Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada
Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2009;30(3):291-295
ISSN 1808-4532

Lipoperoxidação, perda de viabilidade celular e diminuição da liberação de IL-8 de neutrófilos humanos na presença de corpos cetônicos

Gileno, M.C.[1]; Ximenes, V.F.[2]; Fonseca, L.M.[1*]

[1]Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil
[2]Departamento de Química, Faculdade de Ciências de Bauru, Universidade Estadual Paulista, Bauru, São Paulo, Brasil.

Recebido 01/06/2009 / Aceito 19/01/2010

RESUMO

Portadores de diabetes tipo-1 são acometidos por episódios freqüentes de acidose causada pelo aumento no metabolismo de ácido graxos com conseqüente acúmulo de acetoacetato (AcAc) e β-hidroxibutirato (β-OB). Neste trabalho estudou-se o efeito de concentrações patológicas destes metabólitos na lipoperoxidação, viabilidade e liberação da quimiocina CXCL8 (IL-8) por neutrófilos em cultura. Neutrófilos de indivíduos saudáveis foram isolados por gradiente de densidade (Histopaque 1077/1119) e incubados com os corpos cetônicos. A lipoperoxidação foi determinada pela presença de substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A viabilidade celular foi avaliada pela liberação da enzima lactato desidrogenase. A liberação de CXCL8 para o meio extracelular foi medida após cultura de 24 horas de neutrófilos estimulados por zymosan opsonizado por ensaio imunoenzimático (ELISA). O AcAc causou um aumento na lipoperoxidação dos neutrófilos e este efeito foi dependente da sua concentração ($p < 0.05$; $r = 0.99146$); não se observou efeito do β-HOB. No estudo do efeito citotóxico, houve aumento dose-dependente da liberação da LDH até 40 mM de AcAc ($p < 0.05$); não se observou efeito do β-HOB. A liberação de CXCL8 foi suprimida de modo dose-dependente por AcAc e β-HOB. Estes resultados sugerem que o acúmulo de corpos cetônicos pode contribuir para aumentar o tempo de remissão de doenças e mesmo estar relacionado com a gravidade destas em indivíduos diabéticos.
Palavras-chave: Acetoacetato. Lipoperoxidação. Neutrófilos. Interleucina-8. Diabetes mellitus.

Autor correspondente: Luiz Marcos da Fonseca - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - Universidade Estadual Paulista (UNESP) Araraquara -SP - CEP.14801-902 - Brasil - Telelefone: (16) 3332-0087 - Fax: (16) 3322-0073 - e-mail:fonseclm@fcfar.unesp.br.

INTRODUÇÃO

Portadores de diabetes tipo-1 são acometidos por episódios freqüentes de acidose causada pelo aumento no metabolismo de ácidos graxos com conseqüente acúmulo de acetoacetato (AcAc) e β-hidroxibutirato (β-HOB). Este estado patológico correlaciona-se com a alta incidência de doenças vasculares, para as quais existe uma forte correlação com danos tissulares mediados por estresse oxidativo (Lodovici et al, 2009; Tesfamariam & Cohen, 1992; Jain & McVie, 1999). Neste contexto, foi demonstrado recentemente que AcAc pode promover a peroxidação lipídica em células endoteliais humanas por meio da geração de intermediários reativos de oxigênio. Um destes trabalhos propõe um mecanismo que envolve a autoxidação AcAc e consequente geração de H_2O_2 (Jain et al., 1998). Outros trabalhos propõem que a peroxidase neutrofílica (mieloperoxidase, MPO) presente em neutrófios catalise a oxidação do AcAc, levando a formação de espécies radicalares que podem inicializar a cadeia de peroxidação lipídica (Harrison & Saeed, 1981; Harrison & Saeed, 1983).

Os leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (LPMN) constituem um importante componente da defesa inata do hospedeiro contra patógenos e usualmente são as primeiras células a chegarem aos locais de infecção e/ou inflamação (Verhocf & Visser 1993). Para destruir os patógenos fagocitados, o neutrófilo utiliza-se de procedimentos oxidativos (geração de espécies reativas de oxigênio) e não oxidativos (ação das enzimas lisossomais), sendo que uma das enzimas chaves na via oxidativa é a MPO. Por muitos anos acreditou-se que a função única dos neutrófilos era a fagocitose e a destruição dos microrganismos fagocitados pelos processos oxidativos do "burst" respiratório ou pela função bactericida e lítica dos constituintes dos seus grânulos específicos, durante o processo de degranulação. Todavia, recentemente, evidências concretas foram obtidas experimentalmente, mostrando que os neutrófilos são também células secretoras

de citocinas: TNF-α, IL-1 e CXCL8 (Cassatela, 1995). Estes achados colocam os LPMN como células chaves, influenciando principalmente o recrutamento de outros neutrófilos para o foco infeccioso.

Infecções de vários tipos chamam a atenção clínica em pacientes diabéticos, não devido a sua facilidade de adquirir infecções, mas sim devido ao fato de lidarem com os patógenos invasores de maneira deficitária em relação aos indivíduos não diabéticos. Até mesmo infecções por organismos relativamente benígnos, podem assumir formas progressivas nesses pacientes (Bouter et al, 1992). Com respeito aos mecanismos pelos quais os processos infecciosos podem ser mais severos no diabetes, não há evidências da má formação de anticorpos muito embora vários estudos relatem alterações diversas em populações de linfócitos T em pacientes com diabetes mellitus (Cugnet-Anceau & Bauduceau, 2009; Pontesilli et al, 1986). Todavia, existem fortes evidências de deficiências na mobilização de células inflamatórias e a fagocitose está claramente prejudicada nos fagócitos de pacientes diabéticos com cetoacidose (Delamaire et al., 1995; Gallacher et al., 1995; Delamaire, 1997; Sato et al., 1997; CERONE et al., 1998; Daoud et al., 2009; Kawahito et al., 2009). Estas células também mostram um decréscimo na produção de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos.

Como muitas indagações envolvendo neutrófilos e infecções em diabéticos continuam em aberto e existem evidências que apontam para o papel dos corpos cetônicos como moléculas capazes de desencadear processos oxidativos, o objetivo do presente trabalho foi determinar o potencial do AcAc e do β-HOB como promotores de peroxidação lipídica na membrana do próprio neutrófilo. Adicionalmente estudou-se como estas substâncias interferem na viabilidade celular e capacidade de liberação de CXCL8.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes

Fosfato monoácido de potássio, fosfato monoácido de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de potássio, ácido clorídrico fumegante, ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico, hidroximetil- aminometano (tris), da MERCK; zymosan, acetoacetato de lítio, 3-hidroxibutirato, Ficoll-Hypaque 1077 e 1113 foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). "Kit" DuoSet para dosagem da citocina IL-8, foi adquirido da R & D Systems (Minneapolis, USA). Kit para determinação de Desidrogenase Lática foi adquirido da Labtest. Todos os reagentes utilizados na preparação de tampões e soluções foram de grau analítico.

Isolamento de neutrófilos

Os neutrófilos foram isolados do sangue periférico de indivíduos normais por gradiente de densidade usando Histopaque 1077/1119 (English & Andersen, 1974), logo após coleta com o ácido etilenodiaminotetracético dipotássico (EDTA-K_2). Os neutrófilos foram separados do sangue total logo após a coleta; após o procedimento de separação de células foram realizados esfregaços para confirmar a pureza da suspensão celular (aproximadamente 95%) e foi realizada a contagem de leucócitos em câmara de Neubauer (Protocolo de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF-UNESP N°. 15/99 – CEP).

Lipoperoxidação - determinação de substâncias reagentes do Acido Tiobarbitúrico ou TBARS

TBARS foram determinadas como uma indicação de lipoperoxidação usando uma modificação do método de Balla (Balla et al., 1990; Jain et al., 2002). Para isso, 1 x 107 neutrófilos ressuspendidos em PBS-D (500 µL) foram incubados ou não (grupo controle), com AcAc e β-HOB (1, 10, 20, 40 e 80 mM) por 1hora. Após incubação, foram adicionados 50 µL de ácido tricloriacético (300 g/L) e a suspensão foi mantida no gelo por 10 minutos. O precipitado foi removido por centrifugação. Ao sobrenadante (500 µL) foi adicionado 250 µL de uma solução de ácido tiobarbitúrico 0,75 % em HCl 0.5 M e incubado a 90°C por 15 minutos. A formação de TBARS foi medida pelo aumento de absorbância em 535 nm.

Viabilidade Celular – determinação da lactato desidrogenase

A viabilidade foi avaliada pela liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) pelos neutrófilos incubados na presença ou ausência dos corpos cetônicos. Neutrófilos (1 x 10^7) ressuspendidos em PBS-D pH 7.4 foram incubados ou não (grupo controle) com AcAc e β-HOB (0, 1, 10, 20, 30, 40, 60 e 80 mM) e 3-OHB a 37°C por 1 hora. Avaliou-se a liberação de LDH através da determinação de sua atividade no sobrenadante (Kit comercial Labtest). Para se avaliar o máximo de liberação de LDH ao meio extracelular, foi determinada a atividade de LDH após promover a lise por congelamento e descongelamento da suspensão celular.

Determinação de CXCL8

O meio utilizado foi PBS-D suplementado com glicose. O meio foi filtrado em filtro millipore e acondicionado em frasco de vidro previamente esterilizado. Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar. Os neutrófilos (2 x 10^6 células/mL) foram mantidos em frascos de plástico estéril de 0,5 mL e foram submetidos a 24 horas de cultura em estufa com 5 % de CO_2 a 37°C. As células foram incubadas na presença e na ausência de Zymozan opsonizado como estímulo (0,125 mg/dL) e na presença e ausência de acetoacetato e β-hidroxibutirato (0,1 e 10 mM). O material submetido à cultura foi centrifugado a 500 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante livre de células foi coletado e submetido a congelamento a -20°C até o momento do ensaio de quantificação de citocinas.

Para a preparação do Zymosan, 100 mg do mesmo foram adicionados em 10 mL de água, ferveu-se por 10 minutos, aproximadamente, até ficar pastoso. Centrifugou-se a 200 x g por 5 minutos e lavou uma vez com PBS-D sem Ca^{++}. Ressuspendeu-se em 10 mL de PBS-D, os quais

foram divididos em alíquotas de 1 mL e conservados a -20ºC. No dia do uso e para a opsonização, uma alíquota foi descongelada e incubada por meia hora a 37ºC, com o mesmo volume de um *pool* de soro humano. Após incubação, centrifugou-se por 5 minutos a 200 x g, lavou-se uma vez com PBS-D sem Ca^{++}, sendo desprezado o sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso com 1 mL de PBS– D. Durante o uso, essa suspensão foi mantida no gelo.

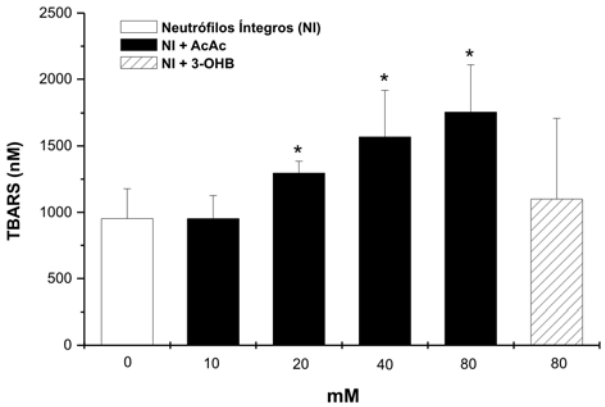
As determinações de CXCL8 foram realizadas através de placas de ELISA montadas e padronizadas a partir de Kits DuoSet da R&D System (Minneapolis, USA).

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e comparados por análise de variância (Anova) seguido de teste-t de Student onde foi estabelecido o nível de significância de $p<0,05$. As regressões lineares foram realizadas pelo programa ORIGIN. Todos os experimentos foram realizados no mínimo em triplicata.

RESULTADOS

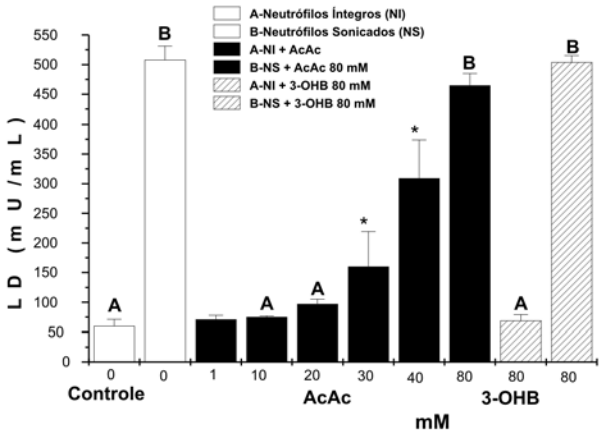
Considerando o alto conteúdo de MPO nos neutrófilos, a alta concentração de corpos cetônicos em indivíduos com diabetes descompensada e as interações entre estes componentes levando a geração de intermediários oxidantes, buscou-se o efeito de AcAc ou β-HOB na lipoperoxidação destas células. Para isso, neutrófilos isolados de doadores humanos e saudáveis foram incubados com concentrações crescentes dos corpos cetônicos e a presença de substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico foi mensurada. A faixa de concentração dos corpos cetônicos foi escolhida em função dos valores encontrados (Krane, 1987; Candiloros et al, 1995) em indivíduos normais não diabéticos (0,5 mM) e diabéticos em crise de acetoacidose (10 mM). O AcAc causou um aumento de peroxidação lipídica nos neutrófilos e este efeito foi dependente da sua concentração ($p < 0.05$; $r = 0.99146$); não observou-se efeito para β-HOB (Figura 1). Resultados similares foram reportados quando monócito e células endoteliais foram tratadas com AcAc (Jain et al., 1999 b; 1998).



* p < 0,05 quando comparado ao grupo controle sem AcAc ou 3-OHB

FIGURA 1. Determinação de substâncias reagentes do ácido tiobarbitúrico na suspensão de neutrófilos em PBS-D pH 7,4 incubados por 1 hora a 37°C na ausência (coluna branca) e na presença de AcAc 10, 20, 40 e 80 mM (coluna preta) e 3-OHB 80 mM (coluna riscada).

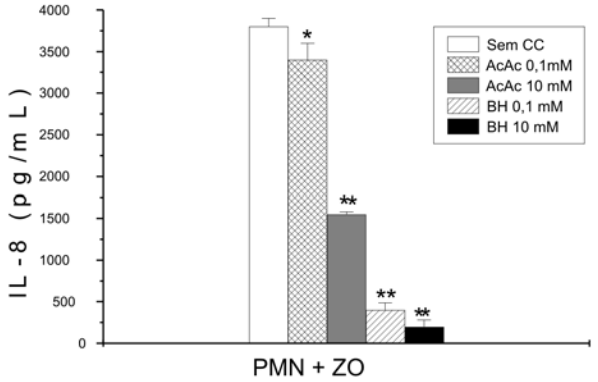
O aumento da peroxidação lipídica provocada pela adição de AcAc correlacionou-se com a diminuição da viabilidade celular acessada pela liberação de LDH. De fato, verificou-se um aumento dose-dependente da liberação da LDH até 40 mM de AcAc ($p < 0.05$), mas não para o β-HOB. Acima de 40 mM observou-se uma diminuição, que parece refletir um alteração físico-química do meio, portanto, sem valor analítico (Figura 2).



* p < 0,05 quando comparado ao grupo controle sem AcAc ou 3-OHB.

FIGURA 2. Determinação da atividade da lactato desidrogenase no sobrenadante da suspensão de neutrófilos em PBS-D pH 7,4 íntegros (A) ou sonicados (B), incubados por 1 hora a 37°C na ausência (coluna branca) e na presença de AcAc 10, 20, 40 e 80 mM (coluna preta) e 3-OHB 80 mM (coluna riscada).

A Figura 3 mostra o efeito do AcAc e do β-HOB tanto na concentração fisiológica (0,1 mM) quanto na patológica (10 mM) na liberação de CXCL8 por neutrófilos humanos mantidos em cultura de 24 horas. Como se pode observar, a liberação de CXCL8 pelos neutrófilos é muito menor na presença dos corpos cetônicos, principalmente nas doses maiores destes compostos.



* p < 0.05 quando comparado ao grupo controle sem AcAc ou 3-OHB.
** p < 0.01 quando comparado ao grupo controle sem AcAc ou 3-OHB.

FIGURA 3. Efeito dos corpos cetônicos acetoacetato (0,1 e 10 mM) e b-hidroxibutirato (0,1 e 10 mM) na liberação de CXCL8 por neutrófilos humanos estimulados com zymozan opsonizado (ZO).

DISCUSSÃO

Diferente de células endoteliais ou macrófagos onde o conteúdo de MPO é pequeno ou inexistente, neutrófilos são as células onde esta enzima desempenha sua função

biológica primordial, ou seja, a geração de ácido hipocloroso com função microbicida (Lehrer, 1975; Bos et al, 1978). Neste sentido estima-se que 5% do peso seco desta célula seja constituído por esta enzima (Agner, 1941; Schultz & Kaminker, 1962). Se adicionalmente considerarmos que o AcAc pode ser oxidado via a ação catalítica da MPO conforme demonstrado por Harrison & Saeed (1981), torna-se evidente que os neutrófilos podem ser alvos especiais para ação peroxidativa desencadeada por AcAc. De fato, estes autores detectaram por espectroscopia paramagnética de elétrons (EPR) a formação de um radical centrado no carbono a do AcAc, o que, pode desencadear a peroxidação de lipídeos (Harrison & Saeed, 1981 e 1983).

É razoável pensar que a peroxidação da membrana plasmática do neutrófilo promovido pelo AcAc não trás um malefício para si mesmo, já que estas células possuem um tempo de circulação de apenas 7 horas. No entanto, a liberação dessas substâncias pode contribuir para o pool plasmático de produtos de lipoperoxidação, que de fato foi observado em indivíduos diabéticos em cetoacidose (Jain et al, 1999a).

A ausência de efeitos nos ensaios de lipoperoxidação e viabilidade celular verificadas para o β-HOB não foi inesperado, pois esta molécula não é um substrato de MPO e, segundo a proposta acima, não poderia iniciar as reações de lipoperoxidação. Adicionalmente, reforça-se a importância desta enzima neste processo.

Considerando que a lipoperoxidação provocada pela presença de AcAc poderia refletir em um desequilíbrio redox do neutrófilo e que a liberação de citocinas pró-inflamatórias pode ser influenciada pela presença de substâncias com potencial antioxidante, resolveu-se avaliar o efeito dos corpos cetônicos na expressão da CXCL8, já que a mesma desempenha um papel importante na resposta inflamatória e no recrutamento de mais neutrófilos aos sítios de infecção (Culpitt et al, 2003; Zhao et al, 2009; Reikerås et al, 2008).

Diferente dos ensaios anteriores, o β-HOB foi até mais efetivo que o AcAc na supressão de CXCL8. Este resultado mostra que a interação com a MPO não é um ponto fundamental no que diz respeito aos efeitos dos corpos cetônicos na alteração da resposta inflamatória via expressão desta quimiocina. Contudo, em conjunto, estes resultados indicam que a cetoacidose pode contribuir para aumentar o tempo de remissão de doenças e mesmo estar relacionada com a gravidade destas em indivíduos diabéticos.

Em resumo, verificamos que corpos cetônicos, especialmente o AcAc podem afetar as funções neutrofílicas. Estes resultados podem ser uma indicação de como estes produtos do metabolismo de lipídeos e que se acumulam em indivíduos diabéticos descompensados podem estar relacionados com os quadros infecciosos destes pacientes.

ABSTRACT

Lipoperoxidation, loss of cell viability and inhibition of release of IL-8 BY human neutrophils in the presence of ketone bodies

Type-1 diabetes patients suffer from frequent episodes of acidosis caused by an increased fatty acid metabolism and consequently increased plasma level of acetoacetate (AcAc) and β-hydroxybutyrate (β-HOB). This article describes a study of the effects of pathological concentrations of AcAc and β-HOB on lipoperoxidation, cell viability and the release of the CXCL8 (IL-8) cytokine by activated neutrophils. Neutrophils from healthy donors were isolated by density gradient (Histopaque® 1077/1119) and incubated with the ketone bodies. Lipoperoxidation was determined as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The cell viability was evaluated by the release of intracellular lactate dehydrogenase. The release of CXCL8 was measured by ELISA in a 24-h culture of opsonized zymosan-stimulated neutrophils. AcAc, but not β-HOB, provoked a dose-dependent increase in the neutrophil membrane lipoperoxidation ($p<0.05$; $r=0.9915$). In the cytotoxicity assay, a dose-dependent release of LDH was observed when the neutrophils were incubated with AcAc in concentrations up to 40 mM ($p<0.05$). β-HOB was devoid of effect. The release of CXCL8 was inhibited by AcAc and β-HOB in a dose-dependent manner. In conclusion, these results suggest that the accumulation of ketone bodies in diabetic patients could be involved in their usually increased susceptibility to infection.

Keywords: Acetoacetate. Lipoperoxidation. Neutrophils. Interleukine-8. Diabetes mellitus.

REFERÊNCIAS

Agner K. Verdoperoxidase. A ferment isolated from leucocytes. Acta Physiol Scand. 1941; 2(8):1-62.

Balla G, Vercellotti GM, Eaton JW, Jacob HS. Iron loading of endothelial cells augments oxidant damage. J Lab Clin Med. 1990; 116:546–54.

Bos A, Wever R, Dirk R. Characterization and qualification of the peroxidase in human monocytes. Biochim Biophys Acta 1978; 525:37-44.

Bouter KP, Meyling FH, Hoekstra JB, Masurel N, Erkelens DW, Diepersloot RJ. Influence of blood glucose levels on peripheral lymphocytes in patients with diabetes mellitus. Diabetes Res. 1992; 19:77-80.

Candiloros H; Muller S, Zeghari N, Donner M, Drouin P, Ziegler O. Decreased erythrocyte membrane fluidity in poorly controlled IDDM. Diabetes Care 1995; 18: 549-51.

Cassatella MA. The production of citokines by polymorphonuclear neutrophils. Immunol Today 1995; 16:21-6.

Cerone S, Sansinanea AS, Streitenberger SA, Garcia MC, Auza NJ. Bovine neutrophil functionnality in molybdenum – induced copper deficiency. Nutr Res. 1998; 18(3):557-66.

Cugnet-Anceau C, Bauduceau B. Glycaemic control and cardiovascular morbi-mortality: the contribution of the 2008 studies. Ann Endocrinol. 2009; 70(1):48-54.

Culpitt SV, Rogers DF, Fenwick PS, Shah P, DE Matos C, Russell RE, Barnes PJ, Donnely P. Inhibition by red

wine extract, resveratrol, of cytokine release by alveolar macrophage in COPD. Thorax 2003; 58(11):942-6.

Daoud AK, Tayyar MA, Fouda IM, Harfeil NA. Effects of Diabetes mellitus vs. in vitro hyperglycemia on select immune cell functions. J Immunotoxicol. 2009; 6(1):36-41.

Delamaire M, Maugendre D, Moreno M, Le Goff MC, Allannic H, Genetet B. Exploration des differents etapes du fonctionnement des polynucléaries neutrophiles chez les paients diabétiques. J Mal Vasc. 1995; 20:107-12.

Delamaire M. Imparied leucocyte functions in diabetic patients. Diabetic Medicine 1997; 14:29-34.

English D, Andersen BR. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuos density gradient of ficoll-hypaque. J Immunol Methods 1974; 5:249.

Gallacher SJ, Thomson G, Fraser WD, Fisher BM, Gemmell CG, Maccuish AC. Neutrophil bactericidal function in diabetes mellitus: evidence for association with blood glucose control. Diabet Med. 1995; 12:916-20.

Harrison JE, Saeed FA. Acetoacetate is na eletron donor to myeloperoxidase and a promoter of myeloperoxidase-catalysed fatty acid peroxidation. Biochem Med. 1981; 26:339-55.

Harrison JE, Saeed FA. Radical acetoacetate oxidation by myeloperoxidase, lactoperoxidase, prostaglandin syntetase, and prostacyclin synthetae: implications for atherosclerosis. Biochem Med. 1983; 29:149-63.

Jain SK, Kannan K, Lim G, McVie R, Bocchini JAJ. Hyperketonemia increases tumor necrosis factor-a secretion in cultured U937 monocytes and type 1 diabetic patients and is apparently mediated by oxidative stress and cAMP deficiency. Diabetes 2002; 51(7): 2287-93.

Jain SK, Kannan K, Lim G. Ketosis (Acetoacetate) can generate oxygen radicals and cause increased lipid peroxidation and growth inhibition in human endothelial cells. Free Radic Biol Med 1998; 25(9):1083-8.

Jain SK, McVie R. Hyperketonemia can increase lipid peroxidation and lower glutathione levels in human erytrocytes *in vitro* and type 1 diabetic patientes. Diabetes 1999; 48(9):1850-5.

Jain SK, Kannan K, McVie R. Effect of hyperketonemia on blood monocytes in type-I diabetic patients and apopt in cultured U 937 monocytes. Antioxid Redox Signal 1999b; 1(2):211-20.

Jain SK, McVie R, Jackson R, Levine SN, Lim G. Effect of hyperketonemia on plasma lipid peroxidation levels in diabetic patients. Diabetes Care 1999a; 22(7):1171-5.

Kawahito S, Kitahata H, Oshita S. Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress. World J Gastroenterol. 2009; 15(33):4137-42.

Krane EJ. Diabetic ketoacidosis. Pediatr. Clin North Am. 1987; 34:935-60.

Lehrer RI. The fungicidal mechanisms of human monocytes. I. Evidence for myeloperoxidase-linked and myeloperoxidase-independent candidicidal mechanisms. J Clin Invest. 1975; 55:338-46.

Lodovici M, Bigagli E, Bardini G, Rotella C.M. Lipoperoxidation and antioxidant capacity in patients with poorly controlled type 2 diabetes. Toxicol Ind Health.2009; 25 (4-5):337-41.

Pontesilli O, Chase HP, Carotenuto P, Herberger MJ, Hayward AR. T- lymphocyte subpopulations in insulism dependent (type I) *Diabetes mellitus.* Clin Exp Immunol. 1986; 63:68-72.

Reikerås O, Sun J, Wang JE, Foster SJ, Aasen AO. Differences in LPS and PepG induced release of inflammatory cytokines in orthopedic trauma. J Invest Surg. 2008; 21 (5): 255-60.

Sato N, Shimizu H, Shimomura Y, Suwa K, Mori M, Kobayashi I. Mechanism of inhibitory action of ketone bodies on the production of reactive oxygen intermediates (ROIS) by polymorphonuclear leukocytes. Diabetes Care 1997; 20:995-8.

Schultz J, Kaminker K. Myeloperoxidase of the leukocyte of normal human blood. I. Content and localization. Arch Biochem Biophys.1962; 98:465-71.

Tesfamariam B, Cohen RA. Free radicals mediated endothelial cells dysfunction caused by elevated glucose. Am J Physiol.1992; 263:321-26.

Verhocf J, Visser MR. Neutrophil phagocytosis and Killing: normal function and microbial evasion. In: Abramson JJ, Wheele JG. The neutrophil. IRL Press: Oxford. 1993. p. 110.

Zhao X, Town JR, Li F, Zhang X, Cockcroft DW, Gordon JR. ELR-CXC chemokine receptor antagonism targets inflammatory responses at multiple levels. J Immunol. 2009; 182(5):3213-22.