resistência Newtoniana das vias aéreas
SUS	Sistema Único de Saúde
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SBPT	Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia
TA	Temperatura Ambiente
Te	Tempo expiratório

Th	T <i>helper</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
Tr	Tempo de relaxamento

LISTA DE SÍMBOLOS

<	menor que	nm	Nanômetro
%	Porcento	°C	graus celcius
/	dividido por	rpm	rotação por minuto
±	mais ou menos	mL	Mililitro
µL	Microlitro	mm	Milímetro
dL	Decilitro	mm ³	milímetro cúbico
G	Grama	ng	Nanograma
H	Hora	rpm	rotação por minuto
L	Litro	UI	unidade Internacional
Mg	Miligrama	α	Alfa
Min	Minuto	γ	Gama
Ng	Nanograma		

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre resposta inflamatória, e hipersensibilidade do tipo I

Podemos considerar a inflamação uma resposta complexa do tecido conjuntivo, devido a uma injúria. Essa resposta é dividida, didaticamente, em inflamação aguda e crônica. Este processo é caracterizado por: dor, calor, vermelhidão, edema e em alguns casos, até perda da função. A inflamação aguda apresenta exsudato com grande quantidade de proteínas plasmáticas, além do acúmulo de leucócitos, principalmente de neutrófilos, esse tipo de inflamação é caracterizada pelo seu início rápido e ser de curta duração. Já a inflamação crônica se caracteriza por apresentar linfócitos e macrófagos com proliferação vascular, fibrose, e por ser de longa duração. A resposta inflamatória é determinada por eventos vasculares, celulares e linfáticos desenvolvidos a fim de eliminar o agente lesivo, restituir o tecido lesado e manter a homeostasia do organismo (RANKIN, 2004; MEDZHITOV, 2008; KUMAR *et al.*, 2010; KVIETYS & GRANGER, 2012).

Os eventos vasculares da resposta inflamatória compreendem alterações hemodinâmicas seguidas por mudanças estruturais na parede do vaso, caracterizadas, principalmente, pela contração da célula endotelial e abertura de junções entre essas células. Essas aberturas levam ao extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido intersticial caracterizando o edema inflamatório. Ainda, em consequência ao extravasamento plasmático, ocorre o aumento da viscosidade do sangue e a redução do fluxo sanguíneo. Além disso, em consequência ao extravasamento plasmático observa-se aumento da viscosidade do sangue e redução do fluxo sanguíneo. Esta estase sanguínea gera a marginação leucocitária e consequentemente a migração de leucócitos para o espaço extra vascular (RANKIN 2004; KUMAR *et al.*, 2010).

A inflamação se dá pelo recrutamento dos leucócitos e das proteínas plasmáticas do sangue para os locais de infecção e de lesão tecidual (MEDZHITOV, 2008).

O recrutamento dos leucócitos do sangue para o tecido ocorre, pelo *rolling* dos leucócitos, sobre o endotélio, seguido por adesão leucocitária que culmina com a migração dessas células para o tecido lesado. Essa interação entre leucócito e endotélio é permitida devido à expressão de diversas famílias de moléculas de

adesão, tanto na superfície endotelial quanto na superfície leucocitária. Dentre as moléculas de adesão podemos destacar as selectinas, integrinas e moléculas pertencentes à superfamília das imunoglobulinas (LEY *et al.*, 2007; MULLER, 2009; KUMAR *et al.*, 2010).

As manifestações que ocorrem mediante o processo inflamatório, se devem a ação de substâncias endógenas denominadas mediadores químicos. Estes mediadores são divididos em dois grupos: mediadores pré-formados (grânulos) e neoformados. Os mediadores pré-formados incluem mediadores vasoativos, como histamina, mediadores quimiotáticos (neutrófilos, eosinófilos), enzimas e proteoglicanos. Dentre os mediadores neoformados, podemos citar leucotrienos, prostaglandinas, PAF e citocinas (MAJNO & JORIS, 2004).

A resposta adaptativa consiste na ativação de linfócitos B e T. Os linfócitos T são divididos em células supressoras (CD8⁺) ou células auxiliares (CD4⁺), conhecidas, também, como linfócitos T *helper* (Th). Existem cinco subpopulações de células Th Th0, Th1, Th2, Th3 e Th17. Quando essas células Th0, conhecidas também como células Th inativas ou não iniciadas, são apresentadas a um antígeno, são capazes de se diferenciar em células inflamatórias Th1, Th2, Th3 ou Th17. Essas células são diferenciadas dependendo das citocinas no meio, e a secreção dessas citocinas, por sua vez, será determinada pelo tipo antígeno. Um exemplo são os antígenos que estimulam a produção de IL-12, que favorece a produção de células Th1 (LLOYD & HESSEL, 2010; DECKERS, 2013; LICONA-LIMÓN, 2013), enquanto alguns antígenos estimulam a produção de IL-6 e de TGF- β que estimulam a produção de células Th17. Já a resposta Th3, é caracterizada pela produção TGF- β . Já a IL-4 favorece a produção de células Th2. As citocinas produzidas pelas células Th2 auxiliam na ativação das células B, resultando na produção das imunoglobulinas (Ig), como IgE. A resposta Th1 está relacionada à defesa de protozoários, bactérias intracelulares e vírus. Já a resposta Th2 é mais efetiva na defesa contra helmintos e em alergias inflamatórias (LLOYD & HESSEL, 2010).

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, envolvidas na resposta inflamatória, que regulam a amplitude e duração desta resposta. Essas substâncias são produzidas por diversos tipos de células e apresentam várias funções durante o processo inflamatório, incluindo a ativação do endotélio e leucócitos e indução de resposta na fase aguda. Muitas citocinas são pleiotrópicas, ou seja, podem apresentar

múltiplas atividades sobre diferentes células alvo. Além disso, algumas citocinas podem ser, também, redundantes, ou seja, diferentes citocinas possuem o mesmo efeito sobre determinado tipo celular (GREGHI, 2011).

O fator de necrose tumoral (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória, liberada por mastócitos, fagócitos mononucleares e células *natural killer* (NK), que apresenta diversas propriedades biológicas, podendo atuar no aumento da permeabilidade vascular, na diferenciação, proliferação, ativação celular, e apoptose (BEUTLER & CERAMI, 1989; BOGDAN, 2001; CAVAILLON, 2001).

As interleucinas (IL) - 1 e IL-6, produzidas por diferentes tipos celulares, induzem a síntese e secreção de proteínas da fase aguda e atuam sobre o endotélio aumentando a expressão de moléculas de adesão (BOGDAN, 2001; CAVAILLON, 2001). Por outro lado, a IL-4, secretada por células T, mastócitos e basófilos, é importante na expansão clonal de células B, na produção de anticorpos, na proliferação de células T e na indução de células Th2 (GREGHI, 2011).

Já a IL-10, uma potente citocina anti-inflamatória, produzida por células T, células B, macrófagos e monócitos, apresenta como principal papel é a supressão da resposta imune e inflamatória. A IL-10 suprime a resposta T pela inibição da capacidade de apresentação de antígeno aos macrófagos, além de apresentar efeito inibitório na produção de interferon gama (IFN- γ) e agir como fator de crescimento e de diferenciação para células B (BOGDAN, 2001; CAVAILLON, 2001).

O fator de crescimento transformador (TGF)- β , também é um agente anti-inflamatório, produzido por células T e por macrófagos, que atua como regulador de crescimento e diferenciação celular. Além disso, também está envolvido no processo de reparo tecidual, estimulando a proliferação de fibroblastos, a síntese de componentes da matriz extracelular (MEC), como fibronectina, colágeno tipo I e laminina, por parte dos fibroblastos, osteoblastos, e células endoteliais, podendo culminar na formação de fibrose local (PEREIRA & MARTINS, 2010).

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é um potente indutor de formação de vaso sanguíneo no desenvolvimento inicial, e tem um papel importante na angiogênese (crescimento de novos vasos), promovendo angiogênese em tumores, inflamações crônicas, e cicatrização de ferimentos (FATIMA & PAPA, 2010).

Outros tipos de células T que desempenham um papel importante no processo inflamatório são as células NK e as células $T\gamma\delta$. As células NK são células citotóxicas não específicas. Já as células $T\gamma\delta$ tem estreita associação com o epitélio pulmonar e tem função de vigilância imunológica, em resposta ao estresse do endógeno, ou indicando o local de dano tecidual (LLOYD & HESSEL, 2010).

Enquanto, a inflamação aguda é uma resposta imediata frente a um agente nocivo, a inflamação crônica é considerada uma resposta de longa duração, podendo durar semanas, meses ou até anos (KUMAR *et al.*, 2010).

A inflamação crônica acontece devido a uma resposta ineficiente da inflamação aguda, de modo que o agente agressor ainda continua em contato com o organismo. Essa resposta crônica começa de uma maneira pouco intensa, geralmente assintomática (RANKIN, 2004; KUMAR *et al.*, 2010).

Este tipo de processo crônico é caracterizado pela participação de células mononucleadas (linfócitos, macrófagos) e fenômenos proliferativos (como fibrogênese), havendo fenômenos de destruição tecidual, e tentativa de reparar os danos simultaneamente (GALLI *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2010). Os eosinófilos, mastócitos e neutrófilos só surgem caso o agente agressor permaneça no processo lesivo. Porém as concentrações de neutrófilos são muito menores, no processo crônico, quando comparado com o processo agudo.

Na inflamação crônica as seguintes alterações são observadas: aumento proliferação de fibroblastos, angiogênese, aumento do tecido conjuntivo com deposição de colágeno e destruição tissular (KUMAR *et al.*, 2010).

Células do sistema imune tem um papel importante para o desenvolvimento da resposta inflamatória. Essas células são produzidas na medula óssea (MO). A diferenciação inicial ocorre entre as células progenitora mielóide e célula progenitora linfóide, a partir do processo de hematopoiese. A hematopoiese é um processo dinâmico no qual as células-tronco hemapoéticas se auto renovam e/ou diferenciam-se em células do sistema sanguíneo. Durante a hematopoiese, a célula-tronco pluripotente origina células comprometidas para a linhagem mielóide ou linfóide. Esse processo é regulado por: fatores de crescimento, hormônios, citocinas, e células estromais, tais fatores mantem a quantidade e tipos celulares de acordo com as necessidades do organismo, sejam fisiológicos ou patológicos. (MAYANI *et al.*, 1992). O progenitor linfóide comum origina diversas populações de linfócitos, como: linfócito

B (LB), linfócito T (LT) e células *natural killer* (NK). O progenitor mieloide, origina: eritrócitos, monócitos e granulócitos. As células B e T, como também, os mastócitos e as células dendríticas (CDs) tem um papel importante no início da resposta alérgica. Os eosinófilos são essenciais na resposta alérgica tardia (LEY *et al.*, 2007; MULLER, 2009; KUMAR *et al.*, 2010). O aumento do número de eosinófilos e também o aumento da produção de IgE específicos para antígenos ambientais e aumento da atividade de mastócitos está relacionado a hipersensibilidade do tipo I (MUR *et al.*, 2008; LOPES & PIVATO, 2012).

A hipersensibilidade pode ser definida como uma resposta imune adaptativa prejudicial contra antígenos não associados a agentes infecciosos, resultando em reação inflamatória e/ou dano tecidual. A hipersensibilidade pode ser dividida, didaticamente divididas, pelo sistema de Gell e Combs (1963) em quatro tipos: I, II, III, IV. Essa divisão é baseada nos mecanismos envolvidos e no início do processo. Uma doença pode envolver mais de um tipo de reação (ABBAS, 2012).

Resumidamente, a hipersensibilidade tipo I é mediada por IgE, ativando mastócitos. A hipersensibilidade do tipo II é mediada por IgG, fagócitos e sistema complemento. Já a hipersensibilidade do tipo III mediada também por IgG, fagócitos, e complexos imunes (ligação entre antígeno e anticorpo). Enquanto que a hipersensibilidade do tipo IV mediada por linfócitos T, e tem como resultado a formação de granulomas (tecido cronicamente inflamado, afim de isolar microrganismos ou substâncias estranhas que o organismo é incapaz de expulsar) (ABBAS, 2012; LOPES & PIVATO, 2012).

A hipersensibilidade do tipo I, é nomeada, imediata ou alérgica, e tem como principal característica a ligação de IgEs específicos na superfície de mastócitos, que degranulam, após essa ligação. A consequência dessa rápida liberação de mediadores de mastócitos, são manifestações clínicas de doenças alérgicas, como por exemplo: asma (REGATEIRO & FARIA, 2016).

O desenvolvimento da asma se inicia, devido a um processo de sensibilização alérgica das vias aéreas. A sensibilização é decorrente de um primeiro contato do organismo a um agente sensibilizante (SCHOFIELD & CALHOUN, 2011).

A sensibilização é um processo multicelular e conta com a presença de células imunes, como CDs, linfócitos do tipo Th2, linfócitos B e mastócitos (MACKAY & ROSEN, 2001; GALLI *et al.*, 2008; MANISE *et al.*, 2013). Assim, podemos caracterizar

a asma como uma doença atópica, por ser uma hipersensibilidade do tipo I, e apresentarem padrão de resposta Th2.

As CDs, podem ser nomeadas, células apresentadoras de antígenos (APCs), por possuírem capacidade de capturar e processar os antígenos. Tais células tem grande importância no início da resposta Th2 no pulmão, por capturarem alérgenos externos, inalados, e transportá-los para o órgão linfóide proximal, e apresentar para uma célula T inativa, iniciando então a resposta imune (van RIJT *et al.*, 2005; HAMMAD *et al.*, 2010; SCHOFIELD & CALHOUN, 2011). Essa apresentação do antígeno ocorre através do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II). Após a apresentação as células T inativas, se diferenciam em células Th2, e passam a secretar citocinas como IL-13 e IL-4, que ativam os LB. Os LB ativados produzem anticorpos IgE específicos (HAMMAD *et al.*, 2010; DECKERS *et al.*, 2013). Os IgEs específicos, se ligam ao receptor FcεRI do mastócito, essa ligação entre IgE e mastócito, torna o mastócito sensibilizado. Após a sensibilização do mastócito, em uma segunda exposição do indivíduo, ao alérgeno, o mastócito secreta uma gama de mediadores químicos, que são divididos em grânulos (exemplo: histamina e serotonina) e os neoformados (leucotrienos e prostaglandinas), além de secretar o fator de ativação plaquetária (PAF) e citocinas, como IL-5, TNF-α, entre outras citocinas do perfil Th2 (HOLGATE, 2008; SCHOFIELD & CALHOUN, 2011).

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas que reduz a função pulmonar e induz a hiperresponsividade das vias aéreas (AHR) a irritantes inespecíficos diversos, como estímulos físicos (exemplo: frio), substâncias irritantes, exposição de alérgenos, infecções, exercícios, entre outros. Trata-se de uma doença caracterizada por obstrução variável, reversível ou irreversível das vias aéreas e uma exacerbada resposta broncoconstritora a estímulos não relacionados ao antígeno (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA - SBPT, 2012) (Figura 1).

Segundo o *Global Strategy for Asthma Management and Prevention* (GINA, 2018), cerca de 1 a 18% da população do mundo, sofre com asma. Essa porcentagem varia dependendo da região. Estimativas mostraram que essa taxa vem aumentando em todos os grupos etários, embora essas tendências são mais marcantes em crianças até 14 anos. A asma é uma doença com grande mortalidade no mundo, cerca

de 346.000 de pessoas morreram com asma (GINA, 2018). O Brasil é o oitavo país do mundo em prevalência de asma (aproximadamente 21%) (SBPT, 2012).

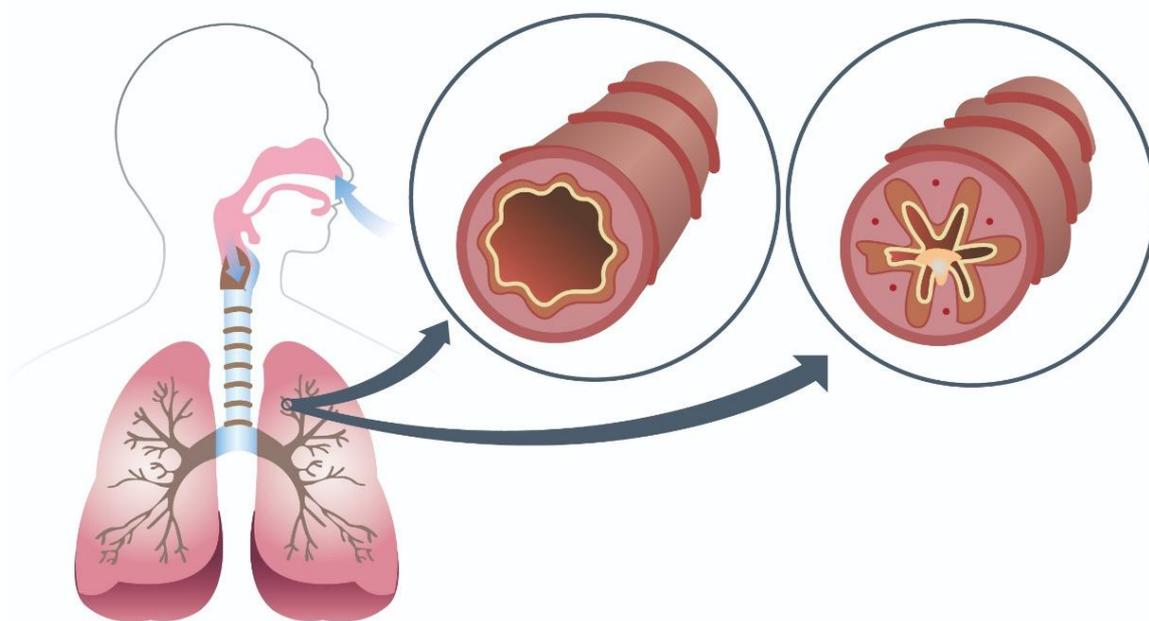


Figura. 1: Diferença entre brônquios normais e com inflamação alérgica pulmonar. Os principais sinais da asma nas vias aéreas são: secreção de muco dentro das vias aéreas, vasoconstricção e edema. Todos esses fatores dificultam a passagem de ar.

Asma clinicamente é caracterizada por, como dispneia, tosse seca, sibilância, sensação de aperto torácico, dificuldade ao respirar (o paciente apresenta dificuldade para expirar e não para inspirar como muitos pensam). Em geral esses sintomas variam ao longo do tempo e de intensidade. Essas variações dependem de fatores externos, como alérgeno, exercício físico, mudança de clima, infecções respiratórias, entre outros (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH 2019).

Podemos considerar a asma uma síndrome complexa, sendo resultado de fatores genéticos e ambientais, cuja a causa não está completamente elucidada. A inflamação das vias aéreas, é um denominador comum, e tem características hiperresponsivas. Sendo assim, as vias aéreas contraem facilmente em resposta a uma extensa gama de estímulos externos, como citado acima. Em geral o estreitamento das vias aéreas é reversível, em alguns asmáticos essa obstrução das vias aéreas se torna irreversível, devido à cronicidade da doença (PASCUAL & PETERS, 2005; CAMPOS, 2007; BRANNAN & LOUGHEED, 2012).

Sendo a asma um processo inflamatório, é dividida também em duas fases: fase aguda e fase crônica. A fase aguda é caracterizada pela obstrução reversível do fluxo de ar, e mediada por mastócitos e mediadores químicos, tais como histamina e leucotrienos. A reação aguda ocorre minutos após a exposição ao alérgeno (LEE & YANG, 2013). A fase crônica é caracterizada por infiltrado leucocitário, principalmente de eosinófilos (GALLI *et al.*, 2008) e ocorre horas após a exposição ao alérgeno. A obstrução irreversível ocorre devido ao remodelamento do pulmão, que é caracterizado por deposição de colágeno e muco (FERREIRA *et al.*, 2017), hiperplasia do músculo liso, ativação de fibroblastos (STUMM *et al.*, 2014), aumento de níveis de TGF- β (FAHY, 2015) e VEGF (YUKSEL *et al.*, 2013) (Figura 2).

É bastante conhecido que linfócitos T e eosinófilos são de extrema importância na evolução da asma (DECKERS *et al.*, 2013). Diversos estudos demonstram uma forte associação entre o infiltrado eosinofílico e o aumento da hiper-reatividade das vias aéreas, tanto em humanos, como em uma diversidade de modelos experimentais de inflamação alérgica pulmonar. Eosinófilos secretam proteínas que conseguem romper a barreira do epitélio, causando degradação enzimática de mediadores ou prejudicando o efeito broncoprotetor. (De BOER *et al.*, 1996, MEHTA *et al.*, 1997, MEURS *et al.*, 1999).

A asma possui um mecanismo inflamatório complexo que envolve diversas células e mediadores, dependendo da fase em que se encontra. Dentre esses podemos citar os eosinófilos (STUMM *et al.*, 2011), neutrófilos (HOLGATE, 2008), linfócitos T CD4⁺ e B (SCHOFIELD & CALHOUNM 2011), ativação de mastócitos, entre outras células (MAUAD *et al.*, 2007; BOULE & STERK, 2007; DECKERS *et al.*, 2013).

Uma variedade de diferentes populações dos linfócitos T estão envolvidas no estabelecimento e na evolução da resposta inflamatória na asma. Evidências de modelos animais indicam fortemente a presença de células T NK no desenvolvimento de doenças alérgicas das vias aérea, pois essas células expressam um receptor invariante de células T (TCR): em camundongos (V α 14) e em humanos (V α 24). A ativação do TCR invariante de células T NK leva à rápida produção de uma gama de citocinas inflamatórias, incluindo IL-4. Estudos mostraram que camundongos deficientes de células T NK, apresentam diminuição eosinofílica, e conseqüentemente diminuição da hiperresponsividade brônquica (SADLON *et al.*, 2010). Além disso, demonstraram também diminuição na concentração de citocinas do tipo Th2 quando

comparados com seus controles (LISBONNE *et al.*, 2003). A diminuição de eosinofília pulmonar foi observada também em camundongos deficientes de $T\gamma\delta$, além da concentração reduzida de IgG1, IgE e IL-5 (ZUANY-AMORIM *et al.*, 1998). Além disso, a proporção de células $T\gamma\delta$ no LBA de pacientes asmáticos é maior quando comparados a pacientes não asmáticos (PAWANKAR *et al.*, 1996). Trabalhos na literatura sugerem que $T\gamma\delta$ e NK T podem regular a diferenciação da resposta Th1 e Th2 (MEDZHITOV & JANEWAY, 1997) e, assim, modular o desenvolvimento de doenças pulmonares alérgicas.

Não está claro o papel dos linfócitos $CD8^+$ na asma alérgica, existe pouca informação na literatura sobre essa população linfocitária, e tais informações são conflitantes. Hamelmann e colaboradores (1996), mostram que o aumento da população de $CD8^+$, diminui a hiper-reatividade brônquica e a concentração de IgE no soro de camundongos. Porém YING e colaboradores (1997) demonstraram que o aumento de $CD8^+$, está proporcionalmente relacionado ao aumento de IL-4 e IL-5 e conseqüentemente de eosinófilos na biopsia de pacientes asmáticos. Martin *et al.*, (2004) discutiram esse papel conflitante do $CD8^+$, e mostraram que essa população pode apresentar tanto um papel anti-inflamatório quanto um papel pró-inflamatório, de acordo com a subpopulação observada.

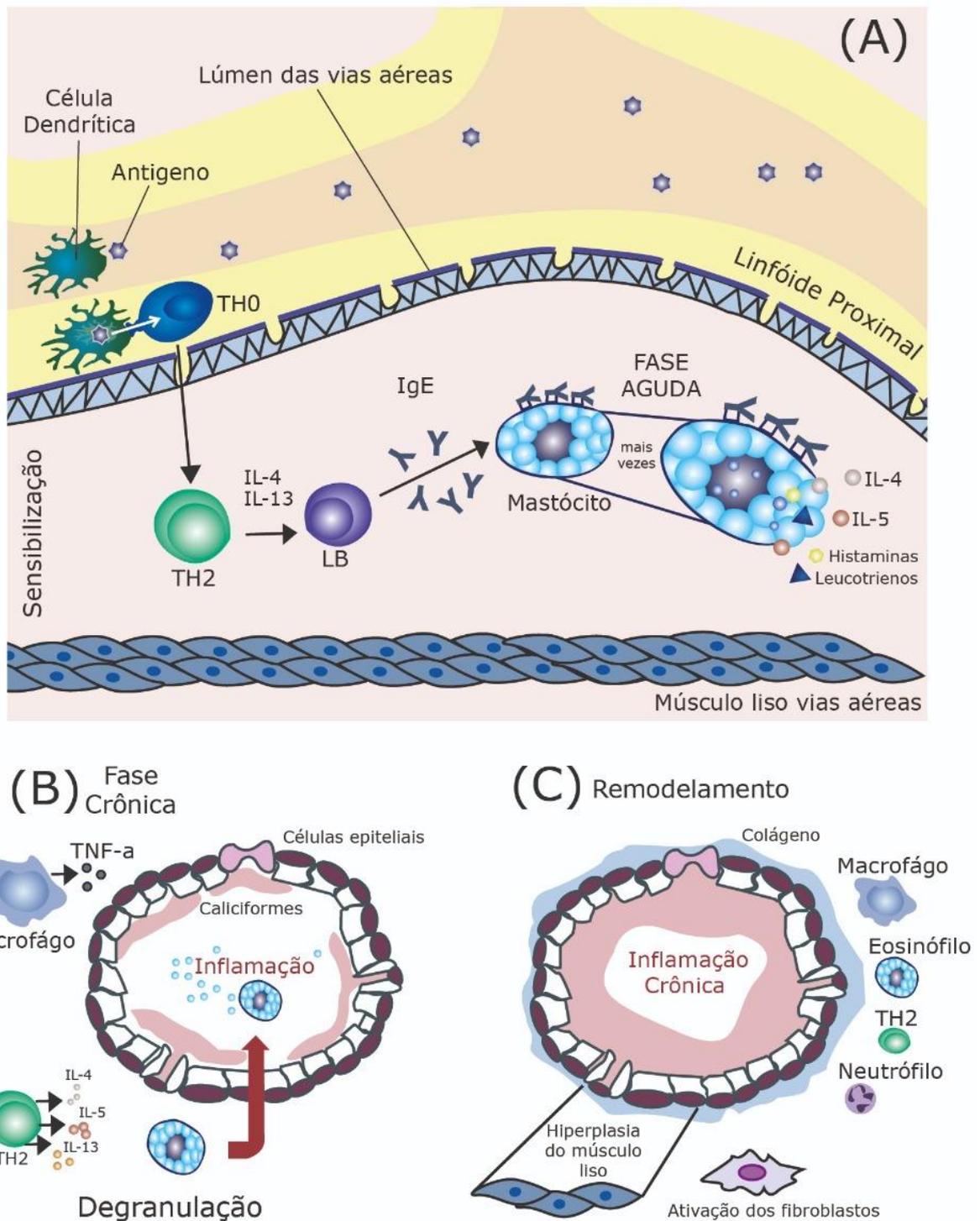


Figura 2. Ilustração do desenvolvimento da asma. A) Sensibilização do mastócito e fase aguda. O antígeno é capturado pela célula dendrítica. Em um linfóide proximal, a CD apresenta o antígeno para uma célula T inativa. Que se ativará célula Th2, que por sua vez ativa os LB, com auxílio de IL-4 e IL-13. Os LB secretam os IgEs específicos. Esses anticorpos vão se ligar ao mastócito, tornando-o sensibilizado. O mastócito degranula mediadores químicos como histaminas e leucotrienos. A fase aguda é caracterizada por mediadores e citocinas como, IL-4 e IL-5. B) Fase crônica: é caracterizada por migração de leucócitos, em principal por eosinófilos. C) Remodelamento: após repetidas exposições ao alérgeno, pode ocorrer alterações estruturais irreversíveis nas vias aéreas, que é denominado, remodelamento. É caracterizado por aumento de deposição de colágeno, secreção de muco, ativação de fibroblastos e hiperplasia do músculo liso.

1.2 Diabetes Mellitus e Diabetes Mellitus tipo I

O DM é um dos principais responsáveis pelo aumento mundial da morbidade e da mortalidade (PARCHWANI & UPADHYAH, 2012). As estimativas indicam que mais de 425 milhões de pessoas no mundo sejam acometidas pelo diabetes (*International Diabetes Federation - IDF*, 2018). Além disso, de acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) (2017-2018), um país pode gastar diretamente com o DM, dependendo da prevalência e do grau de complexidade do tratamento disponível, entre 2,5 e 15% do orçamento anual destinado à saúde. Além do grande orçamento anual destinado à doença, o DM também possui uma carga adicional para a sociedade, se levarmos em conta a perda de produtividade de trabalho, a aposentadoria precoce, de um paciente diabético, e em alguns casos até a morte prematura desse indivíduo. O DM acarreta perda de qualidade de vida para o indivíduo, pois algumas das consequências da doença são: insuficiência renal, cegueira, amputação dos membros inferiores, e doença cardiovascular (IDF, 2018).

Segundo a SBD, podemos considerar o DM, um grupo de distúrbios metabólicos e heterogêneo, sendo que a hiperglicemia uma característica comum para todos DM. Essa hiperglicemia ocorre, devido a defeitos na ação e/ou secreção da insulina. O DM é classificado, de acordo com a etiologia, em quatro classes: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), DM gestacional, e outros tipos específicos de DM (SBD, 2017-2018).

Segundo a IDF (2018) o DM1 é uma das mais importantes doenças crônicas na infância em todo o mundo. O DM1, anteriormente conhecido como *diabetes* juvenil, compreende cerca de 5% a 10% do total de casos de DM, e sua prevalência está aumentando.

O DM1 é uma doença complexa, que envolve uma combinação de fatores. Para entender a base desta doença, é preciso compreender os eventos que levam ao desenvolvimento da doença autoimune. Até o momento três causas que levam DM1: predisposição genética, desregulação imunológica e exposição a causas ambientais (van BELLE *et al.*, 2011). A maioria dos casos de DM1 são considerados casos autoimunes, porém existe alguns casos idiopáticos, o DM1 idiopático corresponde a minoria dos casos e caracteriza-se por ausência de marcadores de autoimunidade contra as células beta e não associação a haplótipos do sistema HLA. Os indivíduos

com essa forma de DM podem desenvolver cetoacidose e apresentam grânulos apoptóticos que se apresentam marcadores contra as células beta e não associados (SBD, 2017-2018).

O DM1 ocorre devido a destruição total das células beta pancreáticas. A ausência de tais células resulta na deficiência completa na produção e secreção de insulina. O DM1 é caracterizado, por uma extensa resposta imune, devido à presença de um infiltrado de células nas ilhotas pancreáticas sobre a progressão temporal da insulite (inflamação das ilhotas de Langerhans do pâncreas). A inflamação das ilhotas de Langerhans do pâncreas acontece devido à infiltração de células mononucleares nas células beta pancreáticas. Essa infiltração de linfócitos pode resultar na destruição de células beta produtoras de insulina (WILLCOX *et al.*, 2008; van BELLE *et al.*, 2011).

Diabetes experimental é induzido em animais, utilizando compostos químicos que destroem, seletivamente, as células betapancreática, sendo efetivos e simples (KIRSTEN, 2006). O modelo de DM induzido por aloxana, é comumente utilizado para o modelo de DM1 (LERCO *et al.*, 2003; MORDES *et al.*, 2004), por induzir um modelo de DM insulino-dependente (ROHILLA & ALI, 2012).

A via endovenosa tem sido a de escolha na maioria das espécies animais, pois o efeito da aloxana fica mais evidente nessa via, devido à velocidade de infusão desse agente diabetogênico. O jejum também tem um papel importante na resposta da aloxana. Lerco *et al.* (2003), mostraram que 95% dos animais tratados com aloxana, em jejum prolongado, tornaram-se diabéticos.

1.3 *Diabetes mellitus*, asma e insulina

Como visto acima, asma e diabetes são doenças comuns, e possuem grande incidência mundial. Embora as taxas individuais, de cada doença, sejam altas, em todo o mundo, não existe fontes que mostrem a incidência de ambas em um mesmo indivíduo. Porém, existe dados clínicos (DOUEK *et al.*, 1999; TOSCA *et al.*, 2013) e experimentais (d-ANNUNZIO *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2018) na literatura, sugerindo que a inflamação alérgica pulmonar é prejudicada em indivíduos diabéticos. Diversos estudos mostram que o desencadeamento de DM, em pacientes previamente asmáticos, atenua os sintomas da asma. Quando esse paciente é tratado com a insulina, os sintomas da asma se agravam novamente. Na maioria dos casos em que ocorre essa associação patológica, a gravidade dessas doenças é leve. Em

suma, asma e diabetes parecem apresentar certo tipo de antagonismo (HELANDER, 1958; BOTTINI & FONTANA, 1999; TOSCA *et al* 2013). Evidências experimentais indicam que uma reação inflamatória geral reduzida é observada sempre que uma falta relativa de insulina ocorre em um organismo (GARCIA-LEME, 1993).

Sabe-se que hormônios e outros fatores endócrinos, como glicocorticoides e agentes adrenérgicos, desempenham um papel modulatório na inflamação alérgica (HOFFMAN *et al.*, 1982) e que 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; KEETON *et al.*, 2002) durante o desenvolvimento da resposta inflamatória.

Segundo dados, o DM induzido por aloxana, parece atenuar todas as fases da inflamação alérgica pulmonar, em modelo experimental, e a reversão das respostas prejudicadas é alcançada pelo tratamento de insulina. Cavalher-Machado (2004), utilizando ratos diabéticos e depois sensibilizados com OVA, mostrou que a degranulação dos mastócitos nesses animais, foi reduzida, assim como a liberação de histamina, e por consequência a responsividade da via aérea. Outros estudos, com modelo experimental similar, mostram que o número de mastócitos também pode ser prejudicado, e conseqüentemente, diminui a secreção de IgE (DIAZ *et al*, 1996; CARVALHO *et al.*, 2011). O tratamento com insulina restabeleceu o processo de sensibilização do mastócito.

Cascata de Sinalização das MAPKs

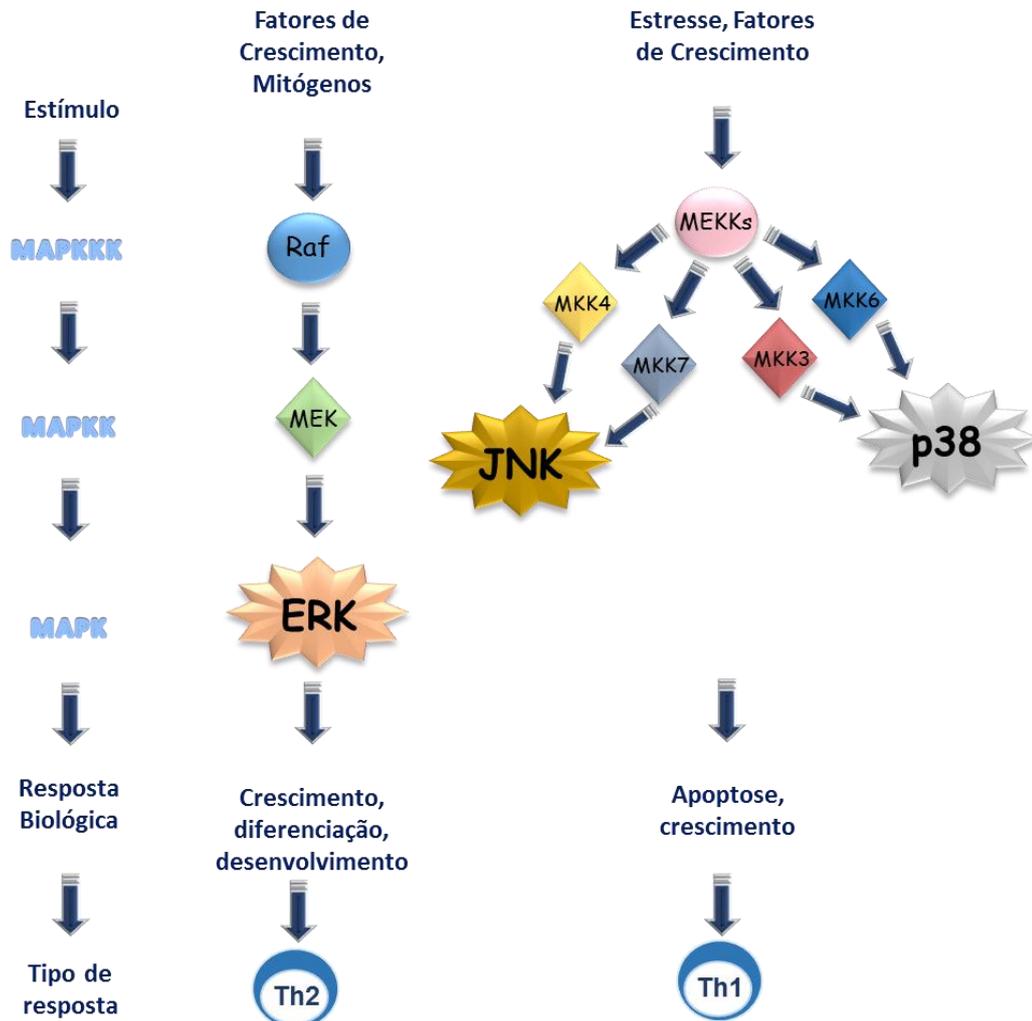


Figura 3. Cascata de Sinalização das MAPKs. A fosforilação de ERK, polariza para a resposta Th2 que está ligada a doenças atópicas, como a asma. A fosforilação de p38, polariza para a resposta Th1 que está ligada a doenças autoimunes como diabetes tipo 1. A insulina ativa a fosforilação de ERK, inibindo a fosforilação de p38.

Na fase inicial da inflamação alérgica pulmonar, utilizando o mesmo modelo experimental, pode-se observar que ratos diabéticos apresentam redução em moléculas de adesão P e E selectina (MARTINS *et al.*, 2010), citocinas como: IL-5 (CARVALHO *et al.*, 2018), TNF- α , IL-1 β (MARTINS *et al.*, 2010), corroborando com a redução de infiltrado inflamatório pulmonar (VIANNA & GARCIA LEME, 1995) e migração de neutrófilos (MARTINS *et al.*, 2010) e eosinófilos no pulmão (CARVALHO *et al.*, 2018). Por consequência da diminuição desses fatores, a hiper-reatividade brônquica, também é prejudicada (CARVALHO *et al.*, 2018) e a insulina por sua vez,

restabeleceu todos os parâmetros estudados na fase inicial da inflamação alérgica pulmonar.

Devido a dados na literatura que comprovam o efeito modulatório da insulina na inflamação alérgica pulmonar, e considerando dados prévios da fase inicial. Decidimos estudar o efeito modulatório da insulina na fase tardia da inflamação alérgica pulmonar, em meu mestrado. Utilizando o modelo OVA para induzir a inflamação alérgica pulmonar tardia, em camundongos tornados diabéticos, pode-se observar uma diminuição significativa do infiltrado leucocitário, principalmente de eosinófilos no LBA e no sangue periférico dos animais, além da redução de colágeno ao redor das vias aéreas e ausência de muco dentro das mesmas. O tratamento de uma única dose de insulina restabeleceu apenas a migração celular, principalmente de eosinófilos no sangue periférico e não restabeleceu os sinais de remodelamento nas vias aéreas (muco e colágeno). Sabendo que o tratamento de insulina prolongado tende a ser mais eficaz, que tratamentos curtos (PEREIRA *et al.*, 1987; SANNOMIYA *et al.*, 1990) optamos por utilizar múltiplas doses de insulina. E esse tratamento com múltiplas doses, restabeleceu tanto o infiltrado eosinofílico no LBA, como os sinais de remodelamento nas vias aéreas. Sugerindo que a insulina também modula o remodelamento na inflamação alérgica pulmonar tardia (FERREIRA *et al.*, 2017).

Estudos mostraram, que mesmo corrigindo os níveis de glicose no sangue, utilizando 2-desoxiglicose, os fatores como: infiltrado leucocitário e citocinas do perfil Th2, que indicam a inflamação alérgica pulmonar, mantinham-se prejudicados. Nesses mesmos estudos, o tratamento com insulina, restabeleceu os fatores indicativos da resposta alérgica. O que nos sugere que a asma é suprimida pelo DM, pela falta de insulina e não devido a hiperglicemia (VIANNA & GARCIA-LEME, 1995; SINGH *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2017).

Considerando os dados previamente obtidos e sabendo que tanto asma como o DM, são doenças de alta prevalência, é de fundamental relevância ampliar o conhecimento sobre a resposta inflamatória pulmonar na fase tardia em indivíduos tornados diabéticos. Além disso, a investigação do papel da insulina sobre a inflamação alérgica pulmonar contribuirá para a discussão sobre o uso deste hormônio em pacientes que desenvolvem asma alérgica na sua fase tardia.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar o papel modulatório da insulina em modelo experimental da inflamação alérgica pulmonar tardia em camundongos diabéticos e sadios.

Para atingir tal o objetivo foi necessário:

- a) Avaliar da expressão de moléculas de sinalização intracelular;
- b) Avaliar do perfil de imunoglobulinas presentes no soro do animal;
- c) Determinar do perfil de citocinas no sobrenadante do homogenato de pulmão;
- d) Analisar do processo inflamatório alérgico pulmonar no lavado broncoalveolar;
- e) Caracterizar da expressão de moléculas de superfície nos tecidos de pulmão, baço, timo e medula óssea;
- f) Avaliar e mecânica pulmonar.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/490) (Anexo I). Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/C, com peso médio inicial de 20-25 gramas e idade entre 8 e 12 semanas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério, acondicionados em gaiolas coletivas, contendo no máximo cinco animais, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de 22°C e com suprimentos de água e alimento disponíveis todo o tempo.

Os animais foram divididos em 6 grupos, conforme a tabela 1:

Grupos	Injeção com aloxana	Desafio com OVA	Tratamento com insulina
Não diabético, sensibilizado, desafiado com SAL.	X	X	X
Não diabético, sensibilizado, desafiado com OVA.	X	✓	X
Não diabético, sensibilizado, desafiado com OVA, tratado com insulina.	X	✓	✓
Diabético sensibilizado, desafiado com SAL.	✓	X	X
Diabético sensibilizado, desafiado com OVA.	✓	✓	X
Diabético sensibilizado, desafiado com OVA, tratado com insulina.	✓	✓	✓

Tabela 1: Relação dos grupos estudados. Todos os grupos receberam sensibilização com OVA e [Al(OH)₃]. O símbolo X indica os animais que não receberam o tratamento indicado. O símbolo ✓ indica que os animais receberam o tratamento indicado.

3.2 Indução de *diabetes mellitus*

Para indução do DM os animais foram deixados em jejum de 12 horas antes de receberem uma injeção endovenosa de aloxana, via retro-orbital, (Sigma-Aldrich) (50 mg/kg) dissolvida em solução salina fisiológica. Animais controle receberam volume equivalente de solução salina, pela mesma via. A glicemia foi determinada através de um monitor de glicose (Accu-Check Active - Roche Diagnosis®), utilizando-se amostras de sangue obtidas da extremidade da cauda dos animais. Somente foram utilizados, como diabéticos, animais com glicemia superior a 300 mg/dL (SPILLER *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2017).

3.3 Modelo de inflamação alérgica pulmonar

3.3.1 Sensibilização

Os animais foram imunizados com uma mistura contendo 20µg de ovalbumina (OVA) grau III (Sigma, USA) e 2 mg de hidróxido de alumínio [Al(OH)₃], Reheis Inc, USA), injetada intra-peritonealmente (i.p.) em 0.2 mL de PBS. Após 12 dias os animais receberam esta mesma dose, como reforço. (STUMM, *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2017).

3.3.2 Desafio

Após 18 dias da primeira sensibilização, os animais receberam o primeiro desafio antigênico através da exposição por via respiratória de uma solução de OVA grau III, 1mg/mL em solução salina, durante 30 minutos, o procedimento foi repetido durante 7 dias (dias 28-33 e 35). A nebulização da OVA foi realizada por um aparelho ultrassônico (ICEL US-800, São Paulo, Brasil) que fornece partículas de 0,5-10µm de diâmetro, em aproximadamente 0,75 cc/min. Os experimentos foram realizados 24 horas após o último desafio antigênico (STUMM, *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2017).

3.4 Tratamento com insulina

O grupo de diabéticos que receberam o desafio com OVA, foram tratados com 2UI de insulina NPH via subcutânea, 12h antes de cada desafio (às 19:00 horas) e 1UI de insulina NPH via subcutânea 2 horas antes de cada desafio (às 07:00 horas). O grupo de animais não diabéticos que receberam o desafio com OVA foram tratados com 1UI de insulina NPH via subcutânea 2 horas antes de cada desafio (07:00 horas). As análises foram feitas 2 horas após a última dose de insulina (FERREIRA *et al*, 2017).

3.5. Protocolo experimental

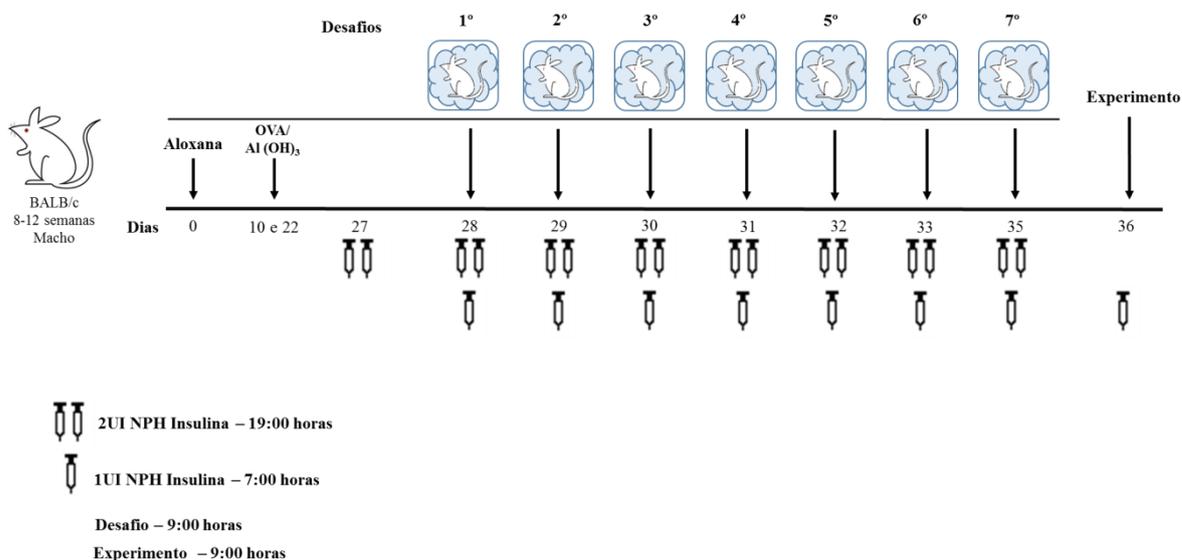


Figura 4. Delineamento experimental. Os animais receberam aloxana (50mg/Kg) no dia 0, via endovenosa. Após 10 dias os animais considerados diabéticos, foram sensibilizados com uma solução de OVA+AI (OH)₃ (20µg + 2mg em PBS) por via intraperitoneal, e após 12 dias da sensibilização os animais receberam uma dose reforço. Após 6 dias da última sensibilização os animais receberam 7 desafios em dias (via aerossol), e antes de cada desafio, os animais receberam por via subcutânea, doses de insulina, sendo às 19:00h 2UI de insulina NPH, e às 7:00h 1UI de insulina NPH. O experimento ocorreu 24h após o último desafio.

3.6 Determinação do perfil intracelular por Eletroforese e Imunoblotting

Fragmentos dos pulmões foram macerados (macerador de tecidos Potter-Elvehjem) separadamente em tampão RIPA (300µl/5mg) aditivado com coquetéis inibidores de fosfatase e protease (Ortovanadato de Sódio 1M, utilizado 1:100 e Pirofosfato de Sódio 1M, utilizado 1:200), seguido de centrifugação (12000RPM / 20 minutos). A concentração de proteínas foi determinada utilizando Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL) e foi utilizado amostras contendo 20µg de proteínas.

As moléculas de sinalização intracelular ERK 1/2 MAP Kinase (Thr183/Tyr185), p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182), JNK (phospho-54/SAPK-JNK), STAT-3 (124H6), and phospho-STAT 6 (Tyr641) foram analisadas por Western blot. Os ensaios foram realizados por eletroforese em gel de policrilamida a 10% na presença de sulfato de sódio (SDS) a 1%, conforme orientação do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Foi adicionado as amostras tampão Tris-HCl 62,5 M, contendo glicerol 10%; SDS 2%; β-mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,001%. Estas foram incubadas a 95°C durante 5 min e, alíquotas de 20 µL, aplicadas no gel de policrilamida-SDS. A separação das proteínas foi feita em cuba de eletroforese (tampão de corrida: Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,5%) a 25 mA (100V) por aproximadamente 140 minutos. Solução padrão de proteínas foi usada como referência do peso molecular. As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%; metanol 20%), a 150 mA (50V) durante 60 minutos. Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi colocada em solução de leite desnatado (5%) em tampão Tris-salina (TBS) durante 1 hora para minimizar as ligações específicas, incubadas com anticorpo primário durante 15-18 horas a 4°C, sob agitação à temperatura ambiente, e com anticorpo secundário durante 1 horas em temperatura ambiente. A cada etapa de incubação a membrana foi lavada com TBST durante 5 minutos por 3 vezes consecutivas. A revelação foi realizada utilizando ECL (*enhanced chemiluminescence* - ECL; Amersham, Arlington Heights, IL). As densidades relativas das bandas foram determinadas por meio de análise densitométrica utilizando o software NIH Image. Os anticorpos primários foram adquiridos da Cell Signaling Technology (Beverly, MA, EUA), a diluição utilizada foi 1:1000 em 5% de BSA em TBST. O anticorpo secundário,

anti-coelho, foi adquirido da Abcam, diluição de 1:10000, diluído em 5% de leite desnatado em TBST.

3.7 Determinação da concentração de insulina

A insulinemia foi determinada em amostras de soro estocadas a -20°C, utilizando kit *Rat Insulin Enzyme Immunoassay* (SPIbio, Massy Cedex, France), que se baseia na capacidade da insulina, presente nas amostras do soro, em competir com a insulina de camundongo ligada a acetilcolinesterase, pela ligação a um anticorpo específico. A leitura foi realizada a 414nm em leitora de microplacas (EPOK, Biotek, USA) e os resultados foram expressos em ng/mL.

3.8 Determinação da concentração de IgE, IgG1 e IgG2a

Após a coleta, por punção cardíaca do sangue total dos animais pertencentes aos grupos experimentais, foi realizada a separação do soro por centrifugação das amostras a 1600rpm por 20 minutos.

A concentração de IgE, IgG1 e IgG2a foram determinados em amostras de soro estocadas a -20°C, utilizando kit *IgE Mouse Enzyme Immunoassay* (Abcam), o kit *IgG1 Mouse Enzyme Immunoassay* (Abcam), e o kit *IgG2a Mouse Enzyme Immunoassay* (Abcam), respectivamente. A leitura foi realizada a 570nm e 450nm em leitora de microplacas (EPOK, Biotek, USA) e os resultados foram expressos em ng/mL.

3.9 Quantificação de citocinas por enzima-imunoensaio

Após a eutanásia dos animais, foi realizada a lobectomia do lobo esquerdo do pulmão, para a análise de citocinas por ELISA.

Foi realizada a maceração do lobo esquerdo pulmonar, utilizando 1mL de tampão RIPA, posteriormente foi centrifugado e o sobrenadante coletado para posterior análises.

A dosagem de citocinas (IL-4, IL5, IL-10, IL-13, TNF- α , TGF- β , IFN- γ e VEGF) foram realizadas em amostras do homogenato de pulmão, utilizando-se kits comerciais (R&D Systems, Inc., Mineapolis, MN, USA).

3.10 Obtenção de fluido de lavado broncoalveolar

Os animais foram eutanasiados através de uma dose letal de cloridrato de quetamina (270 mg/kg) e cloridrato de xilazina (30mg/kg). Em seguida, a traquéia foi devidamente canulada com o auxílio de um cateter periférico (24G x $\frac{3}{4}$). Após a traqueia ser canulada, foi realizada a lavagem do espaço aéreo com 1,5 mL de solução PBS (pH 7,4) para obtenção do fluido de lavado broncoalveolar (LBA). As amostras dos diferentes grupos experimentais foram centrifugadas (1500rpm/10 minutos) a 4°C e o sedimento celular obtido, foi ressuspenso em 1 mL de PBS (pH 7,4) (VIEIRA *et al.*, 2007).

3.11 Contagem celular do LBA

Para contagem do número total de células no fluido de LBA, a suspensão celular, foi diluída na proporção 1:2 (v:v) com líquido de Turk e a contagem total de células foi determinada em câmara de Neubauer. Além disso, mediante a utilização de uma citocentrífuga, a contagem diferencial foi realizada por meio de esfregaços corados pelo método pancrômico de Rosenfeld (ROSENFELD, 1947). Um total de 100 células foi contado por microscopia de luz, utilizando-se objetiva de imersão.

3.12 Obtenção das células de medula óssea

Os fêmures dos animais previamente anestesiados e eutanasiados de todos os grupos foram removidos cirurgicamente e a camada muscular removida com auxílio de um bisturi.

Em um fluxo laminar os ossos foram colocados em etanol 70%, depois lavados com RPMI estéril 1640 e em seguida as duas epífises foram removidas usando tesoura e pinça estéreis, o canal medular foi exposto e a cavidade lavada com 4mL de meio Iscove's contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) para a extrusão da medula

óssea para o um tubo de polipropileno estéril de 15mL. A amostra foi então homogeneizada. A suspensão de células geradas foi chamada de células frescas da medula óssea (MARIM *et al.*, 2010).

3.13 Obtenção das células do pulmão, timo e baço

Após a eutanásia dos animais, foi realizada a assepsia, para a laparotomia, onde foi retirado o baço, a incisão se estendeu até a região do tórax para a retirada do timo e pulmão.

Para a obtenção das células pulmonares, foi separado apenas o lobo direito de todos os animais, depois da lobectomia do pulmão, os lobos foram colocados em solução colagenase (2 mg/mL) durante 1h em estufa a 37 °C. A partir disto, foi seguido o mesmo protocolo para todos os órgãos, descrito abaixo.

Os tecidos foram homogeneizados utilizando o homogeneizador de tecidos Potter-Elvehjem com 3mL de soro fetal bovino a 10%. Ao finalizar o processo de homogeneização, foi completado 10mL de soro fetal bovino a 10%. Em seguida foi adicionado 1mL de solução de lise BD, e centrifugado (1200 rpm/12 minutos). Após a centrifugação dos órgãos macerados, foi descartado o sobrenadante e o pellet foi ressuspensão em 1mL/órgão de solução de lise durante 10 minutos a temperatura ambiente. As células foram ajustadas na concentração de 1×10^6 e fixadas em PBS contendo 2% de paraformaldeído durante 30 minutos à TA. A seguir as populações celulares foram submetidas à marcação de anticorpos. Para análise de timo, baço, pulmão, foram realizados *pools* contendo órgãos de 3 animais para cada grupo, enquanto as medulas ósseas foram analisadas individualmente (MIROTTI *et al.*, 2017).

3.14 Análise das populações celulares por FACS em medula óssea, pulmão, timo e baço

A suspensão celular obtida no item 3.12, foi centrifugada a 1200rpm durante 12 minutos a 4°C. Em seguida, 10^7 células/mL foram fixadas em PBS contendo 2% de paraformaldeído durante 30 minutos TA, lavadas com 1mL de tampão PBS contendo 0,5% BSA e marcadas com o “cocktail” de anticorpos, previamente titulados: anti-CD4⁺, anti-CD8⁺, anti-NK1.1, anti-TCR $\gamma\delta$, anti-CD22, anti-CD19, anti-siglec e anti-GR1 (fluorescências e painel vide Tabela 2) durante 20 minutos à TA e ao abrigo da

luz. As células foram lavadas com 1mL de tampão PBS, centrifugadas a 1500rpm durante 5 minutos e ressuspensas em 400µL de PBS. Após a incubação, as células foram adquiridas em citômetro de fluxo (FacsCanto) e os dados gerados, analisados com o auxílio do software FlowJo (TREE STAR, Inc-USA). Foram analisados 20.000 eventos (TSJUITA, 2016), o citômetro foi calibrado com *beads* magnéticas. Utilizando controles de cadeia isotópicas, controles positivos e foi realizado FMO dos marcadores para cada tecido avaliado. Esse projeto teve a colaboração da Dr. Maristela Tsjuita. A aquisição foi realizada no departamento de pós-graduação em farmácia, com auxílio da técnica Renata Albuquerque.

Anticorpos	Espécie hospedeira	Diluição	Concentração original	Fabricante	Clone	Fluorocromo
anti-CD3	Rato	Puro (1µL)	0.2mg/mL	Ebioscience	17A2	FITC
anti-CD45	Rato	Puro (1µL)	0.2mg/mL	Ebioscience	30-F17	APC
anti-CD4	Rato	Puro (1µL)	0.5mg/mL	Ebioscience	RM4-4	PE
anti-CD8	Rato	Puro (1µL)	0.5mg/mL	Ebioscience	53-6.7	PE
anti-TCR	Hamster	Puro (1µL)	0.2mg/mL	Ebioscience	UC7- 13D5	PE
anti-NK	Camundongo	Puro (1µL)	0.2mg/mL	Ebioscience	PK136	PE
anti-CD19	Rato	Puro (1µL)	0.1mg/mL	Ebioscience	Ebio1D3	PE
anti-CD22	Coelho	Puro (1µL)	0.2mg/mL	ABCAM	Ab25369	PE
anti-SIGLECf	Camundongo	Puro (1µL)	0.2mg/mL	BD	E50- 2440	PE
Anti-Cd11b	Camundongo	Puro (1µL)	0.2mg/mL	BD	1A8	PE

Tabela 2. Relação dos anticorpos. Descrição dos anticorpos utilizados nas reações de citometria.

Quanto ao perfil imunofenotípico, para identificar e analisar da expressão das moléculas de superfície (exemplo CD4⁺, na figura abaixo) na população de células do pulmão, baço, timo e MO foi realizado um gráfico de dispersão de pontos, *dot plot*, no qual o eixo das abcissas corresponde ao parâmetro FSC (tamanho celular) e o eixo

das ordenadas ao parâmetro SSC (complexidade celular). Foi delimitada uma região ao redor das células totais, excluindo-se os “*debris*”. Em seguida, a partir desta janela eletrônica, foi desenvolvido outro gráfico um contendo no eixo das abcissas o parâmetro CD3 APC e na ordenada o parâmetro CD4 FITC. A porcentagem de células positivas, foi avaliada no quadrante superior à direita, correspondente à populações duplamente positiva para os marcadores de CD3 e CD4 (Figura 4).

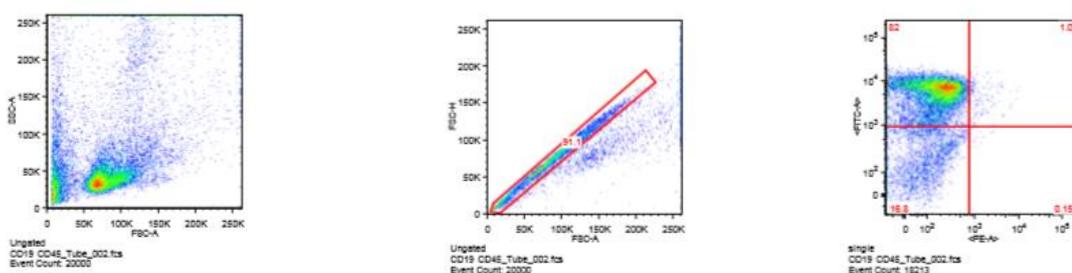


Figura 5. Estratégia de seleção das populações de CD4. Aquisição realizada em FacsCanto e os dados gerados, analisados com o auxílio do software FlowJo (TREE STAR, Inc-USA). Foram analisados 20.000 eventos. 1) total de células. 2) seleção de células, excluindo os *debris*. 3) população de CD4 por CD3 e CD45.

3.15 Avaliação da Mecânica Pulmonar por BUXCO

Para a avaliação da hiper-reatividade brônquica foi utilizado o sistema Buxco (o espaço foi gentilmente cedido pelo professor Dr. Momtchilo Russo), onde foi avaliado o Penh (índice de hiper-reatividade brônquica), que leva em conta o tempo inspiratório e expiratório. A resistência respiratória foi expressa como aumento na pausa respiratória (Penh), calculada pela fórmula: $Penh = (Te/Tr-1) \times Pef/Pif$. Onde Penh “*enhanced pause*”, Te: tempo expiratório (segundos); Tr: tempo de relaxamento (segundos); Pef: pico de fluxo respiratório e Pif: pico de fluxo inspiratório (segundo instruções do fabricante). O agente broncoconstritor utilizado para a realização da curva dose-resposta foi a metacolina (FAUSTINO *et al.*, 2012).

A hiper-reatividade brônquica foi avaliada em três diferentes dias: 2º dia de desafio; 4º desafio e 6º desafio, (dias do delineamento experimental: 29,31 e 33, respectivamente), a fim de avaliar a evolução dos desafios antigênicos nas vias aéreas, e do tratamento diário de insulina. A capacidade à metacolina (MCh) foi avaliada em camundongos conscientes utilizando um fluxo pletismógrafo de corpo inteiro (FWBP) (Buxco Eletronics, USA).

Os camundongos foram colocados na câmara principal do FWBP. Para estimar o fluxo e unidades de volume do sinal de pressão da caixa, o pletismógrafo foi calibrado através de uma injeção de 1mL de ar antes das medições. O tempo expiratório e de relaxamento, e o pico inspiratório e pressão expiratória foram extraídos a partir dos registros de pressão da caixa. Picos de fluxo expiratório, e inspiratória foram calculados dos picos de pressão inspiratórias e expiratórias, respectivamente.

A hiper-reatividade brônquica foi avaliada usando os valores de Penh e da área sob a curva (AUC) como índice. As medições da linha de base foram feitas e em média, durante 3 minutos após a aclimatação dos animais para o FWBP. Os camundongos foram expostos à nebulização de soro fisiológico durante 3 minutos, e em seguida, foram expostos a concentrações crescentes de metacolina, também por nebulização (12 e 25mg/ml), por utilização de um nebulizador ultra-sônico. Valores Penh foram calculados com uma média de aproximadamente a cada 25 respirações, e os valores acumulados foram calculados e expressos para cada concentração (VIEIRA, *et al.*, 2007) (Figura 5).

3.16 Avaliação da Mécânica pulmonar por FlexiVent

Os animais foram anestesiados com quetamina (120 mg/kg, ip) e xilazina (12,0 mg/kg, ip) e permaneceram nesta condição durante todo o procedimento experimental da avaliação da mecânica respiratória. Em seguida, os animais foram traqueostomizados para inserção de uma cânula metálica 18 G (BD Company, Brasil) serrada, totalizando 3,2 cm de comprimento e com bisel suavizado. Paralelamente, a veia jugular direita foi canulada com um cateter de polietileno. Encerrados estes procedimentos, os animais foram conectados ao aparelho de ventilação mecânica para pequenos animais (flexiVent, SCIREQ, Canadá) e submetidos aos seguintes parâmetros de ventilação pulmonar: volume corrente 10 ml/kg; frequência, 150 ciclos/minuto e PEEP (positive end-expiratory pressure), 3 cm/H₂O. A seguir os animais receberam uma dose de relaxante muscular (Pancuron®, 1 mg/kg, ip). Decorridos 7 minutos da injeção do relaxante muscular, os animais foram submetidos a duas manobras de recrutamento pulmonar de 6 segundos de duração cada com rampa de pressão partindo da PEEP até 30 cmH₂O e mantidos nesta pressão até o

fim da manobra, a fim de homogeneizar todo o tecido pulmonar e extinguir possíveis regiões com atelectasia. Posteriormente foram realizadas perturbações multifrequenciais (1-20,5 Hz) para cálculo da impedância respiratória, posterior aplicação do modelo de fase constante e obtenção dos seguintes parâmetros: resistência Newtoniana das vias aéreas (Rn), viscosidade (G) e elastância (H) do tecido pulmonar. Esses parâmetros foram obtidos após a injeção de 20 μ L/10 g de peso de PBS e após a aplicação de metacolina (MCh), um agonista de receptor muscarínico, nas seguintes doses: 30, 100, 300 e 1000 μ g/kg (administradas pela cânula inserida na veia jugular direita). Os dados utilizados corresponderam à média de resposta de cada parâmetro após a aplicação do PBS e aos picos de resposta após as aplicações das quatro doses de MCh (Figura 5). O espaço foi gentilmente cedido pelo professor Dr. Wothan Tavares de Lima.

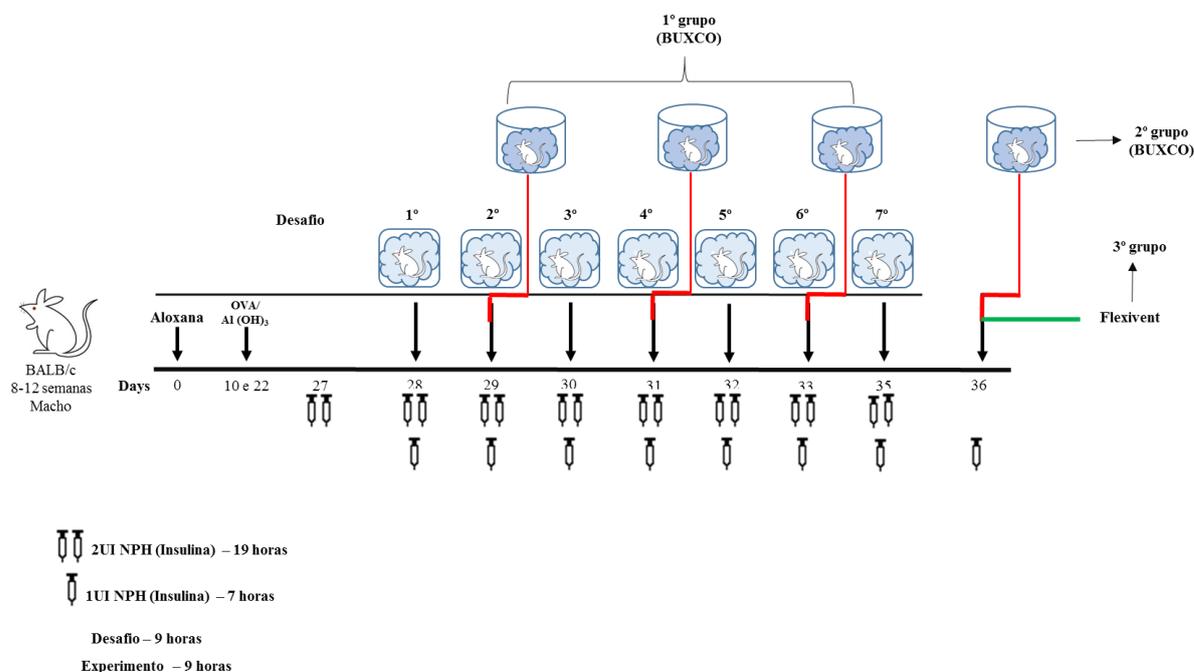


Figura 6. Protocolo experimental com BUXCO e FlexiVent. Para a avaliação de mecânica pulmonar por BUXCO, os animais foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo, recebeu os desafios à metacolina em 3 dias diferentes (após o 2º, 4º e 6º desafio). O segundo grupo recebeu desafio à metacolina apenas 24h após o último desafio. O terceiro grupo foi utilizado para a avaliação pulmonar por FlexiVent, 24h após o último desafio.

3.17. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad 6 (San Diego, CA, EUA), teste t de Student e análise de variância (ANOVA – duas vias),

seguido do teste de Tukey-Kramer ou Bonferroni para realizar comparações. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Neste presente estudo investigamos a influência da insulina no remodelamento da inflamação alérgica pulmonar em modelo murino diabético e sadio.

4.1 Caracterização do modelo de DM

No presente estudo, durante os experimentos realizados com camundongos machos da linhagem BALB/C, observou-se que, no modelo proposto, a administração endovenosa de aloxana (50 mg/kg), exibiu características do estado insulinopênico: perda de peso corporal (Figura 6) e concentrações plasmáticas elevadas de glicose (>300 mg/dL) (Figura 7), após 10 dias e se mantiveram até o experimento final (36 dias). No mesmo período, o grupo controle apresentou normoglicemia (100-170 mg/dL), bem como ganho de peso corporal normal (Apêndice I).

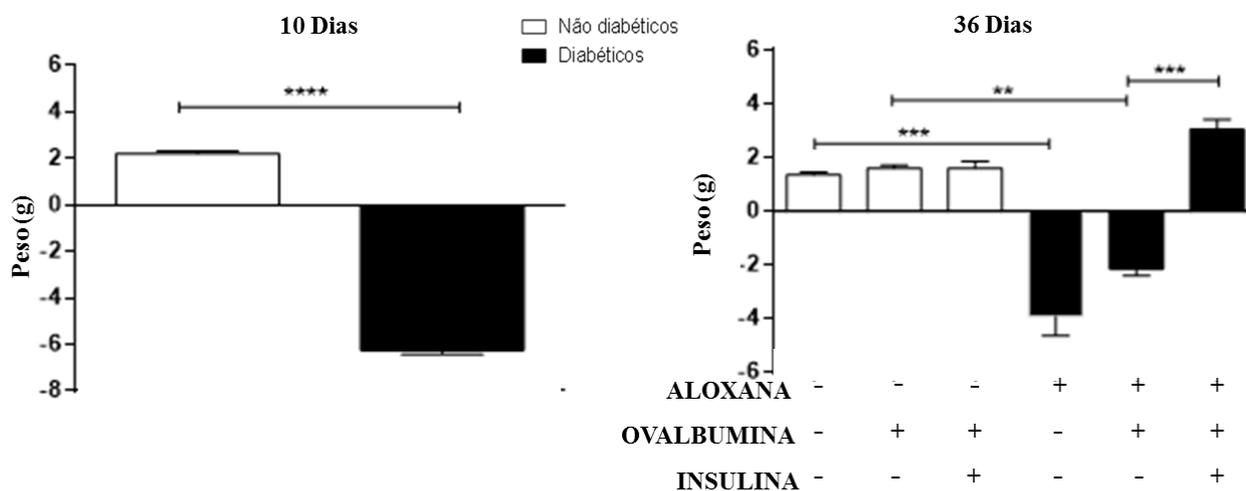


Figura 7. Determinação de variação de peso (10 e 36 dias). O peso dos animais pertencentes aos grupos não diabéticos e diabéticos foram avaliados após 10 dias da injeção de aloxana (50mg/Kg) ou salina. Após 10 dias do tratamento com aloxana, os animais foram sensibilizados com OVA [20µg OVA + 2mg Al(OH₃)] e expostos ao antígeno por via inalatória uma vez ao dia, sete dias consecutivos, e o tratamento com insulina NPH (2UI e 1UI), foi realizado antes de cada desafio. O peso foi avaliado, novamente, no dia do experimento (36 dias). Os valores representam a média da glicemia ± E.P.M. *p<0.05; **p< 0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001. (10 dias: 18 animais por grupo) (36 dias: 6 animais por grupo). As diferenças entre os grupos iniciais (diabéticos ou não) foram analisadas usando o teste t de Student. As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA- duas vias) seguida do pós teste Tukey-Kramer.

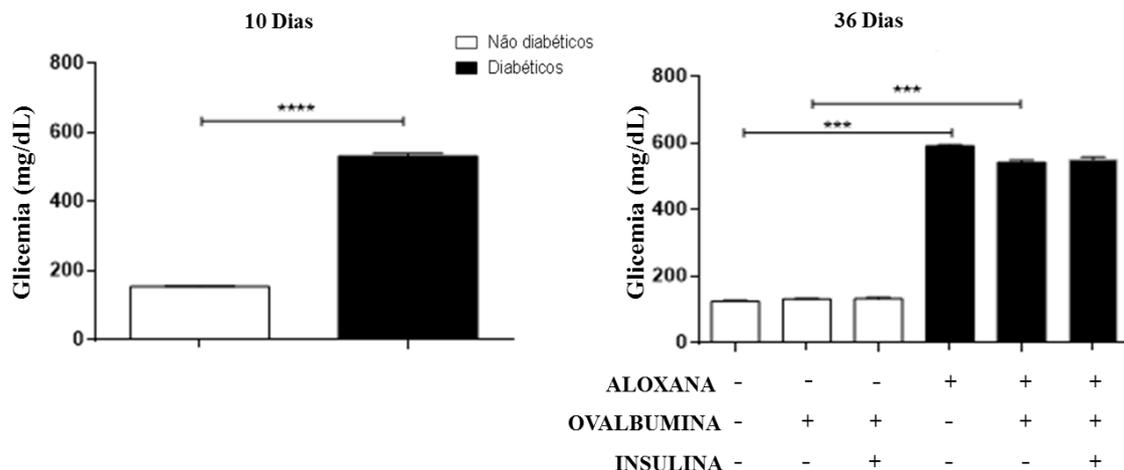


Figura 8. Determinação dos níveis glicêmicos (10 e 36 dias). A glicemia foi determinada através de um monitor de glicose (Advantage, Lilly) 10 dias após a injeção endovenosa de aloxana (50mg/kg), utilizando-se amostras de sangue obtidas da extremidade da cauda dos animais. Animais controle receberam injeção de salina pela mesma via. Durante os experimentos, foram apenas utilizados animais com glicemia superior a 300 mg/dL (16.7 mM). E após 10 dias do tratamento com aloxana foram sensibilizados com OVA e expostos ao antígeno por via inalatória uma vez ao dia, sete dias consecutivos, e o tratamento com insulina NPH, foi realizado antes de cada desafio. A glicemia foi aferida novamente, no dia do experimento (36 dias). Os valores representam a média da glicemia \pm E.P.M. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (10 dias: 18 animais por grupo) (36 dias: 6 animais por grupo). As diferenças entre os grupos iniciais (diabéticos ou não) foram analisadas usando o teste t de Student. As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA- duas vias) seguida do pós teste Tukey-Kramer.

4.2 Determinação da concentração de insulina

Os animais não diabéticos desafiados com OVA que receberam tratamento com insulina apresentaram um aumento de 4 vezes da concentração de insulina no soro, quando comparados aos animais não diabéticos não tratados com insulina.

Os animais diabéticos tiveram uma redução de 2,4 vezes da concentração de insulina, quando comparado aos animais não diabéticos.

Por outro lado, o tratamento com insulina dos animais diabéticos desafiados com OVA aumentou a concentração do hormônio em 11 vezes (Figura 8) (Apêndice II).

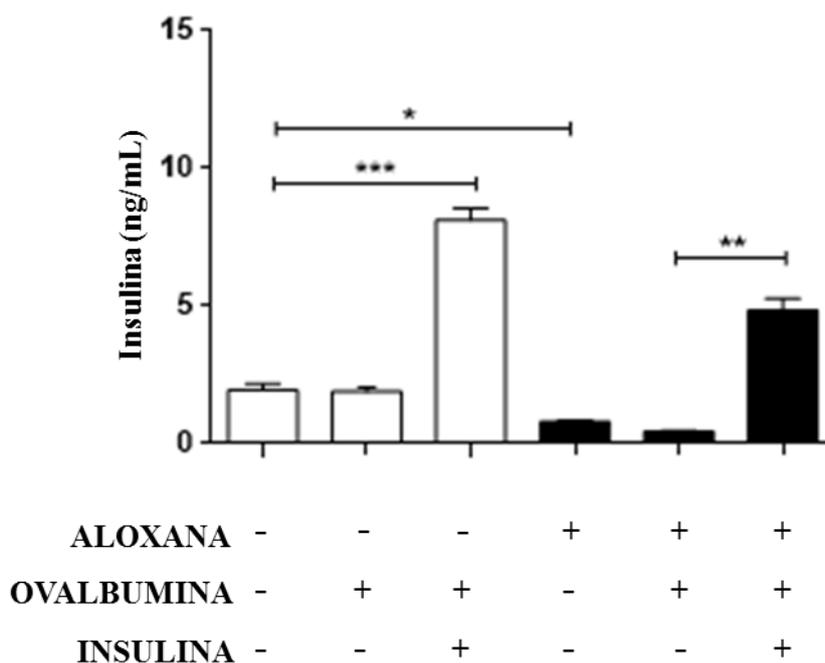


Figura 9: Avaliação da concentração de insulina: Após a coleta, por punção cardíaca do sangue total dos animais pertencentes aos grupos experimentais, foi realizada a separação do soro por centrifugação das amostras a 1600rpm por 20 minutos. Para a realização da avaliação da concentração de insulina. Os valores representam a média da glicemia \pm E.P.M. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (6 animais por grupo). As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA- duas vias) seguida do pós teste Tukey-Kramer.

4.3 Expressão das moléculas de sinalização após imunização

Moléculas de sinalização intracelular (p38, JNK, ERK 1/2, pSMAD 2/3, STAT 3, STAT6, pSTAT6 e pKCdelta) da ativação de vias inflamatórias foram analisadas pela técnica de *Western Blotting* para melhor entendimento das alterações causadas pelo desafio com OVA em camundongos diabéticos e não diabéticos e, ainda, com a intervenção do tratamento de insulina exógena.

O desafio com OVA, em animais não diabéticos, aumentou a expressão de JNK-phospho-54 (4 vezes), JNK- SAPK/JNK (1,4 vezes), STAT3 (2,6 vezes), pSTAT6 (11,5 vezes), quando comparado aos animais não diabéticos desafiados com SAL.

O grupo diabético desafiado com OVA apresentou redução significativa das concentrações de ERK 1 (1,9 vezes), ERK 2 (7,4 vezes), de JNK-phospho-54 (2,8 vezes), JNK- SAPK/JNK (9,1 vezes), STAT3 (3,8 vezes), redução total de pSTAT6,

e um aumento significativo de p38 (4,5 vezes), quando comparado ao grupo não diabético desafiado com OVA.

O tratamento de insulina restabeleceu as expressões de ERK 1/2, JNK, STAT3, mas não restabeleceu a expressão de pSTAT6, e diminuiu a expressão de p38 (Figura 9).

Em relação a molécula pKCdelta, não foram encontradas diferença estatísticas entre os grupos. E em relação as moléculas pSMAD 2/3, STAT 6 e pAKT não foram detectadas a expressão dessas moléculas em homogenato de pulmão (Apêndice III).

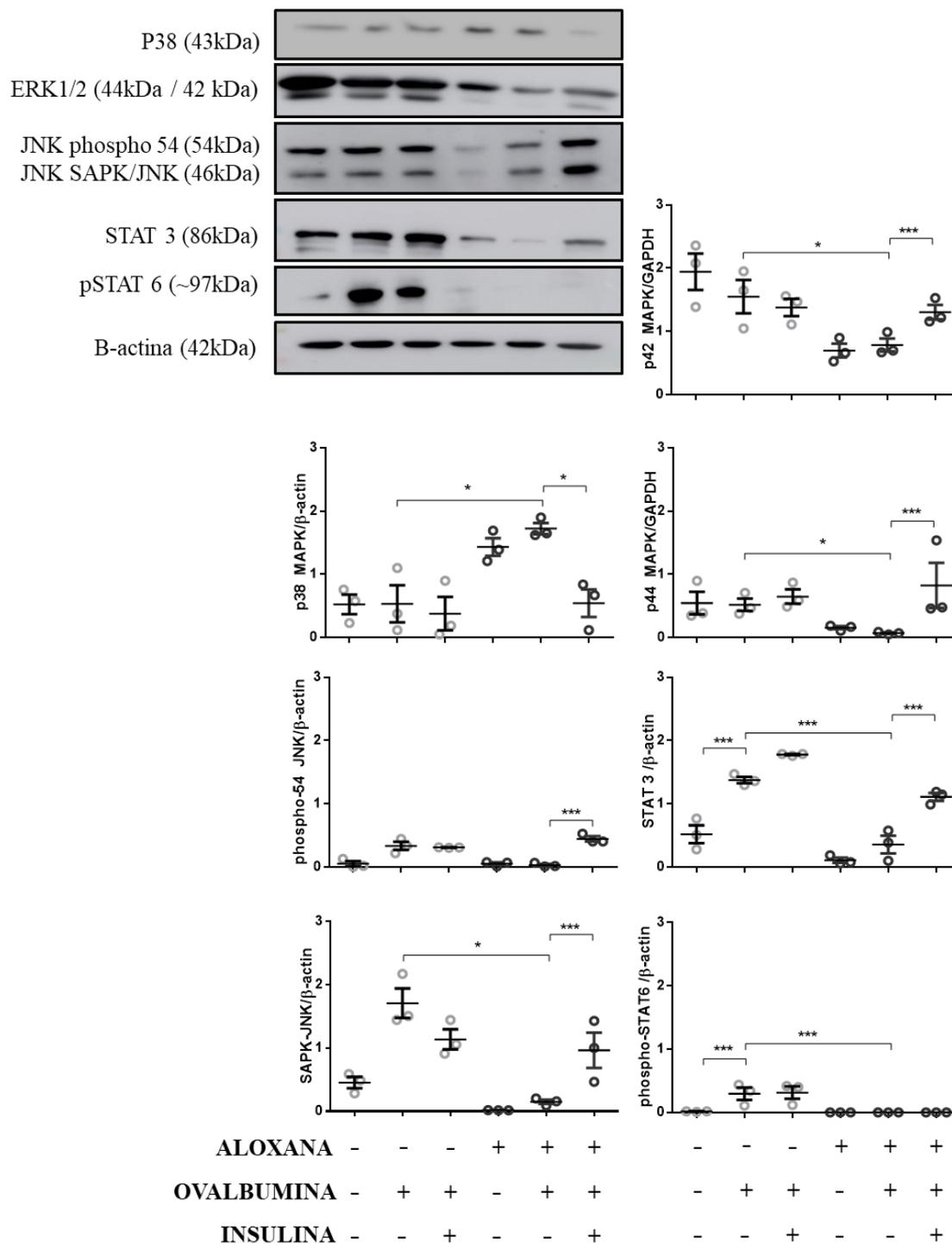


Figura 10. Expressão de moléculas em homogenato de pulmão. Após a coleta do pulmão, um homogenato de tecido pulmonar foi feito com o tampão RIPA. Os valores representam a média \pm EPM de três experimentos independentes (n=3 por grupo). * p < 0,05; *** p < 0,001. As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA- duas vias) seguida do pós-teste Tukey-Kramer.

4.4 Determinação da concentração de IgG1, IgG2a e IgE

Em relação a concentração de IgG1, os animais não diabéticos desafiados com OVA apresentaram um aumento de 7 vezes na concentração de IgG1, quando comparado aos animais que receberam desafio com SAL. A indução de diabetes promoveu uma significativa redução da resposta de IgG1, quando comparados aos animais não diabéticos (2 vezes menor). Além disso, os animais diabéticos que não responderam ao desafio com OVA, e que, portanto, desenvolveram uma baixa resposta inflamatória pulmonar, mantiveram a concentração de IgG1 inalterados.

Para a concentração de IgG2a, os animais diabéticos desafiados com OVA apresentaram um aumento de quase 10 vezes de IgG2a, quando comparados aos animais não diabéticos desafiados com OVA. O tratamento de insulina dos animais diabéticos desafiados com OVA, reduziu em cerca de 1,7 vezes a concentração de IgG2a no soro dos animais, quando comparado aos animais diabéticos desafiados com OVA, que não foram tratados com insulina.

Em relação a concentração de IgE os animais desafiados com OVA apresentaram concentração maior de IgE, quando comparados aos animais desafiados com SAL (3,2 vezes maior) diferentemente do que foi observado nos animais tornados diabéticos desafiados com OVA que apresentaram redução significativa da concentração de IgE. Já o tratamento com insulina dos animais diabéticos desafiados com OVA, aumentou cerca de 2 vezes a concentração de IgE, quando comparados aos animais diabéticos desafiados com OVA que não receberam o tratamento com insulina (Figura 10) (Apêndice IV).

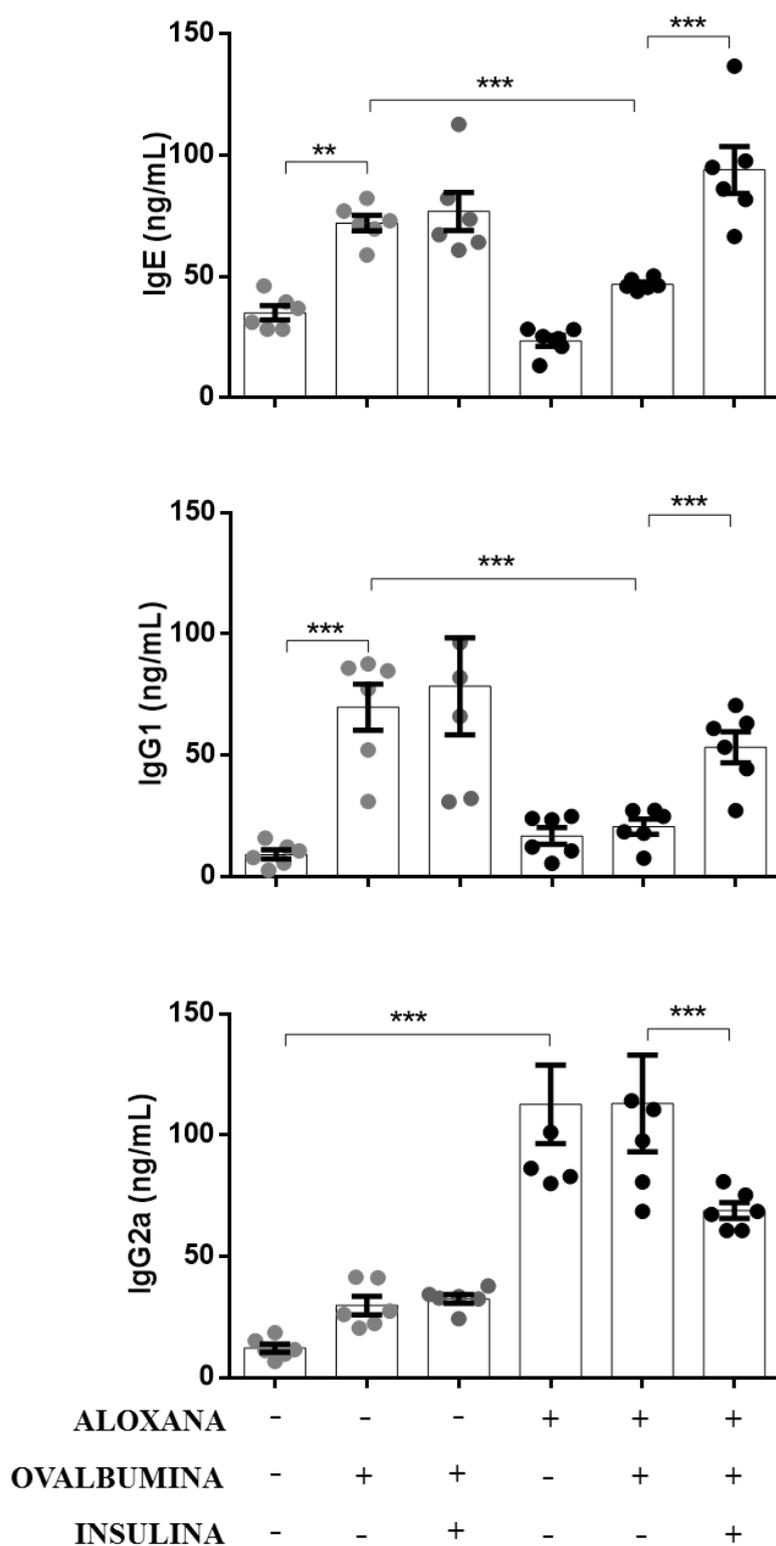


Figura 10: Avaliação da concentração de IgG1, IgG2a e IgE presentes no soro. Após a coleta, por punção cardíaca do sangue total dos animais pertencentes aos grupos experimentais, foi realizada a separação do soro por centrifugação das amostras a 1600rpm por 20 minutos. Para a realização da avaliação da concentração das imunoglobulinas. Os valores representam a média do número de leucócitos \pm E.P.M. (6 animais por grupo). As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA- duas vias) seguida do pós-teste Tukey-Kramer.

4.5 Avaliação das citocinas por enzima imunoensaio

Em experimentos conduzidos após o último desafio com OVA ou SAL determinou-se a concentração das citocinas IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , VEGF e IL-10 em homogenato de pulmão.

O grupo não diabético desafiado com OVA apresentou um aumento significativo na concentração de: IL-4 (3,4 vezes), IL-5 (1,5 vezes), IL-13 (3,8 vezes), TNF- α (2 vezes), TGF- β (1,7 vezes) e VEGF (1,8 vezes), quando comparado aos animais não diabéticos desafiados com SAL.

O grupo diabético desafiado com OVA apresentou uma redução significativa na concentração de: IL-4 (3,3 vezes), IL-5 (1,8 vezes), IL-13 (4 vezes), TNF- α (2 vezes), TGF- β (2,2 vezes) e VEGF (1,8 vezes) e um aumento significativo de IFN- γ (1,33 vezes), quando comparado ao grupo não diabético desafiado com OVA.

O tratamento de insulina restabeleceu a concentração de: IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α TGF- β e VEGF, e diminuiu a concentração de IFN- γ (1,38 vezes).

Em relação a IL-10, a concentração dessa citocina foram similares em todos os grupos estudados, não havendo diferença estatística entre os grupos (Figura 11) (Apêndice V).

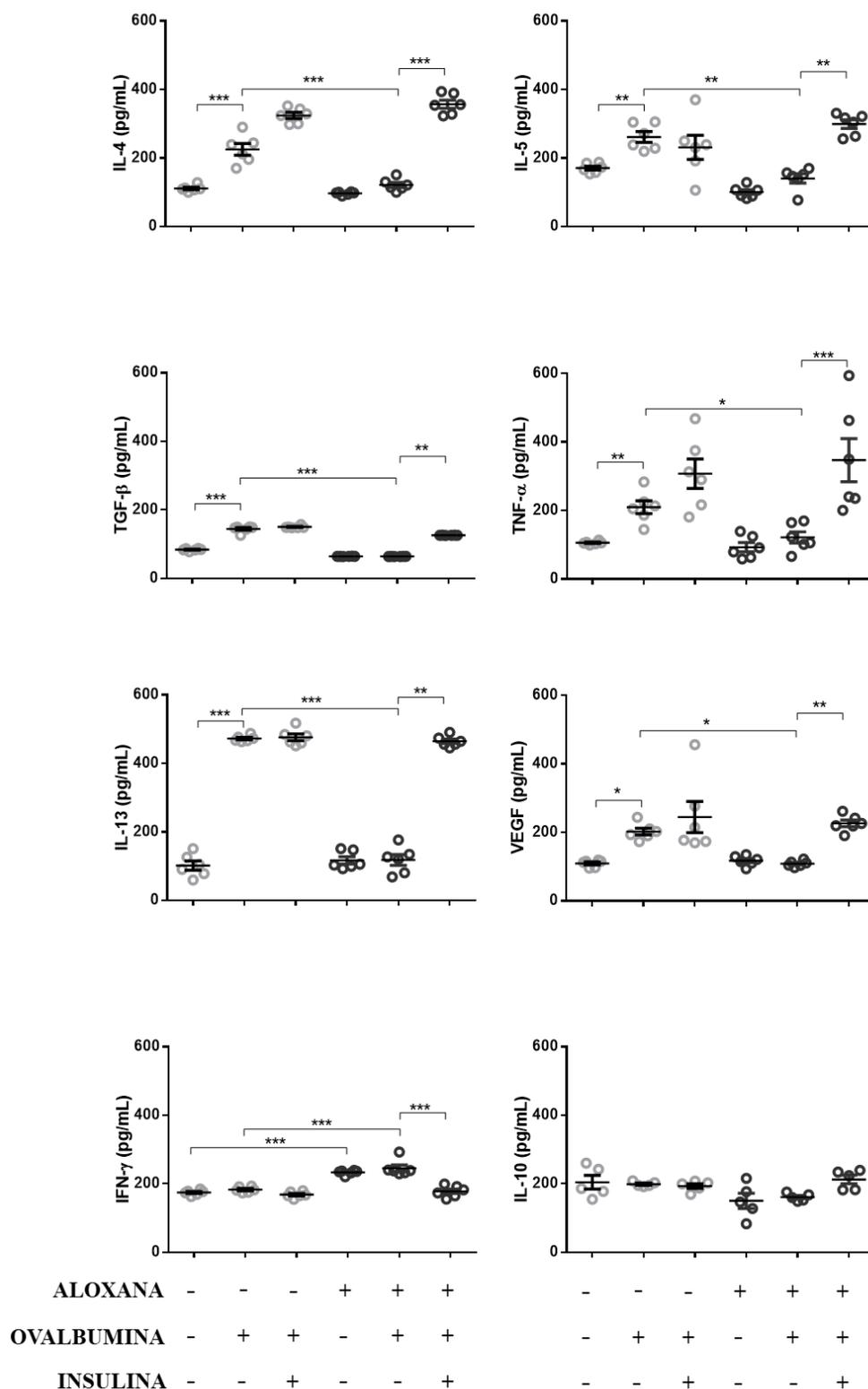


Figura 11. Efeito da insulina sobre a secreção de citocinas em homogenato de pulmão de camundongos: Após a coleta, do pulmão, foi feito um homogenato do tecido pulmonar com o tampão RIPA, e o sobrenadante foi utilizado para posterior análise de citocinas por ELISA. Os valores representam a média do número de leucócitos \pm E.P.M. * p < 0,05; ** p < 0,001, *** p < 0,001 (6 animais por grupo). As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA- duas vias) seguida do pós-teste Tukey-Kramer.

4.6 Efeito da insulina na migração celular no LBA

A celularidade observada no LBA demonstrou um aumento significativo nas células totais (3,6 vezes) e nos eosinófilos (4,2 vezes) após o desafio com OVA. Camundongos diabéticos desafiados com OVA promoveram uma redução de células totais (11,7 vezes) e de eosinófilos (4,43 vezes). O tratamento com insulina de animais diabéticos com OVA restabeleceu a celularidade total e a migração eosinofílica em relação ao grupo que não recebeu tratamento com insulina. A análise imunofenotípica apresentou um aumento na população de e SIGLEC-f (5 vezes) e CD11b (3,2 vezes) após o desafio com OVA. O desafio diabético com OVA reduziu o CD11b (5,3 vezes) e o SIGLEC-f (8,2 vezes). O tratamento com insulina restabeleceu a migração dessas populações (Figura 12). (Apêndice VI).

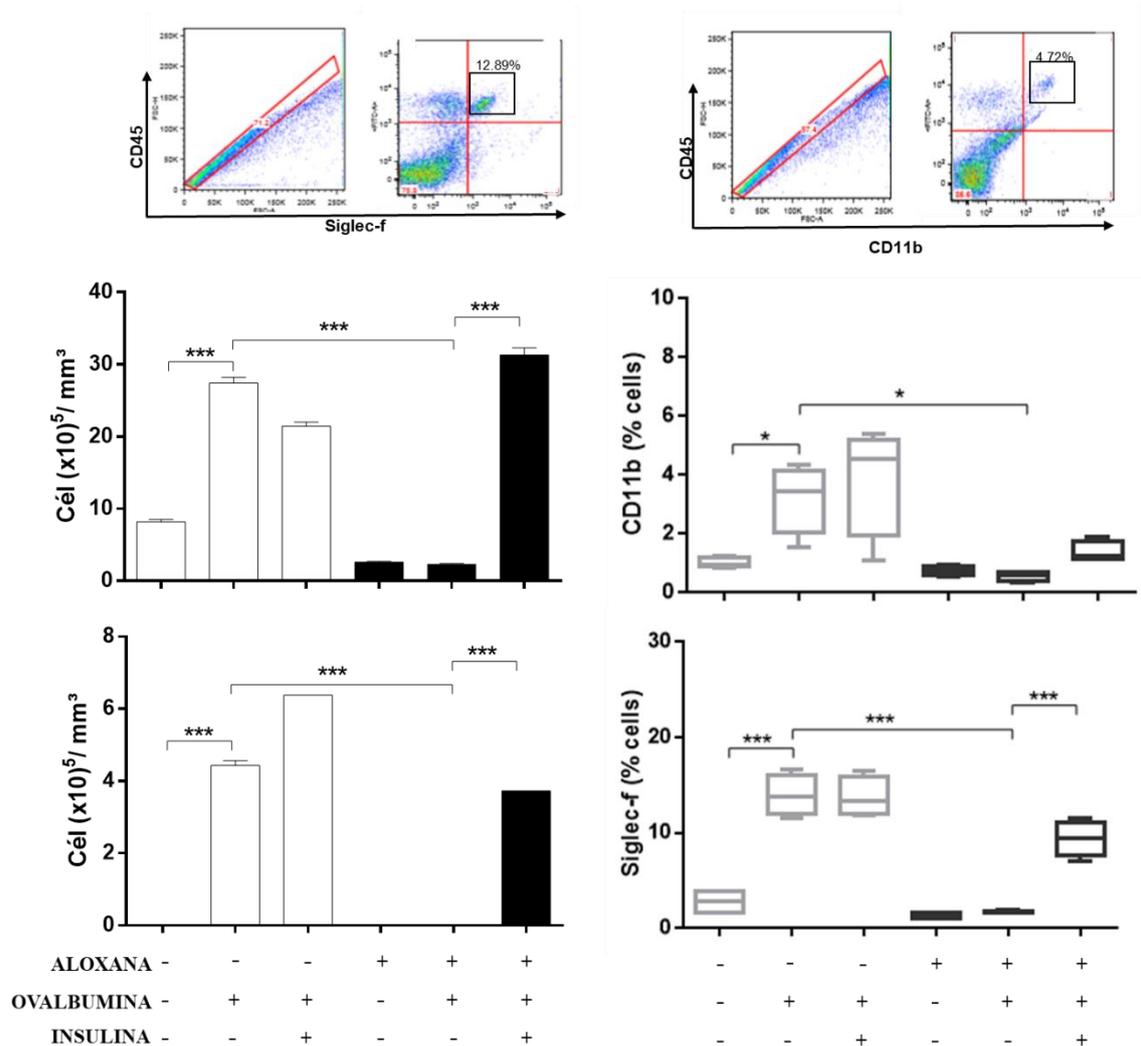


Figura 12. Caracterização dos leucócitos no LBA: papel da insulina. Os animais foram sensibilizados com OVA + Al (OH)₃ (ip) 10 dias após a administração de aloxana e 12 dias após a sensibilização. Após 6 dias da dose de reforço, os animais receberam 7 desafios antigênicos diariamente, com OVA ou solução salina. O tratamento com insulina NPH foi realizado entre os desafios 2UI da insulina NPH às 19h e 1UI de insulina NPH às 7h. Após 24 horas do último desafio, os animais foram eutanasiados e o líquido de LBA foi retirado. Valores representam a média ± EPM * p < 0,05; *** p < 0,001. (6 animais por grupo). As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA- duas vias) seguida do pós teste Tukey-Kramer.

4.7 Análise do perfil de linfócitos recrutados para o pulmão, baço, timo e MO após imunização

Verificou-se um aumento significativo da celularidade, no pulmão (8,9 vezes), baço (1,8 vezes) e timo (2,7 vezes), dos animais não diabéticos desafiados com OVA, em relação aos animais não diabéticos que receberam o desafio com SAL.

A indução de diabetes reduziu o recrutamento de células nos tecidos de no pulmão (1,3 vezes), baço (7,7 vezes), timo (4 vezes) e MO (2,2 vezes). Além disso, os animais diabéticos não conseguem responder ao desafio com OVA mantendo os valores de celularidade inalterados. O tratamento com insulina restabeleceu a celularidade dos órgãos avaliados (Tabela 3).

Pulmão						
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS
Células totais 10⁶/mL	5,9±0,9	52,8±1,5	34,3±1,1	4,5 ±0,6*	6,5±0,6**	30,4±1,5***
Baço						
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS
Células totais 10⁶/mL	143,9±13,9	254,7±2,4	262,6±7,1	18,6±2,1*	40,2±3,7**	176,6±2,2***
Timo						
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS
Células totais 10⁶/mL	17,6±1,1	48,8±3,3	37,4±1,0	4,4±1,4*	7,9±0,9**	53,8±10,5***
Medula Óssea						
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS
Células totais 10⁷/mL	3,62±0,12	3,31±0,23	3,3±0,18	1,61±0,35*	1,51±0,14**	3,10±0,18***

Tabela 3. Valores de células totais encontrados em Pulmão, Baço, Timo e MO. Animais não diabéticos desafiados com SAL (OVA+SAL), animais não diabéticos desafiados com OVA (OVA+OVA), animais não diabéticos, desafiados com OVA e tratados com insulina (OVA+OVA+INS), animais diabéticos desafiados com SAL (ALO+SAL), animais diabéticos desafiados com OVA (ALO+OVA) e animais diabéticos desafiados com OVA e tratados com insulina (ALO+OVA+INS). Os valores representam a média do número de leucócitos ± E.P.M. (pool de 4animais por grupo – 4 grupos para pulmão, timo, e baço), (6 animais por grupo - MO). *p< OVA+SAL vs ALO+SAL. **p< OVA+OVA vs ALO+OVA. ***p< ALO+OVA vs ALO+OVA+INS. As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA- duas vias) seguida do pós teste Tukey-Kramer.

4.8 Papel da insulina na fenotipagem das células imunes

Diferentes órgãos estudados apresentaram um perfil similar de fenotipagem celular, quando analisados em FACS. Os camundongos não diabéticos, após o desafio com OVA, mostraram um aumento significativo de células T: CD4 (6 vezes), CD8 (4,8 vezes), NK1.1 (5,5 vezes) e T γ δ (3,3 vezes) na medula óssea; CD4 (1,4 vezes), CD8 (4,6 vezes), NK1.1 (2,3 vezes) e T γ δ (10,7 vezes) no pulmão; CD4 (2,1 vezes), CD8 (2,8 vezes), NK1,1 (3,3 vezes) e T γ δ (10,7 vezes) no timo; e CD4 (1,5 vezes), CD8 (3,6 vezes), NK1.1 (7 vezes) e T γ δ (7,4 vezes) no baço (Figura 13).

Houve um aumento de células B: CD19 (5,2 vezes) e CD22 (12,1 vezes) na medula óssea; CD19 (9,1 vezes) e CD22 (4,7 vezes) no pulmão; CD19 (21 vezes) e CD22 (4,3 vezes) no timo e CD19 (14,4 vezes) e CD22 (1,7 vezes) no baço (Figuras 14).

Podemos ver o mesmo aumento nos eosinófilos Siglec-f (3,5 vezes) e CD11b (9,6 vezes) na medula óssea; Siglec-f (4,8 vezes) e CD11b (2,9 vezes) no pulmão; Siglec-f (6,6 vezes) e CD11b (5 vezes) no timo; Siglec-f (8 vezes) e CD11b (1,6 vezes) no baço (Figura 15).

Animais diabéticos desafiados com OVA demonstraram redução significativa do perfil das células imunes. O tratamento com insulina restaurou o perfil de células nos órgãos estudados (Apêndices VII ao X).

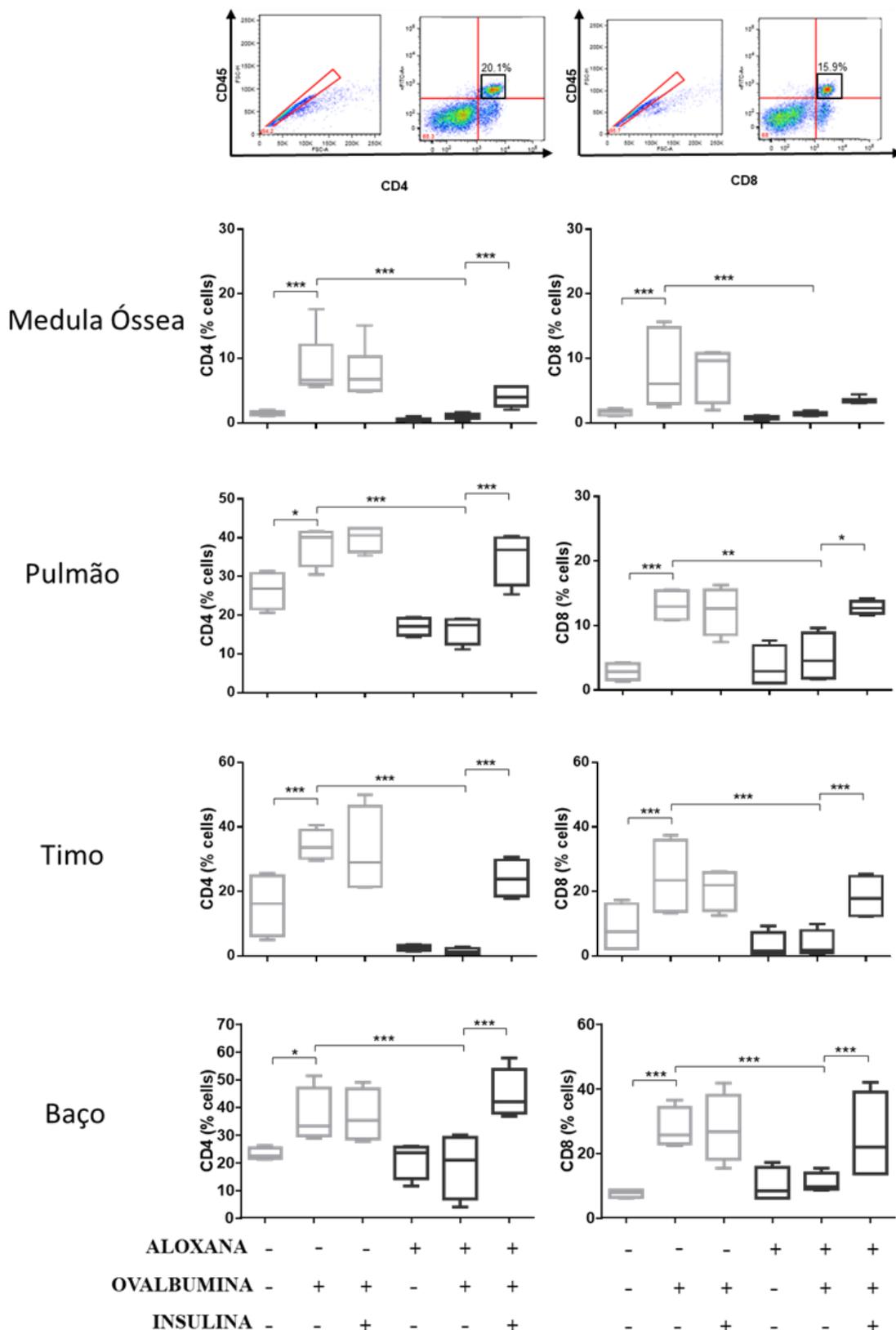


Figura 13. Análise de perfil de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺recrutados. Aquisição realizada no FacsCanto e os dados gerados, analisados com o auxílio do software FlowJo (TREE STAR, Inc-USA). Analisamos 20.000 eventos. Células T na medula óssea Valores representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (6 animais por grupo para Medula óssea) (4 animais por grupo para pulmão, baço e timo). As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA- duas vias) seguida do pós teste Tukey-Kramer.

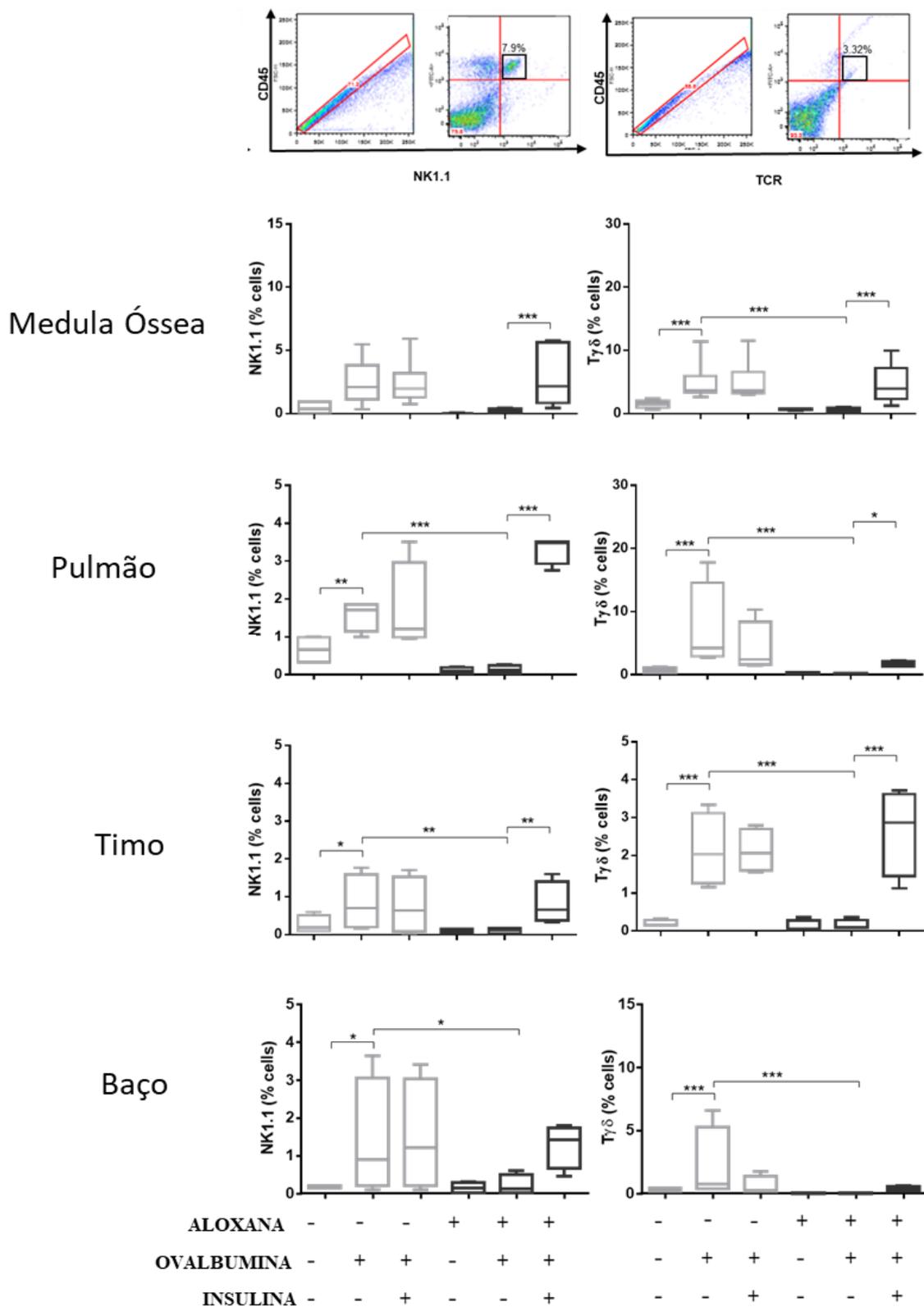


Figura 14. Análise de perfil de linfócitos NK T e T $\gamma\delta$ recrutados. Aquisição realizada no FacsCanto e os dados gerados, analisados com o auxílio do software FlowJo (TREE STAR, Inc-USA). Analisamos 20.000 eventos. Células T na medula óssea Valores representam a média \pm EPM. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. (6 animais por grupo para Medula óssea) (4 animais por grupo para pulmão, baço e timo). As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA- duas vias) seguida do pós teste Tukey-Kramer.

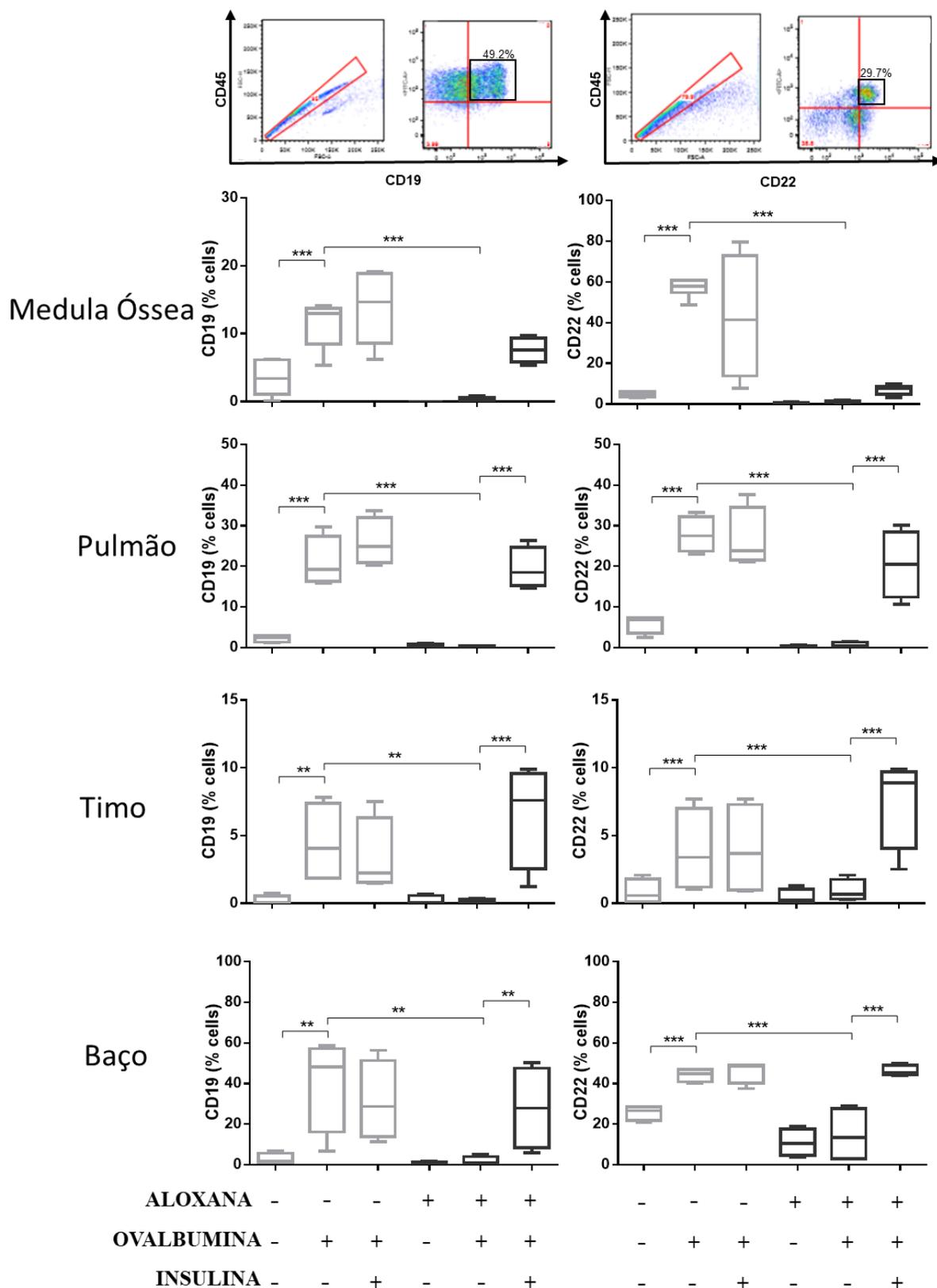


Figura 15. Análise de perfil de linfócitos B recrutados. Aquisição realizada no FacsCanto e os dados gerados, analisados com o auxílio do software FlowJo (TREE STAR, Inc-USA). Analisamos 20.000 eventos. Células B na medula óssea. Valores representam a média \pm EPM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (6 animais por grupo para Medula óssea) (4 animais por grupo para pulmão, baço e timo). As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA- duas vias) seguida do pós teste Tukey-Kramer.

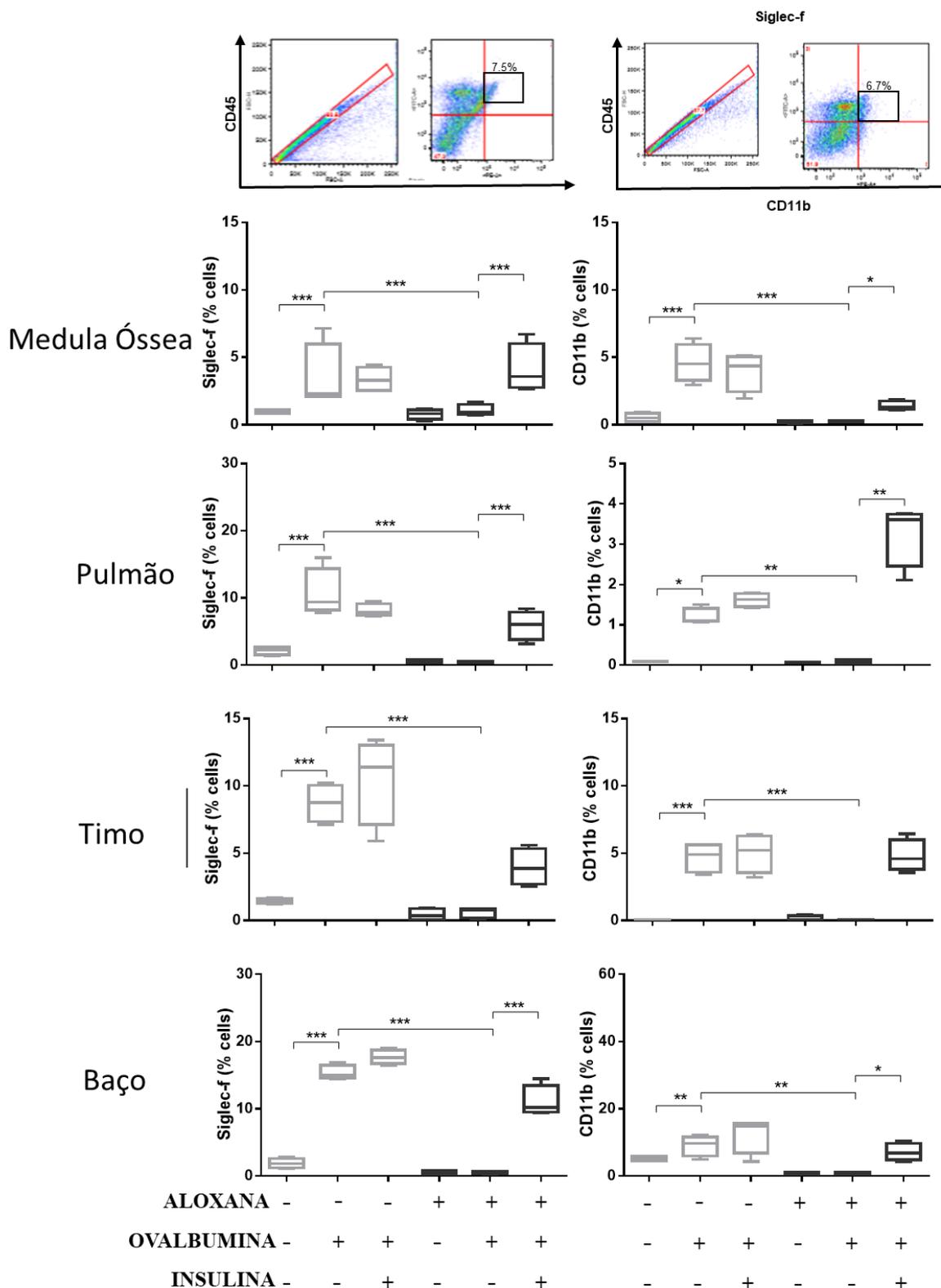


Figura 16. Análise de perfil de eosinófilos recrutados. Aquisição realizada no FacsCanto e os dados gerados, analisados com o auxílio do software FlowJo (TREE STAR, Inc-USA). Analisamos 20.000 eventos. Células B na medula óssea. Valores representam a média \pm EPM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (6 animais por grupo para Medula óssea) (4 animais por grupo para pulmão, baço e timo). As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA-duas vias) seguida do pós teste Tukey-Kramer.

4.9 Avaliação da responsividade brônquica por BUXCO

O primeiro grupo, que recebeu três desafios à metacolina, em dias distintos, apresentaram em cada dia, diferentes respostas. Após 2 desafios com OVA, observou-se que os animais não diabéticos desafiados com OVA apresentaram um aumento (1,5 vezes) da capacidade de resposta pulmonar quando comparados com os animais não diabéticos desafiados com SAL. A indução de diabetes não alterou o padrão e os animais diabéticos não puderam responder ao desafio com OVA, mantendo inalterada a responsividade pulmonar. O início do tratamento com insulina não restabeleceu a hiper-reatividade brônquica (Figura 15A). Após 4 desafios OVA, a análise da capacidade de resposta pulmonar é semelhante ao segundo desafio (Figura 15B). Após 6 desafios, observou-se que o tratamento com insulina em animais diabéticos desafiados com OVA, aumentou significativamente a hiperatividade para metacolina (2,2 vezes) (Figura 15C).

O segundo grupo que recebeu apenas um desafio a metacolina, mostrou que, após 7 desafios, camundongos não diabéticos desafiados com OVA aumentaram a responsividade pulmonar (1,8 vezes) quando comparados ao grupo de não diabéticos desafiado com SAL. A indução de diabetes não alterou a responsividade pulmonar basal quando comparada com animais não diabéticos SAL desafiados, e os animais diabéticos foram incapazes de responder ao desafio OVA, mantendo inalterada a capacidade de resposta pulmonar. O tratamento com insulina restaurou a hiperresponsividade brônquica (Figura 15D) (Apêndice XI).

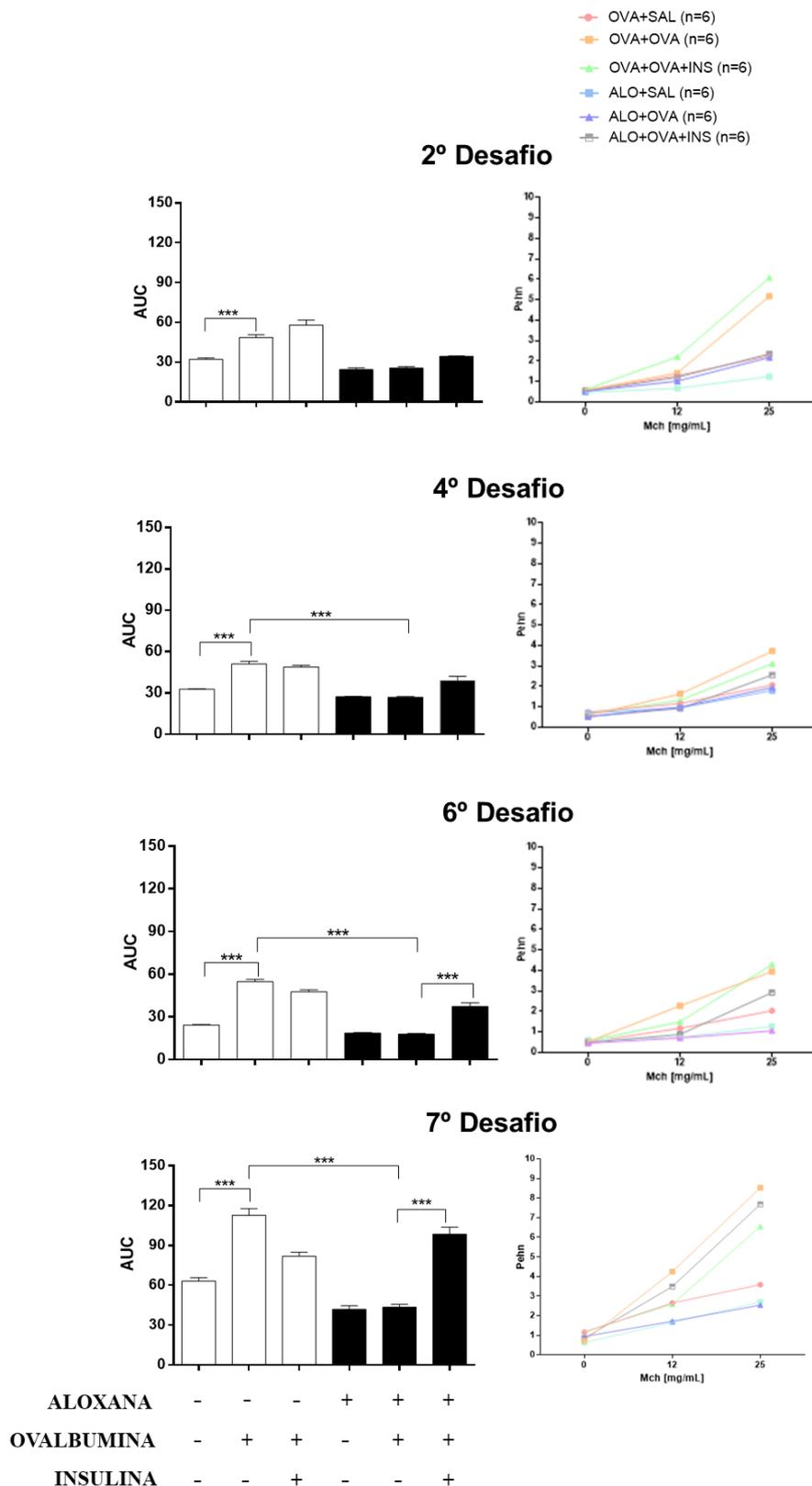


Figura 17: Avaliação da hiper-reatividade brônquica por Buxco: A capacidade à metacolina (MCh) foi avaliada em camundongos conscientes utilizando um fluxo pletismógrafo de corpo inteiro (FWBP). Antes de cada desafio e após o tratamento com 1UI os animais eram avaliados utilizando o fluxo pletismógrafo. Os valores representam a média do número de leucócitos \pm E.P.M. *** $p < 0.001$. (6 animais por grupo). As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA- duas vias) seguida do-pós teste Tukey-Kramer.

4.10 Efeito da insulina na resistência das vias aéreas e na resistência das pequenas vias aéreas

Após 24 horas do último desafio, a mecânica pulmonar dos animais foi medida. Os camundongos não diabéticos desafiados com OVA aumentaram a resistência das vias aéreas (Raw) (2,2 vezes) e a viscosidade (Gtis) (4 vezes) quando comparados com o grupo de desafiado com SAL. A indução de diabetes não alterou ambos, e os animais diabéticos não responderam ao desafio com OVA. O tratamento com insulina restabeleceu os parâmetros estudados (Figura 16).

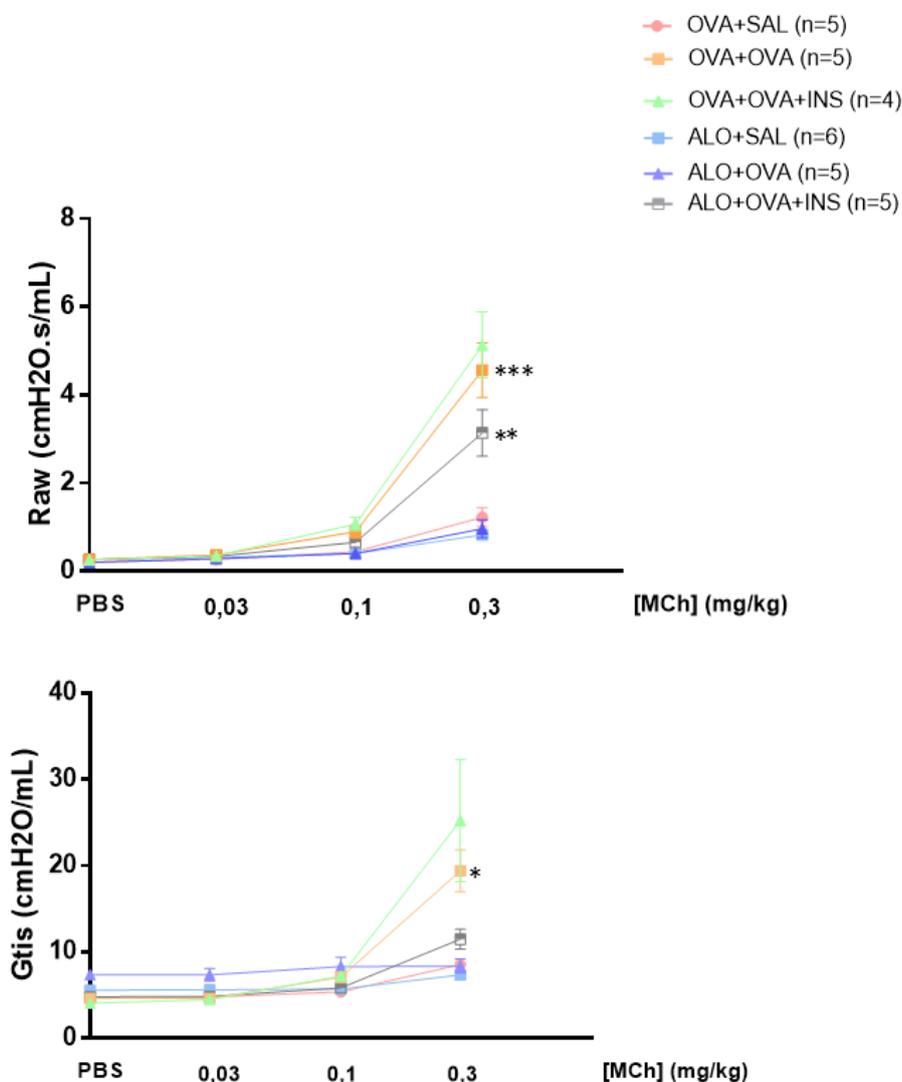


Figura 18. Curva dose-resposta para solução de metacolina inalada (MCh). As respostas a Mch são medidas como Raw (resistência das vias aéreas) e Gtis (resistência tecidual). Valores representam a média \pm EPM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA- duas vias) seguida do pós-teste Bonferroni.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesse trabalho sugerem que a insulina modula o desenvolvimento da reação inflamatória alérgica pulmonar tardia, na fase do remodelamento dos brônquios, em modelo murino diabético, pela sua capacidade de restabelecer: a) expressão de moléculas de sinalização intracelular JNK, ERK 1/2, STAT 3 em homogenato de pulmão; b) a secreção de imunoglobulinas IgG1 e IgE no soro; c) a secreção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α , TGF- β e VEGF em homogenato de pulmão; d) o infiltrado inflamatório no fluído de LBA, principalmente de eosinófilos; e) a expressão de moléculas de superfície CD4⁺, CD8⁺, NK1.1, T γ δ , CD22, CD19, SIGLEC-f e CD11b; f) a hiper-reatividade brônquica.

O modelo de DM insulino-dependente é induzido, pelo agente diabetogênico aloxana que tem uma seletiva ação tóxica para as células beta-pancreáticas. A aloxana se acumula nas ilhotas pancreáticas, como os análogos da glicose, causando lesões irreversíveis às células beta, de modo que sua ação mediada por espécies reativas de oxigênio culmina com a lise das células levando à diabetogênese (SZKUDELSKI, 2001; ROHILLA & ALI, 2012). Este, porém, não é o único modelo utilizado para a indução de DM insulino-dependente. A estreptozotocina é um outro agente diabetogênico, com ação similar a da aloxana, ambas apresentam efeitos tóxicos. A aloxana promove necrose das células tubulares renais quando administrada em altas doses (LENZEN *et al.*, 1996). Já a estreptozotocina promove toxicidade para células linfóides do baço, timo, e essa toxicidade linfóide precede a hiperglicemia, podendo ser observada, mesmo em doses subdiabetogênicas (GAULTON *et al.*, 1985; WELLHAUSEN, 1986).

Considerando o objetivo do presente trabalho de avaliar o papel modulatório da insulina sobre o efeito imunológico da inflamação alérgica pulmonar, acredita-se que o efeito tóxico causada pela estreptozotocina ao timo e baço, venha interferir nos resultados, sendo assim a aloxana é o melhor agente diabetogênico, indutora de DM, indicada para o estudo proposto. Conforme analisado em nossos resultados, a administração de aloxana por si só, não gerou alterações no padrão de resposta inflamatória.

A dose de aloxana para a indução de DM foi padronizada, em nosso grupo de pesquisa, em camundongos da linhagem C57BL/6, utilizando a dose de 60mg/kg de

aloxana via endovenosa (BELLA *et al.*, 2017). Porém para camundongos da linhagem BALB/c essa dose, foi padronizada utilizando 50mg/kg de aloxana, devido a grandes perdas de animais, utilizando a dose de 60mg/kg (FERREIRA *et al.*, 2017).

A indução de DM por única dose de aloxana via endovenosa (50mg/kg), exibiu características do estado insulinopênico: significativa perda de peso corporal e concentrações plasmáticas elevadas de glicose (>300 mg/dL), após 10 dias, e este estado se manteve até o experimento final (36 dias).

O modelo de asma é amplamente usado e fornece importante conhecimento sobre mecanismos imunológicos e inflamatórios desse distúrbio (EMALA & HIRSHMAN, 1996; HERZ *et a.*, 1996). Em geral este modelo envolve sensibilização via intraperitoneal do alérgeno em combinação com um adjuvante como Al (OH³) juntamente com exposições alérgicas no local (pulmão). Quando os animais são avaliados quanto ao fenótipo asmático, os mesmos apresentam hiper-reatividade brônquica (BARNES, 2004), eosinofilia (KAY, 2005) e citocinas do perfil Th2 (PAUWELS & BRUSSELLE, 1997; MANISE, *et al.*, 2013). De acordo com nossos resultados, observamos um aumento significativo de hiper-reatividade à metacolina, bem como de células mononucleares e eosinófilos no fluído do LBA, e também aumento de secreção de citocinas do perfil Th2, tal como IL-4, IL-5 e IL-13 em resposta ao desafio com OVA, em animais não diabéticos.

O desencadeamento de DM em pacientes previamente asmáticos resulta em uma melhora dos sintomas da asma, porém o tratamento de pacientes diabéticos com insulina agrava os fenótipos da asma, o mesmo ocorre em pacientes asmáticos não diabéticos, quando recebem insulina (HELANDER, 1958; DOUEK, 1999).

Animais tornados diabéticos pela injeção de aloxana, sensibilizados e desafiados com OVA, exibiram marcada redução de infiltrado inflamatório pulmonar. O tratamento dos animais com insulina corrigiu essa situação. A administração de 2-desoxiglucose nesses animais, não restabeleceu os parâmetros estudados, sugerindo que a asma é suprimida pelo diabetes, pois existe uma relativa falta de insulina, que permite a manifestação de DM (VIANNA & GARCIA LEME, 1995).

Em estudo anterior, pode-se observar que uma única dose de insulina restaurou o infiltrado leucocitário no fluído de LBA, mas não a eosinofilia, e não restaurou o remodelamento das vias aéreas (secreção de muco e deposição de colágeno no tecido pulmonar). O tratamento de múltiplas doses, padronizado para esse mesmo estudo, restaurou tanto o infiltrado leucocitário, e a eosinofilia no fluído

de LBA, como também o remodelamento das vias aéreas. Foram feitos dois tratamentos diários, devido aos hábitos noturnos e do metabolismo mais acelerado dos camundongos. Optamos por uma maior dosagem de insulina NPH à noite, e a menor dosagem pela manhã. A dose de insulina administrada a cada camundongo seguiu o protocolo padronizado por Spiller (2012). Desse modo, os animais receberam dosagens relativas aos seus níveis glicêmicos (1UI de insulina / 300mg/dL no período noturno, e metade da dose no período diurno). Foram observadas mudanças nos animais diabéticos durante o tratamento com insulina, como por exemplo, a redução do consumo de água, e conseqüentemente redução no volume urinário, bem como melhora na aparência da pelagem. Foi utilizado a via subcutânea para a administração de insulina NPH, que segundo alguns estudos, em humanos, atinge seu pico máximo de 6-8 horas, após a administração (VORA *et al.*, 2014; ROSS *et al.*, 2014). Dados prévios de camundongos machos da linhagem BALB/c, apresentaram uma diminuição acentuada na glicemia 1 hora após a administração da insulina. Essa diminuição de glicemia durou por até 2 horas após a injeção do hormônio. E após 6 horas a glicemia do animal apresenta valores glicêmicos similares a antes da administração de insulina (FERREIRA *et al.*, 2017). Esses dados são importantes para um melhor entendimento da escolha do tratamento e horários de administração de insulina, e pelos horários de desafios ou experimentos, no presente trabalho.

Nas amostras obtidas após 26 dias da indução de asma (36 dias após a indução de DM), pode-se observar que as características do diabetes se mantiveram durante todo o tempo de exposição ao antígeno, de modo que manteve a hiperglicemia dos grupos diabéticos e a marcada redução de peso corpóreo, ou seja, o ambiente insulinopênico causado pela aloxana se manteve durante todo o curso experimental, mimetizando sinais clássicos de um DM1.

Verificou-se também que a exposição ao alérgeno em si não apresentou alterações dos níveis glicêmicos dos animais estudados, não diabéticos ou diabéticos.

Durante o desenvolvimento do meu trabalho de mestrado, foi demonstrado que em modelos de remodelamento das vias aéreas em inflamação pulmonar, animais tornados diabéticos e desafiados com OVA apresentaram redução da migração celular das vias aéreas, em testes de celularidade, e também mostraram redução de colágeno ao redor das vias aéreas e ausência de muco dentro dessas mesmas vias.

Além disso, uma única dose de insulina restaurou os níveis de inflamação no fluído do LBA, porém não restaurou a migração de eosinófilos do sangue para o tecido. No entanto resultados do sangue periférico mostraram um aumento significativo de eosinófilos, após o tratamento com uma única dose de insulina, sugerindo que esses eosinófilos tendem a migrar para o tecido. Uma única dose de insulina também não restaurou o remodelamento das vias aéreas. Por outro lado, o tratamento de múltiplas doses de insulina em animais asmáticos e diabéticos, restaurou o desenvolvimento da inflamação nestes animais, uma vez que foi possível observar a presença eosinófilos no fluído do LBA. Esse mesmo tratamento de múltiplas doses de insulina também restabeleceu os sinais de remodelamento das vias aéreas (FERREIRA *et al.*, 2017).

Outros estudos, utilizando modelos murinos, mostraram que o tratamento de múltiplas doses de insulina provou ser mais eficaz para inflamações crônicas em animais diabéticos (ANJOS-VALLOTA *et al.*, 2006; Di PETTA *et al.*, 2011). Por esse motivo, optamos apenas pelo tratamento de múltiplas doses.

Durante o desenvolvimento da resposta inflamatória, a via de sinalização da MAPK desempenha um papel importante na ativação e diferenciação das células T, e o efeito da ativação da insulina nas vias de sinalização da MAPK está bem estabelecido. A insulina tende a favorecer a fosforilação da ERK pela inibição da fosforilação da p38 (VIARDORT, 2007). Encontramos resultado semelhante ao nosso modelo. Analisamos a expressão de outras moléculas importantes para a inflamação alérgica pulmonar, como STAT3 (HUANG, *et al.*, 2018), pSTAT6 (WALFORD & DOHERTY, 2013) e JNK (KUMAR *et al.*, 2015). E pudemos observar um aumento da expressão de todas as moléculas citadas, em animais não diabéticos que receberam OVA. A indução do diabetes promoveu redução na expressão de tais moléculas, e a insulina restabeleceu a resposta prejudicada.

Martins e colaboradores (2010), demonstraram que a insulina modula a produção de citocinas, expressão de moléculas de adesão e migração neutrofílica, em ratos diabéticos por aloxana com inflamação alérgica pulmonar na fase inicial, induzida por OVA, em ratos. Nestes experimentos, observou-se aumento na concentração de leucócitos em principal de eosinófilos no fluído de LBA, em animais não diabéticos desafiados com OVA. A indução de diabetes promoveu uma marcada redução de infiltrado leucocitário e ausência de eosinófilos. Os animais diabéticos

sensibilizados não responderam ao desafio com OVA, e o tratamento com insulina, restabeleceu tanto o infiltrado leucocitário, como a eosinofilia.

Outro dos efeitos observados na exposição do alérgeno foi o aumento de concentrações de citocinas do perfil Th2, como IL-4 (STEINKE & BORISH, 2001), IL-5 (GREENFEDER, *et al.*, 2001) e IL-13 (CORREN, 2013), que tem um papel muito importante no desenvolvimento da asma. Outras citocinas também participam desse desenvolvimento, como TNF- α , VEGF e TGF- β , que foram encontradas com concentração maior no tecido pulmonar. Estudos demonstraram que o TNF- α inalado aumenta a responsividade brônquica à metacolina, em indivíduos normais e pacientes asmáticos (GENOV & SOLÉ, 2007). O aumento da concentração de TGF- β é um evento precoce na remodelação que precede as alterações morfológicas, como aumento da musculatura lisa, fibrose, entre outras. Em animais sensibilizados e desafiados, a expressão de TGF- β aumenta horas após o estímulo e, dependendo do estímulo, tem seu máximo atingido após 7 dias (BARTRAM, 2004). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é também conhecido por estar aumentado em asmáticos (YUKSEL *et al.*, 2013). Além disso, VEGF é um mediador do remodelamento vascular e extravascular, e também da inflamação que aumenta a sensibilização do antígeno. Essa citocina é crucial para inflamação Th2 adaptativa (LEE *et al.*, 2004). Podemos sugerir que nosso modelo de inflamação alérgica pulmonar se encontra na fase tardia, pois além de dados prévios, demonstrando sinais de remodelamento (aumento de muco e colágeno), agora mostramos um aumento significativo de TGF- β e VEGF, em animais não diabéticos desafiados com OVA. Os animais diabéticos desafiados com OVA apresentaram redução significativa de todas as citocinas estudadas, demonstrando que o DM induzido por ALX, prejudica a resposta inflamatória no pulmão. E o tratamento com insulina, restabeleceu a concentração de citocinas nesse tecido.

Bendelac e colaboradores (1997) mostraram que há diversas populações linfocitárias relacionadas à resposta inflamatória alérgica pulmonar. A fim de caracterizar a expressão de moléculas de superfície no estabelecimento e desenvolvimento da resposta inflamatória asmática, estudamos diversas populações relacionadas a linfócitos T (CD4⁺, CD8⁺, NK1.1. T $\gamma\delta$) e linfócitos B (CD22 e CD19), em diferentes tecidos do animal. Em relação à população linfocitária T CD4⁺, essa população apresentou um aumento em todos os órgãos estudados (MO, timo, baço e pulmão), as células T CD4⁺, de padrão Th2 são fundamentais na resposta alérgica

pulmonar, a eliminação dessa população causa redução do fenótipo asmático (GAVETT *et al.*, 1994, SILVA, 2008). Além disto, Gavett e colaboradores (1994) demonstraram que os linfócitos TCD4⁺ podem mediar a hiper-reatividade das vias áreas, bem como o aumento do número de linfócitos e eosinófilos no fluído do LBA, em camundongos que receberam o desafio antigênico, quando comparados ao grupo controle. Nossos dados vão de acordo com a literatura, já que observamos um aumento da população de linfócitos T CD4 no pulmão de animais alérgicos.

A participação de linfócitos TCD8⁺ é conflitante na literatura, pois alguns autores mostram que o TCD8⁺ parece participar do desenvolvimento da asma (MARTIN *et al.*, 2004), e outros grupos mostram que a diminuição da população do linfócito TCD8⁺, está associado a diminuição de produção de IgE (HAMELMANN *et al.*, 1996). Nossos dados, porém, mostram que os linfócitos TCD8⁺, participam na patogênese da asma, pois quando os animais não diabéticos são desafiados com OVA, há um aumento significativo de linfócitos TCD8⁺. Este envolvimento foi previamente sugerido Hamelamann e colaboradores (1996) que mostraram que as células TCD8⁺, estão envolvidas no aumento de IL-5, levando à infiltração de eosinófilos, e a hiper-reatividade das vias aéreas. Já os linfócitos NK estão ligados à patogênese da asma alérgica na promoção do recrutamento de eosinófilos. Animais deficientes de NK apresentam redução de eosinofilia, sugerindo que linfócitos NK podem amplificar a resposta inflamatória Th2 e a hiper-reatividade das vias aéreas (LISBONNE *et al.*, 2003), no presente estudo pode ser observado um aumento de populações de NK nos animais não diabéticos desafiados com OVA, o que sugere que essa célula está ligado ao aumento na concentração de IL-5 em homogenato de pulmão, e consequentemente de eosinófilos no fluído de LBA.

A deficiência da população de T $\gamma\delta$ em camundongos diminui a secreção de citocinas do perfil Th2, além da diminuição da eosinofilia (ZUANY-AMORIM *et al.*, 1998). No presente estudo o desafio com OVA em animais não diabéticos aumentou as populações de T $\gamma\delta$ em todos os órgãos estudados, sugerindo que esta célula está relacionada com o aumento da secreção de IgE e IgG1 no soro dos animais, e com o aumento na liberação de IL-5 no homogenato de pulmão, e consequentemente a migração de eosinófilos e células T no tecido pulmonar, quando comparado aos animais controles.

Diversos estudos mostram um papel crucial dos linfócitos T e a produção de citocinas do perfil Th2, no desenvolvimento da asma (GAVETT *et al.*, 1994;

LISBONNE *et al.*, 2003; SILVA, 2008; DECKERS *et al.*, 2013). Porém o papel das células B na asma alérgica permanece indefinido, com exceção da bem conhecida capacidade dos linfócitos B de produzir a imunoglobulina específica IgE, após a sinalização das células Th2 (SCHOFIELD & CALHOUN, 2011; MANISE *et al.*, 2013). A fim de esclarecer melhor o papel do linfócito B na asma, Voogth e colaboradores (2013) mostraram que os linfócitos B desempenham um papel crucial no desenvolvimento da asma em modelos de rato. A transferência de linfócitos B sensibilizados, para animais *naive* resultou em um aumento da hiper-reatividade e inflamação das vias aéreas, após o desafio antigênico desses animais. Que sugere que o linfócito B pode induzir uma resposta asmática sem ajuda de linfócitos T. Esses achados dão nova visão sobre os mecanismos pelos quais as células B promovem a asma. Em nosso estudo pesquisamos as populações de CD19 (população madura) e CD22 (população jovem) a fim de entender o mecanismo do linfócito B na resposta asmática. Observamos em animais não diabéticos, desafiados com OVA, um aumento de ambas as populações. Sugerindo que esse aumento de população está ligado, não só ao aumento de IgE no soro do animal, mas também a hiper-reatividade e inflamação das vias aéreas.

As populações de linfócitos T, linfócitos B e eosinófilos, estudadas aqui, foram prejudicadas em camundongos diabéticos desafiados com OVA, quando comparamos com camundongos não diabéticos desafiados. E como visto, o DM afeta todas as fases da inflamação alérgica pulmonar, desde a sensibilização do mastócito (DIAZ *et al.*, 1999; CAVALHER-MACHADO, 2004; CARVALHO *et al.*, 2011). Podemos elucidar, se a degranulação é prejudicada, a secreção de citocinas, de moléculas de adesão, também estará, e por consequência teremos uma diminuição na migração celular. Ou seja, existe um sinergismo do DM afetando todo o desenvolvimento da inflamação alérgica pulmonar. E a insulina restabelece o desenvolvimento da asma.

Podemos sugerir que esse sinergismo do DM prejudicando a resposta alérgica, pode estar ligado à hipótese Th1 e Th2. Dados mostram que a resposta Th1 tende a inibir a resposta Th2, e insulina restabelece a resposta Th2 no indivíduo. (GAZIT *et al.*, 2008; TOSCA *et al.*, 2009). Essa ação pode estar ligada aos receptores de insulina (IR-A e IR-B) (LEIBIGER *et al.*, 2001). O IR-A está ligado a via de sinalização PI3K, que desenvolve a ação metabólica. E o IR-B está ligado a via de sinalização MAPK, que desenvolve o crescimento e diferenciação celular (LEIBIGER *et al.*, 2010). Viadort e colaboradores (2007) demonstraram que a ação da insulina, na via MAPK, tem um

aumento de expressão da proteína ERK, que está ligada a resposta Th2, e por consequência uma diminuição da expressão da proteína p38, que está ligada a resposta Th1. Talvez por ativação dessa via, temos um desencadeamento da resposta Th2, piorando os sintomas da inflamação alérgica pulmonar, em camundongos diabéticos.

Sabendo que todos os parâmetros estudados, em principal o aumento leucocitário, levam ao aumento da responsividade pulmonar, decidimos avaliar a mecânica do pulmão em duas condições diferentes para os animais: sem o efeito da anestesia (BUXCO) e sob da anestesia (Flexivent). Podemos observar em nossos achados, que o fator anestesia não alterou a mecânica pulmonar, sendo que, animais não diabéticos desafiados com OVA apresentaram um aumento da hiperresponsividade das vias aéreas, independente do aparelho utilizado. E mais uma vez, podemos observar que o DM prejudicou outro sintoma importante da asma.

Em resumo, nosso modelo experimental de DM1 por aloxana, compromete a resposta inflamatória alérgica pulmonar tardia, ocasionando a diminuição da hiperreatividade das vias aéreas, reduzindo: as moléculas de vias de sinalização; a concentração de imunoglobulinas específicas; e citocinas do perfil Th2, assim como a diminuição das populações leucocitárias envolvidas no desenvolvimento da asma. O tratamento com múltiplas doses de insulina restabelece os parâmetros estudados envolvidos na resposta inflamatória alérgica tardia, mesmo sem normalizar a glicemia.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Com os resultados do presente estudo, podemos concluir que a insulina modula a inflamação alérgica pulmonar tardia em camundongos diabéticos. Por regular a) a expressão de moléculas de sinalização intracelular; b) concentração de imunoglobulinas presentes no soro do animal; c) o perfil de citocinas Th2 no sobrenadante do homogenato de pulmão; d) processo inflamatório alérgico pulmonar no lavado broncoalveolar; e) a expressão de moléculas de superfície nos tecidos de pulmão, baço, timo e medula óssea e f) hiper-reatividade brônquica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BARNES, P.J. New drugs for asthma. **Nat Rev Drug Discov**. 3: 831-844, 2004.

BARTRAM, U.; SPEER, C.P.; The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. **Chest**. 125:754-765, 2004.

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

BENDELAC, A.; RIVERA, M.N.; PARK, S.H.; ROARK, J.H. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. **Annu Rev Immunol**. 15: 535-562, 1997.

BRANNAN, J.D & LOUGHEED, M.D. Airway hyperresponsiveness in asthma: mechanisms, clinical significance, and treatment. **Frontiers in Physiology**. 3 (460), 2012.

BOULET, L-P., & STERK, P.J., Airway remodeling: the future. **Eur Respir J**. 30: 831-834, 2007.

BOTTINI, N., FONTANA, L. Asthma and diabetes. **Lancet**. 7;354(9177):515-6. 1999

CAVALHER-MACHADO S. C., de LIMA W. T., DAMAZO A.S., de FRIAS CARVALHO V., MARTINS M. A., e SILVA P. M., SANNOMIYA P. Down-regulation of mast cell activation and airway reactivity in diabetic rats: role of insulin. **Eur. Respir. J**. 24, 552–558, 2004.

CARVALHO V. F., FLORIM L. T., DE O BARRETO E., . Inhibition of advanced glycation end products by aminoguanidine restores mast cell numbers and reactivity in alloxan-diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**. 669(1–3):143–148. 2011.

CARVALHO, V.F; BARRETO, E.O.; ARANTES, A.C.S.; SERRA, M.F.; FERREIRA T.P.T.; JANNINI-Sá Y.A.P.; HOGABOAM C.M.; MARTINS M.A.; SILVA P.M.R. Diabetes Downregulates Allergen-Induced Airway Inflammation in Mice. **Mediators Inflamm**. 2018.

CORREN, J., Role of Interleukin-13 in Asthma. **Curr Allergy Asthma Rep**. 13:415–420, 2013

d' ANNUNZIO G.; TOSCA, M.A.; PISTORIO, A.; SILVESTRI, M.; ROMANISIO, G.; LORINI, R.; ROSSI G.A.; CIPRANDI G. Type 1 diabetes mellitus and asthma: A follow-up study. **Allergologia et Immunopathologia**. 42 (2) 119-236, 2015.

De BOER, J.; MEURS, H.; COERS, W.; KOOPAL, M.; BOTTONE, A.E.; VISSER, A.C.; TIMENS, W.; ZAAGSMA, J. Deficiency of nitric oxide in allergen-induced airway hyperreactivity to contractile agonists after the early asthmatic reaction: an ex vivo study. **Br Journal Pharmacol**. 119: 1109-1116, 1996.

DECKERS, J., MADEIRA, F.B., HAMMAD, H. Innate immune cells in asthma. **Trends in Immunology**. 1-8. 2013.

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

DIAZ, B.L.; SERRA, M.F.; ALVES, A.C.; *et al*. Alloxan diabetes reduces pleural mast cell numbers and subsequent eosinophil influx induced by allergen in sensitized rats. **Int Arch Allergy Immunol**. 111:36–43. 1996.

DOUEK, I. F.; LEECH, N. J.; GILLMOR, H. A.; BINGLEY, P. J.; GALE, E. A. M. Children with type-1 diabetes and their unaffected siblings have fewer symptoms of asthma. **The Lancet**. 353: 1850, 1999.

EMALA, C., and HIRSHMAN, C. Animal models of bronchial hyperreactivity. **Monogr Allergy** 33, 35–52, 1996.

FAUSTINO, L.; MUCIDA, D.; KELLER, A.C.; DEMENGEOT J.; BORTOLUCI, K.; SARDINHA, R.L.; TAKENAKA, M.C.; BASSO, A.S; FARIA, A.M.C.; RUSSO. M. Regulatory T Cells Accumulate in the Lung Allergic Inflammation and Efficiently Suppress T-Cell Proliferation but Not Th2 Cytokine Production. **Clinical and Developmental Immunology**. 2012.

FERREIRA, S.S.; NUNES, F.P.B., CASAGRANDE, F.B., MARTINS, J.O. Insulin Modulates Cytokine Release, Collagen and Mucus Secretion in Lung Remodeling of Allergic Diabetic Mice. **Frontiers in Immunology**. 8, 633, 2017.

GALLI, S.J., TSAI, M., PILIPONSKY, A.M. The development of allergic inflammation. **Nature**. 454, 2008.

GARCIA-LEME, J.; FARSKY, S.P. Hormonal control of inflammatory responses. **Mediat Inflamm** 2:181–198. 1993

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

GAVETT, S.H.; CHEN, X.; FINKELMAN, F.; WILLS-KARP, M. Depletion of murine CD4+ T lymphocytes prevents antigen-induced airway hyperreactivity and pulmonary eosinophilia. **Am J Respir Cell Mol Biol**. 10: 587-593, 1994.

GELL, P.G.H.; COOMBS, R.R.A.; The classification of allergic reactions underlying disease. In *Clinical Aspects of Immunology*. **Blackwell Science**. 1963.

GREENFENDER, S., UMLAND, S.P., CUSS, F.M., CHAPMAN R.W., EGAN, W.E., Th2 cytokines and asthma: The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. **Respiratory Research**. Vol.1, 2001.

GENOV, I. R., SOLÉ D., Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) and Asthma: Is Meta-analysis the only way out?. **Rev. bras. alerg. imunopatol.** – Vol. 30:1, 2007.

GINA. GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA. **Global Initiative for asthma**. 2016.

HAMMAD, H. PLANTINGA, M.; DESWARTE, K.; POULIOT, P.; WILLART, M.A.M., KOOL, M.; MUSKENS F.; LAMBRECHTI B.N. Inflammatory dendritic cells – not basophils – are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. **The journal of experimental medicine**. Vol. 207.10: 2097-2111. 2010.

HAMELMANN, E.; OSHIBA, A.; PALUH, J.; BRADLEY, K.; LOADER, J.; POTTER, T.A.; LARSEN, G.L.; GELFAND, E.W. Requirement for CD8+ T cells in the development of airway hyperresponsiveness in a marine model of airway sensitization. **J Exp Med**. 183: 1719-1729, 1996.

HELANDER, E. Asthma and diabetes. **Acta Med. Scand.**. 162: 165-174, 1958.

HERZ, U., LUMPP, U., DA PALMA, J. C., ENSSLE, K., TAKATSU, K., SCHONROY, N., DASER, A., KOTTGEN, E., WAHN, U., and RENZ H. The relevance of murine animal models to study the development of allergic bronchial asthma. **Immunol Cell Biol** 74, 209–17, 1996.

HOFFMAN, D.A; MCCONAHEY, W.M; DIAMOND, E.L; KURLAND, L.T. Mortality in women treated for hyperthyroidism. **Am J Epidemiol**. 115:243–254. 1982.

HOLGATE, S.T., Pathogenesis of asthma. **Clinical and Experimental Allergy**. 2008.

HUANG, N., LIU K., GAO, X., ZENG Z., ZHANG Y., CHEN J. Interleukin-37 alleviates airway inflammation and remodeling in asthma via inhibiting the activation of NF- κ B and STAT3 signalings. **Int Immunopharmacol**. 55:198-204, 2018.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas, 8th edn**. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017.

KAY, A.B. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. **Trends Mol Med**. 11: 148-152, 2005.

KEETON, A.B.; AMSLER, M.O.; VENABLE, D.Y.; MESSINA J.L. Insulin signal transduction pathways and insulin-induced gene expression. **J Biol Chem**. 13:277. 2002.

KIRSTEN, V.R. Caracterização do modelo experimental NOD (nonobese diabetic) em ambiente convencional. **Dissertação de Mestrado**. 2006.

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

KUMAR, A; SINGH, U.K; KINI, S.G; GARG, V; AGRAWAL S; TOMAR, P.K; PATHAK, P.; CHAUDHARY A, GUPTA, P; MALIK, A. JNK pathway signaling: a novel and smarter therapeutic targets for various biological diseases. **Future Med Chem**. 7:15, 2065-86. 2015.

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

LAMBRECHT, B.N.; DE VEERMAN, M.; COYLE, A.J.; GUITIERREZ-RAMOS, J-C.; THIELEMANS, K.; PAUWELS R. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**. 106 (4), 2000.

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

LEE C.G., LINK, H., BALUK, P., HOMER, R.J., CHAPOVAL, S., BHANDARI, V., KANG, M.J., COHN, L., KIM, Y.K., McDONALD, D.M., ELIA, J.A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. **Nature Medicine**. 10:10, 2004.

LEE, I-T & YANG, C-M. Inflammatory singalings involved in airway and pulmonar diseases. **Hindawi**. 2013.

LEIBIGER, B., LEIBIGER, I. B., MOEDE T., et al. Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic β cells. **Molecular Cell**. 2001

LEIBIGER, B., MOEDE, T., UHLES S., BARKER, C.J., CREVEAUX, M., DOMIN, J., BERGGREN, P.O., LEIBIGER, I.B. Insulin-feedback via PI3K-C2alpha activated PKBalpha/Akt1 is required for glucose-stimulated insulin secretion. **FASEB J**. 24(6): 1824-37. 2010.

LENZEN, S.; TIEDGE, M.; JORNS, A.; MUNDAY, R. Alloxan derivatives as a tool for the elucidation of the mechanism of the diabetogenic action of alloxan. In: **Lessons from Animal Diabetes**, Birkhauser, Boston, E SHAFRIR (ed): 113-122, 1996.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M.I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews**

Immunology. 7: .678-689, 2007.

LISBONNE, M.; DIEM, S.; DE CASTRO KELLER, A.; LEFORT, J.; ARAUJO, L.M.; HACHEM, P.; FOURNEAU, J.M.; SIDOBRE, S.; KRONENBERG, M.; TANIGUCHI, M.; VAN ENDERT, P.; DY, M.; ASKENASE, P.; RUSSO, M.; VARGAFTIG, B.B.; HERBELIN, A.; LEITE-DE-MORAES, M.C. Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. **J Immunol.** 171: 1637-1641, 2003.

LOPES, R.A & PIVATO, L. S.P. Hipersensibilidade imediata: uma revisão sobre anafilaxia. **Revista Saúde e Pesquisa.** 5 (1): 147- 160, 2012.

MACKAY I.R & ROSEN F.S. Allergy and Allergic Diseases. **N Engl J Med.** 344(1), 2001.

MANISE, M.; HOLTAPPELS, G. CROMBRUGGEN, K.V.; SCHLEICH, F.; BACHERTZ; LOUIS, R. Sputum IgE and Cytokines in Asthma: Relationship with Sputum Cellular Profile. **Plos one.** 8 (3), 2013.

MARIM, F.M.; SILVEIRA,T.N.;LIMA, D.S.;ZAMBONI, D.S.; A Method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **Plos one.** 5(12): e15263, 2010.

MARTIN, J.G.; SUZUKI, M.; RAMOS-BARBON, D.; ISOGAI, S. T cell cytokines: animal models. **Paediatr Respir Rev.** 5 Suppl A: S47-51, 2004.

MARTINS, J.O; CAMPOS C.A.L; CRUZ, J.W.M.C; MANZOLLI, S; ALVES, V.A.F; VIANNA, E.O; JANCAR, S; SANNOMIYA, P. Insulin modulates cytokine release and selectin expression in the early phase of allergic airway inflammation in diabetic rats. **BMC Pulmonary Medicine,** 10:39, 2010a

MARTINS, J. O.; MEYER-PFLUG, A. R.; ALBA-LOUREIRO, T. C.; MELBOSTAD, H.; CRUZ, J. W. M. C.; COIMBRA, R.; CURI, R.; SANNOMIYA, P. Modulation of Lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation: role of insulin. **Shock.** 33.1:76-82. 2010b.

MAUAD, T., BEL.,E.H., STERK, P.J. Asthma therapy and airway remodeling. **J Allergy Clin Immuol.** 2007.

MAYANI, H.; GUILBERT, L.J.; JANOWASKA-WIECZOREK, A. Biology of hemopoietic microenvironment. **European journal of haematology,** v. 49.5: 225-233, 1992.

MEDZHITOV, R. & JANEWAY, C.A., JR. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. **Curr Opin Immunol.** 9: 4-9, 1997.

MEDZHITOV. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature Reviews Immunology.** 454(24):428-435, 2008.

MEHTA, S.; LILLY, C.M.; ROLLENHAGEN, J.E.; HALEY, K.J.; ASANO, K.; DRAZEN, J.M. Acute and chronic effects of allergic airway inflammation on pulmonary nitric oxide production. **Am J Physiol.** 272: L124-131, 1997. 18

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

MEURS, H.; SCHUURMAN, F.E.; DUYVENDAK, M.; ZAAGSMA, J. Deficiency of nitric oxide in polycation-induced airway hyperreactivity. **Br J Pharmacol.** 126: 559-562, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ministério da Saúde.** 2010.

MIROTTI, L.C.; CUSTÓDIO, R.W.A.; GOMES, E.; RAMMAURO, F.; ARAUJO F.; CALICH, V.L.G.; RUSSO, M. CpG-ODN Shapes Alum Adjuvant Activity Signaling via MyD88 and IL-10. **Frontiers in Immunology.** 8:47,2017.

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

MULLER, W.A. Mechanisms of Transendothelial Migration of Leukocytes. **Circ Res.** 105: 223-230, 2009.

MUR, L.A.J.; KENTON, P.; LLOYD, A.J.; OUGHAM, H.; PRATS, E.; The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?. **Journal of experimental botany.** 59 (3): 501-520, 2008.

National Institute of Allergy and Infectious Diseases, (NIH). Disponível em <https://www.niaid.nih.gov/>. Acessado em 15 de janeiro de 2019.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Diabetes 2016: Global Report on Diabetes 2016.** Disponível em: <http://www.who.int/diabetes/global-report/WHD16-press-release-EN_3.pdf?ua=1>. Acessado em 25 de agosto de 2016.

PARCHWANI, D.N.; UPADHYAH, A.A. Diabetic nephropathy: Progression and pathophysiology. **Int J Med Sci Public Health.** V.1, n.2, p.59-70, 2012.

PASCUAL, R.M & PETERS, S.P. Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: An overview. **J Allergy Clin Immunol.** 2005.

PAWANKAR RU, et al. Phenotypic and molecular characteristics of nasal mucosal $\gamma\delta$ T cells in allergic and infectious rhinitis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 153:1655–1665. 1996

PAUWELS, R. A., BRUSSELLE, G. J., and KIPS, J. C. Cytokine manipulation in animal models of asthma. **Am J Respir Crit Care Med** 156, S78–81, 1997.

PEREIRA, M. A. A.; SANNOMIYA, P.; GARCIA-LEME, J. Inhibition of leukocyte chemotaxis by factor in alloxan-induced diabetic rat plasma. **Diabetes**. 36: 1307-1314, 1987.

RANKIN, J.A. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Clinical issues**. 15 (1): 3-17, 2004.

REGATEIRO, F.; FARIA, E.; Mecanismos imunopatológicos das reações de hipersensibilidade a fármacos. **Rev Port Imunoalergologia**. 24 (2): 63, 7-8. 2016.

ROHILLA, A & ALI, S. Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effect. **International J of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**. 3 (2), 2012.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudos de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantan**. 20: 315-28, 1947.

SADLON TJ, et al. Genome-wide identification of human FOXP3 target genes in natural regulatory **T cells**. **J. Immunol**. 185:1071–1081. 2010.

SANNOMIYA, P.; PEREIRA, M. A. A.; GARCIA-LEME, J. Inhibition of leukocyte chemotaxis by serum factor in diabetes mellitus: selective depression of cell response mediated by complement-derived chemoattractants. **Agents and Actions**. 30: 369-376, 1990.

SCHOFIELD, M., & CALHOUN K.H. Immunology of asthma. **Otolaryngol Clin N Am**. 44:591-601, 2011.

SILVA, J.R.L. Inflamação crônica na asma brônquica. **Pulmão RJ**. 2008.

SILVERSTEIN, J. KINGENSMITH, G., COPELAND, K., PLOTNICK L., KAUFMAN F., LAFFER L., DEEB, L., GREY M., ANDERSON B., HOLZMEISTER L.A., CLARK N., Care of Children and Adolescents With Type 1 Diabetes. **Diabetes Care**. 28:1, 2005.

SINGH S, PRAKASH, Y.S, LINNEBERG, A. AGRAWAL, A. Insulin and the lung connecting asthma and metabolic syndrome. **Hindawi**. 2013.

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMONIA E TISIOLOGIA. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**. 2012.

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

SUNAHARA KK, SANNOMIYA P, MARTINS JO. Briefs on insulin and innate immune response. **Cell Physiol Biochem**. 29 (1-2):1-8, 2012.

STEINKE, J.W., BORISH, L., Th2 cytokines and asthma: Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting. **Respir Res.**, 2:66–70, 2001.

STUMM, C.L., WETTLAUER, S.H., JANCAR, S., PETERS-GOLDEN, M., Airway remodeling in murine asthma correlates with a defect in PGE₂ synthesis by lung fibroblasts. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 10.1152, 2011.

STUMM, C.L; HALCSIK, E; LANDGRAF, R.G; CAMARA, N,O,S; SOGAYAR, M.C; JANCAR, S.;Lung Remodeling in a Mouse Model of Asthma Involves a Balance between TGF-b1 and BMP-7. **Plos one**. 9:4, 2014.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res**. 50:536-546, 2001.

TOSCA, M.A.; SILOVESTRI, M.; D'ANNUNZIO.; LORINI, R.; ROSSI, G.A.; CIPRANDI, G. May T1 diabetes mellitus protect from asthma? **Allergol Immunopathol (Madr)**. 41(5):288-91, 2013.

TSJUITA, M. **Participação do nicho endosteal na regulação da hematopoiese de camundongos submetidos à desnutrição proteica**. 2016. Tese (Tese de Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

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

van RIJT, L.S; JUNG, S.;KLEINJAN, A.; VOS N.; WILLART, M.; DUEZ C.; HENK, C.H.; LAMBRECHT, B.N. In vivo depletion of lung CD11c⁺ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. **JEM**. 201 (6): 981-991, 2005.

VIANNA, E. S. O. & GARCIA-LEME, J. Allergen-induced airway inflammation in rats. Role of insulin. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**. 151: 809-814, 1995.

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

VIEIRA, R.P; DUARTE, A.C; CLAUDINO, R.C; PERINI, A; SANTOS, A.B.G.; MORIYA, H.T.; ARANTES-COSTA, F.M.; MARTINS, CARVALHO, R.F.; DOLHNIKOFF. A., Creatine Supplementation Exacerbates Allergic Lung Inflammation and Airway Remodeling in Mice. **Am J Respir Cell Mol Biol**. 37: 660-667, 2007.

WALFORD, H.H., DOHERTY T.A. STAT6 and lung inflammation. **Jak-Stat**. 2:4, 2013.

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

WILLCOX, A; RICHARDSON, S.J., BONE, A.J; FOULIS, A.K, MORGAN, N.G; Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. **Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology**. 155:173-181, 2008.

VOOGHT, V.; CARLIER, V.; DEVOS, F.C.; HAENEN, S.; VERBEKEN, E.; NEMERY, B.; HOET, P.H.M.; VANOIRBEEK, J.AJ. B-lymphocytes as Key Players in Chemical-Induced Asthma. **Plos one**. 8 (12), 2013.

YING S, et al. Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4+ and CD8+ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics. **J. Immunol**; 158:3539–3544. 1997.

YUKSEL, H.; YILMAZ, O.; KARAMAN, M.; BAGRIYANIK, H.A.; FIRINCI, F.; KIRAY, M.; TURKELI, A.; KARAMAN, O. Role of vascular endothelial growth factor antagonism on airway remodeling in asthma. **Ann Allergy Asthma Immunol**. 110 (3): 150-155. 2013.

ZUANY-AMORIM, C.; RUFFIE, C.; HAILE, S.; VARGAFTIG, B.B.; PEREIRA, P.; PRETOLANI, M. Requirement for gammadelta T cells in allergic airway inflammation. **Science**. 280: 1265-1267, 1998.

ANEXOS

Anexo I



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

Ofício CEUA/FCF 21.2015-P490

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 "**Aspectos moleculares envolvidos na modulação da insulina em modelo de asma tardia em animais sadios e diabéticos**" (Protocolo CEUA/FCF/490), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Sabrina de Souza Ferreira**, sob orientação do(a) **Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de **6 de fevereiro de 2015**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 15 de abril de 2015.


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

Anexo II

2019-1-7

 - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



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

9142 - 8182912/1 - Sabrina de Souza Ferreira

Email: sabrinasferreira@usp.br
Data de Nascimento: 08/06/1988
Cédula de Identidade: RG - 42.181.839-9 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Licenciado e Bacharel em Ciências Biológicas - Centro Universitário - Fundação Instituto de Ensino para Osasco - São Paulo - Brasil - 2011
Mestrado: Mestra em Ciências - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2015

Curso: Doutorado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Fisiopatologia
Data de Matrícula: 26/02/2015
Início da Contagem de Prazo: 26/02/2015
Data Limite para o Depósito: 26/02/2019
Orientador: Prof(a). Dr(a). Jilson de Oliveira Martins - 09/01/2017 até o presente. Email: martinsj@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 26/02/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 23/03/2017
Estágio no Exterior: Karolinska Institutet, Suécia - Período de 25/10/2017 até 25/09/2018
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 26/02/2015

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 8542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2018

Impresso em: 07/01/2019 16:21:11



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

FICHA DO ALUNO

9142 - 8182912/1 - Sabrina de Souza Ferreira

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5792-3/2	Tópicos em Análises Clínicas III	03/03/2015	16/06/2015	15	1	87	A	N	Concluída
FBC5766-4/2	Tópicos em Análises Clínicas IV	04/08/2015	16/11/2015	15	1	90	A	N	Concluída
MPT5794-1/4	Ultra-Estrutura e Função Celular (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	03/03/2016	06/04/2016	75	5	90	A	N	Concluída
MCM5772-7/2	Temas Básicos de Imunologia (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	04/04/2016	01/05/2016	60	4	90	B	N	Concluída
ECB5803-1/1	Biologia e Cultura: Reflexões para Professores (Curso Interunidades: Ensino de Biologia - Universidade de São Paulo)	01/06/2016	05/07/2016	90	6	100	A	N	Concluída
MCM5866-3/1	Prática de Laboratório VII (Modelos Experimentais em Alergia) (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	26/09/2016	09/10/2016	60	4	100	A	N	Concluída
BMF5861-5/1	Mecanismos Reguladores da Inflamação Pulmonar Experimental (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	10/10/2016	30/10/2016	90	6	93	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	27
Estágios:			
Total:	0	20	27

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2018

Impresso em: 07/01/2019 16:21:11



Sabrina de Souza Ferreira

Endereço para acessar este CV: <https://lattes.cnpq.br/5696026999387684>

Última atualização do currículo em 17/01/2019

Resumo informado pelo autor

Graduada em Biologia pelo Centro Universitário FIEO (2010). Concluiu o Programa de Aperfeiçoamento Profissional da Secretaria de Estado da Saúde/FUNDAP, no Instituto Butantan pelo Laboratório de Patopatologia (2009-2013), onde a aluna obteve conhecimentos, sobre: morfologia, com ênfase em histologia com parafina e coloração de H/E; nas técnicas de imunohistoquímica com peroxidase e de western blotting, atuando nos seguintes temas: decídua mesometrial, embriologia, fibrinogênio, envenenamento por Botrosp jararaca. Concluiu o mestrado (2015) pelo Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FBC/FCF/USP), seu projeto dá ênfase à inflamação alérgica pulmonar crônica em modelos diabéticos e não diabéticos, atuando nos seguintes temas: insulina, imunologia celular, inflamação pulmonar. Atualmente é doutoranda da Universidade de São Paulo. Possui interesse nas áreas de docência e pesquisa.
(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Sabrina de Souza Ferreira

Dados pessoais

Filiação Antonio Carlos Ferreira e Ildanda Lourdes De Souza
 Nascimento 08/06/1985 - Osasco/SP - Brasil
 Carteira de Identidade 421616389 SSP - SP - 29/01/2001
 CPF 360.444.288-50

Formação acadêmica/titulação

- 2015** Doutorado em Farmácia (Patopatologia e Toxicologia).
 Universidade de São Paulo, USP, Brasil
 com período acadêmico em Karolinska Institutet (Orientador: Dr. Per-Olof Berggren e Dr. Chis Barker)
 Título: Aspectos moleculares envolvidos na modulação da insulina em modelo de asma tardia em animais saudáveis e diabéticos.
 Orientador: Prof. Dr. Jolison de Oliveira Martins
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2013 - 2015** Mestrado em Farmácia (Patopatologia e Toxicologia).
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: PAPEL DA INSULINA NA VOZELÇA DA INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS E SADIOS. Ano de obtenção: 2015
 Orientador: Jolison de Oliveira Martins
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2009 - 2011** Especialização em Iniciação Científica.
 Instituto Butantan, IB, Brasil
 Título: Alerção do fibrinogênio plasmático e urinário no envenenamento por Botrosp jararaca em camundongos prenhes
 Orientador: Diva Denelle Spadacci-Moreira
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2007 - 2010** Graduação em Biologia.
 Centro Universitário FIEO, UNIFIEO, Osasco, Brasil
 Título: Papel da p53 em cardiomiopatia cerebral induzida por radiação ionizante
- 2011 - 2013** Aperfeiçoamento em Patopatologia e Farmacologia.
 Instituto Butantan, IBU, São Paulo, Brasil
 Título: Alerção do fibrinogênio plasmático e urinário no envenenamento por Botrosp jararaca em camundongos prenhes
 Orientador: Diva Denelle Spadacci-Moreira
 Bolsista do(a): FUNDAP

Formação complementar

- 2018 - 2018** Curso de curta duração em Radiation safety for laboratory work.
 Karolinska Institutet, KI, Estocolmo, Suécia
- 2018 - 2018** Laboratory Animal Science Function A - Rodents and lagomorphs .
 Karolinska Institutet, KI, Estocolmo, Suécia
- 2018 - 2018** Swedish legislation & Ethics, animal welfare and 3R .
 Karolinska Institutet, KI, Estocolmo, Suécia
- 2016 - 2016** Programa de Aperfeiçoamento de Ensino... (Carga horária: 75h).
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em teórico-prático de Imunohistoquímica. (Carga horária: 8h).
 Instituto Butantan, IB, Brasil
- 2009 - 2009** Extensão universitária em Acidentes por Animais peçonhentos. (Carga horária: 60h).
 Instituto Butantan, IBU, São Paulo, Brasil
- 2009 - 2009** Extensão universitária em Histologia II. (Carga horária: 16h).

	Centro Universitário FIEO, UNIFIEO, Osasco, Brasil
2009 - 2009	Edenão universitária em Análise de Laboratório: Espécies Convencionais. (Carga horária: 100h). Instituto Butantan, IBU, São Paulo, Brasil
2009 - 2009	Edenão universitária em Biologia Molecular no Estudo de Toxinas. (Carga horária: 15h). Instituto Butantan, IBU, São Paulo, Brasil
2009 - 2009	Curso de curta duração em Introdução a microscopia nas técnicas biológicas. (Carga horária: 4h). Instituto Butantan, IBU, São Paulo, Brasil
2009 - 2009	Edenão universitária em Estatística Experimental. (Carga horária: 6h). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, FMVZ, Brasil
2008 - 2008	Edenão universitária em Vírus Bacterianas Virais e Recombinantes. (Carga horária: 20h). Instituto Butantan, IBU, São Paulo, Brasil
2008 - 2008	Edenão universitária em Desenvolvimento Bioinformático. (Carga horária: 16h). Centro Universitário FIEO, UNIFIEO, Osasco, Brasil
2008 - 2008	Edenão universitária em Histologia I. (Carga horária: 12h). Centro Universitário FIEO, UNIFIEO, Osasco, Brasil
2008 - 2008	Edenão universitária em Metodologia de Estudos de Aves. (Carga horária: 8h). Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
2008 - 2008	Edenão universitária em Mecanismos Celulares que Modulam Sit Homeostático. (Carga horária: 15h). Instituto Butantan, IBU, São Paulo, Brasil
2008 - 2008	Edenão universitária em Ferramentas Didáticas em Microbiologia. (Carga horária: 20h). Instituto Butantan, IBU, São Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

- 2015 - Atual** Vínculo: Bolsista CAPES, Enquadramento funcional: Doutorado, Regime: Dedicção exclusiva
- 2013 - 2015** Vínculo: Bolsista FAPESP, Enquadramento funcional: Mestrado, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

Atividades

- 03/2013 - Atual** Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
- Linhas de pesquisa:**
Papel da insulina na vigência de inflamação alérgica pulmonar em camundongos diabéticos e sedos

2. Instituto Butantan - IBU

Vínculo institucional

- 2011 - 2013** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Aperfeiçoamento Profissional, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
- 2009 - 2011** Vínculo: Bolsista CNPq, Enquadramento funcional: Aluna de Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Parcial
- 2008 - 2009** Vínculo: Estagiária, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

- 10/2008 - 03/2013** Pesquisa e Desenvolvimento, Laboratório de Patopatologia
- Linhas de pesquisa:**
Avaliação do fibrinogênio no soro de camundongos prenhes submetidos ao veneno de Bothrops jararaca

3. Fundação Butantan - FB*

Vínculo institucional

- 2008 - 2009** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Monitora, Carga horária: 8, Regime: Parcial

Linhas de pesquisa

1. Avaliação do fibrinogênio no soro de camundongos prenhes submetidos ao veneno de Bothrops jararaca
2. Papel da insulina na vigência de inflamação alérgica pulmonar em camundongos diabéticos e sedos

Projetos

Projetos de pesquisa

- 2013 - Atual** Papel da insulina na vigência de inflamação alérgica pulmonar em camundongos diabéticos e sedos
- Descrição:** Em trabalho anterior observamos que alterações inflamatórias no pulmão, desencadeadas na reação alérgica (fase inicial - seis horas após um único desafio), tais como, infiltrado celular, produção de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-10) e moléculas de adesão encontravam-se reduzidas em ratos diabéticos. O tratamento desses animais com doses únicas de insulina, corrigiu estas alterações. No entanto, a asma é uma doença complexa que envolve, simultaneamente, a participação de várias células, citocinas e mediadores inflamatórios em que a fase inicial é completamente diferente de fase tardia. O

O. Vitamin D Modulates Hematological Parameters and Cell Migration Into Peritoneal and Pulmonary Cavities in Alloxan-Diabetic Mice. *Bioméd Research International*. **2017**, v.2017, p.1 - 10, 2017.

6.  **NOLASCO, EDUARDO L.; ZANONE, FERNANDO L.; NUNES, FERNANDA P. B.; FERREIRA, SABRINA S.; FREITAS, LUÍZA A.; SILVA, MARIANA C.F.; MARTINS, JOILSON O.** Insulin Modulates Leukocyte Function in a Type 1 Diabetes Rat Model. *Cellular Physiology and Biochemistry*. **2015**, v.36, p.1467 - 1479, 2015.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SILVA, MARIANA C.F.; NUNES, FERNANDA P. B.; FERREIRA, S. S.; CASAGRANDE, F. B.; MARTINS, JOILSON O. Effects of insulin on cytokines production in different tissues during peritonitis induced by *Staphylococcus aureus* in diabetic and health rats In: SIMFAC VI, 2016. SIMFAC VI. , 2016.
2. CASAGRANDE, F. B.; NUNES FPB; ROMERA, L.; FERREIRA, S. S.; TESSARO, F.; SOUZA, P. R. K.; ALMEIDA, S.; MARTINS, JOILSON O. Insulin Effects on *Paracoccidídeos* *Brasilensis*- Induced Systemic Mycosis in Healthy and Diabetic Mice In: SIMFAC VII, 2016, São Paulo. SIMFAC VII. , 2016.
3. CASAGRANDE, F. B.; NUNES FPB; ROMERA, L.; FERREIRA, S. S.; TESSARO, F.; SOUZA, P.; ALMEIDA, S.; MARTINS, J. O. Insulin Effects on *Paracoccidídeos* *Brasilensis*-Induced Systemic Mycosis in Healthy and Diabetic Mice. In: XXI SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2016, São Paulo. XXI SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2016, São Paulo. XXI SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. , 2016.
4. FERREIRA, S. S.; TSUJITA, M.; CASAGRANDE, F. B.; NUNES FPB; OOMES, E.; CUSTODIO, R. W.; MARTINS, J. O. Insulin Modulates Molecular Aspects of Asthma in Diabetic Mice. In: XXI SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2016. XXI SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. , 2016.
5. NOLASCO, E.; TESSARO, F.; BELLA, L. M.; FERREIRA, S. S.; MARTINS, JOILSON O. Insulin differently modulates leukocyte recruitment in different sites in septic diabetic mice. In: 50ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica - L SUPFAB, 2015. 50ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica - L SUPFAB. , 2015.
6. CASAGRANDE, F. B.; NUNES FPB; ROMERA, L.; FERREIRA, S. S.; TESSARO, F.; SOUZA, P. R. K.; ALMEIDA, S.; MARTINS, J. O. Insulin effects on *Paracoccidídeos* *Brasilensis*-induced systemic mycosis in healthy and diabetic and healthy mice. In: XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2015. XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE. , 2015.
7. FERREIRA, S. S.; NUNES FPB; MARTINS, JOILSON O. Insulin modulates airway remodeling in diabetic mice In: 50ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica - L SUPFAB, 2015, São Paulo. 50ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. , 2015.
8. NOLASCO, E.; TESSARO, F.; BELLA, L. M.; FERREIRA, S. S.; MARTINS, J. O. Insulin modulates leukocyte recruitment in septic diabetic mice. In: XII Fórum Internacional de Sepse In: XII Fórum Internacional de Sepse, 2015. XII Fórum Internacional de Sepse. , 2015.
9. CASAGRANDE, F. B.; NUNES, FERNANDA P. B.; ROMERA, L.; FERREIRA, S. S.; TESSARO, F.; SOUZA, P. R. K.; ALMEIDA, S.; MARTINS, J. O. *Paracoccidídeos* *Brasilensis*-induced systemic mycosis in healthy and diabetic and healthy mice: role of insulin In: 50ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica - L SUPFAB, 2015. 50ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica - L SUPFAB. , 2015.
10. SILVA, MARIANA C.F.; SOUZA, P. R. K.; NUNES FPB; FERREIRA, S. S.; CASAGRANDE, F. B.; MARTINS, JOILSON O. *Staphylococcus aureus*-induced peritonitis in healthy and diabetic rats: role of insulin. In: XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2015, São Paulo. XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE. , 2015.
11. FERREIRA, S. S.; NUNES, FERNANDA P. B.; MARTINS, J. O. Allergic airway inflammation in diabetic mice: role of insulin In: 11th International Conference on Innate Immunity 2014, Olympia. 11th International Conference on Innate Immunity. , 2014.
12. BELLA, L. M.; AZEVEDO, C.; TESSARO, F.; NOLASCO, EDUARDO L.; NUNES, FERNANDA P. B.; FERREIRA, SABRINA S.; MARTINS, JOILSON O. Effect of Vitamin D Supplementation in the Experimental Model of Diabetes Mellitus In: XIX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2014. XIX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. , 2014.
13. FERREIRA, S. S.; NUNES FPB; MARTINS, JOILSON O. Modulatory Effect of Insulin on Airway Remodeling in Diabetic Mice. In: XIX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2014. XIX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. , 2014.
14. NOLASCO, E.; TESSARO, F.; BELLA, L. M.; FERREIRA, S. S.; GRUND, L. Z.; LIMA, C.; MARTINS, J. O. Sepsis-induced systemic inflammatory response syndrome (SIRS) is major in diabetic mice and correlates with neutrophils capacity of endocytosis. In: XXXIX Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2014, Búzios. XXXIX Congress of the Brazilian Society of Immunology. , 2014.
15. FERREIRA, S. S.; SANTORO, M. L.; KATZ, S. G.; SPADACCI-MORENA, D.D. Alteração do fibrinogênio plasmático e uterino no envenenamento por *Bothrops jararaca* em camundongos pretinhos In: XXI Semana Científica Benjamin Euclides Malucelli, 2012. XXI Semana Científica Benjamin Euclides Malucelli. , 2012.
16. FERREIRA, S. S.; SANTORO, M. L.; SPADACCI-MORENA, D.D. *Bothrops jararaca* envenomation elicits low uterine fibrinogen In: XII Reunião Científica anual Instituto Butantan, 2010, São Paulo. XII Reunião Científica anual Instituto Butantan. , 2010.
17. NUNES, FERNANDA P. B.; FERREIRA, S. S.; Della-Casa M5; SPADACCI-MORENA, D.D.; Citão MC Crotacina Inhibits pro-inflammatory cytokines secretion: effect on cell migration In: XI Congresso da Sociedade Brasileira de Tecnologia, 2010. XI Congresso da Sociedade Brasileira de Tecnologia. , 2010.
18. NUNES FPB; FERREIRA, S. S.; Della-Casa M5; SPADACCI-MORENA, D.D.; Citão MC Crotacina Inhibits pro-inflammatory cytokines secretion: effect on cell migration In: XI Congresso da Sociedade Brasileira de Tecnologia, Anais. Crotacina Inhibits pro-inflammatory cytokines secretion: effect on cell migration. , 2010.
19. NUNES FPB; FERREIRA, S. S.; Della-Casa M5; SPADACCI-MORENA, D.D.; Citão MC Crotacina Inhibits the secretion of pro-inflammatory cytokines: effect on cell migration In: XII Reunião Científica anual do Instituto Butantan - Biotecnologia e Inovação em Saúde Pública, 2010, São Paulo. Crotacina Inhibits the secretion of pro-inflammatory cytokines: effect on cell migration. , 2010.
20.  FERREIRA, S. S.; SANTORO, M. L.; SPADACCI-MORENA, D.D. Evaluation of Fibrinogen in the uterus of pregnant mice submitted to *Bothrops jararaca* envenomation In: XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2010, São Paulo. XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology. , 2010.
21. FERREIRA, S. S.; SANTORO, M. L.; SPADACCI-MORENA, D.D.

Avaliação do fibrinogênio no soro de camundongos prenhes submetidos ao veneno de Bothrops jararaca. In: XVII Semana Científica Benjamin Burck Malucelli, 2009, São Paulo.
XVIII Semana Científica Benjamin Burck Malucelli, 2009.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. FERREIRA, S. S.; NUNES FPB; MARTINS, JOILSON O. PAPEL DA INSULINA NA VIGÊNCIA DO REMODELAMENTO DA ASMA EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS E SADIOS. In: XXIII Semana de VPT, 2015, São Paulo. MV&Z, 2015, v.13, p.95 - 96
2. BELLA, L. M.; FIERLI, I.; TESSARO, F.; NOLASCO, E.; NUNES FPB; FERREIRA, S. S.; MARTINS, J. O. Efeito da suplementação de vitamina D em modelo experimental de Diabetes Mellitus. In: XXX Congresso Brasileiro de Reumatologia - SBR, 2014, Belo Horizonte. Revista Brasileira de Reumatologia, 2014, v.54, p.59 - 60
3. BELLA, L. M.; FIERLI, I.; AZEVEDO, C.; TESSARO, F.; NUNES FPB; FERREIRA, S. S.; MARTINS, J. O. Efeito da suplementação de vitamina D em modelo experimental de diabetes mellitus. In: XXX Congresso Brasileiro de Reumatologia, 2014, Belo Horizonte. Revista Brasileira de Reumatologia, 2014, v.54, p.59 - 60
4. NOLASCO, E.; ZANONI, FERNANDO L.; NUNES, FERNANDA P. B.; FERREIRA, S. S.; MARTINS, JOILSON O. Insulin attenuates CLP-induced liver dysfunction in the diabetic rats. In: 11th World Congress of Inflammation, 2013, Natal. BASEL, SWITZERLAND: SPRINGER BASEL AG., 2013, v.62.
5. NOLASCO, EDUARDO L.; ZANONI, FERNANDO L.; NUNES FPB; SILVA, MARIANA C.F.; FERREIRA, S. S.; COSTA, L.S.A.; MARTINS, J. O. Insulin attenuates CLP-induced liver dysfunction in the diabetic rats. In: 11th World Congress of Inflammation, 2013, Natal. Inflammation Research. SWITZERLAND: BASEL, SWITZERLAND: SPRINGER BASEL, 2013, v.62.

Apresentação de trabalho e palestra

1. NOLASCO, E.; TESSARO, F.; BELLA, L. M.; FERREIRA, S. S.; GRUND, L. Z.; LIMA, C.; MARTINS, J. O. Sepsis-induced systemic inflammatory response syndrome (SIRS) is major in diabetic mice and correlates with neutrophil capacity of endocytosis, 2014. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. FERREIRA, S. S. Papel da Insulina na asma, 2015. (Outra produção técnica)
2. FERREIRA, S. S. Papel da Insulina na asma, 2014. (Outra produção técnica)
3. FERREIRA, S. S. Estratégias para o Ensino de Microbiologia para os Ensino Fundamental e Médio, 2009. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)
4. FERREIRA, S. S. Práticas de Laboratório de Microbiologia, 2009. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
5. FERREIRA, S. S. Práticas de Laboratório de Microbiologia, 2008. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(s) XXII SEMANA FARMACÉUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2017. (Congresso) "INSULIN MODULATES CYTOKINE RELEASE, BRONCHIAL HYPERREACTIVITY AND IMMUNOGLOBULINS IN ALLERGIC DIABETIC MICE".
2. Apresentação de Poster / Painel no(s) XXI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2016. (Congresso) Effect of Insulin on Cytokines Production in Different Tissues During Peritonitis Induced by Staphylococcus Aureus in Diabetic and Health Rats.
3. Apresentação de Poster / Painel no(s) XXI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2016. (Congresso) Insulin Modulates Molecular Aspects of Asthma in Diabetic mice.
4. Apresentação de Poster / Painel no(s) XXI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2016. (Congresso) Insulin Effects on Paracoccidídeos Brazilian- Induced Systemic Mycosis in Healthy and Diabetic Mice.
5. Avaliador no(s) 23º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP, 2015. (Simpósio) Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP.
6. Apresentação de Poster / Painel no(s) FESBE, 2015. (Congresso) Staphylococcus aureus-induced peritonitis in healthy and diabetic rats: role of insulin.
7. Apresentação de Poster / Painel no(s) FESBE, 2015. (Congresso) INSULIN EFFECTS ON PARACOCIDÍDEOS BRAZILIAN-INDUCED SYSTEMIC MYCOSIS IN HEALTHY AND DIABETIC AND HEALTHY MICE.
8. Avaliador no(s) Mostra de Destaque do 23º SIBICUSP, 2015. (Simpósio) Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP.
9. Simpósio em Imunoendocrinologia, 2015. (Simpósio)
10. Apresentação de Poster / Painel no(s) XI Fórum Internacional de Sepes, 2015. (Congresso) Insulin modulates leucocyte recruitment in septic diabetic mice.
11. Apresentação de Poster / Painel no(s) XX Semana Farmacêutica de Ciências e Tecnologia, 2015. (Simpósio) Airway remodeling in diabetic mice.
12. Apresentação de Poster / Painel no(s) XI International Conference on Innate Immunity, 2014. (Congresso) Allergic airway inflammation in diabetic mice: role of insulin.

13. Apresentação de Poster / Painel no(a) XIX SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2014. (Simpósio)
Modulatory effect of insulin on airway remodeling in diabetic rats.
14. XIII Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli, 2014. (Simpósio)
Papel da insulina na regulação do remodelamento da asma em camundongos diabéticos e sedos.
15. V Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas, 2013. (Simpósio)
16. Apresentação de Poster / Painel no(a) World Congress on Inflammation, 2013. (Congresso)
Insulin attenuates cp-induced liver dysfunction in the diabetic rats.
17. IV simpósio de pós graduação em análises clínicas, 2012. (Simpósio)
18. Apresentação de Poster / Painel no(a) XIV Reunião Científica anual do Instituto Butantan, 2012. (Congresso)
Alteration of plasens and uterine fibrinogen during Bothrops jararaca envenomation in pregnant mice.
19. Apresentação de Poster / Painel no(a) XII Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli, 2012. (Congresso)
Alteração do Fibrinogênio plasmático e uterino no envenenamento.
20. Cell cycle mechanisms and cell survival, 2011. (Outra)
21. VI ciclo de seminários sobre interação materno-fetal: pesquisas básicas e clínica, 2011. (Seminário)
22. Apresentação de Poster / Painel no(a) Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2010. (Congresso)
Evaluation of fibrinogen in the uterus of pregnant mice submitted to Bothrops jararaca envenomation.
23. Apresentação de Poster / Painel no(a) XII Reunião Científica do Instituto Butantan - Biotecnologia e Inovação em Saúde Pública, 2010. (Congresso)
Bothrops jararaca envenomation elicits low uterine fibrinogen.
24. Apresentação Oral no(a) XVIII Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli, 2009. (Outra)
Avaliação do fibrinogênio no útero de camundongos pré-nas submetidos ao veneno de Bothrops jararaca.

Organização de evento

1. FERREIRA, S. S.
XII Reunião Científica Anual do Instituto Butantan - Biotecnologia e Inovação em Saúde Pública, 2010. (Congresso, Organização de evento)

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. CASAGRANDE, F. B.; FERREIRA, S. S.; SOUZA, P. R. K.
Participação em banca de Sebastiana Rianá de Carvalho. Erisipela e sua etiologia, 2014 (Farmácia) Universidade Municipal de São Carlos do Sul
2. CASAGRANDE, F. B.; FERREIRA, S. S.; SOUZA, P. R. K.
Participação em banca de Flávia Aranda de Sousa. Leucemia Linfóide Aguda de células B em crianças, 2014 (Farmácia) Universidade Municipal de São Carlos do Sul
3. CASAGRANDE, F. B.; FERREIRA, S. S.; SOUZA, P. R. K.
Participação em banca de Thiago Luiz Custódio. Medicamentos emagrecedores e seus efeitos colaterais, 2014 (Farmácia) Universidade Municipal de São Carlos do Sul

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico	6
Trabalhos publicados em anais de eventos	26
Apresentações de trabalhos (Congresso)	1

Produção técnica

Curso de curta duração ministrado (extensão)	2
Curso de curta duração ministrado (aperfeiçoamento)	1
Outra produção técnica	2

Eventos

Participações em eventos (congresso)	13
Participações em eventos (seminário)	1
Participações em eventos (simpósio)	8
Participações em eventos (outra)	2
Organização de evento (congresso)	1
Participação em banca de trabalhos de conclusão (graduação)	3

17/01/2019

Curriculo Lattes

Página gerada pelo sistema Curriculo Lattes em 17/01/2018 às 16:34:22.

APÊNDICES

Apêndice I

Tabelas A1. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes às Figuras 4 e 5 na Caracterização do modelo de DM de acordo com a variação de glicemia e peso, da seção Resultados.

Variação de Peso (10 dias)			
Não diabéticos			
Número de Animais	Dias – Peso em gramas		Variação
	0 dia	10 dias	
1	24,3	25,8	1,5
2	24,6	25	0,4
3	26,5	27,1	0,6
4	24	25,6	1,6
5	22,8	28	5,2
6	22,2	26,5	4,3
7	20	25,8	5,8
8	21,4	27,3	5,9
9	26	26,9	0,9
12	23,5	26,4	2,8
11	27,3	28	0,7
12	21,9	23	1,1
13	22,4	23,6	1,2
14	21,2	22,9	1,7
15	26,4	27,1	0,7
16	24,3	26,8	2,5
17	23,8	25	1,2
18	25,7	27,4	1,7
Média	23,79	26,09	2,21
DP	2,05	1,58	1,83
EPM	0,48	0,37	0,43

Variação de Peso (10 dias)			
Diabéticos			
Número de Animais	Dias – Peso em gramas		Variação
	0 dia	10 dias	
1	28	26,9	-1,1
2	23	17,1	-5,9
3	23,6	19,3	-4,3
4	22,9	20,5	-2,4
5	27,1	16,1	-11
6	22,5	14,9	-7,6
7	25	16,4	-8,6
8	27,4	18,1	-9,3
9	24,5	15,4	-9,1
12	26	22	-4
11	24,1	20,8	-3,3
12	27,3	20,3	-7
13	26,8	17,6	-9,2
14	25	16,6	-8,4
15	28,1	20,7	-7,4
16	27,6	22,5	-5,1
17	27,5	20	-7,5
18	23	21,4	-1,6
Média	25,522	19,22	-6,26
DP	2,00	3,03	2,93
EPM	0,47	0,71	0,69

Número de Animais	Dias – Glicemia (mg/dL)	
	0 dia	10 dias
1	120	186
2	134	144
3	117	187
4	126	147
5	139	129
6	151	152
7	142	150
8	143	186
9	126	149
12	135	123
11	129	135
12	138	147
13	121	126
14	143	148
15	129	162
16	133	173
17	119	174
18	112	169
Média	130,93	154,83
DP	10,65	20,55
EPM	4,75	9,17

Número de Animais	Dias – Glicemia (mg/dL)	
	0 dia	10 dias
1	156	329
2	121	533
3	132	568
4	124	491
5	130	548
6	126	600
7	137	600
8	148	600
9	142	600
12	138	399
11	120	466
12	119	479
13	125	539
14	134	600
15	129	540
16	133	560
17	149	528
18	151	600
Média	134,11	532,23
DP	11,28	75,90
EPM	5,03	33,88

Variação de Peso (g) (36 dias)			
OVA+SAL			
N. de animais	Dias		Variação
	10	36	
1	25,8	27,9	2,1
2	25	26	1
3	27,1	29	1,9
4	25,6	26,1	0,5
5	28	29	1
6	26,5	28,2	1,7
Média	26,33	27,7	1,36
DESPA	1,09	1,35	0,62
EPM	0,45	0,56	0,26

Variação de Peso (g) (36 dias)			
ALO+SAL			
N. de animais	Dias		Variação
	10	36	
1	26,9	14,3	-12,6
2	17,1	15	-2,1
3	19,3	17,5	-1,8
4	20,5	17,3	-3,2
5	16,1	15	-1,1
6	14,9	12,3	-2,6
Média	19,13	15,2	-3,9
DESPA	4,32	1,94	4,32
EPM	1,80	0,81	1,80

Variação de Peso (g) (36 dias)			
OVA+OVA			
N. de animais	Dias		Variação
	10	36	
1	25,8	27,3	1,5
2	27,3	28	0,7
3	26,9	29,7	2,8
4	26,4	28,3	1,9
5	28	29,3	1,3
6	23	24,5	1,5
Média	26,23	27,8	1,62
DESPA	1,75	1,86	0,70
EPM	0,73	0,77	0,29

Variação de Peso (g) (36 dias)			
ALO+OVA			
N. de animais	Dias		Variação
	10	36	
1	16,4	16,1	-0,3
2	18,1	14,2	-3,9
3	15,4	14,9	-0,5
4	22	19,2	-2,8
5	20,8	18,3	-2,5
6	20,3	17,4	-2,9
Média	18,83	16,6	-2,15
DESPA	2,61	1,95	1,43
EPM	1,09	0,81	0,59

Variação de Peso (g) (36 dias)			
OVA+OVA+INS			
N. de animais	Dias		Variação
	10	36	
1	23,6	25,8	2,2
2	22,9	27,3	4,4
3	27,1	28,4	1,3
4	26,8	27,3	0,5
5	25	26,2	1,2
6	27,4	27,5	0,1
Média	25,4	27,0	1,61
DESPA	1,92	0,94	1,54
EPM	0,80	0,39	0,64

Variação de Peso (g) (36 dias)			
ALO+OVA+INS			
N. de animais	Dias		Variação
	10	36	
1	17,6	20,1	2,5
2	16,6	19,3	2,7
3	20,7	22,4	1,7
4	22,5	23,1	0,6
5	20	26,7	6,7
6	21,4	25,6	4,2
Média	19,8	22,8	3,06
DESPA	2,27	2,92	2,13
EPM	0,94	1,21	0,89

Glicemia (mg/dL)		
OVA+SAL		
N. de animais	Dias	
	10	36
1	186	114
2	144	108
3	187	140
4	147	121
5	129	130
6	152	143
Média	157,5	125,9
DESPA	23,74	14,12
EPM	9,89	5,88

Glicemia (mg/dL)		
OVA+OVA		
N. de animais	Dias	
	10	36
1	150	127
2	186	131
3	149	133
4	123	130
5	135	143
6	147	132
Média	148,3	132,7
DESPA	21,18	5,4
EPM	8,83	2,26

Glicemia (mg/dL)		
OVA+OVA+INS		
N. de animais	Dias	
	10	36
1	126	115
2	148	121
3	162	126
4	173	121
5	174	167
6	169	154
Média	158,7	133,9
DESPA	18,65	21,26
EPM	7,77	8,86

Glicemia (mg/dL)		
ALO+SAL		
N. de animais	Dias	
	10	36
1	329	600
2	533	600
3	568	600
4	491	600
5	548	560
6	600	600
Média	511,5	593,3
DESPA	96,48	16,32
EPM	40,20	6,80

Glicemia (mg/dL)		
ALO+OVA		
N. de animais	Dias	
	10	36
1	600	560
2	600	540
3	600	479
4	399	562
5	466	520
6	479	600
Média	524	543,6
DESPA	87,57	41,34
EPM	36,49	17,22

Glicemia (mg/dL)		
ALO+OVA+INS		
N. de animais	Dias	
	10	36
1	539	560
2	600	540
3	540	479
4	560	526
5	528	600
6	600	600
Média	561,2	550,9
DESPA	31,74	46,47
EPM	13,23	19,36

Apêndice II

Tabelas A2. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referente à Figura 6 do modelo de inflamação alérgica pulmonar, da seção Resultados.

OVA+SAL		
N. de animais	Mononuclear (x10 ⁵)	Eosonófilos (x10 ⁵)
1	7	0
2	6	0
3	11	0
4	8	0
5	10	0
6	7	0
Média	8,17	0
DESPAD	1,94	0
EPM	0,87	0

ALO+SAL		
N. de animais	Mononuclear (x10 ⁵)	Eosonófilos (x10 ⁵)
1	2,5	0
2	3,4	0
3	3	0
4	2,97	0
5	2,1	0
6	1,7	0
Média	2,61	0
DESPAD	0,63	0
EPM	0,28	0

OVA+OVA		
N. de animais	Mononuclear (x10 ⁵)	Eosonófilos (x10 ⁵)
1	35	4,2
2	29	5,4
3	23	4,2
4	24,6	4,6
5	27	5,1
6	26	3,1
Média	27,43	4,43
DESPAD	4,23	0,81
EPM	1,89	0,33

ALO+OVA		
N. de animais	Mononuclear (x10 ⁵)	Eosonófilos (x10 ⁵)
1	2,1	0
2	1,8	0
3	2,3	0
4	2,1	0
5	2,7	0
6	3,1	0
Média	2,34	0
DESPAD	0,48	0
EPM	0,21	0

OVA+OVA+INS		
N. de animais	Mononuclear (x10 ⁵)	Eosonófilos (x10 ⁵)
1	27	7,4
2	18	4,5
3	20	8,2
4	21,7	3,2
5	20,1	8,7
6	22	6,3
Média	21,46	6,38
DESPAD	3,07	2,16
EPM	1,37	0,89

ALO+OVA+INS		
N. de animais	Mononuclear (x10 ⁵)	Eosonófilos (x10 ⁵)
1	30	3,9
2	25	3,1
3	38	3,4
4	31	3,5
5	37,2	3,9
6	26,7	4,6
Média	31,32	3,73
DESPAD	5,34	0,53
EPM	2,38	0,30

Apêndice III

Tabelas A3. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à Figura 7 hiper-responsividade por BUXCO, valores de Penh e AUC. Resultados

OVA+SAL			
Penh – 2° Desafio			
N. de animais	0 PBS	12 mg/mL	25 mg/mL
1	0,572	1,464	2,875
2	0,534	1,765	2,822
3	0,517	0,886	1,802
4	0,537	1,041	1,902
5	0,681	1,296	1,902
6	0,568	1,2904	2,2606

ALO+SAL			
Penh – 2° Desafio			
N. de animais	0 PBS	12 mg/mL	25 mg/mL
1	0,453	0,664	0,875
2	0,469	0,614	0,759
3	0,471	0,804	2,959
4	0,453	0,664	0,875
5	0,469	0,614	0,759
6	0,463	0,672	1,246

OVA+OVA			
Penh – 2° Desafio			
N. de animais	0 PBS	12 mg/mL	25 mg/mL
1	0,5029	1,622	4,000
2	0,658	1,686	3,000
3	0,607	1,211	6,750
4	0,4766	1,254	6,472
5	0,6531	1,334	5,650
6	0,5795	1,4213	5,174

ALO+OVA			
Penh – 2° Desafio			
N. de animais	0 PBS	12 mg/mL	25 mg/mL
1	0,518	0,587	1,067
2	0,403	0,886	2,027
3	0,469	1,411	2,957
4	0,516	0,803	1,930
5	0,664	1,432	2,941
6	0,514	1,024	2,184

OVA+OVA+INS			
Penh – 2° Desafio			
N. de animais	0 PBS	12 mg/mL	25 mg/mL
1	0,453	1,938	10,890
2	0,605	2,498	3,162
3	0,695	1,142	6,000
4	0,421	1,182	3,588
5	0,862	4,285	6,784
6	0,607	2,209	6,085

ALO+OVA+INS			
Penh – 2° Desafio			
N. de animais	0 PBS	12 mg/mL	25 mg/mL
1	0,382	1,043	2,129
2	0,515	1,213	2,533
3	0,680	1,113	2,096
4	0,496	1,464	2,290
5	0,548	1,225	2,718
6	0,524	1,212	2,353

OVA+SAL			
Penh – 4° Desafio			
N. de animais	0 PBS	12 mg/mL	25 mg/mL
1	0,782	1,385	1,891
2	0,602	1,087	2,301
3	0,620	0,933	2,224
4	0,599	1,190	2,613
5	1,118	1,247	1,326
6	0,744	1,168	2,071

ALO+SAL			
Penh – 4° Desafio			
N. de animais	0 PBS	12 mg/mL	25 mg/mL
1	0,670	1,027	1,669
2	1,508	0,754	1,915
3	0,476	0,670	1,843
4	0,652	1,092	1,988
5	0,504	1,104	1,713
6	0,407	1,073	1,679

OVA+OVA			
Penh – 4° Desafio			
N. de animais	0 PBS	12 mg/mL	25 mg/mL
1	0,490	1,207	2,229
2	0,507	1,653	3,623
3	0,889	1,287	2,323
4	0,567	1,996	6,304
5	0,522	2,024	4,159
6	0,595	1,633	3,728

ALO+OVA			
Penh – 4° Desafio			
N. de animais	0 PBS	12 mg/mL	25 mg/mL
1	0,434	1,091	1,263
2	0,541	0,716	3,297
3	0,627	1,283	1,617
4	0,500	0,950	1,225
5	0,569	0,996	2,555
6	0,537	0,907	1,730

OVA+OVA+INS			
Penh – 4° Desafio			
N. de animais	0 PBS	12 mg/mL	25 mg/mL
1	0,630	0,861	3,261
2	0,551	1,644	3,506
3	0,755	1,281	2,493
4	0,520	1,090	3,983
5	0,860	1,736	2,356
6	0,663	1,322	3,120

ALO+OVA+INS			
Penh – 4° Desafio			
N. de animais	0 PBS	12 mg/mL	25 mg/mL
1	0,519	1,182	2,779
2	0,509	0,911	2,411
3	0,507	0,753	1,920
4	0,743	0,952	5,190
5	0,460	0,952	1,907
6	0,406	0,798	1,187

OVA+SAL			
Penh – 6° Desafio			
N. de animais	0 PBS	12 mg/mL	25 mg/mL
1	0,512	1,693	2,485
2	0,557	1,771	2,268
3	0,532	0,897	1,987
4	0,477	0,702	1,645
5	0,484	0,864	1,800
6	0,512	1,185	2,037

ALO+SAL			
Penh – 6° Desafio			
N. de animais	0 PBS	12 mg/mL	25 mg/mL
1	1,137	1,062	1,366
2	0,439	0,585	0,920
3	0,498	0,612	1,136
4	0,503	0,677	1,398
5	0,487	0,787	1,548
6	0,613	0,745	1,274

OVA+OVA			
Penh – 6° Desafio			
N. de animais	0 PBS	12 mg/mL	25 mg/mL
1	0,456	2,382	4,896
2	0,487	3,025	2,895
3	0,501	1,100	3,289
4	0,594	2,100	3,891
5	0,567	2,792	4,798
6	0,521	2,280	3,954

ALO+OVA			
Penh – 6° Desafio			
N. de animais	0 PBS	12 mg/mL	25 mg/mL
1	0,415	0,819	1,034
2	0,456	0,646	1,606
3	0,439	0,594	1,242
4	0,444	0,950	0,913
5	0,537	0,553	0,504
6	0,458	0,7123	1,060

OVA+OVA+INS			
Penh – 6° Desafio			
N. de animais	0 PBS	12 mg/mL	25 mg/mL
1	0,531	1,367	6,061
2	0,660	2,290	2,465
3	0,529	1,091	3,170
4	0,544	1,060	4,004
5	0,574	1,670	5,787
6	0,568	1,496	4,297

ALO+OVA+INS			
Penh – 6° Desafio			
N. de animais	0 PBS	12 mg/mL	25 mg/mL
1	0,408	0,779	1,181
2	0,525	0,760	2,244
3	0,483	0,717	1,344
4	0,439	0,823	2,122
5	0,531	1,367	6,061
6	0,4772	0,8892	4,590

OVA+SAL AUC (área sob a curva)			
N. de animais	2°Desafio	4°Desafio	6°Desafio
1	28,60	35,45	22,33
2	32,65	32,16	25,40
3	40,42	29,84	27,32
4	36,32	32,48	25,02
5	25,89	33,58	23,91
6	29,05	32,96	21,62
Média	32,15	32,75	24,27
DESPAD	5,43	1,84	2,10

OVA+OVA AUC (área sob a curva)			
N. de animais	2°Desafio	4°Desafio	6°Desafio
1	60,60	69,33	55,10
2	41,88	47,25	64,34
3	40,76	36,52	59,55
4	40,16	46,67	38,13
5	65,01	54,55	54,28
6	43,61	52,25	57,50
Média	48,67	51,09	54,82
DESPAD	11,10	10,89	8,93

OVA+OVA+INS AUC (área sob a curva)			
N. de animais	2°Desafio	4°Desafio	6°Desafio
1	40,62	42,63	42,54
2	97,73	55,47	59,67
3	55,41	42,18	48,61
4	41,12	46,65	37,42
5	65,44	46,73	47,06
6	46,95	59,78	50,74
Média	57,88	48,91	47,67
DESPAD	21,68	7,15	7,56
			3,39

ALO+SAL AUC (área sob a curva)			
N. de animais	2°Desafio	4°Desafio	6°Desafio
1	16,70	23,21	18,03
2	15,43	27,71	20,57
3	32,11	30,92	15,93
4	31,73	27,28	20,60
5	27,07	28,09	18,78
6	23,38	26,47	18,01
Média	24,40	27,28	18,65
DESPAD	7,23	2,50	1,77
			0,79

ALO+OVA AUC (área sob a curva)			
N. de animais	2°Desafio	4°Desafio	6°Desafio
1	25,68	22,84	20,47
2	17,38	32,47	13,40
3	35,97	24,45	19,45
4	26,67	26,59	18,13
5	26,43	26,87	17,86
6	21,11	28,54	18,56
Média	25,54	26,96	17,98
DESPAD	6,28	3,36	2,44
EPM	2,82	1,50	1,09

ALO+OVA+INS AUC (área sob a curva)			
N. de animais	2°Desafio	4°Desafio	6°Desafio
1	36,16	27,05	26,72
2	36,26	30,11	29,73
3	31,62	28,90	27,24
4	34,72	60,45	40,00
5	34,69	28,74	40,00
6	33,34	59,78	61,19
Média	34,46	39,17	37,48
DESPAD	1,77	16,25	13,08
EPM	0,79	7,29	5,87

Apêndice IV

Tabelas A3. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à Figura 8. Tratamento de insulina, da seção Resultados.

OVA+SAL	
INSULINA	
N. de animais	ng/mL
1	0,92
2	0,40
3	3,18
4	4,17
5	1,48
6	1,58
Média	1,95
DESPAD	1,43
EPM	0,59

OVA+OVA	
INSULINA	
N. de animais	ng/mL
1	1,27
2	3,52
3	1,05
4	1,24
5	2,88
6	1,45
Média	1,90
DESPAD	1,03
EPM	0,42

OVA+OVA+INS	
INSULINA	
N. de animais	ng/mL
1	10,96
2	9,16
3	3,52
4	8,51
5	8,74
6	7,89
Média	8,13
DESPAD	2,48
EPM	1,02

ALO+SAL	
INSULINA	
N. de animais	ng/mL
1	1,08
2	0,51
3	0,70
4	1,32
5	0,75
6	0,52
Média	0,81
DESPAD	0,32
EPM	0,13

ALO+OVA	
INSULINA	
N. de animais	ng/mL
1	0,76
2	0,63
3	0,11
4	0,51
5	0,41
6	0,31
Média	0,45
DESPAD	0,23
EPM	0,095

ALO+OVA+INS	
INSULINA	
N. de animais	ng/mL
1	3,69
2	3,00
3	2,44
4	9,67
5	4,60
6	5,70
Média	4,85
DESPAD	2,62
EPM	1,07

Apêndice VI

Tabelas A5. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à Figura 10. Análise de citocinas, da seção Resultados

TNF-a						
	ova+sal	ova+ova	ova+ova+i	alo+sal	alo+ova	alo+ova+i
	107,37	144,57	181,44	124,08	101,08	463,00
	99,37	186,67	290,19	58,70	123,01	235,57
	103,37	283,95	468,28	91,39	105,73	200,72
	113,67	205,06	216,73	139,09	66,19	240,03
	105,95	225,23	313,30	63,41	169,65	594,08
	104,79	213,82	375,41	79,42	164,71	349,71
MÉDIA	105,75	209,88	307,56	92,68	121,73	347,18
DESPAD	4,75	45,97	104,81	32,65	39,78	154,77
EPM	1,95	18,84	42,95	13,38	16,30	63,43

IFN-y						
	ova+sal	ova+ova	ova+ova+i	alo+sal	alo+ova	alo+ova+i
	162,83	191,12	154,64	220,50	238,75	191,94
	184,97	173,42	176,29	239,38	229,00	155,10
	173,90	182,27	165,46	234,73	292,99	199,47
	178,09	193,15	165,46	231,54	240,49	182,17
	177,10	181,29	179,72	236,01	232,43	164,94
	169,20	175,21	167,23	237,46	237,90	173,27
MÉDIA	174,35	182,75	168,13	233,27	245,26	177,82
DESPAD	7,66	8,05	8,92	6,79	23,78	16,67
EPM	3,14	3,30	3,66	2,78	9,74	6,83

IL-5						
	ova+sal	ova+ova	ova+ova+i	alo+sal	alo+ova	alo+ova+i
	185,07	228,81	239,10	90,63	77,12	256,45
	153,97	305,53	370,38	81,57	152,38	304,87
	166,24	219,65	191,71	88,65	169,87	321,62
	187,53	271,82	106,20	106,20	138,55	263,75
	158,38	238,12	230,50	128,51	156,58	317,29
	173,45	304,74	249,74	107,89	146,73	330,68
MÉDIA	170,77	261,45	231,27	100,58	140,21	299,11
DESPAD	13,77	38,16	85,98	17,13	32,62	31,42
EPM	7,25	20,08	45,25	9,02	17,17	16,54

IL-4						
	109	212	352	98	130	389
	112	239	298	100	121	328
	128	290	343	89	112	354
	107	170	300	94	100	394
	110	244	329	101	114	323
	100	196	324	98	151	356
MÉDIA	111	225,1667	324,3333	96,66667	121,3333	357,3333
DESPAD	9,29516	41,99246	22,00606	4,457204	17,61439	29,66255
EPM	3,809492	17,21002	9,018877	1,826723	7,219011	12,15678

IL-13						
	ova+sal	ova+ova	ova+ova+i	alo+sal	alo+ova	alo+ova+i
	151,20	476,60	462,61	99,86	68,92	464,83
	104,87	487,93	484,84	105,90	80,84	456,22
	78,40	463,87	459,71	92,80	134,50	445,97
	59,79	466,64	451,75	103,04	176,55	456,22
	126,39	473,31	517,72	147,84	127,20	474,27
	90,78	467,89	480,74	151,07	120,12	490,74
MÉDIA	101,90	472,70	476,23	116,75	118,02	464,71
DESPAD	33,13	8,78	23,97	25,73	38,93	15,90
EPM	13,58	3,60	9,82	10,54	15,96	6,52

VEGF						
	ova+sal	ova+ova	ova+ova+i	alo+sal	alo+ova	alo+ova+i
1	119,1976	173,3281	214,6324	135,0672	97,02372	241,8063
2	95,71937	190,2846	173,5455	114,6324	113,1107	226,3715
3	115,502	193,9802	177,0237	129,415	103,9802	261,8063
4	112,8933	202,6759	169,6324	93,76285	122,2411	218,9802
5	97,4585	210,2846	276,5889	121,3715	104,415	190,9368
6	115,7194	244,1976	456,3715	110,2846	110,9368	219,6324
MÉDIA	108,15	194,11	202,28	118,85	108,15	227,98
DESPAD	10,81	13,98	45,29	16,03	9,72	26,42
EPM	4,85	6,27	20,31	7,19	4,36	11,85

IL-10						
	ova+sal	ova+ova	ova+ova+i	alo+sal	alo+ova	alo+ova+i
1	186,1222	208,6222	207,8722	215,8722	159,8722	182,1222
2	177,8722	203,1222	187,6222	83,1222	152,3722	234,3722
3	154,6222	195,1222	199,6222	176,8722	167,6222	239,3722
4	260,3722	195,3722	169,1222	127,6222	148,8722	223,8722
5	242,3722	191,6222	202,8722	146,6222	175,6222	182,6222
6						
MÉDIA	204,27	198,77	193,42	150,02	160,87	212,47
DESPAD	44,97	6,93	15,50	50,12	10,96	28,04
EPM	20,17	3,11	6,95	22,47	4,91	12,57

TGF						
	ova+sal	ova+ova	ova+ova+i	alo+sal	alo+ova	alo+ova+i
1	82,56445	149,724	157,425822	64,38824	63,92613	126,18738
2	83,48867	147,2595	148,49175	64,51147	64,08017	125,4172
3	86,87746	143,655	148,799821	64,11097	64,17259	125,63285
4	84,41288	150,0321	147,875607	64,41904	63,92613	125,75608
5	87,4936	125,9717	148,799821	64,29582	64,08017	126,09495
6	77,91258	148,7998	149,724036	63,95694	63,95694	125,78688
MEDIA	83,79	144,24	150,19	64,28	64,02	125,81
DESPAD	3,46	9,25	3,60	0,21	0,10	0,29
EPM	1,55	4,15	1,61	0,09	0,05	0,13

Apêndice VIII

Tabelas A7. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à citometria

BAÇO													
População de CD4						População TCR							
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS		OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS
	22,5	51,5	49,0	24,8	26,6	41,9		0,23	1,08	1,74	0,00	0,00	0,33
	21,1	32,8	30,5	22,5	29,9	41,8		0,14	0,33	0,26	0,00	0,00	0,14
	22,1	33,7	39,8	25,9	15,1	57,6		0,36	6,6	0,14	0,012	0,06	0,2
	26,2	28,7	27,7	11,6	4,1	36,6		0,40	0,36	0,2	0,018	0,022	0,6
Média	23,0	36,7	36,8	21,2	18,9	44,5	Média	0,28	2,09	0,59	0,01	0,02	0,32
DESPAD	2,23	10,12	9,67	6,55	11,77	9,09	DESPAD	0,12	3,03	0,77	0,01	0,03	0,20
EPM	1,11	5,06	4,83	3,28	5,88	4,55	EPM	0,06	1,51	0,39	0,00	0,01	0,10
População CD8						População CD19							
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS		OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS
	7,2	36,6	41,8	17,2	15,4	41,9		6,7	52,3	56,4	1,1	1,3	39,9
	6,2	22,5	26,6	10,6	9,9	29,9		2,3	44,3	36,1	1,7	5,0	50,2
	8,6	24,1	26,7	6,3	8,5	13,8		1,0	6,7	11,4	0,2	0,1	15,8
	8,5	27,3	15,3	6,1	9,5	13,6		1,4	58,7	21,2	0,2	0,4	5,8
Média	7,6	27,6	27,6	10,1	10,8	24,8	Média	2,8	40,5	31,3	0,8	1,7	27,9
DESPAD	1,2	6,3	10,9	5,2	3,1	13,7	DESPAD	2,6	23,3	19,6	0,7	2,3	20,7
EPM	0,58	3,15	5,44	2,60	1,56	6,86	EPM	1,3	11,7	9,8	0,4	1,1	10,3
População NK1.1						População CD22							
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS		OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS
	0,2	1,3	1,9	0,2	0,6	1,8		28,4	46,7	48,0	13,6	29	44,0
	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,46		21,0	47,2	49,2	18,9	23,0	45,1
	0,14	0,48	3,4	0,08	0,2	1,54		28,5	43,1	37,5	3,76	3,86	50,1
	0,15	3,63	0,5	0,3	0,02	1,3		24,6	40,1	49,2	7,11	2,77	45,5
Média	0,2	1,4	1,5	0,1	0,2	1,3	Média	25,6	44,3	46,0	10,8	14,7	46,2
DESPAD	0,0	1,6	1,5	0,1	0,3	0,6	DESPAD	3,6	3,3	5,7	6,7	13,3	2,7
EPM	0,0	0,8	0,7	0,1	0,1	0,3	EPM	1,8	1,7	2,8	3,4	6,7	1,3
Baço - População CD11b						Baço - População SIGLEC							
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS		OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS
	4,54	12,1	15,4	0,061	0,195	4,332		1,11	14,5	17,9	0,8	0,3	14,5
	5,97	4,95	4,28	0,262	0,049	6,262		2,09	15,1	16,5	0,6	0,46	9,97
	5,3	9,3	15,6	0,43	1,2	10,45		1,6	14,8	17,3	0,07	0,7	10,4
	4,6	10,2	14,5	1,2	0,9	7,5		2,8	16,9	19	0,6	0,5	9,4
Média	5,1	8,5	9,8	0,2	0,1	5,3	Média	1,9	15,3	17,7	0,5	0,5	11,1
DESPAD	1,0	5,1	7,9	0,1	0,1	1,4	DESPAD	0,7	0,4	1,0	0,1	0,1	3,2
EPM	0,7	3,6	5,6	0,1	0,1	1,0	EPM	0,5	0,3	0,7	0,1	0,1	2,3
População GR1													
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS		OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS
	0,38	1,06	0,7	0,05	0,03	1,62							
	0,67	0,7	0,5	0,02	0,1	0,2							
Média	0,5	0,9	0,6	0,0	0,1	0,9							
DESPAD	0,2	0,3	0,1	0,0	0,0	1,0							
EPM	0,1	0,2	0,1	0,0	0,0	0,7							

TIMO													
População de CD4						População de TCR							
OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS		
22,2	32,4	35,7	3,48	0,557	27	0,33	3,33	1,56	0,36	0,36	3,72		
25,7	40,5	49,9	2,57	2,7	30,6	0,168	1,56	2,80	0,05	0,0763	3,33		
10	34,8	21,2	1,41	1,21	17,8	0,138	2,49	2,4	0,0414	0,0818	1,13		
5,04	29,5	22,2	2,7	1,39	20,7	0,148	1,16	1,71	0,0369	0,09	2,4		
Média	15,74	34,30	32,25	2,54	1,46	24,03	Média	0,20	2,14	2,12	0,12	0,15	2,65
DESPAD	9,80	4,67	13,50	0,85	0,90	5,83	DESPAD	0,09	0,97	0,58	0,16	0,14	1,15
EPM	4,90	2,33	6,75	0,43	0,45	2,91	EPM	0,05	0,49	0,29	0,08	0,07	0,58
População de CD8						População de CD19							
OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS		
17,3	31,4	12,5	0,288	0,767	25,3	0,0747	1,83	22,50	0,71	0,34	99,90		
12,6	15,5	26,1	9,21	9,89	22,9	0,03	2,02	1,72	0,02	0,00	98,70		
2,39	37,4	18,7	1,54	1,69	12,3	0,04	6,1	2,8	0,12	0,125	6,5		
2,13	13,1	25,1	1,32	1,73	12,7	0,718	7,8	1,5	0,0298	0,269	1,25		
Média	8,6	24,4	20,6	3,1	3,5	18,3	Média	0,21	4,44	7,13	0,22	0,18	51,59
DESPAD	7,6	11,9	6,3	4,1	4,3	6,8	DESPAD	0,34	2,98	10,26	0,33	0,15	55,14
EPM	1,89	2,98	1,58	1,03	1,07	1,69	EPM	0,17	1,49	5,13	0,16	0,08	27,57
População de NK						População de CD22							
OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS		
0,09	0,15	0,02	0,00	0,00	0,33	2,1	7,7	7,7	1,3	2,1	9,9		
0,11	0,34	0,27	0,03	0,11	0,50	1,0	5,0	0,9	0,3	0,5	8,6		
0,59	1,77	1,7	0,108	0,178	1,6	0,144	1,78	1,28	0,127	0,268	2,53		
0,257	1,06	1	0,15	0,14	0,812	0,157	1,03	6,1	0,0298	0,803	9,2		
Média	0,26	0,83	0,75	0,07	0,11	0,81	Média	0,9	3,9	4,0	0,5	0,9	7,6
DESPAD	0,23	0,74	0,76	0,07	0,08	0,56	DESPAD	0,9	3,1	3,4	0,6	0,8	3,4
EPM	0,11	0,37	0,38	0,03	0,04	0,28	EPM	0,5	1,5	1,7	0,3	0,4	1,7
Timo - População CD11b						Timo - População SIGLEC							
OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS		
0,0732	5,6	3,2	0,0315	0,0405	3,56	1,23	10,20	10,80	0,06	0,89	2,57		
0,0123	5,642	4,56	0,0123	0,0302	4,56	1,38	7,13	5,91	0,68	0,04	3,15		
0,01	4,2	6,4	0,022	0,045	6,46	1,7	9,56	12	0,95	0,9	5,6		
0,03	3,4	5,9	0,45	0,056	4,6	1,5	8,67	13,4	0,05	0,7	4,6		
Média	0,031	4,711	5,015	0,129	0,043	4,795	Média	1,3	8,7	8,4	0,4	0,5	2,9
DESPAD	0,043	0,030	0,962	0,014	0,007	0,707	DESPAD	0,1	2,2	3,5	0,4	0,6	0,4
EPM	0,03	0,02	0,68	0,01	0,01	0,50	EPM	0,1	1,5	2,5	0,3	0,4	0,3
População GR1													
OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS								
0,166	0,245	0,0485	1,23	0,711	0,104								
0,006	0,0155	0,006	0,0782	0,11	0,0188								
Média	0,086	0,13025	0,02725	0,6541	0,4105	0,0614							
DESPAD	0,11	0,16	0,03	0,81	0,42	0,06							
EPM	0,08	0,12	0,02	0,58	0,30	0,04							

PULMÃO													
População de CD4							População de TCR						
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS		OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS
	31,4	39,4	42,2	14,4	19	25,4		0,76	17,80	10,30	0,00	0,14	2,27
	29,1	40,9	42,5	18,4	18,4	38,8		1,22	4,93	2,62	0,02	0,22	1,83
	20,7	41,7	35,4	15,8	11,2	35		0,419	3,6	2,18	0,23	0,186	1,68
	24,5	30,5	39,1	19,4	16,4	40,4		0,319	2,73	1,45	0,328	0,087	1,3
Média	26,4	38,1	39,8	17,0	16,3	34,9		0,68	7,27	4,14	0,15	0,16	1,77
DESPAD	4,8	5,2	3,3	2,3	3,5	6,7		0,41	7,08	4,14	0,16	0,06	0,40
EPM	2,39	2,59	1,66	1,15	1,77	3,36		0,20	3,54	2,07	0,08	0,03	0,20
População de CD8							População de CD19						
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS		OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS
	2,29	15,6	16,3	4,6	6,8	14,1		1,12	29,7	33,7	0,96	0,406	26,3
	1,34	14,7	12,1	7,7	9,6	12,6		2,03	20,6	20,3	0,424	0,2	20
	4,3	10,9	13,1	1,3	2,3	12,8		2,99	17,8	22,7	0,226	0,42	17
	3,4	11,2	7,4	1,0	1,7	11,6		2,88	15,8	27	0,386	0,45	14,7
Média	2,8	13,1	12,2	3,6	5,1	12,8		2,3	21,0	25,9	0,5	0,4	19,5
DESPAD	1,3	2,4	3,7	3,1	3,8	1,0		0,87	6,14	5,88	0,32	0,11	5,03
EPM	0,64	1,21	1,83	1,57	1,89	0,51		0,43	3,07	2,94	0,16	0,06	2,51
População de NK1.1							População de CD22						
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS		OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS
	0,957	1,87	0,957	0,045	0,0328	3,49		6,51	33,3	37,7	0,575	1,55	30,2
	1	1,59	1,33	0,028	0,0435	3,48		7,29	26,1	24,8	0,319	0,121	23,1
	0,317	1,83	3,51	0,14	0,204	3,51		2,5	28,9	21	0,267	0,75	17,8
	0,371	1	1,08	0,21	0,266	2,75		7,4	23	23	0,272	0,19	10,6
Média	0,66	1,57	1,72	0,11	0,14	3,31		5,9	27,8	26,6	0,4	0,7	20,4
DESPAD	0,37	0,40	1,20	0,09	0,12	0,37		2,3	4,4	7,5	0,1	0,7	8,3
EPM	0,18	0,20	0,60	0,04	0,06	0,19		1,16	2,19	3,77	0,07	0,33	4,14
Pulmão - População CD11b							Pulmão - População SIGLEC						
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS		OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS
	1,93	8,16	6,49	1,65	1,47	3,07		1,93	16	9,54	0,389	0,505	6,49
	2,55	4,77	16	1,93	1,55	4,94		1,47	7,8	7,37	0,57	0,354	3,16
	2	6	10	1,6	1,5	5,2		2,55	9,3	7,8	0,9	0,47	8,4
	2,3	6,3	12	1,7	1,3	3,9		2,7	9,5	8	0,4	0,6	5,7
Média	2,2	6,5	11,2	1,8	1,5	4,0		2,2	10,7	8,2	0,6	0,5	5,9
DESPAD	0,44	2,40	6,72	0,20	0,06	1,32		0,5	3,6	1,1	0,3	0,1	2,7
EPM	0,311	1,700	4,769	0,140	0,040	0,938		0,3	2,1	0,7	0,1	0,0	1,5
População GR1													
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS							
	0,0864	1,12	1,42	0,0694	0,0365	3,49							
	0,0953	1,08	1,7	0,0784	0,146	3,73							
	0,09085	1,1	1,56	0,0739	0,09125	2,11							
	0,08478	1,5	1,8	0,0738	0,1344	3,75							
Média	0,091	1,100	1,560	0,074	0,091	3,610							
DESPAD	0,006	0,028	0,198	0,006	0,077	0,170							
EPM	0,004	0,020	0,140	0,005	0,055	0,120							

MO						MO							
População de CD4						População de NK11							
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS		OVA+SAL	OVA+OVA	A+OVA+I	ALO+SAL	ALO+OVA	O+OVA+INS
	1,37	17,60	15,10	0,39	0,86	4,84		0,66	5,47	5,92	0,00	0,08	25,60
	1,25	10,20	8,67	1,00	0,31	5,54		0,10	2,55	2,28	0,00	0,02	0,45
	1,11	6,89	7,92	0,54	1,25	5,70		0,94	1,37	1,68	0,00	0,28	0,98
	1,39	6,12	5,60	0,37	1,39	3,16		0,96	1,61	2,24	0,04	0,27	5,78
	1,59	5,54	5,03	0,47	1,59	2,07		0,00	3,28	1,44	0,00	0,32	2,45
	2,04	6,33	4,84	0,23	1,11	2,84		0,00	0,33	0,75	0,00	0,46	1,87
Média	1,46	8,78	7,86	0,50	1,09	4,03	Média	0,44	2,44	2,39	0,01	0,24	6,19
DESPAD	0,33	4,63	3,88	0,27	0,45	1,53	DESPAD	0,46	1,80	1,82	0,02	0,16	9,69
EPM	0,14	3,30	2,77	0,19	0,32	1,09	EPM	0,19	0,74	0,75	0,01	0,06	3,97
MO						MO							
População de CD8						População de TCR							
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS		OVA+SAL	OVA+OVA	A+OVA+I	ALO+SAL	ALO+OVA	O+OVA+INS
	1,77	15,70	10,90	0,66	1,51	3,40		1,03	11,40	4,92	0,65	0,54	9,96
	1,98	14,50	10,20	0,93	1,12	3,24		0,55	3,65	3,01	0,78	0,12	2,64
	1,63	8,74	10,70	0,71	1,32	3,40		1,85	4,13	3,35	0,72	0,43	6,30
	2,22	3,45	9,00	0,96	1,21	4,43		1,55	3,71	3,52	0,47	0,24	1,25
	1,10	3,11	1,99	0,37	1,17	3,26		1,35	2,58	11,50	0,68	0,85	3,78
	1,20	2,51	3,45	1,14	1,91	3,11		2,36	3,64	3,78	0,77	1,06	4,12
Média	1,65	8,00	7,71	0,79	1,37	3,47	Média	1,45	4,85	5,01	0,68	0,54	4,68
DESPAD	0,44	5,95	3,95	0,27	0,30	0,48	DESPAD	0,63	3,25	3,24	0,11	0,36	3,08
EPM	0,18	2,44	1,62	0,11	0,12	0,20	EPM	0,26	1,33	1,33	0,05	0,15	1,26
MO						MO							
População de SIGLEC						População de CD 22							
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS		OVA+SAL	OVA+OVA	A+OVA+I	ALO+SAL	ALO+OVA	O+OVA+INS
	1,08	7,15	2,71	0,835	0,918	3,95		3,61	56,80	63,90	0,25	1,19	7,87
	0,862	2,48	2,5	0,815	0,941	6,72		3,19	57,50	7,82	0,60	1,59	9,75
	0,851	2,09	3,84	0,309	0,733	2,63		6,10	48,80	15,90	0,61	2,20	8,21
	1,14	2,13	4,4	1,21	1,7	3,2		6,30	60,90	18,80	0,00	1,10	5,45
								4,82	60,80	70,80	1,25	1,07	7,70
								4,09	58,40	79,50	0,46	0,14	3,19
Média	1,0	3,5	3,4	0,8	1,1	4,1	Média	4,69	57,20	42,79	0,53	1,22	7,03
DESPAD	0,1	2,5	0,9	0,4	0,4	1,8	DESPAD	1,29	4,45	31,94	0,42	0,68	2,33
EPM	0,07	1,23	0,45	0,18	0,21	0,91	EPM	0,53	1,82	13,09	0,17	0,28	0,96
MO						MO							
População de Cd11b						População de CD 19							
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS		OVA+SAL	OVA+OVA	A+OVA+I	ALO+SAL	ALO+OVA	O+OVA+INS
	0,309	6,4	3,9	0,336	0,189	1,32		1,46	53,30	18,80	0,00	0,08	6,19
	0,918	2,94	4,8	0,123	0,289	1,9		1,43	5,34	12,60	0,00	0,00	5,34
	0,731	4,32	1,95	0,239	0,336	1,31		0,15	13,60	9,35	0,00	0,82	6,02
	0,208	4,7	5,13	0,187	0,318	1,08		6,14	12,70	66,70	0,00	0,52	8,93
								5,34	9,51	49,10	0,00	0,26	9,70
								6,18	14,20	6,19	0,00	0,46	9,24
Média	0,5	4,6	3,9	0,2	0,3	1,4	Média	3,45	18,11	27,12	0,00	0,36	7,57
DESPAD	0,3	1,4	1,4	0,1	0,1	0,3	DESPAD	2,73	17,55	24,83	0,00	0,31	1,92
EPM	0,17	0,71	0,71	0,05	0,03	0,17	EPM	1,12	7,19	10,18	0,00	0,13	0,79

BAL

População de SIGLEC						
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS
	3,85	13,7	12,8	1,21	1,58	11,6
	3,92	16,7	14	1,64	1,9	9,08
	1,64	13,9	11,8	1,48	1,64	7,11
	1,9	11,5	16,5	1,09	1,63	9,84
Média	2,8	14,0	13,8	1,4	1,7	9,4
DESPAD	1,2	2,1	2,0	0,3	0,1	1,9
EPM	0,61	1,07	1,01	0,13	0,07	0,93
População de Cd11b						
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+INS	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+INS
	1,27	4,35	4,56	0,947	0,335	1,19
	0,948	1,56	1,11	0,733	0,58	1,89
	0,87	3,46	5,4	0,557	0,655	1,31
	0,924	3,48	4,53	0,731	0,716	1,14
Média	1,0	3,2	3,9	0,7	0,6	1,4
DESPAD	0,2	1,2	1,9	0,2	0,2	0,3
EPM	0,09	0,59	0,95	0,08	0,08	0,17

Apêndice IX

Tabelas A8. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à análise de imunoglobulina

	IgE					
	ova+sal	ova+ova	ova+ova+i	alo+sal	alo+ova	alo+ova+i
	46,19	71,51	112,87	13,29	43,92	66,62
	39,60	58,92	67,32	24,47	48,83	81,83
	28,28	82,28	82,28	28,28	46,37	136,84
	28,33	77,06	64,22	21,16	45,55	95,09
	36,99	73,08	60,97	25,36	50,26	86,13
	31,22	69,71	73,70	28,14	46,10	97,71
MÉDIA	35,10	72,09	76,89	23,45	46,84	94,03
DESPAD	7,13	7,86	19,18	5,63	2,31	23,71
EPM	3,75	4,14	10,10	2,96	1,21	12,48

	IgG2a					
	ova+sal	ova+ova	ova+ova+i	alo+sal	alo+ova	alo+ova+i
	11,53	26,00	24,27	86,28	110,62	68,57
	9,71	22,26	32,38	160,28	68,50	60,65
	6,65	41,39	32,78	101,21	114,16	80,79
	18,50	41,13	37,80	165,21	206,47	67,37
	15,23	27,42	34,30	82,88	97,63	75,34
	11,15	20,40	33,40	80,10	80,70	60,70
MÉDIA	12,13	29,77	32,49	112,66	113,01	68,90
DESPAD	4,18	9,25	4,47	39,50	49,00	8,01
EPM	2,20	4,87	2,35	20,79	25,79	4,21

	IgG1					
	ova+sal	ova+ova	ova+ova+i	alo+sal	alo+ova	alo+ova+i
	2,62	77,35	82,11	12,24	17,80	44,41
	5,56	30,94	32,19	10,60	27,35	27,22
	12,24	52,19	162,92	23,95	27,22	63,16
	10,60	85,97	66,08	23,40	24,85	70,53
	15,85	84,77	30,79	24,85	18,45	53,27
	7,82	87,70	96,40	5,40	7,50	61,10
MÉDIA	9,12	69,82	78,42	16,74	20,53	53,28
DESPAD	4,77	23,17	49,06	8,35	7,64	15,58
EPM	1,95	9,49	20,11	3,42	3,13	6,39

Apêndice X

Tabelas A8. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes ao Western Blotting

	p38- Resultado					
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+I	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+I
	0,58	0,12	0,19	1,69	3,90	0,67
	0,23	1,10	0,90	1,39	1,62	0,12
	0,76	0,38	0,05	1,21	1,65	0,84
MEDIA	0,52	0,53	0,38	1,43	2,39	0,54
DESPAD	0,27	0,51	0,46	0,24	1,31	0,37
EPM	0,16	0,29	0,26	0,14	0,76	0,22

	ERK-1 Resultado					
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+I	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+I
	2,36	1,65	1,47	0,66	0,99	1,16
	1,39	1,05	1,56	0,90	0,67	1,22
	2,08	1,95	1,11	0,53	0,70	1,53
MEDIA	1,94	1,55	1,38	0,70	0,79	1,31
DESPAD	0,50	0,46	0,24	0,19	0,18	0,20
EPM	0,29	0,26	0,14	0,11	0,10	0,11

	ERK-2 Resultado					
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+I	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+I
	0,35	0,47	0,49	0,17	0,07	0,48
	0,39	0,38	0,87	0,19	0,09	0,46
	0,90	0,71	0,59	0,11	0,05	1,54
MEDIA	0,55	0,52	0,65	0,16	0,07	0,83
DESPAD	0,31	0,17	0,20	0,04	0,02	0,62
EPM	0,18	0,10	0,12	0,02	0,01	0,36

	JNK Resultados					
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+I	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+I
	0,022	0,222	0,311	0,080	0,012	0,405
	0,132	0,339	0,307	0,072	0,168	0,407
	0,007	0,047	0,014	0,011	0,018	0,529
MEDIA	0,05	0,20	0,21	0,05	0,07	0,45
DESPAD	0,07	0,15	0,17	0,04	0,09	0,07
EPM	0,04	0,08	0,10	0,02	0,05	0,04

	STAT-3 Resultado					
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+I	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+I
	0,77	1,47	1,76	0,06	0,58	1,15
	0,28	1,36	1,79	0,08	0,10	0,99
	0,51	1,30	1,79	0,19	0,39	1,19
MEDIA	0,52	1,38	1,78	0,11	0,36	1,11
DESPAD	0,25	0,09	0,01	0,07	0,24	0,11
EPM	0,14	0,05	0,01	0,04	0,14	0,06

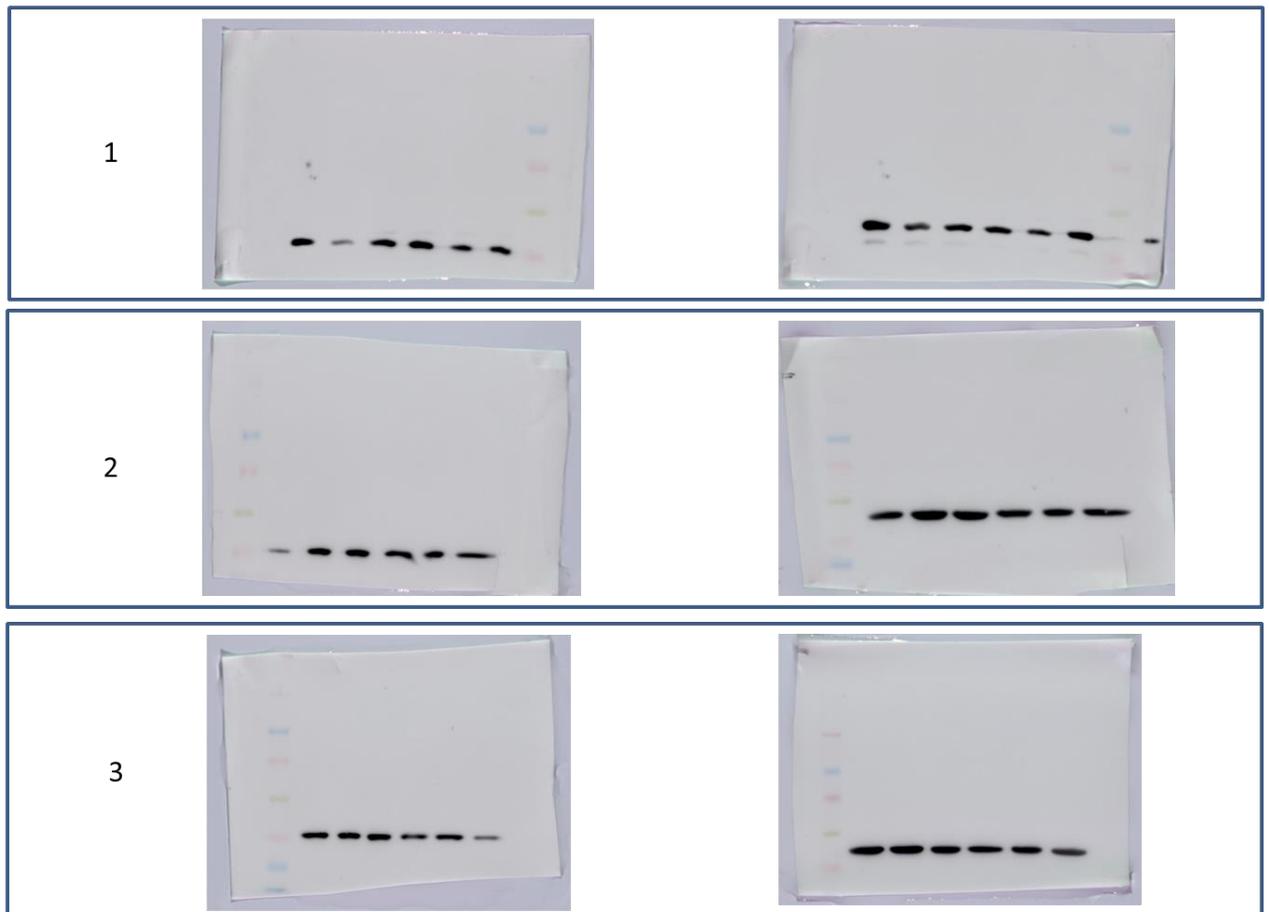
	pSTAT6 - Resultado					
	OVA+SAL	OVA+OVA	OVA+OVA+I	ALO+SAL	ALO+OVA	ALO+OVA+I
	0,02	0,34	0,40	0,00	0,00	0,00
	0,02	0,11	0,12	0,00	0,00	0,00
MEDIA	0,02	0,23	0,26	0,00	0,00	0,00
DESPAD	0,00	0,16	0,20	0,00	0,00	0,00
EPM	0,00	0,09	0,12	0,00	0,00	0,00

Membranas Western Blotting

P38 + β -actina

P38

β -actina



ERK + GAPDH

ERK

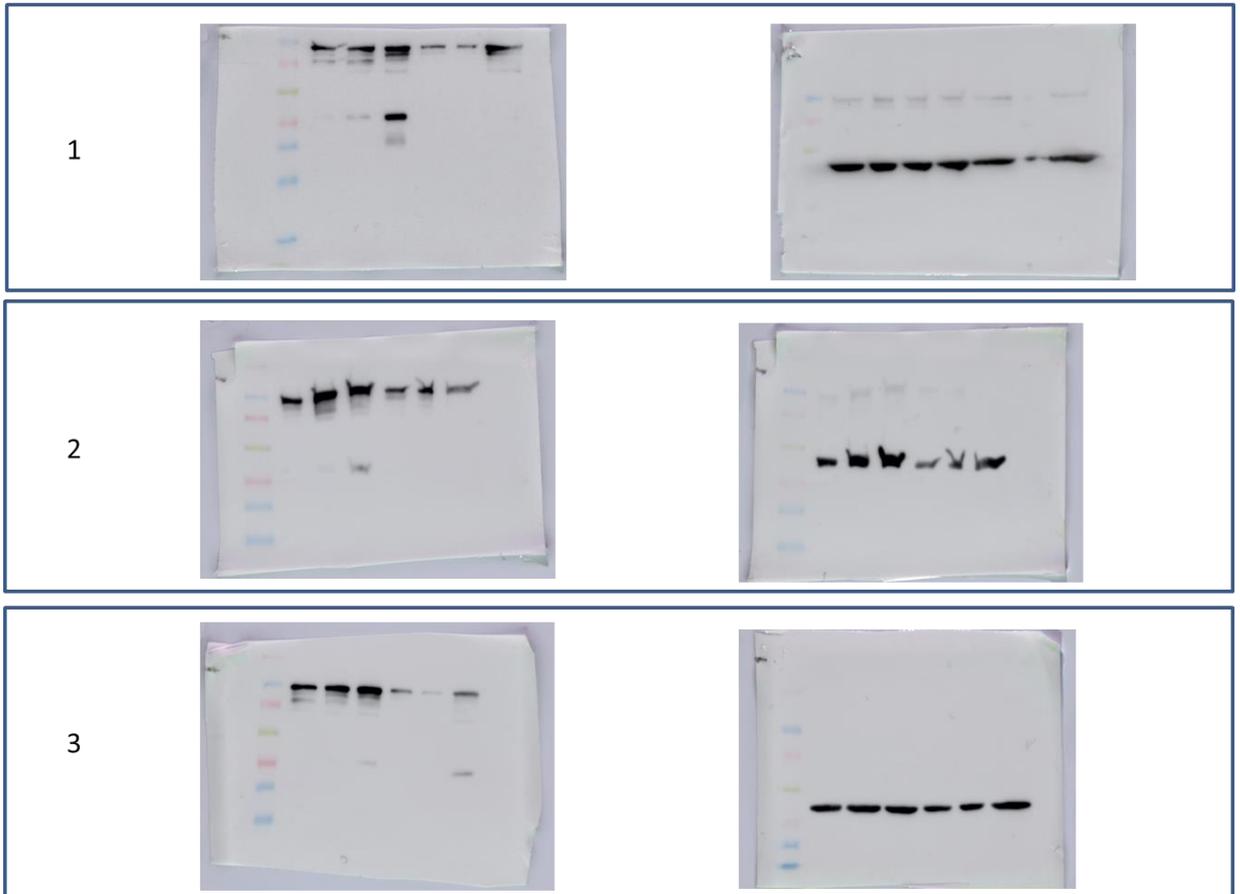
GAPDH



Stat3 + β -actina

Stat 3

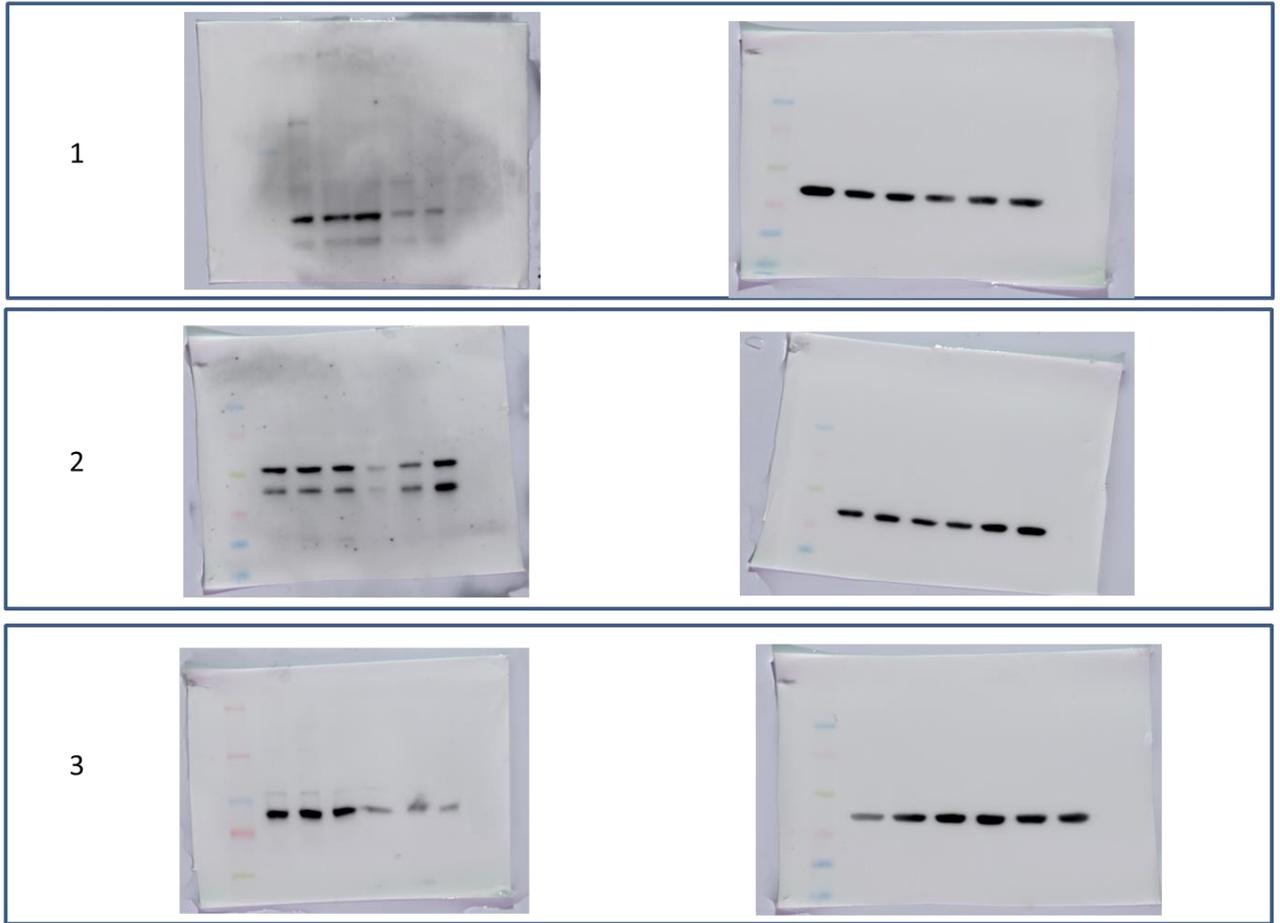
β -actina



JNK + β -actina

JNK

β -actina



pSTAT6 + β -actina

pSTAT6

β -actina

