

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**COMPORTAMENTO IMUNOCELULAR E
SUSCETIBILIDADE À INFECÇÕES NO DIABETES
MELLITUS TIPO 1**

Camila Mele de Carvalho Barbosa

RIBEIRÃO PRETO
2002

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Clínica Médica

CAMILA MELE DE CARVALHO BARBOSA

**Comportamento imunocelular e suscetibilidade à infecções
no diabetes mellitus do tipo 1**

**Tese submetida à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto USP para obtenção de Grau de Mestre
do Programa de PósGraduação em Clínica Médica**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Milton Cesar Foss

Ribeirão Preto
2002

Barbosa, Camila Mele de Carvalho.

Comportamento imune celular e suscetibilidade à infecções no diabetes mellitus do tipo 1. Ribeirão Preto, 2002

80 p.;

Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP – Departamento de Clínica Médica.

Orientador: Foss, Milton C.

1. Citocinas, Comportamento imune celular, Cultura de monócitos, TNF, Interleucinas, Diabetes Mellitus tipo 1, Linfoproliferação.

Aos meus pais, DONALD E PATRÍCIA

Ele, pela presença e apoio constantes; ela, pelo eterno exemplo de uma grande mulher.

Ao GUSTAVO, pela compreensão, amizade e amor.

À minha filhinha PATRÍCIA, minha razão de viver.

Aos meus irmãos, LARISSA e MATHEUS, à querida SANDRA e meus tios, que acompanharam com incentivo toda minha trajetória.

Ao Dr. Renan Magalhães Montenegro Júnior pela disponibilidade e colaboração no trabalho.

Ao Prof. Gerson Muccilo pela colaboração na análise dos dados.

Aos funcionários do SAME, pela colaboração na provisão dos prontuários médicos.

Aos funcionários do setor de coleta de sangue pela ajuda e boa convivência.

Ao Hospital das Clínicas e à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelos meus 12 anos de formação.

Ao Prof. Dr. Dermeval de Carvalho, pelo incentivo a carreira universitária.

Ao Dr. Ricardo Mele, pela participação fundamental em toda minha trajetória médica.

Ao Sr. Gustavo de Araceli Barbosa, meu marido, na ajuda técnica da redação da tese e total apoio.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes e indivíduos controles que participaram deste estudo, pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Milton César Foss, meu agradecimento especial, pela orientação e ensinamentos científicos; pela compreensão e paciência frente aos imprevistos; pelo apoio e dedicação.

À Prof. Dra. Norma Tiraboshi Foss pela disponibilidade e colaboração neste trabalho.

Aos professores e médicos assistentes da Divisão de Endocrinologia e Metabologia, Prof. Dr. Ayrton Custódio Moreira, Prof. Dra. Lea Maria Zanini Maciel, Prof. Dr. Nassim Yazigi (*in memoriam*), Prof. Dra. Margareth de Castro, Prof. Dr. Carlos Eduardo Martinelli Jr. Dra. Glória Maria Ferreira Guimarães Paccola, Dr. Francisco José Albuquerque de Paula, Dra Leonor Maria Ferreira Braz Gouvêa, Dra. Lucila Leiko Elias e Dra. Ângela Maria de Oliveira Leal, pela amizade e pela importância fundamental para minha formação em endocrinologia.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica: pela eficiência e dedicação.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Endocrinologia e de Dermatologia, em especial a Sra. Maria Aparecida Nunes Ferreira pela colaboração no presente trabalho.

Aos colegas pós graduandos e residentes, pela amizade e companheirismo.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO ----- pg 01

MATERIAIS E MÉTODOS----- pg 15

RESULTADOS ----- pg 31

DISCUSSÃO ----- pg 49

BIBLIOGRAFIA----- pg 60

RESUMO----- pg 74

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus do tipo 1 é uma doença de evolução clínica crônica e degenerativa, dada por uma deficiência grave de secreção pancreática de insulina, que determina no organismo humano um conjunto amplo de alterações metabólicas, que tem na hiperglicemia a sua característica fundamental.

Com o desenvolvimento das técnicas para estudo genético e o aprofundamento do conhecimento imunológico, tornou-se evidente que o diabetes mellitus tipo 1 é geralmente um distúrbio autoimune, onde ocorre a destruição das células β do pâncreas, em indivíduos geneticamente susceptíveis.

Podemos dividir o desenvolvimento do diabetes tipo 1 em seis estágios:

1- Susceptibilidade genética: genes do complexo maior de histocompatibilidade contribuem para o desenvolvimento do diabetes, já que 90% dos caucasianos com diabetes mellitus tipo 1 apresenta o alelo DR3 ou DR4 ou ambos, sendo que a frequência na população geral é de 40 %. Somando-se a isso acredita-se que outros genes fora do complexo maior de histocompatibilidade possam estar envolvidos.

2- Fatores ambientais desencadeantes: ainda estão pouco definidos os fatores que desencadeariam o início da destruição autoimune das células β . Existem teorias de que algumas viroses podem desencadear o diabetes, como o vírus Coxsackie, citomegalovírus e a síndrome da rubéola congênita. Outros fatores ambientais também são alvos de estudo, como o aleitamento artificial, com leite de vaca, e até mesmo a ação dos raios ultravioletas.

3- Auto-imunidade: a presença de anticorpos anti-ilhotas, anti-insulina, anti-GAD (descarboxilase do ácido glutâmico) e outros precedem o estabelecimento do diabetes.

4- Destruição das células β com progressiva perda da secreção de insulina: acredita-se que o maior determinante para a destruição das células β seja mediado pela imunidade celular, através, principalmente dos linfócitos T CD4+.

5- Estabelecimento clínico do diabetes: Estudos de acompanhamento a longo prazo mostram que, inicialmente ocorre uma perda da fase rápida de

secreção de insulina. No momento em que o diabetes se estabelece clinicamente já ocorreu uma extensa destruição das células β .

No diabetes mellitus do tipo 1, o diagnóstico é geralmente feito em vigência do quadro metabólico alterado, pela presença de hiperglicemia plasmática, cetonúria, acidose metabólica e alterações hidro-eletrolíticas. Em casos de instalação mais amena da doença, pode ser feito a dosagem dos anticorpos anti-ilhota, anti-insulina e anti-GAD para a comprovação do diagnóstico de tipo 1.

Uma vez estabelecido o diagnóstico, o tratamento imediato se baseia na reposição hidro-eletrolítica e insulino-terapia, até o completo restabelecimento metabólico. A partir de então, o paciente irá necessitar de aplicações de insulina, no mínimo diária e controle alimentar. Com o advento da insulina para uso terapêutico e com isto o aumento da sobrevida do paciente, o maior problema clínico deste tipo de diabetes passou a ser as suas complicações crônicas, uma série de alterações patológicas que ocorrem na evolução a longo prazo da doença. Estas alterações envolvem principalmente o sistema vascular, também acometendo os nervos, a pele e gerando uma maior suscetibilidade às infecções.

Dentro do acometimento vascular, podemos dividi-lo em duas categorias: microangiopatias e macroangiopatias. A doença microvascular envolve a retina (retinopatia diabética) e os rins (nefropatia diabética) por um espessamento da membrana basal dos capilares e arteríolas. A

macroangiopatia do diabético nada mais é do que uma forma acelerada de aterosclerose, aumentando a incidência de infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e gangrenas periféricas no indivíduo com diabetes.

A neuropatia diabética envolve todo o sistema nervoso periférico, podendo acometer os seus componentes sensitivo, motor e autonômico. A neuropatia periférica sensitivo-motora é o tipo de acometimento mais frequentemente detectado, geralmente bilateral e simétrica em extremidades, com perda da sensibilidade tátil, dolorosa, térmica e da percepção vibratória. A neuropatia do sistema nervoso autônomo é comum em pacientes com diabetes mellitus de longa duração, podendo afetar a função de diversos órgãos e sistemas: hipotensão postural, gastroparesias, alterações da função intestinal e impotência estão entre os sintomas e sinais mais comuns.

A incidência de infecções é aumentada no paciente com diabetes mellitus, podendo ainda apresentar um curso clínico mais grave. Os mecanismos responsáveis por esta suscetibilidade às infecções não estão perfeitamente definidos. Defeitos no comportamento imunológico, a presença de micro-macroangiopatia ou/e neuropatia estão entre as causas mais prováveis.

Ultimamente a investigação da patogênese das complicações crônicas tem sido intensa e de fundamental importância, já que são elas as principais comprometedoras da qualidade de vida do indivíduo diabético.

Através de estudos multicêntricos como o DCCT (Diabetes Control e Complication Trial) e o UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) têm ficado definitivamente comprovado que o controle metabólico tem fundamental importância no aparecimento e agravamento das complicações crônicas.

Recentemente, inúmeros estudos têm conseguido elucidar melhor como que a hiperglicemia crônica influenciaria no aparecimento das complicações crônicas do indivíduo diabético, estudos estes, baseados no melhor entendimento dos aspectos biológicos e químicos da glicação não enzimática de proteínas. Sabe-se que, proporcionalmente à concentração de glicose, formam-se, inicialmente, produtos químicos de glicosilação com proteínas, quimicamente reversíveis, sendo que, posteriormente, estes produtos se rearranjam formando produtos mais estáveis. Algumas proteínas glicadas (principalmente colágeno e outras proteínas da parede dos vasos) por rearranjos químicos, frente à hiperglicemia crônica, formam produtos glicosilados irreversíveis e finais no processo. Estes produtos vão se acumulando continuamente na parede dos vasos, sendo o grau de acúmulo proporcional ao período de hiperglicemia. Tem se demonstrado também que tais proteínas estimulam a produção de citocinas, moléculas distintas reconhecidas por sua função comum de sinalizadores intracelulares (Vlassara e cols, 1988).

Citocinas são polipeptídeos produzidos em resposta a um estímulo inflamatório. Estudos iniciais mostraram que eram produzidas por células fagocitárias do sistema imunológico, no entanto, posteriormente, também foi descrita sua síntese por linfócitos T e B, fibroblastos e várias células endoteliais (Beutler e cols, 1988).

Mosmann e cols (1986), em estudo experimental, descreveram que células TCD4+ de camundongos podem ser subdivididas em duas subclasses (Th1 e Th2), baseadas no perfil de citocinas que elas secretam após estimulação. Células Th1 produzem interleucina 2 (IL2), interferon γ (IFN γ) e fator de necrose tumoral β (TNF β), enquanto as células Th2 produzem IL4, IL5, IL6, IL9, IL10 e IL13. Tem sido descrito que linfócitos indiferenciados (Th0), capazes de sintetizar citocinas do perfil Th1 e Th2 (Street e cols, 1988), diferenciam-se em subpopulações Th1 e Th2 e geram a resposta imunocelular que poderá ser caracterizada segundo as citocinas produzidas.

Na imunidade celular há predomínio da resposta do tipo Th1 com atividade inflamatória exacerbada, desencadeada por macrófagos, células NK e linfócitos T "helper" e citotóxicos. Por outro lado, na resposta imune humoral há maior atividade da subpopulação Th2, ativação de linfócitos B, com conseqüente produção de anticorpos e estimulação de eosinófilos.

A resposta do tipo 1 é regulada, especialmente, pela atividade das citocinas IFN γ , IL2 e TNF α e na resposta do tipo Th2 predominam as citocinas IL4, IL6 e IL10.

É interessante destacar que a regulação da atividade e produção destas citocinas é realizada por ação autócrina e/ou parácrina de algumas delas (por ex. IL2, IL4, IFN γ , IL10, TNF α), resultando em um equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2.

Enquanto os primeiros estudos mostravam que as citocinas eram sintetizadas em resposta a um processo infeccioso, pesquisas subseqüentes mostraram que em doenças inflamatórias também ocorriam uma ativação de sua produção, mesmo sem a presença de patógenos. Atualmente, sabe-se que até condições fisiológicas como durante o ciclo menstrual ou exercício físico também interferem na produção das citocinas.

Com o desenvolvimento dos estudos, tem sido evidenciado que as citocinas (IL1 a 12, Interferon α e γ , Fator de necrose tumoral α e β), não só influenciam o sistema imunológico, como também, iniciam mudanças em todo metabolismo.

A regulação para transcrição, translação e secreção das citocinas também são diferentes entre si. Por exemplo, as interleucinas são reguladas por eventos específicos que ocorrem dentro de um número limitado de tipos celulares. Em contraste, os interferons e fatores de crescimento são produzidos por vários tipos celulares em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo: injúria, infecção viral e distúrbios metabólicos.

Após a sua ligação com receptores celulares, as citocinas desencadeiam sinalizações intracelulares que incluem a ativação de proteínas

quinases, síntese proteica e "up regulation" de fatores de transcrição nucleares.

A relação entre as citocinas e o diabetes mellitus foi inicialmente estudada pelo papel imunomodulador que as citocinas exercem, tendo no caso, implicações na etiopatogênese do diabetes mellitus do tipo 1. Evidências mostram que o diabetes tipo 1 ocorre por uma destruição das células β pancreática mediada por imunidade celular, tendo as citocinas fundamental importância. Estudos mostram uma infiltração linfocitária com produção predominante de citocinas do padrão Th1 (Rabinovitch e cols, 1994).

Por outro lado, há um interesse crescente na caracterização da relação entre citocinas e as complicações crônicas do diabetes mellitus, possivelmente envolvendo o processo de glicação não enzimática de proteínas.

Os produtos das proteínas glicadas podem alterar a função vascular ligando-se a receptores específicos presentes nos macrófagos, que assim aumentam níveis de fator de necrose tumoral α (TNF α), IL-1 e outras citocinas. Sabe-se que a IL-1 e o TNF têm receptores endoteliais, conhecidos por aumentar a permeabilidade vascular e afetar o endotélio. O TNF α influencia a migração transendotelial de monócitos e aumenta a expressão de moléculas de adesão vascular facilitando a formação da placa aterosclerótica. A liberação de citocinas no espaço subendotelial promove a

interação de células endoteliais com células mononucleares causando danos nas células endoteliais e induzindo a proliferação de células da musculatura lisa (Wang e cols, 1990).

A IL6 é um dos principais mediadores da resposta inflamatória aguda, estimulando a produção de proteínas da fase aguda, como o fibrinogênio, que por sua vez é um importante fator de risco para doença cardiovascular (Catell e cols, 1988). Outras citocinas podem ainda estar envolvidas: IL-1, IL-2, fatores de crescimento derivados de plaquetas, fator de crescimento derivado de fibroblastos, fator de crescimento endotelial, $TGF\alpha$ e β . Em estudos com diabéticos tipo 1, os níveis plasmáticos de $TNF\alpha$ aumentaram progressivamente nos indivíduos com mau controle metabólico, em relação ao indivíduo com bom controle, sugerindo uma possível correlação entre os níveis de $TNF\alpha$ e o nível de proteínas glicadas nestes pacientes (Foss e cols, 1992).

Em estudos de pacientes com retinopatia diabética proliferativa, há relatos de níveis detectáveis de IL-6 no humor vítreo em 94% e de IL1 em 44% dos pacientes diabéticos. Em 40% dos pacientes diabéticos foi detectado IL-1 no humor aquoso (Asrar e cols, 1992). Em outro estudo, níveis intraoculares de IL-6 estavam elevados em pacientes com diabetes, o que pôde ser correlacionados com o grau de retinopatia diabética. Também se correlacionou altos níveis de $TGF\beta 2$ no humor vítreo com a gravidade da

doença, além disso, injeções locais desta citocina causaram fibrose ocular direta em animais de estudo (Connor e cols, 1989).

O TGF β estimula a síntese e acúmulo de proteínas da matriz (colágeno tipo 4 e fibronectina), como também inibe a sua degradação, diminuindo a secreção de proteases e aumentando a secreção de inibidores das proteases. Como a nefropatia diabética é caracterizada por uma expansão anormal destes componentes dentro da estrutura glomerular, o TGF β foi avaliado como um dos mediadores deste distúrbio. Inicialmente demonstrado em modelos animais de glomerulonefrites, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram, também, uma relação do TGF β 1 e o desenvolvimento da nefropatia diabética. *In vitro*, demonstrou-se que as células mesangiais, frente a uma alta concentração de glicose, aumenta a produção de proteínas da matriz, mediada por uma condição autócrina de maior secreção mesangial de TGF β 1 (Wolf e cols, 1992). Em humanos com nefropatia diabética avançada a concentração glomerular de TGF β 1 também está aumentada. Foi também demonstrado *in vitro* que a secreção de TGF β nas células mesangiais é estimulada pelas proteínas glicadas não enzimaticamente (AGE). Mais recentemente, infusão de albumina glicada em cobaias normais aumentaram a expressão intraglomerular do mRNA de TGF β e levou a um significativo aumento de espessura da membrana basal e glomeruloesclerose (Vlassara e cols, 1994). Em estudo onde se administrou decorina, um inibidor do TGF β , mostrou-se uma prevenção da lesão glomerular e da

proteinúria em modelos animais (Border e cols, 1992). A IL6 também tem sido demonstrada ser um importante fator de crescimento de diversos tipos de células, incluindo as células mesangiais e podendo levar à esclerose glomerular (Coleman e cols, 1992).

Em relação a maior suscetibilidade à infecções em pacientes diabéticos, existem vários fatores que levariam a uma maior incidência e pior prognóstico, inclusive as próprias complicações crônicas vascular e neurológica. Essa multiplicidade de fatores, bem como a dificuldade de técnicas adequadas, fez com que, mesmo após décadas de estudos, ainda permaneça interrogado se o diabetes por si só resulta num defeito imunológico e quanto isto predispõe à infecções. Estudos em pacientes diabéticos avaliando tanto a imunidade humoral como celular tem sido realizados. Em relação à imunidade humoral, as concentrações de anticorpos séricos, bem como a resposta à vacinação, não diferem se compararmos pacientes diabéticos com controles normais (Beam e cols, 1980). Alguns estudos avaliando a concentração de complementos e outros fatores da resposta humoral foram inconclusivos.

Por outro lado, voltando-se para a imunidade celular, estudo de células polimorfonucleares de pacientes diabéticos mostra uma diminuição da quimiotaxia quando comparadas a células de controles normais, não sendo demonstrada correlação com o controle glicêmico (Tater e cols, 1987). A aderência dessas células parece não estar alterada quando comparadas com

controles normais. Em relação à capacidade de fagocitose das células polimorfonucleares, foi encontrado uma diminuição que se correlaciona inversamente com a hemoglobina glicada e que aumenta com a melhora do controle glicêmico. Não houve conclusão sobre os estudos que analisaram a capacidade bactericida das células polimorfonucleares. Alterações de quimiotaxia, fagocitose e secreção de citocinas são descritas em monócitos de pacientes diabéticos (Katz e cols, 1983).

A aderência de um microrganismo às células epiteliais e de mucosa é considerada um importante passo na patogênese de uma infecção, enquanto fatores relacionados ao hospedeiro podem influenciar nesta aderência. No caso do paciente diabético, nota-se um aumento desta aderência por alguns patógenos, como a *Cândida albicans* no epitélio bucal e vaginal e de *Escherichia coli* nas células uroepiteliais.

Deste modo, apesar dos resultados divergentes observados em diferentes estudos e da inexistência de dados conclusivos nesta área de investigação, como exposto anteriormente, é possível depreender que o comportamento imunocelular e as citocinas envolvidas neste processo podem desempenhar importante papel no desenvolvimento de várias complicações freqüentemente observadas em pacientes diabéticos, particularmente, a suscetibilidade a infecções. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento imunocelular em pacientes diabéticos do tipo1 e em controles normais, através da medida da linfoproliferação *in vitro* e da

quantificação dos níveis séricos das citocinas: IL1, IL2, IL4, IL6, TNF α e de sua produção em cultura de células mononucleares periféricas dos pacientes diabéticos e controles, correlacionando assim as respostas *in vivo* com as *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 17 pacientes com diabetes mellitus do tipo 1, selecionados da Clínica de Diabetes da Divisão de Endocrinologia e Metodologia (Clínica Médica) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Os indivíduos que fizeram parte do grupo controle (n=15), foram escolhidos entre os estudantes e pós-graduandos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP, em condições saudáveis, que se dispuseram a participar, e que foram compatíveis com a faixa etária dos pacientes (entre 18 e 30 anos).

Este projeto foi encaminhado inicialmente ao Conselho de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, onde foi devidamente aprovado. Os pacientes e controles foram

esclarecidos sobre o estudo e, após o consentimento, foi feita a coleta de sangue para análise.

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes estudados estão apresentados na TABELA 1. Os pacientes estavam na faixa etária de 14 a 35 anos, sendo todos procedentes da cidade de Ribeirão Preto e região. Em 60% dos pacientes, o seguimento desde o momento do diagnóstico foi feito no próprio Hospital das Clínicas – FMRP-USP, comprovado por registro de cetoacidose diabética (acidose metabólica, cetonúria e hiperglicemia). Nos outros 40 %, o diagnóstico foi feito em outro serviço de atendimento médico, mas também foram encaminhados ao Hospital das Clínicas com os relatos e exames laboratoriais, também comprovando o episódio de cetoacidose diabética.

Foram considerados em bom controle do diabetes os pacientes com glicemia média (utilizando as glicemias do último ano, num total de 4 glicemias) menor ou igual a 120 mg/dL, glicosúria negativa e hemoglobina glicada (método de cromatografia de afinidade) menor ou igual a 8% (valor normal de 3,8-6,0%). Em regular controle metabólico, foram considerados os pacientes com glicemia média entre 120-200mg/dL, glicosúria de 0-10g/24hs e hemoglobina glicada entre 8 e 11%. E em mau controle, aqueles com glicemia maior que 200mg/dL, glicosúria maior que 10g/24hs e hemoglobina glicada maior que 11%. Os parâmetros metabólicos acima citados foram analisados no dia da coleta da amostra de sangue para o

estudo. Os pacientes diabéticos encontravam-se em um estado metabólico de mau a regular no momento do estudo (TABELA 1), avaliados pela hemoglobina glicada (HbA1), glicemia de jejum e glicosúrias fracionadas de 24hs, além de não apresentarem qualquer tipo de infecção.

As complicações do diabetes mellitus foram analisadas através de dados objetivos e subjetivos de macroangiopatia, microangiopatia (retinopatia e nefropatia) e neuropatias diabéticas. A análise objetiva inclui: 1) exame de fundo de olho com pupila dilatada e, quando necessário, angiografia fluoresceínica da retina, realizados por oftalmologista da equipe de trabalho, especializado em retina. Foram considerados portadores de retinopatia diabética de base (não proliferativa) pacientes com, no mínimo, microaneurismas e/ou hemorragias, e de retinopatia proliferativa, os pacientes com áreas de neovascularização retiniana, 2) determinação de proteinúria de amostras 24hs, sendo considerados patológicos e sugestivos de nefropatia diabética valores superiores a 200mg/24hs, na ausência de outras causas de proteinúria; 3) exame neurológico, sendo considerado como critério mínimo para a presença de polineuropatia sensitivo-motora, parestesias ou dor nas extremidades, diminuição ou ausência de reflexos profundos e/ou diminuição da sensibilidade superficial e profunda. A presença de neuropatia autonômica foi estabelecida pela verificação de um ou mais dos seguintes sinais/sintomas: hipotensão postural, gastroparesia diabética, alterações da função intestinal, incontinência fecal e bexiga

neurogênica. Impotência sexual isolada não foi considerada como diagnóstico de neuropatia diabética. O diagnóstico de macroangiopatia foi estabelecido através de sintomas de insuficiência arterial periférica, coronariopatia ou doença cérebro-vascular, associados a alterações nos pulsos periféricos e outros sinais de insuficiência vascular periférica ou anormalidades eletrocardiográficas isquêmicas. Não foi encontrada qualquer complicação crônica em nossos pacientes no momento do estudo, sendo que uma paciente veio a apresentar neuropatia sensitivo-motora, seis meses após a avaliação.

1- COLETA DE SANGUE E SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

De cada paciente, bem como dos controles, foi coletado sangue venoso da veia braquial, após assepsia do local com algodão embebido em álcool iodado.

O método para a separação das células foi desenvolvido de acordo com o protocolo previamente estabelecido no Laboratório de Cultura de Células da Clínica Médica/Dermatologia da FMRP-USP, para células mononucleares do sangue periférico.

A técnica utilizada seguiu os seguintes passos:

- Colhe-se em condições de esterilidade, 12 ml de sangue venoso utilizando-se tubo de coleta à vácuo, heparinizado e siliconado (Vacutainer, BD).

-
- Utilizando câmara de fluxo laminar, com condições ideais de esterilidade, seguiram-se as seguintes etapas:
 - Dilui-se o sangue total com igual volume de meio de cultura estéril (RPMI 1640) a 37°C
 - Coloca-se o sangue diluído, sobre o Ficoll-Hypaque. Centrifuga-se a 400g (1400 rpm) durante 30 minutos, à temperatura ambiente.
 - Após centrifugação, verifica-se a formação das 4 camadas distintas, sendo que a superior deverá conter plasma e plaquetas; a interface, células mononucleares; a média, gradiente Ficoll-Hypaque e a inferior, granulócitos e hemácias.
 - Com pipeta de Pasteur aspira-se, a camada de monócitos transferindo-a para um tubo cônico estéril. Prepara-se o material para a contagem das células.
 - Ressuspendem-se as células com suspensão salina isotônica. Centrifuga-se a 200g (100rpm) durante 10 minutos, despreza-se o sobrenadante
 - Ressuspendem-se as células com 1 ml de meio de cultura. Avalia-se a viabilidade dos linfócitos com Azul de Trypan a 2% ("Trypan Blue"2%). O método baseia-se na capacidade de células vivas repelirem o corante. Em seguida procede-se à contagem das células coradas. A viabilidade celular mostrou-se sempre superior a 95 % em todas as amostras.

- Dilui-se 20 μ l da suspensão de células em 400 μ l de corante de Turk (lisa hemáceas e preserva glóbulos brancos facilitando a contagem).
- Faz-se a contagem total de células obtidas da suspensão em câmara de Neubauer e calcula-se a concentração de células.
- Dilui-se a suspensão de células com o mesmo meio de cultura enriquecido com o soro AB humano (na concentração de 15%), inativado pelo calor, para obter as concentrações de células de $3,0 \times 10^6$ células/ml, necessárias para a cultura de linfócitos e células aderentes (macrófagos).

2- PROTOCOLO PARA PREPARO DAS CÉLULAS ADERENTES

As células aderentes foram obtidas pela incubação de 1,0ml da suspensão de $3,0 \times 10^6$ células/ml durante 2 horas a 37° C em atmosfera com 5% CO₂. Após o período, despreza-se o sobrenadante e lava-se cada poço com meio de cultura para remoção das células não aderentes. Repete-se o processo por 3 vezes.

Acrescenta-se a cada poço 1,0ml do meio de cultura, ressuspende-se as células e são preparadas as placas de cultura de células aderentes (24 poços), em duplicatas, segundo o protocolo (MALEFYT et al, 1991):

- A) $3,0 \times 10^6$ células em duplicatas, para controle
- B) $3,0 \times 10^6$ células + LPS (10 μ g/ml) e IFN γ (50 μ g/ml) em duplicatas

As placas são fechadas e incuba-se a placa por 24 hs a 37° C, com 5% de CO₂. Após, colhe-se o sobrenadante que deve ser armazenado a - 20° C para quantificação de citocinas.

3- PROTOCOLO PARA ESTUDO DE LINFOPROLIFERAÇÃO CELULAR

No estudo da linfoproliferação utilizam-se placas de 96 poços. Utilizando-se a suspensão de células, obtidas segundo técnica descrita, são preparadas culturas em triplicatas de volume de 0,2ml cada, com concentração final de $2,5 \times 10^5$ linfócitos/ml, segundo o protocolo:

A) $2,5 \times 10^5$ células + PHA (20 μ g/ml), em triplicata

B) $2,5 \times 10^5$ células em culturas controles

- As concentrações do mitógeno (PHA) são determinadas através de experimentos prévios de dose x resposta e avaliadas através da incorporação de timidina triciada (3H- Timidina) com o objetivo de definir qual a concentração ideal para estimular as culturas de células mononucleares
- As placas são fechadas e incubadas a 37° C, em ambiente úmido e com CO₂ à concentração aproximada de 5% durante 3 dias.

Completado o período de incubação, colhe-se o sobrenadante para posterior dosagem de citocinas, mantendo-os a - 20° C

- A seguir, adiciona-se a cada poço 0,5 microcuries de 3H-timidina, suspenso em meio de cultura e as células são mantidas, nas condições descritas, por um período de aproximadamente 16 horas.
- Completando o tempo de cultura, procede-se à coleta das células utilizando-se coletor automático ("Automated Cell Harvester"). Este aparelho aspira as células e lava os poços sequencialmente com salina, TCA 5% e metanol absoluto, recolhendo os linfócitos em papel de filtro ("Fiber Glass").
- Cada poço coletado tem área correspondente ao papel de filtro que é então recortado e colocado em frasco de cintilação líquida e conta-se a radioatividade com auxílio de espectrômetro de cintilação líquida (Beckman) durante 10 minutos por frasco.
- Os resultados da linfoproliferação são avaliados através da incorporação de 3H- timidina pelas células em proliferação. Estes resultados, em triplicatas, são apresentados como CPM (média de contagens por minuto) e como IE (índice de estimulação- relação entre CPM das culturas estimuladas e CPM das culturas na presença do meio RPMI

4- DOSAGEM DE CITOCINAS

Para a detecção de citocinas foi utilizado o ensaio imunoenzimático da R & D Systems, Inc. (Minneapolis, MN , USA)- Quantikine TM Human Immunoassay, específico para a determinação quantitativa das

concentrações de citocinas humanas em sobrenadantes de culturas de células, soro e plasma. Este kit contém citocina recombinante humana produzida em *Escherichia coli*. Foi utilizado um conjunto específico para cada citocina a ser dosada.

Emprega-se a técnica imunoenzimática quantitativa em formato de sanduíche. O conjunto apresenta uma placa de microtitulação (ELISA) de poliestireno com 96 poços, a qual vem coberta com anticorpo monoclonal (produzido em camundongo contra a citocina a ser detectada). A seguir, a descrição do ensaio:

- Com a pipeta deposita-se nos poços concentrações obtidas do padrão da citocina e as amostras a serem estudadas. Os sobrenadantes de culturas de células, estocadas em alíquotas a -20°C , como descrito anteriormente, foram descongelados e deixados em temperatura ambiente. Logo em seguida, centrifugados, para que fossem removidas quaisquer partículas cristalizadas. As moléculas da citocina presentes em cada solução são ligadas ao anticorpo imobilizado no fundo da placa.
- Lava-se a placa para a retirada das substâncias não ligadas.
- Adiciona-se aos poços lavados um segundo anticorpo: anticorpo policlonal específico para a citocina conjugado a uma enzima (peroxidase)

- Lava-se novamente para remover qualquer reagente anticorpo-enzima não ligado.
- Adiciona-se aos poços a solução substrato, a qual vai provocar o aparecimento de cor, que se desenvolve na proporção direta da quantidade de citocina ligada na etapa inicial.

Finalmente, adiciona-se a solução bloqueio ("stop") para interromper o desenvolvimento de cor. A intensidade da cor é medida em espectrofotômetro. Este ensaio obedece as seguintes etapas:

- Preparo dos reagentes: (São preparados em temperatura ambiente).
- Tampão de lavagem: dilui-se 20 ml do tampão de lavagem concentrado em 480 ml de água destilada ou deionizada (25x) para preparar 500ml de tampão de lavagem para uso no ensaio.
- Diluente RD5C (1x): Dilui-se 20 ml deste diluente calibrador concentrado 5 x (base protéica tamponada com preservativo) em 80 ml de água destilada ou deionizada para produzir 100ml de diluente calibrador RD5C(1x), o qual será utilizado para ensaiar amostras de sobrenadantes de culturas e a curva padrão.
- Solução substrato: reagente de cor A (peróxido de hidrogênio estabilizado) reagente de cor B (cromógeno TMB estabilizado). São misturados juntos, em igual volume, 15 minutos antes do uso.

- Citocina- Padrão: reconstitui-se o padrão de cada citocina, com 5 ml de diluente calibrador RD5C(1x), produzindo-se 500 pg/ml de solução estoque.
- Iniciamos a preparação da curva padrão: com pipeta, depositar 500µl do diluente calibrador RD5C (1x) em 6 (seis) tubos de prolipropileno.
- A partir da solução estoque a 500 pg/ml produzir diluição seriada com as seguintes concentrações padrões: 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml, 31,2pg/ml, 15,6pg/ml, 7,8pg/ml, 0pg/ml.

O padrão diluído, estoque, serve como a concentração padrão maior (500pg/ml) e o diluente calibrador (RD5C) puro, serve como concentração padrão zero.

- Adicionar 200µl de cada concentração padrão nos poços de placa de A a H, em duplicatas, nas colunas 1 e 2.
- Adicionar nos poços restantes da placa, 200µl de cada amostra pura a ser testada em duplicata.
- Cobrir a placa com vedação apropriada e incubar por 2 horas à temperatura ambiente

Para a lavagem, aspirar cada poço e lavar preenchendo-os com tampão de lavagem (400µl) repetindo o processo mais 3 (três) vezes, totalizando 4 lavagens. A completa remoção do líquido em cada passo é fundamental para um bom desenvolvimento.

Adicionar em cada poço 200 μ l de anticorpo policlonal produzido contra a citocina a ser quantificada conjugado à peroxidase com preservativo (21ml – que acompanha o conjunto), pipetado após o processo de lavagem. Cobrir a placa com nova peça de vedação para evitar a evaporação e incubar à temperatura ambiente por 1 hora.

Após tempo de incubação, repetir o procedimento por 4 (quatro) vezes: aspirar, lavar e bater no papel toalha.

Adicionar em cada poço 200 μ l da solução substrato preparada 15 minutos previamente ao uso (mistura do reagente A e B)

- Vedar a placa e colocar tampa escura sobre a mesma incubando por 30 minutos à temperatura ambiente.
- Observar cuidadosamente as duas colunas que representam a curva padrão. A coloração que vai surgir é amarela.

Após 30 minutos, adicionar em cada poço 50 μ l da solução "bloqueio" (ácido sulfúrico a 2N), obedecendo a mesma sequência da solução substrato. Surgirá coloração azul.

Determinar a densidade ótica (D. O .) de cada poço dentro de 30 minutos , utilizando um filtro com comprimento de onda de 450 nm e um segundo filtro de referência de 750 nm.

5- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média e erro padrão da média e foram analisados segundo testes estatísticos paramétricos e não

paramétricos (teste de Wilcoxon/ Mann – Whitney). O nível de significância adotado foi de 5%.

TABELA1- Dados clínicos e laboratoriais dos 17 pacientes diabéticos.

Pacien te	Sexo	idade	IMC	Tempo de DM	Glicemia jejum	Hb A1	Glicosúria	Dose de Insulina
	M/F	anos	P/Alt ²	anos	mg/%	%	g/24hs	U/Kg
SP	F	16	21,3	11	264	9,1	18,5	1,31
ACS	F	20	24,1	13	279	12,8	13,8	0,72
AMAP	F	16	23,2	05	195	10,2	16,4	1,30
RHJ	F	31	20,1	12	211	8,7	1,8	0,86
AFB	F	19	31,7	06	185	18,5	66,0	0,61
AMS	F	15	19,5	07	221	15,5	25,8	1,40
MFGV	F	34	24,7	19	381	9,5	38,2	0,83
FJR	F	32	22,9	19	350	11,0	57,5	0,85
SMC	F	19	23,1	09	129	10,0	28,0	1,02
RAM	M	14	20,7	07	282	15,6	96,2	1,15
RSO	M	17	21,8	02	178	9,4	18,8	0,38
EF	M	19	25,9	14	131,6	9,2	39,5	0,97
MCMS	F	31	33,7	09	356	10,2	33,0	0,40
NSF	M	15	18,5	10	328	10,3	25,5	1,12
CMAC	M	24	23,6	11	168	12,0	21,4	1,20
HJM	M	18	27,1	15	278	10,5	12,8	0,70
RGS	M	22	20,1	04	302	11,7	21,3	0,50
Média		21,3	23,6	10,2	249,3	11,7	31,5	0,802
EPM		5,4	3,0	3,8	67,8	2,0	16,7	0,265

TABELA 2 – Dados clínicos dos controlos normais.

Controle	Sexo	Idade	IMC
		anos	P/A2
JCC	F	24	19,5
FBH	F	23	20,3
CMC	F	22	22,3
GLD	M	26	24,1
LMV	F	25	22,4
RMO	F	25	23,2
RM	M	24	25,6
AGB	M	23	23,1
AAT	M	24	26,3
ETV	M	23	25,8
CGC	F	23	20,2
FMC	F	22	21,4
DAM	F	21	22,2
MNG	M	24	25,1
GAB	M	25	24,0
Média		23,6	23,0
EPM		1,1	1,7

RESULTADOS

1- NÍVEIS SÉRICOS DAS INTERLEUCINAS:

Os dados individuais dos pacientes diabéticos estão graficamente representados na figura 1 , a figura 2 representa estes dados em média e em erro padrão da média. As tabelas 3 e 4 apresentam os níveis séricos de citocinas IL1, IL2, IL4, IL6 e TNF α em pg/ml nos pacientes diabéticos e nos indivíduos controles, respectivamente. Podemos observar que nos indivíduos diabéticos, os níveis séricos de IL1 (média \pm EPM de 6,0 \pm 5,7 ; variando de 0 a 22,8 e mediana de 5,8 pg/ml), foram significativamente maiores do que nos indivíduos controles (média \pm EPM de 0,7 \pm 0,2; variando de 0 a 7,0 e mediana de 0,1 pg/ml). O mesmo foi observado com os níveis séricos de IL4, onde os pacientes (média \pm EPM de 27,7 \pm 13,8 ; variando de 5,9 a 63,4;

mediana de 25 pg/ml) apresentaram valores mais elevados que o grupo controle (média± EPM de $3,2 \pm 1,6$; variando de 0 a 9,7; mediana de 2,6 pg/ml). O padrão de resposta observado com o $TNF\alpha$ foi também semelhante, pois os indivíduos diabéticos apresentaram valores mais elevados (média± EPM de $139,1 \pm 68,8$; variando de 44,6 a 342,8; mediana de 126 pg/ml) que os controles (média± EPM de $38,9 \pm 15,1$; variando de 10,2 a 112,0; mediana de 37,8 pg/ml). Em contrapartida, os níveis séricos de IL2 foram expressivamente diminuídos no grupo de pacientes diabéticos (média±EPM de $16,7 \pm 11,2$; variando de 0 a 42,7; mediana de 11,0 pg/ml), quando comparados com os dos indivíduos controles (média± EPM de $30,2 \pm 4,3$; variando de 17,4 a 42,2; mediana de 29,6 pg/ml).

Os níveis séricos de IL6 foram significativamente maiores nos indivíduos diabéticos (média± EPM de $5,7 \pm 3,2$; variando de 1,4 a 12,8 mediana de 5,1 pg/ml), que nos controles normais (média±EPM de $1,6 \pm 0,7$; mediana de 1,4; variando de 0,4 a 3,2 pg/ml).

2- ÍNDICE DE ESTIMULAÇÃO (IE):

Observou-se que as células mononucleares dos indivíduos controles responderam significativamente melhor à estimulação com PHA que as dos indivíduos diabéticos, analisadas pelo índice de estimulação. Este índice é

dados pela relação da incorporação de timidina triciada (em cpm) nas células das culturas em condições basais com a das células das culturas estimuladas com o mitógeno PHA. Nos diabéticos o IE apresentou média± EPM de $48,3 \pm 20,5$, mediana de 42,4 variando de 18 a 113; enquanto nos controles, o IE apresentou média± EPM de 89 ± 25 , mediana de 97,5; variando de 22 a 131 (Tabelas 5,6 e figura 3).

3- CONCENTRAÇÕES DE INTERLEUCINAS NOS SOBRENADANTES DAS CULTURAS:

Os níveis das citocinas IL2 e IL4 nos sobrenadantes das culturas de células não aderentes (linfócitos), tiveram comportamento semelhante aos níveis séricos. Os níveis de interleucina 2 mostraram-se significativamente diminuídos nos indivíduos diabéticos (média± EPM de $17,9 \pm 14$; variando de 3,4 a 108,5; mediana de 11,2 pg/ml), quando comparados com os dos indivíduos controles (média± EPM de $45,2 \pm 26$; variando de 0 a 92,1; mediana de 48,4 pg/ml).

Os valores de IL4, como os observados a nível sérico, mostraram-se aumentados no sobrenadante das células dos indivíduos diabéticos (média± EPM de $41,6 \pm 23,4$; variando de 2,4 a 96,2; mediana de 39,3 pg/ml), se

comparados aos níveis dos indivíduos controles (média± EPM de 14,3 ±11,6 ; variando de 0 a 47,7; mediana de 11,8 pg/ml). Os resultados estão apresentados nas tabelas 7 e 8 e figura 4.

Em relação às células aderentes (macrófagos), os resultados das dosagens de interleucinas nos sobrenadantes podem ser visualizados nas tabelas 9 e 10. O TNF α dos indivíduos diabéticos (média± EPM de 25,0 ± 13,3; variando de 6,5 a 67,4, mediana de 19 pg/ml) se encontra em níveis menores se comparado ao dos indivíduos controles (média± EPM de 61,6 ± 17,7 ; variando de 3,4 a 112,5; mediana de 58,9 pg/ml), em discordância com o que foi verificado nas dosagens séricas desta citocina. A dosagem de IL1 no sobrenadante de culturas de monócitos também mostrou-se significativamente reduzida no diabético (média± EPM de 21,2 ± 17,6; variando de 3,2 a 145,6; mediana de 12,6 pg/ml), em relação aos indivíduos controles (média± EPM de 67,0 ± 30,5; variando de 0 a 136,4; mediana de 65,5 pg/ml).

Os níveis de IL6 foram menores nos indivíduos diabéticos (média± EPM de 3,53 ± 2,9 ; variando de 0 a 17,6; mediana de 2,2 pg/ml) quando comparados aos indivíduos controles (média± EPM de 13,8 ± 5,5 ; variando de 5,4 a 23,7; mediana de 12,6 pg/ml) (Tabelas 9 e 10 e Figura 5). A tabela 11 resume todos os resultados obtidos.

TABELA 3: Níveis séricos de citocinas, em pg/ml (IL-1 , IL-2 , IL-4 , IL-6 ,TNF α) nos pacientes diabéticos tipo 1.

Diabéticos	IL1	IL2	IL4	IL6	TNFα
SP	15,4	16,5	34,5	10,5	126,0
ACS	0	7,4	46,0	6,1	58,5
AMAP	5,8	8,9	17,2	1,5	245,4
RHJ	8,0	28,6	17,5	9,6	158,0
AFB	0	11,0	25,0	6,7	126,0
MAS	6,0	17,2	27,7	12,8	246,5
MFGV	0	10,0	14,5	8,5	342,8
FJR	0	25,5	11,0	4,8	217,0
SMC	22,8	0	11,4	2,3	59,5
RAM	17,0	0	44,6	1,6	90,6
RSO	0	8,6	49,1	7,7	155,0
EF	0	3,7	31,4	5,1	194,0
MCMS	14,5	35,2	42,8	1,4	44,6
NSF	6,4	42,7	5,9	3,1	86,2
CMAC	0	34,5	10,6	2,8	58,7
HJM	0	5,6	63,4	11,1	97,5
RGS	6,6	28,5	18,3	1,5	58,4
MÉDIA	6,0	16,7	27,7	5,7	139,1
EPM	5,7	11,2	13,8	3,2	68,8

TABELA 4: Níveis séricos de citocinas em pg/ml (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, TNF α) nos controles normais.

Controles	IL1	IL2	IL4	IL6	TNFα
JCC	0	17,4	2,6	1,4	45,0
FBH	0	29,5	1,9	0,8	32,0
CMC	0	29,6	3,4	1,1	10,2
GLD	0	32,4	4,6	1,4	56,8
LMV	0	22,8	1,8	0,6	12,6
RMO	0	29,6	9,7	1,4	112,0
RM	7,0	42,2	0	0,9	44,8
AGB	0	36,5	1,6	3,2	28,9
AAT	0	29,0	4,4	2,4	17,5
ETV	0	33,0	1,9	1,9	29,0
CGC	3,5	29,2	5,2	2,2	38,2
FMC	0	36,4	1,4	3,1	30,7
DAM	0	22,5	4,2	0,4	42,1
MNG	0	33,5	3,3	2,5	45,9
GAB	0	29,4	2,0	0,7	37,8
MÉDIA	0,7	30,2	3,2	1,6	38,9
EPM	0,21	4,37	1,65	0,76	15,1

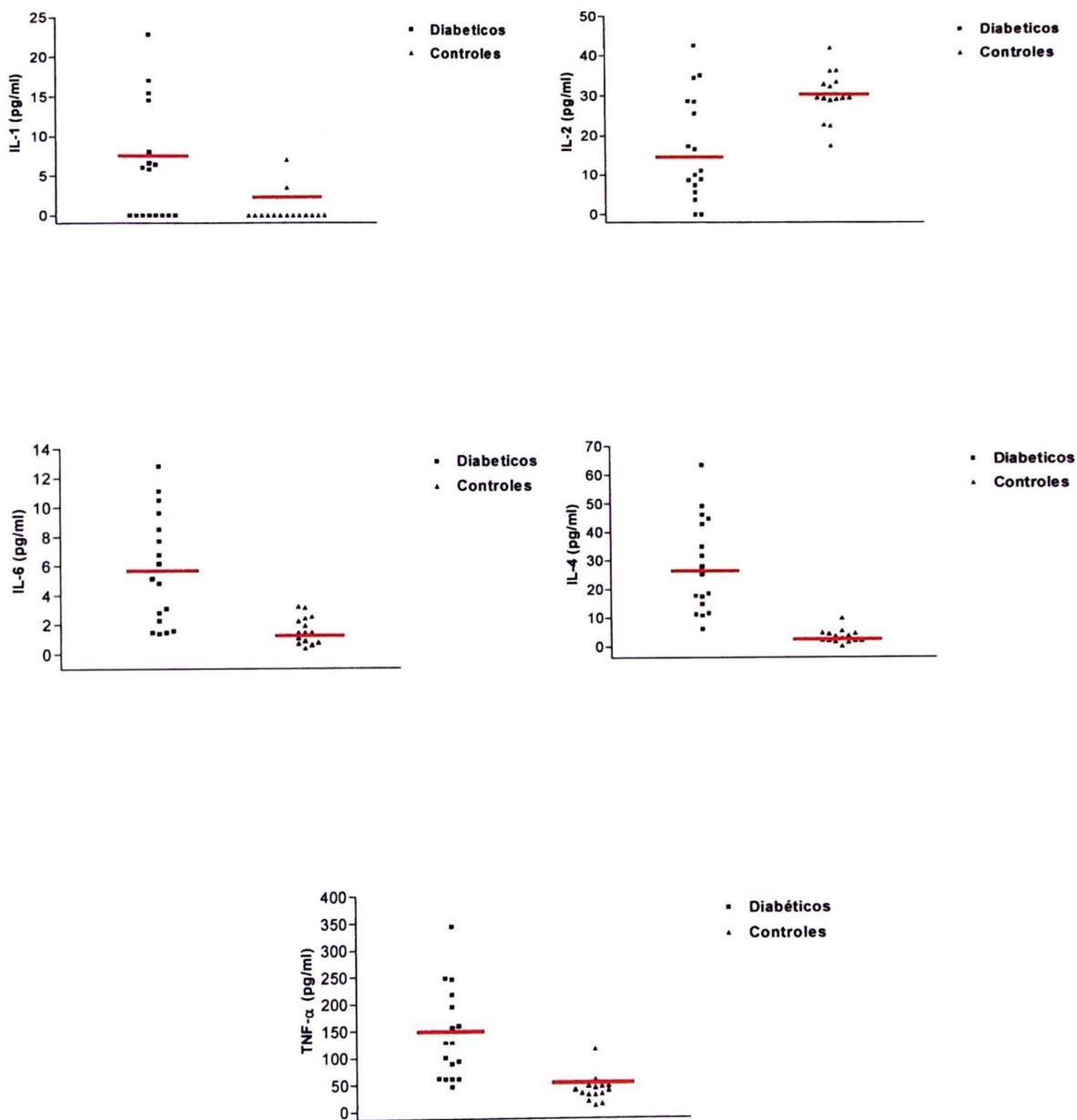


FIGURA 1- Valores individuais de citocinas (IL1, IL2, IL4, IL6 e TNF α) em pg/ml, em indivíduos diabéticos e controles.

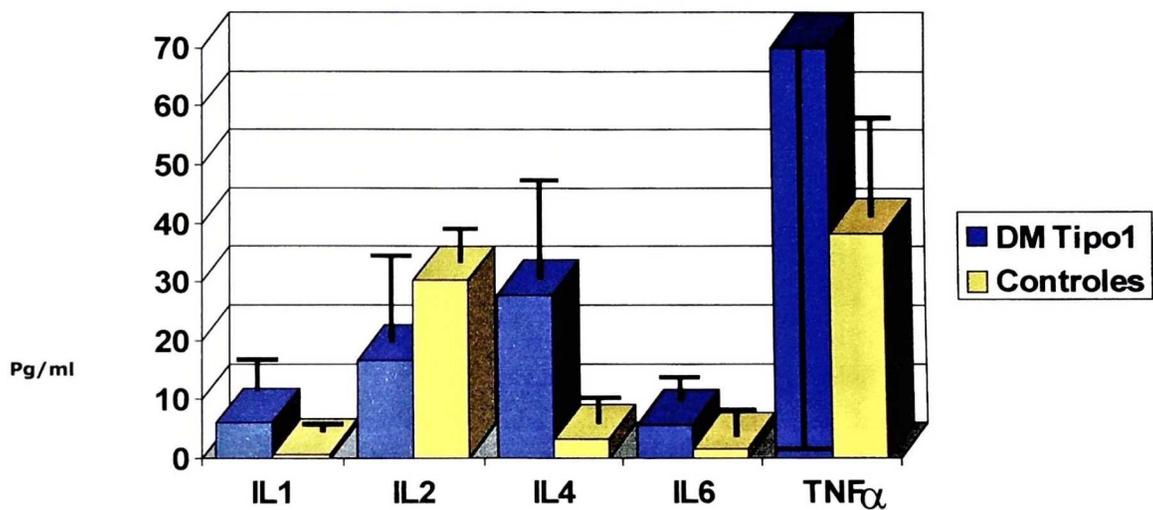


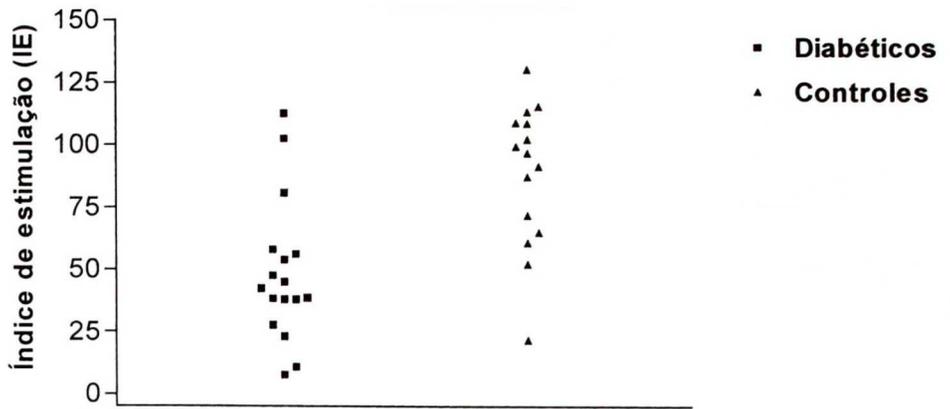
FIGURA 2 - Níveis séricos em média e erro padrão da média de interleucinas (IL1, IL2, IL4, IL6) e TNF α (pg/ml) em pacientes diabéticos e controles.

TABELA 5: Índice de Estimulação (IE): relação entre a proliferação celular em cpm das culturas estimuladas com PHA e a proliferação celular em cpm das culturas em condições basais de pacientes diabéticos tipo 1.

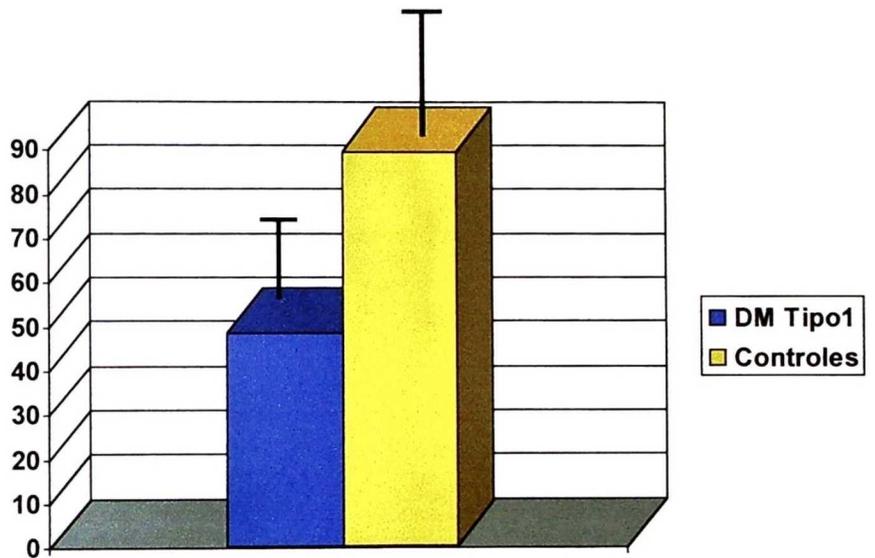
Diabéticos	Basal cpm	PHA cpm	IE
SP	190	11035	58,0
ACS	161	6215	38,7
AMAP	141	15921	112,7
RHJ	178	4948	27,8
AFB	374	14188	37,9
MAS	204	8654	42,4
MFGV	249	9450	38,0
FJR	134	10824	80,8
SMC	288	11053	38,4
RAM	493	3773	7,7
RSO	439	20921	47,7
EF	314	7244	23,1
MCMS	173	17776	102,8
NSF	150	8434	56,2
CMAC	534	5772	10,8
HJM	125	6741	53,9
RGS	158	7110	45,0
MÉDIA	253	10003	48,3
EPM	109	3729	20,5

TABELA 6: Índice de Estimulação (IE): relação entre a proliferação celular em cpm das culturas estimuladas com PHA e a proliferação celular em cpm das culturas em condições basais do grupo controle.

Controles	Basal	Culturas PHA	IE
	cpm	cpm	
JCC	144	3185	22,1
FBH	93	10632	114,3
CMC	225	14752	65,5
GLD	232	14218	61,2
LMV	145	15930	109,8
RMO	114	11754	103,1
RM	123	10811	87,9
AGB	129	9350	72,4
AAT	121	15897	131,0
ETV	201	18564	92,2
CGC	103	11998	116,4
FMC	153	16754	109,2
DAM	214	11267	52,6
MNG	143	13950	97,5
GAB	106	10632	99,9
MEDIA	150	12646	89
EPM	37	2872	25



A



B

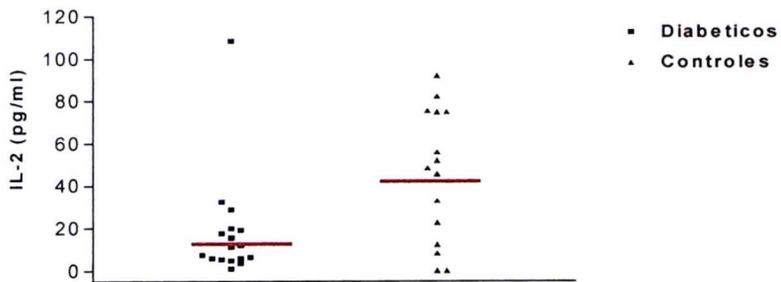
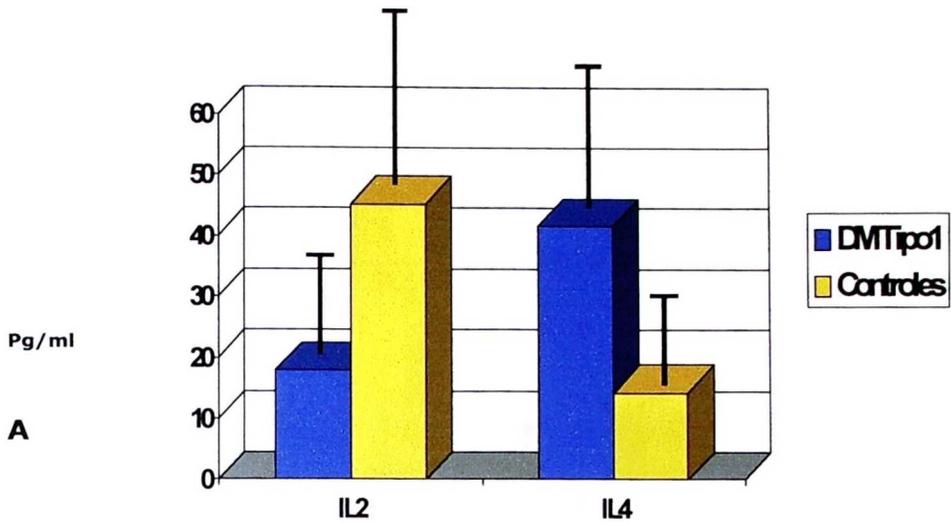
FIGURA 3- Valores individuais (A) e valores em média e EPM (B) do índice da estimulação (IE) em pacientes diabéticos e controles, de células mononucleares em culturas basais e na presença de mitógeno.

TABELA 7: Níveis de IL2 e IL4 (pg/ml) nos sobrenadantes de culturas de linfócitos na presença de PHA nos pacientes diabéticos tipo1.

Diabéticos	IL2	IL4
SP	3,4	21,8
ACS	12,1	39,3
AMAP	7,2	96,2
RHJ	28,7	12,3
AFB	5,4	68,5
MAS	6,2	55,7
MFGV	19,1	86,2
FJR	11,2	38,4
SMC	0,8	13,5
RAM	5,9	7,6
RSO	17,6	5,2
EF	4,8	78,4
MCMS	108,5	2,4
NSF	32,4	54,3
CMAC	5,8	34,6
HJM	15,4	45,6
RGS	19,8	47,2
MÉDIA	17,9	41,6
EPM	14	23,4

TABELA 8: Níveis de IL2 e IL4 (pg/ml) nos sobrenadantes de culturas células mononucleares na presença de PHA nos indivíduos normais.

Controles	IL2	IL4
JCC	8,2	45,6
FBH	0	17,4
CMC	75,0	3,2
GLD	0	47,7
LMV	48,4	0,8
RMO	82,3	0
RM	92,1	0
AGB	56,0	0
AAT	33,1	21,1
ETV	74,9	11,8
CGC	12,2	5,6
FMC	45,6	7,8
DAM	51,9	23,8
MNG	22,7	12,1
GAB	75,6	17,6
MÉDIA	45,2	14,3
EPM	26,0	11,6



B

FIGURA 4 - Níveis de IL2 e IL4 (pg/ml), valores individuais (B) e média e EPM (A) no sobrenadante de culturas de células mononucleares na presença de PHA.

TABELA 9: Níveis de TNF α , IL1 e IL6 (pg/ml) no sobrenadante de culturas de macrófagos na presença de LPS e IFN γ dos pacientes diabéticos tipo 1.

Diabéticos	IL1	IL6	TNFα
SP	12,6	1,7	44,8
ACS	17,4	2,9	19,0
AMAP	3,8	5,8	16,2
RHJ	9,1	0	24,1
AFB	2,7	9,2	33,1
MAS	25,1	1,6	8,6
MFGV	14	0	9,7
FJR	3,2	4,7	51,6
SMC	5,6	0	24,0
RAM	7,8	0	13,5
RSO	13,9	3,2	6,5
EF	27,4	4,4	8,9
MCMS	145,6	17,6	67,4
NSF	9,8	0	29,6
CMAC	19,5	1,9	41,5
HJM	33,6	4,8	10,0
RGS	9,3	2,2	16,5
MÉDIA	21,2	3,5	25,0
EPM	17,3	2,9	13,9

TABELA 10: Níveis de TNF α , IL1 e IL6 (pg/ml) no sobrenadante de culturas de macrófagos na presença de LPS e IFN γ dos indivíduos controles normais.

Controles	IL1	IL6	TNFα
JCC	0	5,4	3,4
FBH	0	8,1	29,1
CMC	68,4	15,4	89,8
GLD	35,2	6,2	58,9
LMV	128,0	18,1	112,5
RMO	96,2	12,6	58,4
RM	136,4	21,5	62,3
AGB	72,1	23,7	78,1
AAT	118,7	7,5	44,5
ETV	78,0	9,8	67,3
CGC	45,6	11,3	52,8
FMC	58,7	20,8	55,9
DAM	44,1	16,4	64,8
MNG	65,5	22,1	89,1
GAB	58,1	8,1	57,1
MÉDIA	67	13,8	61,6
EPM	30,5	5,2	17,7

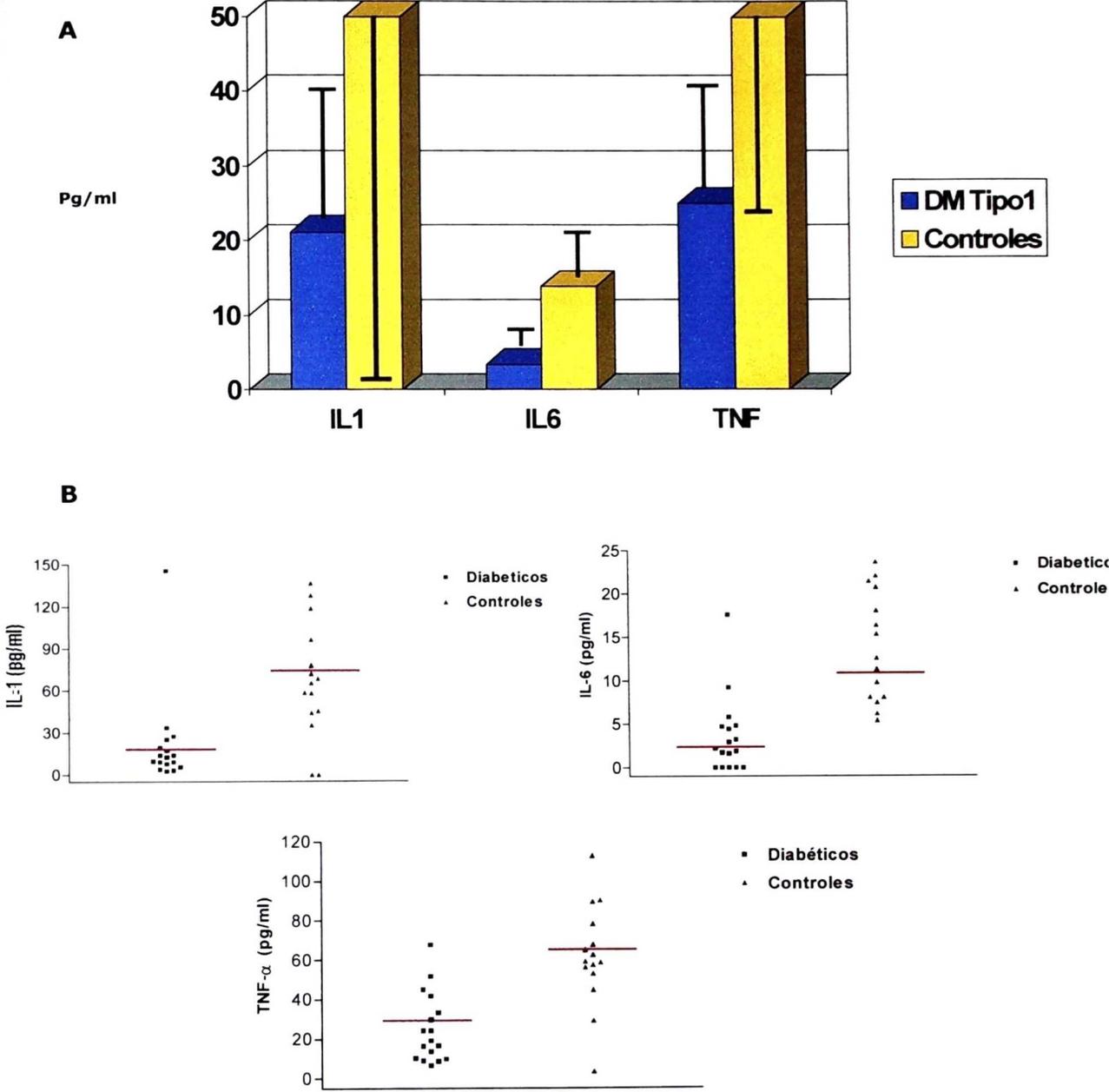


FIGURA 5- Níveis de TNF α , IL1 e IL6 (pg/ml), em valores individuais (B) e em média e EPM (A) no sobrenadante de culturas de células mononucleares na presença de LPS e IFN γ .

TABELA 11: Níveis séricos e em sobrenadantes de culturas de células mononucleares de citocinas (IL-1 , IL-2 , IL-4 , IL-6 ,TNF α), em pg/ml, nos pacientes diabéticos tipo 1 e controles normais.

	IL1	IL2	IL4	IL6	TNFα
séricos					
DM 1	6,0\pm5,7	16,7\pm11,2	27,7\pm13,8	5,7\pm3,2	139,1\pm69
Controles	0,7\pm0,2	30,2\pm4,3	3,2\pm1,6	1,6\pm0,7	38,9\pm15,1
culturas					
DM 1	21,2\pm17,3	17,9\pm14	41,6\pm23,4	3,5\pm2,9	25\pm13,9
Controles	67\pm30,5	45,2\pm26	14,3\pm11,6	13,8\pm5,5	61,6\pm17,7

Pg/ml

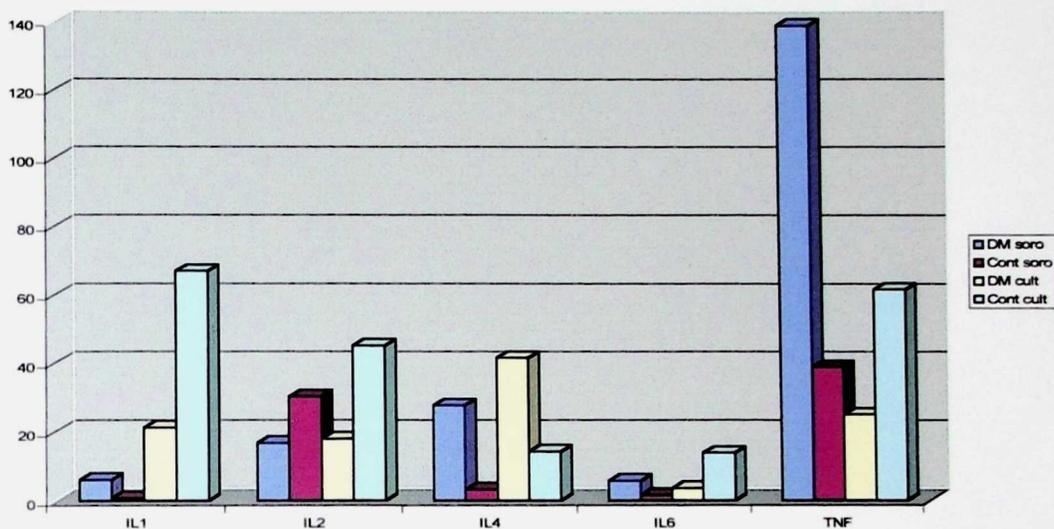


FIGURA 6 - Comparação entre os níveis (média) de citocinas no soro e no sobrenadante de culturas de células mononucleares em indivíduos diabéticos e grupo controle.

DISCUSSÃO

O sistema imunológico apresenta uma variedade de tipos celulares que apresentam subdivisões específicas, tendo cada uma delas funções bem determinadas. Ultimamente, tem se verificado que tais células produzem citocinas específicas que agem no controle da resposta imunocelular. Os estudos pioneiros, relacionando citocinas com diabetes mellitus tipo 1, originaram da investigação da etiopatogênese da doença. O conhecimento mais recente indica que a destruição da célula β pancreática resulta de uma desordem na imunorregulação. De acordo com este conceito, células T específicas para constituintes das células β existem em todos indivíduos, mas ficam restritos, graças a mecanismos regulatórios. No diabetes mellitus tipo 1, acredita-se que ocorra uma falha em um dos mecanismos imunomoduladores que permitiria a ativação dessas células T,

iniciando uma cascata de processos inflamatórios nas ilhotas, culminando com a destruição das células β . Como as citocinas são reguladoras da resposta imunológica, estudos foram iniciados com o objetivo de avaliar sua participação na patogênese do diabetes mellitus tipo 1. Inicialmente, detectou-se a presença de várias citocinas, tanto pela expressão de genes específicos como pela detecção das próprias proteínas nas insulites de modelos animais de diabetes mellitus tipo 1 (Rabinovitch e cols, 1998). A seguir, estudos foram desenvolvidos no sentido de avaliar a participação destas citocinas no processo de destruição da célula β . Estudos em modelos animais demonstraram que quando citocinas do padrão Th1 ($\text{IFN}\gamma$, IL-2 e $\text{TNF}\alpha$), produzidas pelos leucócitos nas ilhotas, prevalecem perante as do padrão Th2 (IL-4 e IL-10) ocorre a destruição das células β , enquanto que, o predomínio das citocinas do padrão Th2 levaria a uma inflamação benigna, não culminando em destruição. Perante este aspecto, é interessante salientar a diferença do nosso estudo, onde, uma vez analisadas as células mononucleares periféricas dos pacientes diabéticos tipo 1, predominou as citocinas de padrão Th2; o que mais uma vez nos leva a concluir que o padrão de secreção das citocinas pode ser diferente em cada tecido do mesmo indivíduo. Até o momento, apenas o $\text{IFN}\alpha$ e o $\text{IFN}\gamma$ tem sido associados com a destruição das células β em pacientes com diabetes tipo 1. Entretanto, está bem documentado que certas citocinas são citotóxicas para a ilhota pancreática *in vitro*. (Rabinovitch e cols, 1993). IL1, $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$ e $\text{IFN}\gamma$ são

citostáticos para a célula β , inibindo a síntese e secreção de insulina, sendo que, em combinação, tais citocinas destroem a célula β tanto nos modelos animais como em humanos. Não se provou ainda se tais citocinas seriam diretamente citotóxicas *in vivo*. Além dessa possibilidade de destruição direta, as citocinas podem deixar as células β mais susceptíveis à destruição por aumentarem a expressão de MHC classe 1 ($\text{IFN}\gamma$) e pela indução dos receptores Fas na célula β . A ligação dos receptores Fas com FasL das células T seria um dos mecanismos de morte celular por apoptose.

A tecnologia transgênica também vem sendo utilizada. Expressão transgênica de $\text{IFN}\gamma$, $\text{IFN}\alpha$ e IL-2 pela célula β em roedores não diabéticos, resultaram em uma progressiva infiltração linfocitária, destruição celular e diabetes. Já expressão de $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$ e IL6 são capazes de induzir inflamação que não progride para destruição celular. Administração sistêmica de citocinas (IL-2, IL-10, $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$ e IL-1) em camundongos NOD pode acelerar ou inibir a destruição celular, dependendo da época e quantidade administrada. Alguns estudos retiraram a expressão genética de uma citocina em roedores susceptíveis ao diabetes, entre tais estudos o destaque ficou para a IL-1, IL-6, IL-2, IL-12, $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$, que quando neutralizadas, houve uma redução significativa no desenvolvimento do diabetes. A deleção de uma única citocina, não foi suficiente para prevenir completamente o desenvolvimento do diabetes. Em seres humanos, não existem estudos tão consistentes. Níveis séricos ou secreção por leucócitos mononucleares do

sangue de diabéticos já foram realizados em busca de explicações para a patogênese, várias alterações foram demonstradas, porém não se sabe se precederiam a doença ou se já são conseqüências das alterações metabólicas (Rabinovitch , 1998). Com base nesses estudos busca-se uma intervenção imunoterapêutica, onde se interviria na rede de citocinas.

Em nosso estudo, procuramos correlacionar tais citocinas, especificamente IL1, IL2, IL4, IL6 e TNF α , com a maior suscetibilidade do diabético frente a uma infecção. Foram verificados padrões alterados na secreção destas citocinas nos indivíduos diabéticos quando comparados ao grupo controle. Em todas as análises, não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo de diabéticos com menos de 10 anos da doença daqueles com diabetes mellitus há mais de 10 anos. Não está totalmente definida a fonte destas citocinas no plasma, já que estas são produzidas por vários tipos celulares, porém, estudos recentes, indicam os monócitos como possível fonte da elevação desta citocina no diabetes (Ohno e cols, 1993).

A dosagem das citocinas no soro dos pacientes diabéticos mostrou um aumento significativo de IL1, TNF α , IL4, IL6, e uma diminuição de IL2 em relação aos indivíduos controles. Esta alteração pode estar relacionada com o mau controle metabólico, concordando com estudo prévio onde foi observado uma tendência a concentrações mais altas de TNF α quanto pior o controle metabólico do paciente (Foss e cols, 1992). A hiperglicemia levaria a um aumento das proteínas glicadas e estas (Vlassara e cols., 1988),

aumentariam a produção das citocinas, principalmente o $\text{TNF}\alpha$. As altas concentrações do $\text{TNF}\alpha$ seria o marcador da ativação macrófágica induzindo a produção de IL1. Sabe-se que a interleucina 1 inicia as interações celulares estimulando as células CD4T a produzir as citocinas IL4 e IL6 (modelo TH2+). Alguns estudos já mostravam alterações de algumas citocinas no soro de diabéticos, mas não há registro da dosagem simultânea destas citocinas e suas interações. Lechleitner e cols. (2000) dosaram $\text{TNF}\alpha$ em 44 pacientes com diabetes tipo 1 e em 24 indivíduos controles, encontrando níveis significativamente elevados desta citocina no plasma de indivíduos diabéticos e uma correlação positiva destes resultados com a hemoglobina glicada e frutossamina, correlação negativa com HDL colesterol, concluindo que o aumento do $\text{TNF}\alpha$ estaria relacionado com o controle metabólico e o risco cardiovascular no indivíduo diabético.

Mooradian e cols.(1991) encontraram um aumento da porcentagem de detecção de $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 no soro de indivíduos diabéticos do tipo2 (30,5%/27,7%) em relação aos controles (11,8%/17,7%), porém, quando comparado com indivíduos portadores de doenças crônicas (29,6%/27,3%), o percentual detectável desta interleucina no soro era semelhante, sugerindo alteração inespecífica, frente a uma doença crônica. Em outro estudo contraditório, Pfeiffer e cols (1997) encontraram um aumento do $\text{TNF}\alpha$ plasmático em homens com diabetes tipo2, mas não em mulheres quando comparados ao grupo controle, sem correlação com a hemoglobina glicada

ou o índice de massa corporal e com correlação positiva com os níveis de triglicérides. O fato de não ocorrer elevação desta citocina no grupo de mulheres diabéticas, foi atribuído a ação estrogênica de inibir a liberação de $TNF\alpha$. Uma comparação (Mysliwska e cols, 1998) entre indivíduos com diabetes tipo1 que apresentaram dosagens detectáveis de $TNF\alpha$, IL2 e IL6 no soro, em relação aos diabéticos com níveis indetectáveis, mostrou uma correlação negativa em relação a hemoglobina glicada e complicações crônicas, ou seja, o grupo com $TNF\alpha$ detectável apresentou menores níveis de Hb glicada e menos complicações crônicas, tendo sido concluído que indivíduos com $TNF\alpha$ detectável possuem menor sinal inflamatório.

A dosagem de interleucinas no soro sofre interferência de diversos fatores, tanto metabólicos quanto de qualquer injúria ao organismo, dificultando uma interpretação específica para o indivíduo diabético, daí a importância da cultura de células específicas para a avaliação do sistema imunológico.

Em nosso estudo, antes mesmo da dosagem das citocinas no sobrenadante das culturas de células, observou-se que as células mononucleares dos indivíduos controles responderam significativamente melhor à estimulação com PHA que as dos indivíduos diabéticos, uma vez analisados os índices de estimulação (relação entre a proliferação em cpm das culturas estimuladas e a proliferação em cpm das culturas em condição basal), indicando alguma anormalidade no sistema imunológico destes

pacientes. Mac Cuish e cols, 1992 mostraram uma inibição de 50% na resposta proliferativa ao estímulo com PHA em diabéticos com controle metabólico ruim quando comparados com indivíduos não diabéticos e diabéticos com bom controle metabólico, resultado que se assemelha ao nosso, já que todos os nossos pacientes se encontravam descompensados metabolicamente.

Em relação a cultura de células aderentes, a dosagem de citocinas (IL1, IL6, TNF α) nos sobrenadantes, foi discordante da dosagem plasmática; ocorrendo uma diminuição dos níveis de TNF α , IL1 e IL6 nos indivíduos diabéticos em comparação com os indivíduos controles. Já o sobrenadante das células não aderentes mostrou níveis elevados de IL4 e diminuídos de IL2 em diabéticos quando comparados ao grupo controle, dados semelhantes com as alterações a nível plasmático. Com estes dados , confirma-se um aumento de IL4, indicando mesmo um modelo de resposta imunocelular tipo TH2+ no paciente diabético tipo 1.

A diminuição das concentrações de citocinas na cultura de células mononucleares sugere uma alteração na capacidade dos macrófagos na defesa contra infecção, também, sendo o IL4 é um potente supressor da atividade dos macrófagos, seu aumento pode estar associado com a deficiência na resposta a infecções do DM tipo 1.

Em indivíduos normais, espera-se uma predominância da resposta TH1+, resultando em um aumento de vários mecanismos citotóxicos,

ocorrendo então, ativação macrofágica, terminando num aumento da morte de parasitas intracelulares e células tumorais e aumento da expressão dos receptores Fc de anticorpos IgG. Estes receptores podem aumentar a produção de anticorpos dependentes da citotoxicidade macrofágica. Os clones TH1 podem também causar hipersensibilidade tardia. Todos estes mecanismos efetores são apropriados para a defesa de infecções intracelulares (vírus e parasitas). Quando ocorre uma ativação predominantemente de modelo TH2+, ocorre um aumento de anticorpos, a interleucina 4 aumenta a produção de IgE, ou seja, de resposta alérgica e não de defesa a infecções. Na maioria das respostas imunológicas o que ocorre é uma mistura dos dois modelos com predominância do TH1, diferente dos resultados encontrados no indivíduo diabético.

Existem outros estudos envolvendo pacientes diabéticos e dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de células, embora nenhum com o objetivo de avaliar a resposta imunológica. Morohoshi e cols (1996) avaliaram a produção de IL6, TNF α e seus respectivos RNAm *in vitro* com várias concentrações de glicose, mostrando uma correlação positiva entre os fatores envolvidos, isto é, quanto maior a concentração da glicose, maior a produção de IL6. Observaram, também, um efeito sinérgico com a associação de proteínas glicadas e estímulo de secreção de IL6 Já com a utilização de manitol, não houve aumento na secreção de IL6, o que afastaria a possibilidade do estímulo ser resultado do aumento da

osmolaridade. Entretanto, outro estudo (Ohno e cols., 1993) não mostrou uma alteração nos níveis de IL1, IL6 e TNF α frente a maiores concentrações de glicose, nem de insulina, porém, foi observada uma menor produção de IL6 e IL1 nas culturas de monócitos de diabéticos tipo 1. Sabendo-se que a IL1 induz a produção de IL6 em monócitos, pode ser possível uma correlação entre os resultados, já no caso da secreção de TNF α , diferentemente de nossos estudos, não foi encontrada alterações no DM tipo 1. Eles utilizaram pacientes diabético tipo 1 e 2, com e sem complicações crônicas. Molvig e cols não detectaram diferença na produção de citocinas (IL1 e TNF α) em culturas de monócitos de diabéticos tipo 2 a curto prazo, a longo prazo e em controles normais.

Estudo analisando os modelos TH1 e TH2 no diabético tipo 1 também foi desenvolvido por Kallmann e cols (1999) em gêmeos discordantes. Os autores verificaram um aumento das citocinas que atuam no modelo TH2, no caso, IL4 e IL10, nos gêmeos diabéticos, resultado semelhante ao obtido neste trabalho. Neste estudo não detectaram alterações nas citocinas que atuam no modelo TH1 (IFN γ e TNF α). Entretanto, cabe salientar que no presente trabalho as citocinas Th1 avaliadas foram diferentes das avaliadas no trabalho de Kallmann e cols, onde também não há descrição do controle metabólico dos pacientes. Pickup e cols (2000) confirmam nossos dados em relação as dosagens de IL6 e TNF α em culturas não estimuladas, sendo que

nesse estudo, estas citocinas apresentavam-se diminuídas nos diabéticos em relação aos controles.

A baixa produção de citocinas nas culturas de células dos indivíduos diabéticos sugere uma deficiência na capacidade das células mononucleares de responder a um estímulo antigênico, podendo ser um dos motivos do maior desenvolvimento de infecções em indivíduos diabéticos.

BIBLIOGRAFIA

Asrar A. M. A. E.; Maimone D.; Morse P. H.; Gregory S.; Reder A. T.
Cytokines in the vitreous of patients with proliferative diabetic
retinopathy. *American Journal of Ophthalmology*, v.114, p. 731-736,
1992

Beam T.R.J.; Crigler E.D.; Goldman J.R. ;Schifmann G.: Antibody response
to polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine in diabetics. *Journal
American of Medicine Association*, v. 244, p. 2641-2644, 1980

Beutler B.; Cerami A.: Cachectin (tumor necrosis factor): a macrophage
hormone governing cellular metabolism and inflammatory response
Endocrine reviews,v.9, p. 57-66, 1988

Border W.A. ; Noble N.A.; Yamamoto T.; Harper J.R.; Yamaguchi Y.;
Pierschbacher M.D.; Ruoslahti E.: Natural inhibitor of transforming growth
factor β protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature*
v.360, p.361-364, 1992

Brownlee M. ; Cerami A. ;Vlassara H. : Advanced glycosylation end products
in tissues and the biochemical basis of diabetic complications. *The New
England Journal of Medicine*,v.318, p.1315- 1321, 1988

- Catell J.V. ; Gomez Lechon ; David M. ; Hirco T. ; Kishimoto T. ; Heirich P.C.
Recombinant human interleukin 6 (IL6/BSF2/HSF) regulates the synthesis of acute phase protein in human hepatocytes. *FEBS letter* v.232, p. 347-350, 1988
- Clausell N.; Kalil P.; Biolo A.; Molossi S.; Azevedo M.: Increased expression of tumor necrosis factor α in diabetic macrovasculopathy. *Cardiovascular Pathology*, v.8, p.145-151, 1999
- Coleman D.L.; Ruef C.: Interleukine-6, na autocrine regulator of mesangial cell growth. *Kidney Int.*, v.41, p.604-606, 1992
- Connor Jr. T.B.; Roberts A.B.; Sporn M.B.; Danielpour D.; Dart L.L.; Michels R.G.; de Bustros S.; Enger C.; Kato H.; Lansing M.; Hayashi H.; Glaser B.M.: Correlation of fibrosis and transforming growth factor β type 2 levels in the eye. *Journal Clinical Investigation* , v.83, p.1661-1666, 1989
- Cope A. P.; Liblau R. S.; Yang X. D.; Congia M.; Laudanna C.; Schreiber R. D.; Probert L.; Kollias G.; McDevitt H. O.: Chronic tumor necrosis factor alters T cell responses by attenuating T cell receptor signaling. *Journal of Experimental Medicine*, v.185, p.1573-1584, 1997

- Ding A.; Nathan C. F.; Graycar J.; Derynck R.; Stuehr D.J.; Srimal S.: Macrophage deactivating factor and transforming growth factors inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN γ . *The Journal of Immunology*, v.145, p.940-944,1990
- Doi T.; Hattori M.; Agodoa L.Y.; Sato T.; Yoshida H.; Striker L.J.; Striker G. E. Glomerular lesions in nonobese diabetic mice: before and after the onset of hyperglycemia. *Laboratory Investigation*, v.2, p.204-212,1990
- Eisenbarth G. S.: Type 1 diabetes- a chronic autoimmune disease. *The New England Journal of Medicine*, v.314, p.1360-1368, 1986
- Fernández-Real J.M.; Ricart W.: Insulin resistance and inflammation in a evolutionary perspective: the contribution of cytokine genotype/phenotype to thriftiness. *Diabetologia*, v.42, p.1367-1374,1999
- Foss M.C.; Foss N.T.; Pacolla G.M.G.F.; Silva C.L.: Serum levels of tumor necrosis factor in insulin-dependent diabetic patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.25 , p.239-242, 1992

- Geerlings S.E.; Hoepelman I.M.: Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v.26, p.259-265,1999
- Hancu N.; Netea M.G.; Baciuc I.: High glucose concentrations increase the tumor necrosis factor- alpha production capacity by human peripheral blood mononuclear cells. *Romania Journal of Physiology*. v.35, p.325-330, 1998
- Hellmich B. ; Schellner M.; Schatz H.; Pfeiffer A.: Activatin of transforming growth factor- β in diabetic kidney desease. *Metabolism* , v.49, p.353-359, 2000
- Hofmann C.; Lorenz K.; Braithwaite S. S.; Colca J. R.; Palazuk B. J.; Hotamisligil G. S.; Spiegelman B.M.: Altered gene expression for tumor necrosis factor- α and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology*, v. 134, p. 264-270, 1994

Hostens K.; Pavlovic D.; Zambre Y.; Ling Z.; Van Schravendijk C.; Eizirik D.L.; Pipeleers D. G.: Exposure of human islets to cytokines can result in disproportionately elevated proinsulin release. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 104, p.67-72,1999

Hotamisligil G. S.; Spiegelman B. M.: Tumor necrosis factor α : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*, v.43, p.1271-1278, 1994

Imani F.; Horii Y.; Suthanthiran M.; Skolnik E. Y.; Makita Z.; Sharma V.; Sehajpal P.; Vlassara H.: Advanced glycosylation end product-specific receptors on human and rat T-lymphocytes mediate synthesis of interferon γ : role in tissue remodeling. *Journal Experimental Medicine* v. 178, p.2165-2172,1993

Joshi N.; Caputo G.M.; Weitekamp M.R.; Karchmer A. W.: Infections in patients with diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, v.341,p.1906-1912, 1999

- Kallmann B.A.; Lampeter E.F.; Hanifi-Moghaddam P.; Hawa M.; Leslie R.D.; Kolb H.: Cytokine secretion patterns in twins discordant for Type 1 diabetes. *Diabetologia*, v.42, p.1080-1085, 1999
- Katz S.; Klein B.; Elian I.; Fishman P. ; Djaldetti M.: Phagocytotic activity of monocytes from diabetic patients. *Diabetes Care* , v.6, p. 479-482, 1983
- Lang C. H.; Dobrescu C.; Bagby G.J.: Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology*, v.130, p.43-52,1992
- Lechleitner M.; Koch T.; Herold M.; Dzien A.; Hoppichler F. : Tumour necrosis factor-alpha plasma level in patients with type 1 diabetes mellitus and its association with glycaemic control and cardiovascular risk factor. *Journal of Internal Medicine*, v.248, p.67-76,2000
- Lopes-Virella M.F.; Virella G.: Cytokines , modified lipoproteins and arteriosclerosis in diabetes. *Diabetes*, v. 45, p.S40-S44,1996

- Makita Z.; Radoff S.; Rayfield E.J. ; Yang Z.; Skolnik E.; Delaney V.;
Friendman E. A.; Vlassara H.: Advanced glycosilation end products in
patients with diabetic nephropathy. *The New England Journal of Medicine*,
v.325, p.836-842,1991
- Mantovani A.; Bussolino F.; Introna M.: Cytokine regulation of endothelial
cell function: from molecular level to the bedside. *Immunology Today*,
v.18, p.231-239,1997
- Mayer A.; Rharbaoui F.; Thivolet C.; Orgiazzi J.; Madec A.M.: The
relationship between peripheral T cell reactivity to insulin, clinical
remissions and cytokines production in type 2 (Insulin-dependent)
Diabetes Mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*,
v.84, p.2419-2424,1999
- Molvig J.; Pociot F.; Back L.; Worsaae H.; Dall Wogensen L.; Christensen P.;
Staub-Nielsen L.; Mandrup-Poulsen T.; Manogue K.; Nerup J.: Monocyte
function in IDDM patients and healthy individuals. *Scandinavian Journal
of Immunology*,v.32, p.297-311,1990

- Mooradian A.D.; Reed R. L.; Meredith K.E.; Scuderi P. :Serum level of tumor necrosis factor and IL-1 α and IL-1 β in diabetic patients. *Diabetes Care*, v.14,p. 63-65, 1991
- Morohoshi M.; Fujisawa K.; Uchimura I.; Numano F.: Glucose-dependent interleukin 6 and tumor necrosis factor production by human peripheral blood monocytes in vitro. *Diabetes*, v.45, p.954-959, 1996
- Morohoshi M.; Fujisawa K.; Uchimura I.; Numano F.: The effect of glucose and advanced glycosylation end products on IL-6 production by human monocytes. *Annals New York Academy of Sciences*, v.15, p.562-570,1993
- Mosmann T. R.; Coffman R. L.: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties
Annals Ver. Immunology, v. 7, p.145-173,1989
- Mysliwska J.; Zorena K.; Bakowska A.; Skuratowicz- Kubica A.; Mysliwski A.: Significance of tumor necrosis factor α in patients with long- standing type-1 diabetes mellitus. *Hormone and Metabolic Research*, v. 30, 158-161,1998

- Nahman N.S.; Leonhart K.L.; Cosio F.G.; Hebert C.L.: Effects of high glucose on cellular proliferation and fibronectin production by cultured human mesangial cells. *Kidney International*, v. 41, p.396-402, 1992
- Ofei Francis; Hurel S.; Newkirk J.; Sopwith M.; Taylor R.: Effects of a engineered human anti-TNF α antibody on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes*, v.45, p.881-885, 1996
- Ohno Y.; Aoki N.; Nishimura A.: In Vitro production of interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in insulin dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.77, p.1072-1077,1993
- Pankewycs O. G.; Guan J.; Benedict J. F.: Cytokines as mediators of autoimmune diabetes and diabetes complications. *Endocrine Reviews*, v.16, p.164-176,1995
- Pfeiffer A.; Janott J.; mohlig M.; Ristow M.; Rochlitz H. ; Busch K.; Schatz H.; Schifferdecker E.: Circulation tumor necrosis factor α is elevated in male but not in female patients with type II diabetes mellitus. *Hormone and Metabolic Research*, v. 29, p.111-114, 1997

- Pickup J. C.; Crook M. A. : Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia*, v. 41, p.1241-1248, 1998
- Pickup J. C.; Chusney G.D.; Thomas S. M.; Burt D.: Plasma interleukin-6, tumor necrosis factor α and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Science*, v.67, p.291-300, 2000
- Ptak W.; Klimek M.; Bryniarski K.; Ptak M.; Majcher P.: Macrophage function in alloxan diabetic mice: expression of adhesion molecules, generation of monokines and oxygen and NO radicals. *Clinical Experimental Immunology*, v.114, p.13-18, 1998
- Rabinovitch A.: An update on Cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes/Metabolism Reviews*, v.14, p.129-151, 1998
- Rabinovitch A.: Roles of cytokines in IDDM pathogenesis and islet β cell destruction . *Diabetes Review*, v. 1, p. 215-240 , 1994

- Rabinovitch A.: Immunoregulatory and cytokine imbalance in the pathogenesis of IDDM. *Diabetes*, v.43, p. 613-621, 1993
- Reinhold D., Ansorge S., Schleicher E.D.: Elevated glucose stimulate transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), suppress interleukin IL-2, IL-6, and IL-10 production and DNA synthesis in peripheral blood mononuclear cells. *Hormone and Metabolic Research*, v.26, p.267-270,1996
- Sandler S.; Andersson A. Secretion, insulin biosynthesis and oxidative metabolism of isolated rat pancreatic islets. *Endocrinology*, v.121, p.1424-1431,1987
- Schreyer S. A.; Chua S. C.; LeBoeuf R. C.: Obesity and Diabetes in TNF- α receptor- deficient mice. *Journal Clinical Investigation*, v.102, p.402-411,1998
- Sica A.; Wang J.M.; Colotta F.; Dejana E.; Mantovani A.; Oppenheim J.J.; Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL1 and tumor necrosis factor. *Journal of Immunology* , v.144, p.3034-3038, 1990

- Tater D.; Tepaut B.; Bercovici J.P.; Youinou P. : Polymorphonuclear cell derangements in type 1 diabetes. *Hormone and Metabolic Research* , v. 19, p. 642-647, 1987
- Trotta P.P.: Cytokines: an overview. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.25, p.137-141, 1991
- Vlassara H.; Brownlee M.; Manogue K.R.; Dinarello C.A.; Pasagian A.: Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose- modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science*, v. 240, p.1546-1548,1988
- Vlassara H.; Striker L.; Teichberg S.; Fuh H.; Li Y. M.; Steffes M. : Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats . *Proc. Natural Academic Science*, v. 91, p. 11704-11708, 1994
- Wang J.M.; Walter S.; Mantovani A. : Re- evaluation of the chemotatic activity of tumor necrosis factor for monocytes. *Immunology Today*, v.71, p.364-367, 1990

Wolf G.; Sharma K.; Chen Y.; Ericksen M.; Ziyadeh F.N. : High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF- β .
Kidney, v.46 , p. 647-656, 1992

RESUMO

RESUMO

O diabetes mellitus tipo 1 é uma situação patológica endócrino-metabólica humana , de evolução crônica , caracterizada por complicações que comprometem a qualidade e sobrevida do indivíduo, destacando-se as angiopatias, a neuropatia e a maior suscetibilidade às infecções. As citocinas têm grande importância na etiopatogênese do diabetes mellitus do tipo 1 e atualmente têm se estudado suas relações com algumas destas complicações. O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento imunocelular de pacientes diabéticos do tipo 1 através da medida da linfoproliferação in vitro e da determinação dos níveis de citocinas (IL1, IL2, IL4, IL6 e TNF α) no soro destes pacientes e em sobrenadante de culturas de células mononucleares do sangue periférico dos mesmos. Células mononucleares de 17 pacientes diabéticos foram colocadas em culturas na presença de LPS (10 μ g/ ml) e IFN γ (50U/ml) durante 72 horas e a linfoproliferação foi medida pela incorporação de 3H-timidina pelas células e a radioatividade, em contagem por minuto (com) foi verificada em contador de radiação β . As citocinas foram determinadas por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados dos

indivíduos diabéticos foram comparados com um grupo controle de 15 indivíduos normais. O índice de estimulação foi calculado através da incorporação de 3H timidina, após a estimulação com PHA em relação a incorporação das culturas não estimuladas. Foi evidenciado uma linfoproliferação significativamente maior nas células mononucleares do grupo controle (89 ± 25) em relação às dos indivíduos diabéticos ($48,3 \pm 20,5$). Os níveis de IL1, IL6 e TNF α estavam elevados no soro dos pacientes diabéticos ($6,0 \pm 5,7$; $5,7 \pm 3,2$ e $139,1 \pm 68,8$ ng/ml) quando comparados com os indivíduos controles ($0,7 \pm 0,2$; $1,6 \pm 0,7$ e $38,9 \pm 15,1$ ng/ml), no entanto, os níveis de IL1, IL6 e TNF α no sobrenadante das culturas dos pacientes diabéticos ($21,2 \pm 17,6$; $3,53 \pm 2,9$ e $25,0 \pm 13,3$ ng/ml) foram significativamente menores que os níveis do grupo controle ($67,0 \pm 30,5$; $13,8 \pm 5,5$ e $61 \pm 17,7$ ng/ml). Os níveis de IL2 tanto no soro como no sobrenadante das culturas de células foram significativamente menores nos indivíduos diabéticos ($16,7 \pm 11,2$ e $17,9 \pm 14$ ng/ml) que nos controles normais ($30,2 \pm 4,3$ e $45,2 \pm 26$ ng/ml). Em contraste, os níveis de IL4 tanto no soro ($27,7 \pm 13,8$ ng/ml) como no sobrenadante das células dos pacientes diabéticos ($41,6 \pm 23,4$ ng/ml) foram mais elevados quando comparados ao grupo controle ($3,2 \pm 1,6$ e $14,3 \pm 11,6$ ng/ml). Os níveis séricos elevados de IL1, IL4, IL6 e TNF α observados nos pacientes diabéticos sugerem que os mecanismos de ativação

macrofágica são desenvolvidos durante a evolução do diabetes, mas a resposta macrofágica pode ser negativamente controlada pela ação da IL4. A baixa produção de citocinas nas culturas de células dos indivíduos diabéticos sugere uma deficiência na capacidade das células mononucleares de responder a um estímulo antigênico, podendo ser um dos motivos do maior desenvolvimento de infecções em indivíduos diabéticos.

ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus is an human endocrine-metabolic pathological condition with a chronic course that affects the survival and quality of life of individuals, mainly by vascular complication, neuropathy and the increase incidence of infections. It has been demonstrated that cytokines have an important influence in the pathogenesis of type 1 diabetes. Recently, studies about the relationship between cytokines and chronic complication have been reported. The aim of this study was to evaluate the cellular immunological response in type 1 diabetic patients using the measure of lymphoproliferation rate and cytokine levels (IL1, IL2, IL4, IL6 e $TNF\alpha$) in serum and culture supernatants of peripheral blood monocytes cells. Monocytes cells of 17 diabetic patients were cultured with LPS (10μ g/ml) and $IFN\gamma$ (50 U/ml) for 72 hours and the lymphoproliferation was measured by the incorporation of 3H-thymidine. Cytokines were assayed in serum and cultured cell supernatants by enzyme immunoassay (ELISA). The results of diabetic patients were compared with a control group of 15 healthy

non diabetic subjects. The stimulation index in response to PHA of cultured cells showed significantly higher values in the control group (89 ± 25) than in diabetic patients ($48,3 \pm 20,5$). The serum levels of IL1, IL6 and TNF α were higher in the diabetic patients ($6,0 \pm 5,7$; $5,7 \pm 3,2$ e $139,1 \pm 68,8$ ng/ml) than in control subjects ($0,7 \pm 0,2$; $1,6 \pm 0,7$ e $38,9 \pm 15,1$ ng/ml), whereas the level of IL1, IL6 e TNF α in supernatants of cultured cells was significantly lower in diabetic patients ($21,2 \pm 17,6$; $3,53 \pm 2,9$ e $25,0 \pm 13,3$ ng/ml) than in control subjects ($67,0 \pm 30,5$; $13,8 \pm 5,5$ e $61 \pm 17,7$ ng/ml). IL2 level was significantly lower in diabetic patients ($16,7 \pm 11,2$ e $17,9 \pm 14$ ng/ml), both in serum and supernatants of cultured cells than in the control group ($30,2 \pm 4,3$ e $45,2 \pm 26$ ng/ml). In contrast , IL4 was higher in the serum ($27,7 \pm 13,8$ ng/ml) and supernatants ($41,6 \pm 23,4$ ng/ml) in diabetic patients than in non diabetic group ($3,2 \pm 1,6$ e $14,3 \pm 11,6$ ng/ml). The higher serum levels of IL1, IL4, IL6, TNF α observed in diabetic patients suggest the presence of macrophage activation process in the course of diabetes, but the macrophage response could be impaired by the action of the IL4. The lower production of cytokines by the cultured cells of diabetic patients suggests a deficient response of monocytes to an antigenic stimulation , that could be responsible for the increased incidence of infections in the diabetic subjects.