

MARIA AUGUSTA KARAS ZELLA

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO EM FAGÓCITOS NO
DIABETES MELLITUS INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Medicina Interna, Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka

CURITIBA

2001



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna
= Mestrado e Doutorado =

PARECER

PARECER CONJUNTO dos Professores Dra. Maria Ilma Araújo, Dr. Hans Graf e Dr. João Carlos Domingues Repka sobre a Dissertação de Mestrado em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, elaborada por Maria Augusta Karas Zella, intitulada: "**AVALIÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO EM FAGÓCITOS NO DIABESTES MELLITUS INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA - ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR**".

A Banca Examinadora considerou que Maria Augusta Karas Zella apresentou trabalho adequado para Dissertação de Mestrado e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe Conceito " Δ ", correspondente ao Grau " 10 ", sendo pois unanimemente recomendado a Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **MESTRE EM MEDICINA** e a publicação da Dissertação em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.

Curitiba, 15 de dezembro de 2001.


Prof.ª Dra. Maria Ilma de Araújo


Prof. Dr. Hans Graf


Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka

Dedico esta dissertação aos meus alunos de Propedêutica e do Ciclo de Internato, da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, motivo da minha opção pelo mestrado.

A meus pais, **Alcione e Augusto**, pelo apoio, carinho, compreensão e dedicação à netinha nos sábados e domingos, durante todo o processo de execução desta dissertação.

À minha filha **Mariana**, hoje com 3 anos, pelo simples fato de existir e ser a prova viva de que um filho é capaz de incentivar a realização de uma tese, principalmente nas horas em que o trabalho parece não sair do lugar. Ainda bem que quando você conseguir ler isto provavelmente não se lembrará do horário em que sua mãe chegava em casa. Amo você!

Ao meu esposo, **Marcelo**, amigo e companheiro, que soube estender a mão nos momentos mais difíceis e empurrar-me nas indecisões.

A **Deus**, por ter-me feito compreender que a busca do conhecimento é gratificante.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **João Carlos Domingues Repka**, pela orientação e por ter-me proporcionado a oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. **Rogério Andrade Mulinari**, coordenador do Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna, pelo apoio e colaboração durante a fase final da realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Nicolau Gregori Czezko**, amigo e estimulador de meu trabalho, pelo apoio e colaboração na realização desta pesquisa.

Aos acadêmicos **Ana Cristina Sobral** e **Álvaro Silveira Neto**, da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, pelo companheirismo e inestimável ajuda na parte prática deste trabalho.

À Dr.^a Prof.^a **Maria Ilma Araújo**, imunopatologista da Universidade Federal da Bahia, cuja participação foi fundamental tanto na orientação da técnica laboratorial desta dissertação, como na compra e envio do material do exterior.

À Dr.^a **Marilene Moreira Nielsen**, alergista e imunologista, pelo auxílio na aquisição dos reagentes no exterior.

Ao Prof. **Paulo Ricardo Bittencourt Guimarães**, pelo auxílio na análise estatística dos dados deste trabalho.

“Tudo tem a sua hora, cada empreendimento tem o seu tempo debaixo do céu: tempo prá nascer, tempo prá morrer, tempo prá plantar tempo prá colher.” (Eclesiastes, 3: 1-2)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE GRÁFICOS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 ALTERAÇÕES DAS FUNÇÕES IMUNOLÓGICAS HUMORAIS E MEDIADAS POR CÉLULA	4
2.2 QUIMIOTAXIA	4
2.3 ADERÊNCIA.....	7
2.4 FAGOCITOSE.....	7
2.5 ASPECTOS DO METABOLISMO DA GLICOSE NOS LEUCÓCITOS.....	9
2.6 ATIVIDADE BACTERICIDA	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	14
3.2 ANIMAIS UTILIZADOS	14
3.3 INDUÇÃO DO <i>DIABETES MELLITUS</i>	15
3.4 DOSAGEM DE GLICEMIA	15
3.5 TERAPIA COM INSULINA.....	15
3.6 TESTE DO NITROBLUE TETRAZOLIUM E LEUCOGRAMA.....	16
3.7 METODOLOGIA ESTATÍSTICA	17
4 RESULTADOS	18
4.1 PESO INICIAL DOS RATOS	18
4.2 AVALIAÇÃO DO PESO NO GRUPO DIABÉTICO	18
4.3 AVALIAÇÃO DO PESO NO GRUPO DIABÉTICO TRATADO	19
4.4 TAXA DE GLICEMIA	19
4.5 EVOLUÇÃO DA GLICEMIA DURANTE O TRATAMENTO COM INSULINA.....	20
4.6 DOSES DE INSULINA ADMINISTRADA NO GRUPO DIABÉTICO TRATADO.....	21
4.7 TESTE DO NITROBLUE TETRAZOLIUM.....	22
4.8 AVALIAÇÃO DO LEUCOGRAMA	24
5 DISCUSSÃO	25
5.1 FUNÇÃO FAGOCITÁRIA	25
5.2 GRUPOS DE ANIMAIS.....	26
5.3 INDUÇÃO DO <i>DIABETES MELLITUS</i>	27
5.4 TESTE DO NITROBLUE TETRAZOLIUM NOS FAGÓCITOS.....	27
5.5 AVALIAÇÃO DO LEUCOGRAMA.....	30
6 CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS	32
APÊNDICES	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	PESO MÉDIO INICIAL DOS GRUPOS ESTUDADOS.....	18
Tabela 2	PESO INICIAL E PESO NA EUTANÁSIA (g)	18
Tabela 3	AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO DO PESO (g) DURANTE A TERAPIA COM INSULINA NO GRUPO DIABÉTICO TRATADO.....	19
Tabela 4	GLICEMIA NOS GRUPOS ESTUDADOS	20
Tabela 5	GLICEMIA OBSERVADA DURANTE O PERÍODO DE INSULINIZAÇÃO.....	21
Tabela 6	VARIAÇÃO DAS DOSES DE INSULINA ADMINISTRADAS DURANTE O PERÍODO DE ACOMPANHAMENTO AO GRUPO DIABÉTICO TRATADO	21
Tabela 7	DEMONSTRATIVO DA AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO EM SANGUE PERIFÉRICO E LÍQUIDO DA CAVIDADE PERITONEAL ATRAVÉS DO TESTE DO NITROBLUE TETRAZOLIUM.....	22
Tabela 8	COMPARAÇÃO DO LEUCOGRAMA ENTRE OS GRUPOS CONTROLE, DIABÉTICO E DIABÉTICO TRATADO.....	24

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	GRÁFICO COMPARATIVO DAS DOSES DE INSULINA ADMINISTRADAS AO GRUPO DIABÉTICO TRATADO	22
Gráfico 2	COMPARAÇÃO DOS GRUPOS ESTUDADOS EM RELAÇÃO AO TESTE DO NITROBLUE TETRAZOLIUM	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

O_2^-	ÂNION SUPERÓXIDO
1O_2	OXIGÊNIO SINGLETE
C3	COMPLEMENTO 3
CD	GRUPO DE DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS, CLUSTER OF DIFFERENTIATION
DG6F	GLICOSE - 6 - FOSFATO DESIDROGENASE
DM	DIABETES MELLITUS
DM1	DIABETES MELLITUS TIPO 1
EM	VIA EMBDEN MEYERHOF
FAM	FATOR ATIVADOR DE MACRÓFAGOS
Fc	FRAÇÃO CRISTALIZADA DA IMUNOGLOBULINA
FIM	FATOR INIBIDOR DE MACRÓFAGOS
GLUT	TRANSPORTADOR DE GLICOSE
H+	ÍON HIDROGÊNIO
H_2O_2	PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
HOCIO	HIPOCLORITO DE CLORO OU SUPERÓXIDO
IFN γ	INTERFERON GAMA
IP	INTRAPERITONEAL
LINFÓCITO T	LINFÓCITO TIMODEPENDENTE
MHC	COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE
NADH	DINUCLEOTÍDEO
NADPH	DINUCLEOTÍDEO DE NICOTINAMIDA ADENINA
NBT	TESTE DO NITROBLUE TETRAZOLIUM
OH	RADICAL HIDROXILA
PBS	SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO
PMN	POLIMORFONUCLEARES
STZ	ESTREPTOZOTOCINA

RESUMO

Este estudo teve como objetivo analisar o metabolismo oxidativo dos leucócitos em ratos Wistar com *diabetes mellitus* (DM) induzido por estreptozotocina (STZ), antes e após controle da glicemia com insulina humana. Para o estudo do metabolismo oxidativo utilizou-se teste com o corante nitroblue tetrazolium (NBT). Esse teste reflete a produção de superóxido na explosão respiratória depois da fagocitose. Para a indução do DM foi utilizada STZ 90 mg/kg, via intraperitoneal. Consideraram-se DM os ratos que apresentaram dosagem de glicemia maior ou igual a 200 mg/dl, sem restrição dietética, 72 horas após a indução. O grupo diabético tratado recebeu insulina NPH humana, após diagnóstico de DM, na dose de 10 a 20 U/kg/dia, por quatro dias. Quantificando o número de células redutoras NBT, o grupo diabético reduziu o NBT em $20,45 \pm 7,07\%$, enquanto o grupo controle o reduziu em $36,9 \pm 15,55\%$ ($p < 0,044$). O grupo diabético tratado reduziu o NBT em $66,8 \pm 11,14\%$ ($p < 0,002$) quando comparado ao grupo controle, e teve $p < 0,00013$ quando comparado ao grupo diabético. Analisando o número de células redutoras de NBT em líquido de cavidade peritoneal, o grupo diabético reduziu o NBT em $15,05 \pm 5,64\%$, enquanto o grupo controle o reduziu em $29,95 \pm 14,22\%$ ($p < 0,044$). O grupo diabético tratado reduziu o NBT em líquido peritoneal em $38,72 \pm 16,61\%$ ($p < 0,30$) quando comparado ao grupo controle, e teve $p < 0,002$ quando comparado ao grupo diabético. Diante desses resultados, pode-se sugerir que a terapia com insulina melhora os níveis de produção de radicais livres intrafagocíticos. Os radicais livres intrafagocíticos produzidos através desse metabolismo têm importante papel na efetiva destruição de microrganismos pelos fagócitos.

Palavras chaves: Estreptozotocina, diabetes mellitus, nitroblue tetrazolium, metabolismo oxidativo.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the oxidative metabolism of leukocytes in Wistar rats with streptozotocin (STZ) induced Diabetes mellitus (DM), before and after glycemic control with insulin. The nitroblue tetrazolium (NBT) assay was employed to study the oxidative metabolism efficiency. This assay evidences superoxide production in the respiratory burst following phagocytosis. Intraperitoneal STZ at 90/mg/kg was used to induce DM. Rats with no dietary restriction and with glycemia equal to or above 200 mg/dl, 72 hours after induction, were considered as having DM. After having DM diagnosed, the treated group received NPH insulin at 10 to 20 U/kg per day, for 4 days. When the number of NBT-reducing cells was quantified, it was found that the diabetic group reduced NBT by $20.45 \pm 7.07\%$, while the control group reduced it by $36.9 \pm 15.55\%$ ($p < 0.044$). The treated diabetic group reduced NBT by $66.8 \pm 11.14\%$ ($p < 0.002$) in contrast to the control group, and $p < 0.00013$ when compared to the diabetes group. Analyzing the NBT-reducing cells in the peritoneal fluid, the diabetic group reduced NBT by $15.05 \pm 5.64\%$, while the control group reduced it by $29.95 \pm 14.22\%$ ($p < 0.044$). The treated diabetic group reduced NBT in the peritoneal fluid by $38.72 \pm 16.61\%$ ($p < 0.30$) in contrast to the control group, and $p < 0.002$ when compared to the diabetic group. In the face of those results, it may be suggested that insulin therapy improves intraphagocytic free radical production. The intraphagocytic free radicals produced by this metabolism play a key role in the effective destruction of microorganisms by phagocytes.

Keywords: Streptozotocin, diabetes mellitus, nitroblue tetrazolium, oxidative metabolism.

1 INTRODUÇÃO

A infecção está entre as complicações mais graves para o diabético e é reconhecida como causa significativa de morbimortalidade nessa população de pacientes (SMITHERMAN e PEACOCK, 1995).

Antes do advento da insulina, 15-20% de todas as mortes por *diabetes mellitus* (DM) tinham relação com infecção (DAVID, 1975). A antibioticoterapia reduziu esse índice para 1,5%. Entretanto, apesar dessa diminuição significativa, a infecção ainda determina importante morbidade (SMITHERMAN e PEACOCK, 1995).

Um conceito clínico de longa data é de que a infecção tende a ser mais freqüente e grave nos pacientes diabéticos (RAYFIELD; KLUSCH; GILBERT; KOVACS; SMITH, 1978; SMITHERMAN e PEACOCK, 1995). Contrapondo-se a essa “verdade clínica”, a revisão de WHEAT constatou em 1980, que apenas a bacteriúria era prevalente em mulheres adultas diabéticas.

As primeiras observações sugeriam que pacientes com diabetes controlado apresentavam a mesma suscetibilidade a infecção dos não-diabéticos. Entretanto havia maior freqüência de infecção nos pacientes com diabetes não-controlado durante a cetoacidose (SMITHERMAN e PEACOCK, 1995). Contudo, com KENTON citado por SMITHERMAN e PEACOCK em 1995, surgiu o conceito de que a própria hiperglicemia pode alterar certas etapas chaves na defesa humoral do hospedeiro e até mesmo aumentar a virulência de alguns microrganismos.

Níveis de glicemia entre 199 mg/dl e 270 mg/dl têm sido relacionados com piora da função fagocitária, *in vitro* e nas triagens clínicas (MCMAHON e BISTRAN, 1995).

RAYFIELD; AULT e KEUSCH em 1982, observaram em pacientes diabéticos assintomáticos, correlação entre a prevalência de infecção e glicemia elevada. Foram documentadas 282 infecções em 114 pacientes, com o percentual de

infecção crescendo de maneira linear direta, de acordo com a glicemia. A incidência de infecção foi duas vezes mais alta quando os níveis de glicemia ficaram entre 216 mg/dl e 291 mg/dl (30% *versus* 60% de prevalência).

Inúmeras variáveis podem contribuir para tornar o diabético não-controlado vulnerável a infecção, incluindo-se a desidratação secundária a diurese osmótica, o estado nutricional comprometido e as complicações de longo prazo próprias da doença, tais como insuficiência vascular e neuropatias. Além disso, a hiperglicemia e a cetoacidose diabética podem por si só produzir alterações no soro e em tecidos, favorecendo o crescimento e a replicação de algumas bactérias e fungos (ESMANN, 1962; ARTIS, FOUNTAIN e DELCHER, 1982).

Apesar de inúmeras evidências apontarem para aumento na frequência de infecção em pacientes diabéticos, anormalidades dos mecanismos de defesa não têm sido convincentemente demonstradas. Há hipóteses de que alguns mecanismos de defesa do hospedeiro em vigência de infecção apresentam funcionabilidade diminuída em pacientes diabéticos. Fatores como fagocitose (BAGDADE; STEWART e WALTERS, 1978), opsonização sérica e imunidade celular imediata (RAYFIELD; KLUSCH; GILBERT; KOVACS e SMITH, 1978), quimiotaxia dos neutrófilos (HIGGINS; LIU; REMOLD e DAVID, 1980), aderência ao endotélio vascular (PIRES e SATO, 1994) e morte intracelular, estariam alterados no diabético.

Poucos estudos têm examinado mais que um parâmetro de defesa nesses pacientes. As defesas do hospedeiro são sobrepostas, e o achado laboratorial de alteração imunológica não significa obrigatoriamente suscetibilidade clínica.

Entretanto, a combinação de defeitos no paciente com diabetes não-controlado pode aumentar não só a possibilidade de ele adquirir infecções, como também o grau de severidade da doença. A relação comensal das bactérias de baixa virulência só é mantida se a função do neutrófilo for normal. Análises dos defeitos das funções dos neutrófilos têm mostrado que a atividade dos fagócitos na defesa do

hospedeiro não pode ser restituída por anticorpos, complemento, linfócitos ou outros fatores, e que o metabolismo fagocítico de oxigênio é essencial para a morte da maioria das bactérias e fungos (JOHNSTON, 1982).

Por outro lado, a insulina tem efeito promotor do metabolismo oxidativo das células, melhorando a capacidade fagocítica dos macrófagos, bem como a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e aumentando o metabolismo de glicose (JOHNSTON, 1982).

Assim, considerando as controvérsias na literatura consultada sobre *diabetes mellitus* e os fagócitos, objetivou-se no presente estudo analisar comparativamente o metabolismo oxidativo dos fagócitos no sangue e no líquido de cavidade peritoneal em ratos Wistar normais, ratos diabéticos com glicemias acima de 200mg/dl induzidos por estreptozotocina e em ratos diabéticos tratados com insulina humana através do uso do corante nitroblue tetrazolium.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ALTERAÇÕES DAS FUNÇÕES IMUNOLÓGICAS HUMORAIS E MEDIADAS POR CÉLULA

Estudos mostram que no *Diabetes Mellitus* existem anormalidades na função imune humoral e mediadas por célula (ESMANN, 1968; TAN, ANDERSON, WATANAKUNAKORN e PHAIR, 1975; PETERSON, AMBE, VALDES e ARQUILLA, 1981; ARTIS, FOUNTAIN e DELCHER, 1982; DZIATKOWIAK, KOWALSKA e DENYS, 1982; COOPAN, 1985; DRACHMAN, ROOT e WOOD, 1986; HOSTETTER, 1990).

LUDWIG, EIBI e SCHERNTHANER, em 1976, encontraram em pacientes diabéticos deficiência na circulação de anticorpos contra certos produtos bacterianos, após imunização.

MAHMOUD e RODMAN, citados por LUDWIG, EIBI e SCHERNTHANER em 1976, observaram alteração da resposta imune celular em diabéticos, como diminuição da hipersensibilidade retardada — medida por sensibilidade de contato, testes cutâneos a antígenos específicos, ensaios de transformação de linfócitos e intradermorreação.

PETERSON, AMBE, VALDES e ARQUILLA, em 1981, estudando ratos sob ação de aloxano demonstraram redução no número de células formadoras de colônia durante a resposta primária e secundária em animais imunizados com antígenos T dependentes e T independentes .

2.2 QUIMIOTAXIA

PERILLIE, NOLAN e FINCH, em 1962, estudaram a resposta exsudativa local a inflamação na pele de pacientes diabéticos (10 pacientes sob controle da

doença, 6 com cetoacidose e 4 com acidose urêmica), usando a técnica da janela cutânea de Rebeck. Esse procedimento avalia a morfologia e a mobilidade das células da reação inflamatória.

Não houve resposta local precoce dos neutrófilos nas primeiras três horas em pacientes com acidose, bem como em diabéticos ou urêmicos, em comparação aos grupos com DM controlado e com não-diabéticos. Entretanto, com a melhora da acidose, a resposta celular local era marcadamente aumentada em ambos os grupos. Os autores concluíram que a presença de acidose no hospedeiro reduz a resistência contra a invasão e a disseminação bacteriana.

Investigações conduzidas por BRAYTON, STOKES, SCHWARTZ e LOURIA, em 1970, usando a mesma técnica, confirmaram os trabalhos anteriores do grupo de PERILLIE, mas também demonstraram defeito na mobilização leucocitária em 18 diabéticos não-acidóticos, não conseguindo documentar a mobilização leucocitária defeituosa em pacientes urêmicos.

Usando método *in vitro* para avaliar quimiotaxia, MOWAT e BAUM, em 1971, demonstraram defeitos na quimiotaxia em 31 pacientes diabéticos. O índice quimiotático foi obtido por comparação do número original de PMNs com o número de PMNs que haviam cruzado completamente a barreira filtro, em resposta a quimiotáticos. A diminuição do índice quimiotático foi encontrada em PMNs de todos os pacientes diabéticos, sem nenhuma correlação entre o índice quimiotático e o tipo de terapia ou nível plasmático de glicose em jejum. A incubação de PMNs do grupo controle com glicose entre 100 e 900 mg/dl não alterou o índice quimiotático dos PMNs. Entretanto a incubação de PMNs do grupo diabético com insulina na concentração de 10 a 100 μ U/ml melhorou o índice quimiotático.

Contraopondo-se a esse estudo, BAGDADE, ROOT e BULGER, em 1974, utilizando técnica similar, porém com células lavadas, não demonstraram diferença no

índice quimiotático dos PMNs do grupo controle em relação a pacientes diabéticos com vários graus de glicemia ou duração da doença.

MOLENAAR, PALUMBO, WILSON e RITTS, em 1976, estudando quimiotaxia em pacientes diabéticos em relação a parentes de primeiro grau, notaram piora da quimiotaxia leucocitária em 36 diabéticos e em 23 irmãos não-diabéticos, quando comparados com 26 pais não-diabéticos e a 108 pacientes do grupo controle.

PETERSON, AMBE, VALDES e ARQUILLA, em 1981, avaliando a fagocitose *in vitro* e a quimiotaxia *in vivo* através da resposta inflamatória peritoneal em modelo animal diabético induzido por aloxano, não verificaram diferença na quimiotaxia e fagocitose dos macrófagos em relação ao grupo controle. Com o mesmo modelo, em outro estudo, pelos mesmos autores, foi observado defeito na formação de anticorpos e imunidade mediada por célula.

JONES, SEIFERT e DIXIT, 1982, observaram que o Fator Inibitório de Macrófagos (FIM) tem pouca atividade inibitória na migração de macrófagos de ratos DM. Embora não tenha sido esclarecido se macrófagos de diabéticos respondem igualmente a todos os quimioatrativos quando comparados ao grupo controle sem diabetes, diminuição da sensibilidade a fatores de migração pode excluir os fagócitos de acumulação no sítio de lesão, com resultante aumento da proliferação bacteriana e infecção. O tratamento com insulina por 10 a 15 dias restaurou a sensibilidade dos macrófagos ao FIM.

Alguns autores consideram que linfócitos de pacientes diabéticos não respondem a mitógenos como fito-hemaglutinina e concanavalina A (TAN, ANDERSON, WATANAKUNAKORN e PHAIR, 1975; SMITHERMAN e PEACOCK, 1995).

2.5 ADERÊNCIA

Comparativamente, poucos estudos têm especificamente verificado a questão da aderência dos PMNs de pacientes diabéticos.

BAGDADE, ROOT e BULGER, em 1974, verificaram aumento de aderência dos PMNs em coluna de fibra de náilon após melhora da glicemia. A aderência aumentou de 53% para 74% em relação aos valores do grupo controle.

PETERSON, JONES e KOENIG, em 1977 observaram que células de 6 entre 7 pacientes com diabetes não-controlado tinham aderência prejudicada em coluna de vidro. A aderência melhorou 1 a 2 meses mais tarde, após controle da glicemia, porém o estudo não era controlado.

Posteriormente em 1980, BAGDADE e WALTERS demonstraram relação direta da aderência com o grau de controle da glicemia.

ANDERSEN, GOLDSMITH e SPAGNUOLO em 1980, estudaram a aderência dos PMNs de maneira mais fisiológica, utilizando endotélio da aorta bovina. Nesse trabalho, 60% dos PMNs de diabéticos, comparados aos do grupo controle, apresentavam função diminuída. Não havia déficit de agregação entre PMNs, não sendo observado defeito quantitativo na fibronectina, embora defeito qualitativo não possa ser excluído.

2.4 FAGOCITOSE

BYBEE e ROGERS estudando em 1964, células de pacientes diabéticos com e sem acidose *in vitro*, demonstraram que a acidose diminuiu a capacidade fagocitária, deficiência essa que desapareceu após correção da acidose. Fagocitose era considerada normal quando ao menos um *Staphylococcus aureus* era ingerido. Não houve quantificação do número de organismos capturados por célula.

BAGDADE, ROOT e BULGER, em 1974, examinaram a fagocitose de *Streptococcus pneumoniae* tipo 25 por leucócitos de pacientes não-acidóticos com diabetes não-controlado. Diminuição da fagocitose foi observada com glicemia de jejum acima de 250 mg/dl. Após controle da glicemia, a atividade fagocitária se normalizou, mas não como nos grupos controles não-diabéticos. Contudo essa técnica empregada não dissocia o defeito fagocitário de morte intracelular da bactéria. Em contraste com os achados de BYBEE e ROGERS, a atividade dos PMNs controles diminuía quando as células eram incubadas com soro de pacientes diabéticos, enquanto a atividade de PMNs de diabéticos aumentava quando incubados com soro normal. Esse fato sugeriu defeito de opsonização nesses pacientes.

TAN, ANDERSON, WATANAKUNAKORN e PHAIR, em 1975, demonstraram defeito de fagocitose do *Staphylococcus aureus*, utilizando lisostafin para diferencia-la da morte intracelular. A presença desse defeito, entretanto, não se correlacionou com controle da glicemia ou história de infecção recorrente.

NOLAN e BEATY, em 1978, observaram que PMNs de pacientes com diabetes não-controlado ingeriam menor quantidade de inóculo de *Staphylococcus aureus* do que PMNs controles durante 20 minutos, intervalo em que ocorre a maioria dos processos de fagocitose sob condições fisiológicas. Essa diferença desapareceu após 60 minutos.

RAYFIELD, AULT e KEUSCH, em 1982, sustentam a possibilidade de defeito de opsonização dos PMNs no diabetes. PMNs normais, quando incubados com soro de pacientes diabéticos, têm diminuída a capacidade de captação de *Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus* marcados.

DRACHMAN, ROOT e WOOD, em 1986, demonstraram depressão fagocitária no exsudato alveolar em ratos albinos diabéticos não-acidóticos, inoculados intrabrônquio com *Streptococcus pneumoniae*, sugerindo no estudo *in vitro* que o

defeito primário no animal diabético estava mais relacionado com alta concentração de glicose do que com algum defeito intrínseco dos PMNs.

2.5 ASPECTOS DO METABOLISMO DA GLICOSE NOS LEUCÓCITOS

Após a fagocitose ocorre uma seqüência complexa de acontecimentos morfológicos e bioquímicos com grande gasto metabólico de energia-ATP.

Os principais eventos bioquímicos da fagocitose incluem aumento no metabolismo fosfolipídico, estímulo marcante do desvio hexose-monofosfato e geração de peróxido de hidrogênio, que culmina com a morte intracelular do patógeno (DOUGLAS, 1970; ROSA, SAFI, CURY e CRI, 1992).

Atualmente, sabe-se que o transporte de glicose dentro de tecidos não-epiteliais, incluindo células circulantes, é do tipo difusão facilitada. Captação de glicose facilitada é mediada por transportadores de glicose (GLUT), que diferem em relação aos tecidos estudados. A insulina aumenta o transporte de glicose através da translocação dos transportadores de glicose dos sítios de estoque microssomal para a membrana plasmática. A resposta insulínica na população de monócitos é mediada pelo GLUT1 e GLUT-3 (FELDMAN, 1988; FOSTER e MCGARRY, 1996).

Uma vez dentro da célula, a glicose é convertida rapidamente em glicose-6-fosfato, para manter o gradiente de concentração de glicose para difusão facilitada. A glicose-6-fosfato pode entrar em numerosas vias metabólicas para futura degradação.

ESMANN em 1964, demonstrou que *in vitro*, o acúmulo de glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato no diabético induz menor atividade da fosfofrutoquinase, com marcada redução na síntese de glicogênio.

ESMANN em 1968 e DRACHMAN, ROOT e WOOD em 1986, verificaram que os leucócitos de diabéticos apresentam taxa diminuída de glicólise.

O catabolismo aeróbico de diferentes hexoses nos PMNs ocorre principalmente pela via Embden-Meyerhof (EM), principal via da glicólise, onde a glicose é metabolizada em duas moléculas de piruvato. A glicólise é a principal via fornecedora de energia para internalização de partículas (SBARRA e KARNOVSKY, 1959).

Entretanto, menor quantidade de glicose (10-15%) é convertida em glicogênio pela via Leloir (DZIATKOWIAK, KOWALSKA e DENYS, 1982). A via EM é irreversível para leucócitos devido à ausência de frutose-1,6-difosfato (ESMANN, 1968). A descarboxilação de piruvato pela acetilcoenzima A é responsável pela produção de um terço do CO₂ em leucócitos; o restante é formado na via oxidativa do ciclo pentose.

A contribuição do ciclo de Krebs para a formação de CO₂ é baixa. O cálculo do ciclo da pentose mostrou que uma pequena quantidade (0,1-0,5%) da glicose é metabolizada por essa rota, mas a fagocitose aumenta essa fração em duas a três vezes (ESMANN, 1968; FELDMAN, 1988).

ESMANN em 1968 demonstrou que a via glicolítica ciclo pentose e Krebs, não difere em relação a células normais, mas leucócitos de pacientes com DM respondem de modo diferente em relação a células normais com respeito à incorporação de radioatividade. O autor verificou que houve diminuição da síntese de glicogênio em leucócitos diabéticos *in vivo* e que com o uso da insulina ocorreu melhora da atividade de glicogênio transferase em 77%, o que não se observou *in vitro*, excluindo defeito no mecanismo de transporte de glicose. ESMANN sugere que a resposta observada à insulina, *in vivo*, é consistente com a regulação do nível enzimático.

DZIATKOWIAK, KOWALSKA e DENYS, em 1982 em estudos experimentais com leucócitos de pacientes DM, comprovaram deficiência na captação de glicose, na produção de ácido láctico e na síntese de glicogênio.

2.6 ATIVIDADE BACTERICIDA

A atividade microbica dos PMNs é o resultado final de complexos mecanismos, uns dependentes de oxigênio e outros independentes. Os mecanismos independentes de oxigênio são realizados por enzimas microbicas, como a lisozima e as catepsinas (PEAKMAN e VERGANI, 1980).

Há dois caminhos dependentes de oxigênio: a explosão respiratória e o sistema peróxido de hidrogênio-mieloperoxidase halogeneto. O mais conhecido é a explosão respiratória, assim chamada devido ao uso do oxigênio. Os principais metabólitos tóxicos já identificados são: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2) e radical hidroxila (OH) (PEAKMAN e VERGANI, 1980).

O grande aumento no consumo de oxigênio por neutrófilos durante a fagocitose foi descrito inicialmente por Baldrige e Gerard em 1933, citado por PEAKMAN e VERGANI, 1980. A demonstração de que esse fenômeno não é inibido pelo cianeto mostrou que é distinto da respiração mitocondrial. Esse fenômeno, conhecido como explosão respiratória, tem o oxigênio como produto inicial da redução de um elétron do O_2 , sendo o NADPH o doador específico de elétrons.

O complexo enzimático que catalisa a redução do O_2 para O_2^- é chamado NADPH oxidase. A fonte contínua de NADPH para os fagócitos é a via glicose-6-fosfato. Se a glicose não for incorporada na célula, não haverá disponibilidade de NADPH, o que em consequência, levará à não formação dos radicais livres.

A superóxido dismutase constitui o principal mecanismo fisiológico de remoção do O_2^- , reduzindo-o para H_2O_2 . O H_2O_2 em altas concentrações danifica o

DNA, rompe membranas e libera cálcio, ativando enzimas proteolíticas intracelulares cálcio-dependentes. Além disso, o H_2O_2 é uma fonte potencial de OH^- .

O H_2O_2 é também o substrato para a mieloperoxidase gerar produtos oxidativos como o HOCl e 1O_2 .

No sistema peróxido de hidrogênio-mieloperoxidase-halogeneto, o H_2O_2 gerado pela explosão respiratória, a mieloperoxidase dos grânulos primários e o halogeneto, tais qual o Cl^- , combinam-se para formar cloreto e íons hidroxil, ambos tóxicos para os microrganismos (PEAKMAN e VERGANI, 1980).

REPINE, CLAUSON e GOETZ, em 1980, utilizando células incubadas com colônias contadas de *Staphylococcus aureus*, demonstraram que os PMNs de pacientes com diabetes não-controlado, apresentaram menor atividade bactericida, especialmente quando eram usadas altas taxas de bactérias por células brancas. Entretanto o funcionamento dos PMNs de pacientes com diabetes controlado era similar ao do grupo controle. A função bactericida dos PMNs de pacientes com diabetes não-controlado era menor do que os de todos os grupos.

DZIATKOWIAK, KOWALSKA, DENYS, em 1982, comparando o número de *Staphylococcus aureus* vivos no granulócito com o número de bactérias fagocitadas, para calcular a proporção de organismos mortos, demonstraram diminuição da morte intracelular de pacientes diabéticos.

RAYFIELD, AULT e KEUSCH, em 1982, demonstraram que o controle da glicemia em diabéticos e não-diabéticos é importante para aumentar a função leucocitária. Esses relatos suportam o ponto de vista de NIELSON e HINDSON em 1989, aonde os PMNs de pacientes saudáveis apresentam redução significativa na explosão respiratória depois da exposição *in vitro*, por 30 minutos, a concentrações de glicose acima de 186 mg/dl.

NAGHIBI, SMITH e BALTCH, em 1987, observaram diminuição da atividade bactericida dos PMNs contra *Pseudomonas aeruginosa*, mas não estudaram nenhum grupo infectado.

MCMAHON e BISTRAN, em 1995 avaliaram vias de ativação distintas de NADPH-oxidase neutrofílica em humanos. O mecanismo pelo qual ocorre a diminuição de geração do superóxido sugere a interferência da glicose na ativação da fosfolipase D dos neutrófilos. Concentrações de glicose entre 270 mg/dl e 900 mg/dl reduzem severamente a hidrólise de fosfatidilcolina e a produção de ácido fosfatídico, refletindo inibição da fosfolipase D. Entre as várias possibilidades oferecidas pelos autores, a mais intrigante é o envolvimento das quinases na regulação de fosfolipases. A glicose é ativadora da proteína C quinase por estimular a produção de diacilglicerol. A proteína C quinase, por fosforilação, poderia levar ao não-acoplamento da proteína G da fosfolipase D e desse modo diminuir a ativação de neutrófilos e macrófagos.

ROSA, SAFI, CURY e CRI, em 1996, avaliando a migração celular e o efeito da insulina sobre o metabolismo e função do macrófago através da resposta ao BCG, tioglicano e a produção de H_2O_2 através de condições lineares de captação de 2-deoxiglicose, demonstraram que a captação de hexose basal é significativamente menor em células mononucleares circulantes de DM1 do que em controles normais, fato em parte explicado pela redução na atividade intrínseca dos transportadores. A resposta à insulina na população monocitária era mediada pelo transportador GLUT-1. A insulina não afetou a migração celular em resposta aos fatores de estímulo, mas melhorou a capacidade fagocítica e a produção de H_2O_2 , aumentando o metabolismo de glicose e reduzindo o da glutaminase. .

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.

Adotou-se como indicador do metabolismo oxidativo em fagócitos a redução do corante nitroblue tetrazolium (NBT) em amostras de sangue e líquido de cavidade peritoneal de animais normais, diabéticos e diabéticos tratados com insulina.

Foram adotadas as Normas para Apresentação de Documentos Científicos da Universidade Federal do Paraná (2000), Nomina Anatômica Veterinária (1983), bem como os Princípios Éticos na Experimentação Animal, propostos pelo Colégio brasileiro de Experimentação Animal, propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1985).

3.2 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados 30 ratos albinos machos (*Rattus norvegicus*, Rodentia, Mammalia, Wistar) provenientes do biotério da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, com peso variando entre 250 e 312 g. Os animais foram alojados em grupos de 5 em caixas de polipropileno, em temperatura controlada entre 19 e 22°C, umidade relativa do ar de 50 a 60%, recebendo água e ração específica para a espécie (Nuvilab[®] CR1, Nuvital), *ad libitum*, durante 15 dias, para adaptação às condições laboratoriais. Ácido picrico foi utilizado na identificação dos animais.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupo controle, grupo diabético e grupo diabético tratado. Cada grupo foi constituído de dez animais.

3.3 INDUÇÃO DO *DIABETES MELLITUS*

Utilizou-se estreptozotocina (Zanozar-UPJOHN[®]) na dose de 90 mg/kg (MOLENAAR, PALUMBO, WILSON e RITTS,1976; BONER, TRENT, HONEY e WEIR,1981; JOHNSTON, 1982), inoculada na cavidade peritoneal no quadrante inferior direito, com seringa de 1 ml e agulha 13x4,5 mm, descartáveis, recebendo água e ração especial por 7 dias. O grupo controle foi inoculado com solução salina isotônica intraperitoneal.

3.4 DOSAGEM DE GLICEMIA

Após 72 horas da indução do diabetes, os ratos eram anestesiados e pesados em balança eletrônica Helmac[®]. Depois era coletada amostra de sangue por punção caudal.

Procedeu-se à dosagem de glicemia em monitor de glicemia capilar Advantage (Boehringer Mannheim[®]) com tiras específicas. Previamente ao uso, o aparelho era calibrado de acordo com solução padronizada de glicose. Considerou-se diabético o rato com nível glicêmico ≥ 200 mg/dl, sem restrição dietética segundo a padronização proposta por OLIVEIRA, 1997.

3.5 TERAPIA COM INSULINA

Setenta e duas horas após a indução do diabetes, no grupo diabético tratado era iniciada terapia com insulina NPH humana 10 a 20 U/kg/dia, por 72 horas (OZTURK, AYDIN, OZCELIKAY, ALTAN e YILDIZO, 1997). A glicemia e o peso eram avaliados no primeiro, segundo, terceiro e quarto dia da terapia com insulina. A dose de insulina NPH era adequada diariamente ao peso do animal. No dia da eutanásia (quarto dia da terapia com insulina), os animais recebiam a dose de insulina NPH humana após exame da glicemia capilar, e 12 horas depois eram eutanasiados,

verificando-se então peso, leucograma, glicemia e metabolismo oxidativo pelo teste do NBT em sangue periférico e líquido da cavidade peritoneal.

3.6 TESTE DO NITROBLUE TETRAZOLIUM E LEUCOGRAMA

Para a execução do teste do nitroblue tetrazolium cumpriram-se as etapas descritas a seguir.

Cada animal era anestesiado por inalação de éter sulfúrico e submetido a punção intracardíaca realizada com seringa heparinizada. O material era colocado em tubo de propileno Corning[®] 25319-15, para posterior realização do teste do NBT e leucograma num prazo máximo de 30 minutos. A eutanásia ocorria após a punção cardíaca.

Posteriormente o animal era submetido a laparotomia com incisão da pele e tecido celular subcutâneo com rebatimento de retalhos laterais. Punção da cavidade peritoneal para infusão de 10 ml de solução tampão fosfato pH 7,2 (PBS) (LIMA e SILVA,1970). A fâscia peritoneal era aberta para retirada de amostra do líquido da cavidade peritoneal, o qual era colocado também em tubo de polipropileno para posterior realização do teste do NBT.

As amostras de sangue e líquido da cavidade peritoneal, tanto dos animais diabéticos como dos animais controles, foram processadas simultaneamente. De cada amostra eram recolhidos, com pipeta automática Gilson[®], 50 µl das amostras de sangue e líquido de cavidade peritoneal e incubados com 50 µl de solução de lipopolissacarídeo (Sigma[®] 2630) durante 15 minutos em temperatura ambiente e 15 minutos a 37°C. Após esse período, eram adicionados 50 µl de NBT previamente diluído em 1 ml de PBS e a mistura novamente incubada por 15 minutos a 37°C.

Após adição de 50 µl de solução de Turck em 20 µl da suspensão celular incubada com NBT, eram preparadas lâminas com essa solução e feita a contagem em microscópio sob magnificação de 40x. Por microscopia óptica era visualizada a

formazana no citoplasma dos fagócitos e quantificada num total de 100 fagócitos por amostra. O resultado era expresso em porcentagem de células portadoras de formazana citoplasmática.

O número e o aspecto morfológico dos neutrófilos e monócitos periféricos era avaliado através de lâminas com esfregaço de sangue periférico.

3.7 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Avaliou-se a suposição de normalidade das variáveis peso, dose de estreptozotocina e glicemia, para posterior aplicação de testes estatísticos paramétricos. Não atendida essa suposição, aplicava-se um teste não-paramétrico.

Para comparação dos grupos controle, diabético e diabético tratado foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, complementado com o teste d.m.s. quando havia pelo menos uma diferença significativa.

No grupo diabético tratado, para comparação dos períodos de avaliação foi aplicado o teste de Friedman complementado com o teste d.m.s.

No grupo diabético, para comparação do peso inicial com o peso final foi aplicado o teste de Wilcoxon.

Quando a suposição de normalidade era atendida para aplicação de teste paramétrico (NBT sangue e líquido de cavidade peritoneal), aplicava-se a análise de variância simples (“ANOVA oneway”).

Na ilustração gráfica dos resultados foram utilizados os gráficos box-plots e Whisker-plots.

4 RESULTADOS

4.1 PESO INICIAL DOS RATOS

De acordo com o teste não-paramétrico de Kruskal Wallis ($H=0,51377$), não existiu diferença significativa entre os grupos com relação ao peso inicial dos ratos ($p=0,77$). A tabela 1 demonstra estes resultados.

TABELA 1 - PESO MÉDIO INICIAL DOS GRUPOS ESTUDADOS (em gramas)

GRUPOS	MÉDIAS	N	D.P.
Controle	279,2	10	40,85
Diabético	265,2	10	18,07
Diabético Tratado	279,3	10	47,94

N= número de animais DP= desvio padrão p=0,77

4.2 AVALIAÇÃO DO PESO NO GRUPO DIABÉTICO

Comparando o peso inicial e o peso na eutanásia no grupo diabético utilizou-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon ($T=12$), o qual não identificou diferença significativa entre o peso inicial e o peso no momento da eutanásia dos ratos do grupo diabético ($p=0,065$). A tabela 2 relaciona as médias dos pesos observados no grupo diabético.

TABELA 2 - PESO INICIAL E PESO NA EUTANÁSIA (gramas) NO GRUPO DIABÉTICO

PESO	N	MÉDIA	MÍNIMO	MÁXIMO	D.P.
Inicial	10	265,2	237,6	300	18,07
Eutanásia	10	242,39	187	331	43,09

N= número de animais; D.P.= desvio padrão; p= 0,065.

4.3 AVALIAÇÃO DO PESO NO GRUPO DIABÉTICO TRATADO

A tabela 3 explicita a variação média do peso dos animais do grupo diabético durante o período da terapia com insulina.

TABELA 3- AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO DO PESO (g) DURANTE A TERAPIA COM INSULINA NO GRUPO DIABÉTICO TRATADO

	N	MÉDIA	MÍNIMO	MÁXIMO	D.P.
Peso Dia 1 da terapia com insulina	10	261,3	203	342	46,97
Peso Dia 2 da terapia com insulina	10	260	207	344	44,81
Peso Dia 3 da terapia com insulina	10	267,9	211	385	55,10
Peso Dia 4 da terapia com insulina	10	277,3	224	357	44,00

N= número de animais; D.P.= desvio padrão

Através do teste não-paramétrico de Friedman para comparação de K tratamentos relacionados, foi encontrada diferença significativa entre os pesos durante o experimento [ANOVA Qui-quadrado (N=10, df=3)=10,86735 (p<0,01247)].

Através do teste d.m.s. observou-se diferenças significativas entre os pesos dos ratos do grupo diabético tratado no dia 4 da terapia com insulina em relação aos pesos do dia 2 e 3.

4.4 TAXA DE GLICEMIA

Considerando que essa variável não apresentava a suposição de normalidade, realizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (H=21,25), verificando-se a existência de diferenças significativas entre os grupos (p=0,00001).

Essas diferenças foram identificadas através do teste de d.m.s, verificando-se existir diferença significativa entre o grupo diabético e o grupo controle ($p < 0,005$) e entre o grupo diabético e o grupo tratado ($p < 0,001$), não havendo diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado no dia da eutanásia ($p = 0,30$). A tabela 4 resume os resultados das médias de glicemias nos grupos estudados.

TABELA 4 - GLICEMIA DOS GRUPOS ESTUDADOS (mg/dl)

GRUPOS	MÉDIAS	N	D.P.
Controle	122,5	10	23,42
Diabético	368,3	10	56,25
Diabético Tratado	100,2	10	32,90

N= número de animais

DP= desvio padrão

$p < 0,005$ controle x diabético ;

$p < 0,001$ diabético tratado no dia da eutanásia x diabético ;

$p = 0,30$ controle x diabético tratado no dia da eutanásia

4.5 EVOLUÇÃO DA GLICEMIA DURANTE O TRATAMENTO COM INSULINA NO GRUPO DIABÉTICO TRATADO.

Realizado o teste não-paramétrico de Friedman para comparação das glicemias observadas durante o período de terapia com insulina NPH humana obteve-se $p < 0,0005$. Segundo o teste d.m.s., as glicemias no momento da eutanásia (dia 4 a tarde da terapia com insulina) foram significativamente diferente das glicemias do primeiro, segundo e terceiro dia da terapia com insulina. A tabela 5 demonstra a glicemia média observada durante o período de terapia com insulina.

TABELA 5 - GLICEMIA OBSERVADA DURANTE O PERÍODO DE INSULINIZAÇÃO (mg/dl)

	N	MÉDIA	MÍNIMO	MÁXIMO	D.P.
Dia 1 da terapia com insulina	10	379,6	292	476	53,27
Dia 2 da terapia com insulina	10	414	194	532	110,43
Dia 3 da terapia com insulina	10	436,7	335	527	58,97
Dia 4 manhã da terapia com insulina	10	224,7	70	467	162,64
Dia 4 tarde ⁽¹⁾ da terapia com insulina	10	100,2	70	179	32,90

(1) Glicemia no momento da eutanásia; N= número de animais; D.P.= desvio padrão.

4.6 DOSES DE INSULINA ADMINISTRADAS AO GRUPO DIABÉTICO TRATADO

A Tabela 6 refere-se a variação das doses de insulina administradas durante o período da terapia com insulina

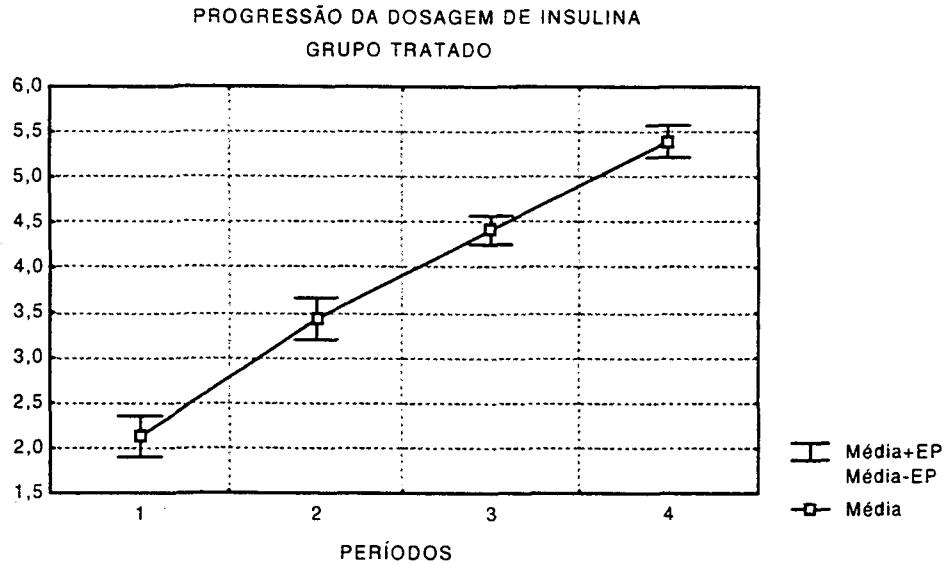
TABELA 6 - VARIAÇÃO DAS DOSES DE INSULINA ADMINISTRADAS DURANTE O PERÍODO DE TERAPIA COM INSULINA NO GRUPO DIABÉTICO TRATADO

	N	MÉDIA	MÍNIMO	MÁXIMO	D.P.
Dose do Dia 1	10	2,128	0,14	4	1,23
Dose do Dia 2	10	3,428	0,28	5	1,27
Dose do Dia 3	10	4,416	2,78	5	0,87
Dose do Dia 4	10	5,4	4	7	0,96

N= número de animais; D.P.= desvio padrão

Através do teste não-paramétrico de Friedman para comparação de K tratamentos relacionados, comprovou-se diferença significativa entre as doses utilizadas para o controle da glicemia [(ANOVA Qui-quadrado (N=10, df=3)= =26,01176) (p<0,00001)]. O teste d.m.s. revelou as diferenças significativas entre as doses utilizadas nos dias um, dois, três e quatro da terapia com insulina. O gráfico 1 demonstra as doses administradas no grupo diabético tratado.

GRÁFICO 1 - GRÁFICO COMPARATIVO DAS DOSES DE INSULINA ADMINISTRADAS AO GRUPO DIABÉTICO TRATADO



4.7 TESTE DO NITROBLUE TETRAZOLIUM

Na tabela 7 avaliou-se comparativamente fagócitos de sangue e líquido de cavidade peritoneal dos grupos controle, diabético e diabético tratados em relação ao teste do nitroblue tetrazolium.

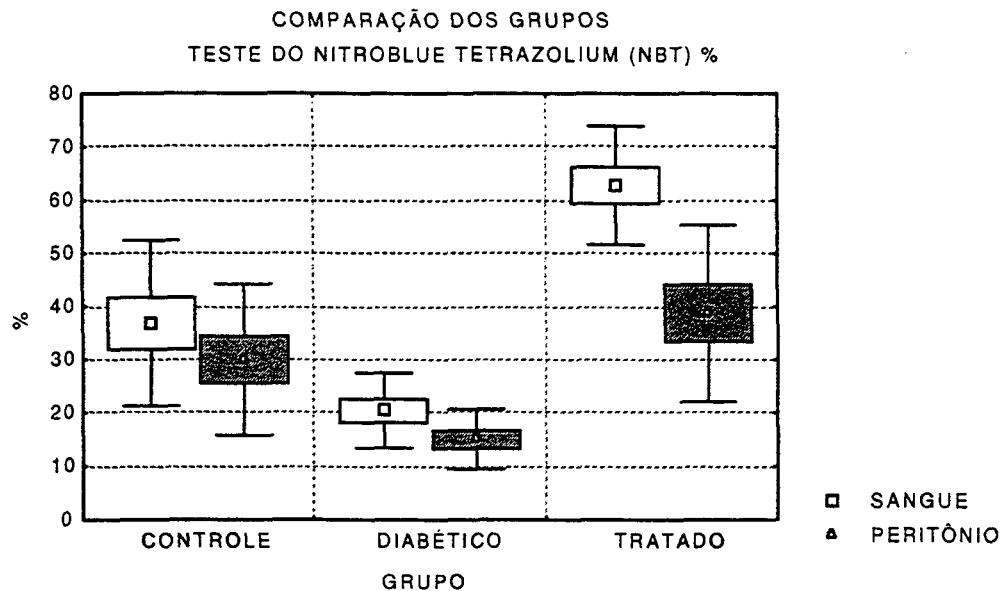
TABELA 7 - DEMONSTRATIVO DA AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO EM SANGUE E LÍQUIDO DE CAVIDADE PERITONEAL ATRAVÉS DO TESTE DO NITROBLUE TETRAZOLIUM (NBT) (%)

Grupos	SANGUE				LÍQUIDO DE CAVIDADE PERITONEAL			
	Médias	N	Mediana	DP	Médias	N	Mediana	DP
Controle	36,9	10	35	15,55	29,95	10	26,5	14,22
Diabético	20,45	10	15	7,07	15,05	10	14,0	5,64
Diabético tratado	62,8	10	70	11,14	38,72	10	34,0	16,61

Na avaliação do metabolismo oxidativo através da quantificação de células redutoras do nitroblue tetrazolium em sangue periférico, realizou-se análise de

variância simples, uma vez que a suposição de normalidade e de homogeneidade das variâncias foi atendida.. Essa análise apontou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,00001$). Realizado o teste de Tukey para identificar as diferenças significativas, constatou-se que o grupo controle diferia significativamente do grupo tratado ($p < 0,002$) e do grupo diabético ($p < 0,044$). Essa diferença significativa também foi observada quando comparou-se o grupo tratado e o grupo diabético ($p < 0,00013$). Para a variável NBT peritônio, realizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($H=12,30$), verificando-se existirem diferenças significativas entre os grupos ($p=0,0021$). As diferenças apontadas foram identificadas através do teste de d.m.s., segundo o qual o grupo diabético era diferente do grupo controle ($p < 0,04$) e do grupo tratado ($p < 0,002$); mas nenhuma diferença foi observada entre o grupo controle e o grupo tratado ($p=0,30$).

GRÁFICO 2 - COMPARAÇÃO DOS GRUPOS ESTUDADOS EM RELAÇÃO AO TESTE NITROBLUE TETRAZOLIUM



4.8 AVALIAÇÃO DO LEUCOGRAMA

Nenhuma diferença quantitativa estatisticamente significativa foi observada entre os grupos em relação à contagem de leucócitos e seu diferencial (Tabela 8).

TABELA 8 – COMPARAÇÃO DO LEUCOGRAMA ENTRE OS GRUPOS CONTROLE, DIABÉTICO E TRATADO

	CONTROLE	DIABÉTICO	DIABÉTICO TRATADO
Leucócitos totais	10,9x10 ³ /ml	9,20x10 ³ /ml	9,13x10 ³ /ml
Neutrófilos polimorfonucleares	10%	16%	14%
Eosinófilos	1%	0	1%
Monócitos	0	0	0
Linfócitos	88%	76%	81%

5 DISCUSSÃO

5.1 FUNÇÃO FAGOCITÁRIA

Diferentes ensaios laboratoriais realizados por vários investigadores têm apresentado resultados conflitantes a respeito da função fagocitária dos pacientes diabéticos. Por essa razão, após décadas de investigações, questões como a forma pela qual o diabetes culmina em defeitos imunológicos específicos e como esses defeitos poderiam predispor o organismo a infecção são, até hoje, ativamente discutidas (DOUGLAS, 1970; RUBIN, 1988; SRIVASTAVA, ANSARI, LIU, IZBAN, DAS, SZABO, BHATNAGAR, 1989 e GILLERY, MONBOISSE, MAQUART, BOREL, 1989).

A participação dos fagócitos nos mecanismos efetores do sistema imunológico é conhecida desde 1883, quando pela primeira vez Metchnikoff observou a habilidade dos leucócitos de fagocitar microrganismos. Sua teoria de que os fagócitos são os detectores de materiais estranhos e a primeira linha de defesa do organismo contra agentes infecciosos só foi reconhecida muitas décadas depois, e atualmente representa o fundamento dos principais conceitos adquiridos na área de imunologia (PIRES e SATO, 1994).

O primeiro encontro do hospedeiro com agentes infecciosos, conduz a resposta estereotipada, com mobilização de elementos fagocitários para as áreas onde os patógenos foram introduzidos, em coordenada seqüência de eventos. Essas células podem reconhecer, aderir e englobar partículas (fagocitose), descarregar o conteúdo dos grânulos citoplasmáticos para o vacúolo fagocítico (degranulação) e gerar metabolismo oxidativo. Os produtos desse metabolismo e o conteúdo granular têm papel importante na efetiva destruição de microrganismos pelos fagócitos (PIRES e SATO, 1994).

A atividade fagocítica dos macrófagos é influenciada pela ativação inicial de linfócitos, os quais então produzem e secretam vários fatores humorais (DUMONDE, WOLSTENCROFT, PANAYI, MATTHEWS, MORLEY, HOWSON, 1969 e WARD, REMOLD, DAVID, 1972), como o agente quimiotático que atrai macrófagos para o sítio de invasão do antígeno e os ativa — fator ativador de macrófagos (FAM) —, e outro que inibe — fator inibidor de macrófagos (FIM). O aumento da suscetibilidade à infecção, no diabetes, pode resultar entre outros fatores, na ativação diminuída dos leucócitos a antígenos e falta de sensibilidade dos fagócitos aos fatores humorais FAM e FIM (DOUGLAS, 1970).

Em muitos tipos de infecção os neutrófilos desempenham o papel primário como efector ou célula assassina. Entretanto na corrente sanguínea e nos espaços extravasculares os neutrófilos exercem seus efeitos antimicrobianos através de interação complexa com anticorpos, complementos e fatores quimiotáticos.

As deficiências nas funções dos neutrófilos podem ser divididas em duas categorias gerais: quantitativas e qualitativas. Nas desordens quantitativas o número total de neutrófilos que funcionam estão reduzidos abaixo do nível crítico, permitindo que a infecção se instale. Nas desordens neutrofílicas qualitativas o número total de PMNs circulantes está normal ou, algumas vezes, realmente elevado, mas as células não exercem suas funções microbicidas normais (STITES, 1970 e PIRES e SATO, 1994).

Neste estudo conseguiu-se desenvolver grupos homogêneos de animais diabéticos, sem defeitos quantitativos dos PMNs, com o uso de estreptozotocina (STZ).

5.2 GRUPOS ANIMAIS

Na literatura consultada não encontrou-se estudo comparativo entre avaliação do metabolismo oxidativo através do uso do corante NBT e ratos Wistar

normais, diabéticos induzidos por STZ e diabéticos tratados com insulina. Portanto, padronizou-se grupo controle para o estudo do teste NBT nos ratos Wistar.

5.3 INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS COM ESTREPTOZOTOCINA

O *diabetes mellitus* pode ser reproduzido em animais por cirurgia, infecção viral, administração de dietas e agentes químicos. A doença também pode ser desenvolver de forma espontânea, como ocorre nos ratos BB, NOD.

Em 1943, iniciaram-se experimentos com Aloxana e, em 1963 RAKIETEN, descreveu a estreptozotocina (MENDEZ e RAMOS, 1994). Essas drogas demonstram significantes seletividade e citotoxicidade para a célula beta, revelando-se como potentes substâncias diabetogênicas.

A estreptozotocina induz diabetes tipo 1 pela destruição de células beta por linfócitos T CD4 e CD8, via liberação de interferon gama (IFNY). Essa citocina produz dano pancreático por aumentar as classes I e II dos antígenos MHC e, conseqüentemente, a identificação das células beta por células T citotóxicas (MOSCI, VECCHIARELLI, CENCI, PULITI e BISTONI, 1993). Essa substância é derivada da cultura do *Streptomyces acromogenes*, em cuja composição química inclui a 2-deoxi-Dglucose com uma cadeia no segundo átomo de carbono. O componente glicose funciona como responsável pela incorporação da metilnitrosuréia na célula beta, a qual seria a indutora de citotoxicidade (BEDOYA, SOLANO e LUCAS, 1996; BURKART, BRENNER, HARTMANN e KOLB, 1996).

5.4 TESTE DO NITROBLUE TETRAZOLIUM NOS FAGÓCITOS

No estudo das etapas da morte intracelular, o teste do NBT foi desenvolvido como adaptação prática de fatos conhecidos previamente sobre os eventos oxidativos que ocorrem durante a fagocitose, os quais incluem aumento do consumo de oxigênio,

aumento da atividade do desvio hexose monofosfato e aumento da formação do peróxido de hidrogênio. Tais eventos são associados com atividade da NADH oxidase (MOWAT e BAUM,1971; PIRES e SATO, 1994).

Para avaliar a formação desses radicais livres utilizou-se a coloração nitroblue tetrazolium, que é receptor de elétrons: após a ativação do metabolismo oxidativo por lipopolissacarídeo de bacilos gram-negativos, o corante é reduzido pela NADH-oxidase, formando um produto azul-escuro insolúvel denominado formazana.

Esse teste é relativamente fácil de realizar e reflete a produção de superóxido na explosão respiratória depois da fagocitose. É utilizado principalmente para triagem da doença granulomatosa crônica. A doença granulomatosa é exemplo de desordens neutrofílicas qualitativas aonde o número total de PMNs circulantes está normal ou, algumas vezes, realmente elevado, mas as células não exercem suas funções microbicidas normais (STITES,1970). O teste pode ser realizado sem adição de NADH, porque a produção de NADH endógeno pela via glicolítica anaeróbica não é alterada em leucócitos normais ou em células de pacientes com doença granulomatosa crônica (BYBEE e ROGERS,1964; MOWAT e BAUM, 1971).

MOLENAAR, PALUMBO, WILSON e RITTS, em 1976 comparam as funções bacteriostática, fagocítica e bactericida no diabetes em relação à doença granulomatosa crônica. Observaram que os neutrófilos no diabetes são capazes de limitar a evolução populacional infectiva de bactérias não-produtoras de catalase (enzima que destrói o peróxido produzido pelo sistema bactericida dos neutrófilos), como o *Streptococcus sp*, mas não são capazes de destruir *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, como na Doença Granulomatosa Crônica.

A ausência total da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase leucocitária tem sido associada a um quadro clínico semelhante ao da doença granulomatosa crônica. Acredita-se que o distúrbio dos leucócitos seja resultante da produção deficiente de NADPH. A avaliação laboratorial desses pacientes revela anormalidades

no teste do NBT, destruição intracelular, resposta de quimioluminescência e produção do peróxido de hidrogênio. O diagnóstico pode ser estabelecido pela análise espectrofotométrica, na qual a produção inicial do NADPH é medida numa reação em que o NADP e a glicose-6-fosfato são incubados. Se não houver enzima, não haverá produção do NADPH (PACHECO, S. E.; SHEARER, W. T., 1994).

No *diabetes mellitus* a infecção pode ser explicada pelo fato de que a formação de radicais livres de peróxido está comprometida. Os ânions superóxido, radical hidroperóxil e a cloramina são dependentes da formação de NADPH, subproduto da via da glicose-6-fosfato desidrogenase na metabolização da glicose. Se a glicose não for incorporada a célula, não haverá disponibilidade de NADPH, o que em consequência reduz a formação dos radicais livres (RAYFIELD, KLUSCH, GILBERT, KOVACS e SMITH, 1978).

A avaliação laboratorial da redução do corante nitroblue tetrazolim nos ratos wistar, no presente estudo, demonstrou que a redução do NBT no grupo diabético foi significativamente menor que no grupo controle quando se avaliou fagócitos do sangue e líquido de cavidade peritoneal. Esse fato foi revertido e melhorado quando se tratou o grupo diabético com insulina.

Sabe-se que a insulina tem efeito promotor do metabolismo oxidativo das células, melhorando a capacidade fagocítica dos macrófagos, bem como a produção de peróxido de hidrogênio, aumentando o metabolismo de glicose e diminuindo o metabolismo da glutaminase (JOHNSTON, 1982; ROSA, SAFI, CURY e CRI, 1996).

Neste estudo, o emprego da insulina melhorou a redução do corante NBT nos fagócitos dos ratos Wistar grupo diabético tratado. Essa redução foi significativamente maior em relação a análise dos fagócitos do sangue no grupo controle. Os fagócitos do líquido peritoneal do grupo diabético tratado não apresentaram diferença significativa na redução do NBT quando comparados ao grupo controle. A insulina foi responsável pela melhora na redução do NBT nessas amostras.

5.5 AVALIAÇÃO DO LEUCOGRAMA

No modelo de diabetes induzido pela estreptozotocina é observada supressão da função das células T, associada com atrofia do timo e dos tecidos linfóides periféricos (OLIVEIRA, 1997). Entretanto apenas grandes doses de STZ (250 mg) podem induzir inibição da síntese de DNA na medula óssea (COOPAN, 1985). Neste experimento, em que foi utilizada a dose de 90 mg de STZ, não se notou alteração no leucograma em relação ao grupo controle.

CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos através da avaliação do metabolismo oxidativo pelo teste do nitroblue tetrazolium permitiu chegar às seguintes conclusões:

1. Os animais do grupo diabético apresentaram diferença significativa menor na redução do NBT em relação ao grupo controle na análise dos fagócitos do sangue e do líquido de cavidade peritoneal.

2. Os ratos do grupo diabético tratado com insulina humana apresentaram diferença significativamente maior em relação ao grupo controle na redução do nitroblue tetrazolium nos fagócitos do sangue, não havendo diferença na redução do NBT em fagócitos do lavado peritoneal.

3. Os animais do grupo diabético tratado apresentaram diferença significativamente maior na redução do nitroblue tetrazolium em relação ao grupo diabético na análise dos fagócitos do sangue e líquido peritoneal.

REFERÊNCIAS

- 1 ANDERSEN, B; GOLDSMITH, G.H.; SPAGNUOLO, P.J. Neutrophil adhesive dysfunction in diabetes mellitus: the role of cellular plasma factors. **J. Lab. Clin. Med.**, St. Louis MO, v. 111, p. 275-285, 1980.
- 2 ARTIS, W.M.; FOUNTAIN, J.A.; DELCHER, H.K. A mechanism of susceptibility to mucormycosis in diabetic ketoacidosis: transferrin and iron availability. **Diabetes**, Alexandria, v. 31, p. 1109-1114, 1982.
- 3 BAGDADE, J. D.; ROOT, R.K.; BULGER, R. J. Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. **Diabetes**, Alexandria, v. 23, p. 9-15, 1974.
- 4 BAGDADE, J.D.; STEWART, M.; WALTERS, E. Impaired granulocyte adherence: a reversible defect in host defense in patients with poorly controlled diabetes. **Diabetes**, Alexandria, v. 27, p. 677-681, 1978.
- 5 BAGDADE, J.D.; WALTERS, E. Impaired granulocyte adherence in mildly diabetic patients: effects of tolazamide treatment. **Diabetes**, Alexandria, v. 29, p. 309-311, 1980.
- 6 BEDOYA, F. J.; SOLANO, F.; LUCAS, M. Monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rats islets. **Experientia**, v. 52, p. 344-347, 1996.
- 7 BONER, W.; TRENT, D.S.; HONEY, R.N.; WEIR, G.S. Response of neonatal islets to streptozotocin: limited cell regeneration and hyperglycemia. **Diabetes**, Alexandria, v. 30, n. 1, p. 64-69, 1981.
- 8 BRAYTON, R.G.; STOKES, P.E.; SCHWARTZ, M.S.; LOURIA, D.B. Effect of alcohol and various diseases in mobilization, phagocytosis and intracellular bacterial killing. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 282, p. 123, 1970.
- 9 BYBEE, J.D.; ROGERS, D.E. The phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes obtained from patients with diabetes mellitus. **J. Lab. Clin. Med.**, St. Louis MO, v. 64, p. 1-13, 1964.
- 10 BURKART, V.; BRENNER, H. H.; HARTMANN, B.; KOLB, H. Metabolic activation of islets cell improves resistance against oxygen radicals or streptozotocin, but not nitric oxide. **J. Clin. Endocrinol Metab**, v. 81, p. 3966-3971, 1996.
- 11 COOPAN, R. Infection and diabetes. In: MARBLE, A.,; KRALL, L.P.; BRADLEY, R.F.; CHRISTIEB, A.R.; SOELDNER, J.S. (Ed): **Joslin's diabetes mellitus**. 12. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1985. p. 737-747.
- 12 DAVID, J.R. Macrophage activation by lymphocyte mediators. **Fed. Proc.**, v. 34, p. 1730-1736, 1975.
- 13 DOUGLAS, S.D. As células envolvidas na respostas imunes. In: LIMA, A.O.; SILVA, W.D. **Imunologia, imunopatologia, alergia: métodos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1970. p 88, 89, 92.

- 14 DRACHMAN, R.H.; ROOT, R.W.; WOOD, W.B. Studies on the effect of experimental nonketotic diabetes mellitus on antibacterial defenses: demonstration of a defect in phagocytosis. **J. Exp. Med.**, New York, v. 124, p. 227, 1986.
- 15 DUMONDE, D.C.; WOLSTENCROFT, R.A.; PANAYI, G.S.; MATTHEWS, M.; MORLEY, J.; HOWSON, W.T. "Lymphokines": non antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation. **Nature**, London, v. 224, n. 38-42, 1969.
- 16 DZIATKOWIAK, H.; KOWALSKA, M.; DENYS, A. A phagocytic and bactericidal activity of granulocytes in diabetes children. **Diabetes**, Alexandria, v. 31, p. 1041-1043, 1982.
- 17 ESMANN, V. The metabolism of (1- 14C), (2-14C), (3,4 14C) and (6 14C) glucose in normal and diabetic polymorphonuclear leukocytes and during phagocytosis. **Diabetologia**, Berlin, v. 4, p. 188, 1968.
- 18 ESMANN, V. Carbohydrate metabolism and respiration in leukocytes from normal and diabetic subjects. **Enzyme**, v. 12, p. 34, 1962.
- 19 ESMANN, V. Effect of cell concentration on the metabolism of normal and diabetic leukocytes *in vitro*. **Metabolism**, Duluth MN, v. 13, p. 354, 1964.
- 20 ESMANN, V. The diabetic leukocyte. **Enzyme**, v. 13, p. 32, 1972.
- 21 FELDMAN, J.M. Pathophysiology of diabetes mellitus In: GALLOWAY, J.A.; POTVIN, J.H. **Diabetes mellitus**. 9. ed. Indianapolis, Lilly Research Laboratories, 1988. cap. 03, p. 28-42.
- 22 FOSTER, D.W.; MCGARRY, J.D. Glucose, lipid, and protein metabolism. In: GRIFFIN, J.E.; OJEDA, S.R. **Textbook of endocrine physiology**. 3. ed. Oxford: Oxford University Press, 1996. p. 349.
- 23 FUDENBERG, H.H.; SITES, D.P.; CALDWELL, J.I.; WELLS, J.V. Basic and clinical immunology. **Lange Medical Publications**, Los Altos, 1976.
- 24 GILLERY, P.; MONBOISSE, J. C.; MAQUART, F. X.; BOREL, J. P. Does oxygen free radical increased formation explain long term complications of diabetes mellitus? **Med Hypotheses**, v. 29, p. 47-50, 1989.
- 25 HIBBS, J.B. Macrophage nonimmunologic recognition: target cell factors related to contact inhibition. **Science**, Washington DC, v. 180, p. 868-870, 1972.
- 26 HIBBS, J.B.; LAMBERT, L.H.; REMINGTON, J.S. Control of carcinogenesis: a possible role for the activated macrophage. **Science**, Washington DC, v. 177, p. 998-1000, 1972.
- 27 HIGGINS, T.J.; LIU, D.Y.; REMOLD, H.G.; DAVID, J.R. Further characterization of the putative glycolipid receptor for MIF: role of fucose associated with na acidic glycolipid. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 93, p. 1259-1265, 1980.
- 28 HOSTETTER, M.K. Handicaps to host defense: effects of hyperglycemia on C3 and *Candida albicans*. **Diabetes**, Alexandria, v. 39, p. 271-275, 1990.
- 29 JOHNSTON, R.B. Defects of neutrophil function. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 307, p. 434-436, n. 7, 1982.

- 30 JONES, A.C.; SEIFERT, M.F.; DIXIT, P.K. Macrophage migration inhibition in experimental diabetes (41434). **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Minnesota, v. 170, p. 298-304, 1982.
- 31 LIMA, A.D.; SILVA, W.D. da. **Imunologia, imunopatologia, alergia: métodos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1970.
- 32 LUDWIG, H.; EIBI M.; SCHERNTHANER G.. Humoral immunodeficiency to bacterial antigens in patients with juvenile onset diabetes mellitus. **Diabetologia**, v.12, p.259, 1976.
- 33 MADERAZO, E.G.; WARD, P.E. Leukocyte chemotaxis. In: ROSE, N.R.; FRIEDMAN, H.; FAHEY, J.L. **Manual of clinical**. 3rd. ed. chapter 40.
- 34 MARBLE, A.; WHITE, H.J.; FERNALD, A.T. The nature of lowered resistance to infection in diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 17, p. 423, 1938.
- 35 MARIDONNEAU-PARINI I.; TRINGALE, S.; TAUBER, A. Identification of distinct activation pathways of the human neutrophil NADPH-oxidase. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 137, p. 2925-2929, 1986.
- 36 MCMAHON, M.M; BISTRAN, B.R. Host defenses and susceptibility to infection in patients with diabetes mellitus. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 9, n. 1, p. 1-9, March 1995.
- 37 MENDEZ, J. D.; RAMOS, H. G. Animal models in diabetes research. *Archives of Medical Research*, v. 25, n. 4, p. 367-375, 1994.
- 38 MOLENAAR, D.M.; PALUMBO, P.J.; WILSON, W.R.; RITTS, R.E. Leukocyte chemotaxis in diabetic patients and their non-diabetic first degree relatives. **Diabetes**, Alexandria, v. 25, p. 880, 1976.
- 39 MOSCI, P.; VECCHIARELLI, A.; CENCI, E.; PULITI, M.; BISTONI, F. Low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. **Cellular Immunology**, Orlando, v. 150, p. 27-35, 1993.
- 40 MOWAT, A.G.; BAUM, J. Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 284, p. 621, 1971.
- 41 NAGHIBI, M.; SMITH, R.P.; BALCH, A.L. The effect of diabetes mellitus on chemotactic and bactericidal activity of human polymorphonuclear leukocytes. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, Limerick, v. 4, p. 27-35, 1987.
- 42 NIELSON C.P.; HINDSON D.A. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte respiratory burst by elevated glucose concentrations in vitro. **Diabetes**, Alexandria, v. 38, p. 1031-1035, 1989.
- 43 NOLAN, C.M.; BEATY, J.D. Further characterization of the impaired bactericidal function of granulocytes in patients with poorly controlled diabetes. **Diabetes**, Alexandria, v. 27, p. 889-94, 1978.
- 44 OLIVEIRA, L.C.B. **Avaliação in vitro de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos Wistar com diabetes melito induzido por estreptozotocina**. Curitiba, 1997. 50 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná

- 45 ORTMEYER, J.; MOHSEIN, V. Glucose suppresses superoxido generation in normal neutrophils: interference in phospholipase D activation. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 264, p. C402-C410, 1993.
- 46 OZTURK, Y.; AYDIN, S.; OZCELIKAY, A.T.; ALTAN, V.M.; YILDIZO, G.-I. Calmodulin content and *in vitro* contractility of duodenum from streptozotocin-induced diabetic rats: effects of insulin therapy and calmodulin antagonism. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 321, n. 1, p. 59-65, 1997.
- 47 PACHECO, S.E.; SHEARER, W.T. Aspectos laboratoriais da imunologia. In: BELLANTI, J.A. **Clínicas pediátricas da América do Norte: imunologia clínica**. [s.l.]: Interlivros, 1994. v. 4, p. 677, 681, 682.
- 48 PEAKMAN, M.; VERGANI, D.: Imunidade natural. II: Mecanismos celulares. In: FUDENBERG, H.; STITES, D.P.; CALDWELL, J.; WELLS, J.V. **Imunologia básica e clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980. p. 20-31.
- 49 PERILLIE, P.E.; NOLAN, J.P.; FINCH, S.C. Studies of the resistance to infection in diabetes mellitus: local exudative cellular response. **J. Lab. Clin. Med.**, St. Louis MO, v. 59, p. 1008. 43, 1962.
- 50 PETERSON, C. M.; JONES, R.L.; KOENIG, R.J. Reversible hematologic sequelae of diabetes mellitus. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 86, p. 425-429, 1977.
- 51 PETERSON, E.M.; AMBE, N.A.; VALDES, I.; ARQUILLA, E.R. Phagocytosis and chemotaxis of macrophages from normal and diabetic mice. **Acta Diabetolol. Lat.**, v. 18, n. 2, p. 129-38, 1981.
- 52 PIRES, R.B.; SATO, M.N. Avaliação laboratorial da resposta imune. In: SAMPAIO, C.M.; GRUMACH, A.S. **Alergia e imunologia em pediatria**. 2nd ed. São Paulo: Sarvier, 1994. p. 220-225.
- 53 PORTHA, B.; LEVACHER, C.; PICON, L. Diabetogenic effect of streptozotocine in the rat during neonatal period. **Diabetes**, Alexandria, v. 23, n. 1, p. 889-895, 1974.
- 54 RAYFIELD, E.J.; AULT, M.J.; KEUSCH, G.T. Infection and diabetes: the case for glucose control. **Am. J. Med.**, New York, v. 72, p. 439-450, 1982.
- 55 RAYFIELD, E.J.; KLUSCH, G.T.; GILBERT, H.S.; KOVACS, I.; SMITH, H. Does diabetic control affect susceptibility to infection? **Clin. Res.**, v. 26, p. 425A, 1978. Abstract.
- 56 REPINE, J.E.; CLAUSON, C.C.; GOETZ, F.C. Bactericidal function of neutrophils from patients with acute bacterial infections and from diabetics. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 142, p. 869-875, 1980.
- 57 ROSA, L.F.B.P.C.; SAFI, D.A.; CURY, Y.; CRI, R. The effect of insulin on macrophage metabolism and function. **Cell Biochem. Function**, Chichester, v. 14, p. 33-42, 1996.
- 58 ROSENTHAL, A.S.; LIPSKY, P.E.; SHEVACH, E.M. Macrophage-lymphocyte interaction and antigen recognition. **Fam. Process.**, New York, v. 34, p. 1743-1748, 1975.
- 59 RUBIN, R.H. Defects in host defense mechanisms. In: RUBIN, R.R.; YOUNG, L.S (Eds.). **Clinical approach to infection in the compromised host**. 2. ed. New York: Phenum Medical Book, 1988.

- 60 SBARRA, A.J.; KARNOVSKY, M.L. The biochemical basis of phagocytosis: metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 234, p 1355, 1959.
- 61 SMITHERMAN, K.O.; PEACOCK, J.E. Emergências infecciosas nos pacientes com diabetes. In: OBER, P. **Emergências endócrinas**. [s.l.]: W.B. Saunders / Harcourt Brace, 1995. v. 79, n. 1, p. 51-74.
- 62 SRIVASTAVA, S. K.; ANSARI, N. H.; IZBAN, A.; DAS, B.; SZABO, G.; BHATNAGAR, A. The effect of oxidants on biomembranes and cellular metabolism. **Mol Cell Biochem** v. 91, n. 1-2, p. 149-157, Nov 1989.
- 63 STITES, D.P. Métodos de laboratório clínico. In: EDWARD, J.; WING, E.; JACK, S.R. **Imunologia, imunopatologia, alergia: métodos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1970. P. 382-383.
- 64 TAN, J.S.; ANDERSON, J.L.; WATANAKUNAKORN, C.; PHAIR, J.P. Neutrophil dysfunction in diabetes mellitus. **J. Lab. Clin. Med**, Cincinnati, v. 85, n. 1, p. 26-33, 1975.
- 65 TSUJI, K.; TAMINATO, T.; USAMI, M. Characteristic sites of insulin secretion in streptozotocine induced rat model. **Metabolism**, Duluth, v. 37, n. 11, p. 1040-1044, 1988.
- 66 UINGS, I.; THOMPSON, N.; RANDALL, R. Tyrosine phosphorylation is involved in receptor coupling to phospholipase D but not phospholipase C in the human neutrophil. **Biochem. J.**, London, v. 281, p. 597-600, 1992.
- 67 UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Central. **Normas Para Apresentação De Documentos Científicos**. 3. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2000, 10v.
- 68 WARD, P.A.; REMOLD, H.G.; DAVID, J.R. The production by antigen-stimulated lymphocytes of a leukotactic factor distinct from migration inhibitory factor. **Cell. Immunol.**, Orlando, v. 2, p. 162-174, 1972.
- 69 WARR, G.A. A macrophage receptor for (mannose/ glucosamine) glycoproteins of potential importance in phagocytic activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 93, p. 737-745, 1980.
- 70 WHEAT, L.J. Infection and diabetes mellitus. **Diab. Care**, Alexandria, v. 3, p. 187-197, 1980.
- 71 WING, E.J.; REMINGTON, J.S. Hipersensibilidade retardada e as funções dos macrófagos. In: LIMA, A.O.; SILVA, W.D. **Imunologia, imunopatologia, alergia: métodos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1970. p 98-99.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - LISTA DE MATERIAIS UTILIZADOS

1 INDUÇÃO DO DIABETES

- Éter 7% para anestesia;
- balança;
- estreptozotocina (Zanosar- UPJOHN) diluída em tampão citrato para manter o pH entre 3,5 e 4,5. Onde 1 ml=100 mg de estreptozotocina;
- tampão citrato (pH 4);
- solução A: 0,1M de ácido cítrico (21,01 g/l);
- solução B: 0,1 M de citrato de sódio (29,41 g/l), 33 cm³ de solução A+17 cm³ de solução B completadas até 100 cm³ com água destilada;
- seringa de insulina, agulha 25x7;
- monitor de glicemia capilar *Advantage Lilly*.

2 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO

- Éter 7% para anestesia;
- balança;
- monitor de glicemia capilar;
- seringa 5 ml, agulha 25x7;
- heparina;
- tubos de propietileno;
- material de dissecação;
- solução tampão citrato;
- pipeta Pasteur;
- pipetas microlitros;
- banho-maria;
- nitroblue tetrazolium (Sigma);
- LPS;
- solução de Turck: 2 ml de ácido acético glacial qsp 100 ml água destilada.

APÊNDICE 2

ANEXO - PRINCÍPIOS ÉTICOS DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL PRE-CONIZADOS PELO COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA - 1994)

O progresso dos conhecimentos humanos, notadamente os referentes à biologia, à medicina humana e dos animais, é necessário. O homem precisa utilizar animais em busca de conhecimento, para se nutrir, se vestir e trabalhar. Assim, ele deve respeitar o animal, seu auxiliar, como um ser vivente como ele.

Postula-se:

Artigo I - Todas as pessoas que pratiquem a experimentação biológica devem tomar consciência de que o animal é dotado de sensibilidade, de memória, e que sofrem sem poder escapar à dor.

Artigo II - O experimentador é moralmente responsável por suas escolhas e por seus atos na experimentação animal.

Artigo III - Procedimentos que envolvam animais devem prever e se desenvolver considerando sua relevância para a saúde humana ou animal, a aquisição de conhecimentos ou o bem da sociedade.

Artigo IV - Os animais selecionados para um experimento devem ser de espécie e qualidade apropriadas e apresentar boas condições de saúde, utilizando-se o número mínimo para obter resultados válidos. Deve-se ter em mente a utilização de métodos alternativos, tais como modelos matemáticos, simulação por computador e sistemas biológicos *in vitro*.

Artigo V - É imperativo que se utilizem os animais de maneira adequada, incluindo aí evitar-lhes desconforto, angústia e dor. Os investigadores devem considerar que os processos determinantes de dor ou angústia em seres humanos causam o mesmo em outras espécies, a não ser que o contrário tenha sido demonstrado.

Artigo VI - Todos os procedimentos com animais, que possam causar dor ou angústia, precisam se desenvolver com sedação, analgesia ou anestesia adequadas. Atos cirúrgicos ou outros atos dolorosos não podem ser realizados em animais não-anestesiados, que estejam apenas paralisados por agentes químicos e/ou físicos.

Artigo VII - Os animais que sofram dor, angústia intensa ou crônica, que não possam ser aliviadas e os que não serão utilizados devem ser sacrificados por método indolor e que não cause estresse.

Artigo VIII - O uso de animais em procedimentos didáticos e experimentais pressupõem disponibilidade de alojamento que proporcione condições de vida adequadas, contribuindo para sua saúde e conforto. O transporte, a acomodação, a alimentação e os cuidados com os animais criados para fins biomédicos devem ser dispensados por técnicos qualificados.

Artigo IX - Os investigadores e funcionários devem ter qualificação e experiência adequadas para exercer procedimentos em animais vivos. Deve-se criar condições para seu treinamento no trabalho, incluindo aspectos de trato e uso humanitário dos animais.