

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**EFEITOS IMUNOMODULADORES DOS HIPOGLICEMIANTES ORAIS EM  
CULTURA DE LINFÓCITOS DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS DO  
TIPO 2.**

Dissertação de Mestrado

Pós-Graduando: Karina Faccio Mello

Professor Orientador: Professor Doutor Jarbas Rodrigues de Oliveira

Porto Alegre

Novembro/2005

## Agradecimentos

Ao professor doutor Jarbas Rodrigues de Oliveira, meu querido orientador e exemplo profissional

À professora doutora Fernanda Bordignon Nunes, idealizadora deste projeto.

À professora doutora e amiga Melissa Guerra Simões Pires, que me acolheu e auxiliou mesmo "sem entender nada" do que eu dizia.

Aos "mestres das culturas" Eduardo Caberlon Cruz e Carolina Maria Alves Bastos e demais cooperadores, que verdadeiramente estiveram comigo neste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Pesquisa em Biofísica que realmente sabem o sentido da frase: "nós somos uma equipe".

À Silvana que foi uma "guriazinha" muito eficiente.

Às colegas Adriana e Fernanda que fizeram de tudo para me ajudar a conciliar os dois laboratórios.

Às colegas Clarisse, Vera e Mary que se preocuparam, e sempre estiveram dispostas a ajudar a "contornar as pressões".

À doutora Luciana e ao doutor Reppeto que nos abriram as portas do ambulatório de Endocrinologia.

Aos coletadores do ambulatório de Endocrinologia, especialmente ao Arthur.

A todos os pacientes e voluntários que "deram o sangue" para a realização deste projeto.

Aos demais amigos e inimigos que direta ou indiretamente contribuíram para o meu crescimento e desenvolvimento acadêmico.

A todos os alunos do meu estágio de docência.

E um agradecimento especial à Silvia, que agüentou, com paciência, a choradeira e o estresse da reta final e à Michéli, que sempre "se importou".

Muito obrigada ao meu pai e a minha mãe.

## Índice:

Resumo	5
Apresentação do Tema:	6
1. Diabetes	6
1.1. Definição e Características	6
2. Diabetes Mellitus do tipo 2	8
2.1. Definição e Características	8
2.2. Manifestações Inflamatórias	9
3. Hipoglicemiantes Orais	11
3.1. Sulfoniluréias	11
3.1.1. Mecanismo de Ação das Sulfoniluréias	11
3.1.2. Clorpropamida	13
3.1.3. Glimepirida	14
3.2. Metformina	14
4. Referências Bibliográficas	15
Objetivos	17
Artigo: "IMMUNOMODULATOR EFFECTS OF ORAL HYPOGLICEMIANTS IN CULTURE OF LYMPHOCYTES FROM PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 2."	18
1. Abstract	19
2. Introduction	20
3. Material and Methods	22
4. Results	25
5. Discussion	26
6. References	29
7. Subtitles	31
8. Figures	32
Considerações Finais	36
Anexos e Dados Complementares	37

Resumo:

A clorpropamida é uma droga hipoglicemiante que atua bloqueando os canais de  $K^+$  ATP-dependentes, provocando com isto um aumento na liberação de insulina. Seguindo-se uma série de experimentos a cerca da frutose-1,6-bisfosfato, avaliando seus efeitos anti-inflamatório e hipoglicemiante, foi proposto, para esta droga, um mecanismo de ação associado ao bloqueio de canais de  $K^+$  ATP-dependentes. Em um estudo comparativo entre a clorpropamida e a frutose-1,6-bisfosfato foi observado um efeito imunomodulador do agente hipoglicemante em cultura de linfócitos.

Este trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos imunomoduladores das drogas hipoglicemiantes orais em cultura de linfócitos de voluntários sadios e pacientes diabéticos do tipo 2. Para isso foram realizados experimentos *in vitro* e *ex vivo* utilizando as seguintes drogas hipoglicemiantes: sulfoniluréias, metformina e a terapia combinada de ambas. No estudo *ex vivo* foi acrescentado um grupo de pacientes diabéticos que controlavam a glicemia através de dieta apropriada. Os resultados obtidos demonstraram que existe um efeito inibidor da proliferação celular por parte dos anti diabéticos orais, tanto das sulfoniluréias quanto da metformina, e que esse efeito apresenta correspondência em ambos experimentos. Os pacientes diabéticos do tipo 2 que fazem uso exclusivo da dieta também tiveram uma redução significativa da proliferação celular quando submetidos ao agente imunoestimulador. A partir disto podemos sugerir que as manifestações inflamatórias relacionadas ao diabetes mellitus do tipo 2 podem estar sofrendo influência da terapêutica.

## Apresentação do Tema

### 1. Diabetes

#### 1.1. Definição e Características

O diabetes mellitus é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos. Caracteriza-se por hiperglicemia crônica, freqüentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial.

As conseqüências do diabetes a longo prazo decorrem de alterações micro e macrovasculares que levam a disfunção, dano ou falência de vários órgãos. As complicações crônicas incluem a nefropatia, com possível evolução para insuficiência renal, a retinopatia, com a possibilidade de cegueira e/ou neuropatia, com risco de úlceras nos pés, amputações, artropatia de Charcot e manifestações de disfunção autonômica, incluindo disfunção sexual.

A evolução para o diabetes mellitus ocorre ao longo de um período de tempo variável, passando por estágios intermediários que recebem as denominações de glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída. Os primeiros estágios representariam evidências precoces de disfunção de célula beta e os segundos, na presença de glicemia de jejum normal, representariam quadro de resistência insulínica. Na presença de ambos os estágios, haveria um quadro misto, com maior risco para progressão para diabetes e doença cardiovascular (1).

Pessoas com níveis altos ou mal controlados de glicose no sangue podem apresentar:

- Muita sede;
- Vontade de urinar diversas vezes;

- Perda de peso (mesmo sentindo mais fome e comendo mais do que o habitual);
- Fome exagerada;
- Visão embaçada;
- Infecções repetidas na pele ou mucosas;
- Machucados que demoram a cicatrizar;
- Fadiga (cansaço inexplicável);
- Dores nas pernas por causa da má circulação.

Em alguns casos não há sintomas, ocorrendo com maior frequência no diabetes tipo 2. Neste caso, a pessoa pode passar muitos meses, às vezes anos, até descobrir a doença. Os sintomas muitas vezes são vagos, como formigamento nas mãos e pés, portanto é importante pesquisar o diabetes em todas as pessoas com mais de 40 anos de idade.

Sabe-se que o diabetes do tipo 2 possui um fator hereditário maior do que do tipo 1. Além disso, há uma grande relação com a obesidade e o sedentarismo. Estima-se que 60% a 90% dos portadores da doença sejam obesos, sendo a incidência maior após os 40 anos. Uma de suas peculiaridades é a contínua produção de insulina pelo pâncreas, associada a uma incapacidade de absorção de glicose por parte das células musculares e adiposas. Esta dificuldade das células em obter a glicose da corrente sanguínea chamamos de "resistência insulínica".

O diabetes tipo 2 é cerca de 8 a 10 vezes mais comum que o tipo 1 e pode responder ao tratamento com dieta e exercício físico. Outras vezes pode necessitar de medicamentos orais e, por fim, a combinação destes com a insulina (2).

## 2. Diabetes Mellitus do tipo 2

### 2.1. Definição e Características

O diabetes do tipo 2 é a forma mais prevalente da doença, geralmente assintomática em estágios iniciais e pode permanecer sem diagnóstico por muitos anos (3).

Indivíduos com diabetes tipo 2 não diagnosticados apresentam riscos significativamente maiores de sofrerem acidente vascular cerebral, doenças coronarianas e doença vascular periférica do que a população não-diabética. Há também maior probabilidade de apresentarem dislipidemias, hipertensão e obesidade (3).

O diabetes tem sido clinicamente associado com aumento da susceptibilidade a infecções, mas os mecanismos específicos são multifatoriais. Já foram descritas redução das atividades fagocítica e bactericida (4). Os efeitos nocivos da hiperglicemia em pacientes com doença crítica (sepse, por exemplo) já foram descritos mesmo não estando associados ao diabetes (Marik et al). Foi demonstrado que a glicose pode ser um poderoso pró inflamatório, aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio e aumentando os níveis de interleucina 8 (IL-8) no plasma, um potente agente quimiotático para neutrófilos. A hiperglicemia reduz ainda os níveis óxido nítrico endotelial, causando anormalidades na atividade vascular e na perfusão de órgãos, ao mesmo tempo em que pacientes diabéticos com infarto agudo de miocárdio, nos quais a glicose foi mantida em níveis inferiores a 215 mg/dL, tiveram uma melhor recuperação quando relacionados com pacientes que não tiveram os níveis glicêmicos controlados (5).

## 2.2. Manifestações Inflamatórias

O sistema imunológico é um mecanismo de proteção e reação que o organismo desenvolveu para sua própria regulação. Suas principais funções são o combate a microorganismos invasores, eliminação de células mortas, eliminação de células que tenham sido infectadas por algum agente nocivo e a renovação de determinadas estruturas protéicas (sistema complemento, aminas vasoativas, etc.). Para tal grau de especificação foi necessário um alto nível de organização dos componentes do sistema imunológico, gerando diferentes atribuições e reações. Algumas células, por exemplo, matam diretamente os invasores (células citotóxicas), outras destroem células derivadas de mitoses anormais através de substâncias que impedem sua proliferação e ainda, algumas células tem a função de apenas identificar os organismos invasores. As principais células do sistema imunológico são os leucócitos e as células do sistema mononuclear fagocitário (retículo endotelial e mastócitos).

Além da capacidade de imunidade natural (resposta inespecífica), o organismo humano também desenvolve imunidade específica contra agentes invasores (tais como bactérias, vírus e toxinas), induzida por um sistema imune especial formador de anticorpos e linfócitos ativados que atacam e destroem esses agentes.

Existem dois tipos básicos e intimamente relacionados de imunidade adquirida. A imunidade humoral (mais especificamente os linfócitos B) desenvolve anticorpos circulantes, que são globulinas capazes de atacar agentes invasores. Já a imunidade celular é responsável pela formação de grandes quantidades de linfócitos T ativados (linfoproliferação) designados para destruir o agente estranho.

Já foi sugerido que o diabetes tipo 2 seja a manifestação de uma resposta inflamatória, pois encontrou-se em pacientes resistentes à insulina, aumento nos níveis de marcadores de

inflamação (Proteína C Reativa e fibrinogênio) e de citocinas pró-inflamatórias, notadamente Interleucina-6 e Fator de Necrose Tumoral (FNT- $\alpha$ ) associado à deficiência na produção de citocinas anti-inflamatórias (Interleucina-10) (6). Também foi observado que a resistência a insulina na sepse é diretamente proporcional à severidade da resposta inflamatória (5).

Estudos recentes associam a presença de FNT- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatórias de atividade citotóxica, na circulação de pacientes com resistência à insulina. A expressão de FNT- $\alpha$  está aumentada nos tecidos adiposo e muscular esquelético de pacientes obesos e diabéticos do tipo 2.

Existem dois tipos de receptores para o FNT- $\alpha$  na superfície das células humanas, os receptores de FNT- $\alpha$  do tipo I, principalmente associados à morte celular programada (apoptose), e os do tipo II, associados a processos inflamatórios. As formas solúveis de ambos os receptores estão presentes no plasma. Em diferentes condições, os receptores solúveis de FNT- $\alpha$  podem inativar ou prolongar a ação desta citocina. A ativação do FNT- $\alpha$  em obesos resulta da super expressão de receptores de FNT- $\alpha$  do tipo 2 no tecido adiposo e da fração solúvel do mesmo no plasma. Níveis elevados de receptores solúveis de FNT- $\alpha$  do tipo 2 podem estar relacionados à resistência a insulina (enquanto manifestação inflamatória) e podem estar alterados em pacientes diabéticos do tipo 2 mesmo antes de estabelecido o quadro de obesidade (7) .

Portanto, estudos recentes mostram que a resistência à insulina pode estar diretamente relacionada a mecanismos inflamatórios.

### 3. Hipoglicemiantes Orais

O principal objetivo do tratamento do diabetes é manter o máximo possível a concentração sérica de glicose dentro dos limites de normalidade. A manutenção da concentração de glicose completamente normal é difícil, mas quanto mais ela for mantida dentro da faixa de normalidade, menos provável será a ocorrência de complicações agudas ou de longo prazo. O principal problema ao se tentar manter um controle rígido da concentração sérica de glicose em pacientes diabéticos é a maior chance de se produzir uma redução exagerada da mesma (hipoglicemia). O tratamento do diabetes requer atenção ao controle do peso, exercícios e dieta. Muitos indivíduos obesos com diabetes tipo II não necessitariam de medicação caso perdessem peso e se exercitassem regularmente. Contudo, a redução de peso e o aumento do exercício são difíceis para a maioria dos indivíduos diabéticos. Por essa razão, a terapia de reposição de insulina ou com medicamentos hipoglicemiantes orais é frequentemente necessária. O exercício reduz diretamente a concentração sérica de glicose e, frequentemente, reduz a quantidade de insulina necessária (8).

As principais drogas hipoglicemiantes orais utilizadas no tratamento do diabetes mellitus do tipo 2 são as sulfoniluréias e as biguanidas.

#### 3.1. Sulfoniluréias

##### 3.1.1. Mecanismo de Ação das Sulfoniluréias

As sulfoniluréias agem primariamente pelo estímulo da secreção de insulina nas células  $\beta$  pancreáticas (na presença de ilhotas pancreáticas ativas), e esse estímulo da secreção de insulina é um efeito direto, comprovado através de estudos com pâncreas perfundidos, ilhotas isoladas perfundidas e cultura de células  $\beta$ . Dados disponíveis sugerem que as

sulfoniluréias ligam-se a receptores específicos (associados a canais de  $K^+$  ATP-sensíveis) presentes na superfície externa da membrana plasmática das células  $\beta$ . Ligadas a esses receptores, as sulfoniluréias inibem os canais de  $K^+$  diminuindo a saída de íons  $K^+$  da célula, causando despolarização da membrana plasmática. Essa despolarização induz os canais de  $Ca^{2+}$  voltagem-dependentes a se abrirem permitindo a entrada de  $Ca^{2+}$  na célula. O aumento na concentração de  $Ca^{2+}$  citoplasmático estimula a fusão entre a membrana granular secretora e a membrana celular, seguida pela liberação de insulina (9).

A ação das sulfoniluréias nos canais de  $K^+$  pode apresentar reatividade cruzada variável com receptores celulares em tecidos extrapancreáticos (coração, músculos esquelético e vascular liso). Experimentos relacionando estrutura e função dos canais de  $K^+$  ATP-sensíveis, no fenótipo de camundongos deficientes de diferentes sub-unidades dos canais de  $K^+$  ATP-sensíveis têm fornecido importantes esclarecimentos nos mecanismos que sustentam a seletividade das sulfoniluréias, e as conseqüências potenciais do bloqueio destes canais fora das células  $\beta$  pancreáticas. As diferentes propriedades dos canais de  $K^+$  ATP-sensíveis das células  $\beta$  em comparação com os tecidos cardíaco e muscular são estimadas pela expressão de tipos alternativos de receptores de sulfoniluréias com sítios de ligação não-idênticos. As sulfoniluréias apresentam dois principais tipos de receptores, SUR1 nas células  $\beta$  e SUR2 nos tecidos extra pancreáticos, com potenciais de ação similares (10, 11).

A seqüência de DNA complementar dos canais de  $K^+$  ATP-sensíveis foi isolada pela clonagem e expressão em rins de rato. Foi isolada uma proteína de 45Kda, que apresenta duas extensões em hélice e um proposto domínio de ligação ao ATP, representando a maior parte do desenho da estrutura básica característica de um canal de  $K^+$  voltagem-dependentes. A

presença de uma região H5, que é conhecida por formar a via de condução, indica que a proteína pode partilhar uma origem comum com os canais de  $K^+$  voltagem-dependentes (12).

A semelhança estrutural entre os canais de  $K^+$  ATP-sensíveis (suscetíveis a ação das sulfoniluréias) e os canais de  $K^+$  voltagem-dependentes pode auxiliar na avaliação da eficiência de ligação das sulfoniluréias nas células  $\beta$ , bem como seus parafeitos em tecidos extra pancreáticos. Os canais de  $K^+$  voltagem-dependentes têm um papel crucial na ativação dos linfócitos T humanos, controlando o potencial de repouso da membrana. A inibição destes canais causa despolarização, aumentando o cálcio intracelular, o que pode levar a ativação das células T (13).

A administração de insulina ou de sulfoniluréias em pacientes com diabetes do tipo 2 eleva as concentrações de insulina no sangue e aumenta o metabolismo da glicose, acelerando a sua captação pelas células. Por outro lado, o aumento da energia celular devido à secreção excessiva de insulina é considerado uma causa da obesidade, uma vez que os depósitos de gordura aumentam (14).

### 3.1.2. Clorpropamida

Representante das sulfoniluréias de primeira geração, a clorpropamida tem uma potente atividade hipoglicêmica e uma longa duração da ação. Assim sendo tende a induzir um maior número de episódios de hipoglicemia que as demais. É contra-indicada em pacientes idosos e portadores de nefropatias. Diversos efeitos colaterais podem ocorrer com o uso da clorpropamida, tais como rubor induzido pelo álcool, reações de hipersensibilidade, retenção de água e hiponatremia (9). Em menos de 1% dos pacientes ocorre toxicidade hematológica (leucopenia transitória e trombocitopenia) (4). Já foram realizados estudos que possibilitaram

a observação de um efeito imunomodulador da clorpropamida *in vitro*. Foi observada diminuição da linfoproliferação de células em cultura quando estimuladas por LPS (lipopolissacarídeos de *E. coli*) e a redução da expressão de algumas citocinas pró-inflamatórias, representado pela diminuição de receptores solúveis de FNT- $\alpha$  do tipo II (15).

### 3.1.3. Glimepirida

A glimepirida é uma sulfoniluréia de terceira geração, de efeito brando na secreção de insulina. Alguns estudos demonstraram que a glimepirida aumenta a sensibilidade periférica à insulina ativando a proteína quinase C. Recentemente a glimepirida foi associada ao mecanismo de resistência à insulina juntamente com o FNT- $\alpha$  e a adiponectina, um marcador do estresse oxidativo (14, 16).

### 3.2. Metformina

A metformina, pertencente ao grupo das biguanidas, não tem efeito na ausência ou deficiência de insulina. A metformina reduz a hiperglicemia aumentando a sensibilidade periférica à insulina, catalisando a atividade da tirosina-quinase, e reduzindo a produção de glicose via gliconeogênese, bem como limitando a absorção de glicose no intestino . A metformina é utilizada sozinha ou associada às sulfoniluréias devido ao seu efeito redutor nos níveis de glicose plasmática e de hemoglobina glicosilada, além de reduzir os níveis plasmáticos de colesterol total, LDL e triglicerídios (9, 17).

#### 4. Referências

1. Consenso Brasileiro sobre Diabetes 2002. Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2. Sociedade Brasileira de Diabetes.
2. Site da Sociedade Brasileira de Diabetes. [www.diabetes.org.br](http://www.diabetes.org.br)
3. American Diabetes Association: Screening for Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26, Supp 1.
4. Stites DP: *Basic & Clinical Immunology*. 1994. eight edition. Katzung, Bertram, G: *Farmacologia Básica e Clínica*. 1994. 5ª edição
5. Marik PE, Raghavan M: Stress-Hyperglycemia, Insulin and Immunomodulation in Sepsis. *Intensive Care Med*. 2004;30(5):748-56.
6. van Exel E, Gusseklo J, de Craen AJM, Frölich M, Bootsma-van der Wiel A, Westendorp RGJ: Low Production Capacity of Interleukin-10 Associates With the Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2002; vol.51, 1088-1092.
7. Straczkowski M, Kowalska I, Stepień A, Dzienis-Straczkowska S, Szelachowska M, Kinalska I: Increased Plasma-Soluble Tumor Necrosis Factor -  $\alpha$  Receptor 2 Level in Lean Nondiabetic Offspring of Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes Care* 2002; 25:1824-1828.
8. [www.msd.brazil.com](http://www.msd.brazil.com)
9. Belfiore F, Megensen CE: *New Concepts in Diabetes and Its Treatment*. 2000.
10. Gribble FM, Reimann F: Pharmacological modulation of K (ATP) channels. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(2):333-339.
11. Gribble FM, Reimann F: Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era. *Diabetologia* 2003; 46(7):875-891.

12. Ho, K, Nichols, CG, Lederer, WJ, Lytton, J, Vassilev, PM, Kanazirska, MV, Hebert, SC: Cloning and Expression of an Inwardly Rectifying ATP-Regulated Potassium Channel. *Nature* 1993; 362 (6415): 31-38.
13. Schmalhoefer WA, Bao J, McManus OB, Green B, Matyskiela M et al: Identification of a New Class of Inhibitors of the Voltage-Gated Potassium Channel, Kv1.3, with Immunosuppressant Properties. *Biochemistry* 2002; 41: 7781-7794.
14. Suzuki Y, Matsui-Hirai H, Kano H, Fukatsu A, Nomura N, Miyazaki A, Iguchi A: Plasma Adiponectin Plays an Important Role in Improving Insulin Resistance With Glimepiride in Elderly Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes Care* 2003; 26:285-289.
15. Nunes FB, Alves-Filho JCF, Bastos CMA, Tessele PM, Caberlon E, Moreira KB, Ferreira TM, Oliveira JR: Effect of the Chlorpropamide and Fructose-1,6-Bisphosphate on Soluble TNF Receptor II Levels. *Pharmacological Research* 2004; 49: 449-453.
16. Hribal ML, D'Alfonso R, Giovannone B, Lauro D, Liu YY, Borboni P, Federici M, Lauro R, Sesti G.: The sulfonylurea Glimepiride Regulates Intracellular Routing of the Insulin-Receptor Complexes Through their Interaction with Specific Protein Kinase C Isoforms. *Mol Pharmacol.* 2001 Feb;59(2):322-30
17. Holland W, Morrison T, Chang Y, Wiernsperger N, Stith BJ: Metformin (Glucophage) Inhibits Tyrosine Phosphatase Activity to Stimulate the Insulin Receptor Tyrosine Kinase. *Biochemical Pharmacology* 67 (2004) 2081–2091

## Objetivos

### Objetivo geral:

Determinar os efeitos imunomoduladores dos hipoglicemiantes orais em cultura de linfócitos de voluntários sadios e pacientes diabéticos do tipo 2.

### Objetivos específicos:

1. Avaliar a ação imunomoduladora *in vitro* da clorpropamida (sulfoniluréia) e/ou metformina (biguanida), isoladas e combinadas, sobre a proliferação de linfócitos de voluntários sadios quando submetidos a um agente estimulador da proliferação celular (fitohemaglutinina).
2. Avaliar a ação imunomoduladora das sulfoniluréias e/ou biguanidas, isoladas e combinadas, sobre os linfócitos de pacientes diabéticos, quando submetidos a um agente estimulador da proliferação celular (fitohemaglutinina).

IMMUNOMODULATOR EFFECTS OF ORAL HYPOGLICEMIANTS IN CULTURE OF LYMPHOCYTES FROM PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 2.

Karina F. Mello; Fernanda B. Nunes; Eduardo Caberlon; Carolina M. A. Bastos; Carmen S. A. de Oliveira; Jarbas R. de Oliveira.

Laboratório de Pesquisa em Biofísica; Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Faculdade de Biociências (FaBio). Avenida Ipiranga, 6681, prédio 12, bloco C, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author: Jarbas Rodrigues de Oliveira, PhD; PUCRS, Avenida Ipiranga, 6681, prédio 12, bloco C, sala 263, phone +55 51 3320 3500, ex.: 4147; Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; CEP 90.619-900; e-mail: jarbas@pucrs.br

Submitted to: International Immunopharmacology

## Abstract

Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by hyperglycemia. It results from insulin secretion defects, insulin action fails, or both. Diabetes type 2 is the most prevalent kind of this disease, frequently asymptomatic in initial periods and it can remain without diagnosis for many years. It has already been suggested that diabetes type 2 is an inflammatory manifestation. It was observed an increase in the inflammation markers levels (C Reactive Protein and fibrinogen) and some pro-inflammatory cytokines in insulin resistant patients (Interleukin-6 and TNF- $\alpha$ ) associated to deficiency in the anti-inflammatory cytokines production (Interleukin-10). The main drugs used in diabetes mellitus type 2 treatment are sulphonylureas and biguanides. The aim of this work was to investigate possible modulating effects in lymphocytes proliferation caused by oral hypoglycemics (sulphonylureas and metformin), *in vitro* and *ex vivo*, when cultured with phytohemagglutinin (PHA). The results obtained by *in vitro* and *ex vivo* studies when analyzed in parallel supplied us with a possible immunomodulator profile. Complementary studies to the cellular proliferation, such as dosages of pro-inflammatory cytokines and activated cellular populations identification, could further clarify this issue. Analysis of variations in membrane potentials of lymphocytes under the mitogen and others studied drugs will disclose how much cell proliferation capacity is affected by diabetes mellitus of type II.

Key words: diabetes mellitus type 2, sulphonylureas, metformin, immunomodulation.

## Introduction

Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by hyperglycemia. It results from insulin secretion defects, insulin action fails, or both. Diabetes type 2 is the most prevalent kind of this disease, frequently asymptomatic in initial periods and it can remain without diagnosis for many years (1).

It has already been suggested that diabetes type 2 is an inflammatory manifestation. An increase in the inflammation markers levels (C Reactive Protein and fibrinogen) and some pro-inflammatory cytokines were observed in insulin resistant patients (Interleukin-6 and TNF- $\alpha$ ) associated to a deficiency in the production of anti-inflammatory cytokines (Interleukin-10)(2). It was also observed that insulin resistance, in sepsis, is proportional to inflammation severity (3).

The main drugs used in diabetes mellitus type 2 treatment are sulphonylureas and biguanides. The sulphonylureas act by directly stimulating insulin secretion in pancreatic cells. Available data suggest that there are specific receptors for sulphonylurea (associated to the ATP-sensitive  $K^+$  channels) in the external plasmatic membrane of the cells. Binding to these receptors, the sulphonylureas block the  $K^+$  channels, reducing the exit of  $K^+$  ions from the intracellular medium. This causes a plasmatic membrane depolarization, which induces the voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels to open, allowing the  $Ca^{2+}$  ions to enter in the cell. The increase in cytoplasmic  $Ca^{2+}$  concentration stimulates the fusion between the granular membrane and the cellular membrane, leading to insulin release (4). The sulphonylureas action over  $K^+$  channels can present cross reactivity with cellular receptors in extra pancreatic tissues (cardiac, skeletal and smooth muscle).

Representing the first generation sulphonylureas, chlorpropamide has a powerful hypoglycemic activity and a long time of action. For that reason, it tends to induce a great number of hypoglycemic episodes. It is counterindicated in aged and nephropatic patients(4). Previous studies demonstrated that there is a probable immunomodulator effect of chlorpropamide *in vitro*. Reduction of cell proliferation in culture was observed upon stimulation with LPS (lipopolysaccharides of *Escherichia. coli*). Also, reduction of some pro-inflammatory cytokines expression, was observed especially soluble receptors of type II TNF- $\alpha$  (9).

Metformin, which is a biguanide, does not have any effect in insulin absence or deficiency. Metformin reduces hyperglycemia, increasing peripheral sensitivity to insulin, catalyzing tyrosine-kinase activity, and reducing glucose production by gluconeogenesis, as well as limiting glucose absorption in the intestines. Metformin is used alone or associated to sulphonylureas for diabetes treatment(4) (10).

The aim of this work was to demonstrate possible modulating effects in lymphocyte proliferation caused by oral hypoglycemics (sulphonylureas and metformin), *in vitro* and *ex vivo*.

## Material and Methods

### Subjects

Patients were divided in five groups according to treatment: 5 non-diabetics patients, 5 diabetics patients with controlled diet, 5 diabetics patients treated with sulphonylureas, 5 diabetics patients treated with metformin and 5 diabetics patients treated with combined therapy (sulphonylurea + metformin).

### Criteria of Inclusion:

Patients and volunteers agreed to participate in this project, signing an Informed Consent. This was presented to the patient/volunteer at a moment previous to the collection of the material. The reading of the term was carried through by the researcher so that any necessary clarifications were given.

Patients answered a "Questionnaire of Pharmacovigilance" . This was presented to the patient previously to collection and soon after signature of the Informed Consent.

### Criteria of Exclusion:

Patients suffering from primary or secondary immunosuppression.

Patients who presented uncompensated diabetes (characterized by values of Glicated Hemoglobin > 8,0).

### Preparation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

PBMCs were isolated from blood of healthy and diabetic individuals by gradient centrifugation on Ficoll-Paque™ plus (Amersham Biosciences, Waukesha, Wisconsin) and

resuspended in RPMI 1640 supplemented with 0,15% garamicin and 20% human AB serum (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md) at final cell density of  $1,6 \times 10^6$  /mL as previously described (11). Viability by trypan blue dye exclusion was uniformly greater than or equal to 90%.

#### Cytotoxicity assay

Chlorpropamide, metformin, or a mix of both, obtained in the salt form (chloridrate) by Almofarix ®, were dissolved in RPMI 1640 and added directly to PBMCs ( $1,6 \times 10^5$  cell/well), which were incubated in 24-well microtiter plates (Corning Inc., Corning, NY) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub>-humidified incubator. The cellular viability was performed by trypan blue dye exclusion after 96 hours of incubation. Results are presented as a percentage (mean ± SD) and all reactions were performed in triplicate. Chlorpropamide therapeutic dosis is equivalent approximately to 2 mM in plasmaties concentrations (steady state). For metformin, at this same situation, the concentration is, approximately, 4 mM (13).

#### Lymphoproliferation assay

Phytohemagglutinin (PHA) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) was used to stimulate T-lymphocyte proliferation. Chlorpropamide and metformin were dissolved in RPMI 1640. PBMCs ( $1,6 \times 10^5$  cell/well) were plated directly with the folloing concentrations of chlorpropamide (5mM) and metformin (1mM), which were cultured in the presence of mitogen (10 µg/ml, PHA) in 96-well microtiter plates (Nunc) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub>-humidified incubator for 96 hours (*in vitro* and *ex vivo*).

Lymphocyte proliferation was determined by MTT assay as previously described (11) (12). Briefly, MTT (3-[4-5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma

Chemical Co., St Louis, MO) was dissolved in RPMI 1640 at 5mg/ml and added to all wells of an assay, and plates were incubated at 37 °C for 4 h. Isopropanol was added to all wells and mixed thoroughly to dissolve the dark blue crystals. After a few minutes, the plates were read on a Hyperion MicroReader reader, using a test wavelength of 540 nm and a reference wavelength of 650 nm.

Group differences were tested by one-way analysis of variance (ANOVA) using SPSS 11.0 for Windows (8.0). The results were expressed as means  $\pm$  SEM and all reactions were performed in triplicate.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

We analyzed the action of sulphonylureas and metformin alone or combined over cell proliferation in response to phytohemagglutinin (PHA). We can see in Figure 1 that the number of cells of group 1 (cells + PHA) showed a significant increase when compared with group 0 (just cells) ( $p < 0,05$ ). In the same figure, we can see that in groups 2 and 3 (chlorpropamide and metformin respectively) there was a reduction of the cell proliferation and in group 4 (combined drugs), the reduction was also present, but much more accentuated ( $p < 0,05$ ).

Because cells could have been lost due to drug toxicity, we determined the cytotoxicity of these drugs in the concentrations used. In Figure 2, we can see that the group 1 (chlorpropamide) and 2 (metformin) didn't suffer alterations in their viability, but in group 3 (drugs combined), the cells had their viability significantly reduced ( $p < 0,05$ ).

We also evaluated the effects of these drugs, isolated or in combination, in the therapeutic dosis. To do this, we performed an *ex vivo* study with lymphocytes from diabetics patients. In Table 1, we see patient data like age, time of treatment and glycosilated hemoglobin (HbA1c), used to evaluate the controlled diabetes. We did not observe significant differences in ages or HbA1c. However, the patients who had received sulphonylureas had a significant difference in compared with the two other groups ( $p < 0,05$ ).

In the *ex vivo* cultures of PBMCs, we observed in Figure 3 that there was a significant reduction in cell proliferation of group 1 (diabetics with diet cells) when in compared with group 0 (non diabetics). At the same time, we observed that the three used treatments (sulphonylurea, metformin and combined therapy) caused a significant reduction of the cell proliferation when in comparison with groups 0 ( $p < 0,05$ ) and 1 ( $p < 0,05$ ).

## Discussion

Diabetes is frequently associated with an increase in susceptibility to infections.. It is know that type 2 TNF- $\alpha$  receptors levels can be increased in diabetic patients and this can be related to insulin resistance (14).

Experiments that relate structure and function of ATP-sensitive  $K^+$  channels, in mice deficient for different sub-units of this channels have supplied important information on the mechanisms that support sulphonylureas selectivity and potential consequences of the blockade of these channels in pancreatic cells. There are different properties of pancreatic cells ATP-sensitive  $K^+$  channels compared to cardiac and muscular tissue. The channels are stimulated by the expression of alternative types of sulphonylureas receptors with not-identical linking sites. Sulphonylureas present two main types of receptors, SUR1 in pancreatic cells and SUR2 in extra pancreatic tissues, with similar potentials of action (5, 6). The structure of ATP-sensitive  $K^+$  channels has two extensions in helix (45 Kda) that present one linking site to the ATP. This channel locus is very similar to the voltage-dependent  $K^+$  channels basic structure. This could indicate that this channel region shares a common origin with the voltage-dependents  $K^+$  channels (7).

The structural similarity between the ATP-sensitive  $K^+$  channels (susceptible to the action of sulphonylureas) and the voltage-dependents  $K^+$  channels can help evaluate the linking efficiency of the sulphonylureas in cells, as well as their side effects in extra pancreatic tissues. The voltage-dependents  $K^+$  channels have a crucial role in human T lymphocytes activation, controlling the membrane rest potential. The inhibition of these channels can cause depolarization, increasing the intracellular calcium, leading to T cell activation (8).

In the *in vitro* experiments, we observed the reduction of cell proliferation upon incubation with hypoglycemics. In the sulphonylurea group, we considered that this action could be associated to the blockade of the ATP-sensitive channels of  $K^+$ . The metformin's mechanism is for the moment unknown. When the both drugs were used in combination we had have a high degree of cytotoxicity, so it was impossible to analyze the immunomodulator effect.

In the *ex vivo* experiment, we were not able to determine the exact plasmatic concentration of each drug, but we considered the therapeutic concentrations used to keep diabetes under control. In this experiment we can see that the diabetes, under controlled diet, and for a mechanism not very clearly understood, inhibits the action of the mitogen. The cells of the patients treated with sulphonylureas, in turn, reproduced the *in vitro* results, as well as metformin and the combined therapy also reproduced the *in vitro* effect, inhibiting proliferation. We could not analyze the cytotoxic condition of combined therapy in these cases (*ex vivo*).

At the same time that these drugs can revert the inflammatory profile, they can increase the patient susceptibility to infections, causing a inefficient immunological response. In Figure 3 we demonstrated that diabetes, under controlled diet, can significantly reduce cell proliferation stimulated by PHA. This means that diabetic patients have difficulties to execute an efficient inflammatory response and hypoglycemics drugs can aggravate this situation.

Complementary studies to cellular proliferation, as well as analysis of pro-inflammatory cytokines and activated cellular populations will help clarify this phenomenon. The analysis of the lymphocyte cellular membrane potential variation under the mitogen and

the others studied drugs, will disclose how much the proliferation capacity would be activated or suppressed in the conditions imposed by the presence of diabetes mellitus of type II.

## References

1. American Diabetes Association: Screening for Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26, Supp 1
2. van Exel E, Gusseklo J, de Craen AJM, Frölich M, Bootsma-van der Wiel A, Westendorp RGJ: Low Production Capacity of Interleukin-10 Associates With the Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2002; vol.51, 1088-1092
3. Marik PE, Raghavan M: Stress-Hyperglycemia, Insulin and Immunomodulation in Sepsis. *Intensive Care Med.* 2004;30(5):748-56
4. Belfiore F, Megensen CE: *New Concepts in Diabetes and Its Treatment.* 2000
5. Gribble FM, Reimann F: Pharmacological Modulation of K (ATP) Channels. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(2):333-339.
6. Gribble FM, Reimann F: Sulphonylurea Action Revisited: The Post-Cloning Era. *Diabetologia* 2003; 46(7):875-891
7. Ho, K, Nichols, CG, Lederer, WJ, Lytton, J, Vassilev, PM, Kanazirska, MV, Hebert, SC: Cloning and Expression of an Inwardly Rectifying ATP-regulated Potassium Channel. *Nature* 1993; 362 (6415): 31-38.
8. Schmalhoefer WA, Bao J, McManus OB, Green B, Matyskiela M et al: Identification of a New Class of Inhibitors of the Voltage-Gated Potassium Channel, Kv1.3, with Immunosuppressant Properties. *Biochemistry* 2002; 41: 7781-7794.
9. Nunes FB, Alves-Filho JCF, Bastos CMA, Tessele PM, Caberlon E, Moreira KB, Ferreira TM, Oliveira JR: Effect of the Chlorpropamide and Fructose-1,6-Bisphosphate on Soluble TNF Receptor II Levels. *Pharmacological Research* 2004; 49: 449-453

10. Holland W, Morrison T, Chang Y, Wiernspergerb N, Stith BJ: Metformin (Glucophage) Inhibits Tyrosine Phosphatase Activity to Stimulate the Insulin Receptor Tyrosine Kinase. *Biochemical Pharmacology* 2004; 67 2081–2091
11. Nunes FB, Graziottin CM, Alves-Filho JCF, Lunardelli a, Caberlon E Peres A, Oliveira JR: Immunomodulatory Effect of Fructose-1,6-bisphosphate on T-lymphocytes. *International Immunopharmacology* 2003; 3: 267-272
12. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and citotoxicity assays. *J immunol Methods* 1983; 65 ; 55-63
13. Katzung BG. *FARMACOLOGIA Básica & Clínica*. Oitava Edição. 2003. 630-632.
14. Straczkowski M, Kowalska I, Stepień A, Dzienis-Straczkowska S, Szelachowska M, Kinalska I: Increased Plasma-Soluble Tumor Necrosis Factor -  $\alpha$  Receptor 2 Level in Lean Nondiabetic Offspring of Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes Care* 2002; 25:1824-1828.

## Subtitles

Figure 1 - *In vitro* lymphoproliferation assay using health volunteers cells under action of oral hypoglicemiant. Significantly different results between group 0 and others are represented by \*  $p < 0,05$ . Between group 1 and others are represented by #  $p < 0,05$ .

Groups: 0 = cells (n = 4); 1= cells + PHA (n = 4); 2 = cells + PHA + chlorpropamide (5mM) (n = 4); 3 = cells + PHA + metformin (1mM) (n = 4); 4 = cells +PHA (5mM) + metformin (1mM) (n = 4).

Figure 2 - *In vitro* citotoxicity assay using health voluteers cells under action of oral hypoglicemiant. Significantly different results between group 0 and others are represented by \*  $p < 0,05$ .

Groups: 0 = cells (n = 3); 1 = cells = chlorpropamide (5mM) (n = 3); 2 = cells + metformin (1mM); 3= cells = chlorpropamide (5mM) = metformin (1mM) (n = 3).

Figure 3 – *Ex vivo* lymphoproliferation assay using diabetics type 2 patients cells that had used oral hypoglicemiant or controlled diet in their treatment. Significant different results between group 0 and others are represented by \*  $p < 0,05$ . Differences between group 1 and others are represented by #  $p < 0,05$ .

Groups: 0 = non-diabetics + PHA (n = 8); 1 = diabetics + PHA + controlled diet (n = 5); 2 = diabetics + PHA + sulphonylurea (n = 5); 3 = diabetics + PHA + metformin (n = 5); 4 =diabetics + PHA + sulphonylurea + metformin (n = 5)

Figure 1

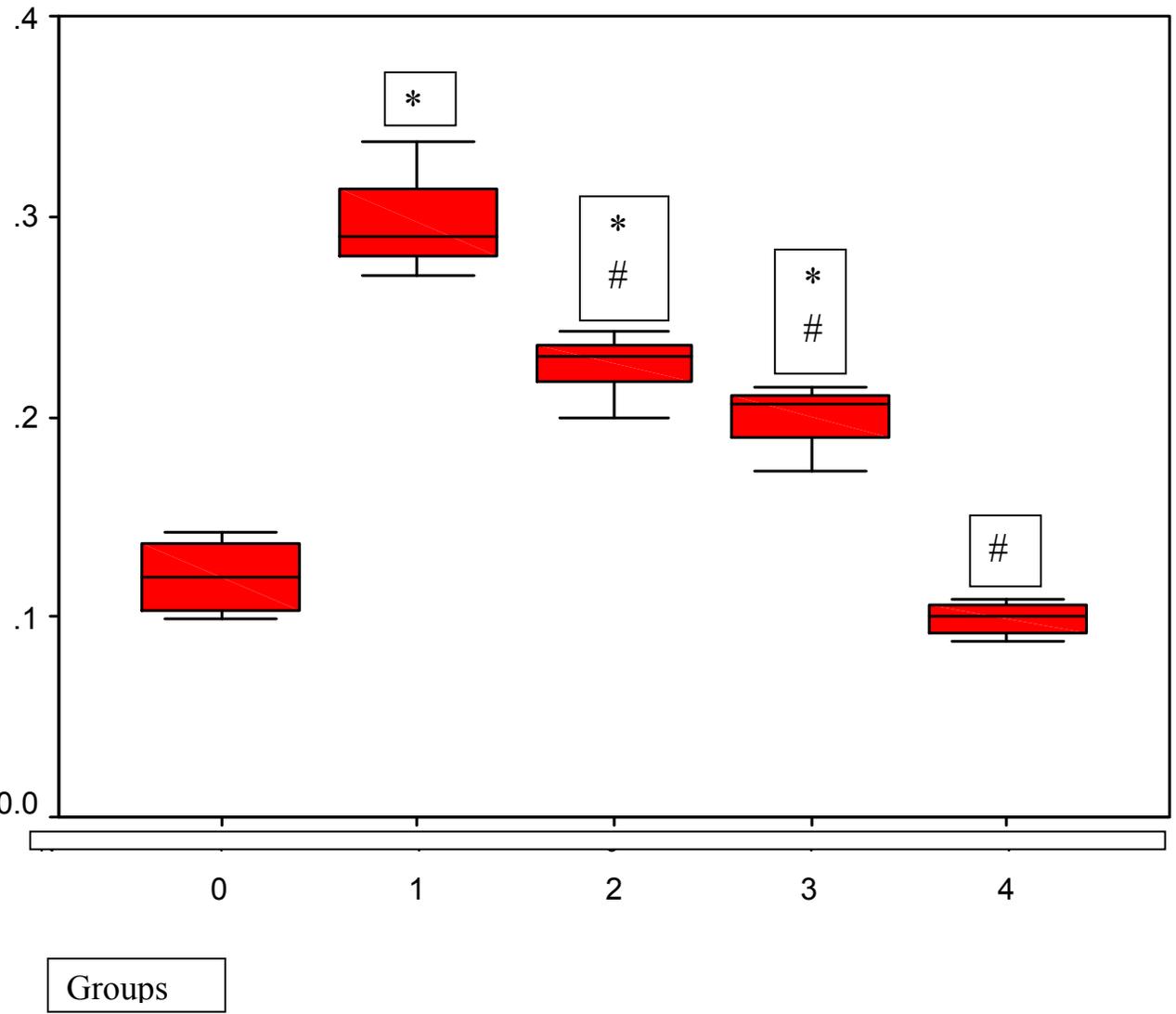


Figure 2

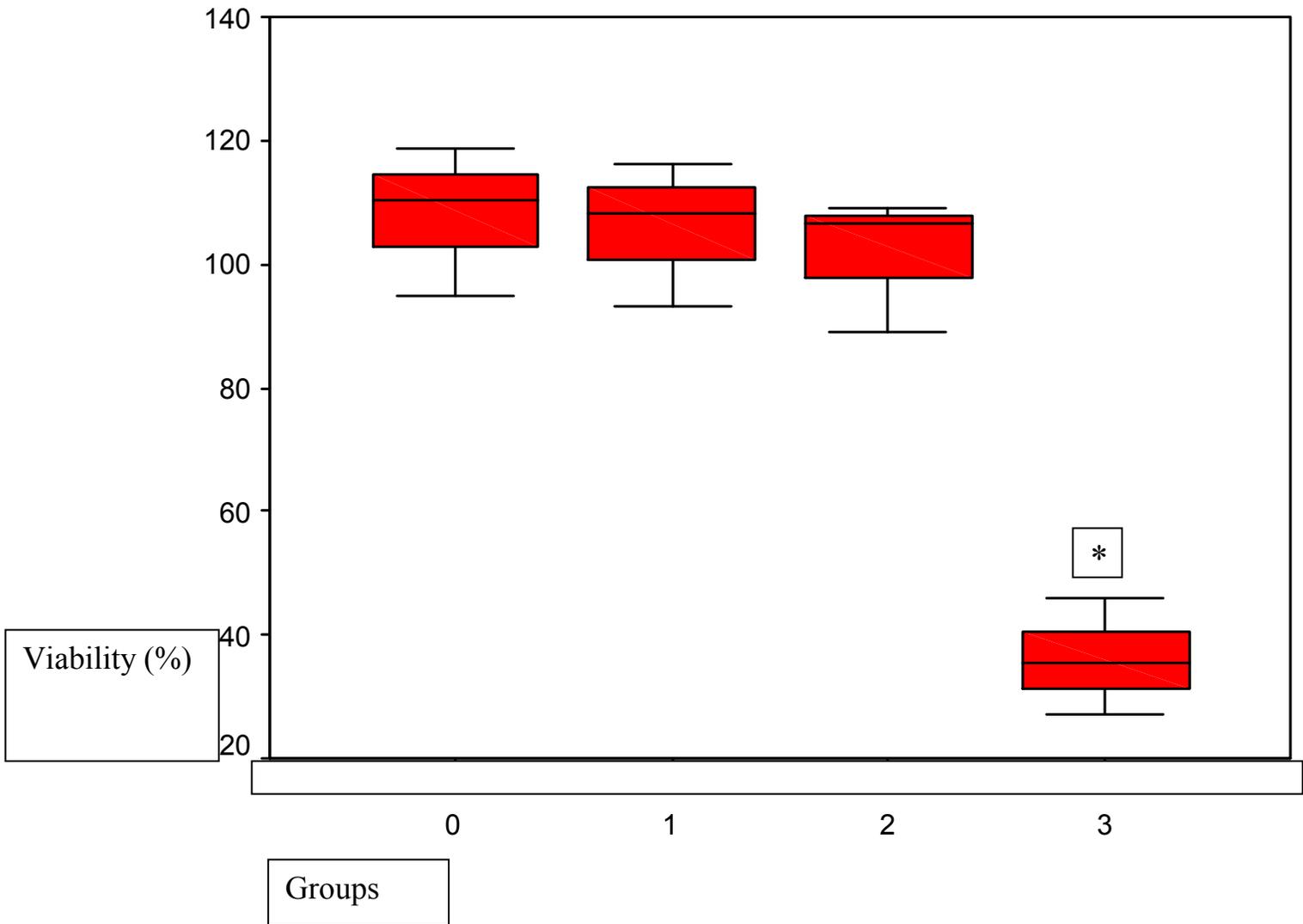
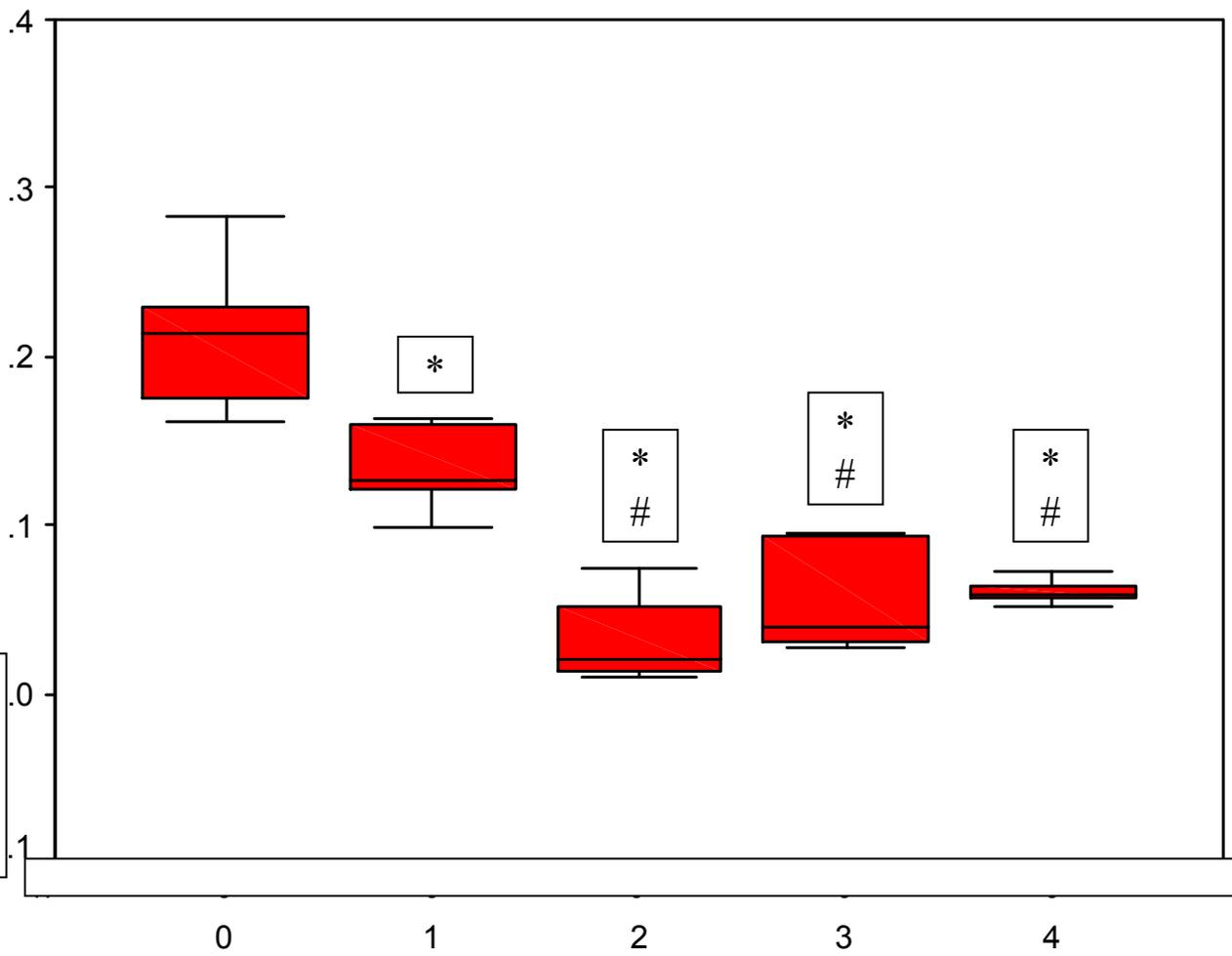


Figure 3



Absorbance  
(sample) -  
Absorbance  
(control)

Groups

Treatment	Age (years)	Time to treatment (months)	Glicated hemoglobin (%)
Diet	53 +/- 5	43 +/- 53	6,3 +/- 0,8
Sulphonylurea	62 +/- 20	88 +/- 128	6,4 +/- 1,4
Metformin	56 +/- 10	38 +/- 82	5,7 +/- 0,9
Sulphonylurea + Metformin	59 +/- 10	67 +/- 53	6,0 +/- 2,0

(Table 1 – Patients data represented by age, time to treatment and glicosilated hemoglobin.)

## Considerações Finais

Atualmente, existem no Brasil cerca de 4,5 milhões de diabéticos do tipo 2, o que leva essa patologia a índices capazes de tornar o diabetes do tipo 2 um problema de saúde pública. A ação patológica desta doença, com o passar do tempo, atinge graus sistêmicos (coração, rins, olhos e nervos) e apresenta um aumento na susceptibilidade a infecções secundárias.

Os hipoglicemiantes orais utilizados no tratamento do diabetes do tipo 2 são capazes de melhorar o quadro inflamatório, porém podem provocar efeitos colaterais, relacionados a imunossupressão.

Nossos resultados mostram uma potencialização da imunomodulação em pacientes que fazem uso de sulfoniluréias e metformina, isoladas ou combinadas, o que pode ser nocivo. Estes resultados já eram esperados em relação às sulfoniluréias, já que o bloqueio dos canais de  $K^+$  ATP-dependentes pode acontecer, não só no pâncreas, mas também em células não pancreáticas.

Para a metformina, por seu mecanismo distinto, não se esperava o mesmo efeito, porém essa droga provocou uma significativa imunomodulação, não só *in vitro*, mas também em doses terapêuticas nos pacientes. O mecanismo que desencadeou esse processo é, até o momento, desconhecido.

É importante salientar que a terapia combinada não potencializou a ação isolada de cada droga, porém apresentou alta toxicidade para os linfócitos *in vitro*, nas concentrações utilizadas, fazendo com que pudéssemos supor que esta escolha terapêutica poderia agravar o quadro imunossupressor nos pacientes, tornando ainda maior a sua susceptibilidade a infecções.

## Anexos e Dados Complementares

Paciente	Idade	Tempo de Doença	Tratamento	HbA1c
01	48 anos	3 anos	Metformina (850mg/dia)	4,8 %
02	58 anos	10 anos	Glibenclamida (20mg/dia) Metformina (850 mg/dia)	8,0 %
03	55 anos	15 anos	Glibenclamida (20 mg/dia)	7,8 %
04	74 anos	10 anos	Metformina (850 mg/dia)	5,6 %
05	48 anos	8 meses	Metformina (850 mg/dia)	6,3 %
06	61 anos	4 meses	Metformina (850 mg/dia)	6,1 %
07	59 anos	7 anos	Glibenclamida (20 mg/dia) Metformina (850 mg/dia)	5,6 %
08	47 anos	2 anos	Metformina (850 mg/dia)	5,7 %
09	67 anos	4 anos	Glibenclamida (20 mg/dia) Metformina (850 mg/dia)	5,2 %
10	55 anos	1 ano	Glibenclamida (20 mg/dia)	4,9 %
11	72 anos	8 meses	Glibenclamida (20 gm/dia)	6,0 %
12	60 anos	2 anos	Glibenclamida (20 mg/dia) Metformina (850 mg/dia)	4,6 %
13	82 anos	2 anos	Glibenclamida (20 mg/dia)	6,3 %
14	51 anos	2 anos	Dieta	6,2 %
15	55 anos	8 anos	Dieta	6,2 %
16	45 anos	18 anos	Glibenclamida (20 mg/dia)	7,1 %

17	49 anos	5 anos	Glibenclamida (20 mg/dia) Metformina (850 mg/dia)	6,5 %
18	58 anos	1 ano	Dieta	5,6 %
19	53 anos	3 anos	Dieta	6,6 %
20	48 anos	4 anos	Dieta	7,1 %

**Successful Submission Confirmation** 31 Aug 2005 13:25

Your manuscript has been successfully uploaded to Diabetic Medicine. You will receive future communications via e-mail.

Your manuscript number is: **DME-2005-00514**

Please make note of your manuscript number. You will receive an e-mail from DME within 24 hours of the end of this process, confirming receipt of your submission.

## Consentimento Informado (paciente)

Esta pesquisa tem por objetivo determinar o efeito da medicação (anti-diabético oral) nas células de pacientes diabéticos do tipo 2 que fazem uso desta. Para tanto serão realizados experimentos com cultivo de linfócitos (células do sangue).

Os pacientes que concordarem em participar deverão doar 10mL de sangue total, puncionado por um profissional experiente. Será mantido sigilo quanto à origem das amostras, não acarretando nenhum prejuízo ao doador. Todas as amostras coletadas serão utilizadas exclusivamente em análise referentes a essa pesquisa. Todos os pacientes receberão um número identificador e não haverá nem um tipo de referência nominal e nem de nenhum dado de ordem pessoal (idade, patologias). Os doadores deverão responder a um “Questionário de Farmacovigilância” a fim de complementar informações importantes para o estudo.

Eu.....fui informado dos objetivos dessa pesquisa. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Sei que meu nome será mantido em sigilo e não há qualquer risco à minha saúde. Poderei, se desejar, obter resultados da pesquisa quando esta estiver concluída, bem como solicitar a exclusão dos meus dados do relatório final ou em qualquer momento conforme a minha vontade. Estou ciente de que na punção venosa pode ocorrer desconforto e, eventualmente, um pouco de dor no local. Fui informado de que caso existirem danos a minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito ao tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei, sem nenhum tipo de ônus.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar Karina Faccio Mello no telefone 51. 99178813. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste

estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar Dr.: Jarbas Rodrigues de Oliveira no telefone 51. 32203500 ramal: 4147.

Assinatura do paciente	Nome	Data
------------------------	------	------

Assinatura do pesquisador	Nome: Karina Faccio Mello	Data
---------------------------	---------------------------	------

Este formulário em duas vias. (uma para pacientes/voluntários e outra para o pesquisador) foi lido para \_\_\_\_\_ em \_\_\_\_\_ por Karina Faccio Mello, enquanto eu estava presente.

Assinatura da testemunha	Nome	Data
--------------------------	------	------

## Consentimento Informado (voluntários)

Esta pesquisa tem por objetivo determinar o efeito da medicação (anti-diabético oral) nas células de pacientes diabéticos do tipo 2 que fazem uso desta frente a controles limpos (que não utilizam a medicação). Para tanto serão realizados experimentos com cultivo de linfócitos (células do sangue).

As pessoas que concordarem em participar deverão doar 10mL de sangue total, puncionado por um profissional experiente. Será mantido sigilo quanto à origem das amostras, não acarretando nenhum prejuízo ao doador. Todas as amostras coletadas serão utilizadas exclusivamente em análise referentes a essa pesquisa. Todos os pacientes receberão um número identificador e não haverá nem um tipo de referência nominal e nem de nenhum dado de ordem pessoal (idade, patologias) Os doadores deverão responder a um “Questionário de Farmacovigilância” a fim de complementar informações importantes para o estudo.

Eu.....fui informado dos objetivos dessa pesquisa. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Sei que meu nome será mantido em sigilo e não há qualquer risco à minha saúde. Poderei, se desejar, obter resultados da pesquisa quando esta estiver concluída, bem como solicitar a exclusão dos meus dados do relatório final ou em qualquer momento conforme a minha vontade. Estou ciente de que na punção venosa pode ocorrer desconforto e, eventualmente, um pouco de dor no local. Fui informado de que caso existirem danos a minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito ao tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei, sem nenhum tipo de ônus.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar Karina Faccio Mello no telefone 51. 99178813. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste

estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar Dr.: Jarbas Rodrigues de Oliveira no telefone 51. 32203500 ramal: 4147.

Assinatura do voluntário	Nome	Data
--------------------------	------	------

Assinatura do pesquisador	Nome: Karina Faccio Mello	Data
---------------------------	---------------------------	------

Este formulário em duas vias. (uma para pacientes/voluntários e outra para o pesquisador) foi lido para \_\_\_\_\_ em \_\_\_\_\_ por Karina Faccio Mello, enquanto eu estava presente.

## Questionário de Farmacovigilância

1. Você faz uso de alguma droga de uso crônico (anti-hipertensivo, anti-anginoso, anti-lipêmico)?
2. Se sim, quais são essas drogas?
3. Esse tratamento é concomitante com o tratamento para o diabetes?
4. Se sim, há quanto tempo?



Ofício nº 150/04-CEP

Porto Alegre, 22 de março de 2004.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa intitulado: "Efeitos imunomoduladores das sulfoniluréias em cultura de linfócitos de pacientes com diabetes mellitus do tipo 2".

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Délio José Kipper  
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)  
Mest Karina Faccio Mello  
N/Universidade

99178813

R 2394 mar/04

LYOK 22/03/04