

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

TALES LYRA DE OLIVEIRA

**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NO TRANSPORTE DE GLICOSE
E ÁGUA NO EPITÉLIO ALVEOLAR DE RATOS DIABÉTICOS**

Orientador: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva

MACEIÓ-AL

2014

TALES LYRA DE OLIVEIRA

**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NO TRANSPORTE DE GLICOSE
E ÁGUA NO EPITÉLIO ALVEOLAR DE RATOS DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva

MACEIÓ-AL

2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

O48m Oliveira, Tales Lyra de.

Mecanismos moleculares envolvidos no transporte de glicose e água no epitélio alveolar de ratos diabéticos / Tales Lyra de Oliveira. – 2014.
78 f. : il.

Orientador: Robinson Sabino da Silva.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2014.

Bibliografias: f. 66-76.

Apêndices: f. 77-78.

1. SGLT1. 2. Proteínas facilitadoras de transporte de glicose.
3. Isoproterenol. 4. Florizina. 5. Diabetes. 6. Pulmão. I. Título.

CDU: 612.08

Folha de Aprovação

Tales Lyra de Oliveira

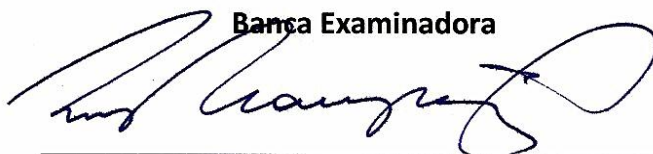
Mecanismos moleculares envolvidos no transporte de glicose e água no epitélio alveolar de ratos diabéticos

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 22 de setembro de 2014.

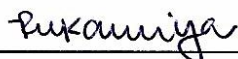


Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva (Orientador)

Banca Examinadora



Prof. Dr. Ruy Ribeiro de Campos Junior – (UNIFESP)



Prof.^a Dr.^a Regianne Umeko Kamiya – (UFAL)



Prof.^a Dr.^a Priscila da Silva Guimarães - (UFAL)

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Biologia Celular (LBC) e no Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa (LNFI) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) sob orientação do Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva.

Dedico esta conquista primeiramente a Deus, por ter me dado saúde, clareza de pensamento e discernimento.

À minha família, especialmente aos meus pais, Carlos e Patrícia, por não medirem esforços para a construção do meu aprendizado.

Aos meus amigos, pois sem eles meus dias teriam sido vazios.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me colocado em uma família tão especial e por iluminar meus caminhos, dando-me paz de espírito, saúde física e mental, clareza de pensamento e discernimento. Grato, Senhor, por ser merecedor de tantas coisas boas!

Aos Meus pais, Carlos e Patrícia, por não medirem esforços para a concretização dos meus sonhos. Não tenho dúvidas que construíram uma família íntegra e alicerçada em princípios. Tudo o que sou devo à educação que recebi. Peço desculpas pela ausência em alguns momentos de confraternização familiar, mas infelizmente o tempo, às vezes, não é justo! Grato por me fazer uma pessoa melhor nessa efêmera jornada terrena.

À minha família, que tanto incentiva a realização dos meus objetivos. Tenho muito orgulho de fazer parte de uma família tão especial. Agradeço as minhas avós, Marluce e Dirlene, por serem grandes exemplos de perseverança, amor ao próximo e simplicidade.

À minha amiga e colega de profissão, Carol Calles, por ter sido insistente em me fazer procurar o Prof. Robinson Sabino, hoje meu orientador, para uma conversa sem compromisso a qual, mais tarde, tornou-se meu projeto de mestrado. Tenho o maior respeito por sua dedicação e profissionalismo. Grato por ter dado o pontapé inicial na realização desse sonho!

Ao meu orientador, Prof. Robinson Sabino, pelo comprometimento, responsabilidade, ética e competência que exerce seu trabalho. Se hoje consigo dar passos mais largos na minha vida profissional, devo à oportunidade e confiança que me conferiste. Grato por todos os ensinamentos científicos e conselhos pessoais!

À família do Laboratório de Biologia Celular, com quem pude dividir esses últimos dois anos de muito aprendizado. Vocês são verdadeiros desbravadores da ciência! Gostaria de agradecer a cada um, Fernanda, Larissa, Rebeka, Janylle Ferro, Carol, Yngrid, Almair, Jeniffer, Isabela Maria, Clarisse, Laís, Daisy, Jamile Taniele, Marvin, Noé, Alex, Rafael, Paulinho e Samário, pelo companheirismo e amizade. Também não posso deixar de agradecer aos professores, Emiliano, Salete e Silvana, que abriram as portas de seu laboratório permitindo-me realizar esta etapa. Grato por todas as importantes discussões científicas!

À família do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa, em especial a Návylla, Polliane e Igor, por toda contribuição na realização dos experimentos. Trabalhamos como uma verdadeira equipe! Grato pela paciência, dedicação e incentivo!

Às minhas amigas-irmãs, Návylla e Fernanda, com quem pude vivenciar momentos inesquecíveis. A presença cotidiana de vocês foi essencial nessa trajetória. Que nossa amizade seja separada apenas por vírgulas, nunca por um ponto final. Grato por existirem!

Aos meus amigos de turma do mestrado, especialmente Marvin, Yngrid e Jordana, pelas boas risadas e companheirismo. E, a Chiara, por ter disponibilizado um pouco de seu tempo para ajudar-me com tanta atenção e responsabilidade.

À família que ganhei no Serviço de Verificação de Óbitos da UNCISAL. A melhor equipe de plantonistas da semana! Maria Rita, Tobias, Vinícius, Charles, Ailton e Morris, não posso deixar de agradecê-los pela ajuda, torcida e amizade. Nosso companheirismo fez toda a diferença! Também agradeço a todos os outros amigos que fiz nos plantões durante a semana: Quezia, Cicera, Silma, João Carlos, Gerliana, Ana Rose, Kátia, Marcelo, Jéssica, Flávia, Nêdja, Simone e Nilda.

Às minhas amigas, Janylle e Carol, por se mostrarem tão solícitas e competentes. Tenho em vocês exemplos de comprometimento e dedicação. Não irei esquecer-me das nossas risadas nas aulas de inglês no LBC! Risadas a parte, grato pela sincera amizade.

Aos órgãos de fomento CNPq/Capes e FAPEAL pelo apoio financeiro fundamental para a realização desse trabalho.

“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós!”

Chico Xavier

RESUMO

A hiperglicemia decorrente da diabetes pode promover alterações metabólicas e funcionais em diferentes órgãos e sistemas, incluindo o pulmão. Como exemplo, temos o aumento da concentração de glicose no líquido superficial das vias aéreas (ASL) que pode propiciar o crescimento de micro-organismos, tornando-se fator de risco para infecções respiratórias. O cotransportador de Na^+ /glicose/ H_2O SGLT1 já foi mostrado no epitélio alveolar de ratos, porém o transportador de glicose GLUT2 não foi descrito neste epitélio. A partir dessas informações, o presente estudo buscou avaliar o efeito da diabetes e do tratamento com isoproterenol e florizina sobre os fluxos de glicose e água no epitélio alveolar de ratos. Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), sob protocolo 40/2012. Foram utilizados ratos Wistar (n=6 por grupo) Não-Diabéticos e Diabéticos tratados com salina (NDs e Ds), isoproterenol (NDi e Di) ou florizina (NDf e Df). A diabetes foi induzida por aloxana (40 mg/kg, i.v.) 21 dias antes do estudo. No 22º dia, os animais receberam tratamento por via intranasal com salina (0,9%), isoproterenol (5 mg/kg) ou florizina (10^{-3} M). Após duas 2h, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (60 mg/kg, i.p.) e, em seguida, foi realizada a coleta do lavado broncoalveolar (BAL) e dissecação da caixa torácica para remoção do tecido pulmonar. Assim, foram realizados os procedimentos de análise histológica (HE e PAS) e imunohistoquímica (SGLT1 e GLUT2) do epitélio respiratório e de mensuração do volume, concentração de glicose e de proteínas totais do ASL por meio do lavado broncoalveolar (BAL). Os resultados foram expressos em média \pm EPM e comparados com ANOVA/Newman-Keuls ($p < 0,05$). A diabetes e o tratamento com florizina promoveram aumento da produção de muco no lúmen do epitélio bronquiolar, porém nenhum grupo experimental apresentou alteração de estrutura histológica nesse epitélio. O volume e a concentração de glicose e de proteínas totais do ASL foram aumentados ($p < 0,05$) em animais diabéticos. O tratamento com isoproterenol promoveu redução ($p < 0,05$) de 17% e 50% do volume e da concentração de glicose do ASL, respectivamente, enquanto que a administração de florizina promoveu efeitos contrários aos observados com o tratamento de isoproterenol. O isoproterenol também propiciou a translocação do SGLT1 para a membrana plasmática de pneumócitos de animais normoglicêmicos e diabéticos. Além disso, o GLUT2 foi demonstrado pela primeira vez, com baixa expressão proteica, nessas células. A inoculação de cepas de MRSA e *Pseudomonas aeruginosa* no BAL revelou que a proliferação dessas colônias aumentou em animais diabéticos e em tratados com florizina, entretanto, reduziu em animais tratados com isoproterenol. Em conjunto, nossos resultados sugerem que o isoproterenol promove à translocação do SGLT1 para a membrana luminal dos pneumócitos favorecendo a diminuição da concentração de glicose e do volume de líquido do ASL de animais diabéticos, reduzindo o risco de complicações respiratórias. Além disso, verificamos que o bloqueio do SGLT1 na membrana luminal dos pneumócitos por florizina aumenta a concentração de glicose e o volume de ASL, o que indica que o SGLT1 alveolar pode ser um importante modulador do volume e da composição do ASL.

Palavras-chaves: SGLT1. GLUT2. Isoproterenol. Florizina. Diabetes. Pulmão.

ABSTRACT

The hyperglycemia resulting of the diabetes can promote metabolic and functional changes in several organs and systems, including the lungs. An example is the high glucose concentration in the airway surface liquid (ASL) that increases the growth of microorganisms, making it a risk factor for respiratory infections. The cotransporter Na⁺/glucose/H₂O SGLT1 has been detected in rat alveolar epithelium, but the glucose transporter, GLUT2, has not been described in this epithelium. Considering, this study aimed to evaluate the effect of diabetes and the treatment with isoproterenol and phlorizin on glucose and water flows in the rat alveolar epithelium. This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA), from Federal University of Alagoas (UFAL), protocol 40/2012. Were used Wistar rats (n=6 per group) Non-Diabetics and Diabetics treated with saline (NDs and Ds) treated with isoproterenol (NDi and Di) or phlorizin (NDf and Df). The diabetes was induced by alloxan (40 mg/kg, iv) 21 days before the study. On 22nd day after the induction, the animals were treated intranasally with saline (0.9%), isoproterenol (5 mg/kg) or phlorizin (10⁻³ M). After 2h, the animals were anesthetized with sodium thiopental (60 mg/kg, ip) and then, was collect the bronchoalveolar lavage (BAL) and the thoracic cage was dissected for remove the lung. The lung lobes were systematically removed and sectioned. Thus it was performed the procedures for histology (HE and PAS) and immunohistochemistry (SGLT1 and GLUT2) analyses of the respiratory epithelium and measurement of water volume, concentration of glucose and total proteins of ASL using the bronchoalveolar lavage. The BAL was used to quantify the glucose concentration in the ASL. The results were expressed as mean ± SEM and compared with ANOVA/Newman-Keuls test (p< 0.05). The diabetes and the treatment with phlorizin promoted an increase in mucus production in the lumen of bronchial epithelium, but none of the experimental groups showed an alteration in histological structure in this epithelium. The volume of water and ASL glucose concentration and total proteins was increased (p< 0.05) in diabetic animals. The treatment with isoproterenol promoted a reduction (p< 0.05) of 17% and 50% of the water volume and the glucose concentration of ASL, respectively, while the administration of phlorizin produced opposite effect compared with isoproterenol-treated rats. The isoproterenol also provided the SGLT1 translocation to the plasma membrane of pneumocytes in normoglycemic and diabetic animals. Furthermore, the GLUT2 was described for the first time, with low protein expression, in these cells. The inoculation of MRSA and *Pseudomonas aeruginosa* on BAL revealed that the proliferation of these colonies increased in diabetic animals and in the animals treated with phlorizin, however was reduced in animals treated with isoproterenol. Taken together, our results suggest that isoproterenol promotes the translocation of SGLT1 to the luminal membrane of pneumocytes, favoring the reduction of glucose concentration and the liquid volume of ASL in diabetic animals, reducing the risk of respiratory complications. In addition, we observed that blocking of SGLT1 in the luminal membrane of pneumocytes by phlorizin increases the glucose concentration and the volume of ASL, which indicates that the alveolar SGLT1 might be an important modulator of the volume and composition of ASL.

Key-words: SGLT1. GLUT2. Isoproterenol. Phlorizin. Diabetes. Lung.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01	Principais tipos celulares do epitélio respiratório.....	21
FIGURA 02	Epitélio respiratório.....	22
FIGURA 03	Desenho esquemático do transporte de muco no lúmen das vias aéreas.....	24
FIGURA 04	Desenho esquemático do mecanismo de batimento ciliar.....	25
FIGURA 05	Desenho esquemático do mecanismo de absorção e secreção de eletrólitos e água no epitélio respiratório.....	26
FIGURA 06	Estrutura secundária do cotransportador SGLT1.....	27
FIGURA 07	Estrutura química da florizina e estrutura conformacional em 3D do sítio de ligação entre a florizina e o SGLT1.....	28
FIGURA 08	Proporção de mortes decorrentes de complicações da diabetes.....	30
FIGURA 09	Estrutura química do isoproterenol.....	32
FIGURA 10	Modelo experimental de indução da diabetes.....	36
FIGURA 11	Modelo esquemático de remoção e perfusão do tecido pulmonar.....	38
FIGURA 12	Massa corpórea dos animais.....	43
FIGURA 13	Concentração de glicose plasmática.....	44
FIGURA 14	Estrutura histológica do epitélio bronquiolar.....	45
FIGURA 15	Presença de muco no epitélio bronquiolar.....	46
FIGURA 16	Volume de ASL.....	47
FIGURA 17	Concentração de glicose do ASL.....	48
FIGURA 18	Concentração de proteínas totais do ASL.....	49
FIGURA 19	Localização do cotransportador SGLT1 em pneumócitos.....	50
FIGURA 20	Localização do transportador GLUT2 em pneumócitos.....	52
FIGURA 21	Crescimento das colônias de MRSA no ASL.....	53
FIGURA 22	Crescimento das colônias de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> no ASL.....	54
FIGURA 23	Modelo esquemático dos fluxos de glicose e água em pneumócitos.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
Anti- GLUT2	Anticorpo contra o transportador GLUT2
Anti-SGLT1	Anticorpo contra o cotransportador SGLT1
AQP	Aquaporina
ASL	Líquido de superfície das vias aéreas
ATP	Trifosfato de adenosina
BAL	Lavado broncoalveolar
β-AR	Receptor β-adrenérgico
Df	Ratos Wistar diabéticos tratados com florizina
Di	Ratos Wistar diabéticos tratados com isoproterenol
Ds	Ratos Wistar diabéticos tratados com salina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
GLUTs	Família de transportadores de glicose por difusão facilitada
GLUT2	Transportador de glicose tipo 2 por difusão facilitada
HE	Hematoxilina-Eosina
ISO	Isoproterenol
Kb	Kilobases
MB	Membrana basal
ML	Membrana luminal
M	Molar
mm	Milímetro
μl	Microlitro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
NDf	Ratos Wistar não-diabéticos tratados com florizina
NDi	Ratos Wistar não-diabéticos tratados com isoproterenol
NDs	Ratos Wistar não-diabéticos tratados com salina
PAS	Ácido Periódico de Shiff
PBS	Tampão fosfato salino
PKA	Proteína cinase A

SGLT1	Cotransportador de Na ⁺ /glicose/H ₂ O tipo 1
SGLTs	Família de cotransportadores de glicose acoplado ao sódio
SLC2A1	Gene que codifica a proteína SGLT1
U/S	Razão peso úmido/peso seco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo geral.....	19
2.2	Objetivos específicos.....	19
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1	Epitélio respiratório.....	21
3.1.1	Líquido superficial das vias aéreas.....	23
3.2	Transportadores de glicose.....	26
3.2.1	Florizina.....	28
3.2.2	Transportadores de glicose através do epitélio alveolar.....	28
3.3	Diabetes mellitus.....	29
3.3.1	Relação entre aumento da concentração de glicose no ASL e infecção respiratória na diabetes.....	30
3.4	Isoproterenol.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1	Animais.....	34
4.2	Modelo experimental.....	34
4.3	Coleta das Amostras.....	36
4.3.1	Coleta de tecido pulmonar e análise do volume de ASL.....	36
4.3.2	Coleta de lavado broncoalveolar e análise da concentração de glicose e proteínas totais do ASL.....	36
4.3.3	Coleta de tecido pulmonar e análise imunohistoquímica de transportadores de glicose.....	37
4.3.4	Coleta de tecido pulmonar e análise histológica do epitélio bronquiolar.....	37
4.4	Avaliação da concentração de glicose do BAL.....	38
4.5	Avaliação da concentração de proteínas totais do BAL.....	38
4.6	Imunohistoquímica.....	39
4.7	Processamento e análise histológica.....	40
4.8	Análise da proliferação de colônias bacterianas.....	41
4.9	Análise estatística.....	41
5	RESULTADOS.....	42

5.1	Parâmetros gerais de caracterização da diabetes.....	43
5.1.1	Massa corpórea dos animais.....	43
5.1.2	Concentração de glicose plasmática.....	43
5.2	Estrutura histológica do epitélio bronquiolar.....	44
5.3	Presença de muco no epitélio bronquiolar.....	45
5.4	Volume de ASL.....	47
5.5	Concentração de glicose do ASL.....	47
5.6	Concentração de proteínas totais do ASL.....	48
5.7	Localização do cotransportador SGLT1 em pneumócitos.....	49
5.8	Localização do transportador GLUT2 em pneumócitos.....	51
5.9	Crescimento das colônias de MRSA no ASL.....	53
5.10	Crescimento das colônias de <i>P. aeruginosa</i> no ASL.....	53
6	DISCUSSÃO.....	55
6.1	Avaliação histológica.....	56
6.2	Participação do cotransportador SGLT1 nos fluxos de água do ASL.....	57
6.3	Participação do GLUT2 e do SGLT1 nos fluxos de glicose do ASL.....	60
7	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS.....	66
	APÊNDICES.....	77

A diabetes mellitus (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla caracterizada pela presença de hiperglicemia inapropriada decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina exercer adequadamente seus efeitos (MASHARANI; KARAM, 2001). A DM constitui atualmente um dos mais importantes problemas de saúde pública em todo o mundo, especialmente em países em desenvolvimento, onde são observados os maiores índices de incidência e prevalência (LI et al., 2010; IDF, 2013). O impacto da diabetes como problema de saúde pública decorre não apenas de seu quadro clínico diretamente relacionado à hiperglicemia, mas principalmente pelas alterações funcionais que ocorrem em diferentes órgãos e sistemas, resultantes do descontrole metabólico crônico (ADA, 2014).

Como exemplo, existem as alterações que ocorrem no sistema respiratório devido a DM, tais como redução da retração elástica pulmonar, redução dos volumes pulmonares e diminuição da capacidade de difusão dos gases através da membrana alveolocapilar (GOLDMAN, 2003; WALTER, 2003). A hiperglicemia vem sendo apontada como o principal fator contribuinte para as alterações histológicas estruturais do epitélio respiratório, pois desencadeia estresse oxidativo no pulmão por meio do aumento da produção de ânion superóxido mitocondrial e do aumento da glicosilação não-enzimática de proteínas (BROWNLEE, 2001).

A membrana luminal do epitélio das vias respiratórias é recoberta por uma fina camada de fluido denominado líquido de superfície das vias aéreas (ASL) (WIDDICOMBE; WIDDICOMBE, 1995). Indivíduos hiperglicêmicos apresentam uma concentração aumentada de glicose no ASL, o que contribui para o aumento do risco de infecções respiratórias (BAKER et al., 2006; KORNUM et al., 2007). Alguns ensaios clínicos evidenciaram que a detecção de glicose na secreção brônquica de pacientes entubados está relacionada com o risco de infecção respiratória, principalmente por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (PHILIPS et al., 2005).

A glicose é a principal fonte de energia para organismos eucariontes, e tem papel central no metabolismo celular (SCHEEPERS; JOOST; SCHURMANN, 2004). O transporte de glicose ocorre por meio de proteínas carreadoras presentes na membrana plasmática. Estas proteínas, chamadas de transportadores de glicose, podem ser divididas em duas famílias: transportadores de glicose por difusão facilitada (GLUTs) e cotransportadores de Na⁺/glicose (SGLTs) (BELL et al., 1990; CARRUTHERS, 1990). Sabe-se que na membrana luminal do intestino (WRIGHT; MARTÍN; TURK, 2003; RODER et al., 2014) e de ductos salivares (SABINO-SILVA et al., 2013) pode ocorrer um processo de reabsorção de glicose e água mediado por SGLT1 na membrana luminal e proteínas tipo GLUT na membrana basolateral.

O cotransportador de Na^+ /glicose/ H_2O SGLT1 já foi descrito na superfície de pneumócitos tipo I (BODEGA et al., 2010) e tipo II (BOYD, 1990). Porém, ainda não foi evidenciado o papel funcional do SGLT1 do epitélio alveolar. Além disso, pouco se sabe sobre o fluxo de glicose envolvendo transportadores de glicose GLUT2 nesse epitélio.

Então, considerando que classicamente o SGLT1 é translocado por meio da proteína cinase A (PKA), e esta é ativada pela interação de agonistas β -adrenérgicos com seus receptores, esse estudo buscou avaliar o papel do isoproterenol (agonista β -adrenérgico) e da florizina (inibidor de SGLTs) na regulação do fluxo de glicose e água no epitélio alveolar de ratos diabéticos. Assim, espera-se que o conhecimento dos mecanismos de transporte de glicose e água no epitélio alveolar de ratos diabéticos abra perspectivas para o desenvolvimento de fármacos que possam minimizar as complicações respiratórias decorrentes do aumento da concentração de glicose e do volume de ASL.

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da diabetes e do tratamento com isoproterenol e florizina sobre os fluxos de glicose e água no epitélio alveolar de ratos.

2.2 Objetivos específicos

Utilizando animais não-diabéticos e diabéticos, tratados com salina, isoproterenol ou florizina, propomos os seguintes objetivos específicos:

1. Verificar as alterações de volume de ASL;
2. Avaliar a concentração de glicose e de proteínas totais do ASL;
3. Analisar a estrutura histológica e a produção de muco do epitélio bronquiolar;
4. Identificar a localização subcelular do cotransportador de Na^+ /glicose/ H_2O SGLT1 em pneumócitos;
5. Verificar a expressão do transportador de glicose GLUT2 em pneumócitos;
6. Avaliar o crescimento de cepas bacterianas de MRSA e de *P. aeruginosa* no ASL.

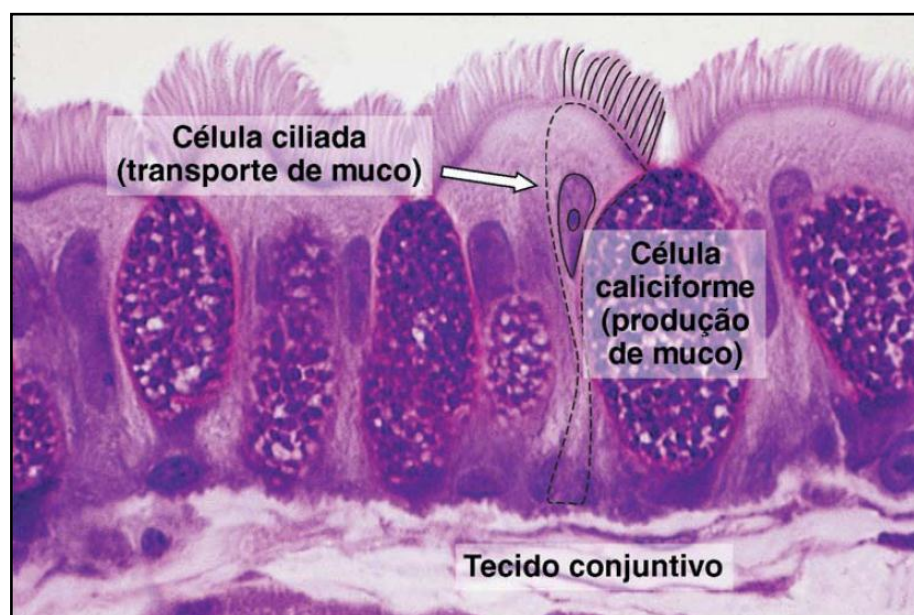
3.1 Epitélio respiratório

O sistema respiratório possui uma arquitetura voltada para a otimização de sua função primordial que é de efetuar as trocas gasosas. As estruturas que compõem esse sistema podem ser divididas entre aquelas que promovem a entrada e saída de ar do organismo, chamada de zona condutora, e aquelas que facilitam o trânsito gasoso para o sangue e do sangue para o ambiente, chamada de zona respiratória (SALDIVA, 1990).

As estruturas anatômicas que fazem parte da zona condutora são: fossas nasais, nasofaringe, laringe, traqueia, brônquios, bronquíolos e bronquíolos terminais; e as que estão situadas na zona respiratória são: bronquíolos respiratórios, ductos alveolares, sacos alveolares e alvéolos. O epitélio respiratório é formado por uma camada celular contínua, presente nas vias aéreas proximais e em suas ramificações até cerca da 23ª geração brônquica (QU et al., 2005; ROSS; PAWLINA, 2012).

Nas vias aéreas de maior calibre, o epitélio respiratório é pseudoestratificado cilíndrico ciliado com células caliciformes, tornando-se colunar ou cuboide nas pequenas vias aéreas. Esse tipo de epitélio reveste a maior parte do sistema respiratório, por isso é também denominado de epitélio tipo respiratório. Os principais tipos celulares que compõem o epitélio respiratório são: colunar ciliado, caliciforme, em escova, granular e basal (CRYSTAL et al., 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011) (Figura 1).

FIGURA 1 - Principais tipos celulares do epitélio respiratório.

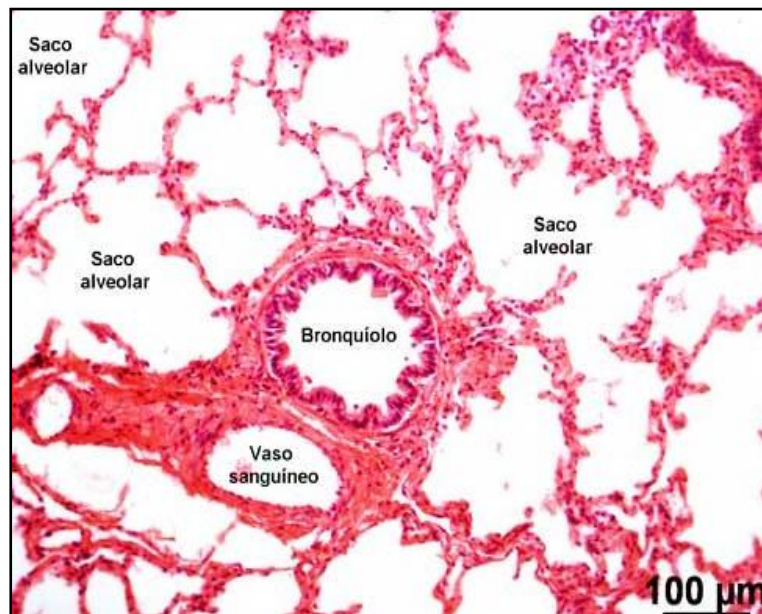


Fonte: Modelo adaptado de JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011.

Os bronquíolos e os alvéolos (Figura 2) são estruturas estreitamente interligadas e fundamentais para o funcionamento do sistema respiratório. Os bronquíolos são as ramificações de menor calibre da árvore brônquica apresentando um diâmetro médio de 1 mm. O epitélio bronquiolar é inicialmente cilíndrico simples ciliado, passando a cúbico simples, ciliado ou não, na porção final. Diferentemente dos brônquios, os bronquíolos não apresentam cartilagem, glândulas ou nódulos linfáticos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011; ROSS; PAWLINA, 2012).

Os alvéolos são estruturas encontradas nos bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e sacos alveolares, sendo responsáveis pela estrutura esponjosa do parênquima pulmonar. O epitélio alveolar é formado por pneumócitos tipo I e II, células endoteliais e macrófagos. O pneumócito tipo I é uma célula pavimentosa que constitui cerca de 95-97% da superfície alveolar e sua principal função é formar uma barreira de espessura mínima que possibilite as trocas gasosas com o meio. Enquanto que o pneumócito tipo II apresenta-se distribuído em apenas 3-5% do epitélio alveolar e sua função é produzir surfactante pulmonar, o que reduz a tensão superficial alveolar e facilita a respiração (ROSS; PAWLINA, 2012).

FIGURA 2 - Epitélio respiratório.



Fonte: <http://www.unifesp.br/morfo/histologia/ensino/pulmao/histologia.htm>

Diariamente, o ser humano inala aproximadamente 12.000 litros de ar do meio ambiente, carreando cerca de 25 milhões de partículas por hora para o interior das vias aéreas (SEATON et al., 1995). Entretanto, apesar da inalação contínua de agentes nocivos, os

pulmões são estéreis. Isso ocorre porque as vias de condução são estruturadas anatômica e fisiologicamente para proteger a região alveolar (LORENZI-FILHO et al, 1992) por meio de respostas imunológicas inatas (não específicas) ou adquiridas (específicas) (NAKAGAWA et al., 2005). O sistema de defesa inato é responsável pelo transporte de partículas e microorganismos depositados na superfície das vias aéreas e pela eliminação de patógenos nos alvéolos através do condicionamento do ar inspirado (umidificação, aquecimento e filtração), transporte mucociliar (batimento ciliar do epitélio respiratório) e fagocitose (macrófagos da região alveolar). O sistema de defesa adquirido é antígeno-específico, incluindo respostas imunológicas mediadas por células e anticorpos (SALDIVA, 1990).

3.1.1 Líquido superficial das vias aéreas

O líquido superficial das vias aéreas (ASL) é uma solução aquosa complexa, com cerca de 6 a 20 micrômetros de espessura, que está presente sobre o epitélio respiratório (WU et al., 1996). É composto por cerca de 95% de água; 1% de sais inorgânicos; 0,5 a 1% de lipídeos; 0,5 a 1% de proteínas livre e 1 a 2% de glicoproteínas (HOUTMEYERS et al., 1999; ROGERS, 2007). Estima-se que a concentração de glicose do ASL de humanos, em condições normais, seja aproximadamente 12,5 vezes menor que a encontrada no plasma sanguíneo (BAKER et al., 2007), semelhante ao observado em pulmões de ratos (SAUMON; MARTET; LOISEAU, 1996) e ovelhas (BAKER et al., 1989).

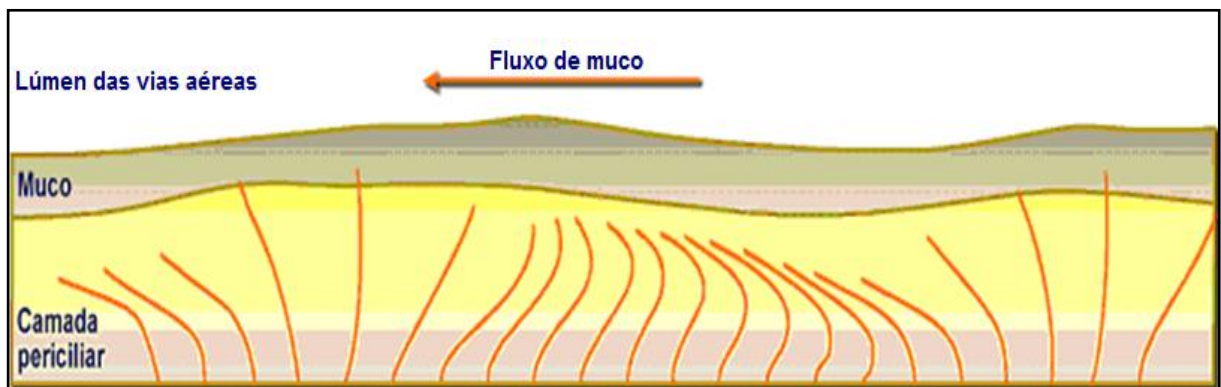
O ASL é formado por uma camada mais densa e superficial, chamada muco ou fase gel, e uma camada menos densa e mais profunda, chamada líquido periciliar ou fase sol. A camada de muco do ASL é composta principalmente de mucinas. As mucinas são macromoléculas ricamente glicosiladas, produzidas e secretadas pelas células caliciformes do epitélio respiratório e pelas glândulas seromucosas presentes na submucosa das vias aéreas proximais (KNOWLES; BOUCHER, 2002; ROGERS, 2007). São as mucinas que promovem a adesão dos agentes agressores orgânicos e inorgânicos ao muco, permitindo a depuração satisfatória das vias respiratórias.

O líquido periciliar é a camada menos densa do ASL e está disposto entre o epitélio respiratório e a camada de muco, sendo sua principal função permitir o batimento adequado dos cílios presentes no epitélio, promovendo o transporte mucociliar efetivo (RANDELL; BOUCHER, 2006). O ASL considerado ideal deve possuir um componente suficientemente elástico capaz de transferir o movimento dos cílios à camada de muco, e um componente suficientemente deformável capaz de promover o deslocamento do muco a partir do

batimento ciliar (SALDIVA, 1990; RIVERO et al., 2001).

Assim, o ASL possui funções de umidificação do ar inalado; lubrificação do epitélio respiratório, permitindo o funcionamento ciliar adequado; inativação de agentes agressores exógenos, como partículas inorgânicas, gases ou micro-organismos; e condução desses agentes agressores para fora das vias aéreas por meio do transporte mucociliar (ROGERS, 2007). O mecanismo de transporte mucociliar (Figura 3) é realizado nas vias aéreas respiratórias através do batimento ciliar que impulsiona o muco no sentido cranial, em direção à orofaringe, onde é deglutido ou expectorado (LORENZI-FILHO et al., 1992). O perfeito funcionamento do transporte mucociliar depende de fatores ligados aos cílios, à composição do muco e à interação adequada entre cílios e muco (HOUTMEYERS et al., 1999).

FIGURA 3. Desenho esquemático do transporte de muco no lúmen das vias aéreas.



Fonte: Modificado de MACCHIONE, 1998.

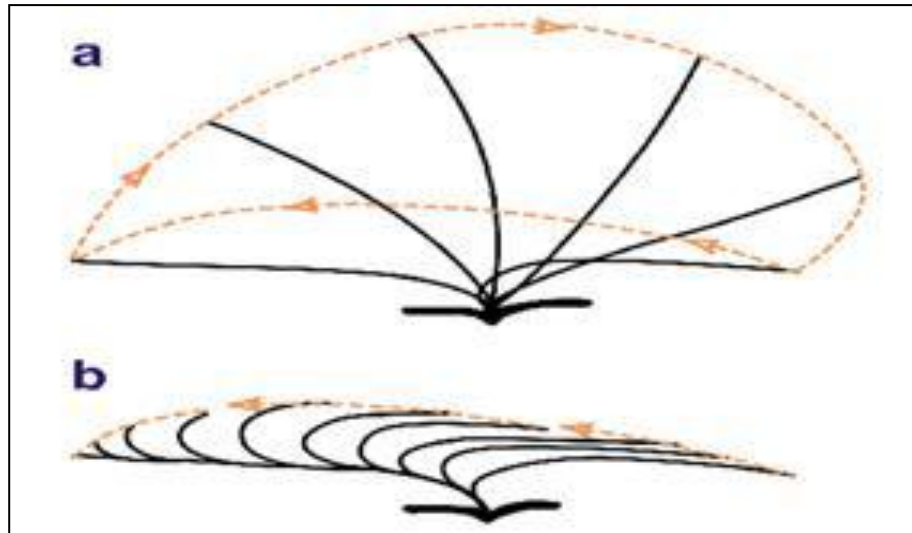
Esquema representativo do mecanismo de transporte mucociliar no lúmen das vias aéreas. O batimento ciliar segue uma orientação em direção à orofaringe.

Portanto, para um transporte mucociliar eficiente é necessária a ação coordenada de três funções celulares: geração de força, função secretora e transporte de água e íons. Uma falha em qualquer desses elementos pode ser suficiente para o colapso desse sistema de transporte (SALDIVA et al., 1992). À medida que ocorre falência do transporte mucociliar, o indivíduo passa a depender de uma forma progressivamente maior do carreamento do muco realizado pela tosse (PUHELLE; ZAHM; AUG, 1981).

A eficiência da propulsão do ASL pelos cílios é alcançada pelo fato do batimento ciliar ser assimétrico. O batimento ciliar pode ser decomposto em duas fases, na primeira o cílio se estende totalmente e sua extremidade penetra parcialmente na camada gel (fase de propulsão). Em uma segunda fase, de recuperação, o cílio dobra-se e coloca o seu eixo principal paralelamente à superfície epitelial. Desta forma, retorna à posição original

lentamente, com uma velocidade cerca de duas vezes menor que a do batimento efetivo, por uma fase de menor impedância, sem qualquer contato com a camada gel (Figura 4).

FIGURA 4. Desenho esquemático do mecanismo de batimento ciliar.



Fonte: Modificado de LORENZI-FILHO, 1992.

Ciclo do batimento ciliar visualizado de perfil. **a.** Fase de propulsão; **b.** Fase de recuperação: onde o cílio movimenta-se lentamente e em direção contrária ao transporte do muco.

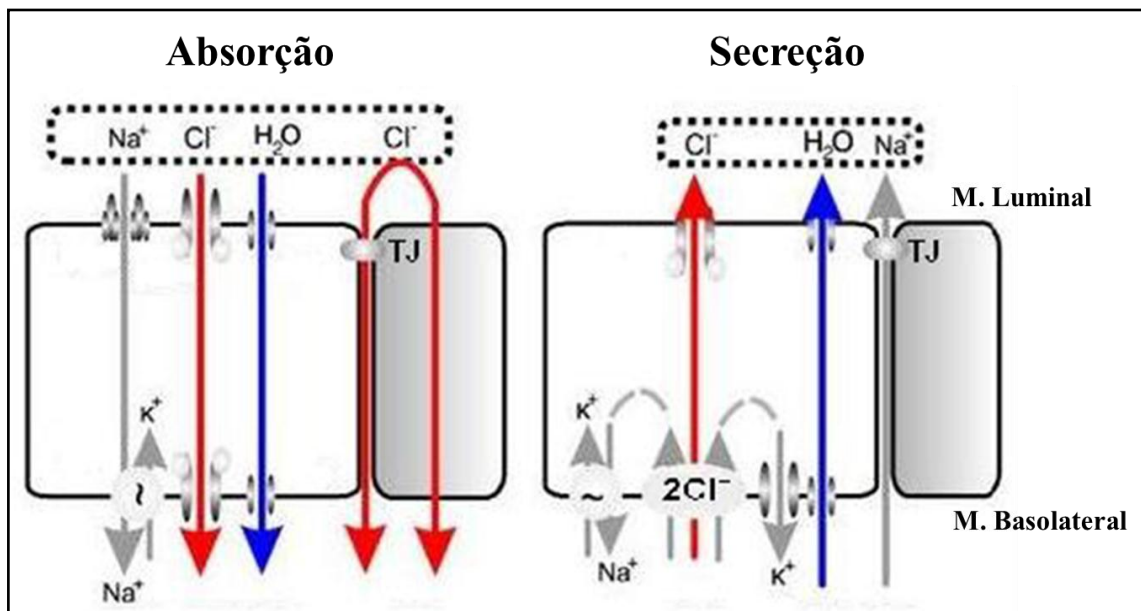
O volume de ASL da hipofase sol depende das células epiteliais (em especial das células ciliadas) que possuem a capacidade tanto de secretar como de absorver líquido, utilizando a energia celular para mobilização de íons contra um gradiente eletroquímico. As células epiteliais são polarizadas anatômica e funcionalmente, o que é fundamental para que exerçam suas funções (BOUCHER, 1994). Essas células estão alinhadas lado a lado e separadas por um espaço intercelular que se encontra estreitado, por junções firmes (*tight junctions*), próximo ao lúmen, o que determina uma difusão seletiva do espaço intercelular (BOUCHER, 1994).

Existem dois mecanismos básicos de transporte iônico através do epitélio respiratório: um que determina a capacidade de absorção de líquidos e outro oposto, que determina a secreção de líquidos (WELSH, 1987; BOUCHER, 1994). A absorção de líquidos é controlada através de canais específicos na membrana luminal que facilitam a entrada de sódio a favor do gradiente eletroquímico. Uma vez dentro da célula, o sódio sairá pela membrana basolateral, através da bomba Na^+/K^+ . A passagem do Na^+ provoca um desequilíbrio de cargas, gerando energia para a passagem passiva de Cl^- (BARROSO et al., 1992) (Figura 5).

A secreção de líquidos ocorre a partir de um mecanismo de cotransporte iônico na membrana basolateral que transporta, no mesmo sentido, o Na^+ a favor do seu gradiente

eletroquímico e acopladamente os íons K^+ e Cl^- . O Na^+ e o K^+ saem novamente pela membrana basolateral através da bomba Na^+/K^+ e por um canal específico para o K^+ , respectivamente. No entanto, o Cl^- alcança o lúmen da via aérea pela membrana luminal através de um canal específico de Cl^- (BARROSO et al., 1992; BOUCHER, 1994) (Figura 5). Os canais iônicos também regulam de forma indireta a quantidade de líquido na camada sol, modulando as propriedades químicas e reológicas do muco e, desta forma, controlando seu grau de hidratação (VERDUGO, 1990; GASTALDI; JARDIM; KING, 2000).

FIGURA 5. Desenho esquemático do mecanismo absorção e secreção de eletrólitos e água no epitélio respiratório.



Fonte: Modificado de WINE, 1999.

Mecanismos de absorção e secreção de eletrólitos e água no epitélio respiratório (TJ: tight junction).

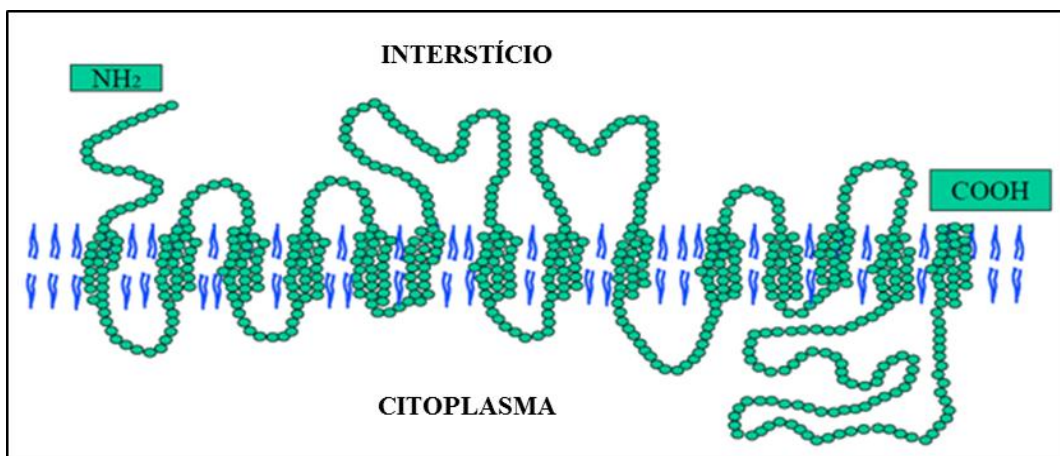
3.2 Transportadores de glicose

A glicose é a principal fonte de energia para todos os tipos celulares de mamíferos, nos quais é responsável pelo fornecimento de ATP tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas (SCHEEPERS; JOOST; SCHURMANN, 2004; WRIGHT; HIRAYAMA; LOO, 2007). A glicose é uma molécula polar, insolúvel à membrana plasmática, portanto, dependente de proteínas carreadoras para realizar seu transporte através das células. Essas proteínas, chamadas de transportadores de glicose, podem ser divididas em duas famílias: transportadores de glicose por difusão facilitada (GLUTs) e cotransportadores de Na^+ /glicose (SGLTs) (WRIGHT; HIRAYAMA; LOO, 2007; THORENS; MUECKLER, 2010).

Os GLUTs têm capacidade de realizar um fluxo bidirecional de glicose e o gradiente do substrato é que determina a direção intracelular ou extracelular do transporte de glicose. (BELL et al., 1990). Considerando que a glicose, como substrato energético, está constantemente sendo consumida nas células, as forças de gradiente garantem um influxo do substrato, na maioria dos tipos celulares, através de diferentes isoformas de GLUTs. Entretanto, quando a concentração intracelular de glicose é maior que a extracelular, o que é comum em territórios que fazem transporte de glicose em células polarizadas, as forças de gradiente promovem um efluxo do substrato através do transportador (BELL et al., 1990).

Os SGLTs fazem parte da família de proteínas transportadoras de soluto acoplado ao Na^+ (KONG; YET; LEVER, 1993). O cotransportador de Na^+ /glicose/ H_2O tipo 1 (SGLT1), codificado pelo gene *SLC2A1*, transporta 2 íons Na^+ , uma molécula de glicose e 264 moléculas de H_2O em cada ciclo (ZEUTHEN, 2000; WRIGHT; HIRAYAMA; LOO, 2011). A direção do transporte de glicose pelo SGLT1 através da membrana plasmática ocorre devido à força motriz produzida pelo gradiente de Na^+ que é mantida pela bomba Na^+/K^+ , isto é, atua deslocando o Na^+ e a glicose sempre no sentido do meio extracelular para o meio intracelular (WRIGHT; HIRAYAMA; LOO, 2007). O SGLT1 é composto por 14 segmentos transmembranares com a face N-terminal voltada para o interstício e a face C-terminal ancorada no interior da membrana plasmática (WRIGHT; TURK, 2004). A estrutura do SGLT1 pode ser observada na Figura 6.

FIGURA 6 - Estrutura secundária do cotransportador SGLT1.

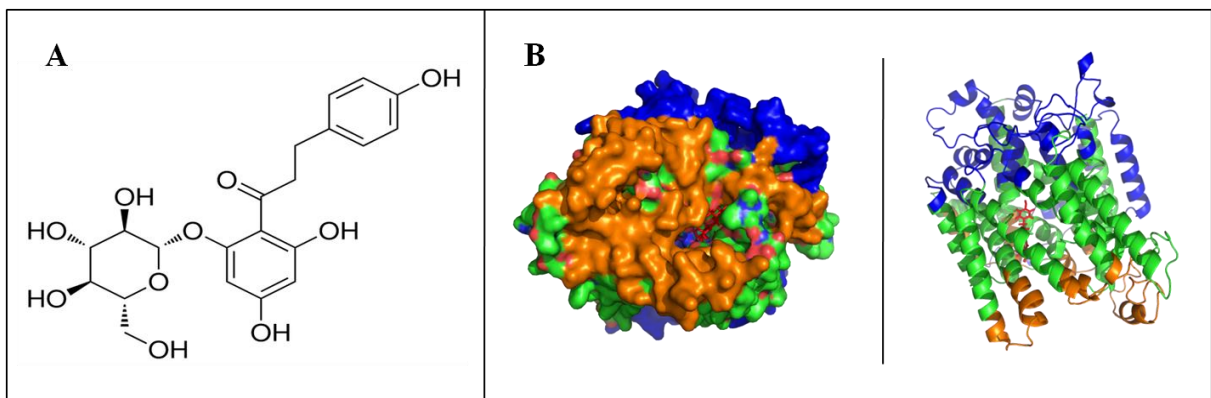


Fonte: Modelo adaptado de WRIGHT; TURK, 2004.

3.2.1 Florizina

Entre as drogas com capacidade de inibir o transporte de glicose, tem-se usado a florizina, que é um glicosídeo derivado de plantas e atua como inibidor específico, por competição, da atividade dos SGLTs, como ferramenta para investigar a regulação do transporte de glicose no organismo (RAJA; TYAGI; KINNE, 2003). A florizina é um membro da família dos dihidrocalcones extraídos em altas concentrações na macieira. A estrutura química da florizina, representada na Figura 7, consiste de uma molécula de glicose e dois anéis aromáticos unidos por um radical alquila (EHRENKRANZ et al., 2005). A inibição do transporte de glicose por meio da florizina mostrou que este mecanismo é saturável e eletrogênico (EHRENKRANZ et al., 2005). A florizina apresenta cerca de duas vezes mais afinidade ao SGLT1 comparada ao SGLT2 (PANAYOTOVA-HEIERMANN; LOO; WRIGHT, 1995). A isoforma SGLT2, codificada pelo gene *SLC5A2*, transporta apenas um íon Na^+ para cada molécula de glicose (ZHAO; KEATING, 2007). Até o momento, o SGLT2 ainda não foi descrito no epitélio respiratório.

FIGURA 7 – Estrutura química da florizina e estrutura conformacional em 3D do sítio de ligação entre a florizina e o SGLT1.



a. Fórmula Molecular: $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$. Fórmula química: glicose, 1-2-(beta-D-oxiglicopiranosil)-4,6-diidroxifenil-3-(4 hidroxifenil)-1-propanona. Peso molecular: 454.41 g/mol. Fonte: Sigma-Aldrich. **b.** Descrição: em vermelho: florizina e em azul, verde e laranja: *loops* extracelulares, transmembranares e citoplasmáticos do SGLT1, respectivamente. Fonte: Ulisses Pádua, Laboratório de Nanobiotecnologia, UFU.

3.2.2 Transportadores de glicose através do epitélio alveolar

O transportador GLUT2, codificado pelo gene *SLC2A*, já foi descrito em culturas de células H441 (células de adenocarcinoma papilar do epitélio bronquiolar) (KALSI et al., 2008), em pneumócitos tipo II de cobaias (KEMP; BOYD, 1992) e no epitélio traqueal de

humanos (KALSI et al., 2008). Desta forma, a presença do transportador GLUT2 em células do epitélio respiratório em diferentes modelos indica que esse transportador pode contribuir para a mobilização de glicose e homeostasia glicêmica neste epitélio (KALSI et al., 2008). Porém, ainda não foi comprovada a existência do GLUT2 em pneumócitos de ratos.

No pulmão, a presença do SGLT1 foi primeiramente descrita em pneumócitos tipo II de ratos e coelhos (BOYD, 1990), o que indicava um transporte específico de Na^+ e glicose. No entanto, não foi caracterizado um papel funcional para este transporte. Porém, dados mais recentes comprovaram a presença do SGLT1 também em pneumócitos tipo I de ratos e cordeiros (BODEGA et al., 2010). Essa evidência é funcionalmente relevante, pois os pneumócitos tipo I fornecem cerca de 95-97% da superfície alveolar total, sugerindo que o SGLT1 contribui para a manutenção de baixas concentrações de glicose no ASL (SAUMON; MARTET; LOISEAU, 1996), que é útil na prevenção de infecções respiratórias (BAKER et al., 2006). Entretanto, ainda não foram realizados experimentos para comprovar o papel funcional do SGLT1 na regulação de volume e composição do ASL pulmonar em situações fisiológicas e patológicas.

3.3 Diabetes mellitus

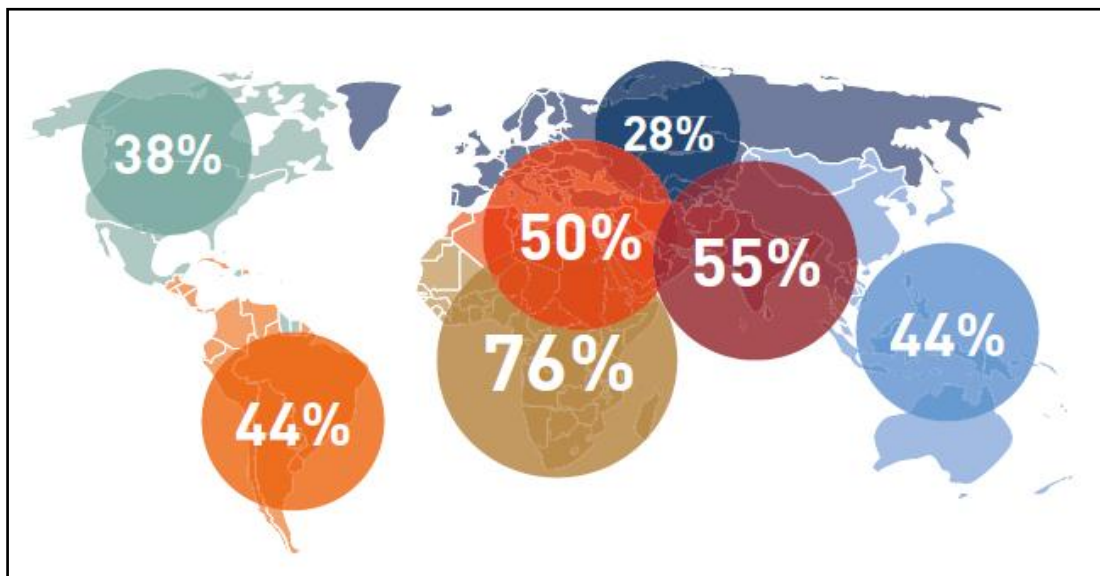
A diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica associada a complicações micro e macrovasculares de elevada morbimortalidade, requerendo cuidado contínuo, educação permanente e suporte para prevenção de complicações agudas e para redução do risco de complicações crônicas (ADA, 2011). A hiperglicemia presente na diabetes pode provocar alguns sinais e sintomas como poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva (MASHARANI; KARAM, 2001; KING; AUBERT; HERMAN, 1998). Há uma grande preocupação com o controle dos níveis glicêmicos, visto que em longo prazo, a hiperglicemia pode causar disfunção, danos e falência de múltiplos órgãos (SINGLETON et al., 2003; GERSTEIN et al., 2007).

As consequências humanas, sociais e econômicas relacionadas a DM são devastadoras, sendo a doença responsável direta ou indiretamente por aproximadamente 5 milhões de mortes por ano, o que representa 8,4% da mortalidade mundial (IDF, 2013). Em 2013, foi estimado que existam aproximadamente 382 milhões de pessoas com diabetes na população mundial, ou seja, 8,3% da população adulta. Quase a metade dessa população tem idade entre 40 e 59 anos. No entanto, cerca de 175 milhões de pessoas não sabem que têm a doença. Se essa tendência continuar, em 2035 cerca de 592 milhões de indivíduos, ou um em

cada 10 adultos, terá diabetes. Isso equivale a aproximadamente três novos casos a cada 10 segundos, isto é, quase 10 milhões de pessoas com diabetes por ano (IDF, 2013).

Tendo em vista essa realidade, destaca-se a importância de pesquisas voltadas para prevenção e tratamento desse agravo no intuito de minimizar o impacto sobre a saúde desses indivíduos. Estima-se que a cada 6 segundos, uma pessoa morre no mundo decorrente de alguma complicação da diabetes (IDF, 2013). A Figura 8 mostra a proporção de mortes devido a complicações da diabetes no mundo em indivíduos com diagnóstico desta doença.

FIGURA 8 - Proporção de mortes decorrentes de complicações da diabetes.



Fonte: IDF, 2013.

Proporção de mortes devido a complicações da diabetes, em pessoas com menos de 60, distribuídas no território mundial.

3.3.1 Relação entre aumento da concentração de glicose no ASL e infecção respiratória na diabetes

O ASL, que recobre a superfície luminal do epitélio respiratório, é estéril, apesar da exposição frequente a bactérias, fungos e vírus (WIDDICOMBE; WIDDICOMBE, 1995). Esses micro-organismos são destruídos logo após alcançarem o lúmen do epitélio respiratório por meio do transporte mucociliar e de componentes da imunidade inata e adaptativa. Entretanto, o ASL também possui componentes essenciais ao crescimento desses agentes patogênicos, tais como eletrólitos, proteínas, lipídios, aminoácidos, oligossacarídeos e monossacarídeos, incluindo a glicose (MAGER; SLOAN, 2003; BARTLETT; FISCHER; MCCRAY, 2008).

Assim, estudos experimentais comprovaram que a presença de baixas concentrações de glicose no ASL pode contribuir para a defesa do epitélio respiratório contra infecções (PEZZULO et al., 2011). Pacientes entubados sob cuidados intensivos que apresentam elevadas concentrações de glicose no ASL são mais propensos a desenvolver infecções pulmonares, quando comparados àqueles com baixas concentrações de glicose no ASL (PHILIPS et al., 2005; MCALISTER et al., 2005).

Pesquisas recentes indicam que a hiperglicemia tanto em pacientes diabéticos como em não diabéticos está associada com um aumento dos riscos de complicações e mortalidade por pneumonia adquirida na comunidade (MCALISTER et al., 2005; KORNUM et al., 2007). Curiosamente, na ausência de hiperglicemia, a diabetes por si só não aumenta estes riscos, ou seja, indivíduos diabéticos que seguem uma dieta nutricional adequada e fazem uso correto de seus medicamentos, mantendo o controle glicêmico, não possuem maior risco para infecções respiratórias (PEZZULO et al., 2011).

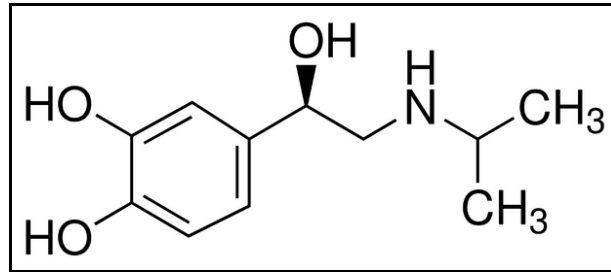
3.4 Isoproterenol

No epitélio respiratório, a expressão de receptores β -adrenérgicos (β -AR) aumenta a cada geração das vias aéreas, estando em maior quantidade nas vias aéreas distais e alvéolos (SPINA et al., 1989). Mais de 90% de todos os receptores β -adrenérgicos do pulmão estão localizados nos alvéolos. Apesar de ambos os subtipos β_1 e β_2 coexistirem e serem uniformemente distribuídos nas paredes alveolares, o subtipo β_2 predomina em cerca de 70% de sua superfície (CARSTAIRS; NIMMO; BARNES, 1985). Desta maneira, os receptores β -adrenérgicos estão presentes por todo o pulmão, incluindo o epitélio alveolar, onde já foram descritos em pneumócitos tipo I e tipo II.

O isoproterenol ou isoprenalina é um fármaco sintético simpaticomimético, agonista β -adrenérgico não-seletivo, usado mais comumente na terapêutica da asma brônquica (HANDLEY et al., 1998). Mesmo sendo um fármaco que atua tanto em receptores β_1 como β_2 , parece ser mais seletivo para os receptores β_2 , comprovando sua importante capacidade de causar relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas (BAI; MAK; BARNES, 1992). A principal via de administração terapêutica do isoproterenol é a inalatória por meio de aerossol, pois garante uma efetiva absorção local do fármaco e, conseqüente, rápida ação terapêutica. Porém, a depender de seu uso terapêutico também pode ser administrado por outras vias, como intravenosa, subcutânea ou intramuscular. O tempo de meia-vida do isoproterenol no plasma sanguíneo é de 90-120 min (SAKUMA et al., 1997; DONOVAN et al., 2014). A

estrutura química do isoproterenol pode ser observada na Figura 9.

FIGURA 9 - Estrutura química do isoproterenol.



Fonte: Sigma-Aldrich.

Fórmula Molecular: $C_{11}H_{17}NO_3$. Fórmula Química: 4-[1-hidroxi-2 (isopropilamino) etil] benzeno-1,2-diol. Peso Molecular: 211,258 g/mol.

É sabido que o SGLT1 pode ser modulado pela PKA em alguns órgãos, como no intestino (VEYHL et al., 1993; ZIMMERMAN et al., 2012) e em glândulas salivares (SABINO-SILVA et al., 2010), e esta é ativada pela interação de agonistas β -adrenérgicos com seus receptores. Espera-se que a administração de isoproterenol estimule os receptores β -adrenérgicos presentes no epitélio respiratório. Assim, a proteína Gs acoplada ao receptor β -adrenérgico será ativada permitindo a liberação da enzima adenilato ciclase, localizada na superfície interna da membrana plasmática, desencadeando a produção de um segundo mensageiro, o AMP cíclico. Isso permitirá a ativação da PKA, translocando, por fim, o SGLT1 presente no citoplasma para a membrana plasmática da célula, onde se espera um aumento da absorção de líquido (de PROST; SAUMON, 2007) e da glicose presente no ASL do epitélio respiratório (SAUMON; MARTET; LOISEAU, 1996).

O protocolo experimental está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), sob protocolo de número 40/2012.

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, pesando 200-250g, com 2 meses de idade, obtidos junto ao Biotério Central da UFAL. Os animais foram acondicionados no biotério do Laboratório de Biologia Celular (LBC) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) nas seguintes condições: a) ciclo claro/escuro de 12 horas; b) temperatura ambiente 23 ± 2 °C; c) oferta plena de água e ração para roedores.

Assim, foram estudados os seguintes grupos de animais (n = 6/grupo):

- a) **Não-diabéticos (NDs)**: ratos que receberam injeção com veículo e tratamento com salina;
- b) **Não-diabéticos tratados com isoproterenol (NDi)**: ratos que receberam injeção com veículo e tratamento com isoproterenol;
- c) **Não-diabéticos tratados com florizina (NDf)**: ratos que receberam injeção com veículo e tratamento com florizina;
- d) **Diabéticos (Ds)**: ratos que receberam injeção com aloxana e tratamento com salina;
- e) **Diabéticos tratados com isoproterenol (Di)**: ratos que receberam injeção com aloxana e tratamento com isoproterenol;
- f) **Diabéticos tratados com florizina (Df)**: ratos que receberam injeção com aloxana e tratamento com florizina.

4.2 Modelo experimental

A diabetes foi induzida por aloxana, que é uma tetraoxipirimidina capaz de promover necrose específica das células β da ilhota pancreática (MCLETCHIE, 2002). A aloxana (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) é uma droga hidrofílica, instável, tendo tempo de meia vida, em pH neutro e temperatura de 37 °C, de aproximadamente 1,5 min, podendo-se prolongar em temperaturas mais baixas (LENZEN; MUNDAY, 1991). A aloxana foi aplicada em solução na dose única de 40 mg/kg de peso corpóreo por via intravenosa, através da veia

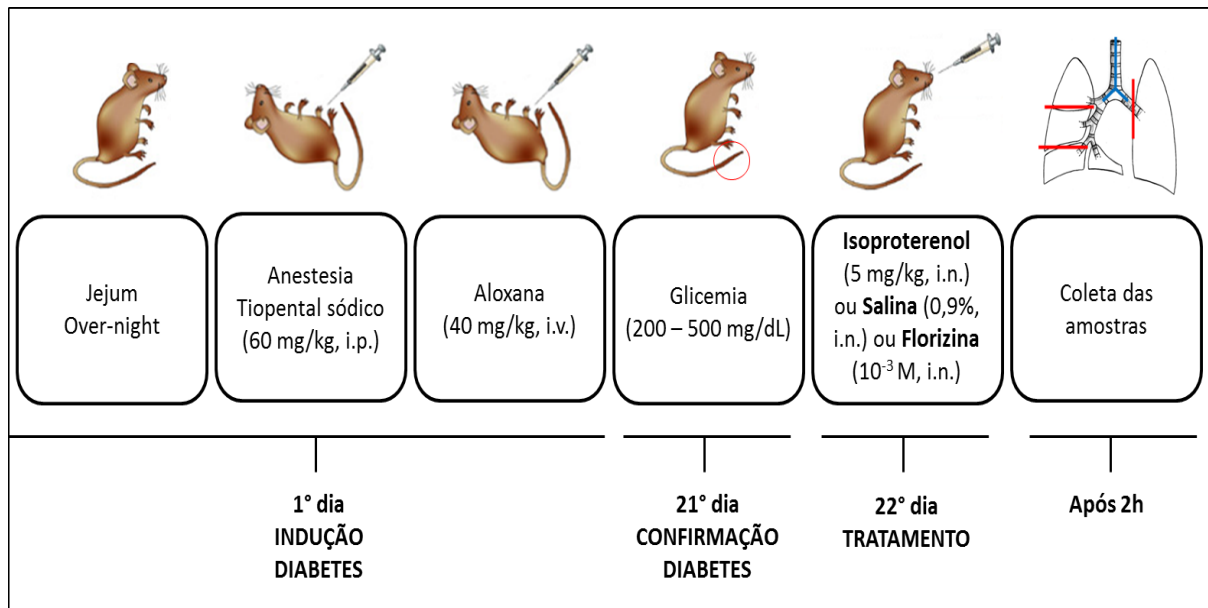
peniana, sob efeito anestésico de tiopental sódico (60mg/kg de peso corpóreo; i.p.), em animais com 2 meses de idade. A solução de aloxana foi preparada minutos antes da aplicação por meio da diluição da droga em solução salina 0,9%, em uma concentração de 30 mg/ml (SABINO-SILVA et al., 2009).

O preparo da solução foi realizado em ambiente escuro visto que o composto é fotossensível. Além disso, após a diluição, o recipiente foi mantido refrigerado até o momento da aplicação. Para aumentar a efetividade da droga, os animais foram deixados previamente sob jejum de 12 horas e, somente 2 horas após a aplicação da aloxana, a alimentação foi reintroduzida (SABINO-SILVA et al., 2009).

Entre os animais que receberam aloxana foram selecionados, após 21 dias, somente aqueles que apresentaram glicemia entre 200 e 500 mg/dL, monitorada por meio de glicosímetro comercial (Accu-chek Advantage, Roche Diagnostics, Indiana, EUA), após 12 horas de jejum. Estes foram aleatoriamente divididos em 3 grupos: Ds, Di ou Df. No 22º dia após a indução da diabetes, os ratos foram tratados uma única vez com salina fisiológica 0,9% (Ds) em solução de 100 µl ou com isoproterenol (Di) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) na dose de 5 mg/kg de peso corpóreo (KRENEK et al., 2009; BHULAN et al., 2011) diluído em 100 µl de salina 0,9% ou com florizina (Df) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 10^{-3} M (BASSET; CRONE; SAUMON, 1987) diluído em 100 µl de salina 0,9%. Todos os tratamentos foram realizados por via intranasal (i.n.) utilizando-se uma micropipeta, com os animais sob efeito anestésico de tiopental sódico (60mg/kg de peso corpóreo; i.p.).

Decorridas 2h da administração do tratamento com salina, florizina ou isoproterenol, os animais foram novamente anestesiados com tiopental sódico (60 mg/kg de peso corpóreo, i.p.) para coleta das amostras. Assim que os animais aboliram o reflexo corneano palpebral e o reflexo de retirada da pata ao pinçamento digital foram colocados em decúbito dorsal sendo a pele e músculos superficiais da caixa torácica removidos. O tórax foi aberto bilateralmente por incisão intercostal e transecção do esterno. O modelo experimental de indução da diabetes é ilustrado na figura 10.

FIGURA 10 - Modelo experimental de indução da diabetes.



Fonte: Autor, 2014.

4.3 Coleta das amostras

4.3.1 Coleta de tecido pulmonar e análise do volume de ASL

Após acesso cirúrgico aos pulmões, foi realizada uma incisão para remoção do lobo pulmonar superior direito. Para isto, o brônquio fonte, a artéria e a veia lobar superior direita foram clampeados por uma pinça Kelly curva e, em seguida, seccionados. O fragmento pulmonar removido foi imediatamente pesado (peso úmido) e em seguida colocado em estufa a 40 °C por 24 horas e novamente pesado (peso seco). Assim, foi calculada a razão entre o peso úmido e o peso seco do pulmão. Este parâmetro é utilizado para quantificar o ASL (MA et al., 2008; MEDEIROS et al., 2012). Segue abaixo, a descrição da fórmula para cálculo da razão U/S que é o indicativo do volume de ASL.

$$\text{Razão U/S} = \text{peso úmido (mg)} / \text{peso seco (mg)}$$

4.3.2 Coleta de lavado broncoalveolar e análise da concentração de glicose e proteínas totais do ASL

Após a retirada do lobo pulmonar superior direito, a traqueia do animal foi exposta, canulada, e com uso de uma seringa, foi injetado 1 ml de solução tamponada de fosfato (PBS)

no espaço broncoalveolar e, em seguida, aspirado, lentamente, por 5 vezes, para que não houvesse prejuízos a integridade do parênquima pulmonar. Ao final deste procedimento, foram coletados cerca de 500 μ L de lavado broncoalveolar (BAL) e armazenados a -20°C para posterior análise da concentração de glicose e proteínas totais por meio do método enzimático colorimétrico (Analisa Diagnóstica, São Paulo, SP, Brasil) e Bradford (BRADFORD, 1976), respectivamente.

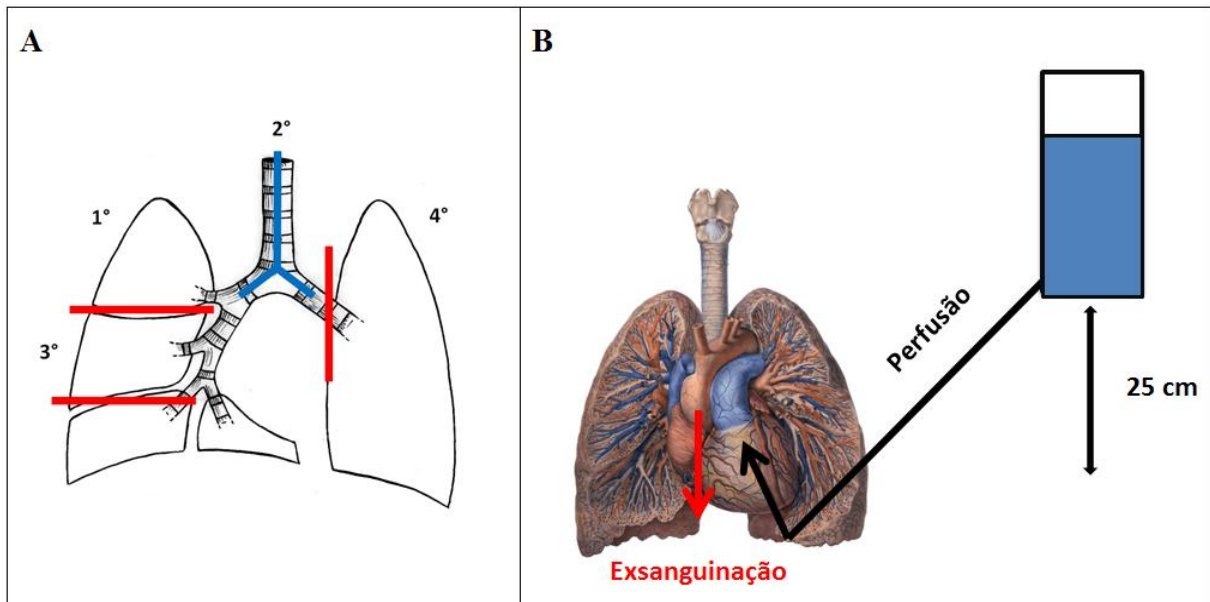
4.3.3 Coleta de tecido pulmonar e análise imunohistoquímica de transportadores de glicose

Assim que o BAL foi coletado, a perfusão pulmonar foi iniciada, por meio de uma cânula introduzida na artéria pulmonar, para administração de salina fisiológica tamponada (salina EDTA, pH 7,4; 0,01M) a partir de um reservatório 25 cm acima do coração do animal que garantia uma pressão fisiológica de perfusão (MONTEIRO et al., 2004). No mesmo momento, uma incisão foi realizada no ventrículo esquerdo do coração para evasão do sangue e, conseqüente, limpeza do órgão. Este procedimento provocou a eutanásia do animal por exsanguinação. Depois que a superfície dos pulmões tornou-se branca, o lobo pulmonar médio direito teve seu hilo clampeado e o mesmo foi removido para identificação da localização subcelular dos transportadores de glicose (SGLT1 e GLUT2) por meio da técnica de imunohistoquímica.

4.3.4 Coleta de tecido pulmonar e análise histológica do epitélio bronquiolar

Sequencialmente a retirada do lobo médio pulmonar direito, a perfusão com o fixador formaldeído 4% tamponado (tampão fosfato, pH 7,4; 0,1 M) foi iniciada por meio do mesmo sistema usado para a perfusão com salina EDTA. A perfusão do fixador durou cerca de 10 min. Em seguida, o pulmão esquerdo foi removido e armazenado imerso em formaldeído a 4% tamponado durante 24h. Após a fixação, foi realizado o processamento histológico do pulmão esquerdo. Pode-se observar na Figura 11, o modelo esquemático de perfusão e remoção sequencial do tecido pulmonar.

FIGURA 11 - Modelo esquemático de remoção e perfusão do tecido pulmonar.



Fonte: Autor, 2014.

(A) Modelo de perfusão do pulmão. (B) Modelo sequencial de remoção do tecido pulmonar e coleta do BAL (1°. Remoção do lobo pulmonar superior direito; 2°. Coleta do BAL; 3°. Remoção do lobo pulmonar médio direito; 4°. Remoção do pulmão esquerdo).

4.4 Avaliação da concentração de glicose do BAL

A concentração de glicose do BAL foi determinada após descongelamento das amostras e homogeneização por inversão. Em seguida, foram colocados 10 μl de amostra em 1000 μl de reagente enzimático (Glicose PAP Liqform, Labtest Diagnóstica SA, Minas Gerais, Brasil). A solução padrão foi preparada com 1000 μl de reagente enzimático e 10 μl de amostra padrão e a solução branca foi composta apenas pelo reagente enzimático. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 10 min e, posteriormente, analisadas no espectrofotômetro. A absorbância foi avaliada em 505 nm. Os resultados de absorbância obtidos na leitura das amostras foram convertidos em concentração através do cálculo: $\text{Absorbância do teste} / \text{Absorbância do padrão} \times 100$. Desta forma, os resultados foram expressos em mg/dL.

4.5 Avaliação da concentração de proteínas totais do BAL

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método colorimétrico descrito por BRADFORD (BRADFORD, 1976), utilizando o Reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) baseado na formação de complexos entre o corante de Coomassie Brilliant Blue com a cadeia

polipeptídica. Uma alíquota de 4 μ L de cada amostra foi agrupada em placa de 96 poços, assim, foi adicionado 196 μ L de Reagente de Bradford. Uma curva padrão foi montada com albumina bovina (1 mg/mL). Após a disposição das amostras, a absorvância foi obtida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 630 nm.

4.6 Imunohistoquímica

Para verificar a localização subcelular dos transportadores de glicose SGLT1 e GLUT2 no epitélio alveolar, o lobo pulmonar médio direito foi removido e fixado em solução de formaldeído 4% tamponado (PBS) 0,1M, por 24hrs. Após a fixação, o tecido pulmonar foi crioprotetido em concentrações crescentes de sacarose (10, 20 e 30%) por no mínimo 24 h e, em seguida, incluído em “OCT compound” (Sakura Finetechnical Co, Tokyo). Logo após, o tecido pulmonar foi seccionado (10 μ m) em criostato (Leica CM1850) e seus cortes histológicos foram coletados em lâminas gelatinizadas. Após a reidratação (30 min, TA, PBS 0,1 M) foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com albumina a 5% diluída em PBS + Triton por 1h. Anticorpos, Anti-SGLT1 ou Anti-GLUT2 (1:100, Chemicon International), foram incubados durante 14 horas. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS 0,1 M (2 vezes por 5 min), incubados com CY5 (1:150, 1h 30min, Alexa Fluor 488), novamente lavados em PBS 0,1 M (2 vezes por 5 min) e, por fim, foi realizada a marcação do citoesqueleto indicando a membrana plasmática (faloidina conjugada à rodamina, 1:200, 1h 30min, Molecular Probes).

Mais uma vez os cortes foram lavados com PBS 0,1 M (2 vezes por 5 min), cobertos por uma lamínula montada com fluoropep, e analisados em microscópio de fluorescência (Nikon DSR11). Cerca de 4 a 5 cortes histológicos de cada grupo de animais foram analisados e, desta forma, foi selecionado um corte representativo. Os controles negativos (CN) do experimento foram realizados com a omissão dos anticorpos primários. As imagens obtidas foram analisadas e em seguida, colocalizadas com auxílio do programa computacional Picasa (Picasa, versão 3.0, USA). Foi realizada uma análise qualitativa, por meio do sistema de cruces (+), para caracterização do grau de marcação dos anticorpos (anti-SGLT1 e anti-GLUT2) no epitélio alveolar. As cruces foram classificadas de acordo com a intensidade da fluorescência registrada nas fotomicrografias, admitindo uma intensidade de 1 a 4 cruces: +/muito baixa, ++/baixa, +++/média e ++++/alta.

4.7 Processamento e análise histológica

Após a fixação do pulmão esquerdo em formaldeído 4% tamponado, o mesmo foi desidratado por diferentes concentrações de etanol, clarificado por xilol, e incluído em parafina. Em seguida, o material parafinado foi levado ao micrótomo (Leica RM2125) para a realização de cortes de 5 μm . Logo após, os cortes foram desparafinados com xilol, reidratados por concentrações decrescentes de etanol e submetidos a dois tipos colorações distintas: 1) Hematoxilina-Eosina (HE) e 2) Ácido Periódico de Schiff (PAS). A maioria dos corantes histológicos se comporta como compostos químicos ácidos ou básicos e tendem a formar ligações eletrostáticas (salinas) com radicais ionizados dos tecidos.

A combinação mais comum de corantes usada em histologia é a HE, pois distingue os diversos componentes estruturais celulares da matriz extracelular. A hematoxilina possui característica química alcalina, ou seja, tem atração por elementos ácidos que compõem os tecidos (acidófila), tais como as proteínas, o retículo endoplasmático rugoso e os ácidos nucleicos, conferindo a essas estruturas a cor azul-púrpura. Já a eosina, por ser um corante com característica ácida (basófila), apresenta afinidade predominante pelo citoplasma, corando-o de róseo a vermelho (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011). A coloração PAS é frequentemente usada para identificar glicogênio nos tecidos. A reação do PAS oxida seletivamente os resíduos de glicose, produzindo aldeídos que reagem com o Reagente de Schiff e produz uma cor rosa-magenta. Assim, é usada para corar estruturas que contêm uma alta proporção de macromoléculas de carboidratos (glicogênio, glicoproteína e proteoglicanos), tipicamente encontradas no muco (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

Nesse contexto, a estrutura histológica do epitélio bronquiolar foi avaliada de forma qualitativa, ou seja, baseando-se na presença de alguns achados histopatológicos relacionados à lesão pulmonar, tais como infiltrado inflamatório, descamação celular do lúmen, espessamento epitelial, fibrose intersticial e muco na superfície luminal do bronquíolo. Assim, foi utilizada a descrição: presente (+) ou ausente (-) referindo-se a existência ou não desses achados. Para análise quantitativa da produção de muco no epitélio bronquiolar, fotomicrografias de 10 campos aleatórios por lâmina foram realizadas usando câmera digital (Olympus, DP25) adaptada ao microscópio (Olympus, BX41). A análise quantitativa das imagens foi realizada através do programa ImageJ versão 1.47 (National Institutes of Health, EUA). Assim, foi realizado o reconhecimento da cor rosa-magenta para determinação da produção de muco do epitélio bronquiolar por meio do cálculo da densidade de área, definida

pelo quociente entre a área ocupada pela quantidade de muco e a área total do campo analisado. Segue abaixo, a descrição da fórmula para cálculo da produção de muco.

$$\text{Produção de muco (\%)} = \frac{\text{Área ocupada pelo muco}}{\text{Área total do campo}}$$

4.8 Análise da proliferação de colônias bacterianas

Uma alíquota de 250 µL de BAL foi utilizada como meio de cultura para a análise da proliferação de colônias bacterianas. Assim, cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina - MRSA (ATCC BAA 976-1) e de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853-1), adquiridas comercialmente (Biomérieux, França) foram inoculadas no BAL, distribuídas e homogeneizadas em placas de Petri (90 mm) contendo meio ágar sangue (Biomérieux, França). As amostras foram semeadas em triplicata utilizando 1 µL de bactérias (10^3 bactérias) suspendidas por meio de alças calibradas estéreis e descartáveis (Biomérieux, França). Após este procedimento, as amostras foram mantidas em estufa bacteriológica a 35 °C por 48h. Vale ressaltar que as cepas bacterianas foram cultivadas em amostras distintas, ou seja, não ocorreu competição por nutrientes ou espaço ambiental entre as duas cepas que impedisse o crescimento das colônias.

Após 48h de armazenamento das culturas bacterianas em estufa, todas as placas de Petri foram analisadas e, assim, foi quantificado o número de unidades formadoras de colônias (UFC), onde cada UFC encontrada foi considerada equivalente a 10^3 bactérias. Dois avaliadores cegos para o estudo, capacitados tecnicamente, fizeram a contagem das UFC. Os resultados obtidos foram apresentados em UFC/µL (ACOURT et al., 1993).

4.9 Análise estatística

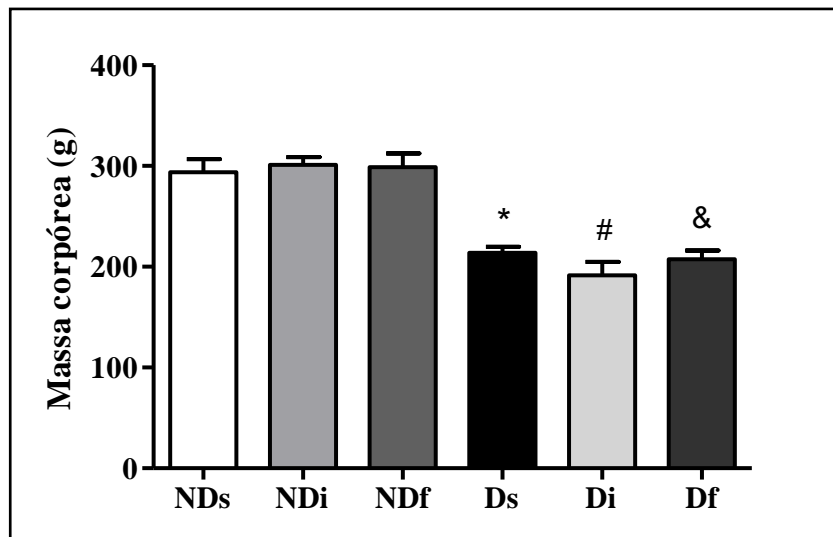
Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Estes foram comparados através de análise de variância (ANOVA) de uma via para dados independentes, utilizando-se o pós-teste Student-Newman-Keuls. Essas análises foram feitas com o auxílio do programa computacional GraphPad Prism (GraphPad, versão 5.0, USA). O nível de significância estabelecido foi de 5% (valor descritivo de $p < 0,05$).

5.1 Parâmetros gerais de caracterização da diabetes

5.1.1 Massa corpórea

A análise da massa corpórea dos animais (Figura 12) mostrou diminuição de 27%, 36% e 31% ($p < 0,05$) deste parâmetro em ratos diabéticos (Ds, Di e Df) quando comparada com ratos normoglicêmicos (NDs, NDi e NDf), respectivamente. O tratamento com salina, isoproterenol e florizina não promoveu alteração ($p > 0,05$) na massa corpórea.

FIGURA 12 – Massa corpórea dos animais.

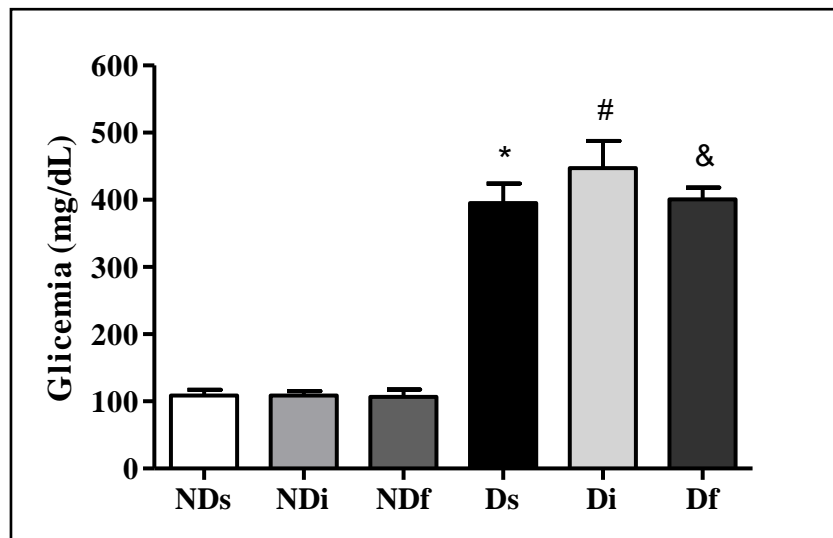


Ratos Não-diabéticos Salina (NDs), Não-diabéticos Isoproterenol (NDi), Não-diabéticos Florizina (NDf), Diabéticos Salina (Ds), Diabéticos Isoproterenol (Di) e Diabéticos Florizina (Df). Valores são média \pm EPM. ANOVA One-Way, *post-hoc* Student Newman Keuls, * $P < 0,05$ vs NDs. # $P < 0,05$ vs NDi. & $P < 0,05$ vs NDf.

5.1.2 Concentração de glicose plasmática

Conforme esperado, a concentração de glicose plasmática (Figura 13) após a indução da diabetes nos animais (Ds, Di e Df) aumentou 288%, 312% e 275% ($p < 0,05$) quando comparada com os ratos normoglicêmicos (NDs, NDi e NDf), respectivamente. O tratamento com salina, isoproterenol e florizina não promoveu alteração ($p > 0,05$) na glicemia dos animais.

FIGURA 13 – Concentração de glicose plasmática.

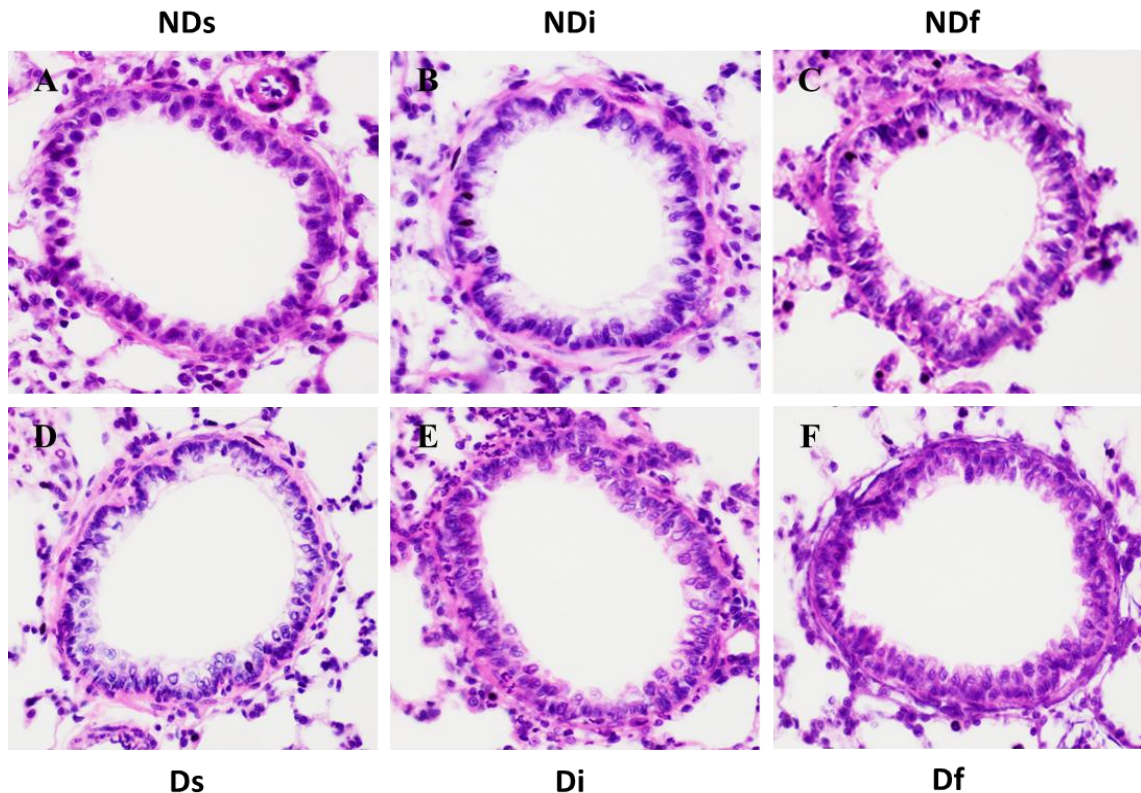


Ratos Não-diabéticos Salina (NDs), Não-diabéticos Isoproterenol (NDi), Não-diabéticos Florizina (NDf), Diabéticos Salina (Ds), Diabéticos Isoproterenol (Di) e Diabéticos Florizina (Df). Valores são média \pm EPM. ANOVA One-Way, *post-hoc* Student Newman Keuls, * $P < 0,05$ vs NDs. # $P < 0,05$ vs NDi. & $P < 0,05$ vs NDf.

5.2 Estrutura histológica do epitélio bronquiolar

A análise histológica da estrutura do epitélio bronquiolar mostrou que a diabetes induzida experimentalmente e o tratamento ofertado, por instilação intranasal, de salina, isoproterenol ou florizina não comprometeram a integridade morfológica do epitélio bronquiolar dos animais estudados. Na Figura 14 (A-F), pode-se observar a preservação estrutural das células do epitélio bronquiolar e a ausência de alterações histopatológicas (infiltrado inflamatório, descamação celular do lúmen, espessamento epitelial e fibrose intersticial).

FIGURA 14 - Estrutura histológica do epitélio bronquiolar.



G	Alterações histopatológicas						
		NDs	NDi	NDf	Ds	Di	Df
	Infiltrado inflamatório	-	-	-	-	-	-
	Descamação celular do lúmen	-	-	-	-	-	-
	Espessamento epitelial	-	-	-	-	-	-
	Fibrose intersticial	-	-	-	-	-	-

Ratos Não-diabéticos Salina (NDs), Não-diabéticos Isoproterenol (NDi), Não-diabéticos Florizina (NDf), Diabéticos Salina (Ds), Diabéticos Isoproterenol (Di) e Diabéticos Florizina (Df) por meio da coloração HE. Aumento: 400x. Legenda: (+) presente e (-) ausente.

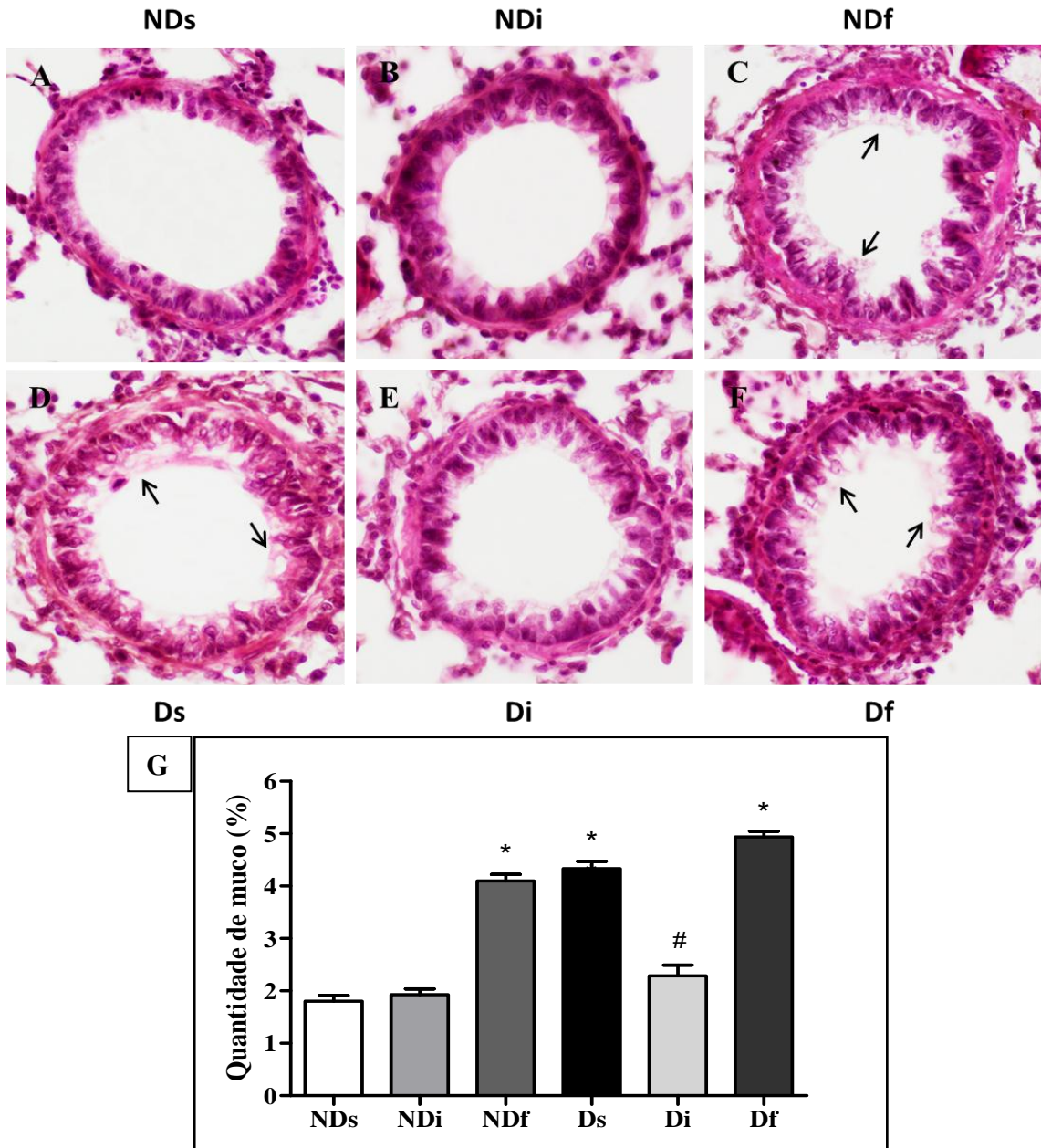
5.3 Presença de muco no epitélio bronquiolar

As fotomicrografias apresentadas na Figura 15 mostram que animais diabéticos (Ds) apresentam um aumento da quantidade de muco no lúmen do epitélio bronquiolar, corado de rosa-magenta, quando comparado aos animais não-diabéticos (NDs). No entanto, o tratamento com isoproterenol foi capaz de reduzir a presença de muco do epitélio bronquiolar de animais diabéticos (Di) comparados aos diabéticos salina (Ds).

Contudo, o tratamento com isoproterenol não alterou a quantidade de muco em animais não-diabéticos (NDi), preservando o lúmen bronquiolar. Os animais diabéticos e

normoglicêmicos tratados com florizina (NDf e Df) também apresentaram um aumento da quantidade de muco no lúmen do epitélio bronquiolar em comparação aos NDs e Ds, respectivamente. De maneira semelhante a esses resultados, a análise quantitativa (Figura 15. G) revelou que animais NDf, Df e Ds apresentam uma maior ($p < 0,05$) quantidade de muco no lúmen bronquiolar em relação a NDs.

FIGURA 15 – Presença de muco do epitélio bronquiolar.

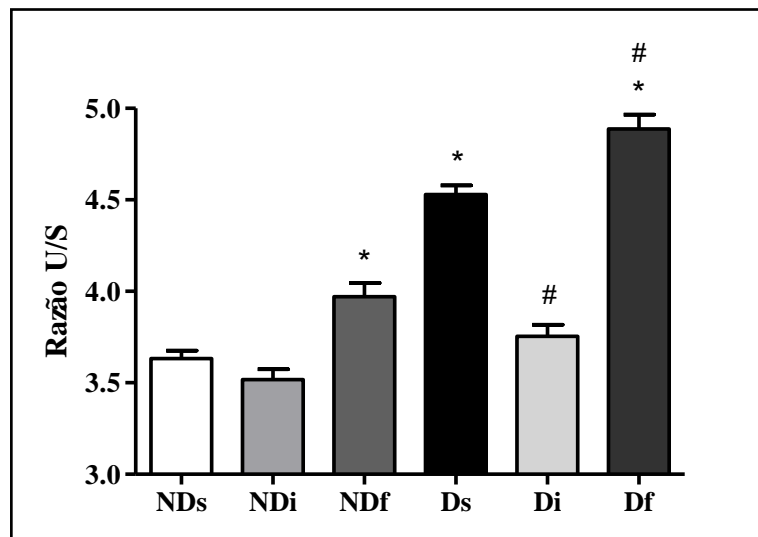


Fotomicrografias com marcação de muco do epitélio bronquiolar e sua respectiva quantificação em ratos Não-diabéticos Salina (NDs), Não-diabéticos Isoproterenol (NDi), Não-diabéticos Florizina (NDf), Diabéticos Salina (Ds), Diabéticos Isoproterenol (Di) e Diabéticos Florizina (Df) por meio da coloração PAS. Setas pretas indicam o muco produzido no epitélio bronquiolar corado de rosa-magenta. Aumento: 400x. Valores são média \pm EPM. ANOVA One-Way, *post-hoc* Student Newman Keuls, * $P < 0,05$ vs NDs. # $P < 0,05$ vs Ds.

5.4 Volume de ASL

Os animais diabéticos (Ds) apresentaram um aumento de 25% ($p < 0,05$) no volume de ASL comparados aos não-diabéticos (NDs), como pode ser observado na Figura 16. Contudo, o tratamento com isoproterenol propiciou em animais diabéticos (Di) uma redução de 17% no volume de ASL ($p < 0,05$) em comparação aos diabéticos salina (Ds). Porém, o tratamento com isoproterenol em ratos normoglicêmicos (NDi) não foi capaz de alterar o volume de ASL quando comparado aos NDs. Em relação ao tratamento com florizina, animais NDf e Df apresentaram um aumento de 9% e 8% ($p < 0,05$) no volume de ASL comparados aos NDs e Ds, respectivamente.

FIGURA 16 - Volume de ASL.



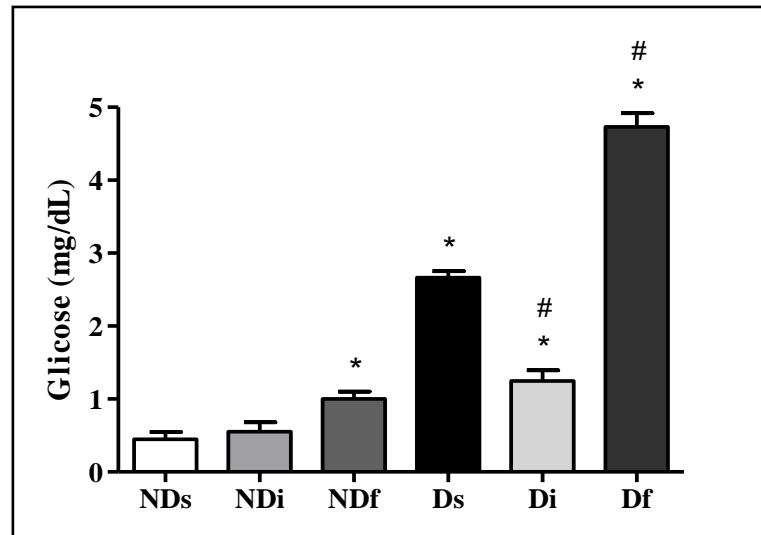
Ratos Não-diabéticos Salina (NDs), Não-diabéticos Isoproterenol (NDi), Não-diabéticos Florizina (NDf), Diabéticos Salina (Ds), Diabéticos Isoproterenol (Di) e Diabéticos Florizina (Df). Valores são média \pm EPM. ANOVA One-Way, *post-hoc* Student Newman Keuls, * $P < 0,05$ vs NDs. # $P < 0,05$ vs Ds.

5.5 Concentração de glicose do ASL

Os animais diabéticos (Ds) apresentaram um aumento de aproximadamente 5 vezes na concentração de glicose do ASL ($p < 0,05$) quando comparados aos normoglicêmicos (NDs) (Figura 17). Entretanto, o tratamento com isoproterenol em animais diabéticos (Di) promoveu uma redução de cerca de 50% da concentração de glicose do ASL ($p < 0,05$) comparado aos diabéticos salina (Ds). Apesar disso, o isoproterenol não foi capaz de alterar a concentração de glicose do ASL de animais normoglicêmicos (NDi). Em relação ao tratamento com

florizina, animais Ndf e Df tiveram um aumento de 120% e 90% ($p < 0,05$) da concentração de glicose do ASL em comparação aos NDs e Ds, respectivamente.

FIGURA 17 - Concentração de glicose do ASL.

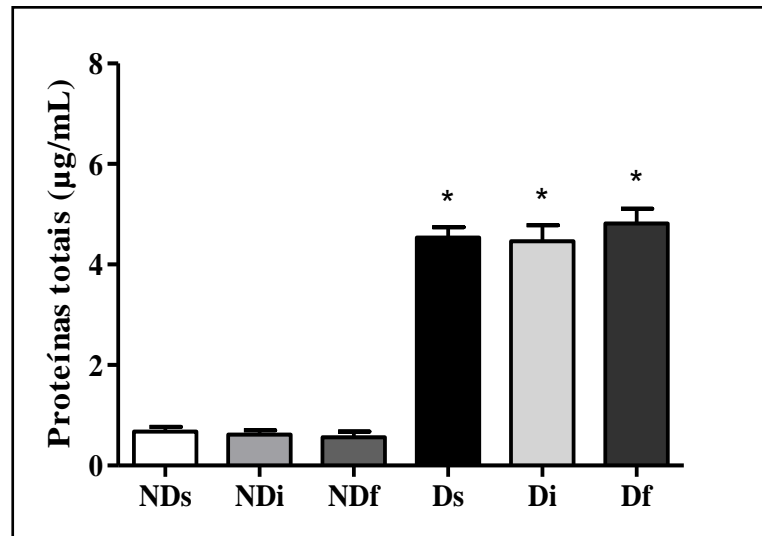


Ratos Não-diabéticos Salina (NDs), Não-diabéticos Isoproterenol (NDi), Não-diabéticos Florizina (Ndf), Diabéticos Salina (Ds), Diabéticos Isoproterenol (Di) e Diabéticos Florizina (Df). Valores são média \pm EPM. ANOVA One-Way, *post-hoc* Student Newman Keuls, * $P < 0,05$ vs NDs. # $P < 0,05$ vs Ds.

5.6 Concentração de proteínas totais do ASL

Animais diabéticos tratados com salina, isoproterenol ou florizina apresentaram um aumento da concentração de proteínas totais do ASL ($p < 0,05$) quando comparados aos animais normoglicêmicos controle (NDs) (Figura 18).

FIGURA 18 - Concentração de proteínas totais do ASL.

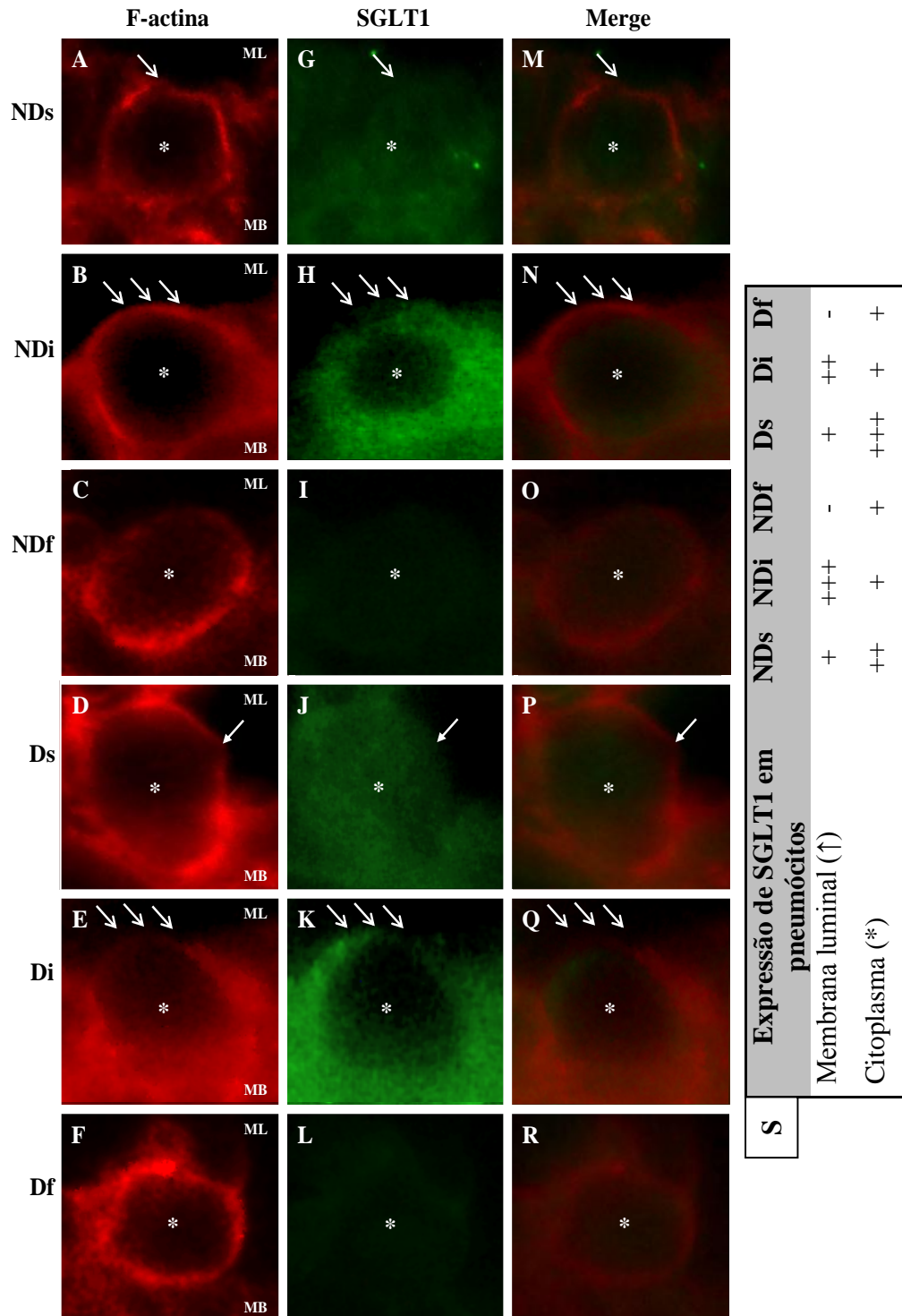


Ratos Não-diabéticos Salina (NDs), Não-diabéticos Isoproterenol (NDi), Não-diabéticos Florizina (NDf), Diabéticos Salina (Ds), Diabéticos Isoproterenol (Di) e Diabéticos Florizina (Df). Valores são média \pm EPM. ANOVA One-Way, *post-hoc* Student Newman Keuls,* $P < 0,05$ vs NDs.

5.7 Localização do cotransportador SGLT1 em pneumócitos

A marcação do SGLT1 em pneumócitos foi evidenciada de forma internalizada com distribuição difusa no citoplasma (Figura 19. M e P) em animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (NDs e Ds). De maneira semelhante, animais tratados com florizina (NDf e Df) apresentaram não apenas uma marcação do SGLT1 difusa como também em menor expressão no citoplasma sem a evidência de marcação na membrana plasmática (Figura 19. O e R). Contudo, o tratamento com isoproterenol promoveu em animais NDi e Di um aumento da marcação do SGLT1 na membrana plasmática (Figura 19. N e Q) em comparação aos NDs e Ds, respectivamente.

FIGURA 19 - Localização subcelular do cotransportador SGLT1 em pneumócitos.

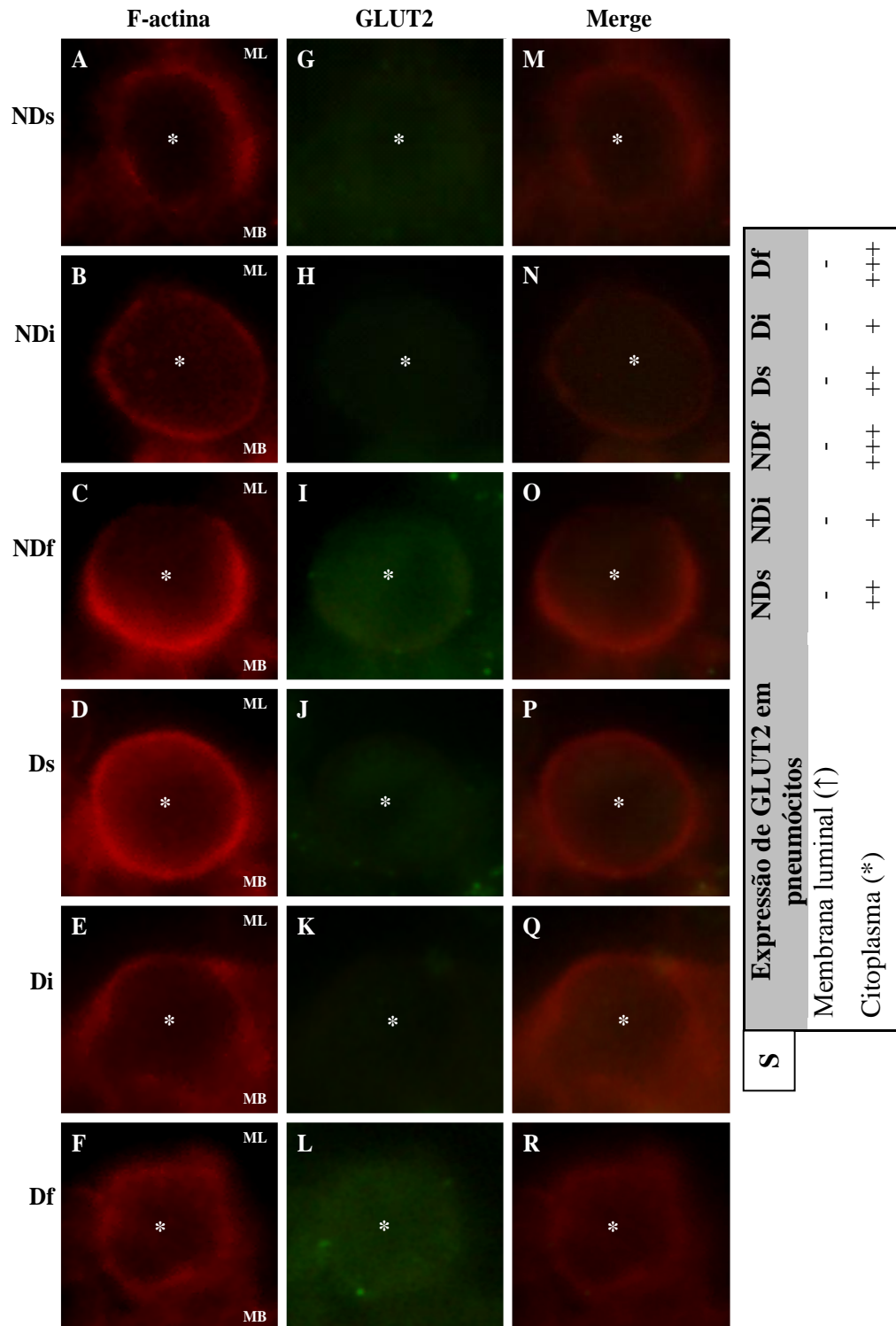


Ratos Não-diabéticos Salina (NDs), Não-diabéticos Isoproterenol (NDi), Não-diabéticos Florizina (NDf), Diabéticos Salina (Ds), Diabéticos Isoproterenol (Di) e Diabéticos Florizina (Df) pela técnica de imunohistoquímica. (A-F) Marcação para F-actina (marcador de membrana plasmática) em vermelho, (G-L) marcação para SGLT1 em verde e (M-R) sobreposição das mesmas fotomicrografias para colocalização do cotrasportador SGLT1. Setas brancas indicam a presença do SGLT1 na membrana plasmática e os asteriscos indicam a presença do SGLT1 no citoplasma. Descrição: (ML) Membrana luminal e (MB) Membrana basolateral de pneumócitos. Aumento: 1000x.

5.8 Localização do transportador GLUT2 em pneumócitos

A marcação do transportador de glicose GLUT2 em pneumócitos revelou sua presença de forma internalizada com distribuição difusa no citoplasma (Figura 20. M e P) em animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (NDs e Ds). De maneira semelhante, animais tratados com isoproterenol mostraram não apenas uma marcação do GLUT2 difusa como também em menor expressão no citoplasma (Figura 20. N e Q). Entretanto, animais tratados com florizina apresentaram um aumento da marcação do GLUT2 no citoplasma em NDf e Df (Figura 20. O e R) em comparação aos NDs e Ds, respectivamente.

FIGURA 20 - Localização subcelular do transportador GLUT2 em pneumócitos.

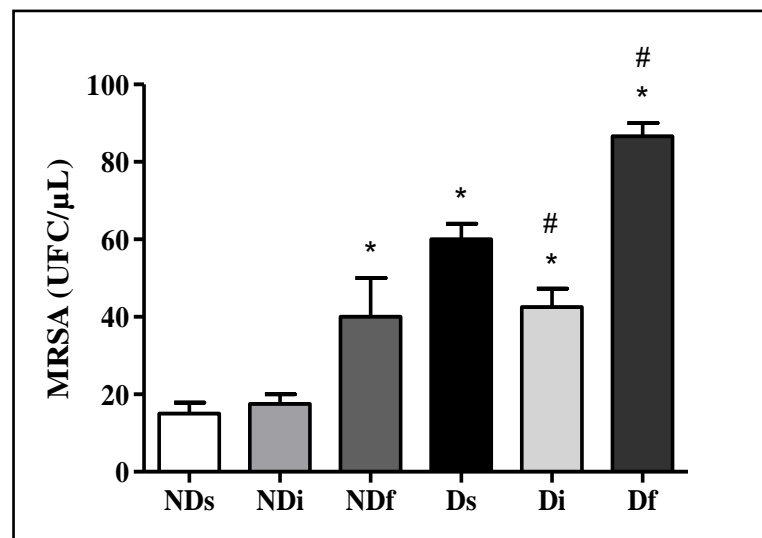


Ratos Não-diabéticos Salina (NDs), Não-diabéticos Isoproterenol (NDi), Não-diabéticos Florizina (NDf), Diabéticos Salina (Ds), Diabéticos Isoproterenol (Di) e Diabéticos Florizina (Df) pela técnica de imunohistoquímica. (A-F) Marcação para F-actina (marcador de membrana plasmática) em vermelho, (G-L) marcação para GLUT2 em verde e (M-R) sobreposição das mesmas fotomicrografias para colocação do cotransportador GLUT2. Os asteriscos indicam a presença do GLUT2 no citoplasma. Descrição: (ML) Membrana luminal e (MB) Membrana basolateral de pneumócitos. Aumento: 1000x.

5.9 Crescimento das colônias de MRSA no ASL

O crescimento das colônias de MRSA ($p < 0,05$) foi aumentado no ASL de animais diabéticos (Ds) quando comparados aos normoglicêmicos (NDs), como pode ser observado na Figura 21. Entretanto, o tratamento com isoproterenol em animais diabéticos (Di) promoveu uma redução das UFC ($p < 0,05$) comparado aos diabéticos salina (Ds). O isoproterenol não foi capaz de alterar o crescimento das colônias de MRSA no ASL de animais normoglicêmicos (NDi). Em relação ao tratamento com florizina, animais NDf e Df tiveram um aumento ($p < 0,05$) do crescimento das UFC no ASL em comparação aos NDs e Ds, respectivamente.

FIGURA 21 - Crescimento das colônias de MRSA no ASL.



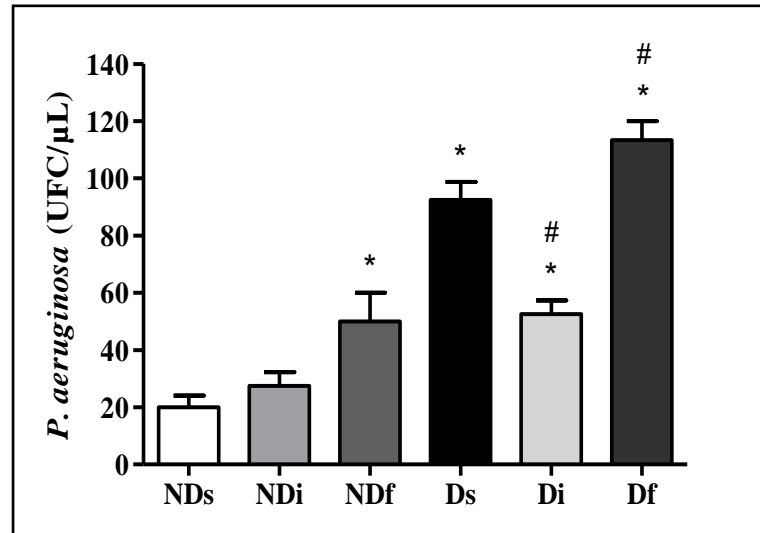
Ratos Não-diabéticos Salina (NDs), Não-diabéticos Isoproterenol (NDi), Não-diabéticos Florizina (NDf), Diabéticos Salina (Ds), Diabéticos Isoproterenol (Di) e Diabéticos Florizina (Df). Valores são média \pm EPM. ANOVA One-Way, *post-hoc* Student Newman Keuls, * $P < 0,05$ vs NDs. # $P < 0,05$ vs Ds.

5.10 Crescimento das colônias de *P. aeruginosa* no ASL

Na Figura 22, pode-se observar que o crescimento das colônias de *P.aeruginosa* ($p < 0,05$) foi aumentado no ASL de animais diabéticos (Ds) quando comparados aos normoglicêmicos (NDs). Entretanto, o tratamento com isoproterenol em animais diabéticos (Di) promoveu uma redução das UFC ($p < 0,05$) comparado aos diabéticos salina (Ds). O isoproterenol não foi capaz de alterar o crescimento das colônias de *P.aeruginosa* no ASL de animais normoglicêmicos (NDi). Em relação ao tratamento com florizina, animais NDf e Df

tiveram um aumento ($p < 0,05$) do crescimento das UFC no ASL em comparação aos NDs e Ds, respectivamente.

FIGURA 22 - Crescimento das colônias de *P. aeruginosa* no ASL.



Ratos Não-diabéticos Salina (NDs), Não-diabéticos Isoproterenol (NDi), Não-diabéticos Florizina (NDf), Diabéticos Salina (Ds), Diabéticos Isoproterenol (Di) e Diabéticos Florizina (Df). Valores são média \pm EPM. ANOVA One-Way, *post-hoc* Student Newman Keuls, * $P < 0,05$ vs NDs. # $P < 0,05$ vs Ds.

Alguns estudos vêm mostrando que a composição do ASL encontra-se alterada em condições de hiperglicemia, destacando-se a diabetes mellitus. Acreditamos que os achados do presente estudo podem contribuir para o entendimento da distribuição subcelular dos transportadores de glicose no epitélio alveolar e de possíveis moduladores de sua expressão, o que contribui para uma melhor compreensão dos fluxos de água e glicose em pneumócitos de diabéticos. Nesse contexto, os principais achados deste estudo foram:

1. O volume e a concentração de glicose do ASL aumentaram em animais diabéticos.
2. O tratamento com isoproterenol promoveu redução do volume e da concentração de glicose do ASL.
3. A administração de florizina promoveu aumento do volume e da concentração de glicose do ASL.
4. O transportador de glicose GLUT2 foi descrito pela primeira vez em pneumócitos de animais normoglicêmicos e diabéticos.
5. O tratamento com isoproterenol promoveu a translocação do cotransportador SGLT1 do citoplasma para a membrana luminal de pneumócitos de animais normoglicêmicos e diabéticos.
6. As cepas bacterianas de MRSA e *P. aeruginosa* proliferaram-se em maior número de colônias nos animais que apresentavam uma concentração de glicose aumentada no ASL.

Os principais achados encontrados nesta pesquisa serão discutidos a seguir.

6.1 Avaliação histológica

A hiperglicemia vem sendo apontada como o principal fator contribuinte para as alterações histológicas estruturais do epitélio respiratório, pois desencadeia estresse oxidativo no pulmão por meio do aumento da produção de ânion superóxido mitocondrial e do aumento da glicosilação não-enzimática de proteínas (BROWNLEE, 2001). Diversos estudos têm evidenciado que a diabetes, induzida experimentalmente, pode promover alterações na estrutura pulmonar, tais como infiltrado inflamatório, fibrose intersticial e aumento da membrana alveolocapilar (OHNISHI et al., 2009; FORGIARINI-JUNIOR et al., 2010). Essas alterações histológicas estão diretamente relacionadas à severidade da diabetes (nível glicêmico) e o tempo de evolução da mesma. Logo, quanto maior a glicemia e o estado crônico da doença, maiores serão suas repercussões sobre o epitélio respiratório

(GOLDMAN, 2003; WALTER et al., 2003). Acreditamos que o tempo de desenvolvimento da diabetes adotado no presente estudo, 21 dias, não foi capaz de promover alterações histológicas do tecido pulmonar que pudessem ser visualizadas por meio da microscopia de luz convencional. Além disso, alterações histológicas ultraestruturais decorrentes da diabetes, como o espessamento da membrana basal, a desorganização de pneumócitos tipo II e a ausência de corpos lamelares são visualizadas apenas por meio de microscopia eletrônica (OZANSOY et al., 2005). Vale destacar também que o tratamento realizado com isoproterenol e florizina, por instilação intranasal, não promoveu alteração das características histológicas do epitélio bronquiolar. Novos estudos com maior tempo de tratamento ainda são necessários para avaliar a incapacidade destas drogas, especialmente a florizina, produzirem alterações histológicas no pulmão quando administradas por via intranasal.

No presente estudo foi mostrada, pela primeira vez, em ratos diabéticos a presença de muco no lúmen do epitélio bronquiolar. Considerando que o muco corresponde à camada mais densa e superficial do ASL do epitélio bronquiolar, sendo composto principalmente por glicoproteínas, acreditamos que o excesso desse componente tenha contribuído para o aumento da camada de muco. Contudo, o tratamento realizado com isoproterenol promoveu redução desse parâmetro em ratos diabéticos, indicando a atuação de um agonista β -adrenérgico na secreção ou absorção de muco do pulmão. De forma contrária, o tratamento com florizina produziu aumento da quantidade de muco no epitélio bronquiolar de ratos normoglicêmicos e diabéticos. Logo, à medida que a florizina inibe os cotransportadores de Na^+ /glicose, não se pode descartar que a inatividade dos SGLTs interfere no controle da quantidade de muco do epitélio bronquiolar. Porém, como não existem estudos relacionando a diabetes ao aumento da produção de muco no epitélio bronquiolar, mais evidências científicas são necessárias para melhor compreensão do tema.

6.2 Participação do cotransportador SGLT1 nos fluxos de água do ASL

A partir de análise por imunohistoquímica, o presente estudo comprovou a expressão do cotransportador de Na^+ /glicose/ H_2O SGLT1 em pneumócitos de ratos normoglicêmicos, corroborando estudos anteriores (BOYD, 1990; BODEGA et al, 2010). Além disso, foi evidenciada, pela primeira vez, a presença do SGLT1 em pneumócitos de animais diabéticos. Apesar de estudos anteriores já terem indicado a presença do SGLT1 no epitélio alveolar, ainda não havia sido estudado o seu papel funcional nesse epitélio. Portanto, a descrição do

mecanismo de transporte de água por meio do SGLT1 e sua função no epitélio alveolar são essenciais para compreensão da regulação do fluxo de água que compõe o ASL.

É importante ressaltar que apenas o SGLT1 inserido na membrana plasmática de células epiteliais apresenta função fisiológica (VEYHL et al., 1993; ZIMMERMAN et al., 2012). Nossos dados mostram que o SGLT1 está localizado principalmente no citoplasma de pneumócitos de animais normoglicêmicos e diabéticos. A expressão proteica do SGLT1 na membrana luminal, em nível similar ao citoplasmático, indica que não ocorre um alto nível de translocação nesta condição experimental. O presente trabalho também mostrou que o volume de ASL em animais diabéticos encontra-se aumentado. Não temos conhecimento de outros estudos que identificaram essa alteração no volume de ASL em animais diabéticos. Desta maneira, acreditamos que a alteração de volume do ASL evidenciada na diabetes não foi promovida por modulações da expressão do SGLT1 na membrana luminal de pneumócitos. Acreditamos que ocorre um aumento da secreção de glicose no ASL devido à hiperglicemia resultante da diabetes, o que gera um consequente aumento de volume no ASL que não foi revertido pelo SGLT1. Em outros territórios, foi descrita a presença de sensores de glicose T1R2/T1R3 que apresentam a capacidade de aumentar a translocação de SGLT1 para membrana plasmática pelo aumento da cascata de sinalização intracelular envolvendo a PKA, em situações de hiperglicemia e aumento da presença de glicose luminal (MARGOLSKEE et al., 2007; MERIGO et al., 2011). Como no presente estudo, foi descrito o aumento da concentração de glicose no ASL associado à hiperglicemia, assim, nós acreditamos que estas proteínas não estão presentes com papel funcional relevante neste território.

Interessantemente, quando os animais diabéticos foram tratados com o agonista β -adrenérgico isoproterenol, o volume de ASL reduziu significativamente para valores próximos aos dos animais normoglicêmicos. Essa diminuição do volume de ASL em diabéticos pode ser atribuída à translocação do SGLT1 citoplasmático para a membrana luminal dos pneumócitos, corroborando estudos realizados em outros territórios, como células ductais de glândulas salivares (SABINO-SILVA et al., 2013), oócitos (HIRSCH; LOO; WRIGHT, 1996) e enterócitos (WRIGHT et al., 2001; RODER et al., 2014). A translocação do SGLT1 pode ser explicada nesses territórios pela modulação da via da PKA, pois esta é ativada pela interação de agonistas β -adrenérgicos com seus receptores e, desta forma, pode promover a translocação do SGLT1 para a membrana plasmática (HIRSCH; LOO; WRIGHT, 1996).

Contudo, a administração de isoproterenol em animais normoglicêmicos não foi capaz de promover uma diminuição do volume de ASL. Considerando a razão U/S um método

restrito para avaliação de sensíveis mudanças no volume de líquido pulmonar, destacamos a necessidade de métodos de maior precisão que sejam capazes de avaliar pequenos volumes de ASL. Outro aspecto importante a ser considerado é que o processo de umidificação do epitélio respiratório depende essencialmente da presença de líquido no ASL. Acreditamos que diminuições do volume líquido nesse fluido, abaixo dos níveis de normalidade, pode comprometer a integridade do epitélio respiratório promovendo o ressecamento das vias aéreas e, conseqüentemente predispondo o animal a complicações respiratórias. Desta forma, sugerimos que outros mecanismos moleculares estejam envolvidos no transporte de água do epitélio respiratório, impedindo reduções drásticas de volume do ASL e prejuízos ao funcionamento do sistema respiratório.

Por outro lado, os animais que receberam tratamento com florizina, um inibidor por competição da atividade de SGLTs, apresentaram a marcação de SGLT1 de forma internalizada no citoplasma e tiveram um aumento considerável no volume de ASL (Figura 11). Alguns estudos mostram que o uso da florizina em outros territórios, como no rim (BISHOP et al., 1978) e no intestino (PARSONS; SMYTH; TAYLOR, 1958) pode reduzir a absorção de água nesses órgãos. Dessa forma, acreditamos que o SGLT1, quando presente na membrana plasmática de pneumócitos, pode estar realizando a remoção do excesso de líquido do ASL, promovendo a diminuição do edema alveolar. O aumento do volume de líquido nos alvéolos desencadeia uma série de complicações sistêmicas, pois remove o surfactante pulmonar aumentando a tensão superficial alveolar e, conseqüentemente limitando as trocas gasosas (LIESCHING et al., 2014). Assim, considerando o edema alveolar uma grave condição clínica, que causa intensa dificuldade respiratória, mais estudos devem ser realizados para esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos nesta condição.

Outros estudos realizados utilizando agonistas β -adrenérgicos seletivos (procatérol, salmeterol e terbutalina) e não-seletivos (isoproterenol, epinefrina e dobutamina), mostraram aumento da absorção de líquido do epitélio alveolar de ratos (JAYR et al., 1994), camundongos (ICARD; SAUMON, 1999; FUKUDA; FOLKESSON; MATTHAY, 2000) cobaias (NORLIN et al., 1998), cães (BERTHIAUME et al., 1988), ovelhas (BERTHIAUME, 1991) e humanos (SAKUMA et al., 1997) em condições normais e patológicas. Os resultados desses estudos foram atribuídos à atuação de agonistas β -adrenérgicos na ativação da via da PKA, que estaria promovendo o tráfego de canais de Na^+ para a membrana luminal da célula, aumentando tanto a abundância desses canais ligados à membrana quanto os fluxos de Na^+ direcionados por eles. Entendendo que esses estudos que correlacionaram a absorção de água no epitélio alveolar ao tráfego de canais de Na^+ à membrana plasmática não analisaram a

presença e o papel funcional do SGLT1 no epitélio alveolar, necessita-se de mais estudos que integrem e avaliem esses dois possíveis mecanismos de transporte de água dos alvéolos.

6.3 Participação do GLUT2 e do SGLT1 nos fluxos de glicose do ASL

Animais diabéticos possuem uma concentração aumentada de glicose no ASL, o que facilita o crescimento de certos micro-organismos predispondo às infecções respiratórias (BAKER et al., 2006; KORNUM et al., 2007). Nossos dados mostraram uma elevação na concentração de glicose do lavado broncoalveolar (BAL) de ratos diabéticos. A concentração de glicose do BAL pode fornecer uma relação direta da concentração de glicose do ASL. Alguns estudos vêm tentando desvendar como ocorrem os fluxos de glicose do ASL, porém pouco se tem sido esclarecido, necessitando de mais pesquisas sobre o tema, especialmente em condições fisiopatológicas.

Até o momento, cerca de três transportadores de glicose (GLUT1, GLUT2 e GLUT10) (KALSI et al., 2008; PEZZULO et al., 2011) e um cotransportador de Na^+ /glicose/ H_2O SGLT1 (BODEGA et al., 2010) foram descritos no epitélio pulmonar. Sendo que os transportadores de glicose GLUT1 e GLUT10 (PEZZULO et al., 2011) foram evidenciados em modelos de culturas de células do epitélio alveolar de ratos, enquanto o GLUT2 foi evidenciado em células do epitélio bronquiolar de humanos (KALSI et al., 2008). Nossos dados mostram, pela primeira vez, a presença de GLUT2 em pneumócitos de ratos normoglicêmicos e diabéticos.

O transportador de glicose GLUT2 foi localizado principalmente no citoplasma das células, apresentando uma maior expressão em animais tratados com florizina, em comparação aos animais tratados com salina ou isoproterenol. Resultados semelhantes, em estudos no epitélio intestinal, têm indicado que existe um “pool” intracelular de GLUT2 que pode ser translocado para a membrana celular em resposta a alterações na concentração de glicose do lúmen (AFFLECK; HELLIWELL; KELLETT, 2003; KELLETT; BROTLAROCHE, 2005). Modelos de cultura de células H441 (KALSI et al., 2008), de pneumócitos tipo II de cobaias (KEMP; BOYD, 1992) e de células do epitélio traqueal humano (KALSI et al., 2008) encontraram o GLUT2 expresso tanto na membrana basolateral como na membrana luminal. Porém, ainda não foi comprovada a existência de GLUT2 em pneumócitos de ratos, assim, nosso estudo mostra pela primeira vez esse transportador de glicose no epitélio alveolar de animais normoglicêmicos e diabéticos. A partir desses achados, podemos sugerir que outros transportadores de glicose podem estar presentes em pneumócitos

e envolvidos nos fluxos de glicose do ASL. A reduzida expressão do GLUT2 em membrana plasmática de pneumócitos indica que outros transportadores de glicose por difusão facilitada podem desempenhar papel relevante no fluxo de glicose neste território.

O cotransportador de Na^+ /glicose/ H_2O SGLT1 foi evidenciado no citoplasma dos pneumócitos de ratos normoglicêmicos e diabéticos. Os animais diabéticos apresentaram uma concentração elevada de glicose no ASL, concordando com dados de outros estudos (MCALISTER et al., 2005; BAKER et al., 2006), enquanto que animais normoglicêmicos apresentaram baixas concentrações de glicose no ASL. Além disso, foi mostrado que animais tratados com florizina aumentaram a concentração de glicose do ASL, o que está de acordo com outro trabalho que realizou instilação de solução com florizina no epitélio pulmonar de fetos de ovelhas e, em seguida, avaliou a concentração de glicose do ASL (BAKER et al., 1989). Segundo Baker e colaboradores (1989), animais tratados previamente com florizina via instilação nasal apresentam aumento da concentração de glicose do ASL. Esse relato reforça o entendimento de que o SGLT1 está presente na membrana luminal de células do epitélio respiratório mesmo em condições fisiológicas. Trabalhos realizados em rins (ROSSETTI et al., 1987), intestino (EHRENKRANZ et al., 2005) e glândulas salivares (TAKAI; YOSHIDA; KAKUDO, 1983), também observaram, após administração de florizina no lúmen epitelial, aumento da concentração de glicose no fluido luminal de seus epitélios. Desta forma, acreditamos que a florizina, ao bloquear o SGLT1, diminui a absorção de glicose pelos pneumócitos, contribuindo para o aumento da concentração de glicose do ASL.

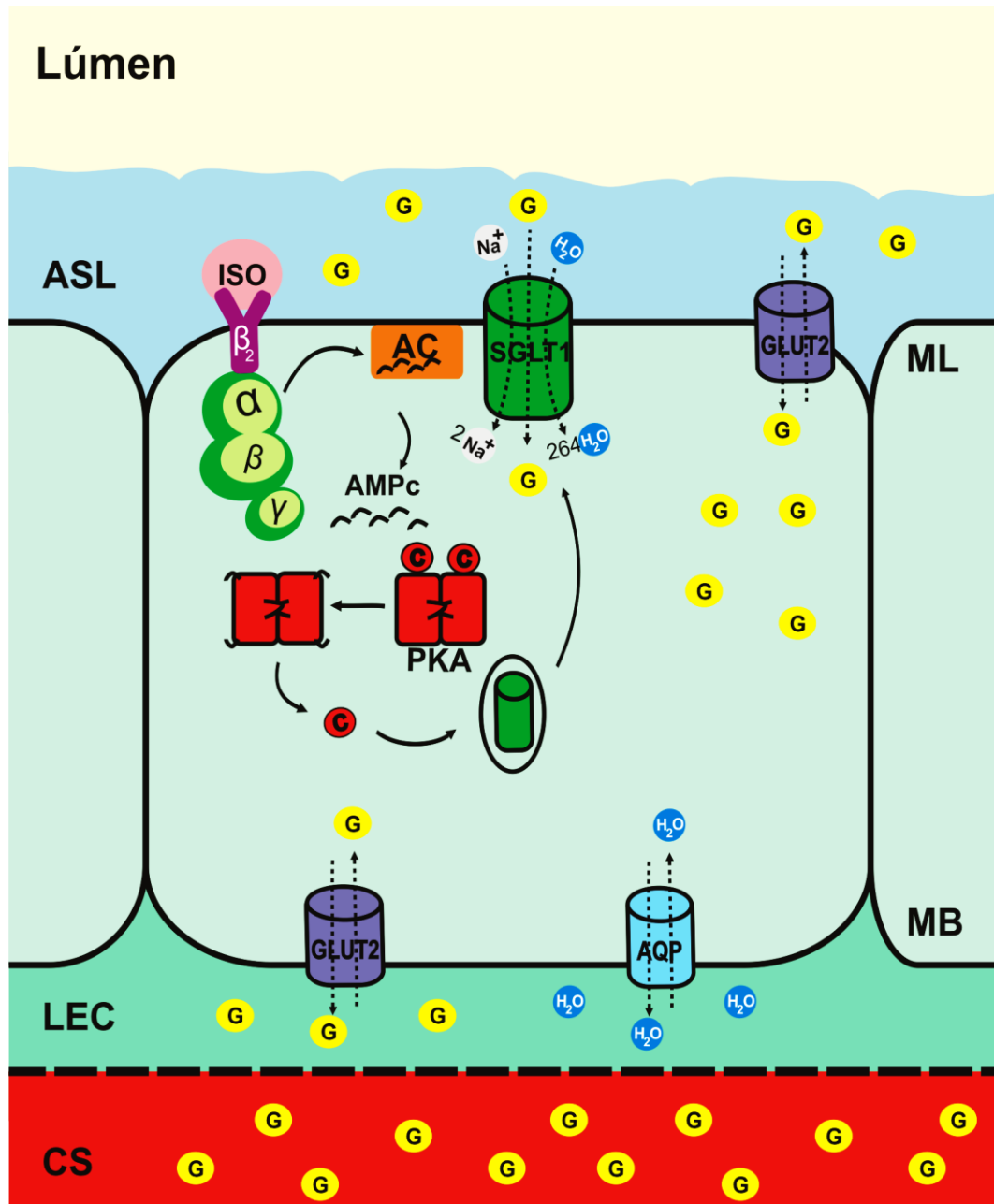
Seguindo essa linha de raciocínio, esse trabalho também mostrou que animais diabéticos tratados com isoproterenol reduziram a concentração de glicose do ASL. Assim, sugerimos que a presença do SGLT1 encontrada na membrana luminal dos pneumócitos tenha promovido a absorção de glicose do ASL e, conseqüentemente tenha reduzido sua concentração neste fluido. Contudo, a administração de isoproterenol não promoveu redução da concentração de glicose de animais normoglicêmicos. Considerando que a glicose está presente em baixa concentração no ASL de normoglicêmicos, acreditamos que sua diminuição neste fluido a níveis não fisiológicos comprometa a composição química e as propriedades reológicas do muco. Desta forma, interferindo negativamente no sistema de defesa mucociliar do epitélio respiratório.

Contudo, é importante destacar que a manutenção fisiológica de baixas concentrações de glicose no ASL é fundamental para a prevenção de infecções respiratórias, principalmente por MRSA e *P. aeruginosa*. Os animais que apresentaram aumento no volume e concentração de glicose do ASL tiveram conseqüentemente uma maior proliferação de colônias de MRSA e

P. aeruginosa, pois essas cepas colonizando-se com facilidade em ambientes úmidos e ricos em glicose. Essas bactérias são consideradas oportunistas devido à elevada capacidade de causar infecções em diferentes sistemas do organismo como também são resistentes a diferentes antibióticos (SILVA et al., 2014).

Em resumo, nossos dados mostram que a diabetes promove um aumento da concentração de glicose e do volume de água no ASL de ratos. O tratamento com isoproterenol propicia a diminuição dessas alterações, pois estimula a translocação do SGLT1 citoplasmático para a membrana luminal de pneumócitos, permitindo a absorção de glicose e água do ASL. Além disso, o bloqueio de SGLT1 realizado com florizina resultou no aumento da concentração de glicose e volume do ASL, sugerindo fortemente o papel funcional do SGLT1 nos fluxos de glicose e água através do epitélio alveolar. Um modelo esquemático dessa regulação é mostrado na Figura 23.

FIGURA 23 - Modelo esquemático dos fluxos de glicose e água em pneumócitos.



Fonte: Autor, 2014.

Modelo esquemático da translocação do cotransportador SGLT1 em pneumócitos. G – glicose; ASL – líquido de superfície das vias aéreas; AC – adenilato ciclase; AMPc – monofosfato cíclico de adenosina; ISO – isoproterenol; PKA – proteína cinase A; C – subunidade catalítica da PKA; β_2 – receptor β_2 -adrenérgico; $\alpha/\beta/\gamma$ – subunidades do receptor β_2 -adrenérgico; AQP – aquaporina; ML – membrana luminal; MB – membrana basolateral; LEC – líquido extracelular; CS – capilar sanguíneo; GLUT2 – transportador de glicose tipo 2 por difusão facilitada; SGLT1 – cotransportador de Na^+ /glicose/ H_2O tipo 1.

Em conjunto, nossos resultados mostram que animais diabéticos apresentam aumento da concentração de glicose e do volume de líquido do ASL. Além disso, mostramos pela primeira vez a presença do transportador de glicose GLUT2 em pneumócitos de ratos normoglicêmicos e diabéticos, como também confirmamos a presença do cotransportador de Na^+ /glicose/ H_2O SGLT1 nessas células.

Adicionalmente, evidenciamos que o tratamento com isoproterenol promoveu a diminuição da concentração de glicose e do volume de líquido do ASL, juntamente com a translocação do SGLT1 para a membrana luminal dos pneumócitos. Desta forma, sugerimos que o isoproterenol estimula receptores β -adrenérgicos presentes na membrana luminal dos pneumócitos, que ativam a via da PKA, promovendo a translocação do SGLT1 para a membrana luminal dessas células. Assim, contribuindo para captação de glicose e água em excesso no ASL de diabéticos. Logo, sugerimos que a glicose e a água absorvidas pelos pneumócitos poderão ser metabolizadas intracelularmente ou direcionadas para o interstício, via GLUT2 e aquaporinas, respectivamente, presentes na membrana basolateral.

Considerando o aumento da concentração de glicose do ASL um fator de risco para infecções respiratórias e que o aumento de seu volume de líquido limita as trocas gasosas, acreditamos que o conhecimento dos mecanismos de transporte de glicose e água no epitélio alveolar abra perspectivas para o desenvolvimento de fármacos com potencial de modular esses mecanismos. E assim, permitir a redução do percentual de complicações respiratórias decorrentes do aumento da concentração de glicose e do volume de líquido do ASL.

ACOURT, C.H. et al. Microbiological lung surveillance in mechanically ventilated patients, using non-directed bronchial lavage and quantitative culture. **The Quarterly Journal of Medicine**, v. 86, n.10, p. 635-648, 1993.

AFFLECK, J.A.; HELLIWELL, P.A.; KELLETT, G.L. Immunocytochemical detection of GLUT2 at the rat intestinal brush-border membrane. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. v. 51, p. 1567-1574, 2003.

ALBERTI, K.G.; ZIMMET, P.Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. **Diabetic Medicine**. v. 15, n. 7, p. 539-553, 1998.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v. 37, n. 1, p. 81-90, 2014.

BAI, T.R.; MAK, J.C.; BARNES, P.J. A comparison of beta-adrenergic receptors and in vitro relaxant responses to isoproterenol in asthmatic airway smooth muscle. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v. 6, n. 6, p. 647-651, 1992.

BAKER, E.H. et al. Hyperglycaemia and pulmonary infection. **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 65, p. 227-235, 2006.

BAKER, E.H. et al. Hyperglycemia and cystic fibrosis alter respiratory fluid glucose concentrations estimated by breath condensate analysis. **Journal of Applied Physiology**. v. 102, p. 1969-1975, 2007.

BARKER, P.M. et al. Pulmonary glucose transport in the fetal sheep. **Journal of Physiology**. v. 409, p. 15-27, 1989.

BARTLETT, J.A.; FISCHER, A.J.; MCCRAY, P.B. Innate immune functions of the airway epithelium. **Contributions to Microbiology**. v. 15, p. 147-163, 2008.

BARROSO, F.C. et al. Transporte de eletrólitos no epitélio respiratório dos portadores de fibrose cística. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**. v. 47, n. 2, p. 76-78, 1992.

BASSET, G.; CRONE, C.; SAUMON, G. Fluid absorption by rat lung in situ: pathways for sodium entry in the luminal membrane of alveolar epithelium. **Journal of Physiology**. v. 384, p. 325-345, 1987.

BELL G.I. et al. Molecular biology of mammalian glucose transporters. **Diabetes Care**. v. 13, n. 3, p. 198-208, 1990.

BERTHIAUME, Y. Effect of exogenous cAMP and aminophylline on alveolar and lung liquid clearance in anesthetized sheep. **Journal of Applied Physiology**. v. 70, p. 2490-2497, 1991.

BERTHIAUME, Y. et al. Alveolar liquid and protein clearance from normal dog lungs. **Journal of Applied Physiology**. v. 65, p. 585-593, 1988.

BHULAN, K.S. et al. Isoproterenol-Induced Cardiomyopathy in Rats: influence of Acorus Calamus Linn. **Cardiovascular Toxicology**. v. 11, p. 263-271, 2011.

BISHOP, J.H. V. et al. Effects of phlorizin on glucose, water and sodium handling by the rat kidney. **Journal of Physiology**. v. 275, p. 467-480, 1978.

BODEGA, F. et al. Evidence for Na⁺-glucose cotransporter in type I alveolar epithelium. **Histochemistry and Cell Biology**. v. 134, p. 129-136, 2010.

BOUCHER, R.C. Human airway ion transport. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 150, n. 2, p. 581-593, 1994.

BOYD, C.A.R. Cellular basis of active D-glucose transport in mouse and rabbit lung. **Journal of Physiology**. v. 3, p. 422-444, 1990.

BRADFORD, M. M. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**. v. 414, p.813-820. 2001.

CALLES-ESCANDON, J.; CIPOLLA, M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. **Endocrine Reviews**. v. 22, n. 1, p. 36-52, 2001.

CARRUTHERS, A. Facilitated diffusion of glucose. **Physiological Reviews**. v. 70, p. 1135-1176, 1990.

CARSTAIRS, J.R.; NIMMO, A.J.; BARNES, P.J. Autoradiographic visualization of beta-adrenoceptor subtypes in human lung. **American Review of Respiratory Disease**. v. 132, p. 541-547, 1985.

CRYSTAL, R.G. et al. Airway epithelial cells: current concepts and challenges. **Proceedings of the American Thoracic Society**. v. 5, n. 7, p.772-777, 2008.

de PROST, N.; SAUMON, G. Glucose transport in the lung and its role in liquid movement. **Respiratory Physiology and Neurobiology**. v. 159, p. 331-337, 2007.

DONOVAN, C. et al. Rosiglitazone is a superior bronchodilator compared to chloroquine and beta-adrenoceptor agonists in mouse lung slices. **Respiratory Research**. v. 15, n. 1, p. 29-45, 2014.

EHRENKRANZ, J.R. et al. Phlorizin: a review. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**. v. 21, n. 1, p. 31-38, 2005.

FORGIARINI-JUNIOR, L.A. et al. Lung alterations in a rat model of diabetes mellitus: effects of antioxidant therapy. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 36, n. 5, p. 579-587, 2010.

FUKUDA, N.; FOLKESSON, H.G.; MATTHAY, M.A. Relationship of interstitial fluid volume to alveolar fluid clearance in mice: ventilated vs. in situ studies. **Journal of Applied Physiology**. v. 89, p. 672-679, 2000.

GASTALDI, A.C.; JARDIM, J.R.; KING, M. The influence of temperature and length of time of storage of frog mucus samples. **Biorheology**. v. 37, n. 3, p. 203-211, 2000.

GERSTEIN, H.C. et al. Annual incidence and relative risk of diabetes in people with various categories of dysglycemia: a systematic overview and meta-analysis of prospective studies. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v. 78, p.305-312, 2007.

GOLDMAN, M.D. Lung dysfunction in diabetes. **Diabetes Care**. v. 26, n. 6, p.1915-1918, 2003.

HANDLEY, D.A. et al. Sympathomimetic enantiomers and asthma. **Chirality**. v. 10, n. 3, p. 262-272, 1998.

HIRSCH, J.R.; LOO, D.D; WRIGHT, E.M. Regulation of Na⁺/glucose cotransporter expression by protein kinases in *Xenopus laevis* oocytes. **Journal of Biological Chemistry**. v. 271, p. 14740-14746, 1996.

HOUTMEYERS, E. et al. Regulation of mucociliary clearance in health and disease. **European Respiratory Journal**. v. 13, n.5, p.1177-1188, 1999.

ICARD, P.; SAUMON, G. Alveolar sodium and liquid transport in mice. **American Journal of Physiology**. v. 277, n. 6, p. 1232-1238, 1999.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **Diabetes Atlas**. ed. 6, 2013.

JAYR, C. et al. Alveolar liquid and protein clearance in anesthetized ventilated rats. **Journal of Applied Physiology**. v.76, p. 2636–2642, 1994.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

KALSI, K.K. et al. Apical and basolateral localisation of GLUT2 transporters in human lung epithelial cells. **European Journal of Physiology**. v. 456, p. 991-1003, 2008.

KELLETT, G.L.; BROT-LAROCHE, E. Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. **Diabetes**. v. 54, p. 3056-3062, 2005.

KEMP, P.J.; BOYD, C.A. Pathways for glucose transport in type II pneumocytes freshly isolated from adult guinea pig lung. **American Journal of Physiology**. v. 263, p. 612-616, 1992.

KING, H.; AUBERT, R.E.; HERMAN, W.H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care**. v. 21, n. 9, p. 1414-1431, 1998.

KNOWLES, M.R.; BOUCHER, R.C. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. **Journal of Clinical Investigation**. v. 109, n. 5, p. 571-577, 2002.

KONG, C.T.; YET, S.F.; LEVER, J.E. Cloning and expression of a mammalian Na⁺/amino acid cotransporter with sequence similarity to Na⁺/glucose cotransporters. **Journal of Biological Chemistry**. v. 68, p. 1509-1512, 1993.

KORNUM, J.B. et al. Type 2 diabetes and pneumonia outcomes: a population-based cohort study. **Diabetes Care**. v. 30, p. 2251–2257, 2007.

KRENEK, P. et al. Isoproterenol-induced heart failure in the rat is associated with nitric oxide dependent functional alterations of cardiac function. **European Journal of Heart Failure**. v. 11, p. 140-146, 2009.

LENZEN, S.; MUNDAY, R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. **Biochemical Pharmacology**. v. 42, n. 7, p. 1385-1391, 1991.

LI, R. et al. Cost-effectiveness of interventions to prevent and control diabetes mellitus: a systematic review. **Diabetes Care**. v. 33, p. 1872-1894, 2010.

LIESCHING, T. et al. Randomized trial of bilevel versus continuous positive airway pressure for acute pulmonary edema. **Journal of Emergency Medicine**. v. 46, n. 1, p. 130-40, 2014.

LORENZI-FILHO, G. et al. Correlation between rheologic properties and in vitro ciliary transport of rat nasal mucus. **Biorheology**. v. 29, n. 4, p. 433-440, 1992.

MA, G. et al. Increased Reabsorption of Alveolar Edema Fluid in the Obese Zucker Rat. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**. v. 216, p. 223-230, 2008.

MACHADO, U.F. Transportadores de Glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v. 42, n. 6, p. 413-421, 1998.

MAGER, S.; SLOAN, J. Possible role of amino acids, peptides, and sugar transporter in protein removal and innate lung defense. **European Journal of Pharmacology**. v. 479, p. 263-267, 2003.

MARGOLSKEE, R.F. et al. T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. v. 104, n. 38, p. 15075-15080, 2007.

MASHARANI, U.; KARAN, J. H. Pancreatic Hormones and Diabetes Mellitus. **Basic and Clinical Endocrinology**. p. 623-698, 2001.

MCALISTER, F.A. et al. The relation between hyperglycemia and outcomes in 2,471 patients admitted to the hospital with community-acquired pneumonia. **Diabetes Care**. v. 28, p. 810-815, 2005.

MCLETCHIE, G.; MARTET, G.; LOISEAU, P. Glucose transport and equilibrium across alveolar-airway barrier of rat. **American Journal of Physiology**. v. 270, p. 183-190, 1996.

MCLETCHIE, N.G. Alloxan diabetes: a discovery, albeit a minor one. **Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh**. v. 32, n. 2, p. 134-142, 2002.

MEDEIROS, I.L. et al. Comparison of lung preservation solutions in human lungs using an ex vivo lung perfusion experimental model. **Clinics**. v. 67, n. 9, p.1101-1106, 2012.

MERIGO, et al. Glucose transporters are expressed in taste receptor cells. **Journal of Anatomy**. v. 219, p.243-252, 2011.

MONTEIRO, R. et al. Evaluation of the cardiac morphological alterations secondary to the pulmonary emphysema: experimental study in rats. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**. v. 19, n. 4, p. 341-347, 2004.

NAKAGAWA, N.K. et al. Mucociliary clearance is impaired in acutely ill patients. **Chest**. v. 128, n. 4, p. 2772-2777, 2005.

NORLIN, A. et al. Alveolar liquid clearance in the anesthetized ventilated guinea pig. **American Journal of Physiology**. v. 274, p. 235-243, 1998.

OHNISHI, T. et al. Oxidative stress causes alveolar bone loss in metabolic syndrome model mice with type 2 diabetes. **Journal of Periodontal Research**. v. 44, n. 1, p. 43-51, 2009.

OZANSOY, G. et al. Effects of simvastatin treatment on oxidant/antioxidant state and ultrastructure of streptozotocin-diabetic rat lung. **Cell Biochemistry and Function**. v. 23, n. 6, p. 421-426, 2005.

PANAYOTOVA-HEIERMANN, M.; LOO, D.D.; WRIGHT, E.M. Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na⁺/glucose cotransporter. **Journal of Biological Chemistry**. v. 270, n. 45, p. 99-105, 1995.

PARSONS, B.J.; SMYTH, D.H.; TAYLOR, C.B. The action of phlorrhizin on the intestinal transfer of glucose and water in vitro. **Journal of Physiology**. v. 144, n. 3, p. 387-402, 1958.

PEZZULO, A.A. et al. Glucose Depletion in the Airway Surface Liquid Is Essential for Sterility of the Airways. **Plos One**. v. 6, n. 1, p. 161-166, 2011.

PHILIPS, B.J. et al. Glucose in bronchial aspirates increases the risk of respiratory MRSA in intubated patients. **Thorax**. v. 60, p. 761-764, 2005.

PUCHELLE, E.; ZAHM, J.M.; AUG, F. Viscoelasticity, protein content and ciliary transport rate of sputum in patients with recurrent and chronic bronchitis. **Biorheology**. v. 18, p. 659-666, 1981.

QU, N. et al. Integrity of airway epithelium is essential against obliterative airway disease in transplanted rat tracheas. **Journal of Heart and Lung Transplantation**. v. 24, n. 7, p. 882-890, 2005.

RAJA, M.M.; TYAGI, N.K.; KINNE, R.K. Phlorizin Recognition in a C-terminal Fragment of SGLT1 Studied by Tryptophan Scanning and Affinity Labeling. **Journal of Biological Chemistry**. v. 278, n. 49, p. 154-163, 2003.

RANDELL, S.H.; BOUCHER, R.C. Effective mucus clearance is essential for respiratory health. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v. 35, n. 1, p. 20-28, 2006.

RIVERO, D.H, et al. Effects of bronchial transection and reanastomosis on mucociliary system. **Chest**. v. 119, n. 5, p. 1510-1515, 2001.

RODER, P.V. et al. The Role of SGLT1 and GLUT2 in Intestinal Glucose Transport and Sensing. **Plos One**. v. 9, n. 2, 2014.

ROGERS, D.F. Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion. **Respiratory Care**. v. 52, n. 9, p. 1134-1146, 2007.

ROSS, M.J; PAWLINA, W. **Histologia: texto e atlas**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

ROSSETTI, L. et al. Effect of insulin on renal potassium metabolism. **American Journal of Physiology**. v. 252, p. 60-64, 1987.

SABINO-SILVA, R. et al. Increased SGLT1 expression in salivary gland ductal cells correlates with hyposalivation in diabetic and hypertensive rats. **Diabetology and Metabolic Syndrome**. v. 5, n. 64, p. 1-5, 2013.

SABINO-SILVA, R. et al. Na⁺-Glucose Cotransporter SGLT1 protein in salivary glands: potencial involvement in the diabetes-induced decrease in salivary flow. **Journal of Membrane Biology**. v. 228, p. 63-69, 2009.

SABINO-SILVA, R. et al. SGLT1 protein expression in plasma membrane of acinar cells correlates with the sympathetic outflow to salivary glands in diabetic and hypertensive rats. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**. v. 299, p. 1028-1037, 2010.

SAKUMA, T. et al. Beta-adrenergic agonist stimulated alveolar fluid clearance in ex vivo human and rat lungs. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 155, p. 506-512, 1997.

SALDIVA, P.H.N. Aparelho mucociliar: aspectos funcionais e métodos de estudo. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 16, n. 3, p. 161-170, 1990.

SALDIVA, P.H.N. et al. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. **Environmental Research**. v. 57, n. 1, p. 19-33, 1992.

SCHEEPERS, A.; JOOST, H.G.; SCHURMANN, A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**. v. 28, p. 364-371, 2004.

SEATON, A. et al. Particulate air pollution and acute health effects. **Lancet**. v. 345, p. 176-178, 1995.

SILVA, L.V. et al. Virulence attributes in Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 14, p. 1438-4221, 2014.

SINGLETON, J.R. et al. Microvascular complications of impaired glucose tolerance. **Diabetes**. v. 52, p. 2867-2873, 2003.

SPINA, D. et al. Autoradiographic localization of beta-adrenoceptors in asthmatic human lung. **American Review of Respiratory Disease**. v. 140, p. 1410-1415, 1989.

TAKAI, N.; YOSHIDA, Y.; KAKUDO, Y. Secretion and Re-absorption of Glucose in Rat Submandibular and Sublingual Saliva. **Journal of Dental Research**. v. 62, n. 10, p. 1022-1025, 1983.

THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st Century. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**. v. 298, p. 141-145, 2010.

VARDAKAS, K.Z.; SIEMPOS, I.I.; FALAGAS, M.E. Diabetes mellitus as a risk factor for nosocomial pneumonia and associated mortality. **Diabetic Medicine**. v. 24, p. 1168-1171, 2007.

VARDAKAS, P.C. et al. Increased susceptibility of diabetic mice to influenza virus infection: compromise of collectin-mediated host defense of the lung by glucose? **Journal of Virology**. v. 72, p. 6884-6887, 1998.

VERDUGO, P. Goblet cells secretion and mucogenesis. **Annual Review of Physiolog**. v. 52, p. 157-176, 1990.

VEYHL, M. et al. Cloning of a membrane-associated protein which modifies activity and properties of the Na⁺-D-glucose cotransporter. **Journal of Biological Chemistry**. v. 268, p. 41-53, 1993.

WALTER, R.E. et al. Association between glycemic state and lung function: the Framingham Heart Study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 167, n. 6, p. 911-916, 2003.

WELSH, M.J. Electrolyte transport by airway epithelia. **Physiological Reviews**. v. 67, n. 4, p. 1143-1184, 1987.

WELSH, M.J. Production and control of airway secretions. **Pulmonary Diseases and Disorders**. v. 1, p. 113-118, 1988.

WIDDICOMBE, J.H.; WIDDICOMBE, J.G. Regulation of human airway surface liquid. **Respiration Physiology**. v. 99, p. 3-12, 1995.

WRIGHT, E.M.; HIRAYAMA, B.A.; LOO D.F. Active sugar transport in health and disease. **Journal of Internal Medicine**. v. 261, p. 32-43, 2007.

WRIGHT, E.M.; HIRAYAMA, B.A.; LOO D.F. Biology of human sodium glucose transporters. **Physiological Reviews**. v. 91, p. 733-794, 2011.

WRIGHT, E.M.; MARTÍN, M.G.; TURK, E. Intestinal absorption in health and disease-sugars. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**. v. 17, n. 6, p. 943-956, 2003.

WRIGHT, E.M.; TURK, E. The sodium/glucose cotransport family SLC5. **European Journal of Physiology**. v. 447, p. 510-518, 2004.

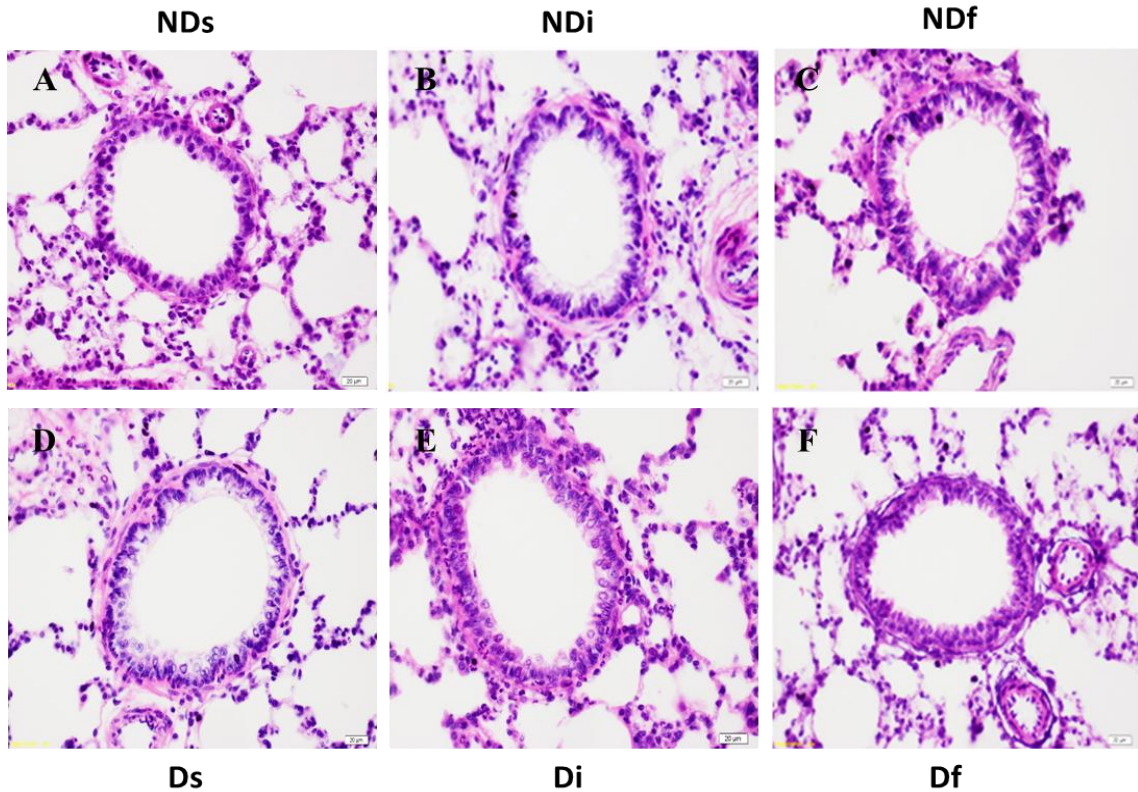
WU, D.X. et al. Ultrastructure of tracheal surface liquid: low-temperature scanning electron microscopy. **Scanning**. v. 18, n. 8, p. 589-592, 1996.

ZEUTHEN, T. Molecular water pumps. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. v.141, p. 97-151, 2000.

ZIMMERMAN, N.P. et al. Cyclic AMP dysregulates intestinal epithelial cell restitution through PKA and RhoA. **Inflammatory Bowel Disease Journal**. v. 18, n. 6, p. 1081-1091, 2012.

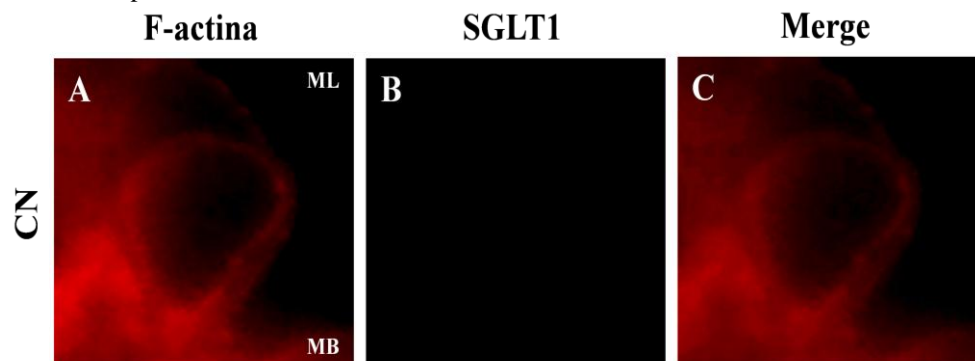
APÊNDICES

APÊNDICE A - Estrutura histológica do epitélio broncoalveolar.



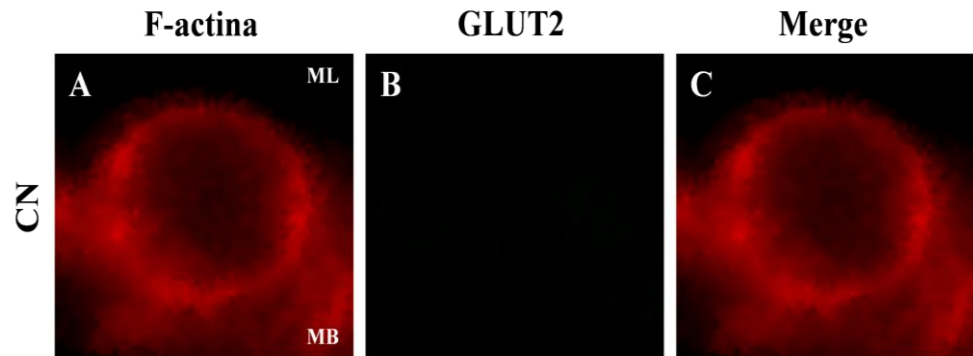
Ratos Não-diabéticos Salina (NDs), Não-diabéticos Isoproterenol (NDi), Não-diabéticos Florizina (NDf), Diabéticos Salina (Ds), Diabéticos Isoproterenol (Di) e Diabéticos Florizina (Df) por meio da coloração HE. Aumento: 200x.

APÊNDICE B - Controle negativo do experimento de imunohistoquímica para localização do cotransportador SGLT1 em pneumócitos.



CN – Controle negativo. (A) Marcação para F-actina (marcador de membrana plasmática) em vermelho, (B) controle negativo e (C) sobreposição das mesmas fotomicrografias para colocalização do cotransportador SGLT1. Descrição: (ML) Membrana luminal e (MB) Membrana basolateral de pneumócitos. Aumento: 1000x.

APÊNDICE C - Controle negativo do experimento de imunohistoquímica para localização do cotransportador GLUT2 em pneumócitos.



CN – Controle negativo. (A) Marcação para F-actina (marcador de membrana plasmática) em vermelho, (B) controle negativo e (C) sobreposição das mesmas fotomicrografias para colocalização do cotransportador GLUT2. Descrição: (ML) Membrana luminal e (MB) Membrana basolateral de pneumócitos. Aumento: 1000x.