

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

Avaliação do Efeito da Hiperglicemia na Via da Autofagia em Macrófagos de
Camundongos Diabéticos

Emanuella Sarmento Alho de Sousa

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

SÃO PAULO
2022

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

Avaliação do Efeito da Hiperglicemia na Via da Autofagia em Macrófagos de
Camundongos Diabéticos

Emanuella Sarmento Alho de Sousa

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

SÃO PAULO
2022

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

S719a	Sousa, Emanuella Sarmento Alho de Avaliação do Efeito da Hiperglicemia na Via da Autofagia em Macrófagos de Camundongos Diabéticos / Emanuella Sarmento Alho de Sousa. - São Paulo, 2022. 97 p.
	Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia). Orientador: Martins, Joilson de Oliveira
	1. Inflamação. 2. Autofagia. 3. Hiperglicemia. 4. Macrófagos. 5. Diabetes mellitus tipo 1. I. T. II. Martins, Joilson de Oliveira, orientador.

Emanuella Sarmiento Alho de Sousa

Avaliação do Efeito da Hiperglicemia na Via da Autofagia em Macrófagos de
Camundongos Diabéticos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do título de Mestre

Dr. João Pedro Tôrres Guimarães
1º. Examinador

Dra. Jacqueline de Fátima Jacysyn
2º. Examinador

Dr. Stephen Fernandes de Paula Rodrigues
3º. Examinador

São Paulo 26 de abril de 2022

Aos meus pais, Darla e Edi, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim, dedico este trabalho. Os amo profundamente.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me guiar, me ajudar e me dar forças e ânimo para enfrentar os obstáculos encontrados ao longo dessa jornada.

À minha mãe, agradeço todo o apoio e incentivo dado durante essa caminhada. Muito obrigada por seu acolhimento nos momentos difíceis, pelos ensinamentos, pela escuta, por me acalmar quando as coisas pareciam impossíveis. Obrigada principalmente por acreditar em mim quando nem eu mesma conseguia. Eu não teria chegado até aqui sem seu apoio e amor. Eu te amo infinitamente!

Ao meu pai, agradeço por sempre ter me incentivado e nunca ter medido esforços para me dar as melhores condições para que eu crescesse como pessoa e como profissional. Você sempre me falou que a única coisa que poderia me dar era o estudo, mas todos os dias você me dá muito mais que isso. Obrigada por me dar o privilégio de ser sua filha. Amo você com todo o meu coração!

À minha família e amigos, obrigada por sempre estarem ao meu lado enquanto eu me dedicava à realização desta pesquisa e por compreenderem minhas ausências, que não foram poucas. Serei eternamente grata!

Ao meu orientador, Dr. Joilson de Oliveira Martins, muito obrigada por toda ajuda, pela oportunidade e confiança em mim depositadas, que me permitiram crescer como profissional e pessoa. Serei sempre extremamente grata pela sua orientação, paciência, compreensão, apoio e incentivo para superar os obstáculos encontrados durante essa caminhada. Me sinto profundamente grata e sortuda por ter tido a oportunidade de ser sua aluna!

Ao meu amigo Adriano, muito, muito obrigada por ter me feito companhia nessa caminhada. Obrigada por todas as conversas, conselhos, pelas palavras de incentivo, por escutar meus desabafos, pela ajuda nos experimentos e na vida. Agradeço pela sua positividade excessiva que foi o ponto de equilíbrio dos meus momentos de negatividade, e que me ajudaram a lidar com algumas coisas com leveza. Muito obrigada por sua amizade, por ser o Bob Esponja do meu Lula Molusco. Nunca terei palavras suficientes para expressar minha gratidão à você.

Ao meu colega de laboratório, Dr. João Pedro, muito obrigada pela ajuda e contribuição dadas ao longo deste trabalho.

Aos amigos Kamilla e Rafael, agradeço pela ajuda, pela amizade e por terem trazido leveza para a reta final desta caminhada.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Imunoendocrinologia, obrigada pela ajuda e parceria: Thais, Felipe, Sabrina e Fernando, muito obrigada.

Às técnicas Silene Miglioniri, Fabiana Teixeira agradeço por sempre me ajudarem em todos os momentos, principalmente nos contratemplos. Muito obrigada pelos conselhos, conversas e principalmente pela amizade durante esses anos.

Aos funcionários da FCF que me auxiliaram em diversos momentos desta caminhada: Edson, Renata, Samantha, Edna, Elaine e Silvia, sou extremamente grata por toda a ajuda.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), e à Fundação de

Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro sem o qual esta pesquisa não poderia ser realizada

Por fim, obrigada a todas as pessoas que de alguma forma me auxiliaram, ou contribuíram para a realização deste mestrado.

“Porque desistir poderia ser mais fácil, mas não seria melhor.”
Jenny Lawson – Alucinadamente Feliz

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) auxílio 88882.327675/2019-01; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) auxílio 310993/2020-2; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) auxílio 2020/03175-9; 2020/03163-1.

RESUMO

O Diabetes *mellitus* (DM) é um grupo de distúrbios metabólicos caracterizado pela hiperglicemia. O DM tipo 1 (DM1) se caracteriza pela destruição das células β pancreáticas, que consiste na maioria das vezes por um processo autoimune, promovendo uma deficiência de insulina. A hiperglicemia decorrente da falta de insulina ocasiona prejuízos para o sistema imunológico tornando indivíduos diabéticos mais susceptíveis a infecções quando comparado com indivíduos saudáveis. A alta susceptibilidade às infecções é, pelo menos em parte, em função de uma resposta imune inadequada. Além disto, a hiperglicemia *per se* desempenha um importante papel neste processo. Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi de avaliar a hiperglicemia e seu envolvimento no processo da autofagia e na resposta induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em populações de macrófagos de animais diabéticos e não diabéticos. Para tanto, utilizamos macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) de camundongos C57BL/6 diabéticos (Aloxana 60mg/kg, i.v.) e não diabéticos. Os BMDMs foram mantidos em meio de cultura com concentração normal (5,5 mM) e uma alta concentração de glicose (25 mM) e foram estimuladas ou não com LPS na concentração de 100 ng/mL e Nigericina na concentração de 20 μ M, nos tempos de 30 minutos; 2; 4; 6; 24 horas, sendo dosadas as citocinas IL-6, IL-10, IL-1 β e TNF- α . Em nossos estudos, identificamos alterações na secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α , em que os BMDMs de camundongos diabéticos e não diabéticos apresentaram aumento na secreção dessas citocinas quando estimulados por LPS+Nigericina. Além disso, foram observadas alterações na via de autofagia, onde o aumento da proteína autofágica LC3b e Beclin-1 ocorreu por macrófagos de animais não diabéticos em meio hiperglicêmico, sem estímulo. Os macrófagos de animais diabéticos apresentaram redução na expressão de LC3b e Beclin-1 em meio hiperglicêmico, sugerindo um processo autofágico prejudicado nessas células. Os resultados obtidos permitem sugerir que a hiperglicemia altera as vias inflamatórias em macrófagos estimulados por LPS+Nigericina, desempenhando um papel importante na resposta inflamatória de indivíduos diabéticos.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*, Hiperglicemia, Inflamação, Autofagia.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic disorders characterized by hyperglycemia. Type 1 DM (T1DM) is characterized by the pancreatic beta cells destruction, which most often consists of an autoimmune process, promoting an insulin deficiency. Hyperglycemia resulting from the lack of insulin leads to an impaired immune system, leading diabetic individuals more susceptible to infections when compared to healthy individuals. The high susceptibility is, at least in part, due to an inadequate immune response. In addition, hyperglycemia *per se* plays an important role in this process. Thus, the objective of this study was to evaluate the autophagy process and the lipopolysaccharide-induced response (LPS) in macrophage populations of diabetic and non-diabetic mice. For this, we used bone marrow-derived macrophages (BMDM) from diabetic (Aloxan 60mg/kg, i.v.) and non-diabetic C57BL/6 mice. BMDM were cultured in normal concentration (5.5 mM) and in a high concentration of glucose (25 mM) medium, and were stimulated or not with LPS at a concentration of 100 ng/mL and Nigericin at a concentration of 20 μ M, at times 30 minutes; 2; 4; 6; 24 hours, followed by the measurement of the cytokines IL-6, IL-10, IL-1 β and TNF- α . In our study, we identified changes in the levels of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-1 β and TNF- α , where BMDM showed an increase in the secretion of these cytokines when stimulated by LPS + Nigericin. In addition, changes were observed in the autophagy pathway, where the increase in the autophagic protein LC3b and Beclin-1 occurred by macrophages of non-diabetic mice in hyperglycemic medium, without LPS stimulation. Macrophages from diabetic mice showed a reduction on the expression of LC3b and Beclin-1, suggesting an impaired autophagic process in these cells. The results obtained allow us to suggest that hyperglycemia alters the inflammatory pathways in macrophages stimulated by LPS, playing an important role in the inflammatory response of diabetic individuals.

Keywords: Diabetes *mellitus*, Hyperglycemia, Inflammation, Autophagy.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Diabetes <i>mellitus</i> Tipo 1.....	19
1.2 Modelo experimental de DM1	20
1.3 Hiperglicemia	21
1.4 Macrófagos	24
1.5 Autofagia	26
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Aspectos éticos	31
4.2 Indução do Diabetes <i>mellitus</i>	31
4.3 Coleta dos macrófagos derivados de medula óssea e tratamento	31
4.4 Avaliação da via da autofagia.....	32
4.5 Quantificação de citocinas por ensaio imunoenzimático.	33
4.6 Quantificação de Óxido Nítrico.....	33
4.7 Análise estatística.....	34
5 RESULTADOS	35
5.1 Modelo experimental de diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	35
5.2 O envolvimento da hiperglicemia no processo de autofagia em BMDM de animais diabéticos estimulados com LPS+Nigericina	36
5.3 Secreção da citocina IL-6 em BMDM de animais diabéticos estimulados com LPS + Nigericina.....	37
5.4 Secreção da citocina TNF- α em BMDM de animais diabéticos estimulados com LPS + Nigericina.....	38
5.5 Secreção da citocina IL-1 β em BMDM de animais diabéticos estimulados com LPS + Nigericina.....	39
5.6 Secreção de IL-10 em BMDM de animais diabéticos estimulados com LPS + Nigericina	40
5.7 Secreção de Óxido Nítrico em BMDM de animais diabéticos estimulados com LPS + Nigericina.....	41
6. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO.....	45
7 REFERÊNCIAS	46
8 ANEXOS	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Variação de massa corpórea após 10 dias de indução.....34

Gráfico 2 – Evolução da glicemia após 10 dias de indução.....34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Oxidação de glicose e estresse oxidativo induzido em condições hiperglicêmicas.....	23
Figura 2 – Avaliação da via da autofagia após 30 minutos de incubação.....	35
Figura 3 – Secreção de IL-6 por ND-BMDM e D-BMDM com <i>priming</i> de Nigericina.....	36
Figura 4 – Secreção de TNF- α por ND-BMDM e D-BMDM com <i>priming</i> de Nigericina.....	37
Figura 5 – Secreção de IL-1 β por ND-BMDM e D-BMDM com <i>priming</i> de nigericina.....	38
Figura 6 – Secreção de IL-10 por ND-BMDM e D-BMDM com <i>priming</i> de nigericina.....	39
Figura 7 – Secreção de Óxido Nítrico por ND-BMDM e D-BMDM com <i>priming</i> de nigericina.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS.

ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AGE	Produtos finais de glicação avançada
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APC	<i>antigen-presenting cell</i>
ATP	<i>Adenosine Tri-Phosphate</i>
ALOX	Aloxana
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
CT	Controle
C57BL/6	Camundongo 57 black / 6
DAMP	Padrões associados a danos
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM1	<i>Diabetes mellitus</i> do tipo 1
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> do tipo 2
DNA	<i>DeoxyriboNucleic Acid</i>
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
F-6-P	Frutose-6-fosfato
GAP	Gliceraldeído-3-fosfato
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLUT2	<i>Glucose transporter 2</i>
G-6-P	Glicose-6-fosfato
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IL	Interleucina
i.p	Intraperitoneal
i.v	Intravenosa
LCCM	Meio condicionado da cultura do cultivo de fibroblastos L929
LPS	Lipopolissacarídeo
NAD ⁺	<i>Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo</i>
NF-κB	<i>Factor Nuclear Kappa B</i>

NO	<i>Nitric oxide</i>
NOD	<i>Non-obese diabetic</i>
OMS	Organização mundial da Saúde
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
PARP-1	Poly-ADP-ribose polimerase-1
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
rpm	Rotação por minuto
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SFB	Soro Fetal Bovino
STZ	Estreptozotocina
TNF	Fator de necrose tumoral
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

\geq	Maior e igual que
$<$	Menor que
%	Porcentagem
/	Dividido por
μm	Micromêtro
μL	Micro litro
dL	Decilitro
g	Gramma
kg	Kilogramma
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mM	Milimolar
μM	Micromolar
M	Molaridade
nm	Nanómetro
ng	Nanogramma
pg	Picogramma
L	Litro
$^{\circ}\text{C}$	Grauu celsius
α	Alpha
β	Beta
γ	Gama
I	Um

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) consiste em um distúrbio metabólico caracterizado por hiperglicemia persistente, decorrente de deficiência na produção de insulina ou na sua ação, ou em ambos os mecanismos (Sociedade Brasileira de Diabetes – SBD, 2021). A hiperglicemia crônica do diabetes *mellitus* (DM) está associada a danos nos órgãos, complicações cardiovasculares, nefropatias, retinopatias, inflamação e aumento do risco de desenvolvimento de câncer (WHITING et al., 2011; GIRI et al., 2018; PAUL; ALI; KATARE 2020). Além disto, sabe-se que resposta imune de indivíduos diabéticos se encontra prejudicada, pois suas células fagocitárias possuem baixa atividade fagocítica e microbicida, levando a uma alta susceptibilidade ao desenvolvimento de infecções secundárias por esses pacientes (SUNAHARA et al., 2012; CASAGRANDE et al., 2020).

A homeostasia da glicose é mantida através do correto funcionamento de algumas vias metabólicas: a glicogênese, a gliconeogênese, a glicogenólise e a glicólise. Durante altos níveis de glicose, o hormônio insulina é liberado com a ativação da via da glicogênese, e quando há baixa disponibilidade de glicose, o hormônio glucagon é liberado e ocasiona a ativação da via da gliconeogênese (DASHTY 2013).

A classificação do diabetes foi sugerida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em conjunto com a Associação Americana de Diabetes (American Diabetes Association – ADA), sendo utilizada a mesma classificação pela SBD, onde o DM é dividido em quatro classes clínicas: a) o diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é causado pela destruição autoimune de suas próprias células beta (β) no pâncreas, responsáveis pela produção do hormônio insulina, que permite o controle adequado dos níveis de açúcar no sangue (HEALTH QUALITY ONTARIO, 2015); b) o DM tipo 2 é a forma mais comum de diabetes. Desenvolve-se secundária a uma deficiência relativa de insulina, mas o defeito primário é a resistência à insulina, sendo a obesidade um dos fatores de risco para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 pelo consumo excessivo de carboidratos; c) A intolerância ao carboidrato desenvolvida durante a gravidez é conhecida como diabetes gestacional. O DM não diagnosticado anteriormente (tipo 1 ou tipo 2) pode manifestar-se particularmente durante as avaliações iniciais na gravidez. Contudo, o diabetes gestacional é considerado um fator/causa separada do DM2. Com o avanço da gravidez, a crescente resistência à insulina cria uma demanda por mais insulina. Na grande maioria das gestações, a demanda é prontamente atendida e o equilíbrio entre a resistência à insulina e o suprimento de insulina é mantido. No entanto, se a resistência persiste a gestante se torna hiperglicêmica; Embora o tratamento consiga reverter o quadro diabético, a gestante

se torna mais susceptível ao desenvolvimento de DM2 com o passar do tempo (PLOWS et al. 2018); d) outros fatores como, síndromes monogênicas do diabetes, insuficiência pancreática exócrina (fibrose cística e pancreatite), diabetes induzido por fármacos, ou substâncias químicas (uso de glicocorticóides, tratamento do HIV/AIDS e após transplante de órgãos) e defeitos genéticos na função das células β estão associados ao desenvolvimento de inúmeras formas de diabetes e com um início de hiperglicemia geralmente antes dos 25 anos de idade (ALAM et al., 2014; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2021; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018).

Dados divulgados pela *International Diabetes Federation* (IDF, 2021) afirmam que 536,6 milhões de adultos no mundo tem diabetes e até 2045 cerca de 783,2 milhões de pessoas serão afetadas pela doença. O Brasil ocupa o sexto lugar no ranking de 10 países que possuem o maior número de indivíduos diabéticos, com mais de 15 milhões de pessoas afetadas. O DM1 é responsável por cerca de 5-10% do total de casos de diabetes e afeta mais de 1 milhão de crianças e adolescentes, sendo a doença crônica de ocorrência mais comum na infância, possuindo uma ocorrência de mais de 180 mil casos por ano. Brasil salta para o terceiro lugar no ranking quando são contabilizados crianças e adolescentes com DM1, com cerca de 92.300 indivíduos afetados, possuindo uma incidência de 8.900 casos novos por ano, tornando o DM1 um problema de saúde pública no país (IDF, 2021).

1.1 Diabetes *mellitus* Tipo 1

A maior parte dos casos de DM1 representa um distúrbio imune, se não autoimune, sugerindo que os pacientes frequentemente apresentam características de uma contribuição imunológica para a patogênese da doença (autoanticorpos ou associações genéticas com genes que controlam as respostas imunes). Entretanto, nem todos os pacientes com DM1 apresentam essas características, levando a classificações propostas de DM1A (autoimune), para os pacientes com DM1 que possuem autoanticorpos imunológicos auto-reativos, que corresponde a 70-80% dos casos (POZNYAK et al., 2020), e tipo 1B (idiopático), representando o restante cuja patogênese específica permanece obscura (ATKINSON et al., 2014).

A fisiopatologia desta doença consiste em sinais clássicos de doença autoimune órgão-específica caracterizada por infiltração linfocítica, ou inflamação em ilhotas pancreáticas chamada de “insulite”, assinalada pela presença de células imunes e inflamatórias dentro e ao redor deste sítio. Essas células secretam citocinas que levam a apoptose de células β , aumentando a infiltração de células T específicas de ilhotas que por sua vez atacam e destroem as células β (SZABLEWSKI, 2014; PUGLIESE, 2017).

Na fase clínica, os sintomas clássicos do estabelecimento do DM1 são: polidipsia, polifagia, poliúria, perda de peso, visão borrada e astenia. Estes sintomas em conjunto com a detecção de alta concentração glicêmica plasmática de jejum, ou glicemia casual, em qualquer hora do dia confirmam o diagnóstico (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2021; IDF, 2021).

O tratamento do DM1 consiste na manutenção dos níveis normais de glicose sanguínea, sendo a administração de insulina a base do tratamento, concomitante ao acompanhamento da hemoglobina glicada (HbA1c), pressão arterial, parâmetros lipídicos, massa corporal, evitando quadros de hipoglicemia (STEFANOWICZ et al., 2018; OTTO-BUCZKOWSKA et al., 2018).

1.2 Modelo experimental de DM1

Existem diversos modelos de estudo sobre a fisiopatologia do DM1, como: modelos de roedores de DM1 espontâneos *Non-Obese Diabetic mice* (NOD) e ratos *BioBreeding* ou BB (*BioBreeding Diabetes Prone BB-DP rats*), e pela indução química experimental de diabetes utilizando agentes chamados 20etonuria20ico — aloxana (ALOX) e a estreptozotocina (STZ) (GRAHAM; SCHUURMAN, 2015; QUEIROZ et al., 2021).

O método de indução química do DM1 consiste em injetar agentes 20etonuria20ico que vão atuar destruindo as células β do pâncreas (ACHARJEE et al., 2013). A aloxana e a estreptozotocina são agentes tóxicos às células β que após alguns dias de administração, induzem os quadros de DM1 (KING; BOWE, 2016). Estes agentes citotóxicos são análogos à glicose que se acumulam preferencialmente nas células β pancreáticas pela via transportadora de glicose, GLUT-2 (van BELLE et al., 2009).

A ALOX, quimicamente conhecida como 2,4,5,6-Tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracil, é uma substância química derivada da uréia e análoga citotóxica da glicose, sendo um dos agentes 20etonuria20ico mais utilizados para a indução experimental do diabetes, por induzir sinais clínicos análogos aos identificados na síndrome diabética em humanos, sinais estes como, hiperglicemia, perda de massa corpórea, glicosúria, polifagia, polidipsia, 20etonuria e cetonemia, possuindo também um grau de ação oncogênico e baixo custo comparada a outros agentes citotóxicos (LENZEN, 2008; SILVA et al., 2014).

Já está descrito na literatura que a ALOX induz o diabetes insulino-dependente em diversas espécies de animais como, camundongos, coelhos, ratos, macacos e cães, podendo ser administrada em doses únicas ou seriada, pelas vias: intraperitoneal, intravenosa e subcutânea (IGHODARO et al., 2017). O método de ação da ALOX foi bastante estudado, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo muito bem descrito. Foi demonstrado, utilizando ilhotas pancreáticas

isoladas e tecido pancreático de rato, que este fármaco provoca um aumento na secreção de insulina, na presença ou ausência de glicose, logo após o tratamento com ALOX (SILVA et al, 2015). Existem dois mecanismos patológicos pelos quais a ALOX induz o diabetes: bloqueando seletivamente a secreção de insulina induzida pela glicose por meio da inibição específica de glicoquinase, sensor de glicose da célula beta e pela indução da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), resultando na destruição seletiva de células β , causando um estado insulino-dependente (LENZEN, 2008).

A estreptozotocina (STZ), 2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosourea) -D-glucopiranose, é um agente diabetogênico derivado da bactéria *Streptomyces achromogens*, que possui uma absorção seletiva pelas células β do pâncreas através dos receptores GLUT-2 (WU; YAN, 2015). O quadro insulino-dependente causado pela STZ se dá pela transferência do grupo metil de sua estrutura, para o ácido desoxirribonucleico (ADN, ou DNA), mecanismo chamado de alquilação que leva a consequente fragmentação do DNA. O mecanismo de reparo do DNA leva a uma superestimulação de ADP-ribose polimerase, diminuindo o NAD⁺ celular e consequente redução de ATP, resultando na necrose das células β (LENZEN, 2008).

Devido ao receptor GLUT-2 estar presente em outros tecidos do corpo, como células hepáticas e túbulos renais, os agentes ALOX e STZ podem afetar a função destes órgãos (LENZEN, 2008). Além disso, alterações importantes nos parâmetros das células imunes *in vivo* e *in vitro* foram encontradas em um estágio inicial de DM1 em camundongos tratados com STZ, enquanto alterações em camundongos tratados com ALX foram encontradas principalmente na fase crônica do DM1, incluindo aumento das taxas de mortalidade. Esses achados sugerem que os efeitos de ALX e STZ influenciaram, em diferentes momentos, os órgãos linfoides, como o timo e baço, além da função dos próprios linfócitos (QUEIROZ et al., 2021).

1.3 Hiperglicemia

A hiperglicemia é caracterizada por uma elevação nos níveis de glicose no sangue, definindo-se quando as taxas de glicemia se encontram >125 mg/dL em jejum e >180mg/dL duas horas pós sobrecarga de glicose (MOURI; BADIREDDY, 2021). Além disto, a hiperglicemia é uma das principais características do DM, causada pela perda de função das células-beta produtoras do hormônio insulina, ou pelo surgimento da resistência a esse hormônio, sendo um dos principais fatores de risco para desenvolvimento de problemas crônicos micro e macrovasculares, elevação das taxas de morbidade e mortalidade e redução da

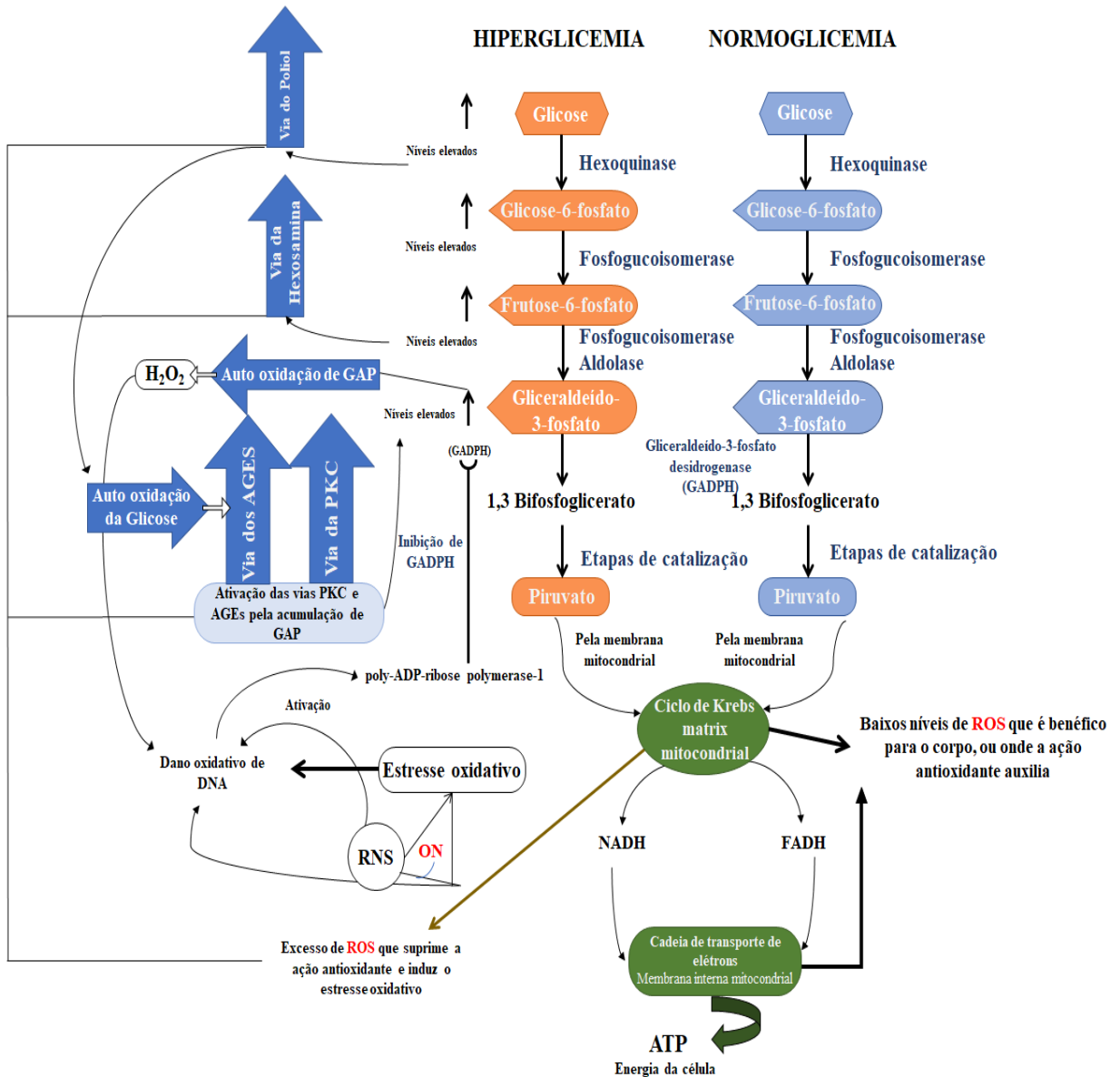
qualidade de vida (MARESCH et al., 2017; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2021).

A via glicolítica, ou glicólise é uma série de reações químicas que convertem a glicose, liberando energia na forma de quatro moléculas de adenosina trifosfato (ATP) e duas de dinucleótido de nicotinamida e adenina em seu estado de oxidação reduzido (NADH), sendo um processo responsável pela quebra de 80-90% de moléculas de glicose corporal. Esse processo se inicia com a fosforilação da glicose pela hexoquinase ou glucoquinase em glicose 6-fosfato (G-6-P) e, em seguida é convertida em frutose-6-fosfato (F-6-P) pela ação catalisadora da fosfoglucoisomerase. A glicose 6-fosfato é então canalizada para as vias de pentose fosfato, gerando nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase (NADPH) proveniente de NADP+ para reações celulares sintéticas. Ao mesmo tempo, a via glicolítica produz gliceraldeído-3-fosfato (GAP) que é fosforilado pelo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), onde o produto resultante é decomposto em várias fases da reação, gerando o produto glicolítico piruvato, que quando descarbolizado se associa a Coenzima A para iniciar o ciclo de Krebs na matriz mitocondrial. Os intermediadores do ciclo de Krebs, NADH e o dinucleótido de adenina de flavina reduzido (FADH₂), são subsequentemente oxidados para formar um gradiente de prótons, que por um processo chamado de cadeia de transporte de elétrons, sintetiza ATP na membrana interna mitocondrial. Em condições fisiológicas, este processo resulta na produção mitocondrial de superóxido radical aniônico (Figura 1) (IGHODARO, 2018).

A hiperglicemia presente em indivíduos diabéticos possui diversos efeitos deletérios, podendo ocorrer devido a ativação de vias que estimulam a produção de EROs, que na ausência de um mecanismo antioxidante de defesa apropriado, promovem a ativação de vias intracelulares sensíveis ao estresse, causando danos as células e consequente desenvolvimento de complicações ligadas a patogênese do diabetes. Em estados hiperglicêmicos, o fluxo de glicose pela via glicolítica tende a aumentar, intensificando a produção de piruvato e acetil-CoA e consequente aumento na produção de NADH. Por NADH ser um transportador de elétrons, em grandes quantidades, leva a uma pressão de elétrons na cadeia de transportadores mitocondriais, resultando em um vazamento de elétrons, causando um aumento na produção de superóxidos que suprime o sistema antioxidante, induzindo o estresse oxidativo, causando danos no DNA nuclear e em outras moléculas. O sistema reparador de DNA irá ativar a enzima poly-ADP-ribose polymerase-1 (PARP-1), que inibirá GAPDH, resultando na elevação dos níveis de GAP e outros intermediadores glicolíticos (F-6-P e G-6-P), assim como a glicose. O acúmulo dessas moléculas ativa outras vias pró-oxidativas, como as vias da hexosamina, polioli,

proteína C quinase (PKC) e produtos de glicação avançada (AGE) (Figura 1) (FIORENTINO

A VIA GLICOLÍTICA



et al., 2013; YAN, 2014; IGHODARO, 2018).

Figura 1. Oxidação de glicose e estresse oxidativo induzido em condições hiperglicêmicas: Em condições hiperglicêmicas, ocorre a produção excessiva de radicais livres, levando a danos ao DNA e consequente ativação da Poly-ADP-ribose polymerase-1, enzima reparadora de DNA. Esta enzima inibe a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, resultando no acúmulo de GAP, que ativa vários processos pró-oxidativos, incluindo hexosamina, polioliol, proteína C quinase e AGE (Fonte adaptada de IGHODARO, 2018).

A hiperglicemia compromete o sistema imune de diversas formas, diminuindo a função fagocítica de neutrófilos e monócitos, prejudicando a atividade bactericida, glicosilação de

imunoglobulinas e quimiotaxia (DUNCAN, 2012). O estado hiperglicêmico também ativa o fator nuclear κ B (NF- κ B) e induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, como Fator de Necrose tumoral (TNF)- α e a interleucina (IL)-6 (McDONELL; UMPIERREZ, 2012).

1.4 Macrófagos

Macrófagos são células do sistema imune com capacidade fagocítica que atuam na resposta inata, iniciação e finalização da resposta inflamatória, contribuindo para o desenvolvimento tecidual, controlando e organizando a defesa do hospedeiro contra patógenos, atuando também na ativação da imunidade adaptativa, desempenhando o papel de células apresentadoras de antígenos (APCs) que secretam IL-12, IL-18 e IL-23, ativando as células T de resposta Th1 (GORDON; MARTINEZ, 2010; WEISS; SCHAIBLE, 2015; EDHOLM et al., 2017; REMMERIE; SCOTT, 2018).

O desenvolvimento dos macrófagos ocorre a partir de células tronco hematopoiéticas de linhagem mieloide fagocítica mononuclear, que são liberadas na corrente sanguínea na forma de monócitos e, após migrarem para os tecidos, se diferenciam em macrófagos, podendo ser divididos em macrófagos residentes e recrutados, que em resposta a fatores de crescimento e citocinas secretadas no sítio tecidual, sofrem mudanças fenotípicas e funcionais (GEISSMAN et al., 2010; SNYDER et al., 2016; BYRNE et al., 2016; WYNN; VANELLA, 2016). Os macrófagos residentes em tecidos incluem: macrófagos da polpa vermelha do baço, macrófagos alveolares do pulmão, células de Langerhans epidérmicas, microglia do cérebro, células de Kupffer do tecido hepático, macrófagos peritoneais e macrófagos pancreáticos, renais e cardíacos (PERDIGUERO; GEISSMAN, 2016). Os macrófagos teciduais expressam uma ampla gama de receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) e padrões moleculares associados ao dano (DAMP), que são os receptores do tipo Toll-Like (TLR), receptores do tipo NOD (NLR), família dos receptores induzido por ácido retinóico (RIG) tipo gene I, lectinas e receptores de eliminação *scavenger*, responsáveis pela internalização de moléculas de natureza lipídica (DAVIES et al., 2013).

Os macrófagos mudam sua expressão gênica em resposta a diferentes estímulos, se polarizando em fenótipos distintos em fases sequenciais (HUME, 2015; WANG et al., 2019). De acordo com sua função, os macrófagos são polarizados em: macrófagos ativados pela via clássica, ou M1 (pró-inflamatórios); e macrófagos ativados pela via alternativa, ou M2 (anti-inflamatórios) (REMMERIE; SCOTT, 2018). A população de macrófagos M1 é ativada por citocinas do tipo I, Interferon (IFN)- γ , ou por reconhecimento de PAMPs (ex. lipopolissacarídeo – LPS) e DAMPs, possuindo elevada atividade bactericida. Essa população

exerce atividades antiproliferativas e citotóxicas, resultando na liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23), com elevação nos níveis de IL-12 e IL-13 e baixos níveis de IL-10, produzindo mais EROs e espécies reativas de nitrogênio (RNS) quando comparada aos macrófagos M2. Acredita-se que essa população de M1 esteja relacionada à lesão mediada por macrófagos (LASKIN et al., 2011; SUNAHARA; MARTINS, 2012; EDHOLM et al., 2017). Já a via alternativa (M2), é ativada em resposta as citocinas IL-4 e IL-13, agonistas de receptores *Toll-like* (LPS), imunocomplexos e glicocorticóides, regulando negativamente a resposta inflamatória, iniciando o reparo tecidual pela liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e fator de transformação de crescimento (TGF)- β , que polariza estes macrófagos ao perfil anti-inflamatório da ativação alternativa (SNYDER et al., 2016; EDHOLM et al., 2017; LIN et al., 2021). Macrófagos M2a são polarizados pelas citocinas IL-4 e IL-13, expressando altos níveis de receptores de manose e secretando TGF- β , fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e fibronectina (OREKHOV et al., 2019). Os macrófagos M2b são induzidos imunocomplexos, agonistas dos receptores *Toll-Like* e de receptores de IL-1, expressando baixos níveis de IL-12 e altos níveis de IL-10, CCL1 e do Membro 14 da Superfamília de Ligantes de TNF (WANG et al., 2019). Já os macrófagos M2c são induzidos por IL-10 via transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3), por receptor de IL-10, secretando altos níveis de IL-10 e TGF- β (YAO et al., 2019; WANG et al., 2019).

O papel dos macrófagos na patogênese do DM1 tem sido sugerido (KOLB-BACHOFEN; KOLB, 1989; CANTOR; HASKINS, 2007; THAYER et al., 2011). A atividade macrofágica é canalizada através de dois padrões distintos de resposta designados como ativação clássica e alternativa (MURRAY, 2017). Ambas as populações de macrófagos são centrais no diabetes (ARNUSH et al., 1998). Sabe-se que os macrófagos são influenciados pela hiperglicemia, porém há uma lacuna no consenso da relação entre macrófagos e condições de alta concentração de glicose, assim, mais investigações são necessárias (XIU et al., 2014). Em um estudo realizado com BMDMs foi reportado que estados hiperglicêmicos em longo prazo sensibilizam macrófagos a produzirem citocinas, reduzindo sua atividade fagocítica e produção de óxido nítrico, assim, mais investigações são necessárias (PAVLOU et al., 2018). Além disto, foi identificado que a expressão de receptores Toll-Like 4 (TLR4) em BMDM *in vivo* e *in vitro* é regulada negativamente em situações de hiperglicemia, interferindo em seu retorno à superfície dessas células, sugerindo que o reconhecimento de patógenos pelos macrófagos esteja prejudicado, podendo interferir na eliminação desses antígenos (AYALA et al., 2019).

Assim, pretendemos ampliar o conhecimento sobre o efeito da hiperglicemia na liberação de mediadores imunes pró e anti-inflamatórios por macrófagos, assim como promover o melhor entendimento dos mecanismos pelo qual a hiperglicemia provoca os efeitos nesta célula, avaliando as vias de sinalização e utilizando inibidores farmacológicos, os receptores que envolvem a resposta dos macrófagos, assim como a capacidade desta célula em capturar e realizar o *killing* de um antígeno, avaliando quais são os passos cruciais para os efeitos provocados nos macrófagos a em condições de hiperglicemia.

1.5 Autofagia

A autofagia é um processo de degradação celular que conserva a homeostasia celular, degradando e reciclando componentes do citoplasma em resposta a variações ambientais, inanição, infecções e estresse (WANG et al., 2013), a fim de manter um ambiente intracelular saudável e funcional. Este processo se inicia com a formação do autofagossoma, uma estrutura com membrana dupla que envolve o cargo citoplásmico (macromoléculas e organelas). O autofagossoma pode então se fundir aos lisossomos, resultando na degradação do cargo (HARRIS et al., 2017).

Diversas proteínas envolvidas na biogênese do endossomos e fagossomos participam na regulação da autofagia, e uma ampla gama de proteínas provenientes dos genes relacionados à autofagia (ATG), incluindo o ATG8 (LC3), que em conjunto com a Beclin-1, proteína que atua durante o processo autofágico inicial, é comumente utilizado como marcador para avaliação do autofagossoma (KLIONSKY et al., 2016; LIANG et al., 2019). O processo de autofagia inicia com a formação do autofagossoma, onde a bicamada lipídica vai interagir com os complexos recrutados ULK (composto por Atg13, Atg101, ULK1 e FIP200) e PI3K (Atg14, Beclin-1, VPS34 and VPS15) (BANDUSEELA et al., 2013; GERMAIN; KIM, 2020). Simultaneamente, a proteína LC3, que será clivada em LC3-I por Atg4, irá se conjugar com o complexo Atg12-Atg5-Atg16, para a montagem do autofagossomo (LI et al., 2020). LC3-I será convertida em LC3-II por Atg7, Atg3 e fosfatidiletanolamina, e irá se acoplar à proteína p62, que se liga a proteínas ubiquitinadas, facilitando o processo de degradação do cargo (BANDUSEELA et al., 2013). Por fim, o autofagossomo se funde ao lisossomo, formando o autofagolisossomo, onde o conteúdo do autofagossomo será degradado por enzimas lisossomais, sendo convertidos em nutrientes e metabólitos (LI et al., 2020)

O estímulo por LPS induz o processo de autofagia em macrófagos derivados de medula óssea pela sua ligação ao receptor de superfície de membrana TLR4 por dois meios: via eixo de sinalização TRIF-p38-proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), e via dependente de

MyD88 (SEAY et al., 2007; DELGADO et al., 2009; OH; LEE, 2014). Além disto, o papel da autofagia na regulação de inflamação em doenças infecciosas e não infecciosas já é bem estabelecido (CADWELL et al., 2016; DERETIC et al., 2015), sendo descrito por Levine et al. (2011) que a regulação negativa deste processo interfere nas respostas inflamatórias a doenças (LEVINE et al., 2011).

Embora a autofagia seja conhecida principalmente como um mecanismo de sobrevivência para células em condições de estresse, as evidências de acúmulo de proteínas autofágicas indicam que a autofagia pode contribuir para os processos de morte celular sob condições patológicas (WANG et al, 2012; WEI; WANG; MIAO, 2012). Assim, entre outros, o processo autofágico prejudicado tem sido associado ao desenvolvimento de síndromes metabólicas, diabetes, alcoolismo e anormalidades lipídicas (SINGH et al, 2009; DONOHUE et al, 2009) e, na maioria desses casos, a patogênese subjacente está relacionada à falha de maquinaria de autofagia para remover eficientemente proteínas defeituosas ou organelas danificadas do citosol. Paralelamente, a via da autofagia pode se relacionar à sinalização pró-inflamatória via estresse oxidativo (ZHOU et al, 2011), pois o bloqueio da mitofagia (processo autofágico referente a degradação e/ou reciclagem de componentes mitocondriais) leva ao acúmulo de mitocôndrias danificadas e geradoras de EROs, ativando o inflamassoma de receptores do tipo NOD contendo o domínio pirina 3 (NLRP3) (MURIACH et al, 2014).

A família de receptores de reconhecimento de padrões NOD (NLRs), possui proteínas que formam grandes complexos proteicos multiméricos chamados inflamassomas, que são formados no citoplasma das células em resposta ao PAMP e DAMP (STIENSTRA et al., 2012; WEN et al., 2011). O inflamassoma formado a partir de NLRP3 é o mais amplamente estudado, conhecido por ser ativado em resposta a “sinais de perigo” celulares (HAN et al., 2015). A união dos componentes do inflamassoma NLRP3 envolve a associação da proteína NLRP3, do adaptador ASC e da pró-caspase-1, e sua ativação geralmente ocorre em duas fases: o primeiro sinal, que pode ser iniciada após o reconhecimento do LPS pelos TLRs, resultando na ativação de NF- κ B; o segundo sinal é dado por estímulos de PAMP e DAMP, que aumentam a geração de EROs, levando ao encontro do NLRP3 (CURI et al., 2017; MARUYAMA; YAMADA, 2019). EROs são conhecidos por serem os principais mediadores da ativação do inflamassoma caspase-1 e NLRP3. (CRUZ et al., 2007; DOSTERT et al., 2008; NAKAHIRA et al., 2011; ZHOU et al., 2011; KELLEY et al., 2019). Também foi relatado que a disfunção mitocondrial ativa o inflamassoma NLRP3 causando acúmulo de EROs (WEN et al., 2011). Sabe-se que a Nigericina, um ionóforo derivado de *Streptomyces Hygroscopicus* combinado com LPS, induz a formação do inflamassoma NLRP3, que por sua vez aumenta a produção de IL-1 β (LOPEZ-

CASTEJON; BROUGH, 2011; KAUSHIK et al, 2018; GAO et al, 2021). A IL-1 β é central na resposta inflamatória, onde uma secreção contínua desta citocina pode levar a um estado inflamatório persistente e consequente dano tecidual (WYNN et al, 2016; KANEKO et al., 2019). Apesar de ser conhecido como um mecanismo de sobrevivência celular em condições de estresse, uma falha na maquinaria da autofagia pode contribuir para o aumento da secreção de IL-1 β , visto que esta maquinaria é responsável pela regulação da secreção desta citocina (HARRIS, 2013).

Um estudo realizado com macrófagos derivados de medula óssea provenientes de animais com DM1 após diferenciação em M1 mostrou que houve diminuição nos níveis da proteína LC3 nessas células, em contrapartida, macrófagos do tipo M2 apresentaram aumento nos níveis da mesma proteína (SUNAHARA et al, 2014).

Embora esteja claro que as consequências provenientes do diabetes afetam tanto a mitocôndria quanto o retículo endoplasmático, ainda são necessários estudos avaliando o papel da autofagia no diabetes ou no metabolismo e, portanto, o papel da autofagia na patogênese das complicações diabéticas torna-se imprescindível para a melhor compreensão destes mecanismos e suas consequências.

2 JUSTIFICATIVA

A hiperglicemia causada pela DM1 causa uma série de alterações na homeostase do sistema imune, que favorecem a ativação de respostas pró inflamatórias deletérias para o organismo, a longo prazo.

As infecções estimulam a ativação do inflamassoma e a autofagia surge como um processo homeostático celular que interfere na secreção de insulina pelas células β pancreáticas, ao promover a degradação das mitocôndrias nessas células, regulando negativamente a produção de insulina, reduzindo sua presença na corrente sanguínea. Esta baixa de insulina causa a hiperglicemia, levando a uma inclinação do sistema imune para respostas inflamatórias, podendo levar à uma inflamação sistêmica do organismo.

É proposto que a ativação do inflamassoma esteja relacionada a complicações secundárias da DM1. Durante infecções bacterianas, o LPS presente na superfície das bactérias possui a capacidade de induzir fortemente a resposta inflamatória durante uma infecção, podendo possivelmente agravar o caso do doente quando estimula a via inflamatória num quadro diabético.

Assim, a elucidação da relação desses processos pode contribuir para um maior entendimento do DM1, fornecendo o perfil de resposta imune mediada por macrófagos, que são células importantes na resposta a infecções.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste projeto de mestrado foi de avaliar o efeito da hiperglicemia concomitante ao estímulo por LPS em BMDM de animais diabéticos (D-BMDM) e não diabéticos (ND-BMDM) para caracterização do fenótipo destas células e identificar possíveis alterações no processo de autofagia.

Para tanto, avaliamos:

- A resposta *in vitro* dos macrófagos provenientes de camundongos diabéticos e não diabéticos cultivados em meio normal de glicose (NG) (5,5 mM) e alta concentração de glicose (HG) (25 mM) com ou sem estímulo por LPS (100 ng/mL);
- As concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-1 β no meio de cultivo celular após 30 min; 2; 4; 6 e 24 horas de cultivo;
- As concentrações de Óxido Nítrico no meio de cultivo celular após 2; 4; 6 e 24 horas de cultivo;
- A via de ativação da autofagia (beclin-1 e LC3b) no tempo de 30 minutos;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O presente estudo encontra-se em conformidade com os princípios e diretrizes do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), estando aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (número de protocolo: CEUA / FCF /570). Os animais passaram por um período de 7 dias de aclimação antes de serem submetidos aos experimentos, sendo acomodados em mini-isoladores, com no máximo 3 camundongos, em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo disponibilizados água e ração. Foram colocados acessórios adicionais nas gaiolas para o enriquecimento de ambiente (algodão, iglu, tubos de papelão, etc).

4.2 Indução do Diabetes *mellitus*

Camundongos da linhagem C57B/6J, com idade entre 8 e 12 semanas e peso médio de 18 a 25 gramas. Os animais foram postos em mini-isoladores, cada mini-isolador com no máximo cinco camundongos, passando por um período de 7 dias de aclimação. Iglus, tubos de papelão e papéis foram postos nas gaiolas para enriquecimento ambiental. Os camundongos foram postos em jejum de 12 horas antes da indução. A indução do DMT1 foi realizada via injeção intravenosa de 60 mg/kg de aloxana monohidratada (*Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo*), diluída em solução salina (0.9% NaCl). Após 10 dias da indução, a glicemia dos animais foi mensurada utilizando o equipamento *Accu-Chek Advantage II (Roche Diagnostics, São Paulo, SP, Brazil)*. Os animais não diabéticos receberam apenas solução fisiológica pela mesma via. Somente foram considerados animais diabéticos, aqueles que apresentaram glicemia superior a 300 mg/dL (QUEIROZ et al., 2021; e SPILLER et al., 2012).

4.3 Coleta dos macrófagos derivados de medula óssea e tratamento

Após 10 dias de indução do diabetes, foi feita a eutanásia dos camundongos com cloridrato de cetamina (270mg/kg) em conjunto com cloridrato de xilasina (30mg/kg). Os BMDMs foram coletados conforme descrito por MARIM et al. (2010). Primeiramente, foi realizada uma excisão cirúrgica da medula óssea dos fêmures dos animais e as células coletadas foram incubadas em meio R20/30 (meio RPMI-1640 (Gibco, *Gaithersburg, MD, USA Sigma-Aldrich*), com 20% de soro fetal bovino (SBF) (*Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, USA*) e 30% de indutor de diferenciação de macrófagos obtidos de meio condicionado da cultura do cultivo de fibroblastos L929 (LCCM), durante sete dias, onde no quarto dia, foi feita a suplementação

da cultura com meio R20/30. Após sete dias, os macrófagos foram coletados utilizando Tampão fosfato-salino (PBS) refrigerado, centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos a 4 °C, e ressuspensos em meio R10/5 (RPMI 10% de soro fetal bovino e 5% de LCCM). As células foram então contadas utilizando azul de trypan (Gibco® *by life technologies ThermoFisher Scientific*), e determinadas em câmara de Neubauer. O volume final da suspensão, contendo 1×10^6 de células por mL, foi distribuído em quatro poços (2 mL por poço, totalizando 2×10^6 células por poço) e incubados na estufa a 37°C, 5% CO₂ para adesão. Após 12 horas, as células foram cultivadas em concentração normal (5,5 mM) e em alta concentração de glicose (25 mM) e foram estimuladas ou não com LPS na concentração de 100 ng/mL e Nigericina na concentração de 20 μM (CARLOS et al., 2017; AYALA et al., 2019) nos tempos de 30 minutos, 2, 4, 6 e 24 horas.

4.4 Avaliação da via da autofagia

Os macrófagos foram lisados, e as proteínas liberadas foram quantificadas pelo método do ácido bicinonínico (BCA) e a análise das proteínas da via da autofagia foi realizada pelo método de *Western blot*. Os experimentos foram efetuados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10-15% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1%, conforme orientação do fabricante (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). Para conservação, foi adicionado tampão de amostra no lisado, sendo incubados em banho seco por 5 minutos à 95°C e aplicados no gel de poliacrilamida-SDS. A separação das proteínas foi realizada em cuba de eletroforese (tampão de corrida: Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,5%) a 125V por cerca de 120 minutos. Após a eletroforese, foi realizada a transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%; metanol 20%), a 60 mA durante 60 minutos. Em seguida, a membrana de nitrocelulose passou pela etapa de bloqueio, utilizando-se a solução de bloqueio (*bovine serum albumin (BSA)* a 5% em tampão Tris-salina (TBS)-Tween (TBST)) durante 1 hora para minimizar as ligações inespecíficas. Após a etapa de bloqueio, as membranas foram incubadas em anticorpo primário na diluição de 1:1000, *overnight*, sob agitação à 4°C. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário por 1 hora (Abcam) na diluição de 1:20000. Em todas as etapas de incubação, foi realizada a lavagem das membranas com TBST durante 10 minutos por 3 vezes consecutivas. Para a revelação, foi utilizado ECL (*enhanced chemiluminescence - ECL; Amersham, Arlington Heights, IL*) no equipamento *Amersham Imager 680 blot and gel imager (Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom)*. Foram utilizados os anticorpos primários anti-mouse LC3B (2775S) e anti-mouse Beclin-1 (#3738) adquiridos da *Cell*

Signaling Technology (Beverly, MA, USA), para detectar as proteínas alvo, e o anticorpo secundário HRP-conjugado anti-mouse IgG (#7074S). As densidades relativas das bandas foram determinadas por meio de análise densitométrica utilizando o *software ImageJ*. Os valores de densidade das bandas foram normalizados com anticorpo anti-mouse β -actina (048M4859V) (*Cell Signaling Technology*[®]).

4.5 Quantificação de citocinas por ensaio imunoenzimático.

As concentrações séricas de TNF- α , IL-6 e IL-1 β foram avaliadas em amostras do sobrenadante da cultura celular pela técnica de ensaio imunoenzimático (*R&D Systems, Minneapolis, EUA*). Inicialmente, uma placa de 96 poços foi sensibilizada adicionando-se 80 μ L/poço do anticorpo de captura, anti-TNF- α , anti-IL10, anti-IL-6 ou anti-IL-1 β . Após incubação *overnight*, a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e realizou-se a lavagem das placas por 3 vezes com o tampão de lavagem (aproximadamente 300 μ L/poço). Após a lavagem, as placas foram bloqueadas por 1 hora, adicionando-se 300 μ L/poço de reagente diluente (BSA a 1% em PBS), em temperatura ambiente (20 a 26°C). As placas foram lavadas novamente (3 vezes) com o tampão de lavagem. Foram adicionadas 80 μ L/poço do padrão ou das amostras, procedendo-se à incubação da placa por 2 horas, em temperatura ambiente. Para a curva padrão, um *vial* proveniente do kit foi reconstituído em 0.5 mL de reagente diluente, realizando-se uma diluição seriada, obtendo uma curva de concentrações de 15,625; 31,25; 62,50; 125; 250; 500; 1.000; e 2.000 pg/mL. Após incubação das amostras e etapa de lavagem, foram adicionados 80 μ L/poço do anticorpo de detecção e a placa foi incubada por 2 horas, em temperatura ambiente. Ao término da incubação, o ciclo de lavagem da placa foi repetido e, em seguida, adicionaram-se 80 μ L/poço da enzima estreptavidina peroxidase, na proporção 1:200 de enzima PBS com 1% de BSA, com incubação de 20 minutos, em temperatura ambiente, e protegida da luz. Em seguida, o ciclo de lavagem da placa foi repetido e a reação foi revelada pela adição de 80 μ L/poço de tetrametilbenzidina: H₂O₂, incubação (20 minutos), à temperatura ambiente, e protegida da luz. A reação foi bloqueada adicionando-se 40 μ L/poço de H₂SO₄ (2M) e avaliando-se a densidade óptica das amostras a 450 nm e 540nm, imediatamente após o bloqueio da reação.

4.6 Quantificação de Óxido Nítrico

Para a dosagem sérica de óxido nítrico, realizamos o método de reação de GRIESS utilizando o sobrenadante obtido após 2, 4, 6 e 24 horas de incubação. As amostras foram

adicionadas em placa de 96 poços (50µL/poço) e incubadas com a reação GRIESS (1% sulfanilamida/0,1% N- (1-naftil) etilenodiamina dicloridrato /2,5% H₃PO₄) por 15 minutos em temperatura ambiente. A curva padrão foi obtida pela diluição de nitrito de sódio (100µM) em meio RPMI, obtendo-se uma curva de 0; 5; 10; 20; 40; 60; 80; 100 µM. A densidade óptica das amostras foi obtida a 540 nm em leitor de microplacas.

4.7 Análise estatística

Os resultados foram avaliados utilizando *GraphPad 8 software (San Diego, CA, USA)*, por análise de variância *two-way* (ANOVA) seguida por teste estatísticos de múltiplas comparações de Tukey-Kramer, Sidak, ou teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Considerando-se significativo $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

O presente estudo avaliou o efeito da hiperglicemia concomitante ao estímulo por LPS e LPS+Nigericina em macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) de animais diabéticos (D-BMDM) e não diabéticos (ND-BMDM) identificando alterações na resposta inflamatória.

A realização da análise foi feita pelo método de comparação entre BMDM de animais diabéticos e não diabéticos, verificando o comportamento dessas células quando cultivadas em alta concentração de glicose *in vitro*

5.1 Modelo experimental de diabetes *mellitus* tipo 1

Após os 10 dias de indução por aloxana, os animais apresentaram redução de massa corpórea (no dia 0: 27,35g; após 10 dias de indução: 24,68g; n=13 p<0.005; Figura 1), quanto a sua glicemia, os animais apresentaram um aumento de glicose sanguínea (no dia 0: 155,46mg/dL; após 10 dias de indução: 582,15mg/dL, n=13; p<0.005; Figura 2).

Varição de massa corpórea após 10 dias

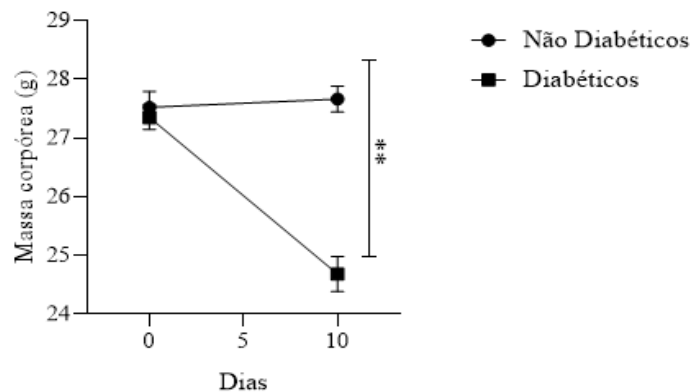


Gráfico 1 – Variação de massa corpórea após indução do diabetes: Após o tratamento com o agente diabetogênico Aloxana (60mg/kg), observou-se que os animais induzidos apresentaram perda de peso significativa. Resultados expressos em teste Sidak de comparação simultânea **p<0.005, n=13.

Evolução da glicemia após 10 dias

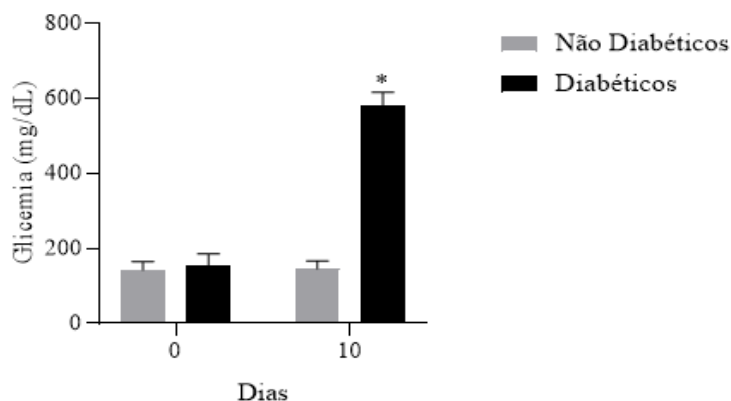


Gráfico 2 – Evolução da glicemia após indução do diabetes: Animais diabéticos apresentaram aumento da glicemia após 10 dias de indução com o agente diabetogênico. Resultados expressos em teste Sidak de comparação simultânea **p<0.005, n=13 (total).

5.2 O envolvimento da hiperglicemia no processo de autofagia em BMDM de animais diabéticos estimulados com LPS+Nigericina

Para avaliar a via da autofagia em BMDMs, foi avaliada a expressão das proteínas LC3B e Beclin-1 pelo método de *Western Blot*, no tempo de 30 minutos. Identificamos que, após 30 minutos de incubação, ND-BMDM e D-BMDM tiveram um aumento na expressão de LC3B em meio hiperglicêmico sem estímulo (Figura 2B). Ao avaliarmos a proteína Beclin-1, observamos que ND-BMDM tiveram uma diminuição na expressão dessa proteína em meio hiperglicêmico, com estímulo (Figura 2C).

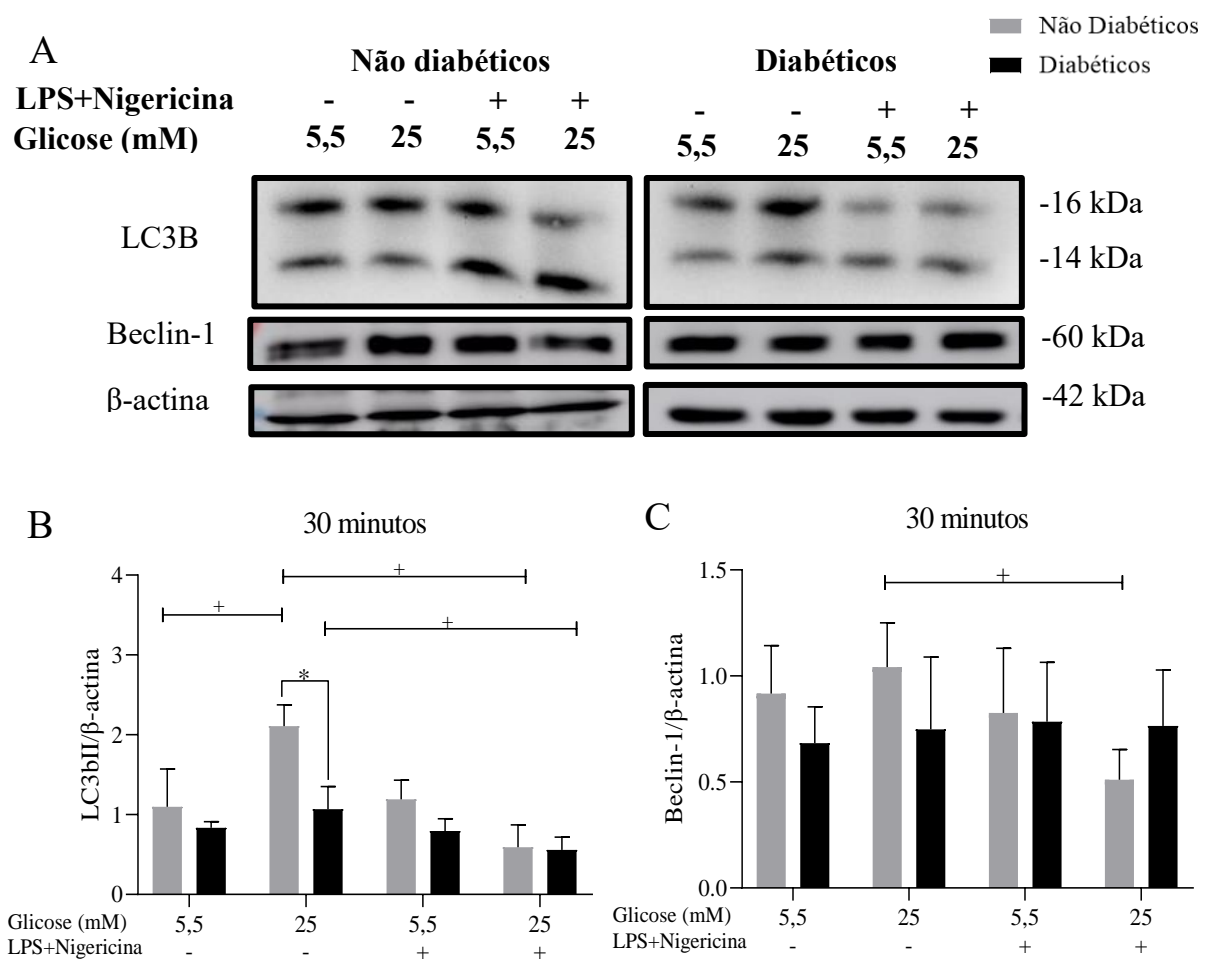


Figura 2 – Avaliação da via da autofagia. (A) Expressão (B) Nível de proteínas LC3b/β-actina no tempo de 30 minutos. +P<0.05 ND-BMDM 5.5mM- vs ND-BMDM 25mM-; +P<0.05 ND-BMDM 25mM- vs ND-BMDM 25mM+; +P<0.05 D-BMDM 25mM- vs D-BMDM 25mM+; *P<0.05 ND-BMDM 25mM- vs D-BMDM 25mM-. (C) Nível de proteínas Beclin-1/β-actina após 30 minutos de tratamento. +P<0.05 ND-BMDM 25mM- vs ND-BMDM 25mM. Os resultados representam a média ± EPM. N = 3-6.

5.3 Secreção da citocina IL-6 em BMDM de animais diabéticos estimulados com LPS + Nigericina

Também investigamos o efeito da hiperglicemia concomitante ao estímulo por LPS+Nigericina para avaliar a secreção da citocina pró-inflamatória IL-6. Após 2, 4, 6 e 24 horas de incubação, os BMDMs de animais diabéticos e não diabéticos liberaram uma maior quantidade de IL-6 nas concentrações de 5,5 e 25 mM de glicose, com estímulo por LPS+Nigericina (Figura 3).

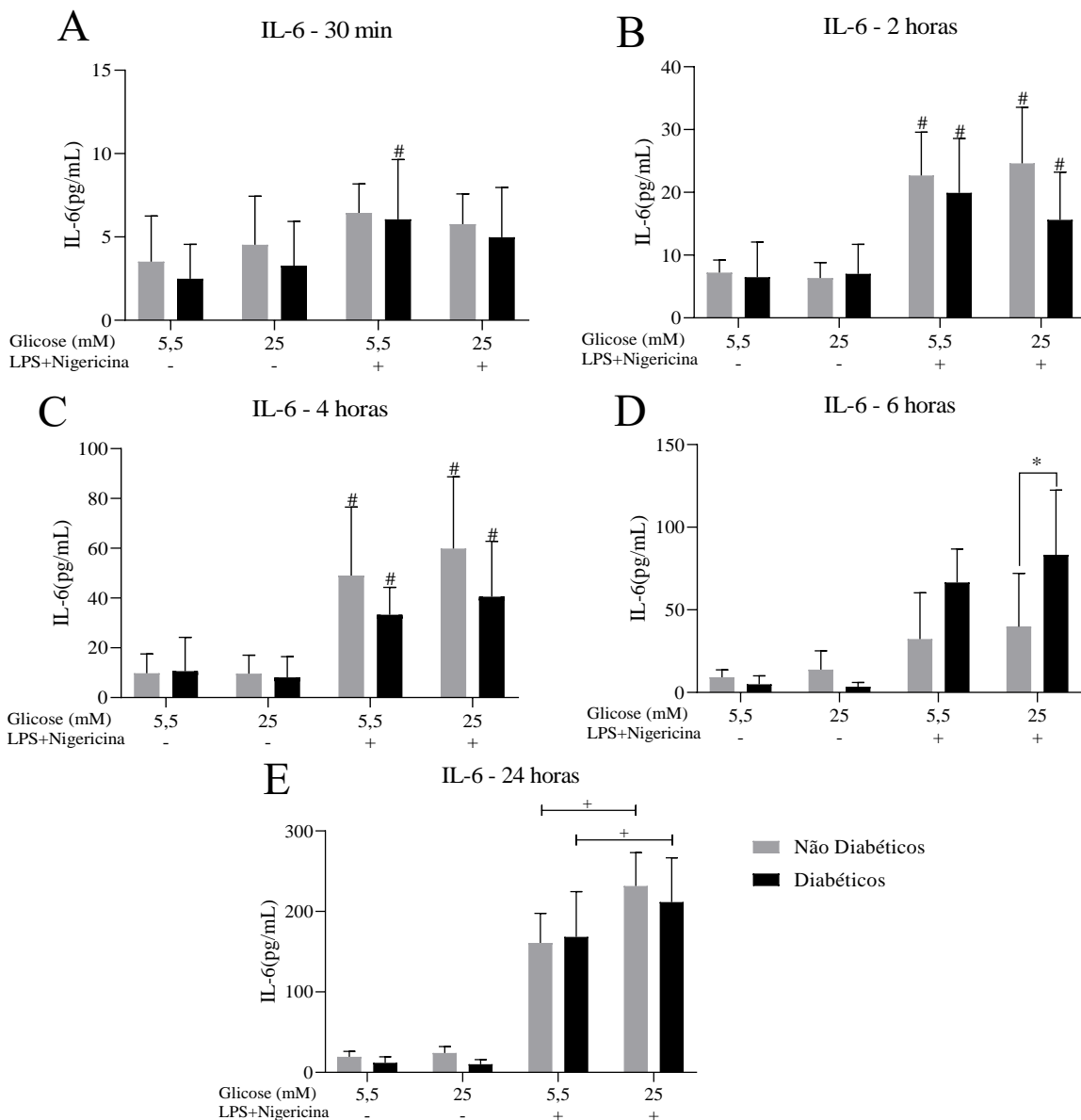


Figura 3 - Secreção de IL-6 por ND-BMDM e D-BMDM com *priming* de Nigericina. (A) 30 minutos com diferentes concentrações de glicose. # $P < 0.05$ D-BMDM 5.5Mm+ vs D-BMDM 5.5mM-. (B) 2 horas com diferentes concentrações de glicose. # $P < 0.05$ estimulados vs não estimulados. (C) 4 horas com diferentes concentrações de glicose. # $P < 0.05$ estimulados vs não estimulados. (D) 6 horas com diferentes concentrações de glicose. * $P < 0.05$ D-BMDM 25 Mm+ vs ND-BMDM 25mM+. (E) 24 horas com diferentes concentrações de glicose. + $P < 0.05$ 5.5mM+ vs 25mM+. A dosagem de IL-6 foi realizada pelo ensaio de imun absorção enzimática. Os resultados representam a média \pm EPM. N = 7-13 por grupo.

5.4 Secreção da citocina TNF- α em BMDM de animais diabéticos estimulados com LPS + Nigericina

Investigamos o efeito da hiperglicemia concomitante ao estímulo por LPS para avaliar a secreção da citocina pró-inflamatória TNF- α . Após 30 minutos, 2, 4, 6 e 24 horas de incubação, os BMDM de animais diabéticos e não diabéticos liberaram uma maior quantidade de TNF- α nas concentrações de 5,5 e 25 mM de glicose, com estímulo de LPS+Nigericina (Figura 4).

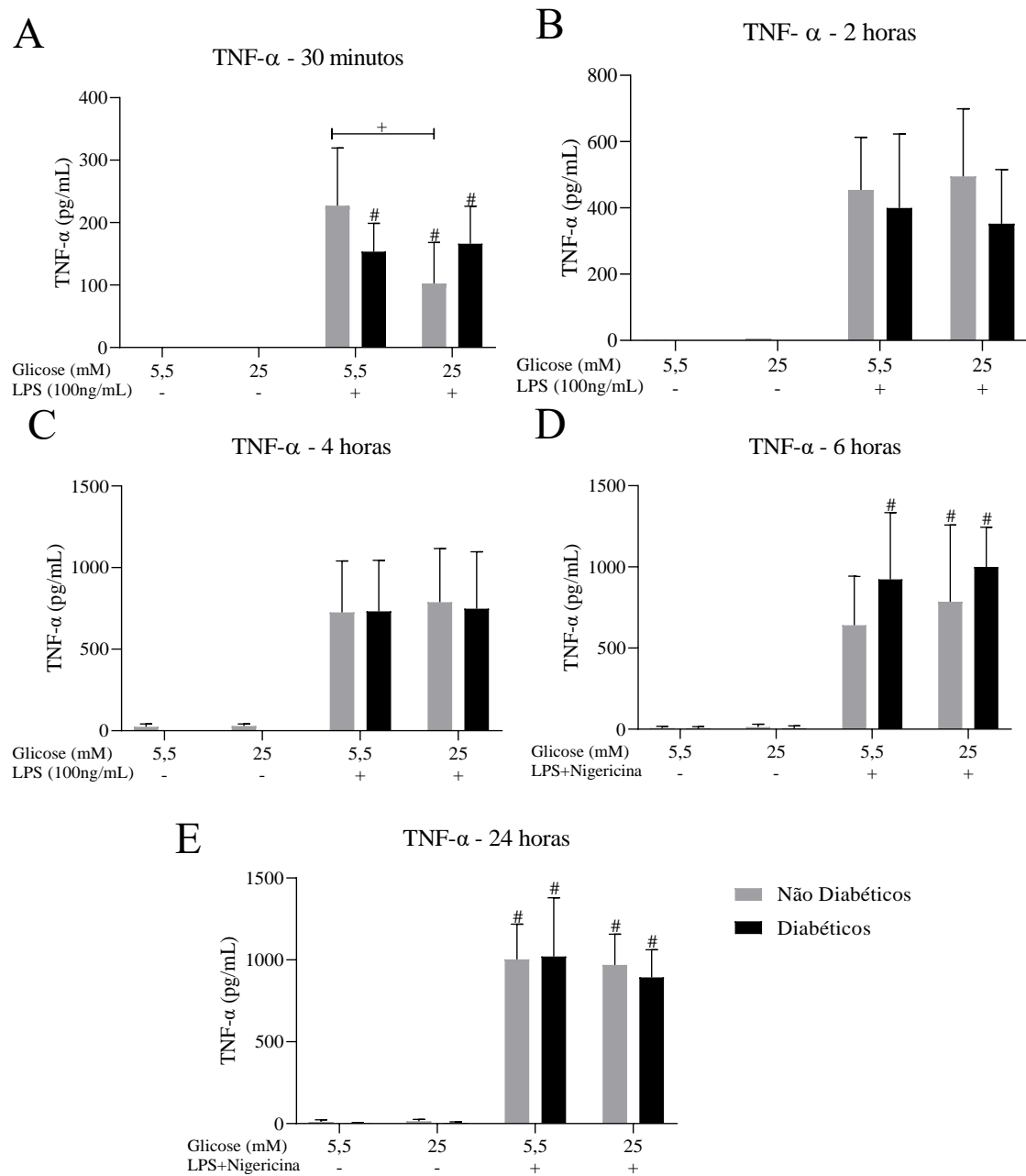


Figura 4 - Secreção de TNF- α por ND-BMDM e D-BMDM com priming de Nigericina. Liberação de TNF- α (A) 30 minutos com diferentes concentrações de glicose. (B) 2 horas com diferentes concentrações de glicose. (C) 4 horas com diferentes concentrações de glicose. (D) 6 horas com diferentes concentrações de glicose. (E) 24 horas com diferentes concentrações de glicose. # $P < 0.05$ estimulados vs não estimulados. Os resultados representam a média \pm EPM. N = 7-13 por grupo.

5.5 Secreção da citocina IL-1 β em BMDM de animais diabéticos estimulados com LPS + Nigericina

A secreção da citocina IL-1 β frente ao efeito da hiperglicemia concomitante ao estímulo por LPS+Nigericina também foi avaliada. Foi observado que após 30 minutos, 2, 4, 6 e 24 horas de incubação, os BMDM de animais diabéticos e não diabéticos liberaram uma maior quantidade de IL-1 β nas concentrações de 5,5 e 25 mM de glicose, com estímulo de LPS+Nigericina (Figura 5).

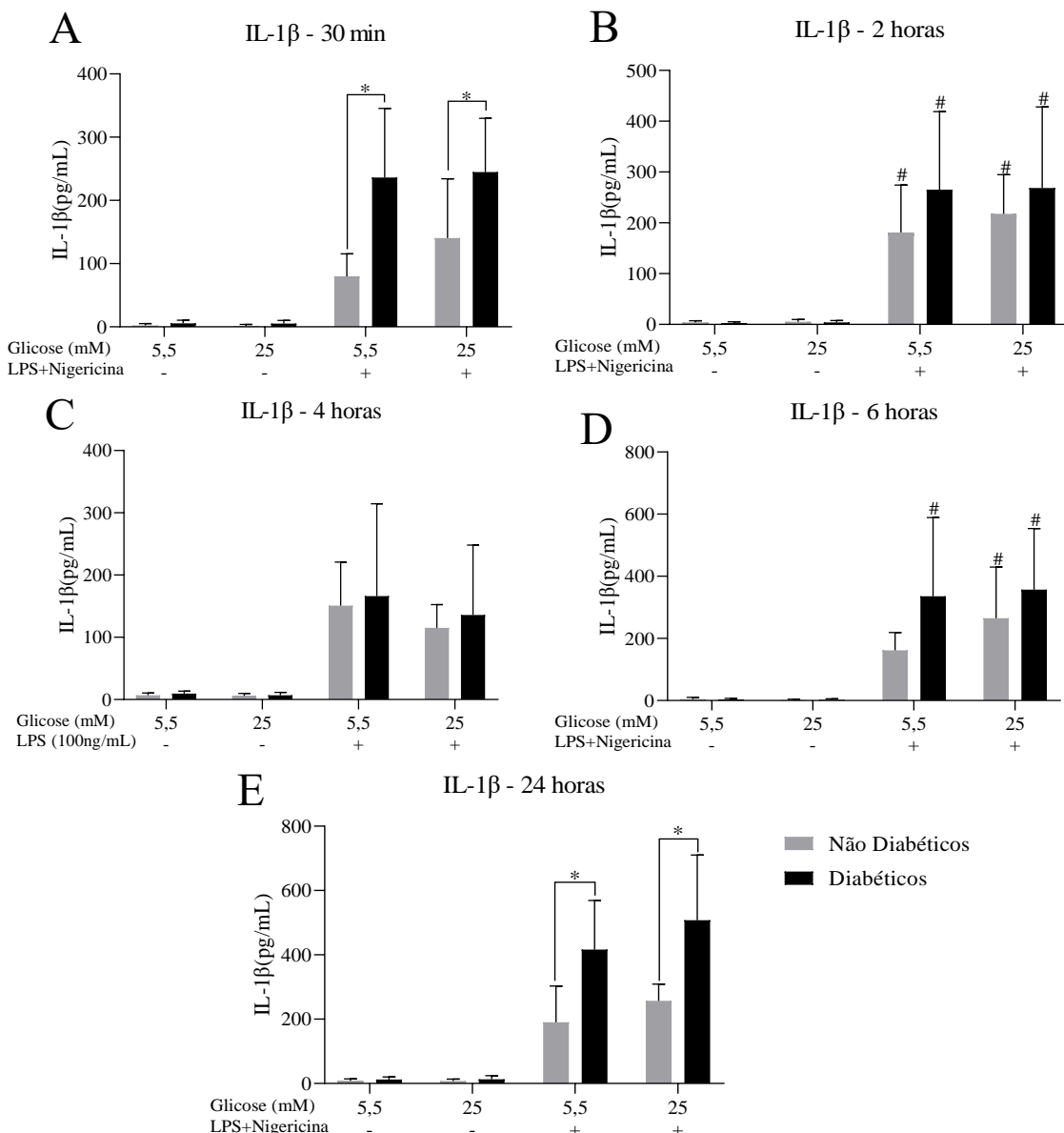


Figura 5 - Secreção de IL-1 β por ND-BMDM e D-BMDM com priming de Nigericina. Liberação de IL-1 β após (A) 30 minutos com diferentes concentrações de glicose. * $P < 0.05$ D-BMDM 5.5mM+ vs ND-BMDM 5.5mM+. * $P < 0.05$ D-BMDM 25mM+ vs ND-BMDM 25mM+. (B) 2 horas com diferentes concentrações de glicose. # $P < 0.05$ estimulados vs não estimulados. (C) 4 horas com diferentes concentrações de glicose. (D) 6 horas com diferentes concentrações de glicose. # $P < 0.05$ grupos estimulados vs não estimulados. (E) 24 horas com diferentes concentrações de glicose. * $P < 0.05$ D-BMDM 25mM+ vs ND-BMDM 25mM+. A dosagem de IL-1 β foi realizada pelo ensaio de imun absorção enzimática. Os resultados representam a média \pm EPM. N = 7-13.

5.6 Secreção de IL-10 em BMDM de animais diabéticos estimulados com LPS + Nigericina

A secreção de IL-10 frente ao efeito da hiperglicemia concomitante ao estímulo por LPS+Nigericina também foi avaliada (Figura 6). Não foram identificadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

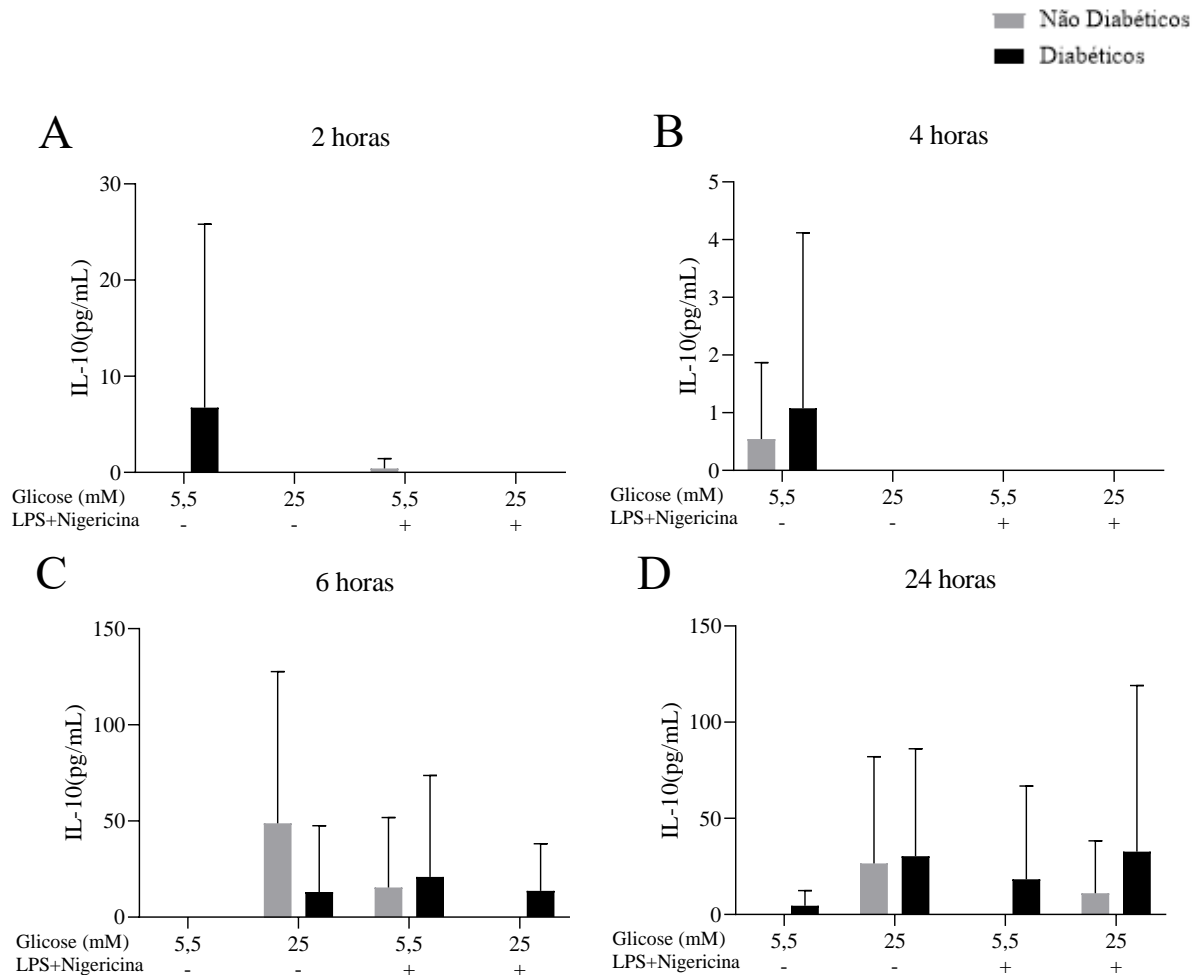


Figura 6 - Secreção de IL-10 por ND-BMDM e D-BMDM com *priming* de Nigericina. Liberação de IL-10 após (A) 2 horas com diferentes concentrações de glicose. (B) 4 horas com diferentes concentrações de glicose. (C) 6 horas com diferentes concentrações de glicose. (D) 24 horas com diferentes concentrações de glicose. A dosagem de IL-1 β foi realizada pelo ensaio de imunoabsorção enzimática. Os resultados representam a média \pm EPM. N = 6-8.

5.7 Secreção de Óxido Nítrico em BMDM de animais diabéticos estimulados com LPS + Nigericina

A secreção de óxido nítrico frente ao efeito da hiperglicemia concomitante ao estímulo por LPS+Nigericina também foi avaliada (Figura 7). Não foram identificadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

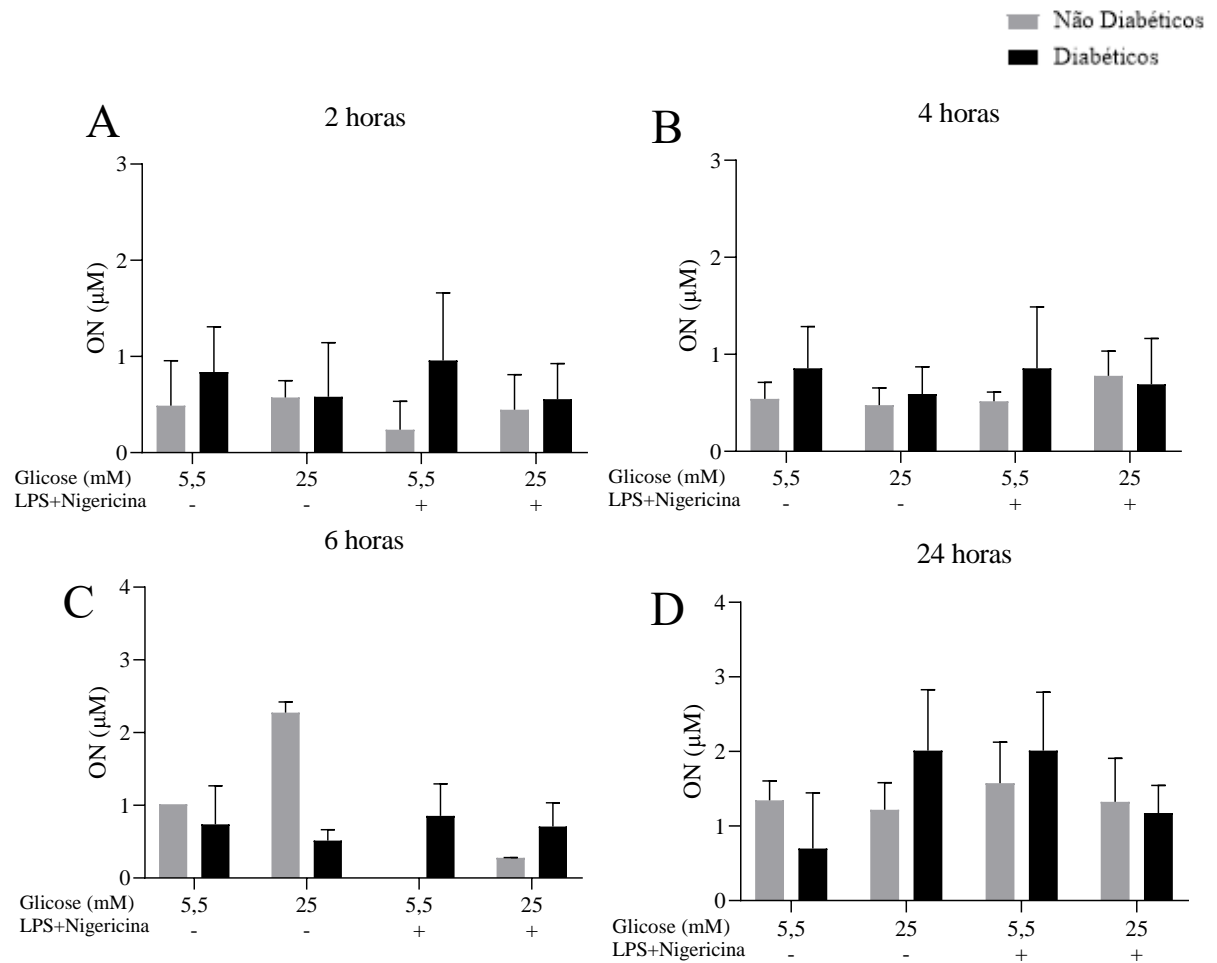


Figura 7 - Secreção de Óxido Nítrico por ND-BMDM e D-BMDM com *priming* de Nigericina. Liberação de óxido nítrico após (A) 30 minutos com diferentes concentrações de glicose. (B) 2 horas com diferentes concentrações de glicose. (C) 4 horas com diferentes concentrações de glicose. (D) 6 horas com diferentes concentrações de glicose. (E) 24 horas com diferentes concentrações de glicose. A dosagem de óxido nítrico foi realizada por método de reação de Griess. Os resultados representam a média \pm EPM. N = 6-8.

6. DISCUSSÃO

A destruição autoimune das células beta produtoras de insulina interfere diretamente no metabolismo da glicose, levando a um estado hiperglicêmico crônico (WILCOX et al., 2016). A hiperglicemia crônica presente no DM1 vem sendo associada com o desenvolvimento de diversas complicações patológicas, incluindo distúrbios no sistema imune (NAGAREDDY et al., 2013; TENCEROVA et al., 2015; FAINSOD-LEVI et al., 2017; LI et al., 2021). Em nossos estudos, investigamos os efeitos da hiperglicemia na resposta inflamatória *in vitro* de macrófagos estimulados com LPS e Nigericina e a influência da alta concentração de glicose no processo de autofagia. A realização da análise tem sido feita pelo método de comparação entre BMDM de animais diabéticos e não diabéticos, verificando o comportamento dessas células quando cultivadas em alta concentração de glicose *in vitro*. Nos resultados em BMDMs estimulados apenas com LPS, foi possível verificar alterações significantes nas secreções das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β por BMDM de animais diabéticos. Também identificamos alterações na expressão de proteínas envolvidas na indução da autofagia, onde ocorreu o aumento de LC3b e Beclin-1 em meio hiperglicêmico, sem estímulo e diminuição da expressão de LC3b em meio hiperglicêmico, com estímulo, no tempo de 30 minutos por ND-BMDM e D-BMDM. Também observamos alterações na secreção de óxido nítrico no tempo de 6 horas por macrófagos de animais diabéticos e no tempo de 24 horas por macrófagos de animais saudáveis.

Após 10 dias da indução com aloxana, os animais apresentaram as características do DM1, com altas taxas de glicose circulante (>300mg/dL) e perda de massa corpórea (AYALA et al., 2019), sinais análogos aos observados no DM1 em humanos (IDF, 2021). A indução do diabetes ocorre pela administração de ALOX via intravenosa que vai atuar inibindo a enzima glicoquinase, e induzindo produção de EROs, levando a necrose das células β , estabelecendo o quadro insulino-dependente (LENZEN, 2008). O estado hiperglicêmico causado pela ausência de insulina é o principal fator associado ao desenvolvimento das patologias relacionadas ao DM1, onde a alta concentração de glicose aumenta a produção de superóxido, levando ao estresse oxidativo e consequente dano celular, que foi mimetizado com sucesso pelo agente diabetogênico escolhido para este estudo (KATSAROU et al., 2017).

Sabe-se que pacientes diabéticos desenvolvem inflamação crônica caracterizada por uma produção desregulada de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (RAMALHO et al., 2018). Além disto, já foi identificado que pacientes diabéticos apresentam uma inflamação de baixo grau que pode influenciar no desenvolvimento de outras

comorbidades associadas ao diabetes (SARAHEIMO et al., 2003; MANGGE et al., 2004; BONNET et al., 2018). Já foi que macrófagos peritoneais quando expostos a altos níveis de glicose secretam maiores quantidades de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 (PAN et al., 2012; TORRES-CASTRO et al., 2016). Estudos realizados por Cheng e colaboradores (2015) identificaram que células RAW264.7 aumentam significativamente a produção de TNF- α após serem expostas a altos níveis de glicose (CHENG et al., 2015). Também foi reportado que BMDM quando cultivados em meio hiperglicêmico, secretavam maiores quantidades de TNF- α , porém a expressão de IL-6 nas mesmas condições se encontrava diminuída (AYALA et al., 2019). No entanto, em nossos estudos observamos que os altos níveis de glicose não foram suficientes para aumentar a secreção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 pelos macrófagos. Porém, quando estimulados por LPS, houve um aumento significativo na secreção destas citocinas. Nossos achados corroboram com estudos onde foi reportado que altas concentrações de glicose (15mM, 25mM) não alteram a expressão de TNF- α e IL-6 por macrófagos, porém, quando estimulados com LPS, a secreção destas citocinas aumenta, mostrando que a hiperglicemia não é um estímulo suficiente para a produção elevada destas citocinas em macrófagos (LACHMANDAS et al., 2015; TORRES-CASTRO et al., 2016). Tessaro e colaboradores (2020) reportaram que macrófagos de diferentes sítios provenientes de animais diabéticos possuem uma resposta desregulada quando estimulados por LPS, fazendo com que o controle da inflamação seja prejudicado (TESSARO et al., 2020).

A Nigericina é um indutor da via do inflamassoma NLRP3, onde a formação deste complexo resulta na produção de IL-1 β (KELLEY et al., 2019). Em nossos estudos, observamos que BMDM estimulados secretaram esta citocina, o que sugere que a via do inflamassoma esteja ativada nestes macrófagos. Além disto, D-BMDM secretaram IL-1 β em maior quantidade quando comparados com ND-BMDM, sugerindo que macrófagos de animais diabéticos já estão previamente sensibilizados pela hiperglicemia, onde o estado hiperglicêmico aumenta a produção de EROs, que por sua vez regula a via do inflamassoma, aumentando a produção de IL-1 β (HARIJITH et al., 2014; RENDRA et al., 2019; SILWAL et al., 2020; ZHANG et al., 2021).

Já está descrito que hiperglicemia causa dano mitocondrial, aumentando a produção de EROs, o que leva a ativação do processo de autofagia (PARK et al., 2013; IGHODARO, 2018; MA et al., 2013; RENDRA et al., 2019). A proteína LC3b está envolvida na mitofagia (PADMAN et al., 2019), um processo que remove mitocôndrias disfuncionais pela maquinaria autofágica (BHARATH et al., 2021). Sabe-se que alterações na via da autofagia podem interferir diretamente na resposta inflamatória de indivíduos diabéticos, tornando-os

susceptíveis ao desenvolvimento de infecções, visto que um defeito na maquinaria autofágica pode dificultar a eliminação de patógenos e organelas defeituosas, interferindo no pleno funcionamento das células do sistema imune, (LEVINE et al., 2011; CADWELL, 2016; RACANELLI et al., 2018; SIL; MUSE; MARTINEZ et al., 2018; SIQUEIRA et al., 2018; GERMIC et al., 2019; HAIT et al., 2020).

Em nossos estudos observamos que esta proteína, junto com a Beclin-1, teve uma alta expressão por ND-BMDM, quando comparamos aos D-BMDM em meio hiperglicêmico sem estímulo, o que nos permite sugerir que isso se deve ao processo normal de regulação celular, indicando que a via da autofagia está prejudicada em macrófagos de animais diabéticos, o que reforça que essas células já estão pré-sensibilizadas ao serem expostas ao quadro hiperglicêmico *in vivo* (CAO et al., 2018; FENG et al., 2019; DARIOS et al., 2020; PAINTER et al., 2020). Porém, observamos a redução da expressão de LC3b por ND-BMDMs e D-BMDMs estimulados em meio hiperglicêmico. Nossos achados corroboram com estudos que mostraram a diminuição do processo de autofagia em macrófagos e podócitos expostos a altas concentrações de glicose com a via do inflamassoma ativada (XIN et al., 2016; DAI et al., 2017). Como a via da autofagia é responsável pela regulação da secreção de IL-1 β (HARRIS, 2013), a falha na maquinaria desta via também pode estar contribuindo para o aumento da liberação desta citocina identificado em nosso estudo. A relação do processo de autofagia e a secreção da citocina IL-1 β vem sendo amplamente estudada, onde já foi reportado que este processo é responsável por sequestrar esta citocina e impedir sua secreção (HARRIS et al., 2017). Além disto, a secreção contínua de IL-1 β atua nos macrófagos mantendo seu fenótipo pró-inflamatório, o que por sua vez prejudica a resolução de infecções (MIRZA et al., 2013).

Com as alterações identificadas em nosso estudo, podemos observar que a hiperglicemia desempenha um papel importante na resposta inflamatória de BMDMs provenientes de camundongos diabéticos, onde observamos que o estado hiperglicêmico, quando combinado com o estímulo por LPS e Nigericina, aumentou a secreção IL-1 β e diminuiu a produção de óxido nítrico e a atividade autofágica dos macrófagos, processos que interferem diretamente na resolução de infecções por estas células.

6. CONCLUSÃO

Visto as diferenças observadas neste estudo, podemos inferir que a alta concentração de glicose altera as vias inflamatórias em macrófagos estimulados por LPS, causando um desequilíbrio na homeostasia celular através do processo de autofagia prejudicado, e desregulando a secreção de citocinas pró-inflamatórias por essas células, fazendo com que a resposta de camundongos frente a infecções seja descompensada. Além disto, observamos que a sensibilização desempenhada pela hiperglicemia nos macrófagos interfere no processo de autofagia, prejudicando a eliminação de moléculas danificadas, influenciando diretamente na homeostasia celular.

7 REFERÊNCIAS

- ACHARJEE, Satarupa et al. Understanding type 1 diabetes: etiology and models. **Canadian journal of diabetes**, v. 37, n. 4, p. 269-276, 2013.
- ALAM, Uazman et al. General aspects of diabetes mellitus. **Handbook of clinical neurology**, v. 126, p. 211-222, 2014.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care**. v. 41, 2018.
- ARNUSH, Marc et al. IL-1 produced and released endogenously within human islets inhibits beta cell function. **The Journal of clinical investigation**, v. 102, n. 3, p. 516-526, 1998.
- ATKINSON, Mark A.; EISENBARTH, George S.; MICHELS, Aaron W. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 383, n. 9911, p. 69-82, 2014.
- AYALA, Thais Soprani et al. High glucose environments interfere with bone marrow-derived macrophage inflammatory mediator release, the TLR4 pathway and glucose metabolism. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.
- BANDUSEELA, Varuna C. et al. Impaired autophagy, chaperone expression, and protein synthesis in response to critical illness interventions in porcine skeletal muscle. **Physiological genomics**, v. 45, n. 12, p. 477-486, 2013.
- BHARATH, Leena P.; ROCKHOLD, Jack Donato; CONWAY, Rachel. Selective Autophagy in Hyperglycemia-Induced Microvascular and Macrovascular Diseases. **Cells**, v. 10, n. 8, p. 2114, 2021.
- BYRNE, Adam J.; MAHER, Toby M.; LLOYD, Clare M. Pulmonary macrophages: a new therapeutic pathway in fibrosing lung disease?. **Trends in molecular medicine**, v. 22, n. 4, p. 303-316, 2016.
- CADWELL K. Crosstalk between autophagy and inflammatory signalling pathways: balancing defence and homeostasis. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n.11, p661–675, 2016.
- CASAGRANDE, Felipe Beccaria et al. Insulin Modulates Inflammatory Cytokine Release in Acute Stages and Augments Expression of Adhesion Molecules and Leukocytes in Lungs on Chronic Stages of Paracoccidioidomycosis. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 583385, 2020.
- CANTOR, Joseph; HASKINS, Kathryn. Recruitment and activation of macrophages by pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes: evidence for involvement of CCR8 and CCL1. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 9, p. 5760-5767, 2007.
- CAO, Y., LUO, Y., ZOU, J., OUYANG, J., CAI, Z., ZENG, X., ... & ZENG, T. Autophagy and its role in gastric cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 489, p. 10-20, 2019.
- CARLOS, Daniela et al. Mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome and predisposes to type 1 diabetes in murine model. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 164, 2017.
- CHENG, Cheng-I. et al. High glucose activates Raw264. 7 macrophages through RhoA kinase-mediated signaling pathway. **Cellular signalling**, v. 27, n. 2, p. 283-292, 2015.

CRUZ, Cristiane M. et al. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 5, p. 2871-2879, 2007.

CURI, Rui et al. A past and present overview of macrophage metabolism and functional outcomes. **Clinical Science**, v. 131, n. 12, p. 1329-1342, 2017.

DA SILVA, Valter Dias et al. Comparison of induction of Diabetes mellitus with alloxan in different doses in Wistar rats. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4Supl, p. 2463-2470, 2014.

DA SILVA, Valter Dias; NOGUEIRA, Rosa Maria Barilli. Diabetes mellitus experimental induzido com aloxana em ratos Wistar. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 1, 2015.

DAI, Jiezhi et al. Autophagy inhibition contributes to ROS-producing NLRP3-dependent inflammasome activation and cytokine secretion in high glucose-induced macrophages. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 247-256, 2017.

DARIOS, F.; STEVANIN, G. Impairment of Lysosome Function and Autophagy in Rare Neurodegenerative Diseases. **J Mol Biol.**, v.432, n.8, p.2714-2734, 2020.

DASHTY, Monireh. A quick look at biochemistry: carbohydrate metabolism. **Clinical biochemistry**, v. 46, n. 15, p. 1339-1352, 2013.

DAVIES, Luke C. et al. Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. **Nature communications**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2013.

DELGADO, M.; SINGH, S.; DE HARO, S.; MASTER, S.; PONPUAK, M.; DINKINS, C.; ORNATOWSKI, W.; VERGNE, I.; DERETIC, V. Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity. **Immunological Reviews**, v. 227, n. 1, p.189-202, 2009.

DERETIC, V.; KIMURA, T.; TIMMINS, G.; MOSELEY, P.; CHAUHAN, S.; MANDELL, M. Immunologic manifestations of autophagy. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 125, n. 1, p.75-84, 2015.

DONOHUE JR, Terrence M. Autophagy and ethanol-induced liver injury. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 15, n. 10, p. 1178, 2009.

DOSTERT, Catherine et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. **Science**, v. 320, n. 5876, p. 674-677, 2008

DUNCANSON F.; DOHERTY T.M.; LIN L.; SPELLBERG B. Diabetes Exacerbates Infection via Hyperinflammation by Signaling through TLR4 and RAGE. **Mbio**, v. 8, n. 4, p.1-15, 2017.

EDHOLM, Eva-Stina; RHOO, Kun Hyoe; ROBERT, Jacques. Evolutionary aspects of macrophages polarization. **Macrophages**, p. 3-22, 2017.

FAINSOD-LEVI, Tanya et al. Hyperglycemia impairs neutrophil mobilization leading to enhanced metastatic seeding. **Cell reports**, v. 21, n. 9, p. 2384-2392, 2017.

FENG, Y., LIU, B., ZHENG, X., CHEN, L., CHEN, W., FANG, Z. The protective role of autophagy in sepsis. *Microbial pathogenesis*, v. 131, p. 106-111, 2019.

GAO, Guanzhuang et al. Evidence of nigericin as a potential therapeutic candidate for cancers: A review. ***Biomedicine & Pharmacotherapy***, v. 137, p. 111262, 2021.

GEISSMANN, Frederic et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. ***Science***, v. 327, n. 5966, p. 656-661, 2010.

Generation of Bone Marrow-Derived Macrophages from Cryopreserved Mouse Bone Marrow Cells. ***Plos One***, v. 5, p. 1-8, 2010.

GERMAIN, Kyla; KIM, Peter K. Pexophagy: a model for selective autophagy. ***International journal of molecular sciences***, v. 21, n. 2, p. 578, 2020.

GIRI, Biplab et al. Chronic hyperglycemia mediated physiological alteration and metabolic distortion leads to organ dysfunction, infection, cancer progression and other pathophysiological consequences: an update on glucose toxicity. ***Biomedicine & pharmacotherapy***, v. 107, p. 306-328, 2018.

GORDON, Siamon; MARTINEZ, Fernando O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. ***Immunity***, v. 32, n. 5, p. 593-604, 2010.

GRAHAM, Melanie L.; SCHUURMAN, Henk-Jan. Validity of animal models of type 1 diabetes, and strategies to enhance their utility in translational research. ***European journal of pharmacology***, v. 759, p. 221-230, 2015.

HAN, Ji-Won et al. Anti-inflammatory effect of emodin via attenuation of NLRP3 inflammasome activation. ***International Journal of Molecular Sciences***, v. 16, n. 4, p. 8102-8109, 2015.

HARIJITH, Anantha; EBENEZER, David L.; NATARAJAN, Viswanathan. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. ***Frontiers in physiology***, v. 5, p. 352, 2014.

HARRIS, James et al. Autophagy and inflammasomes. ***Molecular immunology***, v. 86, p. 10-15, 2017.

HARRIS, James. Autophagy and IL-1 family cytokines. ***Frontiers in immunology***, v. 4, p. 83, 2013.

HEALTH QUALITY ONTARIO et al. Pancreas islet transplantation for patients with type 1 diabetes mellitus: a clinical evidence review. ***Ontario health technology assessment series***, v. 15, n. 16, p. 1, 2015.

HUME, David A. The many alternative faces of macrophage activation. ***Frontiers in immunology***, v. 6, p. 370, 2015.

IGHODARO, Osasenaga Macdonald. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes *mellitus*. ***Biomedicine & Pharmacotherapy***, v. 108, p. 656-662, 2018.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas, 10th edn. **International Diabetes Federation**, 2021.

KANEKO, Naoe et al. The role of interleukin-1 in general pathology. Inflammation and regeneration, v. 39, n. 1, p. 1-16, 2019.

KATSAROU, Anastasia et al. Type 1 diabetes mellitus. **Nature reviews Disease primers**, v. 3, n. 1, p. 1-17, 2017.

KAUSHIK, Vivek et al. Ionophores: potential use as anticancer drugs and chemosensitizers. **Cancers**, v. 10, n. 10, p. 360, 2018.

KELLEY, Nathan et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 13, p. 3328, 2019.

KING, Aileen; BOWE, James. Animal models for diabetes: understanding the pathogenesis and finding new treatments. **Biochemical pharmacology**, v. 99, p. 1-10, 2016.

KLIONSKY, Daniel J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy . **Autophagy**, v. 12, n. 1, p. 1-222, 2016.

KOLB-BACHOFEN, Victoria; KOLB, Hubert. A role for macrophages in the pathogenesis of type 1 diabetes. **Autoimmunity**, v. 3, n. 2, p. 145-155, 1989.

LACHMANDAS, Ekta et al. The effect of hyperglycaemia on in vitro cytokine production and macrophage infection with Mycobacterium tuberculosis. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0117941, 2015.

LASKIN, Debra L. et al. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction?. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 51, p. 267-288, 2011.

LENZEN, Sigurd. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.

LEVINE, Beth; MIZUSHIMA, Noboru; VIRGIN, Herbert W. Autophagy in immunity and inflammation. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 323-335, 2011.

LI, Qingxian et al. Hyperglycemia-induced accumulation of advanced glycosylation end products in fibroblast-like synoviocytes promotes knee osteoarthritis. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 53, n. 11, p. 1735-1747, 2021.

LI, Yajing et al. Self-eating: friend or foe? The emerging role of autophagy in fibrotic diseases. **Theranostics**, v. 10, n. 18, p. 7993, 2020.

LIANG, Fan et al. The crosstalk between STAT3 and p53/RAS signaling controls cancer cell metastasis and cisplatin resistance via the Slug/MAPK/PI3K/AKT-mediated regulation of EMT and autophagy. **Oncogenesis**, v. 8, n. 10, p. 1-15, 2019.

LIN, Ping et al. Macrophage plasticity and atherosclerosis therapy. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 8, p. 679797, 2021.

LOPEZ-CASTEJON, Gloria; BROUGH, David. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 22, n. 4, p. 189-195, 2011.

MA, Tean et al. High glucose induces autophagy in podocytes. *Experimental cell research*, v. 319, n. 6, p. 779-789, 2013.

MACDONALD IGHODARO, Osasenaga; MOHAMMED ADEOSUN, Abiola; ADEBOYE AKINLOYE, Oluseyi. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. **Medicina**, v. 53, n. 6, p. 365-374, 2017.

MARESCH, Constanze C. et al. Hyperglycemia is associated with reduced testicular function and activin dysregulation in the Ins2Akita^{+/-} mouse model of type 1 diabetes. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 446, p. 91-101, 2017.

MARIM, F. M.; SILVEIRA, T. N.; LIMA Jr, D. S.; ZAMBONI, D. S. A Method for Generation of Bone Marrow-Derived Macrophages from Cryopreserved Mouse Bone Marrow Cells. **Plos One**, v. 5, p. 1-8, 2010.

MARUYAMA, Kentaro; NEMOTO, Eiji; YAMADA, Satoru. Mechanical regulation of macrophage function-cyclic tensile force inhibits NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in murine macrophages. **Inflammation and regeneration**, v. 39, n. 1, p. 3, 2019.

MCDONNELL, Marie E.; UMPIERREZ, Guillermo E. Insulin therapy for the management of hyperglycemia in hospitalized patients. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, v. 41, n. 1, p. 175-201, 2012.

MIRZA, Rita E. et al. Blocking interleukin-1 β induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 62, n. 7, p. 2579-2587, 2013.

MOURI, Michelle; BADIREDDY, Madhu. Hyperglycemia. **StatPearls [Internet]**, 2021.

MURIACH, María et al. Diabetes and the brain: oxidative stress, inflammation, and autophagy. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014.

MURRAY, Peter J. Macrophage polarization. **Annual review of physiology**, v. 79, p. 541-566, 2017.

NAGAREDDY, Prabhakara R. et al. Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis. **Cell metabolism**, v. 17, n. 5, p. 695-708, 2013.

NAKAHIRA, Kiichi et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. **Nature immunology**, v. 12, n. 3, p. 222, 2011.

OH, Ji Eun; LEE, Heung Kyu. Pattern recognition receptors and autophagy. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 300, 2014.

OREKHOV, Alexander N. et al. Monocyte differentiation and macrophage polarization. **Vessel Plus**, v. 3, p. 10, 2019.

OTTO-BUCZKOWSKA, Ewa; JAINTA, Natalia. Pharmacological treatment in diabetes mellitus type 1–insulin and what else?. **International journal of endocrinology and metabolism**, v. 16, n. 1, 2018.

PADMAN, B. S., NGUYEN, T. N., UOSELIS, L., SKULSUPPAISARN, M., NGUYEN, L. K., & LAZAROU, M. LC3/GABARAPs drive ubiquitin-independent recruitment of Optineurin and NDP52 to amplify mitophagy. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2019.

PAINTER, J. D., GALLE-TREGER, L., & AKBARI, O. Role of Autophagy in Lung Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

PAN, Yong et al. Inhibition of high glucose-induced inflammatory response and macrophage infiltration by a novel curcumin derivative prevents renal injury in diabetic rats. **British journal of pharmacology**, v. 166, n. 3, p. 1169-1182, 2012.

PARK, Eun-Young; PARK, Jong-Beom. High glucose-induced oxidative stress promotes autophagy through mitochondrial damage in rat notochordal cells. **International orthopaedics**, v. 37, n. 12, p. 2507-2514, 2013.

PAUL, Shalini; ALI, Azam; KATARE, Rajesh. Molecular complexities underlying the vascular complications of diabetes mellitus–A comprehensive review. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 34, n. 8, p. 107613, 2020.

PAVLOU, Sofia et al. Sustained high glucose exposure sensitizes macrophage responses to cytokine stimuli but reduces their phagocytic activity. **BMC immunology**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2018.

PERDIGUERO, Elisa Gomez; GEISSMANN, Frederic. The development and maintenance of resident macrophages. **Nature immunology**, v. 17, n. 1, p. 2-8, 2016.

PLOWS, Jasmine F. et al. The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 11, p. 3342, 2018.

POZNYAK, Anastasia et al. The diabetes mellitus–atherosclerosis connection: The role of lipid and glucose metabolism and chronic inflammation. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 5, p. 1835, 2020.

PUGLIESE, Alberto et al. Autoreactive T cells in type 1 diabetes. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 8, p. 2881-2891, 2017.

QUEIROZ, Luiz AD et al. Endangered lymphocytes: The effects of alloxan and streptozotocin on immune cells in type 1 induced diabetes. **Mediators of Inflammation**, v. 2021, 2021.

RACANELLI, Alexandra C. et al. Autophagy and inflammation in chronic respiratory disease. **Autophagy**, v. 14, n. 2, p. 221-232, 2018.

RAMALHO, Theresa et al. Impaired wound healing in type 1 diabetes is dependent on 5-lipoxygenase products. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 14164, 2018.

REMMERIE, Anneleen; SCOTT, Charlotte L. Macrophages and lipid metabolism. **Cellular immunology**, v. 330, p. 27-42, 2018.

RENDRA, Erika et al. Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes. *Immunobiology*, v. 224, n. 2, p. 242-253, 2019.

SEAY, Montrell D.; DINESH-KUMAR, S. P. Autophagy takes its TOLL on innate immunity. *Cell host & microbe*, v. 2, n. 2, p. 69-70, 2007.

SILWAL, Prashanta et al. Mitochondrial reactive oxygen species: double-edged weapon in host defense and pathological inflammation during infection. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 1649, 2020.

SINGH, Rajat et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, v. 458, n. 7242, p. 1131-1135, 2009.

SNYDER, Robert J. et al. Macrophages: a review of their role in wound healing and their therapeutic use. *Wound Repair and Regeneration*, v. 24, n. 4, p. 613-629, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. São Paulo, SP, 2021

SPILLER, F.; CARLOS, D.; SOUTO F.O.; FREITAS, A.; SOARES, F.S.; VIEIRA, S.M.; PAULA, F.J.A.; ALVES-FILHO, J.C.; CUNHA, F.Q. α 1-Acid Glycoprotein Decreases Neutrophil Migration and Increases Susceptibility to Sepsis in Diabetic Mice. *Diabetes*, v. 61, n. 6, p. 1584-1591, 2012.

STEFANOWICZ, Anna; MYSLIWIEC, Malgorzata; ADAMKIEWICZ-DROZYNSKA, Elzbieta. Parental knowledge and metabolic control of children and young adults with type 1 diabetes. *Archives of medical science: AMS*, v. 14, n. 1, p. 52, 2018.

STIENSTRA, Rinke et al. The inflammasome puts obesity in the danger zone. *Cell metabolism*, v. 15, n. 1, p. 10-18, 2012.

SUNAHARA, Karen KS et al. Insulin influences autophagy response distinctively in macrophages of different compartments. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 34, n. 6, p. 2017-2026, 2014.

SUNAHARA, Karen KS; MARTINS, Joilson O. Alveolar macrophages in diabetes: friends or foes? *Journal of leukocyte biology*, v. 91, n. 6, p. 871-876, 2012.

SUNAHARA, Karen KS; SANNOMIYA, Paulina; MARTINS, Joilson O. Briefs on insulin and innate immune response. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 29, n. 1-2, p. 1-8, 2012.

SZABLEWSKI, Leszek. Role of immune system in type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *International immunopharmacology*, v. 22, n. 1, p. 182-191, 2014.

TENCEROVA, Michaela et al. Experimental hyperglycemia induces an increase of monocyte and T-lymphocyte content in adipose tissue of healthy obese women. *PloS one*, v. 10, n. 4, p. e0122872, 2015.

TESSARO, Fernando Henrique Galvão et al. Macrophages from a type 1 diabetes mouse model present dysregulated PI3K/AKT, ERK 1/2 and SAPK/JNK levels. *Immunobiology*, v. 225, n. 2, p. 151879, 2020.

THAYER, Terri C. et al. Superoxide production by macrophages and T cells is critical for the induction of autoreactivity and type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 60, n. 8, p. 2144-2151, 2011.

TORRES-CASTRO, Israel et al. Human monocytes and macrophages undergo M1-type inflammatory polarization in response to high levels of glucose. **Immunology letters**, v. 176, p. 81-89, 2016.

VAN BELLE, T. L.; TAYLOR, P.; VON HERRATH, M. G. Mouse models for type 1 diabetes. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 6, n. 2, p. 41-45, 2009.

VANESSA FIORENTINO, Teresa et al. Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 32, p. 5695-5703, 2013.

WANG, Le-xun et al. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. **Journal of leukocyte biology**, v. 106, n. 2, p. 345-358, 2019.

WANG, Richard C. et al. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. **Science**, v. 338, n. 6109, p. 956-959, 2012.

WANG, Y.; LI, Y.B.; YIN, J.J.; YING W.; LI-BO, Z.; GUANG-YING X.; SHANG-HA, P. Autophagy Regulates Inflammation Following Oxidative Injury In Diabetes. **Autophagy**, v. 9, n. 3, p.272-277, 2013.

WANG, Youhan et al. M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds. *International immunopharmacology*, v. 70, p. 459-466, 2019.

WEI, Kai; WANG, Pei; MIAO, Chao-Yu. A double-edged sword with therapeutic potential: An updated role of autophagy in ischemic cerebral injury. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 18, n. 11, p. 879-886, 2012.

WEISS, Günter; SCHAIBLE, Ulrich E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. **Immunological reviews**, v. 264, n. 1, p. 182-203, 2015.

WEN, Haitao et al. Fatty acid–induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. **Nature immunology**, v. 12, n. 5, p. 408-415, 2011.

WHITING, David R. et al. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes research and clinical practice**, v. 94, n. 3, p. 311-321, 2011.

WILCOX, Nicholas S. et al. Life and death of β cells in type 1 diabetes: a comprehensive review. **Journal of autoimmunity**, v. 71, p. 51-58, 2016.

WU, Jinzi; YAN, Liang-Jun. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 8, p. 181, 2015.

WYNN, Thomas A.; VANNELLA, Kevin M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 450-462, 2016.

XIN, Wei et al. Autophagy protects human podocytes from high glucose-induced injury by preventing insulin resistance. **Metabolism**, v. 65, n. 9, p. 1307-1315, 2016.

XIU, Fangming et al. Stress hyperglycemia, insulin treatment, and innate immune cells. **International journal of endocrinology**, v. 2014, 2014.

YAN, Liang-Jun. Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress. **Journal of diabetes research**, v. 2014, 2014.

YAO, Yongli; XU, Xiang-Hong; JIN, Liping. Macrophage polarization in physiological and pathological pregnancy. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 792, 2019.

ZHANG, Bo et al. Hyperglycemia modulates M1/M2 macrophage polarization via reactive oxygen species overproduction in ligature-induced periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 56, n. 5, p. 991-1005, 2021.

ZHOU, Feifan; YANG, Ying; XING, Da. Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. **The FEBS journal**, v. 278, n. 3, p. 403-413, 2011.

ZHOU, Rongbin et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature**, v. 469, n. 7329, p. 221, 2011.

8 ANEXOS

Anexo 1

28/01/2022 19:28

FAMUS - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

8142 - 10837182/1 - Emanuella Sarmiento Alho de Sousa

Email: emanuellasarmiento@usp.br
 Data de Nascimento: 15/06/1996
 Cédula de Identidade: RG - 6598859 - PA
 Local de Nascimento: Estado do Pará
 Nacionalidade: Brasileira
 Graduação: Bacharel em Biomedicina - Universidade do Estado do Pará - Pará - Brasil - 2018

Curso: Mestrado
 Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
 Área: Fisiopatologia
 Data de Matrícula: 03/09/2018
 Início da Contagem de Prazo: 03/09/2018
 Data Limite para o Depósito: 03/03/2022
 Orientador: Prof(a). Dr(a). Jollson de Oliveira Martins - 03/09/2018 até o presente. Email: martinsj@usp.br
 Proficiência em Línguas: Inglês, 03/09/2018
 Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 17/10/2019
 Data do Depósito do Trabalho:
 Título do Trabalho:
 Data Máxima para Aprovação da Banca:
 Data de Aprovação da Banca:
 Data Máxima para Defesa:
 Data da Defesa:
 Resultado da Defesa:
 Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 03/09/2018

Aluno matriculado no Regulamento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).
 Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2021
 Impresso em: 28/01/2022 19:26:04



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9142 - 10937192/1 - Emanuella Sarmiento Ailho de Souza

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BCX5018-1/7	Aprimoramento Didático (Escola de Artes, Ciências e Humanidades - Universidade de São Paulo)	02/10/2018	05/11/2018	75	5	100	A	N	Concluída
BMI5808-1/3	O Ensino de Imunologia para Cursos de Graduação (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	10/10/2018	29/11/2018	120	8	79	B	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino, junto à disciplina FBC0519 - Imunodiagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, ministrada aos alunos de graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo. (1)	01/02/2019	30/06/2019	-	3	-	-	-	-
FBC5703-14/2	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	12/03/2019	24/06/2019	15	1	88	A	N	Concluída
FBC5757-8/3	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	09/08/2019	18/11/2019	15	0	62	R	N	Concluída
FBC5707-7/3	Biologia de Sistemas para Ciências da Vida	28/09/2019	18/12/2019	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5954-1/4	Redação de Trabalhos Científicos	04/03/2020	10/03/2020	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5757-8/4	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	10/03/2020	23/06/2020	15	1	90	A	N	Concluída
FBC5722-5/3	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	11/05/2020	31/05/2020	60	4	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Publicação de trabalho original - CASAGRANDE, Felipe Beccaria; FERREIRA, Sabrina de Souza; SOUSA, Emanuella Sarmiento Ailho de; et al. Insulin modulates inflammatory cytokine release in acute stages and augments expression of adhesion molecules and leukocytes in lungs on chronic stages of paracoccidioidomycosis. <i>Frontiers in Immunology, Lausanne</i> , v. 11, p. 1-13 art. 583385, 2020. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.583385 > DOI: 10.3389/fimmu.2020.583385. (2)	18/11/2020	18/11/2020	-	2	-	-	-	-

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	29
Estágios:			
Total:	0	25	29

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

- 1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588/05, alterada pelas Portarias GR-4391/09 e GR-4601/09 - PAE e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 10/03/2021
- 2) Créditos atribuídos de acordo com o Artigo 64 do Regimento de Pós-Graduação e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 10/03/2021

Conceito a partir de 02/01/1987:

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

Anexo 02



Emanuella Sarmento Alho de Sousa

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2174974170320986>
 ID Lattes: **2174974170320986**
 Última atualização do currículo em 30/11/2021

Graduada em Ciências Biomédicas pela Universidade do Estado do Pará (UEPA) com habilitação em Análises Clínicas (2014-2018), estágio de iniciação científica no Instituto Evandro Chagas (IEC) no laboratório de norovírus da seção de virologia (SAVIR) (2015-2018). Atualmente é aluna de mestrado em Farmácia: Fisiopatologia e Toxicologia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Emanuella Sarmento Alho de Sousa
Nome em citações bibliográficas	SOUSA, E. S. A., DE SOUSA, EMANUELLA SARMENTO ALHO
Lattes ID	http://lattes.cnpq.br/2174974170320986
ORCID ID	https://orcid.org/0000-0001-8861-635X

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Avenida Professor Lineu Prestes, 580 - Bloco 17, Butantã, 05508000 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30913662 Ramal: 3662
------------------------------	---

Formação acadêmica/titulação

2018	Mestrado em andamento em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Avaliação Do Efeito Da Hiperglicemia Na Ativação Da Via Do Inflammosoma E No Envolvimento Do Processo De Autofagia, Orientador: Jolison de Oliveira Martins. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
2014 - 2018	Graduação em Biomedicina. Universidade do Estado do Pará, UEPA, Brasil.
2011 - 2013	Ensino Médio (2º grau). Centro de Ensino Puro Ideal, IDEAL, Brasil.

Formação Complementar

2021 - 2021	8º Curso de Verão em Virologia. (Carga horária: 40h). Instituto Evandro Chagas, IEC, Brasil.
2021 - 2021	Workshop de Escrita Científica em Inglês. (Carga horária: 5h). Lina Assessoria Linguística, UNA, Brasil.
2020 - 2020	Extensão universitária em Programa de Aperfeiçoamento de Ensino. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2020 - 2020	Prevenção ao suicídio. (Carga horária: 30h). Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Brasil.
2020 - 2020	Doenças ocasionadas por vírus respiratórios emergentes, incluindo o COVID-19. (Carga horária: 4h). Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil.
2020 - 2020	Atualização do Manejo Clínico da Influenza. (Carga horária: 6h). Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil.
2020 - 2020	

	Doença de Chagas - Triagem e diagnóstico sorológico em Unidades Hemoterápicas. (Carga horária: 15h). Departamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis, Aids e Hepatites Virais, TELELAB, Brasil.
2020 - 2020	Coleta de sangue - Diagnóstico e monitoramento das DST, AIDS e Hepatites Vi. (Carga horária: 15h). Departamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis, Aids e Hepatites Virais, TELELAB, Brasil.
2020 - 2020	O que é Ciência Aberta?. (Carga horária: 10h). Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil.
2020 - 2020	O novo coronavírus e a COVID-19. (Carga horária: 15h). Universidade Federal do Maranhão, UFMA, Brasil.
2019 - 2019	Extensão universitária em Programa de Aperfeiçoamento de Ensino. (Carga horária: 6h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2017 - 2017	III Curso Técnico-Prático Em Gastroenterites Virais. (Carga horária: 20h). Instituto Evandro Chagas, IEC, Brasil.
2017 - 2017	Diagnóstico de HIV. (Carga horária: 15h). Departamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis, Aids e Hepatites Virais, TELELAB, Brasil.
2016 - 2016	Upper Intermediate course. Oxford House College, OHC, Grã-Bretanha.
2015 - 2015	Extensão universitária em Projeto de extensão UEPA nas comunidades. (Carga horária: 20h). Universidade do Estado do Pará, UEPA, Brasil.
2008 - 2015	Nível Pós Avançado (Master). Centro de Cultura Anglo Americana, CCAA, Brasil.
2014 - 2014	Curso de Injetáveis e Imunização. (Carga horária: 20h). Universidade do Estado do Pará, UEPA, Brasil.
2014 - 2014	CONHECENDO MELHOR A HOMEOPATIA. (Carga horária: 4h). XVII CONGRESSO MÉDICO AMAZÔNICO, CMA, Brasil.

Atuação Profissional

	Instituto Evandro Chagas, IEC, Brasil.
Vínculo Institucional 2018 - 2018	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiária - PIBIC
Outras informações	Integrante do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq/IEC), desenvolvendo projeto de pesquisa no laboratório de Norovírus (LNVE), Seção de Virologia, trabalhando com clonagem molecular de bactérias, padronização de qRT-PCR duplex e detecção e genotipagem de Norovírus.
Vínculo Institucional 2017 - 2017	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiária-FAPESPA, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva.
Outras informações	Atua no laboratório de gastroenterites virais (Astrovírus/Calicivírus) - Seção Virologia - trabalhando com coleta de amostras em instituições de longa permanência e detecção e genotipagem de Sapovírus.
Vínculo Institucional 2015 - 2016	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiária-FAPESPA, Carga horária: 20
Outras informações	Atua no laboratório de gastroenterites virais (Astrovírus/Calicivírus) - Seção Virologia - trabalhando com extração de RNA viral, realização de testes de RT-PCR, cDNAs, preparo de reagentes, gel de agarose para eletroforese e detecção e genotipagem de Norovírus.
Atividades 01/2017 - 12/2017	Estágios, Instituto Evandro Chagas. Estágio realizado Estágio realizado durante duas vigências (dois anos), desenvolvendo projeto de pesquisa no laboratório de Norovírus (LNVE), Seção de Virologia.
03/2015 - 12/2016	Estágios, Instituto Evandro Chagas. Estágio realizado Estágio realizado durante duas vigências (dois anos), desenvolvendo projeto de pesquisa no laboratório de Norovírus (LNVE), Seção de Virologia.
	Universidade do Estado do Pará, UEPA, Brasil.
Vínculo Institucional 2017 - 2017	Vínculo: Aluno, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 20
Outras informações	Estágio supervisionado em análises clínicas realizado nos laboratórios da Universidade do Estado do Pará, nos setores de bioquímica, hematologia, parasitologia, urianálise, microbiologia e imunologia.
Atividades	

08/2017 - 12/2017	Estágios , Universidade do Estado do Pará. Estágio realizado Estágio obrigatória realizada no laboratório de análises clínicas da Universidade do Estado do Pará.
Hospital Ophir Loyola, HOL, Brasil.	
Vínculo institucional	Vínculo: Aluno, Enquadramento Funcional: Estagiária
2018 - 2018	
Outras informações	Estágio supervisionado em análises clínicas realizado nos laboratórios do Hospital Ophir Loyola, trabalhando em rotina hospitalar nos setores de bioquímica, hematologia, parasitologia, urianálise, microbiologia e imunologia.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.	
Vínculo institucional	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor PAE, Carga horária: 6
2020 - 2020	
Outras informações	Ministrou aula intitulada "Quimioluminescência" e " Diagnóstico laboratorial de Doença de Chagas e Toxoplasmose" durante a disciplina de graduação FBC0519 ? Imunodiagnóstico, nos períodos Integral e Noturno com carga horária total de 16 horas.
Vínculo institucional	Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Monitor PAE, Carga horária: 6
2019 - 2019	
Outras informações	Ministrou aula intitulada "Quimioluminescência" e " Diagnóstico laboratorial de Doença de Chagas e Toxoplasmose" durante a disciplina de graduação FBC0519 ? Imunodiagnóstico, nos períodos Integral e Noturno com carga horária total de 16 horas.
Atividades	
08/2019 - 08/2020	Conselhos, Comissões e Consultoria, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Cargo ou função Representante Discente de Pós-Graduação.
1/2019 - 6/2019	Outras atividades técnico-científicas , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Atividade realizada Ministrou aula intitulada "Diagnóstico laboratorial de Doença de Chagas e Toxoplasmose" durante a disciplina de graduação FBC0519 ? Imunodiagnóstico, nos períodos Integral e Noturno com carga horária total de 8 horas.
1/2019 - 6/2019	Outras atividades técnico-científicas , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Atividade realizada Ministrou aula intitulada "Quimioluminescência" durante a disciplina de graduação FBC0519 ? Imunodiagnóstico, nos períodos Integral e Noturno com carga horária total de 8 horas.
5/2019 - 5/2019	Ensino, Programa de Residência em Farmácia Clínica e Atenção Farmacêutica da FCF/US, Nível: Especialização Disciplinas ministradas Imunodiagnóstico

Projetos de pesquisa

2018 - 2018	<p>PESQUISA DE NOROVÍRUS DO GENOGRUPO GIV EM INFECÇÕES PEDIÁTRICAS OCORRIDAS EM BELÉM, PARÁ: 21 ANOS DE INVESTIGAÇÃO</p> <p>Descrição: Este estudo tem por finalidade realizar a pesquisa de norovírus do genogrupo GIV em casos de infecções pediátricas por gastroenterite aguda em Belém, Pará entre os anos de 1990 a 2011. Visa, ainda, estabelecer o contexto clínico-epidemiológico das infecções por GIV nos casos de diarreia infantil ao longo de 21 anos, além de permitir a análise de co-infecção com outros genótipos de norovírus e a possibilidade de se encontrar genótipos que indiquem uma possível transmissão zoonótica por este genogrupo.</p> <p>Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.</p> <p>Integrantes: Emanuella Sarmiento Aho de Sousa - Coordenador / Renato da Silva Bandeira - Integrante / Yvone Benchimol Gabby - Integrante / Jones Anderson Monteiro Siqueira - Integrante / Dielle Monteiro Teixeira - Integrante / Luciana D. Silva - Integrante / Hugo Reis Resque - Integrante / TAYNAH COHEN DE MELO - Integrante.</p>
2018 - Atual	<p>Avaliação do efeito da hiperglicemia na ativação da via do inflamassoma e no envolvimento do processo de autofagia</p> <p>Descrição: Avaliar o efeito da hiperglicemia concomitante ao estímulo por LPS em macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) de animais diabéticos (D-BMDM) e não diabéticos (ND-BMDM) para caracterização do fenótipo destas células e identificar possíveis alterações na via do inflamassoma e no processo de autofagia.</p> <p>Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.</p>

2017 - 2018	<p>Integrantes: Emanuella Sarmiento Aílo de Sousa - Integrante / Jolison de Oliveira Martins - Coordenador.</p> <p>Aspectos epidemiológicos e moleculares das infecções por Norovírus e outros enteropatógenos causadores de gastroenterite em indivíduos residentes em instituições de longa permanência, em Belém, Pará</p> <p>Descrição: Este estudo abrange uma investigação longitudinal, com características epidemiológicas e moleculares na qual serão analisadas as infecções gastroenteríticas por vírus e parasitas em indivíduos maiores de 60 anos de idade residentes em Instituições de Longa Permanência em Belém. A pesquisa abrangerá um acompanhamento semanal (com pelo menos duas visitas) da população estudada, durante um período de dois anos consecutivos, durante os quais será realizada coleta de material biológico e de dados clínicos e epidemiológicos.</p> <p>Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.</p>
2012 - 2016	<p>Integrantes: Emanuella Sarmiento Aílo de Sousa - Integrante / Yvone Benchimol Gabbay - Integrante / Luciana Damascena da Silva - Coordenador / Joana D. P. Mascarenhas - Integrante / Hugo R. Resque - Integrante / Luana Silva Soares - Integrante / Maria Sílvia Silva Lucena - Integrante / Mônica Cristina De Moraes Silva Bonfim - Integrante / Thayara Moraes Portal - Integrante / Renato Silva Bandeira - Integrante / Edvaldo Costa Sousa Junior - Integrante / Carina Guilhon Sequeira - Integrante / Ana Maria Revorido da Silva Ventura - Integrante.</p> <p>VIGILÂNCIA VIROLÓGICA, EPIDEMIOLÓGICA E EVOLUÇÃO MOLECULAR DOS NOROVÍRUS NO ESTADO DO PARÁ: 30 ANOS DE ESTUDO RETROSPECTIVO</p> <p>Descrição: Este estudo visa fornecer dados sobre a circulação dos genótipos e das variantes genéticas, incluindo recombinantes, de norovírus associados a hospitalizações e casos esporádicos de gastroenterite na comunidade pediátrica de Belém, Pará, ao longo de 30 anos de estudo. Com isso, será possível definir o quadro epidemiológico-molecular das diversas cepas circulantes nesta cidade, o que poderá subsidiar pesquisas futuras relacionadas à obtenção de uma vacina contra os norovírus.</p> <p>Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.</p> <p>Integrantes: Emanuella Sarmiento Aílo de Sousa - Integrante / Renato da Silva Bandeira - Integrante / Alexandre da Costa Linhares - Integrante / Yvone Benchimol Gabbay - Coordenador / Jones Anderson Monteiro Siqueira - Integrante / Ingrid Melo Rocha - Integrante / Larissa C. P. N. Costa - Integrante / Liann Felipe Pereira dos Santos - Integrante / Edvaldo C. S. Junior - Integrante.</p>

Áreas de atuação

1.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Virologia humana.
2.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.
3.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica.
4.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Bacteriologia.
5.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Farmacologia / Subárea: Farmacologia.
6.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Imunologia / Subárea: Imunologia.

Idiomas

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

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordenar Cronológica

1.  QUEIROZ, L. A. D.; ASSIS, J. B.; GUIHARRES, J. P. T.; SOUSA, E. S. A.; MILHOMEM, A. C.; SUNAHARA, K.; NUNES, A. S.; MARTINS, J. O. . Endangered Lymphocytes: The Effects of Alloxan and Streptozotocin on Immune Cells in Type 1 Induced Diabetes. MEDIATORS OF INFLAMMATION **KR**, v. 2021, p. <https://www.hin, 2021>.

- CASAGRANDE, FELIPE BECCARIA ; FERREIRA, SABRINA DE SOUZA ; **DE SOUSA, EMANUELLA SARMENTO ALHO** ; GUIMARAES, JOÃO PEDRO TÔRRES ; ROMERA, LAVÍNIA MARIA DALMAS ; TESSARO, FERNANDO HENRIQUE GALVÃO ; ALMEIDA, SANDRO ROGÉRIO DE ; RODRIGUES, STEPHEN FERNANDES DE PAULA ; MARTINS, JOILSON O. . Insulin Modulates Inflammatory Cytokine Release in Acute Stages and Augments Expression of Adhesion Molecules and Leukocytes in Lungs on Chronic Stages of Paracoccidioidomycosis. *Frontiers in Immunology* **11**, p. 2793, 2020.

Resumos publicados em anais de congressos

- SIQUEIRA, J. A. M. ; **SOUSA, E. S. A.** ; TEIXEIRA, D. M. ; SILVA, L. D. ; RESQUE, H. R. ; GABBAY, Y. B. . PESQUISA DE NOROVÍRUS-GIV EM INFECÇÕES PEDIÁTRICAS OCORRIDAS EM BELÉM, PARÁ: UM ESTUDO RETROSPECTIVO. In: 56ª Edição do Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 7 MEDTROP PLAY, 2021, Recife/PE. 56ª Edição do Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 7 MEDTROP PLAY, 2021.
- MOREIRA, V. A. ; **SOUSA, E. S. A.** . Influência da hiperglicemia na ativação da via do inflamassoma e da autofagia na resposta imune mediada por macrófagos. In: 29ª Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIDCIUSP, 2020, São Paulo. 29ª Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIDCIUSP, 2020.
- SOUSA, E. S. A.**; QUEIROZ, L. A. D. ; MARTINS, J. O. . Role of hyperglycemia, inflammation and autophagy in bone marrow derived macrophages in Type 1 Diabetes. In: 51st Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019, Macaó. 51st Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019.
- QUEIROZ, L. A. D. ; GUIMARAES, J. P. T. ; ASSIS, J. B. ; **SOUSA, E. S. A.** ; MARTINS, J. O. ; SA-NUNES, A. . Comparative Study of T Lymphocyte Activity in Different Murine Models of Experimental Type 1 Diabetes Mellitus. In: 51st Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019, Macaó. 51st Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019.
- SOUSA, E. S. A.**; SIQUEIRA, J. A. M. ; BANDEIRA, R. S. ; SANTOS, L. F. P. ; GABBAY, Y. B. ; LINHARES, A. C. . MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF NOROVIRUS IN CHILDREN HOSPITALIZED DURING A RANDOMIZED CLINICAL TRIAL IN BELÉM, NORTHERN BRAZIL. In: XXVII Congresso Brasileiro de Virologia, 2016, Piracicaba. *Virus Reviews and Research*. Nova Hamburgo, RS: Journal of the Brazilian Society for Virology, 2016. v. 20. p. 16-183.
- NASCIMENTO, A. B. ; **SOUSA, E. S. A.** ; MENDONÇA, M. H. R. . ANÁLISE DA INCIDÊNCIA DE DOENÇA DE CHAGAS AGUDA (DCA) NA REGIÃO METROPOLITANA DE BELÉM 7 PARÁ. In: XV Congresso Brasileiro de Biomedicina, 2016, Bento Gonçalves. XV Congresso Brasileiro de Biomedicina, 2016.

Apresentações de Trabalho

- SOUSA, E. S. A.**; QUEIROZ, L. A. D. ; MARTINS, J. O. . Role Of Hyperglycemia And Inflammation In Bone Marrow Derived Macrophages In Type 1 Diabetes. 2021. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Demais tipos de produção técnica

- SOUSA, E. S. A.** . Imunodiagnósticos. 2019. (Curso de curta duração ministrado/Especialização).
- SOUSA, E. S. A.** . III Curso Teórico-Prático em Gastroenterites: Gastroenterites Virais e suas Implicações na Saúde Pública. 2017. .

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

- 55ª edição da Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica (SUPFAB). 2021. (Simpósio).
- 52nd Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics - online format. 2020. (Congresso).
- XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul. 2020. (Congresso).
- 51st Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics. Role of hyperglycemia, inflammation and autophagy in bone marrow derived macrophages in Type 1 Diabetes. 2019. (Congresso).
- VIII Annual Meeting of the Graduate Program in Immunology 7 Institute of Biomedical Science IV 7 University of São Paulo. 2019. (Encontro).
- II International Scientific Meeting of the IEC/XXXI Internal Seminar of PIBIC/IEC/FAPESP/Molecular Epidemiology of Sapovirus in elderly residents in long-stay institutions in Belém, Northern Brazil. 2017. (Encontro).
- XXVII Congresso Brasileiro de Virologia. 2017. (Congresso).
- XV Congresso Brasileiro de Biomedicina. Análise da Incidência de Doença de Chagas Aguda(DCA) na Região Metropolitana de Belém, Pará. 2016. (Congresso).
- XXVII Congresso Brasileiro de Virologia. MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF NOROVIRUS IN CHILDREN HOSPITALIZED DURING A RANDOMIZED CLINICAL TRIAL IN BELÉM, NORTHERN BRAZIL. 2016. (Congresso).
- Feira Vocacional Uepa 2014. Divulgação do curso de Biomedicina. 2014. (Feira).
- I SEMANA DO CALOURO DO CURSO DE BIOMEDICINA DA UEPA. 2014. (Outra).
- XVII Congresso Médico Amazônico. 2014. (Congresso).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

- SOUSA, E. S. A.** . I Escola de Inverno em Análises Clínicas e Toxicológicas 7 I ClinToc. 2019. (Outro).
- SOUSA, E. S. A.** . Ciclo de Palestras de Hematologia. 2016. (Outro).
- SOUSA, E. S. A.** . Feira Vocacional UEPA. 2014. .

Orientações

Orientações e supervisões em andamento

Iniciação científica

1. Victória Alves Moreira. Influência da Hiperglicemia na Ativação da Via do Inflamassoma e da Autofagia na Resposta Imune Mediada Por Macrófagos. Início: 2019. Iniciação científica (Graduando em Ciências Biológicas) - Universidade Anhambé Norumbi. (Orientador).

Outras informações relevantes

Realizou visita técnica na Divisão de Virologia da Universidade de Cambridge, localizada no Departamento de Patologia do Hospital Addenbrooke, Cambridge, sob supervisão do Chefe da divisão, Dr. Ian Goodfellow.

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 28/01/2022 às 19:36:16

[Imprimir currículo](#)

APÊNDICES

APÊNDICE A - Tabela contendo valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referente ao Gráfico 1.

Gráfico 01 – Variação de massa corpórea após 10 dias

Variação de massa corpórea após 10 dias em gramas				
Animal	Não diabético		Diabético	
	Dia 0	Dia 10	Dia 0	Dia 10
1	26,3	26,9	27,3	24,5
2	28,7	28,4	26,1	23,6
3	27,0	28,2	26,8	23,7
4	26,9	27,4	27,3	25,6
5	27,7	26,8	28,4	24,7
6	27,7	27,5	27,8	23,3
7	28,3	27,8	26,7	24,2
8	27,6	28,3	28,1	26,4
9			27,4	25,6
10			26,9	24,7
11			28,7	26,3
12			27,4	25,1
13			26,7	23,2
Média	27,5	27,6	27,3	24,6
Desvio Padrão	0,7	0,6	0,7	1,0
Erro Padrão da Média	0,27	0,2	0,2	0,2

APÊNDICE B - Tabela contendo valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referente ao Gráfico 2.

Gráfico 02 – Evolução da glicemia após 10 dias

Glicemia (mg/dL)				
Animal	Não diabético		Diabético	
	Dia 0	Dia 10	Dia 0	Dia 10
1	112	152	129	600
2	124	144	198	532
3	165	182	141	600
4	147	154	177	600
5	133	127	138	569
6	172	159	167	600
7	163	110	103	600
8	121	136	142	574
9			154	493
10			122	600
11			186	600
12			171	600
13			193	600
Média	142,1	145,5	155,4	582,1
Desvio Padrão	22,8	21,7	29,2	33,6
Erro Padrão da Média	8,0	7,7	8,1	9,3

APÊNDICE C - Tabela contendo valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referente à Figura 2.

Figura 02 – Avaliação da Via da Autofagia

LC3b/ β -actina - 30 minutos				
Diabético				
Animal	5,5 -	25 -	5,5 +	25+
1	0,72	0,80	0,72	0,34
2	0,87	1,52	0,99	0,48
3	0,90	1,07	0,76	0,54
4	0,88	1,07	0,89	0,76
5	0,77	0,86	0,59	0,65
Média	0,83	1,06	0,79	0,55
Desvio Padrão	0,07	0,28	0,15	0,16
Erro Padrão da Média	0,03	0,12	0,06	0,07
Não diabético				
Animal	5,5 -	25 -	5,5 +	25+
1	7,01	1,92	1,35	0,62
2	1,43	2,29	1,30	0,29
3	0,76	0,92	0,91	0,85
Média	3,06	1,71	1,19	0,59
Desvio Padrão	3,43	0,71	0,23	0,28
Erro Padrão da Média	1,98	0,41	0,13	0,16

Beclin-1/ β -actina - 30 minutos				
Diabético				
Animal	5,5 -	25 -	5,5 +	25+
1	0,59	0,51	0,49	0,51
2	0,74	1,28	1,10	1,14
3	0,43	0,41	0,49	0,51
4	0,85	0,82	0,82	0,79
5	0,79	0,70	0,99	0,84
Média	0,68	0,74	0,78	0,76
Desvio Padrão	0,17	0,34	0,27	0,26
Erro Padrão da Média	0,07	0,15	0,12	0,11
Não diabético				
Animal	5,5 -	25 -	5,5 +	25+
1	0,75	0,93	0,77	0,71
2	0,83	1,13	0,75	0,32
3	1,22	1,29	0,66	0,40
4	1,05	1,18	1,43	0,52
5	0,60	0,71	0,62	0,46
6	1,03	0,98	0,69	0,62
Média	0,91	1,04	0,82	0,51
Desvio Padrão	0,22	0,20	0,30	0,14
Erro Padrão da Média	0,09	0,08	0,12	0,05

APÊNDICE D - Tabela contendo valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referente à Figura 3.

Figura 03 – Secreção de IL-6 por ND-BMDM e D-BMDM com priming de Nigericina

IL-6 - 30 minutos				
Diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	3,55	4,09	11,60	8,38
2	20,22	3,55	7,84	9,46
3	3,02	4,63	5,70	7,31
4	3,02	3,02	7,84	8,92
5	3,55	4,09	7,31	6,24
6	6,52	8,73	1,36	2,83
7	0,62	ND	8,00	3,57
8	3,57	2,09	3,57	5,04
9	ND	2,61	ND	ND
10	1,72	19,07	11,86	1,72
11	ND	ND	2,31	1,12
12	4,39	6,48	2,61	2,31
13	ND	ND	2,61	2,91
Média	5,02	5,84	6,05	4,98
Desvio Padrão	5,56	5,04	3,60	2,98
Erro Padrão da Média	1,76	1,60	1,04	0,86
Não diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	3,55	2,48	5,16	5,70
2	3,55	5,16	5,16	5,16
3	6,24	4,09	8,38	5,70
4	16,98	8,92	8,38	6,24
5	ND	1,36	8,00	7,26
6	2,83	5,78	11,69	8,00
7	7,67	7,67	5,59	2,31
8	0,82	0,82	4,39	24,19
Média	5,95	4,54	7,09	8,07
Desvio Padrão	5,36	2,91	2,46	6,73
Erro Padrão da Média	2,03	1,03	0,87	2,38

IL-6 - 2 horas				
Diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	3,55	3,55	28,32	16,98
2	7,31	7,84	34,81	20,22
3	5,70	4,63	25,61	35,36
4	7,84	5,70	16,45	19,14
5	4,09	6,24	11,60	15,91
6	5,78	6,52	11,69	11,69
7	8,00	5,78	5,04	10,95
8	4,31	7,26	15,39	13,91
9	2,61	0,82	30,25	3,50
10	2,01	3,80	12,76	11,56
11	3,50	17,26	23,89	14,86
12	5,88	16,36	21,78	19,97
13	23,89	5,59	21,48	9,17
Média	6,50	7,03	19,93	15,63
Desvio Padrão	5,57	4,70	8,64	7,58
Erro Padrão da Média	1,54	1,30	2,40	2,10
Não diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	10,53	8,92	16,45	20,22
2	7,84	6,24	17,52	18,06
3	4,63	7,31	28,86	26,15
4	8,38	5,70	20,76	35,36
5	5,04	4,31	20,57	13,17
6	7,26	9,47	15,39	16,87
7	6,78	2,61	27,22	36,95
8	34,82	24,80	34,82	30,25
Média	10,66	8,67	22,70	24,63
Desvio Padrão	9,94	6,90	6,90	8,91
Erro Padrão da Média	3,51	2,44	2,44	3,15

IL-6 - 4 horas				
Diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	10,53	13,22	23,99	21,30
2	4,63	6,24	29,94	18,06
3	3,96	3,44	12,79	19,57
4	ND	ND	15,40	24,80
5	1,37	5,00	20,09	21,66
6	9,47	5,78	28,72	21,31
7	5,78	7,26	28,72	57,76
8	24,27	8,73	36,89	46,57
9	5,59	15,16	31,77	44,30
10	48,30	31,77	27,52	63,48
11	ND	2,91	31,17	32,99
12	21,48	0,82	50,76	78,21
13	2,61	4,99	56,64	76,95
Média	12,54	8,78	30,34	40,53
Desvio Padrão	14,01	8,32	12,40	22,29
Erro Padrão da Média	4,22	2,40	3,44	6,18
Não diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	7,59	1,89	9,67	19,57
2	8,11	7,59	28,99	37,93
3	0,33	4,48	12,27	13,31
4	23,23	16,44	49,54	62,29
5	10,21	9,47	18,35	26,50
6	18,35	10,21	36,15	46,57
7	9,17	23,89	68,79	83,58
8	1,52	2,80	92,42	102,38
Média	9,81	9,60	39,52	49,02
Desvio Padrão	7,74	7,44	29,18	31,62
Erro Padrão da Média	2,74	2,63	10,32	11,18

IL-6 - 6 horas				
Diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	ND	ND	14,88	37,40
2	9,67	5,00	46,37	42,14
3	2,41	1,89	82,64	56,44
4	3,96	3,44	9,67	13,31
5	9,47	8,00	39,87	48,80
6	16,22	1,88	75,73	147,41
7	ND	ND	54,35	112,82
8	4,40	1,84	69,35	78,80
9	ND	4,08	61,64	83,21
10	3,76	7,61	106,53	138,79
11	5,04	3,76	62,97	87,29
Média	6,87	4,17	56,73	76,95
Desvio Padrão	4,62	2,34	28,46	42,74
Erro Padrão da Média	1,63	1,65	8,58	12,89
Não diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	10,53	8,92	16,45	20,22
2	7,84	6,24	17,52	18,06
3	4,63	7,31	28,86	26,15
4	8,38	5,70	20,76	35,36
5	5,04	4,31	20,57	13,17
6	7,26	9,47	15,39	16,87
7	6,78	2,61	27,22	36,95
8	34,82	24,80	34,82	30,25
Média	10,66	8,67	22,70	24,63
Desvio Padrão	9,94	6,90	6,90	8,91
Erro Padrão da Média	3,51	2,44	2,44	3,15

IL-6 - 24 horas				
Diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	3,96	5,00	229,26	282,04
2	15,92	15,92	186,34	250,78
3	10,19	19,05	129,97	241,44
4	12,27	7,59	256,64	190,31
5	6,55	3,96	120,64	138,80
6	26,56	12,24	133,28	65,44
7	8,26	7,46	122,27	167,01
Média	11,96	10,17	168,34	190,83
Desvio Padrão	7,52	5,71	56,17	74,69
Erro Padrão da Média	2,84	2,16	21,23	28,23
Não diabético				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	16,13	27,24	162,97	168,34
2	14,65	17,61	200,71	249,77
3	16,13	19,09	115,71	273,35
4	31,69	33,18	175,25	252,91
5	22,59	32,92	192,81	213,87
6	15,42	14,63	117,54	68,60
Média	19,43	24,11	160,83	204,47
Desvio Padrão	6,65	8,09	36,70	76,15
Erro Padrão da Média	2,71	3,30	14,98	31,09

APÊNDICE E - Tabela contendo valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referente à Figura 4.

Figura 04 – Secreção de TNF- α por ND-BMDM e D-BMDM com *priming* de Nigericina

TNF- α - 30 minutos				
Diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	ND	ND	51,77	38,85
2	ND	ND	147,58	190,29
3	ND	ND	5,47	37,42
4	ND	ND	22,45	64,06
5	ND	ND	ND	79,32
6	ND	ND	20,61	131,46
7	ND	ND	135,83	163,77
8	ND	ND	105,38	149,02
9	ND	ND	163,88	223,00
10	ND	ND	207,73	238,41
11	ND	ND	80,97	142,92
12	ND	ND	187,40	212,42
13	ND	ND	200,15	234,84
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	102,25	146,60
Desvio Padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	76,82	72,86
Erro Padrão da Média	#DIV/0!	#DIV/0!	21,23	20,21
Não diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	ND	ND	83,71	51,05
2	ND	ND	46,74	50,33
3	ND	ND	70,59	54,66
4	ND	ND	122,09	104,29
5	ND	ND	211,66	103,22
6	ND	ND	157,86	236,79
7	ND	ND	311,48	116,11
8	ND	ND	332,17	390,06
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	167,04	138,31
Desvio Padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	108,86	118,51
Erro Padrão da Média	#DIV/0!	#DIV/0!	38,49	41,90

TNF- α – 2 horas				
Diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	ND	ND	271,35	62,61
2	ND	ND	295,62	171,87
3	ND	ND	280,21	340,12
4	ND	ND	228,43	284,25
5	ND	ND	196,46	204,21
6	ND	ND	256,80	198,08
7	ND	ND	266,89	265,33
8	ND	ND	220,76	208,63
9	ND	ND	709,16	318,35
10	ND	ND	782,18	547,09
11	ND	ND	591,77	557,38
12	ND	ND	695,91	627,08
13	ND	ND	1049,58	508,12
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	449,62	330,24
Desvio Padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	279,72	175,54
Erro Padrão da Média	#DIV/0!	#DIV/0!	77,58	48,69
Não diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	ND	ND	306,24	384,89
2	ND	ND	303,78	204,21
3	ND	ND	474,37	441,37
4	ND	ND	479,78	555,57
5	ND	ND	243,69	172,66
6	ND	ND	528,73	379,66
7	ND	ND	600,12	703,34
8	1,18	5,88	698,38	794,68
Média	1,18	5,88	454,39	454,55
Desvio Padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	158,73	220,57
Erro Padrão da Média	#DIV/0!	#DIV/0!	56,12	77,98

TNF- α – 4 horas				
Diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	ND	ND	348,49	143,81
2	ND	ND	413,34	182,59
3	ND	ND	220,75	314,40
4	ND	ND	357,54	350,92
5	ND	ND	384,23	314,40
6	ND	ND	603,49	450,16
7	ND	ND	489,87	712,42
8	ND	ND	640,31	713,42
9	ND	ND	875,76	1191,31
10	ND	ND	946,03	1054,27
11	ND	ND	895,33	943,95
12	ND	ND	1407,50	1212,73
13	ND	ND	693,44	971,36
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	636,62	658,13
Desvio Padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	327,54	387,21
Erro Padrão da Média	#DIV/0!	#DIV/0!	90,84	107,39
Não diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	ND	ND	333,99	416,12
2	5,50	29,23	910,68	851,87
3	ND	11,21	483,42	360,39
4	42,42	41,59	1022,94	919,63
5	ND	ND	368,16	265,33
6	ND	ND	676,94	727,44
7	ND	ND	808,22	915,29
8	24,11	34,60	1200,64	1323,11
Média	24,01	29,16	725,62	722,40
Desvio Padrão	18,46	12,99	315,62	356,07
Erro Padrão da Média	10,66	6,50	111,59	125,89

TNF- α - 6 horas				
Diabéticos				
Animal	5,5 -	25 -	5,5+	25+
1	ND	ND	659,02	469,38
2	ND	ND	582,41	364,19
3	ND	ND	1453,91	790,32
4	ND	ND	349,98	341,50
5	ND	ND	567,56	686,71
6	ND	ND	690,64	1122,59
7	ND	ND	582,82	979,55
8	39,27	49,24	1256,05	1393,13
9	3,88	11,95	859,90	1168,98
10	ND	1,01	1723,61	ND
11	ND	6,19	857,96	851,18
Média	21,58	17,10	871,26	816,75
Desvio Padrão	25,02	21,89	426,92	356,91
Erro Padrão da Média	17,69	10,95	128,72	112,86
Não diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	ND	ND	475,38	377,53
2	ND	ND	385,19	612,25
3	4,69	11,21	353,76	1276,03
4	ND	7,95	208,31	283,05
5	ND	4,82	571,43	335,40
6	0,40	ND	852,18	380,59
7	31,68	52,77	640,07	1056,49
8	17,16	25,86	1208,73	1465,19
Média	13,48	20,52	586,88	723,32
Desvio Padrão	14,06	19,75	318,69	472,16
Erro Padrão da Média	7,03	8,83	112,67	166,93

TNF- α - 24 horas				
Diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	ND	ND	844,51	913,24
2	ND	ND	513,82	571,86
3	ND	8,76	624,10	882,89
4	ND	ND	938,97	937,67
5	ND	ND	787,95	859,26
6	11,93	17,27	1453,81	940,17
7	1,28	0,40	1476,24	1144,64
Média	6,60	8,81	948,49	892,82
Desvio Padrão	7,53	8,44	379,63	169,47
Erro Padrão da Média	5,32	4,87	143,49	64,05
Não diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	ND	3,34	1337,35	898,84
2	ND	3,34	970,76	1063,37
3	13,68	21,99	824,01	923,93
4	30,33	32,42	811,20	1110,40
5	15,49	17,27	885,48	1167,02
6	6,60	5,71	1191,41	652,56
Média	16,53	14,01	1003,37	969,36
Desvio Padrão	9,97	11,92	214,92	187,19
Erro Padrão da Média	4,99	4,86	87,74	76,42

APÊNDICE F - Tabela contendo valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referente à Figura 5.

Figura 05 – Secreção de IL- β por ND-BMDM e D-BMDM com *priming* de Nigericina

IL-1 β - 30 minutos				
Diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	2,27	2,85	1283,30	997,43
2	1,69	4,59	380,88	252,76
3	5,75	1,69	226,58	185,21
4	2,27	1,69	249,38	324,25
5	3,43	1,69	282,18	345,76
6	12,97	15,86	47,82	163,86
7	ND	ND	217,38	210,21
8	9,38	7,94	360,15	344,66
9	5,63	14,36	50,17	73,66
10	0,74	1,29	35,77	13,26
11	6,18	2,92	82,67	10,54
12	6,18	8,90	90,60	131,27
13	16,00	3,46	13,81	22,57
Média	6,04	5,60	255,44	236,57
Desvio Padrão	4,68	5,07	333,56	258,76
Erro Padrão da Média	1,35	1,46	92,51	71,77
Não diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	ND	3,43	93,95	76,91
2	2,27	2,27	94,56	73,88
3	ND	ND	67,24	113,65
4	5,75	ND	72,67	69,65
5	0,77	ND	143,78	401,26
6	7,94	6,51	362,74	295,66
7	ND	ND	33,57	19,28
8	ND	0,74	52,40	214,06
Média	4,18	3,24	115,11	158,04
Desvio Padrão	3,26	2,44	105,35	133,06
Erro Padrão da Média	1,63	1,22	37,25	47,04

IL-1 β – 2 horas				
Diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	5,17	8,07	873,41	497,84
2	ND	3,43	552,58	473,74
3	2,27	12,15	396,54	426,87
4	2,27	4,01	203,46	210,69
5	6,91	6,91	159,51	185,86
6	4,35	5,79	150,71	163,08
7	6,51	5,07	333,56	275,78
8	5,07	5,07	239,06	94,47
9	ND	ND	22,57	14,36
10	ND	ND	55,74	6,72
11	ND	0,20	42,41	88,90
12	1,29	2,37	29,16	27,51
13	ND	ND	87,76	6,18
Média	4,23	5,31	242,04	190,15
Desvio Padrão	2,08	3,29	247,62	178,86
Erro Padrão da Média	0,74	1,04	68,68	49,61
Não diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	2,27	10,40	155,06	171,02
2	9,24	10,40	185,21	266,37
3	1,11	8,07	351,55	301,66
4	4,59	ND	196,92	287,03
5	7,22	7,94	89,98	163,86
6	2,20	5,07	468,10	748,62
7	ND	ND	106,54	115,13
8	5,63	ND	9,45	24,21
Média	4,61	8,38	195,35	259,74
Desvio Padrão	2,97	2,20	148,36	218,76
Erro Padrão da Média	1,12	0,99	52,45	77,34

IL-1 β – 4 horas				
Diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	ND	1,69	108,09	820,38
2	6,91	6,91	137,36	147,45
3	ND	ND	198,79	121,92
4	ND	ND	206,00	142,04
5	ND	ND	214,84	145,93
6	13,69	14,41	547,47	258,55
7	5,79	5,07	956,43	755,32
8	12,25	6,51	872,49	382,77
9	ND	ND	61,32	28,61
10	ND	ND	13,81	13,26
11	ND	ND	60,76	34,67
12	ND	ND	70,28	44,62
13	ND	ND	57,97	50,17
Média	9,66	6,92	269,66	226,59
Desvio Padrão	3,90	4,67	316,88	269,91
Erro Padrão da Média	1,95	2,09	87,89	74,86
Não diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	ND	ND	85,27	96,65
2	ND	ND	247,32	163,14
3	ND	ND	122,69	133,50
4	ND	ND	244,87	315,62
5	4,35	2,92	140,71	120,87
6	9,38	8,66	1324,98	1000,82
7	ND	ND	73,09	52,96
8	ND	ND	142,08	123,66
Média	6,87	5,79	297,63	250,90
Desvio Padrão	3,55	4,06	420,15	312,62
Erro Padrão da Média	2,51	2,87	148,55	110,53

IL-1 β - 6 horas				
Diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	ND	ND	80,73	461,89
2	ND	ND	55,94	417,50
3	ND	ND	418,39	472,01
4	2,80	ND	347,25	404,12
5	9,38	8,66	741,95	590,72
6	2,68	1,88	658,46	546,93
7	5,87	5,87	947,57	1300,09
8	ND	ND	174,82	102,26
9	ND	ND	66,80	61,87
10	6,44	ND	135,08	102,89
11	ND	ND	129,36	115,46
Média	5,43	5,47	341,49	415,98
Desvio Padrão	2,80	3,40	312,17	353,11
Erro Padrão da Média	1,25	1,97	94,12	106,47
Não diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	6,45	ND	93,61	121,15
2	ND	ND	198,79	327,53
3	ND	ND	235,89	372,41
4	ND	ND	133,50	170,22
5	4,27	1,09	195,25	85,50
6	5,07	1,88	832,37	564,07
7	17,91	8,85	86,02	124,93
8	ND	ND	188,44	174,17
Média	8,43	3,94	245,49	242,50
Desvio Padrão	6,39	4,27	243,05	165,01
Erro Padrão da Média	3,19	2,46	85,93	58,34

IL-1 β - 24 horas				
Diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	7,91	4,99	565,84	662,14
2	13,03	14,50	412,13	597,31
3	9,37	4,26	298,74	373,28
4	13,77	8,64	257,99	324,97
5	2,80	4,26	182,87	231,83
6	27,51	33,16	1067,08	904,33
7	12,26	21,88	1217,10	756,76
8	ND	ND	499,15	658,59
9	ND	ND	527,23	595,71
10	ND	ND	334,27	206,07
11	ND	ND	676,73	1124,93
12	ND	ND	407,11	671,76
Média	12,38	13,10	537,19	592,31
Desvio Padrão	7,66	10,98	316,08	273,41
Erro Padrão da Média	2,90	4,15	91,24	78,93
Não diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	14,41	15,13	145,32	195,16
2	ND	ND	115,56	223,78
3	12,97	10,82	178,66	253,66
4	4,35	ND	126,19	284,87
5	5,87	9,86	387,48	328,34
6	12,26	9,86	828,49	534,18
Média	9,97	11,42	296,95	303,33
Desvio Padrão	4,54	2,52	279,20	122,28
Erro Padrão da Média	2,03	1,26	113,98	49,92

APÊNDICE G - Tabela contendo valores individuais, média, desvio padrão e erro padrão da média referente à Figura 6.

Figura 06 – Secreção de IL-10 por ND-BMDM e D-BMDM com *priming* de Nigericina

IL-10 - 2 horas				
Diabéticos				
Animal	5,5 -	25 -	5,5+	25+
1	ND	ND	ND	ND
2	53,93	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND
Média	53,92	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Desvio Padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Erro Padrão da Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Não diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	2,48	ND
5	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND
Média	#DIV/0!	#DIV/0!	2,48	#DIV/0!
Desvio Padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Erro Padrão da Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

IL-10 - 4 horas				
Diabéticos				
Animal	5,5 -	25 -	5,5+	25+
1	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND
5	7,66	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND
Média	7,66	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Desvio Padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Erro Padrão da Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Não diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	2,24	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND
Média	2,245	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Desvio Padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Erro Padrão da Média	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

IL-10 - 6 horas				
Diabéticos				
Animal	5,5 -	25 -	5,5+	25+
1	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	6,52	60,99
6	ND	91,36	140,42	34,73
7	ND	ND	ND	ND
Média	#DIV/0!	91,36	73,47	47,86
Desvio Padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	94,68	18,56
Erro Padrão da Média	#DIV/0!	#DIV/0!	66,95	13,13
Não diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	2,24	ND
5	ND	110,69	89,60	ND
6	ND	182,12	ND	ND
Média	#DIV/0!	146,40	45,92	#DIV/0!
Desvio Padrão	#DIV/0!	50,50	61,77	#DIV/0!
Erro Padrão da Média	#DIV/0!	35,71	43,68	#DIV/0!

IL-10 - 24 horas				
Diabéticos				
Animal	5,5	25	5,5+	25+
1	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND
6	15,12	70,20	128,20	228,63
7	16,90	142,17	ND	ND
Média	16,01	106,18	128,20	228,63
Desvio Padrão	1,26	50,89	#DIV/0!	#DIV/0!
Erro Padrão da Média	0,89	35,98	#DIV/0!	#DIV/0!
Não diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	ND	3,24	ND	4,88
2	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND
5	ND	20,47	ND	66,66
6	150,88	138,68	ND	ND
Média	150,88	54,13	#DIV/0!	35,77
Desvio Padrão	#DIV/0!	73,72	#DIV/0!	43,68
Erro Padrão da Média	#DIV/0!	42,56	#DIV/0!	30,88

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

Figura 07 – Secreção de Óxido Nítrico por ND-BMDM e D-BMDM com *priming* de Nigericina

ON - 2 horas				
Diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	ND	0,07	0,17	ND
2	0,72	0,11	1,42	0,31
3	0,51	1,52	0,41	1,12
4	0,92	0,11	1,22	0,61
5	0,21	0,31	0,11	0,41
6	1,62	1,03	1,96	0,94
7	0,65	1,14	1,34	0,45
8	1,24	0,35	0,25	0,05
Média	0,84	0,65	0,96	0,56
Desvio Padrão	0,47	0,57	0,70	0,37
Erro Padrão da Média	0,18	0,20	0,25	0,14
Não diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	0,31	0,82	0,01	0,41
2	0,72	0,61	0,72	0,31
3	ND	0,31	0,31	0,41
4	0,61	0,61	0,01	ND
5	1,24	0,45	0,15	0,05
6	0,05	0,65	1,24	1,04
Média	0,59	0,57	0,41	0,45
Desvio Padrão	0,45	0,17	0,49	0,36
Erro Padrão da Média	0,20	0,07	0,20	0,16

ON - 4 horas				
Diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	1,22	0,31	1,22	0,31
2	1,32	0,31	1,72	0,11
3	0,19	0,89	0,49	0,49
4	0,49	0,29	0,29	0,39
5	0,59	0,69	0,29	0,49
6	2,23	0,55	0,25	1,24
7	1,14	0,65	0,84	1,14
8	1,04	1,04	1,74	1,34
Média	1,00	0,63	0,80	0,74
Desvio Padrão	0,67	0,28	0,66	0,49
Erro Padrão da Média	0,24	0,10	0,23	0,17
Não diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	0,39	0,49	0,49	1,19
2	0,69	0,49	0,39	0,49
3	0,39	0,69	0,59	0,69
4	0,69	0,49	0,59	0,79
5	2,53	0,55	2,83	0,74
6	1,64	0,15	1,74	5,32
Média	1,06	0,48	1,11	1,54
Desvio Padrão	0,86	0,18	0,98	1,87
Erro Padrão da Média	0,35	0,07	0,40	0,76

ON – 6 horas				
Diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	0,69	0,39	0,49	0,49
2	0,29	0,69	0,39	0,49
3	0,49	0,59	0,79	0,49
4	ND	ND	ND	ND
5	1,44	2,04	1,64	0,84
6	0,18	0,39	0,91	ND
7	1,33	2,27	0,91	1,23
Média	0,74	1,06	0,86	0,71
Desvio Padrão	0,53	0,86	0,44	0,33
Erro Padrão da Média	0,22	0,35	0,18	0,13
Não diabético				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	0,27
4	ND	ND	ND	ND
5	1,02	2,17	ND	0,28
6	ND	2,38	ND	4,05
Média	1,02	2,27	#DIV/0!	1,54
Desvio Padrão	#DIV/0!	0,15	#DIV/0!	2,18
Erro Padrão da Média	#DIV/0!	0,10	#DIV/0!	1,26

ON – 24 horas				
Diabéticos				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	0,38
3	0,17	ND	2,33	ND
4	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND
6	2,69	2,59	1,12	0,91
7	1,23	1,44	2,59	1,44
Média	1,36	2,01	2,01	0,91
Desvio Padrão	1,27	0,82	0,78	0,53
Erro Padrão da Média	0,73	0,58	0,45	0,31
Não diabético				
Animal	5,5-	25-	5,5+	25+
1	1,45	1,20	1,54	1,71
2	1,45	1,11	1,03	1,20
3	1,45	1,62	1,28	1,88
4	0,94	1,03	1,54	1,45
5	1,12	1,65	2,48	0,39
6	1,65	0,70	0,70	ND
Média	1,34	1,22	1,43	1,33
Desvio Padrão	0,26	0,36	0,61	0,58
Erro Padrão da Média	0,11	0,15	0,25	0,24

APÊNDICE I - Membranas representativas dos Western blots realizados nesta dissertação

