

## EFEITO DO PLASMA RICO EM GLICOSE NA APOTOSE DE NEUTRÓFILOS DE CÃES

Maria Carolina Ramos Nogueira<sup>1</sup>, Priscila Preve Pereira<sup>1</sup>, Breno Fernando Martins Almeida<sup>1</sup>, Anelise Maria Bosco<sup>1</sup>, Tatiana Sousa Barbosa<sup>2</sup>, Paulo César Ciarlini<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UNESP – Campus Araçatuba

<sup>2</sup> UNESP – Campus Botucatu

Correspondência: Paulo César Ciarlini: ciarlini@fmva.unesp.br

**RESUMO:** A hiperglicemia é considerada a principal causa do aumento da mortalidade em pacientes diabéticos humanos, por promover a aceleração da apoptose dos neutrófilos, essenciais para o funcionamento do sistema imune. Desta forma, dá-se um efeito imunossupressor que contribui para o aumento da susceptibilidade dos pacientes a infecções bacterianas graves. Na espécie canina não há estudos semelhantes quanto ao efeito imunossupressor da hiperglicemia, de modo que se testou a hipótese de que o excesso de glicose acelera a apoptose dos neutrófilos em cães. Para tal, substituiu-se o plasma de amostras de sangue de 10 cães sadios por plasma autólogo, homólogo normoglicêmico e homólogo hiperglicêmico. Todas as amostras foram incubadas por duas e quatro horas. As mensurações de glicose foram realizadas pelo método cinético glicose oxidase e o índice apoptótico dos neutrófilos calculado pelo método morfométrico. Em todos os ensaios o índice apoptótico aumentou após duas e quatro horas. Após quatro horas, o índice apoptótico das amostras incubadas com plasma homólogo hiperglicêmico foi significativamente superior ( $p<0,05$ ) aos das amostras incubadas com homólogo normoglicêmico e autólogo. Concluiu-se que *in vitro* o plasma hiperglicêmico aumenta a taxa de apoptose dos neutrófilos em cães, fortalecendo a hipótese de que cães portadores de doenças hiperglicemiantes possam igualmente sofrer imunossupressão por disfunções neutrofílica.

**Palavras-chave:** hiperglicemia; imunossupressão; polimorfonuclear

## EFFECT OF RICH GLUCOSE PLASMA IN APOPTOSIS OF NEUTROPHILS IN DOGS

**ABSTRACT:** Hyperglycemia is considered the main cause of increased mortality in diabetic humans, to promote the acceleration of neutrophil apoptosis, essential for the functioning of the immune system. Thus, there is an immunosuppressive effect that contributes to the increased susceptibility of patients to serious bacterial infections. In canine species there is no similar studies on the immunosuppressive effect of hyperglycemia, so that it tested the hypothesis that excess glucose accelerates neutrophil apoptosis in dogs. To this end, replaced the plasma of blood samples from 10 healthy dogs plasma autologous, homologous counterpart normoglycemia and hyperglycemia. All samples were incubated for two and four hours. The glucose measurements were performed using kinetic glucose oxidase and neutrophil apoptotic index calculated by the morphometric method. In all tests the apoptotic index increased after two and four hours. After four hours, the apoptotic index of the samples incubated with homologous plasma hyperglycemia was significantly higher ( $p < 0.05$ ) to the samples incubated with homologous and autologous normoglycemia. It was concluded that plasma hyperglycemia *in vitro* increases the rate of neutrophil apoptosis in dogs, strengthening the hypothesis that dogs with hyperglycemic disease may also suffer immunosuppression neutrophil dysfunction.

**Key Words:** hyperglycemia; immunosuppression; polymorphonuclear

## INTRODUÇÃO

Os neutrófilos são considerados a primeira linha de defesa do organismo (imunidade inata), movendo-se em direção ao micro-organismo, fagocitando e destruindo-o (Cohen *et al.*, 2001), mas sendo incapaz de um esforço prolongado devido a sua meia vida, *in vivo*, de aproximadamente 12 horas (Tizard *et al.*, 2002). A meia-vida de neutrófilos pode ser aumentada ou reduzida com a aceleração ou atraso da apoptose (Squier *et al.*, 1995). A apoptose é um mecanismo fisiológico de controle da população normal de neutrófilos (Oguma *et al.*, 2000) e age também durante a inflamação, uma vez que estes possuem a morte geneticamente programada (Majewska *et al.*, 2000, Glowacka *et al.*, 2002).

A hiperglicemia em cães ocorre comumente em condições de estresse e doenças como diabetes mellitus e o hiperadrenocorticismo (Nelson; Couto, 2006). Pacientes que sofrem de tais enfermidades hiperglicemiantes apresentam maior risco de infecção e este fato relaciona-se com defeitos na função microbicida e fagocitária dos neutrófilos (Whyte *et al.*, 1993; McManus *et al.*, 2001).

O excesso de glicose na corrente circulatória também causa alterações no metabolismo energético do neutrófilo (via do poliol), aumentando a produção de sorbitol, induzindo uma diminuição da adesão, quimiotaxia e migração ao foco inflamatório. O sorbitol leva a diminuição da disponibilidade da enzima NADPH, interferindo na interação leucócito-endotélio. A hiperglicemia também causa um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), diminuição da resistência ao estresse oxidativo e avançada glicosilação protéica (Brownlee, 2001; Alba-Loureiro *et al.*, 2007).

A glutamina é um aminoácido que exerce efeito protetor sobre a função neutrofílica. Esta é transformada em glutatona pelos neutrófilos, o que aumenta o seu efeito bactericida através da ação antioxidant, além de estabilizar a função mitocondrial, retardando a ocorrência de apoptose. Em ratos diabéticos, foram observadas alterações nas concentrações de glutamina, o que compromete a resposta inflamatória nestes indivíduos (Pithon-Curi *et al.*, 2003; Alba-Loureiro *et al.*, 2007).

Segundo Tennenberg *et al.* (1999) o aumento da susceptibilidade e severidade das infecções em pacientes humanos diabéticos deve-se ao fato da hiperglicemia causar a aceleração da apoptose dos neutrófilos. Considerando-se que a hiperglicemia não é o único fator pró-apoptótico em pacientes diabéticos, protocolos foram desenvolvidos para se avaliar o efeito isolado de diferentes concentrações de glicose sobre a apoptose dos neutrófilos. Neste sentido, estudo realizado "in vitro" por Turina *et al.* (2006) revelou que a exposição de neutrófilos humanos a altas concentrações de glicose plasmática (10mg/dL, 100mg/dL, 200mg/dL e 400mg/dL) no período de meia e vinte quatro horas não promove aumento significativo da apoptose. Tais divergências entre essas pesquisas reforçam a necessidade de mais estudos uma vez que ainda não está clara a relação entre a hiperglicemia, a apoptose e disfunção dos neutrófilos.

Considerando que são diversos os mecanismos que afetam a função neutrofílica de pacientes portadores de doenças hiperglicêmicas *in vivo*, decidiu-se desenvolver um protocolo que permita avaliar o efeito isolado de plasma enriquecido com glicose sobre a taxa de apoptose dos neutrófilos de cães sadios a fim de testar *in vitro* a hipótese de que o plasma enriquecido

com alta concentração de glicose acelera a apoptose de neutrófilos de cães sadios.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 10 cães das raças Pastor Alemão, Labrador, Rottweiler e Golden Retriever, de ambos os sexos, saudáveis, com idade entre três e cinco anos provindos do canil da Polícia Militar do Município de Araçatuba. Os animais apresentaram hemograma e glicemia normais, não apresentaram alterações no exame físico geral (Feitosa, 2008), sem recente vacinação ou tratamentos com medicamentos antimicrobianos, antinflamatórios e imunossupressores.

Foi realizada colheita de 10 mL de sangue em tubos siliconizados heparinizados à vácuo<sup>1</sup>. Todas as amostras foram mantidas refrigeradas até o momento de seu processamento.

O sangue colhido foi submetido à centrifugação a 700 g durante 15 minutos para a obtenção do plasma. O “pool” de plasma homólogo normoglicêmico foi produzido a partir da retirada do plasma dos animais e armazenado em tubos de polipropileno a -20º C até o momento do uso sem o acréscimo de nenhuma substância. Para formar o “pool” de plasma homólogo hiperglicêmico cada um mL de plasma foi acrescido 5 mg de glicose para atingir uma concentração final de aproximadamente 13,83 mmol/L (248,77 mg/dL).

Para a avaliação do efeito do plasma rico em glicose sobre a apoptose dos neutrófilos o sangue total de 10 cães foi submetido a quatro diferentes ensaios. Para tal, quatro alíquotas de 500 µL de sangue total foram centrifugadas (700g / 15 minutos) e 100 µL do sobrenadante substituído por um volume equivalente de plasma

homólogo normoglicêmico (Tubo 1), homólogo hiperglicêmico (Tubo 2) e plasma autólogo (Tubo 3). Foram retirados 500 µL de sangue para obtenção de plasma e consequente determinação da concentração de glicose após a adição dos plasmas homólogos normoglicêmicos e hiperglicêmicos.

Em cada momento foram realizados dois esfregaços por amostra tingidos com corante panótico rápido comercial<sup>2</sup>. Para a determinação do índice apoptótico, um número mínimo de 100 neutrófilos foram analisados morfológicamente por microscopia óptica em aumento de 1.000X, conforme protocolo descrito por Campos et al. (2004) e Batista et al. (2005). Para a quantificação das células apoptóticas, foram contadas somente as que apresentaram pelo menos três das seguintes características morfológicas peculiares do processo: condensação do citoplasma (intensa coloração citoplasmática), condensação nuclear (compactação da cromatina nuclear em massas densas e uniformes, alinhadas no lado interno da membrana nuclear), fragmentação nuclear (convolução e fragmentação da membrana nuclear sem cariorrexe ou ruptura), fragmentação celular (formação de corpos apoptóticos). Os corpos apoptóticos em grande número e próximos uns dos outros foram quantificados como o resultado de uma única célula em apoptose. Quando distantes entre si, foram considerados como resultados de apoptose em células diferentes e contabilizados como tal.

A fim de não incluir corpos apoptóticos de linfócitos na avaliação em questão, levou-se em consideração as informações descritas por Nagami e colaboradores (2002), em que corpos apoptóticos de linfócitos apresentam

<sup>1</sup> Vacutainer plus plastic Heparin, Cod. 367993, Becton-Dickson, New Jersey, USA.

<sup>2</sup> Instant-Prov, NEWPROV, Pinhais- PR.

citoplasma basofílico (coloração azulada), menor tamanho e fragmentos nucleares mais irregulares e os de neutrófilos citoplasma neutrofílico e de maior tamanho.

Com auxílio de um programa computacional estatístico<sup>3</sup> e conforme preconizado por Zar (1984), após os estudos das distribuições das variáveis quanto à normalidade (teste KS) e homocedasticidade (teste Bartlett), para as comparações entre momentos em cada ensaio experimental foi utilizadas a ANOVA e o pós-teste de Tukey.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias de glicose plasmática dos animais após acréscimo de plasma autólogo e homólogo normoglicêmico ficaram dentro da faixa de normalidade para a espécie (Kaneko, 2008), enquanto as amostras acrescidas de plasma homólogo enriquecido com glicose (homólogo hiperglicêmico) foram equivalentes aos de um cão portador de diabetes mellitus (Tabela 1).

**Tabela 1-** Porcentagem de neutrófilos apoptóticos (Médias ± desvios padrão) de cães sadios, antes (0h) e após 2 e 4 horas de incubação com plasma autólogo normoglicêmico ( $4,44 \pm 0,37$  mmol/L glicose), homólogo normoglicêmico ( $4,40 \pm 0,29$  mmol/L glicose) e hiperglicêmico ( $13,83 \pm 1,27$  mmol/L glicose).

	Tempo 0h	Tempo 2h	Tempo 4h
Plasma			
Autólogo	$1,8 \pm 0,87$	$30,9 \pm 7,48$	$30,4 \pm 10,64$
Normoglicêmico	A <sup>1</sup> a <sup>2</sup>	Ba	Bb
Plasma homólogo normoglicêmico	$2,1 \pm 1,24$	$28,9 \pm 9,35$	$33,1 \pm 11,48$
	Aa	Ba	Bab
Plasma homólogo hiperglicêmico	$2,4 \pm 1,82$	$31,3 \pm 15,19$	$43,7 \pm 10,50$
	Aa	Ba	Ca

<sup>1</sup> Letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ).

<sup>2</sup> Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ).

A taxa de apoptose dos neutrófilos no momento imediatamente após o acréscimo dos plasmas autólogo, homólogo normoglicêmico e homólogo hiperglicêmico não diferiram

significativamente entre si (Tabela 1), garantindo que as amostras sanguíneas selecionadas para o estudo não sofreram qualquer efeito indutor de apoptose "in vivo". Estes resultados permitem afirmar que as manipulações realizadas com as amostras nos diferentes ensaios não aceleraram a apoptose dos neutrófilos e sugerem que o aumento da taxa de apoptose está associado com o tempo de incubação e a concentração glicêmica.

O índice apoptótico dos ensaios com plasma autólogo e homólogo normoglicêmico não diferiram em nenhum momento, comprovando que a diferença da composição dos plasmas não contribuiu para aceleração da apoptose (Tabela 1). É razoável afirmar que o aumento da taxa de apoptose nos ensaios autólogo e homólogos normoglicêmicos esteja relacionada com tempo e temperatura de incubação das amostras, conforme anteriormente verificado por Sela *et al.* (2005).

Diferentemente, amostras incubadas com plasma hiperglicêmico tiveram índice apoptótico maior que as normoglicêmicas, sendo tal diferença apenas significativa após quatro horas de incubação (Tabela 1). Estes resultados comprovam que a hiperglicemia acelera a apoptose dos neutrófilos de cães e que este efeito é dependente do tempo. Anteriormente, Tennenberg *et al.* (1999) verificaram que em humanos a alta concentração de glicose provoca diminuição da longevidade funcional dos neutrófilos, aumenta a retirada destes do foco inflamatório, possibilitando uma maior susceptibilidade à infecções ou infecções mais severas. A aceleração da apoptose de neutrófilos e o aumento da susceptibilidade a infecções também foi observada em ratos diabéticos (Alba-Loureiro *et al.*, 2007).

Divergindo do presente estudo e demais relatos da literatura, neutrófilos caninos incubados com meio de cultura

<sup>3</sup> SAS/STA Software, Statistical Analysis System Institute, 1997, USA.

enriquecido com glicose (16 mmol/L) não apresentaram alteração da taxa de apoptose (Bosco et al., 2013) e neutrófilos humanos incubados com altas concentrações de glicose plasmática no período de 30 minutos e 24 horas não resultou no aumento significativo da apoptose (Turina et al., 2006). É provável que tal divergência esteja associada ao fato desses autores terem avaliado o efeito da hiperglicemia sob os neutrófilos isolados e não em sangue total.

Diante dos resultados obtidos e das evidências de que *in vivo* a hiperglicemia é um fator imunossupressor em humanos (Gupta et al., 2007), torna-se necessário aprofundar a presente investigação para confirmar se o mesmo ocorre em cães e em quais doenças hiperglicemiantes. O protocolo desenvolvido no presente estudo permitiu identificar o efeito da hiperglicemia sobre a apoptose sem necessidade de isolamento ou cultivo em meio artificial, abrindo perspectivas para novos estudos sobre o efeito pró-apoptótico da hiperglicemia, assim como para testar *in vitro* novas estratégias de tratamento das doenças hiperglicemiantes.

## CONCLUSÃO

O plasma rico em glicose aumenta a taxa de apoptose dos neutrófilos de cão *in vitro*, fortalecendo a hipótese de que cães portadores de doenças hiperglicemiantes possam igualmente sofrer imunossupressão devido à disfunção neutrofílica.

## AGRADECIMENTOS

A FAPESP pela bolsa auxílio (Processo 2009/50315-2), ao Canil da Polícia Militar do Município de Araçatuba- SP por ceder os cães para o experimento e a Laine Margareth Gabas pelo auxílio técnico.

## REFERÊNCIAS

- ALBA-LOUREIRO, T.C.; MUNHOZ, C.D.; MARTINS, J.O. et al. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, n.8, p.1037-1044, 2007.
- BATISTA, J.J.; MARTINS, A.S.; MOROL, L. et al. Expressão gênica de caspases 3 e 8 em timo e baço de ratas recém-desmamadas e imunossuprimidas por glicocorticóide. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.4, p.457-464, 2005.
- BOSCO, A.M.; ALMEIDA, B.F.M.; PEREIRA, P.P. et al. High concentrations of glucose reduce the oxidative metabolism of dog neutrophils *in vitro*. **BMC Veterinary Research**, V.9, n.24, p.1-6, 2013.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v.13, n.14, p.813-820, 2001.
- CAMPOS, P.P.; VASCONCELOS, A.C.; MELO, M.M. Apoptose no placentomo de cabras gestantes intoxicadas experimentalmente com cipó-preto – *Tetrapterys multiglandulosa*. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.1, p.19-24, 2004.
- COHEN, G.; RUDNIKI, M.; WALTER, F. et al. Glucose-modified proteins modulate essential functions and apoptosis of polymorphonuclear leukocytes. **Journal American Society Nephrology**, v.12, p. 1264-1271, 2001.
- FEITOSA, F.L. **Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico**. São Paulo – SP: ROCA, cap.4, 2008. p. 77-102.
- GLOWACKA, E.; BANASIK, M.; LEWKOWICZ, P. et al. The effect of LPS on neutrophils from patients with high risk of type 1 diabetes mellitus in relation to IL-8, IL-10 and IL-12 production and apoptosis *in vitro*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.55, p.210-217, 2002.
- GUPTA, S.; KOIRALA, J.; KHARDORI, R. et al. Infections in diabetes mellitus and hyperglycemia. **Infectious disease clinics of North America**, v.21, p.617-638, 2007.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic Animals**, 6.ed. San Diego: Academic Press, 2008, 916p.
- MAJEWSKA, E.; SUŁOWSKA, Z.; BAJ, Z. Spontaneous apoptosis of neutrophils in whole blood and its relation to apoptosis gene proteins. **Scandinavian Journal Immunology**, v 52, p.496-501, 2000.

- MCMANUS, L. M.; BLOODWORTH, R. C.; PRIHODA, T. J. *et al.* Agonist-dependent failure of neutrophil function in diabetes correlates with extent of hyperglycemia. **Journal of Leukocyte Biology**, v.70, n.3, p.395-404, 2001.
- NAGAMI, K.; KAWASHIMA, Y.; KUNO, H. *et al.* In vitro cytotoxicity assay to screen compounds for apoptosis-inducing potential on lymphocytes and neutrophils. **The Journal of Toxicological Sciences**, v.27, n.3, p. 91-203, 2002.
- NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**, 3º ed. Rio de Janeiro – RJ: Guanabara Koogan, 2006, 1325p.
- OGUMA, K.; KANO, R.; HASEGAWA, A. In vitro study of neutrophil apoptosis in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.76, p.157-162, 2000.
- PITHON-CURI, T.C.; SCHUMACHER, R.I.; FREITAS, J.J.S; *et al.* Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophil. **American Journal of Physiology**, v.284, p.355-1361, 2003.
- SELA, S.; SHURTZ-SWIRSKI, R.; COHEN-MAZOR, M. *et al.* Primed peripheral polymorphonuclear leukocyte: a culprit underlying chronic low-grade inflammation and systemic oxidative stress in chronic kidney disease. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.16, p.2431-2438, 2005.
- SQUIER, M.K.T.; SEHNERT, A.J.; COHEN, J.J. Apoptosis in leukocytes. **Journal Leukocyte Biological**, v.57, p.2-10, 1995.
- TENNENBERG, S.D.; FINKENAUER, R.; DWIVEDI, A. Absence of lipopolysaccharide-induced inhibition of neutrophil apoptosis in patients with diabetes. **Archives of Surgery**, v.134, n.11, p.1229-1234, 1999.
- TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**, 6<sup>a</sup> ed. São Paulo – SP: Editora Roca, cap. 3, 2002.p. 19-27.
- TURINA, M; MILLER, F.N.; TUCKER, C. *et al.* Effects of hyperglycemia, hyperinsulinemia, and hyperosmolarity on neutrophil apoptosis. **Surgical infections**, v.7, n.2, p.111-121, 2006.
- WHYTE, M.K; MEAGHER, L.C.; MacDERMOT, J. *et al.* Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. **Journal of Immunology**, v.150, n.11, p.5124-5134, 1993.
- ZAR, J.H. **Bioestatistical analysis**. 2<sup>a</sup> ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1984. 718p.