

GESSILDA ALCANTARA NOGUEIRA DE MELO

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO DO
DIABETES TIPO 2 SOBRE A RESPOSTA
INFLAMATÓRIA EM RATOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Maringá,
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Kenji
Nakamura Cuman

MARINGÁ
2003

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GESSILDA ALCANTARA NOGUEIRA DE MELO

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO DO DIABETES
TIPO 2 SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA
EM RATOS**

Dissertação apresentada à Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Miriam Hideco Takahashi
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a Dr^a Ciomar Aparecida Bersani Amado
Universidade Estadual de Maringá

Orientador: Prof^o Dr. Roberto Kenji Nakamura Cuman
Universidade Estadual de Maringá

Dedico este trabalho

Ao meu esposo, Valdemar, aos meus pais, Matias e Iracema, a minha irmã Luciana, as minhas filhas, Mariana e Gabriela pelo incentivo, carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Roberto Kenji Nakamura Cuman, meus sinceros agradecimentos, não apenas pela orientação firme e segura demonstrada na elaboração deste trabalho, mas também pelo incentivo, confiança e amizade nesses anos de convivência.

A professora Ciomar Aparecida Bersani Amado, pela amizade, pelos conhecimentos transmitidos e pela confiança depositada.

Aos funcionários e amigos Jailson Araújo Dantas e Célia Regina Miranda, pela importante colaboração nos experimentos que compõe este trabalho.

RESUMO

A resposta inflamatória está diminuída em ratos portadores de diabetes mellitus tipo 2. O objetivo deste trabalho foi investigar a influência do tratamento com metformina (300mg/kg) e clorpropamida (200mg/kg) sobre esta resposta alterada. O estado diabético foi induzido pela injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (160mg/kg) em ratos machos Wistar neonatos. O diabetes foi caracterizado através da determinação da glicosúria 7 semanas após o tratamento com STZ. Os animais diabéticos foram tratados com metformina ou clorpropamida, por via oral, em dose única diária, durante 7, 14 e 21 dias. A resposta inflamatória foi avaliada pela formação do edema de pata e pelo teste da pleurisia induzidos pela carragenina. O tratamento com metformina por 7, 14 e 21 dias não restaurou a resposta inflamatória dos animais diabéticos. Entretanto, o tratamento com clorpropamida por 7 e 14 dias corrigiu esta resposta. Os resultados obtidos indicam que na correção da resposta inflamatória, neste modelo experimental de diabetes, podem estar envolvidos os mecanismos de liberação e manutenção dos níveis circulantes de insulina, sugerindo o papel pró-inflamatório deste hormônio.

Palavras chaves: diabetes tipo 2; resposta inflamatória; drogas antidiabéticas.

ABSTRACT

The inflammatory response is decreased in type 2 diabetes. The aim of this work was to investigate the influence of metformin and chlorpropamide treatment on these altered responses. The diabetic state was induced by streptozotocin injection (160mg/kg) in male newborn Wistar rats. Diabetes was confirmed by the presence of glucose in 24h urine 7 weeks after diabetes induction. The animals were treated with metformin (300mg/kg) or chlorpropamide (200mg/kg), *per os*, one daily dose during 7, 14 and 21 days. The inflammatory response was evaluated using paw edema and pleurisy test induced by local carrageenan injection. The metformin treatment during 7, 14 and 21 days did not restore the inflammatory response in diabetics rats. However, chlorpropamide treatment during 7 and 14 days corrected this altered response. The results showed that the normalization of the inflammatory response in this experimental diabetes model would involve insulin release mechanisms and sustained circulating levels of this hormone, suggesting its pro-inflammatory role.

Keywords: type 2 diabetes; inflammatory response; antidiabetic drugs.

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO	09
II - OBJETIVO	19
III - MATERIAIS E MÉTODOS	20
1. Animais	20
2. Indução do diabetes tipo 2	20
3. Caracterização do estado diabético	20
3.1. Determinação da glicosúria	20
4. Teste de tolerância à glicose	21
5. Tratamento com drogas antidiabéticas	21
6. Estudo da resposta inflamatória	22
6.1. Produção do edema de pata	22
6.2. Produção da pleurisia	23
7. Análise estatística	25
8. Drogas e reagentes	26
IV – RESULTADOS	27
1. Determinação da concentração de glicose na urina	27
2. Determinação da concentração de glicose sangüínea – teste de tolerância à glicose	27
2.1. Efeito do tratamento com tratamento com metformina sobre o teste de tolerância à glicose	27
2.2. Efeito do tratamento com tratamento com clorpropamida sobre o teste de tolerância à glicose	28

3. Efeito do tratamento com fármacos antidiabéticos sobre o desenvolvimento da resposta inflamatória em ratos	29
3.1. Efeito do tratamento com metformina sobre o desenvolvimento da resposta inflamatória induzida pela carragenina em pata de rato	29
3.2. Efeito do tratamento com clorpropamida sobre o desenvolvimento da resposta inflamatória induzida pela carragenina em pata de rato	30
3.3. Efeito do tratamento com metformina e clorpropamida sobre a pleurisia induzida pela carragenina	30
V – DISCUSSÃO	45
VI – CONCLUSÕES	53
VII – REFERÊNCIAS	55

I – INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante da falta absoluta ou relativa de insulina, que pode estar ou não associada à deficiência na ação deste hormônio. Pode ser classificado como diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, outros tipos específicos e diabetes gestacional (THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 1997).

O diabetes tipo 1 é dividido em diabetes imune-mediado e diabetes idiopático. O primeiro resulta da destruição auto-imune das células β -pancreáticas (ATKINSON & MACLAREN, 1994). O diabetes idiopático não possui etiologia conhecida. Alguns pacientes apresentam insulinopenia permanente, são predispostos à cetoacidose, portanto, portadores desta patologia não sobrevivem sem a reposição de insulina (THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 1997).

O diabetes tipo 2 se origina aparentemente pela redução da secreção de insulina e/ou da sensibilidade de tecidos alvo para a ação da insulina. Pacientes com diabetes tipo 2 caracterizam-se por sobreviverem longos períodos sem a reposição de insulina, apesar de diversos indivíduos receberem este hormônio para melhorar o seu controle glicêmico (PICKUP & WILLIAMS, 1991).

Na literatura há alguns modelos experimentais em animais que se aproximam do diabetes humano. Para o estudo do diabetes tipo 1, normalmente utilizam-se modelos cuja administração de drogas, em animais

adultos, causam a destruição do pâncreas ou este órgão é removido (pancreatectomia). Já o diabetes tipo 2 pode ser reproduzido em modelo experimental após a administração de drogas em animais recém-nascidos.

Vários trabalhos demonstram o envolvimento da insulina no desenvolvimento da resposta inflamatória e mostram que muitos aspectos desta resposta são afetados pelo estado diabético.

Edlung et al. (1952) verificaram que o edema induzido pela dextrana estava diminuído em ratos diabéticos tipo 1 e atribuíram este efeito à própria aloxana e não ao estado diabético. Subsequentemente, outros estudos revelaram que independente do efeito imediato que a aloxana possa ter, a resposta inflamatória reduzida em animais diabéticos estaria obviamente relacionada ao próprio estado diabético do animal. Neste sentido, Garcia-Leme et al. (1973) verificaram que a reação inflamatória induzida pela dextrana, carragenina ou sulfato de celulose, estava marcadamente reduzida em ratos tornados diabéticos pela injeção de aloxana ou em ratos submetidos a pancreatectomia subtotal. Por outro lado, em animais diabéticos tipo 2 foi demonstrado que a formação do edema de pata induzido pela carragenina estava reduzido, enquanto que pela dextrana, a resposta foi semelhante para animais diabéticos e controles (CUMAN et al., 2001). Ainda, no diabetes tipo 1, Garcia-Leme et al. (1973) observaram que a resposta inflamatória também estava diminuída em animais diabéticos tornados normoglicêmicos após um período de jejum. A administração de insulina, antes da injeção do irritante, reverteu tal inibição, sugerindo que a deficiência de insulina, mais do que a hiperglicemia, parece ser o fator responsável pela redução da resposta inflamatória nos animais diabéticos

(GARCIA-LEME et al., 1973, 1974). No diabetes tipo 2, o tratamento com insulina promoveu redução da glicemia de animais diabéticos, sem contudo reverter as alterações da resposta inflamatória observada neste modelo experimental (CUMAN et al., 2001).

A inibição do desenvolvimento da resposta inflamatória nos animais diabéticos parece estar relacionada, pelo menos em parte, as alterações vasculares e celulares que ocorrem neste estado. Vários estudos demonstram que a reatividade e as propriedades dos vasos sanguíneos estão alteradas no animal diabético (ALTURA et al., 1979; LLORACH et al., 1976; GARCIA-LEME, 1981; FORTES et al., 1983a, b, 1984; LONGHURST & HEAD, 1985). Foi observado que o estado diabético tipo 1 não altera a liberação de substâncias endógenas vasoativas como histamina, serotonina e bradicinina; porém, altera a resposta vascular dos animais a estes fatores de permeabilidade. Estes fatos sugerem que se um agente inflamatório é capaz de liberar substâncias que afetam a permeabilidade vascular em animais diabéticos, seu efeito final sobre os vasos pode estar reduzido, sugerindo uma influência da insulina no controle da permeabilidade vascular e, portanto, na inflamação (GARCIA-LEME et al. 1973, 1974). Entretanto, em ratos diabéticos tipo 2, foi observado que a diminuição da resposta de aumento da permeabilidade vascular induzido pela serotonina e bradicinina, não era revertida pelo tratamento com insulina, mas pela remoção das adrenais (adrenalectomia) sugerindo, portanto, a participação de corticóides endógenos na diminuição da resposta inflamatória neste modelo experimental de diabetes (CUMAN et al., 2001).

Outras observações indicam que a reação celular no foco de lesão se

encontra alterada no animal diabético dependente de insulina e, isto parece estar associado tanto a uma diminuição da resposta migratória de leucócitos a agentes quimiotáxicos (PEREIRA et al., 1987) como a uma redução da atividade fagocítica dos leucócitos (BAGDADE et al., 1970; TAN et al., 1975). Sannomiya et al. (1990) verificaram que a alteração da capacidade migratória dos leucócitos pode ser devida à presença de um fator protéico existente no plasma de animais diabéticos, o qual interage com receptores de neutrófilos para agentes quimiotáxicos derivados do complemento, e que a resposta pode ser restaurada após tratamento do animal com insulina. Fortes et al. (1991) observaram ainda, que os animais tornados diabéticos pela injeção de aloxana apresentavam uma redução marcada do número de leucócitos "rollers" sugerindo uma interação leucócito-endotélio defeituosa. Esta alteração foi revertida após o tratamento dos animais com insulina. Em animais diabéticos tipo 2, não foi observada alteração da resposta migratória de leucócitos em experimentos de pleurisia induzida pela carragenina (CUMAN et al., 2001).

A indução do diabetes tipo 2 (experimental) pode ser realizada através da injeção intraperitoneal ou subcutânea de estreptozotocina em ratos recém-nascidos, com dois dias de idade. Neste modelo, proposto por Bonner-Weir et al. (1981), ocorre uma hiperglicemia dois a quatro dias após a injeção de estreptozotocina, quando então os níveis de glicose plasmática permanecem próximos ao normal até a sexta semana de idade. A partir de então, os animais desenvolvem um estado de hiperglicemia permanente, e quando submetidos ao jejum, apresentam concentrações de glicose plasmática variando entre 200 a 350 mg/dL. A injeção de estreptozotocina

induz um estado de diabetes pouco severo, onde o animal apresenta pequena alteração de peso corporal à semelhança do diabetes mellitus tipo 2 (DULIN & SORET, 1978; WEIR et al., 1981).

Uma possibilidade para justificar a resposta diminuída das células β à glicose, neste modelo experimental, seria que a estreptozotocina administrada em ratos recém-nascidos, os quais apresentam uma população heterogênea de células β , destruiria apenas as células β sensíveis à glicose provocando defeito crônico no mecanismo de secreção de insulina dependente de glicose (WEIR et al., 1981). Ainda, outros estudos indicam que defeito na expressão do transportador de glicose, seria a causa da resistência à insulina observada no diabetes tipo 2 e, ainda, a dessensibilização destas células mediante a estimulação crônica com glicose poderia ser responsável pelas alterações funcionais e estruturais que ocorrem nesta patologia (LUCKENS et al., 1942; DOHAN et al., 1947). Cuman et al. (2001), utilizando este modelo ligeiramente modificado, demonstrou que estes animais apresentaram poliúria, glicosúria, intolerância à glicose, resistência à insulina e não apresentam hiperfagia e alteração no peso corporal quando comparados aos animais controles.

A sintomatologia do diabetes mellitus tipo 2 caracteriza-se por hiperglicemia, glicosúria, poliúria, e em alguns casos resistência à secreção de insulina, podendo a hiperglicemia ser devido à variações nos graus de resistência à insulina e redução na secreção deste hormônio (DE FRONZO, 1992).

No diabetes tipo 2 ocorre deterioração progressiva da função normal das células beta. Inicialmente, tecidos hepáticos e musculares perdem a

sensibilidade à ação da insulina (ERIKSSON et al., 1989; PORTE & KAHN, 2001). Nos estágios iniciais da doença, a redução na captação de glicose pelo músculo parece ser o defeito primário (GROOP, 1992), e a hiperglicemia resultante pode contribuir para a redução da função das células beta. Assim, estas células compensam a diminuição da sensibilidade à insulina pelo aumento da secreção deste hormônio. Com a progressão da doença, a redução na secreção de insulina permanece e a sensibilidade a sua ação continua a reduzir. Neste estado de diabetes, a produção hepática de glicose e a captação de glicose pelo músculo são resistentes à ação da insulina. Neste sentido, o diabetes tipo 2 pode ser caracterizado tanto por uma disfunção das células β -pancreáticas como por uma resistência dos tecidos periféricos à ação da insulina (WEIR et al., 1981; DE FRONZO, 1988).

Estudos epidemiológicos indicam que a resistência à insulina seja o provável defeito primário do diabetes tipo 2, já que ele ocorre antes do quadro de intolerância à glicose, freqüentemente quando a secreção de insulina está aumentada. Dessa forma, foi observado que em grupos de pacientes de diferentes etnias, a resistência à insulina com quadro de hiperinsulinemia precede o desenvolvimento do diabetes tipo 2 (BLOOMGARDEN, 1998).

A resistência à insulina pode ser exacerbada durante a progressão da doença devido a uma alteração na regulação do metabolismo de carboidratos e lipídeos. As células beta normalmente respondem à resistência periférica à insulina pelo aumento da secreção basal e pós-prandial deste hormônio para compensar este estado de resistência, mantendo normal ou apresentando um quadro de intolerância à glicose, mas prevenindo a deterioração da

homeostase de glicose e o diabetes tipo 2. Eventualmente, as células beta tornam-se inábeis para compensar a resistência à insulina por secretarem grandes quantidades do hormônio. Neste estágio há uma redução na secreção de insulina induzida pela glicose, alterando a homeostase da glicose levando ao subsequente diabetes (ROSAK, 2001).

Normalmente a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas reflete a magnitude da concentração de glicose sangüínea no jejum ou pós-prandial. A secreção de insulina ocorre em duas fases distintas: uma que consiste na liberação de insulina inicial e rápida (0-10 minutos), quando a concentração de glicose aumenta após a refeição (fase 1), e a outra que corresponde ao aumento sustentado na concentração de insulina circulante, de acordo com os níveis plasmáticos de glicose (fase 2) (GROOP, 1992).

A resposta normal para a glicose administrada por via intravenosa é bifásica (PORTE & PUPO, 1969). Em pacientes portadores do diabetes tipo 2, a fase 1 da secreção de insulina está reduzida ou ela não ocorre, promovendo aumento na concentração da glicose sangüínea (ERIKSSON et al., 1989). Além disso, há uma alteração na fase 2, podendo a secreção de insulina ser normal ou exarcebada (GROOP, 1992). Nesta fase, a secreção de insulina deveria aumentar com o aumento da concentração plasmática de glicose. Devido à hiperglicemia e também à deficiência na secreção do hormônio pelas células beta, as sulfoniluréias e outras drogas secretoras de insulina são utilizadas para melhorar este estado, visando a correção da hiperglicemia e o aumento da responsividade das células beta à estimulação pela glicose. Uma secreção inadequada de insulina na primeira fase inevitavelmente resulta na hiperglicemia e auxilia um estímulo maior para a

resposta da segunda fase. No último estágio da doença, a resposta a segunda fase torna-se diminuída.

Para o tratamento farmacológico do diabetes tipo 2, utilizam-se drogas que aumentam a secreção de insulina e a recaptação de glicose, dentre outros mecanismos que visam a redução da sintomatologia deste estado. Há ainda poucos recursos farmacológicos disponíveis para tratamento da resistência à ação da insulina, neste sentido tem sido estudado drogas que teriam como mecanismo a sensibilização dos tecidos à ação da insulina, como por exemplo, as do grupo das tiazolidinedionas (BAILEY, 1999).

Estudos experimentais realizados em animais mostram que os danos nas ilhotas pancreáticas devidos a prolongada hiperglicemia podem ser prevenidos por tratamento com drogas hipoglicemiantes (CLARK et al., 1982) e, alguns estudos mostram uma melhoria na resposta da insulina após a correção da hiperglicemia.

Para o desenvolvimento desta pesquisa, utilizamos fármacos clássicos para o tratamento do diabetes: a clorpropamida e a metformina. A clorpropamida é uma sulfoniluréia, que estimula a secreção de insulina e aumenta a sensibilidade dos tecidos periféricos à ação da insulina (GROOP, 1992), enquanto a metformina é um fármaco do grupo das biguanidas, que aumenta a ação da insulina nos tecidos (BAILEY, 1992; NAGI & YUDKIN, 1993).

O tratamento com fármacos antidiabéticos orais é indicado para pacientes diabéticos mantidos sob dieta alimentar, com glicemia em jejum acima de 140mg/dL e, geralmente são indicados quando a dietoterapia é ineficaz. Os antidiabéticos orais podem ser classificados em: a) sulfoniluréias

(p. ex. clorpropamida, glibenclamida e glipizida); b) biguanidas (p. ex. metformina); c) tiazolidinedionas (p. ex. rosiglitazona e pioglitazona); d) meglitinidas (p. ex. repaglinida e nateglinida); e) inibidores da alfa-glicosidase (p. ex. acarbose) (ROSAK, 2002).

As sulfoniluréias são indicadas para pacientes diabéticos que apresentam células β -pancreáticas funcionantes, com quadro estável, resistentes à cetose e que não tiveram controle adequado da glicemia apenas com dieta. Promovem aumento da secreção de insulina pelas células β e também aumento da sensibilidade dos tecidos periféricos à ação da insulina (PFEIFER et al., 1981).

Diferente das sulfoniluréias, as biguanidas não promovem hipoglicemia e a sua ação não depende de células β pancreáticas funcionantes. Para a metformina os mecanismos de ação propostos são diminuição da gliconeogênese hepática por interferência na oxidação respiratória em mitocôndria e aumento da captação de glicose mediada pela insulina em músculos esqueléticos e adipócitos, isto por aumentar a atividade da enzima tirosina quinase em receptores de insulina (KIRPICHNICHOV, 2002). Pelo seu efeito anorexígeno, promove uma redução do peso em pacientes diabéticos e obesos (HERMANN, 1979; JACKSON et al., 1987; BAILEY, 1993).

Particularmente quanto ao diabetes tipo 2, a metformina tem sido indicada quando o tratamento dietético isolado se mostra ineficiente (BAILEY, 1993). Além disso, trabalhos tem demonstrado que este fármaco pode corrigir os efeitos de resistência à insulina independentemente da HIPERGLICEMIA (MELIN et al., 1990; GALUSKA et al., 1991; WIDEN et al.,

1992). A metformina é também utilizada associada a outros antidiabéticos orais (sulfoniluréias) principalmente em casos de falência ao uso de monoterapia. Em pacientes portadores do diabetes mellitus tipo 1, a metformina pode ser adicionada ao regime terapêutico para melhorar o controle metabólico e mesmo diminuir a necessidade diária de insulina (BAILEY, 1993). Este fármaco, disponibiliza a glicose estimulada pela insulina sendo empregado na terapêutica para pacientes portadores do diabetes com resistência à insulina.

Neste trabalho, investigamos o efeito de tratamento com fármacos antidiabéticos sobre a resposta inflamatória de animais diabéticos tipo 2.

II - OBJETIVO

Considerando que:

- o modelo de diabetes induzido por estreptozotocina em ratos neonatos é caracterizado por, intolerância à glicose, resistência à insulina e hiperglicemia moderada;
- há alteração da resposta inflamatória de animais portadores do diabetes mellitus tipo 2 experimental;
- no modelo experimental de diabetes tipo 2 o tratamento com insulina não corrige as alterações da resposta inflamatória;
- a metformina e a clorpropamida são fármacos empregados no tratamento do diabetes tipo 2;

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência do tratamento com metformina e clorpropamida sobre a resposta inflamatória no diabetes induzido por estreptozotocina em ratos neonatos.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar mantidos no biotério do Laboratório de Inflamação (DFE/UEM) desde o nascimento.

2. INDUÇÃO DO DIABETES TIPO 2

Ratos com dois dias de idade foram injetados por via intraperitoneal com estreptozotocina (STZ) em dose única de 160mg/kg de peso corporal. Os animais controles foram injetados com solução tampão de citrato de sódio (10mM, pH 4,5), veículo utilizado para dissolver a STZ .

3. CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO DIABÉTICO

Entre a 7a. e 8a. semanas após a injeção de STZ os animais tratados com STZ e seus respectivos controles foram mantidos em gaiola metabólica individual por período de 24 horas (9:00 hs às 9:00 hs do dia seguinte) com alimentação e água *ad libitum*. Foi determinada a concentração de glicose presente na urina destes animais.

3.1. DETERMINAÇÃO DA GLICOSÚRIA

A determinação da concentração de glicose na urina foi realizada utilizando-se uma alíquota de 20µl da urina de 24 horas, através do método enzimático da glicose – oxidase (Labtest®). Neste método, a glicose - oxidase catalisa a oxidação da glicose produzindo o peróxido de hidrogênio. Este, através de uma reação oxidativa catalisada pela peroxidase, reage com a 4-

aminoantipirina e fenol produzindo a antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra. Os resultados foram expressos em mg/dL.

4. TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT)

Os animais mantidos em jejum por 12 horas e anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol 3%®, Fontover) (40mg/kg de peso corporal) por via intraperitoneal foram submetidos à laparotomia e exposição da veia cava inferior. Foi coletada uma amostra de 0,5mL de sangue correspondendo à glicemia basal (To). Após esta coleta inicial, foi administrada dose única de glicose (0,5g/Kg de peso corporal) por esta mesma via e foram coletadas amostras de 0,5mL de sangue nos tempos 5, 10, 20, 30 e 60 minutos após a injeção de glicose, correspondendo então a T5, T10, T20, T30 e T60. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm por cinco minutos. A glicemia foi determinada pelo método enzimático da glicose-oxidase (Labtest®).

5. TRATAMENTO COM FÁRMACOS ANTIDIABÉTICOS

Os animais diabéticos foram tratados com metformina e clorpropamida nas doses de 300mg e 200mg/Kg de peso corporal, respectivamente. Ambas foram administradas através de sonda intragástrica em dose única diária por 7, 14 e 21 dias. Os animais dos grupos controle (normoglicêmicos), diabético e diabéticos tratados, foram utilizados para posterior estudo da resposta inflamatória.

6. ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

6.1. PRODUÇÃO DE EDEMA NA PATA DO RATO

A carragenina dissolvida em salina estéril foi utilizada como agente irritante. Um volume de 0,1mL da solução de carragenina (0,5mg/mL) foi injetado na área subplantar de uma das patas posteriores do rato. A pata contralateral foi injetada com igual volume de salina (controle), conforme técnica de Winter et al. (1962).

O volume das patas até a articulação tíbio-társica foi medido a vários intervalos de tempo (1; 2; 4; 6 e 24 horas) após a injeção podal de carragenina em animais não anestesiados, com auxílio de um pletismógrafo digital (UGO BASILE ®).

O edema foi expresso em termos de aumento do volume da pata (VF) em relação ao volume inicial (VI).

$$VF - VI = \text{aumento do volume da pata } (\mu\text{L})$$

O resultado final foi obtido pela subtração dos valores controles (obtidos em patas injetadas com salina) dos valores testes (obtidos nas patas injetadas com carragenina).

Foram utilizados grupos de 8 a 10 animais para realização dos experimentos.

6.2. PRODUÇÃO DA PLEURISIA

Inicialmente, procedeu-se a coleta de amostra de sangue da cauda de cada animal para determinação da leucometria total e diferencial. Os animais foram anestesiados com éter etílico, submetidos a tricotomia e receberam a injeção na cavidade intrapleural de 50µg/animal de carragenina

diluída em 0,25mL de tampão PBS na região do mediastino direito, entre a 3° e 4° costelas, de acordo com a técnica descrita por Vinegar et al. (1973). A carragenina foi utilizada em forma de suspensão em tampão PBS.

Após 4 horas da injeção do agente irritante foi realizada nova coleta de sangue para a determinação do leucograma total e diferencial. Os animais foram sacrificados e do exsudato coletado da cavidade intrapleural, foram determinados os seguintes parâmetros: o volume e o número de leucócitos.

Foram utilizados grupos de 8 a 10 animais para realização dos experimentos.

6.2.1. Volume de exsudato

Na 4° hora após a injeção de carragenina, os animais foram anestesiados com éter etílico e sacrificados por decapitação. Em cada animal, o mediastino foi aberto através de uma incisão mediana e o exsudato colhido com pipeta de Pasteur. O exsudato foi colocado em tubos de centrifuga graduados de polietileno e o seu volume determinado. Procedeu-se à lavagem da cavidade pleural com 2 mL de tampão PBS heparinizado (25UI/mL) e o material coletado foi colocado no tubo contendo o exsudato, sendo o volume final de 3 mL completado com o tampão. O material foi homogeneizado por inversão lenta, sendo retirada uma alíquota de 50µL para a contagem total de células em câmara de Neubauer. O restante foi centrifugado a 1500 rpm durante 5 minutos para a contagem diferencial de leucócitos.

6.2.2. Leucometria global

À alíquota de 50µL do homogenado foi adicionada a 950µL do líquido de Turk (COSTA CURTA, 1969) e usada para contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos em células/mm³ x 10³.

6.2.3. Leucometria diferencial

O precipitado celular obtido após centrifugação foi utilizado para preparação de lâminas, sendo estas coradas com solução corante de Leishman. Foi determinado o número de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares presentes no exsudato.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e foram analisados utilizando o teste t de Student quando duas médias foram comparadas ou análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações.

A análise da área sob a curva foi obtida a partir das curvas do teste de tolerância à glicose, determinada pelo programa Graphpad Prism® - (Graphpad Software Inc., Microsoft Corp.)

8. DROGAS E REAGENTES

Ácido acético Glacial (Merck), Azul de metileno (Reagen), Carragenina (Sigma), Citrato de Sódio (Merck), Cloreto de sódio (Synth), Clorpropamida (Diabinese®, Pfizer), Eosina/azul de metileno (Reagen), Estreptozotocina (Sigma), Éter Etílico (Reagen), Fosfato monobásico de sódio (Merck), Fosfato dibásico sódico hidratado (Merck), Glicose (Ecibra), Heparina (Liquemine®, Roche), Kit enzimático da glicose-oxidase (Labtest®). Metformina (Glucoformin ®, Biobrás), Pentobarbital Sódico (Hypnol®, Fontover).

IV – RESULTADOS

1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NA URINA

A concentração de glicose na urina dos ratos tratados com STZ foi de $1022 \pm 95,4$ mg/dL. Nos animais controles o valor médio de glicose na urina foi de $49,5 \pm 6,5$ mg/dL.

2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE SANGÜÍNEA - TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

2.1. EFEITO DO TRATAMENTO COM METFORMINA SOBRE O TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

As concentrações de glicose sangüínea determinadas pelo teste de tolerância à glicose estão apresentadas na figura 1 para os tratamentos com metformina durante 7, 14 e 21 dias. Os valores médios da glicemia no T0 (antes da injeção intravenosa de glicose - 0,5mg/kg) foram de $93,74 \pm 7,83$ mg/dL para os ratos controles, de $127,26 \pm 12,27$ mg/dL para os ratos diabéticos e para ratos diabéticos tratados com metformina durante 7, 14 e 21 dias foram respectivamente de $148,48 \pm 8,13$ mg/dL, $142,01 \pm 8,40$ mg/dL e $136,5 \pm 6,4$ mg/dL. Como podemos observar nos tempos de 5, 10, 20, 30 e 60 minutos após a injeção intravenosa de glicose os valores médios da glicemia foram significativamente maiores nos ratos diabéticos e diabéticos tratados com metformina quando comparados aos controles, indicando que o tratamento com metformina não corrige as alterações no GTT realizado em animais diabéticos. Para os diferentes grupos o pico máximo da glicemia ocorreu 5 minutos após a administração de glicose, sendo que a partir deste

tempo houve um declínio da concentração sangüínea desta substância. Além disso, pela análise da área sob a curva, obtida a partir das curvas do teste de tolerância à glicose, verificamos que a área foi maior para ratos diabéticos ($20230 \pm 1047 \text{mg/dL} \cdot \text{min}^{-1}$) e para os ratos diabéticos tratados com metformina 7, 14 e 21 dias ($30897,5 \pm 1186,4 \text{mg/dL} \cdot \text{min}^{-1}$; $22921,3 \pm 1221,4 \text{mg/dL} \cdot \text{min}^{-1}$ e $17460 \pm 810,8 \text{mg/dL} \cdot \text{min}^{-1}$), respectivamente (Tabela 1; Figura 2). Estes dados indicam que o tratamento com metformina não corrigiu as alterações no GTT de ratos diabéticos.

2.2. EFEITO DO TRATAMENTO COM CLORPROPAMIDA SOBRE O TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

As concentrações de glicose sangüínea determinadas pelo teste de tolerância à glicose estão apresentadas na figura 3 para os tratamentos com clorpropamida durante 7 e 14 dias. Os valores basais de glicemia observados para o tratamento com clorpropamida durante 7 e 14 dias, foram de $119,0 \pm 8,8$ e $102,97 \pm 10,50 \text{mg/dL}$ respectivamente. Já ratos controles apresentaram como valores médios de glicemia no T0 $93,74 \pm 7,83 \text{mg/dL}$. Este fato sugere que a clorpropamida atua sobre a glicemia basal de animais diabéticos produzindo uma redução da concentração de glicose sangüínea. Para ambos os grupos o pico máximo da glicemia ocorreu 5 minutos após a injeção de glicose, sendo que a partir deste tempo houve um declínio da concentração de glicose. Como podemos observar nos tempos de 5, 10, 20, 30 e 60 minutos após a injeção intravenosa de glicose os valores médios da glicemia foram significativamente maiores nos ratos diabéticos. Entretanto, os animais que receberam tratamento com clorpropamida durante 14 dias

apresentaram resultados semelhantes aos controles, indicando que o tratamento com clorpropamida durante 14 dias corrigiu as alterações no GTT realizado em animais diabéticos.

No estudo da área sob a curva realizado com animais diabéticos ($20230 \pm 1047 \text{mg/dL.min}^{-1}$) e diabéticos tratados com clorpropamida durante 7 dias ($19360 \pm 881 \text{mg/dL.min}^{-1}$), observamos que, houve diferença significativa entre os valores apresentados pelos animais controles ($13620 \pm 896 \text{mg/dL.min}^{-1}$) (Tabela 2; Figura 4). Entretanto, o tratamento com clorpropamida durante 14 dias ($15920 \pm 759 \text{mg/dL.min}^{-1}$) não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle (Tabela 2; Figura 4).

3. EFEITO DO TRATAMENTO COM FÁRMACOS ANTIDIABÉTICOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM RATOS

3.1. EFEITO DO TRATAMENTO COM METFORMINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA NA PATA DE RATOS

O estudo da resposta inflamatória através da formação do edema de pata induzido pela carragenina foi realizado em ratos diabéticos, controles e diabéticos após 7, 14 e 21 dias de tratamento com metformina 300mg/kg. A figura 5 mostra os dados obtidos após este tratamento. Podemos observar que, a resposta inflamatória induzida pela injeção de 50µg de carragenina, foi menos intensa nos animais diabéticos quando comparados aos controles

e que, o tratamento com metformina não corrigiu a resposta inflamatória que se encontrava reduzida nos animais diabéticos.

3.2. EFEITO DO TRATAMENTO COM CLORPROPAMIDA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA NA PATA DE RATOS

O estudo da resposta inflamatória através da formação do edema de pata induzido pela carragenina foi realizado em animais controles, diabéticos e diabéticos tratados com clorpropamida durante 7 e 14 dias. Como podemos observar na figura 6, a resposta inflamatória induzida pela injeção de 50 μ g de carragenina promoveu uma resposta menos intensa nos animais diabéticos quando comparados aos controles. Para o tratamento com clorpropamida durante 7 e 14 dias, observamos que os animais apresentaram resultados semelhantes aos animais controles. Isto indica que o tratamento com clorpropamida corrigiu a resposta inflamatória que se encontrava reduzida nos animais diabéticos.

3.3. EFEITO DO TRATAMENTO COM METFORMINA E CLORPROPAMIDA SOBRE A PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA

O estudo da resposta inflamatória através da indução da pleurisia foi realizado em animais controles, diabéticos e diabéticos tratados com metformina e clorpropamida. Em todos os grupos houve um aumento significativo de leucócitos totais circulantes quatro horas após a injeção de carragenina na cavidade pleural. Não houve diferença significativa no leucograma diferencial de animais controles, diabéticos e diabéticos tratados

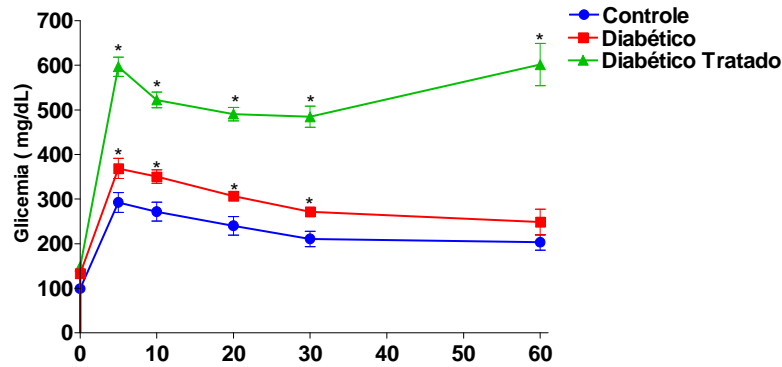
(Tabelas 3 e 4). O volume de exsudato coletado da cavidade intrapleural de ratos diabéticos foi significativamente menor daquele obtido nos animais controles. Ao analisarmos o número de leucócitos totais presentes no exsudato pela realização do leucograma diferencial, observamos não haver diferença significativa entre os grupos de animais controles, diabéticos (Tabelas 5 e 6).

Como podemos observar, o tratamento com metformina durante 7, 14 e 21 dias não corrigiu a redução do volume de exsudato, apresentada pelos animais diabéticos (Tabela 5). Observamos que não houve diferença significativa entre o número de leucócitos presentes no exsudato dos grupos de animais diabéticos, diabéticos tratados com metformina durante 7, 14 e 21 dias quando comparados aos controle. Ao analisarmos o leucograma diferencial, observamos não haver diferença significativa entre o número de células polimorfonucleares e mononucleares obtidos do exsudato de animais controles, diabéticos, diabéticos tratados com metformina.

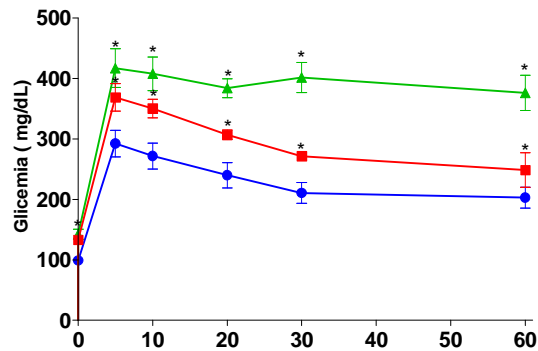
O estudo da resposta inflamatória através da indução da pleurisia para os animais controles, diabéticos e diabéticos tratados com clorpropamida estão apresentados nas tabela 6. Como podemos observar, o tratamento com clorpropamida durante 7 e 14 dias corrigiu o volume de exsudato encontrado diminuído em animais diabéticos. Não houve diferença significativa entre o número de leucócitos presentes no exsudato dos grupos de animais diabéticos, diabéticos tratados com clorpropamida durante 14 dias quando comparados aos controles. Entretanto, um aumento significativo no volume de exsudato e no número de leucócitos foi obtido quando os animais diabéticos foram tratados durante 7 dias com

clorpropamida. Ao analisarmos o leucograma diferencial, observamos não haver diferença significativa entre o número de células polimorfonucleares e mononucleares obtidos do exsudato de animais controles, diabéticos, diabéticos tratados com clorpropamida durante 14 dias, porém quando os animais que foram tratados com clorpropamida durante 7 dias, estes apresentaram aumento significativo no número de células polimorfonucleares.

A



B



C

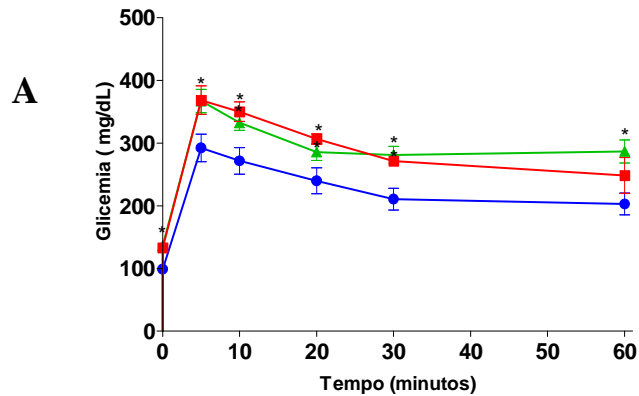


FIGURA 1 - Teste de Tolerância à Glicose (GTT) obtido em animais controles, diabéticos, diabéticos tratados com metformina (300mg/kg) durante 7 dias (A), 14 dias (B) e 21 dias (C) antes e após a administração de glicose por via endovenosa (0,5mg/kg). Cada ponto representa a média \pm e.p.m. de 8 a 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com os valores obtidos nos controles. A análise dos resultados foi realizada empregando ANOVA.

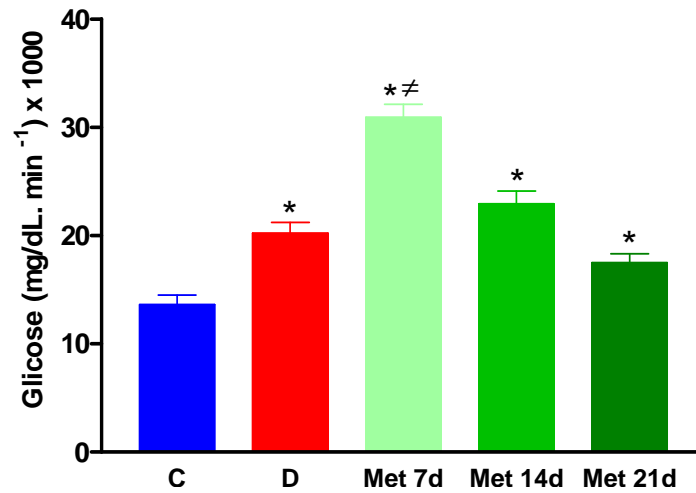
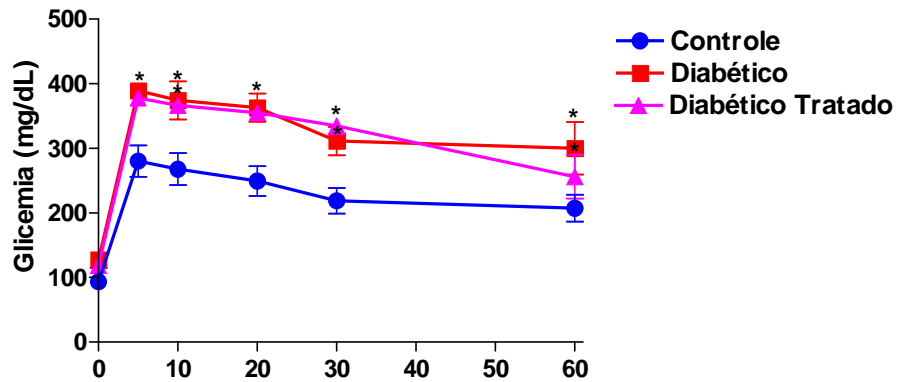


FIGURA 2 - Área sobre a curva durante teste de tolerância a glicose (GTT) de animais controles (C), diabéticos (D), diabéticos tratados com metformina durante 7 dias (Met 7d), 14 dias (Met 14d) e 21 dias (Met 21d), antes e após a injeção de glicose na veia cava inferior (0,5 g/Kg). Cada barra representa a média \pm e.p.m. de 8 a 10 animais por grupo.

$p < 0,05$ em comparação com os valores obtidos nos (*) controles e (\neq) diabéticos. A análise dos resultados foi realizada empregando ANOVA.

A



B

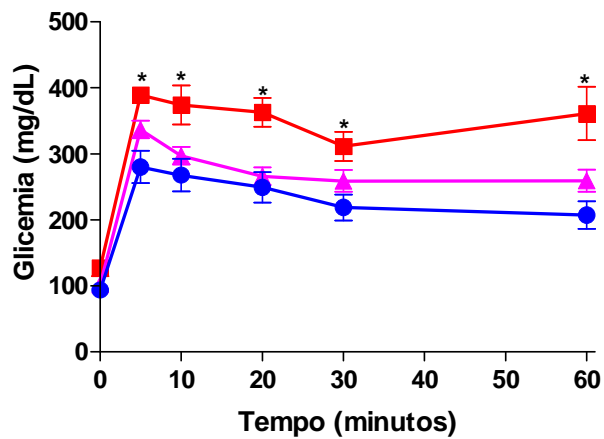


FIGURA 3 - Teste de Tolerância à Glicose (GTT) obtido em animais controles, diabéticos, diabéticos tratados com clorpropamida (200mg/kg) durante 7 dias (A) e 14 dias (B), antes e após a administração de glicose por via endovenosa (0,5mg/kg). Cada ponto representa a média \pm e.p.m. de 8 a 10 animais por grupo.
 * $p < 0,05$ em comparação com os valores obtidos nos controles.
 A análise dos resultados foi realizada empregando ANOVA.

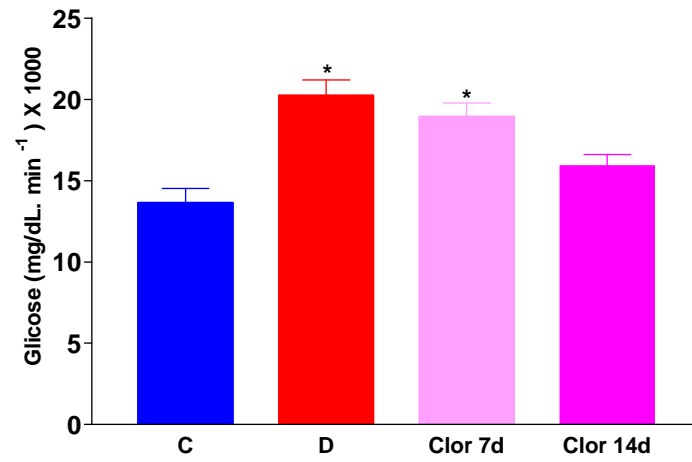
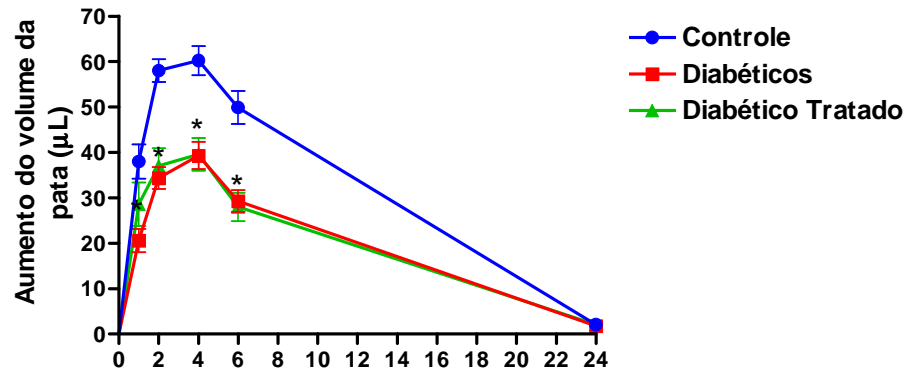


FIGURA 4 - Área sobre a curva durante teste de tolerância a glicose (GTT) de animais controles (C), diabéticos (D), diabéticos tratados com clorpropamida durante 7 dias (Clor 7d) e 14 dias (Clor 14d), antes e após a injeção de glicose na veia cava inferior (0,5g/Kg). Cada barra representa a média \pm e.p.m. de 8 a 10 animais por grupo.

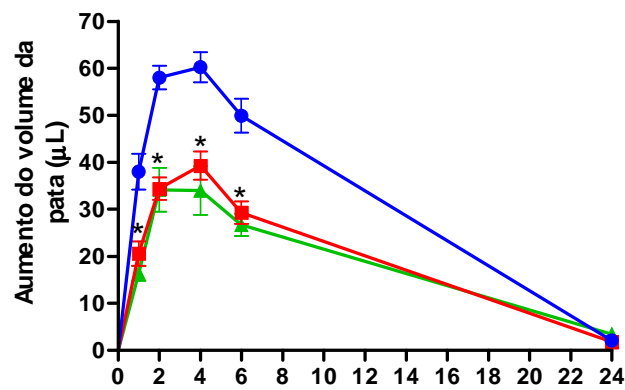
* $p < 0,05$ em comparação com os valores obtidos nos controles.

A análise dos resultados foi realizada empregando ANOVA.

A



B



C

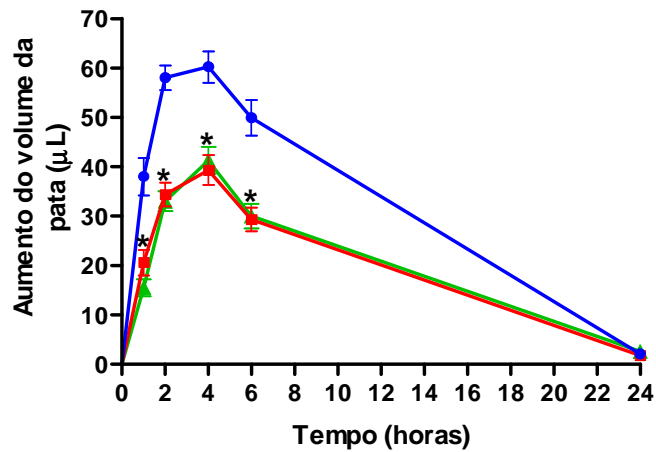
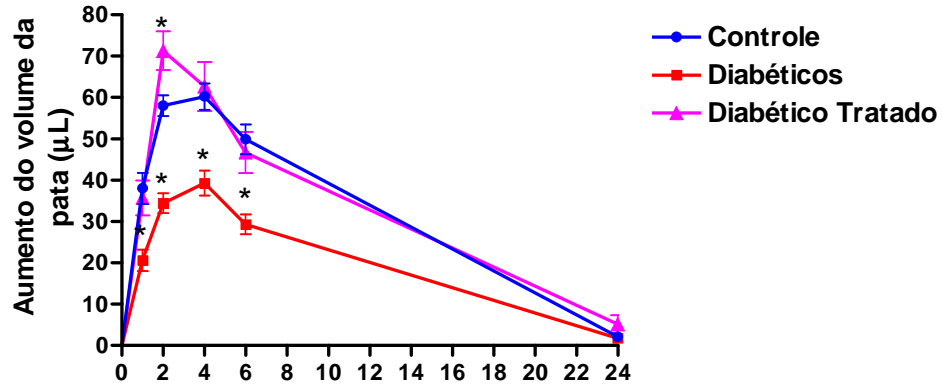


FIGURA 5 - Formação de edema de pata de rato após injeção local de carragenina (50µg/pata) em animais controles, diabéticos, diabéticos tratados com metformina durante 7 dias (A), 14 dias (B) e 21 dias (C). Os resultados (média ± e.p.m.) estão expressos como aumento do volume das patas (µL) de 8 a 10 animais por grupo.

* $p < 0,05$ em relação aos valores obtidos nos controles

A análise dos resultados foi realizada empregando ANOVA.

A



B

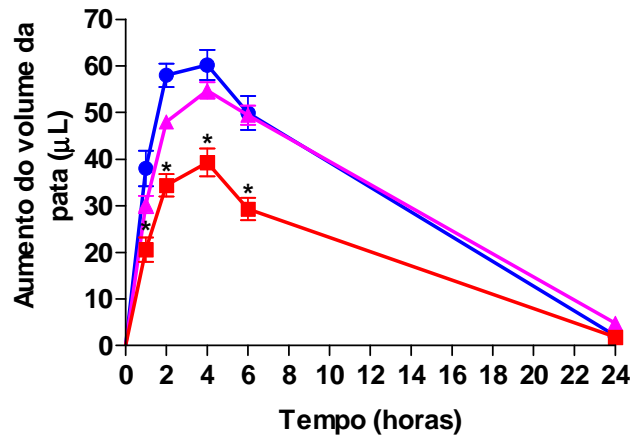


FIGURA 6 - Formação de edema de pata de rato após injeção local de carragenina ($50\mu\text{g}/\text{pata}$) em animais controles, diabéticos, diabéticos tratados com clorpropamida durante 7 dias (A) e 14 dias (B). Os resultados (média \pm e.p.m.) estão expressos como aumento do volume das patas (μL) de 9 a 10 animais por grupo.

* $p < 0,05$ em relação aos valores obtidos nos controles

A análise dos resultados foi realizada empregando ANOVA.

TABELA 1 – Área sob a curva durante o teste de tolerância à glicose por via endovenosa de animais Controles, Diabéticos e Diabéticos tratados durante 7, 14 e 21 dias com metformina (300mg/kg).

GRUPOS	GLICEMIA BASAL (mg/dL)	ÁREA SOBRE A CURVA (mg/dL.min⁻¹)
CONTROLE (n=10)	93,7 ± 7,8	13620 ± 896
DIABÉTICO (n=8)	127,3 ± 12,3*	20230 ± 1047*
METFORMINA 7 dias (n=10)	148,5 ± 8,1*	30897 ± 1186*
METFORMINA 14 dias (n=10)	142,0 ± 8,4*	22921 ± 1221*
METFORMINA 21 dias (n=10)	136,5 ± 6,4	17460 ± 811*

Os valores estão representados como média ± erro padrão da média.

*p<0,05 em comparação com os valores obtidos nos controles.

n – número de animais

TABELA 2 –Área sob a curva durante o teste de tolerância à glicose por via endovenosa de animais Controles, Diabéticos e Diabéticos tratados durante 7 e 14 dias com clorpropamida (200mg/kg).

GRUPOS	GLICEMIA BASAL (mg/dL)	ÁREA SOBRE A CURVA (mg/dL.min⁻¹)
CONTROLE (n=10)	93,7 ± 7,8	13620 ± 896
DIABÉTICO (n=8)	127,3 ± 12,3*	20230 ± 1047*
CLORPROPAMIDA 7 dias (n=10)	119,0 ± 8,8*	18860 ± 923*
CLORPROPAMIDA 14 dias (n=9)	102,9 ± 10,5	15920 ± 759

Os valores estão representados como média ± erro padrão da média.
 *p<0,05 em comparação com os valores obtidos nos controles.
 n – número de animais

TABELA 3 – Contagem de Leucócitos no sangue de ratos Controles, Diabéticos e Diabéticos tratados por 7, 14 e 21 dias com metformina (300mg/kg) antes e 4 horas após a injeção de 50 µg de carragenina na cavidade intrapleurial (pleurisia).

Grupos	Células/mm ³ x 10 ³		
	Total	Mononucleares	Polimorfonucleares
CONTROLE (n=10)			
Antes	9620±667	7420 ± 557	2194 ± 202
Depois	14640 ± 950*	5820 ± 572	8835 ± 724*
DIABÉTICO (n=10)			
Antes	9559 ± 655	6683 ± 491	2984 ± 238
Depois	14410 ± 441*	5810 ± 413	8563 ± 664*
METFORMINA 7 dias (n=10)			
Antes	11650 ± 460	8187 ± 343	3412 ± 212
Depois	16220 ± 541*	6170 ± 665	10060 ± 322*
METFORMINA 14 dias (n=8)			
Antes	9806±292	7176 ± 236	2575 ± 226
Depois	14090 ± 581*	6512 ± 544	7563 ± 679*
METFORMINA 21 dias (n=8)			
Antes	12750 ± 990	9297 ± 580	3453 ± 535,4
Depois	19900 ± 1133*	8655 ± 489	11300 ± 955*

Os valores estão representados como média ± erro padrão da média.

* p<0,05 em comparação com os valores obtidos antes da indução da pleurisia.

n – número de animais

TABELA 4 – Contagem de Leucócitos no sangue de ratos Controles, Diabéticos e Diabéticos tratados por 7 e 14 dias com clorpropamida (200mg/kg) antes e 4 horas após a injeção de 50 µg de carragenina na cavidade intrapleural (pleurisia).

Grupos	Células/mm ³ x 10 ³		
	Total	Mononucleares	Polimorfonucleares
CONTROLE (n=10)			
Antes	9620± 667	7420 ± 557	2194 ± 202
Depois	14640 ± 950*	5820 ± 572	8835 ± 724*
DIABÉTICO (n=10)			
Antes	9559 ± 655	6683 ± 491	2984 ± 238
Depois	14410 ± 441*	5810 ± 413	8563 ± 664*
CLOPROPAMIDA 7 dias (n=8)			
Antes	8525 ± 299	5378 ± 393	1916 ± 160
Depois	13400 ± 759*	4065 ± 391	7447 ± 644*
CLOPROPAMIDA 14 dias (n=8)			
Antes	12080 ± 734	9086 ± 976	3135 ± 582
Depois	17820 ± 811*	8727 ± 1127	9067 ± 767*

Os valores estão representados como média ± erro padrão da média.

* p<0,05 em comparação com os valores obtidos antes da indução da pleurisia.

n – número de animais

TABELA 5 – Resposta inflamatória de animais Controles, Diabéticos e Diabéticos tratados por 7, 14 e 21 dias com metformina (300mg/kg) 4 horas após a injeção de 50µg de carragenina na cavidade intrapleurar (pleurisia).

Grupos	Volume de exsudato (mL)	Leucócitos totais no exsudato (células/mm ³) x 10 ³	Células X 10 ⁶ MN	PMN
CONTROLE (n=10)	0,16 ± 0,01	24980 ± 2026	5 ± 1	20 ± 2
DIABÉTICO (n=10)	0,08 ± 0,01*	25700 ± 1411	6 ± 1	20 ± 1
METFORMINA 7 dias (n=10)	0,08 ± 0,01*	27450 ± 966	5 ± 1	22 ± 1
METFORMINA 14 dias (n=8)	0,08 ± 0,01*	27130 ± 2155	7 ± 1	20 ± 1
METFORMINA 21 dias (n=8)	0,08 ± 0,02*	26630 ± 3256	7 ± 1	20 ± 2

Os valores estão representados como média ± erro padrão da média.

* p<0,05 em comparação com os valores obtidos nos controles.

n – número de animais

PMN - Leucócitos polimorfonucleares.

MN - Leucócitos mononucleares.

TABELA 6 – Resposta inflamatória de animais Controles, Diabéticos e Diabéticos tratados por 7 e 14 dias com Clorpropamida (200mg/kg) 4 horas após a injeção de 50 µg de carragenina na cavidade intrapleurial (pleurisia).

Grupos	Volume de exsudato (mL)	Leucócitos totais no exsudato (células/mm ³) x 10 ³	Células X 10 ⁶	
			MN	PMN
CONTROLE (n=10)	0,16 ± 0,01	24980 ± 2026	5 ± 1	20 ± 2
DIABÉTICO (n=10)	0,08 ± 0,01*	25700 ± 1411	6 ± 1	20 ± 1
CLOPROPAMIDA 7 dias (n=8)	0,35 ± 0,05*	55100 ± 6778*	10 ± 5	45 ± 5*
CLOPROPAMIDA 14 dias (n=8)	0,16 ± 0,02	29970 ± 1332	6 ± 1	24 ± 8

Os valores estão representados como média ± erro padrão da média.

* p<0,05 em comparação com os valores obtidos nos controles

n – número de animais

PMN - Leucócitos polimorfonucleares.

MN - Leucócitos mononucleares.

V - DISCUSSÃO

Os nossos resultados mostraram que a glicemia de ratos diabéticos, avaliada pelo teste de tolerância á glicose (GTT), foi corrigida após o tratamento dos animais com clorpropamida por 14 dias, permanecendo inalterada quando o tratamento foi realizado por 7 dias. É interessante que o valor basal de glicemia observado nos ratos diabéticos após o tratamento com clorpropamida por 14 dias, eram semelhantes aos observados nos ratos normais, indicando que a clorpropamida pode estar atuando sobre a glicemia basal de animais diabéticos no estado de jejum. Estes dados corroboram com os estudos de Rosak (2002) que demonstrou que as sulfoniluréias são potencialmente efetivas na redução dos níveis de glicose tanto no estado de jejum como no pós-prandial.

O tratamento dos ratos diabéticos com metformina durante 7 e 14 dias não corrigiu a glicemia dos animais avaliada através do GTT. No entanto, tal tratamento mostrou uma tendência para corrigir a intolerância à glicose apenas após tratamento prolongado (21 dias). Assim, nossos resultados indicam que a efetividade terapêutica da metformina depende, dentre outros fatores, do tempo de tratamento.

Estudos realizados em humanos demonstraram que a ação potencial da metformina é observada principalmente em pacientes submetidos ao jejum. No entanto, outros estudos como o de Evis & Abdel-Rahman (1995) demonstraram que, embora o tratamento com metformina (60 mg/kg), por via oral, durante 14 dias não tenha alterado a concentração de glicose sangüínea de animais controles em jejum, ele reduziu significativamente a

glicemia de animais diabéticos. Em nossos experimentos, no teste do GTT, observamos pelos valores médios da glicemia basal de ratos diabéticos tratados com metformina durante 7, 14 e 21 dias que o tratamento não corrigiu a hiperglicemia observada nestes animais. Adicionalmente, verificamos que os animais controles tratados com metformina apresentaram um aumento significativo da glicemia basal (dados não apresentados). Tal efeito pode indicar que a administração da metformina poderia promover dessensibilização de transportadores ou estruturas onde ela iria atuar, promovendo um quadro de intolerância aguda à glicose, o que levaria ao quadro de hiperglicemia.

Em camundongos KK, o tratamento com metformina (50 mg/kg/dia) durante 16 semanas corrigiu em 60% dos animais a tolerância oral à glicose (REDDI & JIOTHIRMAYI, 1993). Em outro estudo, avaliando a cinética da glicose realizado em pacientes portadores de diabetes tipo 2, Jackson et al. (1987) demonstraram que através do teste de tolerância oral à glicose que o tratamento com metformina promoveu uma redução significativa na concentração de glicose sanguínea, enquanto que a tolerância à glicose como um todo, observada pela análise da área sob a curva estava inalterada. Os autores sugeriram que este efeito era devido a uma redução da concentração basal de glicose. Como os níveis de glicose em jejum são determinados predominantemente pela taxa de produção hepática de glicose e já que a concentração de insulina está inalterada pelo tratamento com metformina, Jackson et al. (1987) sugeriram que a diminuição basal da produção de glicose hepática e a concentração de glicose em jejum seriam o resultado de

um aumento de sensibilidade hepática à ação da insulina induzida pela droga.

A alteração da resposta inflamatória tem sido demonstrada em diferentes modelos experimentais de diabetes. Neste sentido, Cuman et al. (2001) demonstraram que a resposta inflamatória está alterada em ratos diabéticos tipo 2. Através do teste de pleurisia induzida pela carragenina foi demonstrado que o volume do exsudato inflamatório formado na cavidade pleural era significativamente menor nos ratos diabéticos quando comparados aos animais controles (normais). No entanto, o número de leucócitos totais, presentes no exsudato de ratos diabéticos tipo 2, era semelhante ao número encontrado nos respectivos controles. Estes dados permitiram sugerir que a capacidade migratória dos leucócitos não está alterada neste modelo experimental de diabetes. Em nossos experimentos verificamos que o tratamento com clorpropamida durante 7 dias promoveu um aumento significativo tanto do volume do exsudato inflamatório como no número de leucócitos presentes no exsudato de ratos diabéticos.

Dados da literatura indicam que a deficiência e a resistência à insulina são fatores importantes para a alteração da resposta inflamatória em animais diabéticos. Garcia-Leme et al. (1973, 1974), demonstraram que a redução da resposta inflamatória de ratos, no modelo experimental de diabetes tipo 1, era devida à deficiência de insulina, já que a suplementação deste hormônio corrigiu as alterações observadas. Também foi relatado por Cuman et al. (2001) que a resistência à insulina é um fator importante na hiporreatividade de ratos diabéticos frente ao estímulo inflamatório, e que o tratamento com insulina não corrige esta resposta. Este fato pode indicar

que a resposta inflamatória, alterada neste tipo de diabetes, parece estar relacionada apenas parcialmente à presença de insulina, pois estes animais apresentam níveis sanguíneos deste hormônio e a suplementação dele não restaurou a diminuição do volume de exsudato.

Cuman et al. (2001) demonstraram que neste modelo de diabetes tipo 2 há uma redução na secreção de insulina quando induzida pela glicose. Portanto, o aumento da secreção de insulina, induzida pela clorpropamida, seria responsável pela correção da resposta inflamatória, ou então que baixas concentrações de insulina, mantidas neste modelo experimental, poderiam não ser suficientes para ativar o mecanismo de ação proposto para a metformina, não restaurando a resposta inflamatória.

Os dados obtidos permitem sugerir que a menor resposta inflamatória apresentada neste modelo experimental de diabetes está relacionada, pelo menos parcialmente, com a concentração de glicose plasmática nestes animais, pois quando o agente antidiabético corrigiu as alterações no GTT também corrigiu a resposta inflamatória, que estava anteriormente reduzida. Garcia-Leme et al. (1973) demonstraram que a deficiência de insulina, mais do que o estado hiperglicêmico, era o fator responsável pela resposta inflamatória reduzida no diabetes tipo 1, sugerindo o papel pró-inflamatório da insulina. Neste sentido, já que somente a clorpropamida corrigiu a resposta inflamatória alterada, nossos dados poderiam sugerir que a liberação de insulina provocada pelo tratamento com sulfoniluréia tem participação na reversão desta resposta no modelo experimental de diabetes tipo 2. Entretanto, isto não foi observado por Cuman et al. (2001) que

demonstraram que o tratamento com insulina não corrigiu a alteração da resposta inflamatória em ratos diabéticos tipo 2.

Trabalhos mais recentes demonstram que pacientes portadores de diabetes tipo 2 apresentam níveis elevados de algumas citocinas, dentre elas a interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (BRUUN et al., 2000; MORIWAKI, et al., 2003), substâncias estas envolvidas nas respostas inflamatória e imunológica.

Recentemente o TNF- α tem sido associado ao mecanismo de resistência à insulina. Moller et al. (2000), demonstraram que a administração de TNF- α em ratos promovia um quadro de hiperglicemia, devido à diminuição da captação de glicose pelas células mediada pela insulina e caracterizado por resistência à insulina. Além disso, foi observado que a utilização de antagonistas de TNF- α reverteu este quadro.

Se níveis elevados de TNF- α induzem um quadro de resistência à insulina e, pacientes portadores do diabetes tipo 2 apresentam altos níveis de TNF- α , então o tratamento do diabetes com agentes antidiabéticos atuaria sobre a produção e/ou ação do TNF- α corrigindo esta resistência.

Carlsen et al. (2000), demonstraram que o tratamento de indivíduos não obesos com metformina aumentava os níveis de TNF- α , o que poderia em parte justificar nossos resultados em relação ao GTT de animais diabéticos tratados com metformina, em que o tratamento com esta droga não corrigiu o estado de intolerância à glicose. Por outro lado, Fukusawa et al. (1998) demonstraram que a glicazida, uma sulfoniluréia, inibiu significativamente a produção e ação de TNF- α . Portanto, se a

clorpropamida apresenta efeito semelhante sobre o TNF- α , este dado, justificaria parcialmente seu efeito sobre o perfil glicêmico dos animais diabéticos que receberam tal tratamento, já que a clorpropamida foi efetiva para corrigir os níveis glicêmicos de ratos diabéticos avaliado pelo teste do GTT. Além disso, os dados poderiam indicar que a insulina interfere sobre a ação e/ou produção desta citocina, já que a presença da insulina é necessária para a ação da metformina.

Os glicocorticóides estão entre os mais potentes hormônios contra-regulatórios. Estes esteróides induzem o quadro de resistência à insulina em humanos e podem promover o diabetes ou agravar o quadro de diabetes pré-existente. Trabalhos experimentais têm mostrado que o excesso de glicocorticóides promove uma redução na captação e oxidação de glicose no músculo (DIMITRIADIUS et al., 1997; PAQUOT et al., 1995; RIZZA et al., 1982). Pacientes que recebem doses farmacológicas de esteróides não controlam a hiperglicemia e freqüentemente necessitam altas doses de insulina.

Foi demonstrado que os glicocorticóides apresentam um potente efeito sobre as vias de sinalização do receptor de proliferação e ativação de peroxissomos (PPAR) (DIMITRIADIUS et al., 1997; LEMBERGER et al., 1982; SHI et al., 2000; JOHNSON et al., 1999; GLORAIN et al., 1998). Estes hormônios podem diretamente regular a expressão dos PPARs a nível de transcrição gênica, influenciando o metabolismo de carboidratos e lipídios (PAQUOT et al., 1995). Cuman et al. (2001), ao estudarem o modelo experimental de diabetes tipo 2, verificaram que a redução da resposta inflamatória era parcialmente dependente dos corticóides endógenos, já que

animais diabéticos adrenalectomizados apresentaram resposta inflamatória semelhante a de animais normoglicêmicos. Portanto, a redução da concentração de corticóides endógenos poderia de alguma forma interferir nesta resposta. As drogas agonistas para o PPAR- γ , tais como àquelas que atuam como sensibilizadoras de tecidos à ação da insulina, como as do grupo das tiazolidinedionas, as quais são efetivas no tratamento do diabetes (SALTIEL & HORIKOSHI, 1995) poderiam também, corrigir a resposta inflamatória reduzida no modelo de resistência à insulina. No entanto, como em nossos experimentos utilizamos somente drogas do grupo das sulfoniluréias e das biguanidas não foi possível verificar o papel do PPAR- γ nesta resposta. No presente estudo, foi constatado que somente a clorpropamida foi efetiva, sugerindo que a diminuição da resposta inflamatória neste modelo experimental não é modulada pelo PPAR- γ , o que poderia descartar a influência de corticóides endógenos sobre estes receptores que estariam promovendo o quadro de resistência à insulina. Uma outra explicação seria o fato da metformina estar elevando os níveis de TNF- α , isto estaria contribuindo com o quadro de resistência à insulina e conseqüentemente contribuiria para esta resposta inflamatória reduzida.

Omi et al. (2002) demonstraram o papel da hiperglicemia na resposta inflamatória através da cultura de células endoteliais humanas, em que o quadro hiperglicêmico aumenta a expressão de moléculas de adesão no endotélio (ICAM-I, P-selectina e E-selectina) e a adesão de neutrófilos, principalmente em pacientes portadores da aterosclerose. O tratamento com drogas antidiabéticas pode reverter este efeito. Neste sentido, alguns autores sugerem que o aumento na expressão destas moléculas, também observada

em animais diabéticos, seria fator responsável pelas complicações vasculares do diabetes (BANNAN et al., 1998; CERIELLO et al., 1996). Assim, drogas antidiabéticas poderiam também estar reduzindo a resposta inflamatória em animais diabéticos, o que poderia justificar em parte a ineficácia da metformina nos parâmetros avaliados. Por outro lado, isto não foi observado por Omi et al. (2002), que demonstraram que a metformina não interfere na expressão de moléculas de adesão e na adesão destas moléculas no endotélio. Entretanto, como a clorpropamida restaurou a resposta inflamatória dos animais diabéticos podemos sugerir que pelo seu mecanismo, promovendo a liberação de insulina, um hormônio pró-inflamatório, esta droga poderia também estar atuando sobre a expressão de moléculas de adesão e aderência de polimorfonucleares no endotélio vascular. De fato, o tratamento com clorpropamida durante 7 dias aumentou o número de células migradas e o volume de exsudato.

Os dados em conjunto sugerem que a funcionalidade das células pancreáticas em secretar insulina, a presença de insulina e seu efeito normalizando a glicemia de animais diabéticos são fatores importantes para a normalização da resposta inflamatória neste modelo de diabetes tipo 2 experimental.

VI - CONCLUSÃO

Considerando que:

- ◆ O tratamento com metformina (300mg/kg), durante 7, 14 e 21 dias não corrigiu as alterações observadas no GTT de ratos diabéticos.

- ◆ O tratamento com clorpropamida (200mg/kg) durante 14 dias, corrigiu as alterações no GTT observadas nesses animais, indicando que a clorpropamida é efetiva na correção das alterações glicêmicas deste modelo experimental de diabetes tipo 2.

- ◆ A resposta inflamatória aguda, avaliada através do edema de pata e teste de pleurisia, demonstrada reduzida em animais diabéticos, foi corrigida pelo tratamento de 7 e 14 dias com clorpropamida.

- ◆ O tratamento com metformina durante 7, 14 e 21 dias não reverteu a resposta inflamatória aguda de animais diabéticos.

O tratamento com drogas que aumentam a secreção de insulina, pode restaurar a resposta inflamatória de animais diabéticos, provavelmente por manter os níveis circulantes deste hormônio necessários para ativar esta resposta, confirmando assim o papel pró-inflamatório da insulina.

VII. REFERÊNCIAS

- ALTURA, B.M. ; HAVLEVY, S.; TURLAPATY, P.D.M.V. Vascular smooth muscle in diabetes and its influence on the reactivity of blood vessels. *Adv. Microc.*, v. 8, p. 118, 1979.
- ATKINSON, M.A. & MACLAREN, N.K. The pathogenesis of insulin dependent diabetes. *N. Engl. J. Med.*, v. 331, p. 1428-1436, 1994.
- BAGDADE, J.D.; NIELSON, K.; ROOT, R.; BULGER, R. Host defence in diabetes mellitus: the feckless phagocyte during poor control and ketoacidosis (abstract). *Diabetes*, v. 19(suppl. 1), p. 364, 1970.
- BAILEY, C. J. Metformin - an update. *Gen. Pharmac.*, v. 24, n. 6, p. 1299-1309, 1993.
- BAILEY, C. J. Biguanides and NIDDM. *Diabetes care*, v. 15, p. 755-772, 1992.
- BAILEY, C. J. Insulin resistance and antidiabetic drugs. *Biochemical Pharmacology*, v. 58, p. 1511-1520, 1999.
- BANNAN, S.; MANSFIELD, M.W.; GRANT, P.J. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 E-selectin levels in relation to vascular risk factors and to E-selectin genotype in the first degree relatives of NIDDM patients and in NIDDM patients. *Diabetologia*, v. 41, p. 460-466, 1998.
- BLOOMGARDEN, Z.T. Insulin resistance: current concepts. *Clinical Therapeutics*, v. 20, n. 2, 1998.
- BONNER-WEIR, S.; TRENT, D.F.; HONEY, R.N.; WEIR, G.C. Responses of neonatal rats islets to streptozotocin: limited B-cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes*, v. 30, p. 64-69, 1981.
- BRUUN, J.M.; PEDERSEN, S.B.; RICHELSEN, B.; Interleukin-8 production in human adipose tissue. Inhibitory effects of anti-diabetic compounds, the thiazolidinedione ciglitazone and the biguanide metformin. *Horm. Metab Res.*, v. 32, p. 537-541, 2000.
- CARLSEN, S.M.; WAAGE, A.; GRILL, V.; FOLLING, I. Metformin increases circulating tumor necrosis factor- α levels in non-obese non-diabetic patients with coronary heart disease. *Cytokine*, v.10, p. 66-69, 1998.
- CERIELLO, A.; DELLO RUSSO, P.; AMSTAD, P.; CERUTTI, P. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture: evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes*, v. 45, p. 471-477, 1996.

CLARK, A.; BROWN, E.; KING, T. et al. Islet changes induced by hyperglycemia in rats: effect of insulin or chlorpropamide therapy. *Diabetes*, v. 31, p. 319-325, 1982.

COSTA CURTA, L. *Histologia*. São Paulo. Artes Médicas, 1969.

CUMAN, R.K.N.; AMADO, C.A.B.; FORTES, Z.B. Influence of type 2 diabetes upon the inflammatory response of the rat. *Inflammation Research*, v. 50, p. 460-465, 2001.

DE FRONZO, R.A. Lilly Lecture 1987: The Triumvirate: beta cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*, v. 37, p. 667-87, 1988.

DE FRONZO, R.A. Pathogenesis of type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: a balanced overview. *Diabetologia*, v. 35, p. 389-397, 1992.

DIMITRIADIS, G.; LEIGHTON, B.; PARRY-BILLINGS, M.; SASSON, S.; YOUNG, M.; KRAUSE, U.; BEVAN, S.; PIVA, T.; WEGENER, G.; NEWSHOLME, E.A. Effect of glucocorticoids excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle. *Biochem. J.*, v. 321, p. 707-712, 1997.

DOHAN, F.C. & LUCKENS, F.D.W. Lesions of the pancreatic islets produced in cats by administration of glucose. *Science*, v. 105, p.183, 1947.

DULIN, D.W. & SORET, M.G. Chemically and hormonally induced diabetes. In: Eds. B.W. VOLK & K.F. WELLMAN. *The Diabetic Pancreas*. New York, Plenum Press, 1978. p. 425-466.

EDLUNG, T.; LOFGREN, B.; VALL, L. Toxicity of dextran in rats. *Nature (London)*, v.107, p.125, 1952.

ERIKSSON, J.; FRANSSILA-KALLUNKI, A.; EKSTRAND, A.; SALORANTA, C.; WIDEN, E.; SCHALIN, C.; & GROOP, L. Early metabolic defects in persons at increased risk for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, v. 321, p. 337-343.

EWIS, S.A.; ABDEL-RAHMAN, M.S. Effect of metformin on glutathione and magnesium in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Appl. Toxicol.*, v. 15, n. 5, p. 387-390, 1995.

FORTES, Z.B.; FARSKY, S.P.; OLIVEIRA, M.A.; GARCIA-LEME, J. Direct evidence vital microscopic study of defective leukocyte-endothelial interaction in Diabetes Mellitus. *Diabetes*, v. 40, p.1267-1273, 1991.

FORTES, Z.B.; GARCIA-LEME, J.; SCIVOLETTO, R. Influence of diabetes on the reactivity of mesenteric microvessels to histamine, bradykinin and acetylcholine. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 78, p.39-48, 1983a.

FORTES, Z.B.; GARCIA-LEME, J.; SCIVOLETTO, R. Vascular reactivity in diabetes mellitus: role of the endothelial cell. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 79, p. 771-781, 1983b.

FORTES, Z.B.; GARCIA-LEME, J.; SCIVOLETTO, R. Vascular reactivity in diabetes in diabetes mellitus: possible role of insulin on the endothelial cell. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 83, p. 635-643, 1984.

FUKUSAWA, M.; SATOH, H.; QIANG, X.; MIYAGUCHI, S.; SAKATA, Y.; NAKASAWA, T. Inhibition of tumor necrosis factor- α with anti-diabetic agents. *Diabetes Research*, v. 43, p. 147-154, 1999.

GALUSKA, D.; ZIERATH, J.; THRONE A.; SONNENFELD T.; WALLBERG-HENRIKSSON H. Metformin increases insulin-stimulated glucose transport in insulin resistant human skeletal muscle. *Diabetes metab.*, v. 17, p. 159-163, 1991.

GARCIA-LEME, J. Regulatory mechanisms in inflammation: new aspects of autopharmacology. *Gen. Pharmac.*, v. 12, p.15-24, 1981.

GARCIA-LEME, J.; BOHM, G.M.; MIGLIORINI, R.H.; SOUSA, M.Z.A. Possible participation of insulin in the control of vascular permeability. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 29, p. 298-306, 1974.

GARCIA-LEME, J.; HAMAMURA, L.; MIGLIORINI, R.H.; LEITE, M.P. Influence of diabetes upon the inflammatory response of the rat. A pharmacology analysis. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 23, p. 74-81, 1973.

GLORAIN, M.; FRANCHHAUSER-VOGEL, S.; ROBIN, D.; ROBIN, P.; FOREST, C. Glucocorticoids repress induction by thiazolinediones, fibrates, and fatty acids of phosphoenalpyruvate carboxykinase gene expression in adipocytes. *J. Cell Biochem.*, v. 68, p. 298-308, 1998.

GROOP, L.C. Sulfonylureas in NIDDM. *Diabetes care*, v. 15, p. 737-754, 1992.

HERMANN, L.S. Metformin: a review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Diabetic metabolism*, v.5, p.233-245, 1979.

JACKSON, R.A.; HAWA, M.I.; JASPAN, J.B.; SIM, B.M.; SILVIO, D.; FEATHERBE, L.; KURTZ, D. Mechanism of metformin action in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes*, v. 36, p.632-640, 1987.

JOHNSON, T.E.; VOGEL, R.; RUTLEDGE, S.J.; RODAN, G.; SCHIMIDT, A. Thiazolidinedione effects on glucocorticoid receptor-mediated gene transcription and differentiation in osteoblastic cells. *Endocrinology*, v. 40, p. 3245-3254, 1999.

KIRPICHNIKOV, D.; Mc FARLANE, S.; SOWERS, J.R. Metformin: na update. *Ann. Intern. Med.* v. 137, p. 25-33, 2002.

LEMBERGER, T.; SALADIN, R.; VAZQUEZ, M.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W.; AUWERX, J. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *J. Biol. Chem.*, v. 271, p. 1764-1769, 1982.

LLORACH, M.A.S.; BOHM, G.M.; GARCIA-LEME, J. Decreased vascular reactions to permeability factors in experimental diabetes. *Br. J. Exp. Pathol.*, v. 57, p. 747- 754, 1976.

LONGHURST, P.A. & HEAD, R.J. Responses of isolated perfused mesenteric vasculature from diabetic tissues: the significance of appropriated control tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 235, p. 45-49, 1985.

LUCKENS, F.D.W. & DOHAN, F.C. Pituitary-diabetes in the cat: recovery following insulin or dietary treatment. *Endocrinology*, v. 30, p.175-202, 1942.

MELIN, B.; CHERQUI, G.; BLIVET, M.J.; CARON, M.; LASCOLS, O.; CAPEU, J.; PICARD, J. Dual effect of metformin in cultured rat hepatocytes: potenciation of insulin action and prevention of insulin-induced resistance. *Metabolism*, v. 39, p. 1089-1095, 1990.

MOLLER, D.E. Potential role of TNF- α in the patogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *TEM*, v.11, n. 6, p. 212-216, 2000.

MORIWAKI, Y.; YAMAMOTO, T.; SHIBUTANI, Y.; AOKI, E.; TSUTSUMI, Z.; TAKAHASHI, S.; OKAMURA, H.; KOGA, M.; FUKUCHI, M.; HADA, T. Elevated levels of interleukin-18 and tumor necrosis factor-alfa in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: relationship with diabetic neuropathy. *Metabolism.*, v. 52, p. 605-608, 2003.

NAGI, D.K. & YUDKIN, J. S. Effects of metformin on insulin resistance, risk factors for cardiovascular diasease, and plasminogem activator inhibitor in NIDDM subjects. *Diabetes care*, v. 16, p. 621-629, 1993.

OMI, H.; OKAYAMA, N.; SHIMIZU, M.; OKOUCHI, M. ITO, S.; FUKUTOMI, T.; ITOH, M. Participation of high glucose concentrations in neutrophil adhesion and surface expression of adhesion molecules on cultured human endothelial cells. Effect of antidiabetic medicines. *Journal of Diabetes and its Complications*, v. 16, p. 201-208, 2002.

PAQUOT, N.; SCHNEIDER, P.; JEQUIER, E.; TAPPY, L. Effects of glucocorticoids and sympathomimetic agents on basal and insulin-stimulated glucose metabolism. *Clin. Physiol.* v. 15, p. 231-240, 1995.

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

PFEIFER, M.A.; HALTER, J.B.; BEARD, J.C.; PORTE, D.J. Differential effects of tolbutamide on first and second phase insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 53, p. 1256-1262, 1981.

PICKUP, J. & WILLIAMS, G. Eds. *Textbook of diabetes*. Vol. 1. Oxford, Blackwell, p. 514, 1991.

PORTE, D.; & KAHN, S.E. Beta-cell dysfunction and failure in type 2 diabetes: potential mechanisms. *Diabetes*, v. 50, p. 160-163, 2001.

PORTE D. JR., PUPO, A.A. Insulin responses to glucose: evidence for a two pool system in man. *Journal of Clinical Investigation*, v. 48, n. 12, p. 2309-2319, 1969.

REDDI, A.S.; JYOTHIRMAYI, G.N. Effect of metformin treatment on glucose tolerance and glomerulosclerosis in KK mice. *Diabetes Metab.*, v.19, n. 1, p. 44-51, 1993.

RIZZA, R.A.; MANDARINO, L.J.; GERICH, J.E. Cortisol-induced insulin resistance in man: impaired suppression of glucose production and stimulation of glucose utilization due to a postreceptor defect of insulin action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* v. 54, p. 131-138, 1982.

ROSAK, C. The pathophysiologic basis of efficacy and clinical experience with the new oral antidiabetic agents. *Journal of Diabetes and its Complications*, 16, p. 123-132, 2002.

SALTIEL, A.R.; HORIKOSHI, H. Thiazolidinediones are novel insulin-sensitizing agents. *Curr. Opin. Endocrinol. Diab.* V. 2, p. 341-347, 1995.

SANNOMIYA, P.; PEREIRA, M.A.A.; GARCIA-LEME, J. Inhibition of leukocyte chemotaxis by serum factor in diabetes mellitus: selective depression of cell responses mediated by complement-derived chemoattractants. *Agents Actions*, v. 30, p.369-76, 1990.

SHI, X.M.; BLAIR, H.C.; YANG, X.; McDONALD, J.M.; CAO, X. Tandem repeat of C/EBP binding sites mediates PPAR gamma 2 gene transcription in glucocorticoid-induced adipocyte differentiation. *J. Cell Biochem.*, v. 76, p. 518-527, 2000.

TAN, J.S.; ANDERSON, J.L.; WATANAKUNAKORN, C.; PHAIR, J.P. Neutrophil dysfunction in diabetes mellitus. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 85, p. 26-33, 1975.

THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, v. 20, p. 1183-1197, 1997.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. Some quantitative temporal characteristic of carragenan-induced pleurisy in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, v. 143, p. 711-714, 1973.

WEIR, G.C.; CLORE, E.T.; ZMACHINSKI, C.J.; BONNER-WEIR, S. Islet secretion in a new experimental model for non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes*, v. 30, p. 590-595, 1981.

WIDEN, E.I.M.; ERIKSSON, J.G.; GROOP, L.C. Metformin normalizes monoseidative glucose metabolism in insulin-resistant normoglycemic first-degree relatives of patients with NIDDM. *Diabetes*, v. 41, p. 354-358, 1992.

WINTER, C.A; RISLEY, E.A; NUSS, G.V. Carragenin-induced edema in the hindpaw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 111, p. 544-547, 1962.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)