UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MARILIA ALESSI GUENA DE CAMARGO

Perfil do estresse oxidativo em pacientes com diabetes *mellitus*
do tipo 1 submetidos ao transplante autólogo de células-tronco
hematopoéticas, em Ribeirão Preto, SP

Ribeirão Preto

2015

MARILIA ALESSI GUENA DE CAMARGO

Perfil do estresse oxidativo em pacientes com diabetes *mellitus*
do tipo 1 submetidos ao transplante autólogo de células-tronco
hematopoéticas, em Ribeirão Preto, SP

Tese apresentada ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Investigação Biomédica.

Área de concentração: Clínica Médica
Opção: Investigação Biomédica

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Maria Carolina de Oliveira Rodrigues
Prof. Dr. Júlio Cesar Voltarelli (*in memoriam*)

Ribeirão Preto

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Camargo, Marília Alessi Guena de

Perfil do estresse oxidativo em pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 1 submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas. Ribeirão Preto, 2015.

118 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Rodrigues, Maria Carolina de Oliveira

1. Estresse oxidativo. 2. Antioxidante. 3. Diabetes *mellitus*. 4. Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marilia Alessi Guena de Camargo

Perfil do estresse oxidativo em pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 1 submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas, em Ribeirão Preto, SP.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Investigação Biomédica

Aprovada em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr.	_____
Instituição	_____
Assinatura	_____

Prof. Dr.	_____
Instituição	_____
Assinatura	_____

Prof. Dr.	_____
Instituição	_____
Assinatura	_____

Prof. Dr.	_____
Instituição	_____
Assinatura	_____

Prof. Dr.	_____
Instituição	_____
Assinatura	_____

*Dedico este trabalho à minha família,
em especial ao meu companheiro
Rafael e a nossa pequena Alice. Sem o
apoio e a compreensão deles esse dia
jamaís teria chegado.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à minha família pelo apoio incondicional. Pela compreensão e paciência aos meus momentos infurnados no computador. E à gentileza e carinho com que trataram tudo isso.

Ao meu marido, Rafael, que me mostra todo dia que sou capaz. E que se manteve ao meu lado em todas as minhas decisões.

À nossa filha, Alice, nossa alma, nosso sangue e nosso coração. Tudo em minha vida tem um sentido maior.

Aos meus pais, Luiz Fernando e Neiry, que sempre me apoiaram e não me deixaram desistir.

À minha irmã, Fernanda, que é reflexo de luta e de perseverança. Seu exemplo foi fundamental para que eu seguisse em frente.

Aos meus amigos, que estão pertos e que estão longe que sempre contribuem para que eu me torne uma pessoa melhor.

À equipe do Transplante de Medulla Óssea da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que me recebeu com muito carinho e, de certa forma, abriu as portas para esse novo conhecimento.

À equipe da Unidade de Terapia Imunológica pela disposição em ajudar e efetivar tal ajuda. Meu sincero agradecimento.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro.

Agradecimento especial ao Prof. Dr. Júlio Cesar Voltarelli (*in memoriam*) por acreditar em mim e por ver algo especial em minha pesquisa.

Agradecimento especial à Prof^a. Dr^a. Belinda Simões por ter aceitado o campo intermediário entre minha primeira e última orientação. Um sentimento de conforto num momento de solidão.

Agradecimento especial à Carol, minha orientadora, cuja coragem e determinação guiou-me durante todo esse processo. Minha eterna gratidão.

Pergunta

“ Tem paciência
com tudo não resolvido em teu coração e
tenta amar as perguntas em ti
como se fossem
quartos trancados ou livros escritos em idioma estrangeiro.

Não pesquises em busca de respostas
que não te podem ser dadas,
porque tu não as podes viver, e
trata-se de viver tudo.

Vive as grandes perguntas agora.
Talvez num dia longínquo,
sem o perceberes,
te familiarizarás com a resposta”

(Rainer Maria Rilke)

***“Serras que vão se destapando para destapar outras serras, têm
todas as coisas.
Vivendo se aprende. Mas só o que se aprende.
Mas só o que se aprende, é a fazer outras maiores perguntas.”***

(J. Guimarães Rosa)

RESUMO

DE CAMARGO, M.A.G. **Perfil do estresse oxidativo em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas, em Ribeirão Preto, SP.** 2015. 118 f. Tese (doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O estresse oxidativo, induzido por espécies reativas, está diretamente envolvido com a função das células β durante o desenvolvimento do diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1), bem como no desenrolar das complicações relacionadas à hiperglicemia. O transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas é uma estratégia de intervenção imunológica que visa preservar a função do pâncreas endócrino, se realizado durante a fase em que o paciente ainda possui importante reserva de células β pancreáticas. Dessa forma, o presente estudo objetiva investigar como o estresse oxidativo se comporta nos momentos pré e pós-transplante. Dezoito pacientes transplantados entre 2004 e 2010 foram avaliados retrospectivamente, a partir de amostras de soro criopreservadas imediatamente antes, e 12 meses após o transplante. Esses pacientes também foram subdivididos em respondedores (livres de insulina exógena aos 12 meses pós-transplante) e não-respondedores (em uso de insulina exógena 12 meses pós-transplante). Dados do estresse oxidativo (malonaldeído e isoprostano) e da capacidade antioxidante (glutathiona reduzida, superóxido dismutase e tocoferol) foram comparados nos pacientes diabéticos antes e 12 meses pós-transplante, e também com o grupo controle. Dentro do grupo experimental observamos que, 12 meses depois do transplante, os pacientes apresentaram melhora dos níveis de hemoglobina glicada e das doses de insulina exógena e recuperação do peso corporal. Aos 12 meses pós-transplante, o grupo de pacientes respondedores apresentaram níveis de peptídeo-C significativamente maiores do que o de não-respondedores. Quando comparados ao grupo controle, verificamos maiores níveis de glutathiona reduzida e isoprostano nos pacientes diabéticos, em ambos os momentos (pré e pós-transplante). Também observamos que níveis de tocoferol (vitamina E) estão reduzidos, abaixo do valor de referência, quando comparados ao grupo controle. Em conclusão, o presente estudo identificou que pacientes com DM1 já possuem alterações no estresse oxidativo marcada pelo aumento do isoprostano e da atividade antioxidante marcada pelo aumento da glutathiona reduzida (GSH) poucas semanas após o diagnóstico e que o procedimento não contribuiu para normalizar seus níveis.

Palavras-chave: estresse oxidativo, antioxidantes, diabetes *mellitus*, transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas.

ABSTRACT

DE CAMARGO, M.A.G. Oxidative stress profile in patients with type 1 diabetes mellitus treated with autologous hematopoietic stem cells, in Ribeirão Preto, Brazil. 2015. 118 f. Thesis (Ph.D.) Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Oxidative stress, induced by reactive species, is directly involved with β -cell function during the development of type 1 diabetes mellitus (T1DM) and with the development of hyperglycemia-induced complications. Autologous hematopoietic stem cell transplantation (AHSCT) is an immunological therapeutic strategy to preserve the function of the endocrine pancreas, if performed early after T1DM diagnosis, while the patient still has significant residual beta cell mass. Thus, this study aims to investigate how oxidative stress behaves before and after AHSCT and how it may be related with glycemic control. Eighteen patients transplanted between 2004 and 2010, which had serum samples cryopreserved immediately before and 12 months after transplantation, were retrospectively evaluated. These patients were also divided into responders (insulin-free at 12 months post-transplant) and non-responders (in use of insulin 12 months post-transplant). Data on oxidative stress (malondialdehyde and isoprostane levels) and antioxidant capacity (reduced glutathione, superoxide dismutase and tocopherol levels), from diabetic patients, were compared before and 12 months after AHSCT, and also with a healthy control group. We observed that 12 months after transplantation, T1DM patients showed improvement in glycated hemoglobin levels and exogenous insulin doses, besides recovery of pre-diabetes body weight levels. At 12 months post-transplantation, the group of responders had significantly higher C-peptide levels than the non-responders. When compared to the health individuals (control group), we found higher levels of reduced glutathione and isoprostane in T1DM patients, both before and after transplantation. We also observed that tocopherol levels (vitamin E) were reduced below the reference value, when compared to the control group. In conclusion, we found that patients with T1DM present abnormal oxidative stress, marked by increased isoprostane, and antioxidant activity, marked by the increase of reduced glutathione (GSH) already a few weeks after diagnosis and that AHSCT did not contribute to normalize their levels.

Keywords: oxidative stress, antioxidants, diabetes *mellitus*, autologous hematopoietic stem cell transplantation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução da massa de células β do pâncreas.....	17
Figura 2: Tempo de ação das insulinas.....	24
Figura 3. Fontes e respostas celulares às espécies reativas de oxigênio, de nitrogênio, derivadas de enxofre, de cloro, de carbono e de metais de transição.....	27
Figura 4: Etapas do processo de peroxidação lipídica.....	28
Figura 5: Esquema de mobilização e condicionamento para a realização do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas em pacientes com diabetes mellitus tipo 1, em Ribeirão Preto, SP.....	30
Figura 6: Organograma dos pacientes com DM1 (grupo experimental) submetidos ao TACTH entre 2004 e 2010 e a descrição dos pacientes utilizados nesse estudo.....	42
Figura 7: Níveis de hemoglobina glicada antes e após o transplante.....	45
Figura 8: Níveis de peptídeo-C nos pacientes submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas.....	46
Figura 9: Evolução do peso dos pacientes com DM1 antes e 12 meses após o transplante.....	47
Figura 10: Doses de insulina exógena antes e 12 meses após o transplante.....	47
Figura 11A: Valores de malonaldeído dos pacientes diabéticos e controles.....	50

Figura 11B: Valores de malonaldeído dos pacientes diabéticos, separados entre “respondedores” e “não-respondedores” e controles.....	51
Figura 12A: Valores de isoprostano dos pacientes diabéticos e controles.....	52
Figura 12B: Valores de isoprostano dos pacientes diabéticos, separados entre “respondedores” e “não-respondedores” e controles.....	53
Figura 13A: Valores de glutatona reduzida dos pacientes diabéticos e controles..	54
Figura 13B: Valores de glutatona reduzida dos pacientes diabéticos, separados entre “respondedores” e “não-respondedores” e controles.....	54
Figura 14A: Valores de superóxido dismutase em pacientes diabéticos e controles.....	55
Figura 14B: Valores de superóxido dismutase dos pacientes diabéticos, separados entre “respondedores” e “não-respondedores” e controles.....	56
Figura 15A: Valores de tocoferol dos pacientes diabéticos e controles.....	57
Figura 15B: Valores de tocoferol dos pacientes diabéticos, separados entre “respondedores” e “não-respondedores” e controles.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diretrizes nutricionais no diabetes.....	21
Tabela 2. Início e duração aproximados das insulinas humanas e análogos.....	24
Tabela 3. Regime de condicionamento dos pacientes com diabetes <i>mellitus</i> do tipo 1 submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas.....	39
Tabela 4. Dados demográficos dos pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 submetidos ao transplante de células-tronco hematopoéticas. Ribeirão Preto (2004-2010).....	43
Tabela 5. Dados de estilo de vida dos pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 submetidos ao transplante de células-tronco hematopoéticas. Ribeirão Preto (2004-2010).....	44
Tabela 6. Dados clínicos dos pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 submetidos ao transplante de células-tronco hematopoéticas. Ribeirão Preto (2004-2010).....	44
Tabela 7. Complicações do transplante na fase de mobilização dos pacientes com DM1 submetidos ao transplante de células-tronco hematopoéticas. Ribeirão Preto (2004-2010).....	48
Tabela 8. Complicações do transplante na fase de condicionamento dos pacientes com DM1 submetidos ao transplante de células-tronco hematopoéticas. Ribeirão Preto (2004-2010).....	49

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	16
1.1.	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1.....	17
1.1.1.	Conceito.....	17
1.1.2.	Epidemiologia.....	18
1.1.3.	Manifestações clínicas e complicações.....	19
1.1.4.	Tratamentos.....	20
1.1.4.1.	Dietoterapia.....	20
1.1.4.2.	Atividades físicas.....	22
1.1.4.3.	Insulinoterapia.....	23
1.1.4.3.1.	O hormônio insulina.....	23
1.1.4.3.2.	Evolução da insulinoterapia.....	23
1.2.	Estresse Oxidativo.....	25
1.2.1.	Ação das Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio.....	26
1.2.2.	O processo de peroxidação lipídica.....	28
1.3.	Estresse Oxidativo e Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1.....	29
1.4.	Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas.....	30
2.	Objetivos.....	33
2.1.	Objetivos Geral.....	34
2.2.	Objetivos Específicos.....	34
3.	Metodologia.....	35
3.1.	População de estudo.....	36
3.2.	Critérios de inclusão.....	37
3.3.	Dados bioquímicos.....	37
3.4.	Quantificação do estresse oxidativo.....	37
3.4.1.	Determinação da peroxidação lipídica pela dosagem de malonaldeído.....	37
3.4.2.	Determinação do estresse oxidativo pelo isoprostano.....	38
3.5.	Avaliação da atividade antioxidante.....	38
3.5.1.	Determinação de Glutathiona reduzida.....	38

3.5.2. Determinação da Superóxido Dismutase.....	38
3.5.3. Determinação da enzima Catalase.....	39
3.5.4. Determinação da vitamina E sérica.....	39
3.6. Coleta de células-tronco hematopoéticas do sangue periférico.....	39
3.7. Dados de prontuários.....	40
3.8. Análises Estatísticas.....	41
4. Resultados.....	42
4.1. Análise descritiva.....	43
4.2. Avaliações do estresse oxidativo e da capacidade antioxidante.....	51
4.2.1. Malonaldeído (MDA).....	51
4.2.2. Isoprostano.....	52
4.2.3. Glutathione reduzida (GSH).....	54
4.2.4. Superóxido dismutase (SOD).....	56
4.2.5. Tocoferol.....	57
4.2.6. Catalase.....	59
5. Discussão.....	60
6. Conclusões.....	69
7. Referências Bibliográficas.....	71
8. Apêndices.....	81
8.1. Apêndice A. Dados de peso dos pacientes com DM1 submetidos ao TACTH (2004-2010).....	82
8.2. Apêndice B. Evolução das necessidades de insulina exógena entre os períodos pré-mobilização e 12 meses pós-transplante dos pacientes com DM1 submetidos ao TACTH (2004-2010).....	83
8.3. Apêndice C. Análises descritivas dos valores de glutathione reduzida (GSH), malonaldeído (MDA), isoprostano, superóxido dismutase (SOD), vitamina E (tocoferol) entre os grupos controle, experimental pré e experimental pós-transplante, todos controlados pela idade.....	84

8.4. Apêndice D. Comparações dos valores de glutathiona reduzida (GSH), malonaldeído (MDA), isoprostano, superóxido dismutase (SOD), vitamina E (tocoferol) entre os grupos: controle – experimental pré-transplante; controle – experimental pós-transplante e experimental pré – experimental pós-transplante. E comparações dos valores de hemoglobina glicada (HbA1C) e peptídeo-C entre os grupos: experimental pré – experimental pós-transplante.....85

9. Anexos.....86

9.1. Anexo A. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....87

9.2. Anexo B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para indivíduos do grupo controle menores de 18 anos.....91

9.3. Anexo C. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para indivíduos do grupo controle maiores de 18 anos.....95

9.4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para indivíduos do grupo diabético transplantado maiores de 18 anos.....97

10. Artigo para publicação.....99

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS TIPO 1

1.1.1 Conceito

O diabetes *mellitus* do tipo I (DM1) é uma doença crônica autoimune, multifatorial, em que ocorre destruição das células β pancreáticas, as quais são produtoras de insulina. Essa destruição autoimune das células β tem como consequência a redução da produção de insulina, gerando hiperglicemia. Se não tratada, a insuficiência de insulina pode levar a cetoacidose, situação onde, na falta de insulina, o organismo utiliza de estoques de gordura como fonte alternativa de energia (uma vez que não consegue utilizar a glicose como fonte de energia) (GUYTON AC, 1988; SRIKANTA S, *et al*, 1983). A perda da função pancreática é causada pela redução da sua capacidade secretória por aumento da apoptose celular, evento-chave na patogenia da doença (DREWS G, KRIPPIT-DREWS P, DÜFER M, 2010).

O diabetes *mellitus* do tipo 1 consiste em uma doença poligênica com pelo menos 16 diferentes *loci*. Entretanto, a predisposição genética mais evidente é mediada por genes do antígeno do leucócito humano HLA (*Human Leucocyte Antigen*), localizado na região do complexo principal da histocompatibilidade no braço curto do cromossomo 6, e pelo gene da insulina no cromossomo 21. Todavia, apenas 10% das crianças com predisposição genética desenvolvem o diabetes clínico, o que sugere que fatores ambientais possam estar relacionados à história natural da doença (TANDON A, 2015). Acredita-se que entre as crianças predispostas geneticamente, a produção de auto-anticorpos determine o risco de desenvolvimento clínico da doença. Atualmente, quatro distintos auto-anticorpos principais são descritos, sendo que o risco de progressão para a doença na presença de três ou quatro deles é de 60 a 100% em crianças com predisposição genética (VIRTANEN SM, KNIP M, 2003; KNIP M, *et al*, 2005).

Atualmente, a melhor maneira de aferir a reserva e a função das células β é a partir do peptídeo-C (PALMER JP, *et al*, 2004). O peptídeo-C é um fragmento

proteico inativo, que é eliminado quando ocorre a clivagem (quebra) da pró-insulina em insulina. Dessa maneira, a quantificação de peptídeo-C sérico reflete diretamente a produção endógena de insulina. Há ainda outras maneiras de avaliar a função pancreática: a partir das necessidades de insulina exógena e dos níveis de hemoglobina glicada, que aumentam em proporção inversa à produção endógena de insulina (PALMER JP, *et al*, 2004).

O diabetes mellitus é uma doença de início insidioso e subclínico. Após algum tempo de inflamação pancreática e destruição progressiva das células β , com consequente produção de níveis decrescentes de insulina, o diabetes se estabelece (figura 1). Nesse ponto, estima-se que aproximadamente 60 a 80% das células β tenham sido destruídas (NOTKIN AL, LENMARK A, 2001).

Figura 1. – Evolução da massa de células β do pâncreas. A agressão autoimune provoca diminuição progressiva da massa de células β ao longo de meses ou anos, até o valor limítrofe, em que surgem as manifestações clínicas do diabetes.

1.1.2. Epidemiologia

Antes da descoberta da insulina, a sobrevivência de um indivíduo portador de diabetes do tipo 1 variava entre 6 e 12 meses. Com a descoberta da insulina, houve um aumento importante na sobrevivência desses indivíduos, embora ela não seja curativa (SRIKANTA S, *et al*, 1983).

Os dados epidemiológicos do diabetes no Brasil são escassos e limitados. De acordo com Malerbi e Franco (1992), o diabetes é a quinta causa mais comum de hospitalizações e está entre as dez principais causas de mortalidade. O DM1 corresponde a apenas 10% dos casos de indivíduos portadores de diabetes *mellitus* (BOSI PL, *et al*, 2009).

A incidência de DM1 no Brasil é variável, de acordo com a região: na cidade de Londrina (PR), a taxa encontrada foi de 12,7 casos/100.000 por ano (CAMPOS JJB, *et al*, 1998), enquanto que no estado de SP, a taxa encontrada foi de 7,6 casos/100.000 por ano (FERREIRA SRG, *et al*, 1993), e difere-se entre as áreas geográficas: na China tem-se a menor incidência, com 0,5 casos/100.000 por ano; a Finlândia e Sardenha (Itália) possuem a maior incidência com 50 casos/100.000 por ano (KARVONEN M, *et al*, 2000; MAFFIES C, PINELLI L, 2008). A prevalência do DM1 é de 0,2% na maioria dos países (GREEN A, GALE EA, PATTERSON CC, 1992), desenvolvendo-se em 40% dos pacientes antes dos 14 anos de idade, 30% entre 15 e 34 anos e outros 30% acima dos 35 anos de idade (DPT-1 StudyGroup, 1995), tendo, portanto um pico de incidência em torno das idades de 10 a 12 anos em meninas e 12 a 14 anos em meninos. Nos Estados Unidos da América (EUA), aproximadamente 300.000 a 500.000 indivíduos, de todas as idades, têm DM1 (NDDG, 1995).

O DM1 é uma doença crônica com morbidade e mortalidade 300 a 600% maior do que a da população geral (MADSBAD S, 1983). No Brasil, ocorre em 8 para cada 100.000 indivíduos com menos de 20 anos de idade (LEITE SAO, *et al*, 2008), e foi encontrado como causa básica de óbito em 1,9 a 3,0% da população geral, e como causa associada em 3,1 a 4,2% (FRANCO LJ, *et al*, 1998). No município de Recife-PE, 7,9% de todos os pacientes diabéticos tiveram óbito precoce, sendo que esta porcentagem foi maior no sexo masculino (16,2%) comparado ao sexo feminino (11,1%) (MELO MS, *et al*, 1991).

1.1.3. Manifestações clínicas e complicações

O defeito primário do DM1, destruição de células β pancreáticas, leva à absoluta deficiência de produção de insulina e resulta na hiperglicemia, poliúria (micção excessiva) e polidipsia (sede excessiva), perda de peso importante,

desidratação, distúrbios eletrolíticos e cetoacidose (DIB AS, TSCHIEDEL B, NERY M, 2008).

A taxa de destruição das células β é bastante variável, ocorrendo rapidamente em alguns indivíduos, e lentamente em outros. A capacidade de secreção de insulina do pâncreas saudável excede muito àquela normalmente necessária, portanto o início clínico do DM1 pode ser precedido por um extenso período assintomático de meses a anos, durante o qual as células β estão submetendo-se à destruição gradual (DIB AS, TSCHIEDEL B, NERY M, 2008).

Frequentemente, após o diagnóstico e correção da hiperglicemia e cetoacidose, recupera-se a secreção endógena de insulina, fase esta denominada lua-de-mel. Nesse período, as necessidades de insulina exógena diminuem consideravelmente por períodos variados de meses a anos. Entretanto, a necessidade de aumentar a reposição de insulina exógena é inevitável e, em 8 a 10 anos após o início clínico, a perda de células β é considerada completa e a deficiência de insulina é absoluta (RODACKI M, MILECH A, DE OLIVEIRA JEP, 2008).

A longa duração da doença e o controle glicêmico inadequado são responsáveis por várias das maiores complicações do DM (MYLONA-KARAYANNI C, *et al*, 2006), que envolvem problemas micro e macrovasculares como a nefropatia, retinopatia, neuropatia e doenças cardiovasculares (WADÉN J, *et al*, 2009).

A hemoglobina glicada é um parâmetro que reflete a extensão da hiperglicemia crônica, e serve também, como fator preditivo de complicações na doença. Entretanto, de acordo com estudos realizados pelos grupos *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) e *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications* (EDIC), pacientes com valores de hemoglobina glicada semelhantes podem ter diferenças na incidência de complicações vasculares devido à flutuação dos níveis de glicose sanguínea, que levam a diferentes complicações vasculares, mostrando assim que tanto os valores da hemoglobina glicada como as flutuações da glicose sanguínea são importantes no desenvolvimento de complicações (LACHIN JM, *et al*, 2008; WU D, *et al*, 2013).

1.1.4. Tratamentos

1.1.4.1. Dietoterapia

Juntamente com a prescrição de insulina, a prática de atividades físicas e a terapia nutricional são importantes para o tratamento do DM1 (MICHALISZYN SF, *et al*, 2009; LOTTENBERG AMP, 2008).

O DM 1 está diretamente relacionado ao metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, portanto, a terapia nutricional exerce papel fundamental no tratamento da doença e, ao contrário do que se pensava anteriormente, a composição da dieta para portadores de DM1 assemelha-se à da população geral (LOTTENBERG AMP, 2008).

A quantidade de carboidratos ingerida é o principal determinante nos valores glicêmicos pós-prandiais (QUEIROZ KC, *et al*, 2010), sendo assim, a contagem de carboidratos é uma estratégia viável, que auxilia esses indivíduos, concomitante ao uso de insulina, na manutenção dos níveis adequados de glicemia, além de permitir uma maior flexibilidade nas escolhas alimentares (DIAS VM, *et al*, 2010).

Um dos principais objetivos do plano dietético para indivíduos portadores de DM1 é alcançar e manter os níveis de glicose sanguínea dentro da normalidade, prevenindo ou, pelo menos reduzindo, o risco de complicações decorrentes da hiperglicemia (BARCLAY A, *et al*, 2010).

Há relatos na literatura de estratégias que aumentam a adesão e a motivação para alcançar e manter um bom controle metabólico em pacientes com DM1: avaliação do conhecimento nutricional prévio, automonitorização com registros da quantidade e qualidade dos alimentos ingeridos, adequação do local das refeições, controle do estímulo que precede a alimentação, fazer as refeições em horários preestabelecidos, controle do ato de comer, não fazer as refeições junto com outras atividades como ler e ver televisão, entre outras (LOTTENBERG AMP, 2008).

Atualmente, a dieta de pacientes com DM1 deve ser composta, basicamente, pelos mesmos alimentos de uma dieta para indivíduos saudáveis, exceto pela quantidade recomendada de ingestão de fibras (BRAZEAU AS, *et al*, 2013) que é maior para esses indivíduos (25 a 50 gramas por dia). Sabe-se que os

pacientes que fazem a contagem de carboidratos, principal estratégia para o controle metabólico, calculam as doses de insulina mais adequadamente, melhorando assim o controle glicêmico e evoluindo com menores níveis de hemoglobina glicada (MEHTA SN, *et al*, 2009).

As recentes diretrizes publicadas sobre nutrição e diabetes *mellitus* tipo 1 refletem uma abordagem mais flexível da intervenção nutricional, enfatizando a importância da formação de educadores em diabetes, individualização da dieta e maior variedade de escolha de alimentos ricos em carboidratos (ADA, 2004).

De acordo com a Associação Canadense de Diabetes (2013), a dieta de pacientes com DM1 deve ser equilibrada e composta por 45% do valor calórico total (VCT) de carboidratos, 35% de gordura (a ingestão de ácidos graxos saturados deve ser inferior a 7%) e de 15 a 20% de proteínas, recomendações essas bastante similares com a da população geral.

A tabela a seguir mostra as recomendações das principais diretrizes publicadas pelos mais importantes órgãos como a ADA (*American Diabetes Association*), EASD (*European Association for Study of Diabetes*) e UK (*Diabetes Care Advisory Committee of Diabetes UK*) (CHUDHARY P, 2004).

Tabela 1: Diretrizes nutricionais no diabetes.

	ADA	EASD	UK
Carboidratos + AGM ¹	60 a 70%	60 a 70%	48% CHO ² + 12% AGM ¹
Sacarose	10%	10%	12 a 14%
Lipídios	< 35%	-	35 a 36%
Ácidos graxos saturados	< 7% VCT ³	< 7 a 10%	13%
Poliinsaturados	< 10%	< 10%	6%
Gordura trans	consumo mínimo	-	-

1. AGM: ácidos graxos monoinsaturados

2. CHO: carboidratos

3. VCT: valor calórico total

O total de calorias da dieta (VCT) no DM1 deve ser suficiente para, concomitante ao tratamento com insulina, normalizar os níveis de glicose, prevenindo a hipoglicemia, e garantir o crescimento e desenvolvimento adequados (LOTTENBERG AMP, 2008).

1.1.4.2. Atividades físicas

O “*Physical Activity Guidelines for Americans*” (2008) recomenda 60 minutos ou mais de prática de atividades físicas de intensidade moderada a intensa para crianças e adolescentes, por dia. Pesquisas recentes mostram que indivíduos com DM1 gastam 17 minutos a menos por dia em atividades físicas de intensidade média a intensa, comparado aos 28,7% dos adolescentes saudáveis (CDC, 2012).

Tanto a ADA como a *American Heart Association* (AHA) recomendam estratégias de mudança no estilo de vida de pacientes com DM1 afim de melhorar o controle glicêmico e reduzir as complicações do DM1, como o risco cardiovascular (KAVEY, RE., *et al.*, 2006). Não existe, até o momento, uma recomendação específica de atividades físicas para indivíduos portadores de DM1, mas a Associação de Medicina Esportiva (American College of Sports Medicine) encoraja essas pessoas a fazerem de 30 a 60 minutos de atividades físicas moderadas a intensas, preferencialmente todos os dias (RACHMIEL M, BUCCINO J, DANEMAN D, 2007).

Estudos têm demonstrado uma complexa relação entre a prática de atividades físicas e controle glicêmico em pacientes com DM1. Chimen e colaboradores (2012) mostraram que não há benefícios da prática de atividades físicas sobre o controle glicêmico, mensurado pela hemoglobina glicada, porém reduz de 6 a 15% as doses de insulina exógena necessárias. Já Lukás e colaboradores (2012) encontraram uma relação inversa entre a prática de atividades físicas e o nível de hemoglobina glicada, embora essa associação não seja encontrada em outros estudos (NADEAU KJ, *et al.*, 2010; CUENCA-GARCIA M, *et al.*, 2012).

1.1.4.3. Insulinoterapia

1.1.4.3.1. O hormônio insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico produzido pelas células β do pâncreas, cuja síntese é ativada em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições (MALERBI D, *et al.*, 2006).

Ela atua por meio de um receptor próprio, abundantemente expresso em vários tecidos, incluindo músculo, fígado e tecido adiposo, além do sistema nervoso central (SNC).

O principal objetivo no tratamento de indivíduos com DM1 é que eles consigam manter um equilíbrio metabólico aproximando ao máximo ao estado fisiológico normal do organismo (MALERBI D, *et al.*, 2006).

1.1.4.3.2. Evolução da insulinoterapia:

A insulinoterapia foi descoberta há 93 anos, e desde então, houve avanços importantes em relação a esse assunto. Os mais importantes deles, até o momento, foram a descoberta da insulina animal, a substituição pela insulina humana sintética e a síntese de análogos de insulina (PIRES AC, CHACRA AR, 2008).

Existem vários tipo de insulinas, com diferentes picos de ação. São elas:

- Insulina de ação rápida (regular): início entre 30 e 60 minutos, com pico de ação entre 2 e 3 horas e duração do efeito terapêutico de 5 a 8 horas.
- Análogos de insulina de ação rápida (asparte, lispro e glulisina): têm início de ação entre 5 e 15 minutos, com pico entre 1 e 2 horas e término de ação entre 3 e 5 horas.
- Insulinas de ação intermediária (NPH): apresentam início de ação entre 2 e 4 horas com pico entre 4 e 10 horas e término entre 10 e 18 horas.
- Análogos de insulina basal ou de longa duração (glargina, detemir e degludeca): apresentam início de ação entre 1 e 4 horas, pico entre 6 e 8 horas (exceto pela glargina que não apresenta pico de ação), com duração do efeito terapêutico entre 18 e 24 horas. A degludeca possui meia-vida de aproximadamente 72 horas.
- Pré-misturas, de ação prolongada: possuíam início de ação entre 5 minutos e 1 horas, pico de ação variando de 1 a 12 horas e todas com término de ação entre 10 e 16 horas (**Tabela 2**).

Tabela 2: Início e duração aproximados das insulinas humanas e análogos

Preparação de insulina	Início de ação	Pico	Duração da ação
Regular	30-60 minutos	2-4 horas	6-10 horas
Humana inalável	5-15 minutos	1-2 horas	6-8 horas
NPH/lenta	1-2 horas	4-8 horas	10-20 horas
Lispro/asparte/glulisina	5-15 minutos	1-2 horas	4-6 horas
Glargina/detemir/ degludeca	1-2 horas	pouco pronunciado	~24 horas / ~72 horas

Fonte: Pires; Chacra, 2008; SBD, 2014.

De acordo com o *The Cochrane Collaboration*, as insulinas glargina e detemir apresentam eficácia semelhante em relação ao potencial de redução da HbA1C e superior à NPH sobre suas ações nos efeitos noturnos, resultando em níveis mais baixos de glicemia de jejum e no menor número de episódios de hipoglicemia noturna (SBD, 2011).

A **Figura 2** aponta a ação de cada insulina, de acordo com a velocidade de absorção.

Figura 2: Tempo de ação das insulinas.

1.2. ESTRESSE OXIDATIVO

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo. Assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a produção de radicais livres e de antioxidantes (SCHAFER FQ, BUETTNER GR, 2001).

O organismo sofre ação constante de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de espécies reativas de nitrogênio (ERN) geradas em processos inflamatórios, por algum desequilíbrio biológico ou proveniente dos alimentos. Essas espécies são radicais livres que possuem um ou mais elétrons, de oxigênio ou nitrogênio, desemparelhado na sua camada de valência. As principais ERO distribuem-se em dois grupos: os radicalares: hidroxila ($\text{HO}^\cdot$), superóxido ($\text{O}_2^\cdot$), peroxila ($\text{ROO}^\cdot$) e alcóxila ($\text{RO}^\cdot$) e os não radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ($\text{NO}^\cdot$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos ($\text{NO}_2^\cdot$), nitratos ($\text{NO}_3^\cdot$) e peroxinitritos ($\text{ONOO}^\cdot$). Eles podem ser altamente reativos no organismo, atacando lipídios, proteínas e DNA ou pouco reativos, podendo, nesse caso, gerar espécies danosas (BARREIROS ALBS, *et al*, 2006).

Há fortes evidências de que o estresse oxidativo assume papel importante nos processos de envelhecimento e morte celular com consequências diretas em vários processos patológicos como no câncer e na AIDS, bem como na fisiopatologia de doenças crônicas (doenças autoimunes, cardiopatias entre outras). Além disso, as ERO e ERN participam de situações fisiológicas importantes como o controle da pressão sanguínea, sinalização celular, apoptose e fagocitose de agentes patogênicos (VASCONCELOS SML, *et al*, 2007).

Essa relação entre estresse oxidativo e processos fisiológicos acontece por causa da propriedade que os radicais livres têm de reagir com ácidos graxos poliinsaturados, servindo como iniciadores do processo de peroxidação lipídica (LIMA ES, ABDALLA DSP, 2001). Vários parâmetros são utilizados a fim de mensurar a peroxidação lipídica, como a dosagem do malonaldeído (MDA) a partir do ácido tiobarbitúrico (TBA), que atualmente é bastante utilizado como biomarcador do estresse oxidativo e o isoprostano, produto secundário da peroxidação lipídica, que por ser quimicamente estável, também é bastante

utilizado como marcador do estresse oxidativo (ROSEN P, *et al*, 2001; VASCONCELOS SML, 2007; BARBOSA KBF, *et al*, 2011).

A produção de radicais livres, em condições normais, é neutralizada pelos mecanismos endógenos, como a ativação do sistema antioxidante, composto por ácido ascórbico, glutathione reduzida, α -tocoferol e várias enzimas que eliminam as ERO como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPx). Tanto a SOD como a GPx catalisam a decomposição das ERO, não apenas intra, mas também extracelularmente. Podem, portanto, desempenhar um papel importante na proteção dos componentes fluidos extracelulares, tais como as proteínas, enzimas, além das células de superfície da membrana contra o peróxido mediador de danos teciduais, podendo resultar no aumento da peroxidação lipídica (MYLONA-KARAYANNI C, *et al*, 2006).

1.2.1. Ação das ERO e ERN

O foco de atuação das ERO e ERN, em sistemas biológicos, é a membrana celular, e sua função é vital para a célula. Os oxidantes, que são as espécies reativas, conforme representado na figura 3, são gerados durante o metabolismo normal como nas mitocôndrias, peroxissomas e por uma variedade de enzimas citosólicas. Existem diversas fontes exógenas de produção de espécies reativas, como raios ultravioletas, radiação ionizante, quimioterápicos e xenobióticos. Os sistemas de defesa antioxidante enzimático e não-enzimático, quando eficientes, mantêm a homeostase fisiológica e, quando estão ineficientes, permitem a instalação do estresse oxidativo, representado pelo dano celular em macromoléculas como DNA, proteínas e lipídios que se expressam clinicamente como envelhecimento ou doença (VASCONCELOS SML, *et al*, 2007).

O aumento da concentração de ERO provoca lesão ou até morte celular. O endotélio vascular é o primeiro alvo do estresse oxidativo. Após a exposição às ERO, suas células mostram uma variedade de efeitos biológicos adversos, incluindo a produção de mediadores inflamatórios, expressão de moléculas de adesão e aumento da permeabilidade celular (MYLONA-KARAYANNI C, *et al*, 2006).

Figura 3. Fontes e respostas celulares às espécies reativas (ER) de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), derivadas de enxofre (ERS), de cloro (ERCl), de carbono (ERC) e de metais de transição (M^{n+}) (VASCONSELOS SML, *et al*, 2007).

1.2.2. O processo de peroxidação lipídica

O processo de peroxidação lipídica é definido como uma cascata de eventos bioquímicos que resulta da ação dos radicais livres sobre os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, levando à destruição da sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, até mesmo, à morte celular (BENZIE IF, 1996). Essas alterações que ocorrem nas membranas celulares provocam transtornos de permeabilidade, alterando o fluxo iônico e de outras substâncias, resultando na perda de seletividade para entrada e saída de nutrientes e de substâncias tóxicas à célula, promovendo alterações do DNA, oxidação das LDLs (Low Density Lipoproteins) e comprometimento da matriz extracelular (LIMA SL, ABDALLA DSP, 2001).

A peroxidação lipídica é a origem do estresse oxidativo (WU D, *et al*, 2013), e o seu processo pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação, como mostra a figura 4.

Figura 4: Etapas do processo de peroxidação lipídica.

- Iniciação:** representa o início da peroxidação lipídica, onde o ácido graxo poliinsaturado sofre ataque de um radical hidroxila ou com o oxigênio singlete retirando um átomo de hidrogênio do ácido graxo e liberando um radical lipídico. Este radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado, ou seja, duas ligações duplas intercaladas por uma ligação simples.
- Propagação:** esse radical lipídico inicialmente formado, combina-se com uma ou mais moléculas de oxigênio, transformando-se em radical peróxido.
- Terminação:** ocorre a aniquilação dos radicais peróxidos formados originando hidroperóxido e mais um outro radical lipídico, caracterizando-se como uma típica reação em cadeia (VANNUCCHI H, *et al*, 1998; SCHNEIDER, C, 2009).

1.3. ESTRESSE OXIDATIVO E DIABETES MELLITUS TIPO 1

Um dos mecanismos patogênicos que explica o aumento do risco de aterosclerose e doença coronariana no diabetes é o desequilíbrio entre oxidantes e

antioxidantes (SIES H, 1991). A hiperglicemia resulta da oxidação da glicose, glicação não-enzimática e disfunção monocítica, que conduz para o aumento na produção de radicais livres (MULLARKEY C, EDELTEIN D, BROWNLEE M, 1990; BROWNLEE M, 1994). Isso é agravado pela diminuição dos níveis de antioxidantes (MURAKAMI K, KONDO T, KAWAKAMI Y, 1989) levando ao dano oxidativo, demonstrado por altos níveis de produtos de peroxidação lipídica e de DNA encontrado em pacientes com DM (GRIESMACHER A, *et al*, 1995).

A disfunção endotelial é conhecida como a responsável pelas complicações vasculares do DM1, e o estresse oxidativo contribui significativamente para essa disfunção, a partir do desequilíbrio entre a produção de ERO e a defesa antioxidante, em favor do primeiro, levando, dessa forma, ao dano tecidual (MYLONA-KARAYANNI C, *et al*, 2006).

Estudos têm demonstrado que o pobre controle metabólico no DM1 está associado ao aumento do estresse oxidativo (ERCIYAS F, *et al*, 2004; SHAMIR R, *et al*, 2008), e sua importância na etiologia das complicações do diabetes baseia-se no fato de que vias bioquímicas como a oxidação da glicose e a glicação proteica podem aumentar a formação de radicais livres, fortemente relatada nos períodos de hiperglicemia (SHAMIR R, *et al*, 2008).

De acordo com Varvarovska e colaboradores (2004), a suplementação com antioxidantes como as vitaminas E e C, foi capaz de melhorar o controle metabólico do diabetes e os marcadores da oxidação. Esses resultados vão de encontro às evidências encontradas por Shamir e colaboradores (2008), referentes ao efeito benéfico do controle metabólico no desenvolvimento de estresse oxidativo em crianças com DM1.

1.4. TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS

O Transplante Autólogo de Células-tronco Hematopoiéticas (TACTH) tem sido estudado em doenças autoimunes associadas a elevadas taxas de complicações e mortalidade, ou que comprometem gravemente a qualidade de vida. Seu processo caracteriza o uso das próprias células progenitoras hematopoéticas do paciente, previamente coletadas e criopreservadas.

A figura abaixo (**Figura 5**) demonstra o esquema realizado durante o TACTH nos pacientes com DM1, tratados na Faculdade de Medicina de Ribeirão

Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP). As células-tronco são colhidas por leucoaférese do sangue periférico, após estímulo para mobilização das células-tronco hematopoéticas com ciclofosfamida e filgrastima. Na segunda fase, o paciente recebe condicionamento imunoablativo com ciclofosfamida e globulina antitimocitária, de coelho, seguido por infusão das células-tronco autólogas previamente colhidas. Segue-se o período de aplasia medular, com duração de aproximadamente cinco dias. Após a recuperação hematológica o paciente recebe alta hospitalar e passa a ser acompanhado ambulatorialmente.

Figura 5: Esquema de mobilização e condicionamento para o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1, na FMRP-USP.

O protocolo de TACTH para DM1, desenvolvido em nosso serviço, foi pioneiro no mundo, e baseou-se nos protocolos pré-existentes para outras doenças autoimunes e nas experiências, descritas em literatura, de transplante de ilhotas pancreáticas (SHAPIRO AM, *et al*, 2006). A experiência prévia do TACTH, aplicado para tratamento de esclerose múltipla, esclerose sistêmica e vasculites, revelou-se segura e eficaz (HAMERSCHLAK N, *et al*, 2009; VOLTARELLI JC, *et al*, 2004; VOLTARELLI JC, OUYANG J, 2003), portanto esquemas de tratamento

semelhantes foram adotados para o DM1 (VOLTARELLI JC, *et al*, 2007; COURI CEB, *et al*, 2009).

Uma vez que a perda de células β do pâncreas é gradual, acredita-se que uma intervenção imunológica, que mantenha a agressão controlada, poderia poupar a pequena parcela restante do pâncreas endócrino. Assim, a massa produtora de insulina preservada minimizaria as necessidades de insulina exógena e, possivelmente, reduziria as consequências crônicas da doença. Com base nesse conceito, durante a década de 80, iniciaram-se abordagens imunossupressoras para o DM1, visando controlar a autoimunidade e evitar a completa destruição pancreática (PALMER JP, 2004). Algumas dessas intervenções mostraram resultados parciais em sua maioria sustentados somente durante o período de imunossupressão (BATTAGLIA M, RONCAROLO MG, 2011). De um modo geral, esses resultados demonstraram ser necessário empregar abordagens imunossupressoras mais abrangentes, que modulam o sistema imunológico como um todo, e não somente terapias restritas a determinadas vias inflamatórias.

Em nosso estudo, pudemos avaliar os efeitos imediatos do transplante de células-tronco hematopoéticas, promovendo redução das necessidades de insulina e aumentos dos níveis de peptídeo-C na maioria dos pacientes. Entretanto, ainda nos resta investigar se existem efeitos de longo prazo e se tais efeitos estão condicionados ao controle glicêmico pós-transplante. Um dos aspectos a serem investigados é o estresse oxidativo, componente importante na patogênese do diabetes tipo 1 e 2 e bastante relacionado ao desenvolvimento de complicações crônicas na doença.

Portanto, se levarmos em consideração que os pacientes com DM1 têm um perfil prejudicado em relação ao estresse oxidativo com aumento da produção de radicais livres e/ou redução de antioxidantes, cabe nesse projeto investigar se os pacientes que se encontram no pós-transplante também possuem esse perfil dependente do “status” oxidante.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais:

- Determinar o efeito do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas sobre o perfil biométrico e metabólico de pacientes com DM1;
- Determinar o perfil de estresse oxidativo de pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 1 recém-diagnosticado;
- Determinar os efeitos do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas sobre o perfil oxidativo de pacientes com DM1;
- Comparar os níveis de estresse oxidativo apresentados por pacientes com DM1, antes e após o transplante, com um grupo de indivíduos saudáveis.

2.2. Objetivos Específicos:

- Analisar mudanças nas medidas de peso dos pacientes do grupo experimental antes e 12 meses pós-transplante.
- Analisar o perfil metabólico dos pacientes do grupo experimental antes e 12 meses pós-transplante através de níveis de peptídeo-C, hemoglobina glicada e necessidades de insulina endógena.
- Analisar o perfil oxidativo nos pacientes diabéticos antes e após o transplante e no grupo controle através da dosagem sérica de:
 1. Malonaldeído (MDA)
 2. Isoprostano
- Analisar a capacidade antioxidante nos pacientes diabéticos antes e após o transplante e no grupo controle através da dosagem sérica de:
 1. Glutathione reduzida (GSH)
 2. Superóxido dismutase (SOD)
 3. Catalase
 4. Tocoferol
- Comparar os resultados das análises de perfil oxidativo dos pacientes incluídos nos grupos experimental (pré e pós-transplante) e controle.

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1. População de estudo

Trinta e seis indivíduos participaram desse estudo, sendo que 18 deles eram pacientes com DM1 submetidos ao TACTH entre 2005 e 2010, correspondendo ao grupo experimental. As análises desses pacientes foram realizadas a partir de amostras de soro criopreservadas, além de levantamento de prontuários médicos para obter outras informações, como dados demográficos, clínicos e de estilo de vida. Os demais 18 indivíduos eram pacientes que não apresentavam DM1 ou outra qualquer comorbidade conhecida, correspondendo ao grupo controle. Foram coletadas amostras de sangue em jejum cujo soro foi criopreservado 3 horas após a coleta para posterior análise.

Trata-se de um estudo retrospectivo, cuja população de estudo foi constituída de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TACTH) no período de 2004 a 2010, no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (*grupo experimental*) e indivíduos saudáveis, estudantes de medicina da Faculdade Barão de Mauá de Ribeirão Preto e outros indivíduos abordados aleatoriamente nos ambulatórios do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (*grupo controle*). Todos os pacientes e indivíduos que aceitaram participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo (número do processo 565.313).

Grupo experimental (n=18): foi avaliado em dois momentos. No primeiro, foram analisadas amostras de soro colhidas logo antes de ser realizado o TACTH (momento pré-TACTH). No segundo, amostras de soro dos mesmos indivíduos foram analisadas 360 dias após o TACTH (momento pós-TACTH). As amostras previamente colhidas dos pacientes transplantados estavam criopreservadas em banco de amostras, sob processo aprovado pelo CEP sob número 4911/2008. O responsável pelo banco de amostras é o Prof. Dr. Wilson Araújo Júnior.

Grupo controle (n=18): o grupo controle foi preenchido por indivíduos saudáveis que estudavam na Faculdade Barão de Mauá e de indivíduos saudáveis

abordados em ambulatórios do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e que preencheram os requisitos para participar desse grupo.

3.2. Critérios de inclusão

Para o grupo experimental: pacientes que realizaram o TACTH entre 2004 e 2010, e que possuíam amostras de soro criopreservado antes e/ou 12 meses após o transplante.

Grupo controle: indivíduos saudáveis, que tenham idade máxima de 35 anos, que apresentaram glicemia de jejum de até 110 mg/dL e índice de massa corporal (IMC) abaixo de 30Kg/m².

3.3. Dados bioquímicos

Os participantes foram submetidos à coleta de amostras de sangue em jejum. O rastreamento do valor da glicemia de jejum foi feito através de glicemia capilar. Indivíduos que apresentaram valores de glicemia capilar ≥ 110 mg/dl ou relato de diabetes foram dispensados do estudo.

A glicose plasmática foi dosada pelo método GOD-Trinder oferecido pela empresa Labtest, Brasil. A classificação das alterações glicêmicas baseou-se nos critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS): normoglicemia (glicemia de jejum < 110 mg/dl) (ALBERTI, 1999).

3.4. Quantificação do estresse oxidativo

3.4.1. Determinação da peroxidação lipídica pela dosagem de malonaldeído (MDA): a dosagem da peroxidação lipídica no soro foi feita de acordo com o método proposto por Gererd-Monnier com algumas adaptações (GERARD-MONNIER, D et al., 1998). Utilizou-se 200µl de amostra para a dosagem de MDA no soro. Adicionou-se 650µl de solução de 10mM de 1-metil-fenilindol em acetonitrila e metanol (2:1, v/v) e 150µl de HCL puro (37%). Logo após, agitou-se os tubos do tipo eppendorfs em agitador tipo vórtex e os encubou em banho-maria a 45°C por 40 minutos. Após o banho, houve resfriamento das amostras em gelo e

em seguida os tubos do tipo eppendorfs foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos. Fez-se a leitura de absorbância com comprimento de onda de 586nm do sobrenadante. Calculou-se a concentração de MDA comparando-a a uma curva de 1,1,3,3- tetrametoxipropano (TMP) hidrolisado.

3.4.2. Determinação do estresse oxidativo pelo isoprostano: Determinou-se esse marcador pelo método ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) com o kit 8-isoprostane EIA[®] (Cayman Chemical Company, USA). Não houve necessidade de purificação das amostras de soro visto que diversos testes de diluição resultaram em valores semelhantes (diferença < 20%). Seguiu-se o protocolo de análise fornecido pelo fabricante do kit. Fez-se a leitura das placas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 410nm e os resultados calculados em ng/mmol.

3.5. Avaliação da atividade antioxidante

3.5.1. Determinação de Glutathiona reduzida (GSH): fez-se a quantificação da glutathiona reduzida segundo método descrito por Sedlack e Lindsay (1968). Usou-se 200 microlitros de soro misturados com 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% e 0,1 mL de 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (0,01 M em metanol). Realizou-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 412 nm, 5 minutos após a adição do DTND, contra um branco com ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) (0,02 M) em lugar do soro. Calculou-se a concentração utilizando uma curva padrão de GSH em EDTA (0,02 M).

3.5.2. Determinação da Superóxido Dismutase (SOD): este marcador foi determinado por um método indireto NBT (*Nitroblue Tetrazolium*) com o kit 19160 SOD[®] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH[®]). Adicionou-se 20µl da amostra em solução branca 2 e adicionado 20µl de água duplamente destilada nas soluções brancas 1 e 3. Adicionou-se 20µl da solução WST fornecida pelo kit em cada solução branca e misturou-se. Adicionou-se mais 20µl da solução tampão, também fornecida pelo kit nas soluções brancas 2 e 3. Adicionou-se 20µl da solução de enzima (fornecida

pelo fabricante) na amostra e na solução branca 1 e depois misturou-se continuamente. Foi colocada em uma incubadora a 37°C por 20 minutos. Por fim, fez-se a leitura em absorbância a 450nm.

3.5.3. Determinação da enzima Catalase (CAT): a dosagem da enzima catalase foi feita baseada no método de Beers e Sizer (1952). Para a dosagem da catalase no soro utilizou-se 250µl de amostra. A esta amostra foi adicionado 2,5µl de Tritón X-100 puro. Após misturar por 1 minuto, diluiu-se 1:200 do sobrenadante (10µl da amostra em 2 mL da solução tampão fosfato - (PO_4^-) 50 mM pH 7-7,4). Depois se fez a leitura no espectrofotômetro com absorbância a 240nm a $t=0$ y $t=30''$.

3.5.4. Determinação da vitamina E sérica: Em um tubo de ensaio de vidro (12x75mm) pipetou-se 400 µl da amostra (teste) e 400 µl da solução padrão de α -tocoferol (curva) com 400 µl de água (branco). Adicionou-se 400 µl de etanol no teste e no branco. Adicionou-se 400 µl de água no padrão. Agitou-se em agitador do tipo vórtex por 30 segundos. Adicionou-se 400 µl de hexano e agitou-se por 30 segundos e, em seguida, centrifugou-se por 10 minutos/1.500g/4°C. Coletou-se a camada superior (hexana) e transferiu para outro tubo de vidro e cobriu-se com parafilme para evitar a evaporação. Pipetou-se em um tubo do tipo eppendorf de 0,2 mL, 200 µl da camada hexânica, 50 µl de batofenantrolina 0,4%, 150 µl de cloreto férrico 0,06% e 100 µl de ácido ortofosfórico (85%) 0,5%. Agitou-se em vidro tipo vórtex e fez-se a leitura em absorbância de 536 nm. A curva foi obtida plotando os dados de absorbância x concentração de α -tocoferol (FABIANEK, J.; *ET al.*, 1968).

3.6. Coleta de células-tronco hematopoéticas do sangue periférico

Os pacientes integrantes do presente estudo seguiram o seguinte protocolo: para mobilizar as células-tronco hematopoéticas da medula óssea para o sangue periférico, o paciente recebeu ciclofosfamida (2 g/m^2) endovenosa, seguida de filgrastima (G-CSF, 10 ug/kg/d), iniciando-se 24h após a infusão da primeira dose de ciclofosfamida. A leucocitoaférese foi iniciada quando a contagem leucocitária subiu e o número de células-tronco hematopoéticas (CD34+) foi

superior a 10/ul. Foram realizadas sessões de aférese para garantir a coleta de pelo menos 2 milhões de células CD34/kg de peso do paciente.

A tabela abaixo descreve as doses de agentes usados durante a fase de condicionamento para o TACTH nos pacientes com DM1 (**Tabela 3**).

Tabela 3. Regime de condicionamento dos pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 1 submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas.

Dia	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+5
Hidratação	X	X	X	X	X					
Ciclofosfamida 50mg/kg/d		X	X	X	X					
Globulina antitimocitária mg/Kg/d		0,5	1,0	1,0	1,0	1,0				
Infusão de células-tronco							X			
G-CSF 10µg/kg/d										X⇒

- Ciclofosfamida 50mg/kg/dia x 4 dias, por via endovenosa, infundidos em 1 hora, diluídos em 500 ml de soro fisiológico (SF) 0,9%.
- Globulina antitimocitária de coelho (Sangstat Medical Corporation, Fremont, CA, USA), por via endovenosa, infundida em 12 horas, diluída em 1000 ml de SF 0,9%. A primeira dose foi de 0,5 mg/kg e as quatro subsequentes, de 1 mg/kg. Foi necessário profilaxia com Maleato de Dexclorferamina.
- Hidratação de aproximadamente 175 ml/hora foi iniciada 6 horas antes da ciclofosfamida e mantida até pelo menos 24h após término da infusão de ciclofosfamida. A velocidade de hidratação foi ajustada ao balanço hídrico e à curva ponderal, obtida 2 vezes ao dia.
- G-CSF foi mantido do dia 0 até a contagem de neutrófilos estiver acima de 1000/mm³.

3.7. Dados de prontuário

Dados complementares foram pesquisados a partir de prontuários médicos dos pacientes que realizaram o TACTH, a fim de delinear o perfil desses pacientes. Para isso, foram coletados dados demográficos como sexo, idade, etnia,

estado civil, naturalidade, escolaridade e profissão, dados de estilo de vida como tabagismo, etilismo, uso de drogas ilícitas, prática de atividades físicas antes e 12 meses após o transplante, se faziam contagem de carboidratos e se consumiam frutas, verduras e legumes antes e até 12 meses depois do transplante, dados clínicos como história familiar de DM1, presença de cetoacidose diabética, valores de HbA1C pré e 12 meses depois do transplante e valores de peptídeo-C pré e 12 meses após o transplante (utilizamos cálculo da área sob a curva dos pontos em jejum, 30, 60, 90 e 120 minutos pós estímulo prandial com dieta de 400kcal), dados de peso e altura (altura no momento do transplante, pesos pré-diagnóstico, pré-mobilização, pré-condicionamento e peso 12 meses após o transplante), dados de insulina (uso de insulina ao diagnóstico e 12 meses depois do transplante) e complicações do transplante tanto na fase de mobilização como no condicionamento.

3.8. Análises estatísticas

Todos os conjuntos de valores foram analisados quanto a distribuição paramétrica ou não paramétrica. Foram calculadas as médias (desvios-padrão) dos valores com distribuição paramétrica e mediana (intervalo) dos valores com distribuição não paramétrica. Para as comparações entre os grupos controle, experimental pré e experimental pós quanto aos níveis de malonaldeído (MDA), isoprostano, glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD) e vitamina E (tocoferol) foi utilizado o modelo de regressão linear com efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos). Todos os modelos foram controlados pela idade, eliminando assim, um possível fator de confusão. As comparações entre as medidas pré e pós-transplante do grupo experimental quanto aos níveis de hemoglobina glicada e peptídeo-C, foram feitas através do teste t-Student pareado. Para comparar valores pareados entre o grupo experimental pré e pós-transplante com o grupo controle, foi utilizado o teste t pareado ou teste de Wilcoxon. Todos os gráficos apresentados foram feitos com o auxílio do software R, versão 3.1.1 e as análises através do software SAS® 9.2. O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Para o presente estudo, foram inicialmente considerados para o grupo experimental 25 pacientes com DM1 que haviam sido submetidos ao TACTH entre 2004 e 2010. Entretanto, apenas 18 (72%) deles tinham amostras de soro criopreservadas em quantidade suficiente para as análises laboratoriais previstas. Esses pacientes foram, ainda, retrospectivamente divididos em dois grupos, de acordo com o uso de insulina aos 12 meses após o transplante; aqueles que ficaram livres do uso de insulina exógena até 12 meses depois do transplante (respondedores) e os que se encontravam em uso de insulina exógena aos 12 meses após o transplante (não-respondedores). A **Figura 6** descreve a distribuição dos pacientes.

Figura 6. Organograma dos pacientes com DM1 (grupo experimental) submetidos ao TACTH entre 2004 e 2010 e a descrição dos pacientes utilizados nesse estudo.

4.1 Análise descritiva

O sexo masculino (66,7%) e a etnia branca (83,3%) predominaram entre os indivíduos com DM1 submetidos ao TACTH (**Tabela 4**). A idade mediana (variação) desse grupo foi de 16 (13 a 31) anos. Quando comparamos aos dados do grupo controle, não há diferença em relação a etnia (teste de Chi-quadrado,

p=0,23), porém a idade é maior no grupo controle (teste de Wilcoxon, p=0,08) e predominou o sexo masculino no grupo experimental (teste de Chi-quadrado, p=0,01).

Tabela 4. Dados demográficos dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 submetidos ao transplante de células-tronco hematopoéticas e controles. Ribeirão Preto (2004-2010).

Grupo Experimental				Grupo Controle		
	Sexo	Idade	Etnia	Sexo	Idade	Etnia
1	M	14	branca	F	17	branca
2	F	20	branca	F	22	branca
3	M	16	branca	F	21	branca
4	F	17	branca	F	22	branca
5	F	14	mulata	M	20	branca
6	M	24	branca	F	21	branca
7	M	31	branca	M	22	branca
8	M	16	branca	F	21	branca
9	M	15	branca	F	22	branca
10	M	17	mulata	F	20	branca
11	M	21	branca	F	14	asiática
12	F	16	branca	F	32	branca
13	M	15	branca	M	28	branca
14	M	13	branca	M	28	branca
25	F	15	asiática	F	28	branca
16	M	22	branca	F	30	branca
17	M	19	branca	F	27	branca
18	F	16	branca	F	25	branca

Dados de estilo de vida também foram avaliados e encontrou-se que nenhum desses pacientes era tabagista, etilista ou fazia uso de drogas ilícitas. Dos 18 pacientes analisados, 12 (67%) e 15 (83%) continham, respectivamente, em prontuários, informações de prática de atividades físicas no período pré-transplante e 12 meses pós-transplante. Desses, metade praticava atividades físicas antes do transplante, enquanto que a maioria passou a praticar 12 meses depois do transplante (60%). Adicionalmente, maioria deles não fazia contagem de carboidratos, e, por fim, a maioria tinha o hábito de consumir frutas, verduras e legumes antes e 12 meses depois do transplante (**Tabela 5**).

Tabela 5. Dados de estilo de vida dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 submetidos ao transplante de células-tronco hematopoéticas. Ribeirão Preto (2004-2010).

	Tabagismo	Etilismo	Drogas ilícitas	AF* pré transplante	AF* pós transplante	Contagem de Carboidratos	FVL* pré transplante	FVL** no período até 12 meses pós transplante
1	não	não	não	não	não	Não		
2	não	não	não					
3					sim (moderada)	Sim	sim	sim
4	não	não	não	não	não			
5	não	não	não					
6	não	não	não	sim (intensa)	sim (intensa)	Sim	sim	sim
7	não	não	não	não	não		sim	
8	não	não	não		sim (intensa)		sim	
9	não	não	não	sim (intensa)	sim (intensa)	Não	não	sim
10	não	não	não	sim (intensa)	sim (intensa)			
11	não	não	não		não	Não	sim	
12	não	não	não	sim (leve)	sim (leve)	Não	sim	sim
13	não	não	não	não	não	Não	sim	
14	não	não	não		não	Não	não	
15	não	não	não		sim (intensa)	não		
16	não	não	não	sim (intensa)	sim (intensa)	não	sim	sim
17	Não	não	não	sim (intensa)	sim (intensa)	sim	sim	sim
18	Não	não	não	não				

*AF: Atividades Físicas

**FVL: Consumo de frutas, verduras e legumes na dieta.

A **Tabela 6** corresponde aos dados relacionados ao diabetes desses pacientes. Observa-se que a maioria (83%) não tinha história familiar de DM1 e apenas 2 (11%) pacientes apresentaram cetoacidose diabética.

Tabela 6. Dados clínicos dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 submetidos ao transplante de células-tronco hematopoéticas. Ribeirão Preto (2004-2010).

	História familiar com DM1	CAD ¹	HbA1C ² (pré) ³	HbA1C ² (pós) ⁴	Peptídeo-C (pré) ^{3,5}	Peptídeo-C (pós) ^{4,5}
1	Não	não	10,2	4,6	180,5	144,0
2	Não	não	10,0	4,4	12,0	233,0
3	1 irmã	não	5,3	6,6	33,0	466,0
4	Não	não	8,9	6,1	88,5	285,0
5	Irmã	não	10,2	5,4	32,5	631,5
6	Não	não	8,1	5,3	238,5	466,5
7	2 primos	não	7,1	5,6	143,5	945,5
8	Não	não	6,9	5,7	94,5	508,0
9	Não	não	8,4	7,1	526,5	701,5
10	Não	não	9,0	6,0	474,0	638,0
11	Não	não	9,1	6,9	494,5	588,0
12	Não	sim	9,5	7,9	124,6	75,2
13	Não	não	9,5	10,7	137,5	83,0
14	Não	não	7,6	8,5	816,6	57,6
15	Não	não	11,6	7,5	447,5	529,0
16	Não	não	10,0	6,9	392,0	277,8
17	Não	não	9,9	6,2	202,4	190,9
18	Não	sim	10,2	5,7	14,8	23,4

1. CAD: Presença de cetoacidose diabética.

2. HbA1C: Hemoglobina glicada.

3. (Pré): Dados analisados imediatamente antes do transplante.

4. (Pós): Dados coletados 12 meses após o transplante.

5. Os dados de peptídeo-C foram feitos a partir do cálculo da área sob a curva dos pontos em jejum, 30, 60, 90 e 120 minutos pós estímulo prandial com dieta de 400kcal).

Ao analisar os níveis de HbA1C nos períodos pré-transplante e 12 meses após o transplante, encontrou-se diferença estatística ($p=0,0003$), sendo que os valores pré-transplante são maiores que os valores 12 meses pós-transplante (**Figura 7**).

Figura 7. Níveis de hemoglobina glicada antes e após o transplante. Níveis de hemoglobina glicada imediatamente antes (PRÉ) e 12 meses após o transplante (PÓS) no grupo de pacientes diabéticos. Teste de Wilcoxon para amostras pareadas, *** $p<0,001$. As linhas horizontais correspondem às medianas (maior) e ao 1° e 3° quartis (menores).

Para os níveis de peptídeo-C (valores encontrados a partir do cálculo da área sob a curva dos pontos em jejum, 30, 60, 90 e 120 minutos pós estímulo prandial com dieta de 400kcal), em um primeiro momento não se encontrou diferença significativa entre os valores pré e 12 meses pós-transplante (Teste de Wilcoxon para amostras pareadas, $p=0,1056$) (**Figura 8A**). Entretanto, quando dividimos os pacientes em respondedores e não-respondedores, observamos que os valores de peptídeo-C aumentaram ($p=0,0195$) após o transplante no grupo de respondedores, o que não aconteceu entre os não-respondedores (**Figura 8B**).

Figura 8. Níveis de peptídeo-C, calculados a partir da área sob a curva dos pontos em jejum, 30, 60, 90 e 120 minutos pós estímulo prandial com dieta de 400kcal, nos pacientes DM1 submetidos ao TACTH. **A)** No conjunto de 18 pacientes, antes e 12 meses após o transplante. **B)** Nos grupos de respondedores e não-respondedores, antes e 12 meses após o transplante. Teste de Wilcoxon para amostras pareadas, *** $p < 0,001$. As linhas horizontais correspondem às medianas (maior) e ao 1° e 3° quartis (menor).

Em relação ao peso corporal dos pacientes, observamos diferença estatística ao comparar os quatro períodos analisados: pré-diagnóstico, pré-mobilização, pré-condicionamento e 12 meses pós-transplante ($p = 0,0019$). Detectamos diferença de peso entre os momentos pré-diagnóstico e pré-mobilização ($p < 0,001$), e entre pré-diagnóstico e pré-condicionamento ($p < 0,001$). Porém, não houve diferença entre o pré-diagnóstico e 12 meses pós-transplante, evidenciando que, após 12 meses do transplante, o paciente recupera seu peso original (**Figura 9**).

Figura 9: Evolução do peso dos pacientes com DM1 antes e após o transplante. Teste one-way ANOVA repeated measures, pós-teste de Tukey. O limite superior das colunas corresponde às médias e as barras representam os desvios-padrão. *** $p<0,001$. PRÉ-DIAGN: peso referido antes do diagnóstico de DM1; PRÉ-MOB: peso aferido imediatamente antes da fase de mobilização do transplante; PRÉ-COND: peso aferido imediatamente antes da fase de condicionamento do transplante; 12 MESES: peso aferido aos 12 meses após o transplante.

Ao analisarmos os dados referentes às doses de insulina exógena usadas pelos pacientes, observamos uma redução importante ($p=0,0003$) aos 12 meses pós-transplante quando comparadas com o período pré-mobilização (**Figura 10**).

Figura 10: Doses de insulina exógena (UI/Kg/dia) antes e após o transplante.
A) Comparação antes e 12 meses após o transplante no grupo completo de

pacientes com DM1 (n=18). Teste de Wilcoxon para amostras pareadas, ***p<0,001. As linhas horizontais correspondem às medianas (maior) e ao 1° e 3° quartis (menores). **B)** Representação linear para cada paciente, mostrando a evolução do uso de insulina exógena antes e 12 meses após o transplante. As linhas não contemplam as variações individuais nas doses de insulina ocorridas no intervalo entre os momentos demonstrados pela figura. PRÉ: imediatamente antes de iniciar a primeira fase do transplante. PÓS: 12 meses após o transplante.

De acordo com a **Tabela 7**, a maioria dos pacientes não teve nenhum tipo de complicação durante a fase de mobilização e, entre aqueles que tiveram, destacam-se: náuseas e vômitos e febre sem infecção detectada, caracterizando baixa gravidade.

Tabela 7. Complicações do transplante na fase de mobilização dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 submetidos ao transplante de células-tronco hematopoéticas. Ribeirão Preto (2004-2010).

	Complicações
1	Não houve
2	Não houve
3	Não houve
4	Não houve
5	Não houve
6	Febre sem infecção detectada
7	Ardor nasal e salivação
8	Náuseas, vômitos e hiporexia
9	Amigdalite bacteriana
10	Pico febril no dia da coleta
11	Não houve
12	Não houve
13	Não houve
14	Não houve
15	Foliculite leve em nádegas
16	Não houve
17	Febre sem infecção detectada
18	Não houve

Durante a fase de condicionamento para o transplante, 13 (72%) tiveram neutropenia febril durante essa fase, 5 (27,2%) indivíduos não apresentaram complicações e dentre as complicações relatadas, destacam-se: infecção de cateter, pneumonia e necessidade de ventilação não-invasiva. (**Tabela 8**).

Tabela 8. Complicações do transplante na fase de condicionamento dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 submetidos ao transplante de células-tronco hematopoéticas. Ribeirão Preto (2004-2010).

	Complicações
1	NF, infecção de cateter venoso central e sinusite tardia
2	NF, pneumonia com derrame pleural bilateral
3	NF, pneumonia bacteriana
4	NF, infecção cateter venoso central, diarreia moderada
5	NF
6	Não houve
7	NF
8	NF
9	NF
10	NF
11	Não houve
12	Não houve
13	NF
14	NF
15	Não houve
16	Não houve
17	NF, pneumonia bacteriana bilateral e necessitou ventilação não-invasiva
18	NF

4.2. Avaliações do estresse oxidativo e da capacidade antioxidante

Malonaldeído (MDA)

Não detectamos diferenças estatísticas de níveis séricos de MDA ao compararmos o grupo controle com o grupo experimental pré ($p=0,85$) e com o grupo experimental pós-transplante ($p=0,74$). Também não encontramos diferenças entre o grupo experimental nos momentos pré e pós-transplante ($p=0,72$) (**Figura 11A**). Também não encontramos diferenças estatísticas ao separarmos os pacientes em grupos “respondedores” e não respondedores, quando comparados ao grupo controle e quando comparados entre si ($p>0,05$) (**Figura 11B**).

Figura 11: Valores de malonaldeído (MDA) nos pacientes diabéticos e controles. A) A figura representa os níveis de MDA nos pacientes com DM1 antes (PRÉ) e 12 meses após o transplante (PÓS), assim como no grupo controle. Comparações entre os grupos controle, experimental pré e experimental pós-transplante através do modelo de regressão linear com efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos), controlados pela idade. As margens inferior e superior dos boxplots correspondem ao 1º e 3º quartis. As linhas centrais (em negrito) correspondem às medianas e as linhas horizontais dos extremos correspondem aos respectivos valores mínimo e máximo. Os pontos escuros (•) correspondem às médias dos valores encontrados. Os pontos não preenchidos (○) correspondem aos valores excluídos (*outliers*). **B)** A figura representa níveis de MDA nos pacientes diabéticos subdivididos em respondedores e não-respondedores, nos respectivos momentos pré e pós-transplante, analisados através do teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn. Neste gráfico, as linhas horizontais correspondem à média e limites superior e inferior de desvio padrão. * $p=0,0478$. As linhas horizontais correspondem à mediana (maiores) e ao 1º e 3º quartis (menores). PRÉ: imediatamente antes de iniciar a primeira fase do transplante. PÓS: 12 meses pós-transplante.

Isoprostano

Ao avaliarmos os níveis séricos de isoprostano do grupo experimental (DM1) nos momentos pré e 12 meses após o transplante, não encontramos diferença significativa ($p=0,39$). Observamos níveis séricos superiores nos grupos pré ($p<0,01$) e pós-transplante ($p<0,01$) quando comparado com o grupo controle (**Figura 12A**). Ao separarmos o grupo experimental em respondedores e não-

respondedores, observamos que não houve diferença significativa entre os subgrupos, porém encontramos níveis de isoprostano superiores aos controles no momento pré-transplante ($p<0,05$) no subgrupo não-respondedores, enquanto que no subgrupo dos respondedores, encontramos níveis séricos de isoprostano superiores ($p<0,01$) tanto nos momentos pré como 12 meses pós-transplante, em relação ao grupo controle (**Figura 12B**). Nos casos em que as dosagens de isoprostano superaram a concentração de 524pg/mL, os valores passaram a ser qualitativos ($>524\text{pg/mL}$). Portanto, para as representações gráficas e análises estatísticas, consideramos o valor máximo de $>524\text{pg/mL}$.

B

Figura 12: Valores de isoprostano nos pacientes diabéticos e controles. **A)** A figura representa os níveis de isoprostano nos pacientes com DM1 antes (PRÉ) e 12 meses após o transplante (PÓS), assim como no grupo controle. Comparações entre os grupos controle, experimental pré e experimental pós-transplante através do modelo de regressão linear com efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos), controlados pela idade. As margens inferior e superior dos boxplots correspondem ao 1° e 3° quartis. As linhas centrais (em negrito) correspondem às medianas e as linhas horizontais dos extremos correspondem aos respectivos valores mínimo e máximo. Os pontos escuros (•) correspondem às médias dos valores encontrados. Os pontos não preenchidos (○) correspondem aos valores excluídos (*outliers*). **B)** A figura representa níveis de isoprostano nos pacientes diabéticos subdivididos em respondedores e não-respondedores, nos respectivos momentos pré e 12 meses pós-transplante, assim como níveis de isoprostano do grupo controle. Análise através do teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. Neste gráfico, as linhas horizontais correspondem à mediana (maiores) e ao 1° e 3° quartis (menores). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. PRÉ: imediatamente antes de iniciar a primeira fase do transplante. PÓS: 12 meses pós-transplante.

Glutathiona reduzida (GSH)

Observamos níveis séricos de GSH significativamente maiores no grupo experimental (DM1) nos momentos pré ($p = 0,01$) e 12 meses pós-transplante ($p < 0,01$), quando comparados aos níveis do grupo controle. Níveis elevados de GSH também foram encontrados entre o grupo experimental 12 meses pós-transplante, quando comparados ao momento pré-transplante ($p = 0,02$) (**Figura 13A**). Quando separamos o grupo experimental em respondedores (pacientes que se encontravam livres de insulina exógena aos 12 meses pós-transplante) e não-

respondedores (pacientes que não se encontravam livres de insulina exógena aos 12 meses pós-transplante) observamos diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$), entre o grupo controle e cada um dos momentos do grupo experimental (**Figura 13B**). Entretanto, não há diferença entre os momentos do grupo experimental ($p > 0,05$).

Figura 13: Valores de glutathiona reduzida (GSH) nos pacientes diabéticos e controles. **A)** A figura representa os níveis de GSH nos pacientes com DM1 antes (PRÉ) e 12 meses após o transplante (PÓS), assim como nos indivíduos controles. Comparações entre os grupos controle, experimental pré e experimental pós-transplante através do modelo de regressão linear com efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos), controlados pela idade. As margens inferior e superior dos boxplots correspondem ao 1° e 3° quartis. As linhas centrais (em negrito) correspondem às medianas e as linhas horizontais dos extremos correspondem aos respectivos valores mínimo e máximo. Os pontos escuros (•) correspondem às médias dos valores encontrados. Os pontos não preenchidos (○) correspondem aos valores excluídos (*outliers*). **B)** A figura representa níveis de GSH nos pacientes diabéticos subdivididos em respondedores e não respondedores, nos respectivos momentos, pré e pós-transplante, e níveis de GSH do grupo controle. Comparação entre grupo experimental (DM1) e controle através do teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. As linhas horizontais correspondem à mediana (maiores) e 1° e 3° quartis (menores). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. PRÉ: imediatamente antes de iniciar a primeira fase do transplante. PÓS: 12 meses pós-transplante.

Superóxido dismutase (SOD)

Não detectamos diferenças nos níveis séricos de SOD ao compararmos o grupo controle com o grupo experimental pré ($p=0,37$) e com o grupo experimental pós-transplante ($p=0,24$). Também não encontramos diferenças entre o grupo experimental nos momentos pré e pós-transplante ($p=0,51$) (**Figura 14A**). Ao separarmos o grupo experimental em respondedores e não-respondedores, observamos que não houve diferença significativa entre os momentos pré e pós-transplante em cada um dos subgrupos, assim como e entre cada subgrupos e controles ($p=0,0877$) (**Figura 14B**).

A

B

Figura 14: Valores de superóxido dismutase (SOD) nos pacientes diabéticos e controles. **A)** A figura representa os níveis de SOD nos pacientes DM1 antes (PRÉ) e 12 meses após o transplante (PÓS), assim como no grupo controle. Comparações entre os grupos controle, experimental pré e experimental pós-transplante através do modelo de regressão linear com efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos), controlados pela idade. As margens inferior e superior dos boxplots correspondem ao 1° e 3° quartis. As linhas centrais (em negrito) correspondem às medianas e as linhas horizontais dos extremos correspondem aos respectivos valores mínimo e máximo. Os pontos escuros (•) correspondem às médias dos valores encontrados. **B)** A figura representa níveis de SOD nos pacientes diabéticos subdivididos em respondedores e não-respondedores, nos respectivos momentos pré e 12 meses pós-transplante, e níveis de SOD do grupo

controle. Comparação entre grupos experimental (DM1) e controle através do teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. As linhas horizontais correspondem à mediana (maiores) e ao 1° e 3° quartis (menores). PRÉ: imediatamente antes de iniciar a primeira fase do transplante. PÓS: 12 meses pós-transplante.

Tocoferol

Não detectamos diferenças estatísticas de níveis séricos de tocoferol ao compararmos o grupo controle com o grupo experimental pré ($p=0,28$) e com o grupo experimental pós-transplante ($p=0,07$). Também não encontramos diferenças entre o grupo experimental nos momentos pré e pós-transplante ($p=0,30$). Porém, mesmo não encontrando diferença estatística, tanto o momento pré como o pós-transplante, tiveram seus níveis abaixo da faixa de referência de normalidade (**Figura 15A**). Ao separarmos o grupo experimental em respondedores e não-respondedores, observamos que não houve diferença significativa entre os subgrupos, porém encontramos níveis de tocoferol inferiores no momento pós-transplante no subgrupo não-respondedores quando comparado ao grupo controle ($p<0,05$) (**Figura 15B**).

B

Figura 15: Valores de tocoferol nos pacientes diabéticos e controles. **A)** A figura representa os níveis de tocoferol nos pacientes com DM1 antes (PRÉ) e 12 meses após o transplante (PÓS), assim como no grupo controle. Comparações entre os grupos controle, experimental pré e experimental pós-transplante através do modelo de regressão linear com efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos), controlados pela idade. As margens inferior e superior dos boxplots correspondem ao 1° e 3° quartis. As linhas centrais (em negrito) correspondem às medianas e as linhas horizontais dos extremos correspondem aos respectivos valores mínimo e máximo. Os pontos escuros (•) correspondem às médias dos valores encontrados. **B)** A figura representa níveis de tocoferol nos pacientes diabéticos subdivididos em respondedores e não-respondedores, nos respectivos momentos pré e 12 meses pós-transplante, e níveis de tocoferol do grupo controle. Comparação entre os grupos experimental (DM1) e controle através do teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. As linhas horizontais correspondem à mediana (maiores) e ao 1° e 3° quartis (menores). * $p < 0,05$. PRÉ: imediatamente antes de iniciar a primeira fase do transplante. PÓS: 12 meses pós-transplante. As áreas sombreadas correspondem à faixa de normalidade das dosagens.

Catalase

Houve problema metodológico (falha no equipamento) e não foi possível dosar a catalase nas amostras testadas. Houve perda do material analisado e, na ausência de novas amostras, as análises não puderam ser concluídas.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a disponibilidade de agentes antioxidantes (SCHAFFER FQ, BUETTNER GR, 2001). No presente estudo, investigamos se os pacientes com DM1 recém-diagnosticados apresentavam alterações dos níveis de estresse oxidativo e se o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TACTH) influenciou tais níveis. Investigamos, também, se pacientes com controle glicêmico sem uso de insulina, avaliados 12 meses após o transplante, apresentavam níveis de marcadores de oxidação e de atividade antioxidante diferentes daqueles que se encontravam em uso de insulina exógena. De fato, observamos que os pacientes com DM1 apresentavam, nas primeiras semanas após o diagnóstico, aumento dos níveis séricos de glutathione reduzida (GSH) e de isoprostano e redução dos níveis de vitamina E (tocoferol), quando comparados com pacientes não-diabéticos. Além disso, detectamos que 12 meses após o TACTH, os pacientes diabéticos mantinham os níveis de GSH e isoprostano elevados, e de outros marcadores de estresse oxidativo e atividade antioxidante inalterados. Tais resultados sugerem que o TACTH não influencia o balanço final do estresse oxidativo, embora promova aumento dos níveis de peptídeo-C e decréscimo dos níveis de hemoglobina glicada (HbA1C) e de insulina exógena usados pelos pacientes.

Em nosso estudo, usamos como marcadores de estresse oxidativo o isoprostano e o malonaldeído (MDA), e como marcadores de atividade antioxidante a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione reduzida (GSH), e o tocoferol.

Diversos estudos reforçam que no organismo dos indivíduos com diabetes ocorrem mais reações oxidativas do que no organismo dos indivíduos saudáveis (JAIN SK, *et al*, 1990; BLOCH-DAMTI A, BASHAN N, 2001; RAINS JL, JAIN SK, 2011). A literatura demonstra que o aumento do estresse oxidativo acontece tanto no início, como no decorrer do desenvolvimento do diabetes (MARTIN-GALAN P, *et al*, 2005), portanto está relacionado com a duração da doença e com a eficácia do controle glicêmico (DAVÌ G, *et al*, 2003; HSU WT, *et al*, 2006). Assim, indivíduos portadores de diabetes possuem aumento da geração de radicais livres com consumo dos níveis de antioxidantes circulantes (RAINS JL, JAIN SK, 2011). Tais evidências corroboram nossos achados, mostrando que

alterações de estresse oxidativo podem estar presentes já nas fases iniciais após o diagnóstico da doença.

Resultados de alguns estudos clínicos e experimentais têm sugerido que o processo de peroxidação lipídica é ativado durante diferentes estágios do DM1, e até em sua forma subclínica (DALLE-DONE I, *et al*, 2006; KRZYTEK-KORPACKA M, *et al*, 2008; TAKAYANAGI R, INOUCHI T, OHNAGA K, 2011). O grau de peroxidação lipídica nos eritrócitos é diretamente proporcional à concentração de glicose *in vitro* (JAIN SK, 1989) e à concentração de hemoglobina glicada (JAIN SK, *et al*, 1989). Adicionalmente, o aumento da peroxidação lipídica pode ser amenizado após o controle glicêmico com o uso da insulina, em ratos. Nesse sentido, a hiperglicemia é um dos fatores que mais contribui para o estresse oxidativo em indivíduos com DM1 (RAINS JL, JAIN SK, 2011).

Em nosso estudo, não encontramos diferenças nos níveis dos marcadores de estresse oxidativo, aos 12 meses após o transplante, entre os pacientes que se encontravam, ou não, em uso de insulina exógena. Notamos somente menores valores de tocoferol, em relação ao grupo controle, nos pacientes diabéticos não-respondedores, que usavam insulina aos 12 meses pós-transplante. Acreditamos que essa ausência de diferenças significativas dentro do grupo diabético deva-se ao pequeno número de pacientes incluídos e, principalmente, porque, mesmo sob uso de insulina, os pacientes apresentavam níveis glicêmicos controlados no momento da avaliação. A hipótese fica ainda mais evidente quando observamos que somente dois pacientes do grupo não-respondedores apresentavam níveis de hemoglobina glicada acima de 8,0 aos 12 meses pós-transplante, indicando que o controle glicêmico foi eficaz. Por outro lado, o estresse oxidativo é considerado um importante fator de risco no aparecimento e na progressão do diabetes, relacionando a hiperglicemia como contribuinte para a progressão e manutenção desse evento. Portanto, uma vez que se consegue o controle glicêmico, há a redução da formação de espécies reativas de oxigênio e o controle desse estado redox passa a ser restabelecido (RAINS JL, JAIN SK, 2011).

Observamos maior concentração do marcador de estresse oxidativo isoprostano nos pacientes com DM1 tanto no momento pré, como 12 meses pós-transplante, porém, os valores de MDA mantiveram-se inalterados em ambos os momentos quando comparados ao grupo controle. Nesse mesmo sentido, Vessby J, *et al*. (2002) não encontraram diferenças dos níveis de MDA entre indivíduos com

DM1 em uso de insulina exógena e grupo controle. Por outro lado, Dominguez C, *et al.* (1998) observaram que indivíduos portadores de DM1 apresentavam, tanto ao diagnóstico, quanto ao longo do tratamento, maior concentração dos níveis de MDA do que em controles não-diabéticos. Esse foi o primeiro estudo a demonstrar concentrações elevadas de MDA no início do DM1 clínico, e na normalização do controle metabólico, sugerindo que os radicais livres possuem seu efeito tóxico já em estágios precoces da doença. Ainda nesse sentido, outros autores, que analisaram marcadores de oxidação em crianças obesas, em pacientes com DM1 e em um grupo controle, encontraram que os níveis de MDA estavam superiores nos pacientes com DM1 quando comparados àqueles dos demais grupos (CODONER-FRANCH P, *et al.*, 2010). Assim, questionamos se, no grupo de não-respondedores, o procedimento do TACTH poderia, por mecanismos diferentes daqueles associados ao DM1, contribuir para uma piora dos níveis de estresse oxidativo e, assim, determinar o descontrole glicêmico e aumento das necessidades de insulina. Entretanto, tal argumentação não explica porque, ao dividirmos os pacientes em respondedores ou não-respondedores, ambos os grupos apresentam níveis de MDA similares, pré e 12 meses pós-transplante. Mais uma vez, o pequeno número de pacientes incluídos pode ter prejudicado a análise. Acreditamos, além disso, que mais de um mecanismo esteja contribuindo para o desequilíbrio do estresse oxidativo.

Quando analisamos a capacidade antioxidante dos pacientes diabéticos, pelo marcador GSH, percebemos que seus níveis estão aumentados nos pacientes com DM1 já antes do transplante, e que isso permanece 12 meses depois. Níveis de GSH em pacientes com DM1 já foram dosados em estudos prévios, com resultados distintos do presente estudo. Crianças chinesas com DM1 que estavam em terapia insulínica, tenderam a apresentar níveis reduzidos de GSH, quando comparados com crianças chinesas saudáveis (HSU WT, *et al.*, 2006). Em outro estudo, níveis de GSH de indivíduos do sexo feminino com DM1 em fase reprodutiva puberal, encontravam-se menores do que os níveis dos indivíduos controles (KOLESNIKOVA LI, *et al.*, 2015). Níveis de GSH encontravam-se abaixo do normal desde o início da doença e ao longo do seguimento de crianças com DM1, sugerindo que a hiperglicemia crônica aumenta a formação de radicais livres, levando ao aumento da oxidação e, portanto, à depleção do GSH (DOMÍNGUEZ C, *et al.*, 1998). Esse dado não vai ao encontro do achado no presente estudo onde

níveis de GSH permaneceram elevados mesmo quando os pacientes encontravam-se metabolicamente controlados. Por outro lado, nossos dados sugerem a existência da atividade antioxidante já antes do transplante, provavelmente devido à doença de base, o DM1, que naturalmente aumenta a produção de radicais livres. Os níveis elevados de GSH nos pacientes com DM1 podem refletir uma tentativa endógena de restabelecer o balanço redox rompido tanto pelo DM1 como por outras condições, como o próprio transplante.

Outro marcador da atividade antioxidante, a SOD, permaneceu inalterada tanto no momento pré como 12 meses após o transplante, sugerindo que o DM1 não ativou a via de defesa gerada pela SOD e que, adicionalmente, o procedimento do transplante também não aumentou a necessidade da geração desse antioxidante. Em contraposição aos nossos resultados, níveis de SOD aumentados foram encontrados em crianças diabéticas tanto ao diagnóstico quanto durante o acompanhamento de longo prazo (DOMÍNGUEZ C, *et al*, 1998). Outros autores ainda observaram que, a partir do diagnóstico, a concentração de SOD decrescia progressivamente, porém, sem diferença estatística. Em concordância com o estudo citado acima, níveis de SOD foram dosados em crianças e adolescentes divididos em três grupos (indivíduos com DM1, irmãos desses indivíduos com DM1 e indivíduos saudáveis de famílias não-diabéticas). Níveis de SOD encontravam-se aumentados no grupo controle quando comparados aos grupos de indivíduos portadores de DM1 e aos irmãos de indivíduos portadores de DM1 (SALMONOWICZ B, *et al*, 2014). Em contrapartida, outro estudo encontrou menores níveis de SOD nos indivíduos do grupo controle quando comparados àqueles de indivíduos portadores de DM1, porém sem diferença estatística (KOLESNIKOVA LI, *et al*, 2015).

Já a vitamina E (tocoferol) encontrou-se reduzida tanto no momento pré, como 12 meses após o transplante. Esses achados podem sugerir que, já na fase inicial da doença, os pacientes com DM1 produzam altos níveis de radicais livres que não são combatidos pela concentração tocoferol circulante e, ainda, que esse estado é piorado com o transplante, reduzindo ainda mais a concentração de tocoferol aos 12 meses pós-transplante. Vale ressaltar aqui, que o tocoferol é um antioxidante não-enzimático e adquirido a partir do consumo de alimentos ricos em vitamina E, e possui valores de referências (18 – 29 $\mu\text{mol}/\text{dia}$) (DONALD S, YOUNG MB, 1987). Esse dado poderia indicar que os pacientes com DM1 submetidos ao

TACTH não ingerem quantidades suficientes de vitamina E. Em nosso estudo, a maioria dos pacientes referiu ingerir dieta rica em frutas, verduras e legumes, tanto antes como depois do transplante. Entretanto, a ausência de uma avaliação nutricional mais específica e detalhada não nos permitiu verificar tal informação. Nesse mesmo sentido, outro estudo apontou para a maior concentração de tocoferol nos indivíduos do grupo controle quando comparados com os diabéticos, independente da fase em que se encontravam (puberal, adolescente ou juvenil). Entretanto, o estudo não avaliou se os níveis de tocoferol alteravam entre as fases de maior e menor controle e o descontrole metabólico dos pacientes com DM1 (KOLESNIKOVA LI, *et al*, 2015). Por outro lado, Hsu, *et al*, (2006) encontraram níveis desse marcador aumentados apenas quando os pacientes com DM1 estavam descompensados ($HbA1C >8,5$). Há ainda achados de que indivíduos diabéticos insulinizados possuem maior concentração de tocoferol quando comparados ao grupo controle, porém sem diferença estatística (ASAYAMA K, *et al*, 1993). Assim, as informações acerca dos níveis de tocoferol nos pacientes com DM1 são bastante variáveis na literatura, sugerindo que outros fatores, além do DM1, possam influenciar essas medidas.

Em conjunto, as análises indicam que ocorre um aumento dos mecanismos pró-oxidantes tanto ao diagnóstico de DM1, como após o transplante. Observamos o aumento de GSH como uma resposta endógena a esse desequilíbrio, porém, como não foi acompanhado por outros mecanismos antioxidantes, como aumento dos níveis de tocoferol e de SOD, é possível que o balanço final tenha sido pró-oxidante e, portanto, deletério para o paciente. Seguimento de longo prazo desse grupo de pacientes transplantados poderá definir se o procedimento afeta, positiva ou negativamente, os efeitos tardios do DM1, em grande parte mediados pelo estresse oxidativo.

A seguir, tentamos avaliar se o perfil do estresse oxidativo encontrava-se diferente entre pacientes que haviam e que não haviam respondido ao transplante. Ao compararmos os pacientes subdivididos em respondedores e não-respondedores, observamos uma maior concentração de isoprostano no momento pré-transplante no subgrupo de não-respondedores e maior concentração desse marcador tanto no momento pré, como 12 meses pós-transplante no subgrupo dos respondedores. Isso nos sugere que esses pacientes, antes do transplante, já possuem o desequilíbrio redox marcado pela presença, em maior concentração, do

isoprostano, e que o fato deles terem ficado livres do uso de insulina exógena, 12 meses após o transplante, piorou o quadro do estresse oxidativo.

Contribuindo para tais dados, observamos que os níveis de GSH mantêm-se elevados em ambos os subgrupos do nosso estudo e em ambos os momentos (pré e pós-transplante). Isso sugere que a atividade antioxidante desses pacientes, não foi alterada em diferentes condições metabólicas. Os níveis de GSH encontravam-se elevados no momento pré-transplante, em que os pacientes estavam metabolicamente controlados com o uso de insulina, e esses níveis permaneceram aos 12 meses após o transplante, quando os pacientes encontravam-se ou não em uso de insulina. Ou seja, níveis de GSH permaneceram elevados em qualquer fase do presente estudo. Esses resultados discordam de evidências de literatura que mostram uma correlação negativa entre níveis de GSH e HbA1C (SEGHROUCHNI I, *et al*, 2002), reforçando a hipótese de que o transplante, ou condições a ele associadas, poderiam ter contribuído para piorar os níveis de estresse oxidativo.

A literatura demonstra associações entre controle glicêmico e níveis de estresse oxidativo. Um estudo dividiu pacientes diabéticos de acordo com a duração do tratamento insulínico – em mais ou menos 10 anos – observando que os níveis da enzima SOD aumentavam conforme a doença evoluía, sugerindo que os pacientes insulinizados permaneceriam mais protegidos contra o estresse oxidativo (SEGHROUCHNI I, *et al*, 2002). No nosso estudo, embora o tempo de seguimento tenha sido curto, de apenas um ano pós-diagnóstico, observamos que os níveis de SOD apresentavam-se significativamente menores do que os controles após o transplante. Possíveis mecanismos para tal desfecho poderiam ser efeitos tardios dos quimioterápicos usados durante o transplante (VASCONCELOS SML, *et al*, 2007), ou mesmo restrições dietéticas excessivas (AGNELLO E, *et al*, 2012; VICTOR VM, *et al*, 2014) praticadas pelos pacientes após o transplante, na tentativa de manter o controle glicêmico através do reduzido aporte calórico, em vigência de quantidades limítrofes de insulina endógena.

Embora tenhamos nos empenhado em avaliar de modo completo o estresse oxidativo dos pacientes com DM1 tratados com TACTH, algumas limitações mostraram-se evidentes ao longo do estudo. A ideia inicial da pesquisa visava determinar os níveis séricos de TBARS e tocoferol como marcadores do estresse oxidativo e da capacidade antioxidante, respectivamente. Entretanto, a literatura aponta para diversos outros marcadores que, em conjunto, avaliam o

balanço oxidativo de forma mais completa (DOMINGUEZ C, *et al*, 1998; SEGHTROUCHNI I, *et al*, 2002; CODONER-FRANCH P, *et al*, 2010). Então, resolvemos incluir outros marcadores do estresse oxidativo, como MDA e isoprostano, e outros marcadores da capacidade antioxidante como GSH, SOD, catalase e tocoferol, dessa forma ampliando nossas análises visando permitir uma melhor interpretação para nossos resultados.

Uma das maiores limitações para nosso estudo foi a baixa disponibilidade de amostras biológicas disponíveis, tanto em relação a volume, como em variedade. Nos pacientes transplantados, a natureza retrospectiva do estudo impediu a obtenção de maior número de amostras. No grupo controle, houve grande resistência dos voluntários em conseguir a coleta de amostras, principalmente entre os indivíduos com menos de 18 anos. Esses eventos provocaram, em primeiro lugar, discrepâncias de idade e sexo entre os grupos controle e experimental. Em segundo lugar, foi preciso restringir as análises às amostras de soro, uma vez que outros materiais como DNA, RNA ou, mesmo, células criopreservadas, apresentavam-se em quantidade insuficiente. Dessa forma, deixamos de avaliar a expressão de genes associados com o metabolismo oxidativo, e de possíveis alterações epigenéticas determinadas pelo transplante.

Outra limitação foi a natureza retrospectiva do estudo, limitando não somente a disponibilidade das amostras, mas também de informações mais detalhadas relacionadas aos hábitos nutricionais, sociais e de atividades físicas dos pacientes. Sabe-se que as fontes exógenas para a formação de espécies reativas (radicais livres) são os raios ultravioletas, a radiação ionizante, quimioterápicos e xenobióticos (VASCONCELOS SML, *et al*, 2007). Portanto análises de associação com marcadores de estresse oxidativo com os quimioterápicos utilizados no protocolo do transplante deveriam ser efetuadas e analisadas. Ainda nesse sentido, a defesa antioxidante, também deriva, também, de um sistema não-enzimático, que sofre alterações principalmente através do consumo alimentar (HUGUENIN GVB, *et al*, 2015), portanto acompanhamento nutricional baseado no consumo alimentar seria fundamental para evitar vieses referentes à alimentação. Por outro lado, trata-se de um estudo inédito, que ao avaliar os efeitos do TACTH sobre o estresse oxidativo dos pacientes DM1, fornece subsídios para futuras expectativas e intervenções junto ao protocolo de transplante.

Como os níveis de estresse oxidativo correlacionam-se diretamente à incidência e gravidade das complicações crônicas determinadas pelo diabetes, acreditamos que um adequado controle desse aspecto metabólico possa influenciar o desfecho clínico dos pacientes, em longo prazo. Entretanto, como não observamos melhora dos níveis de estresse oxidativo após o TACTH, podendo, mesmo, terem aumentado em decorrência do procedimento, questionamos se não seria benéfico repor agentes antioxidantes durante o TACTH, visando obter maior equilíbrio entre as reações de redução e oxidação. Antes de atingir tal grau de intervenção, entretanto, é necessário definir o quanto o procedimento do transplante contribui para esse desequilíbrio do estresse oxidativo e, adicionalmente, se outros estímulos participam dessa reação.

Para o futuro, estudos mais bem controlados, prospectivos, com maior número de pacientes e amostras biológicas, e com maior duração do acompanhamento clínico-laboratorial poderiam esclarecer as dúvidas pendentes. Desse modo, para contornar algumas das limitações observadas no presente estudo, propomos aplicação de recordatórios alimentares minuciosos, registro detalhado da prática de atividades físicas a partir de questionários pré-estabelecidos, e coleta de amostras biológicas em outros momentos após o transplante visando caracterizar e, se possível, quantificar a contribuição de cada fator sobre o estresse oxidativo.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Aos 12 meses pós-transplante, os pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1) submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TACTH) recuperaram seu peso, preservaram parcialmente a produção de insulina endógena, marcada pelo aumento dos níveis de peptídeo-C, e restabeleceram controle metabólico, aferido pelos níveis de hemoglobina glicada (HbA1C).
- Pacientes com DM1 recém-diagnosticado apresentaram perfil de estresse oxidativo marcado pelo aumento de isoprostano. Em relação à capacidade da atividade antioxidante, os pacientes apresentaram aumento da glutathiona reduzida (GSH) e redução do tocoferol.
- Aos 12 meses após o TACTH, os níveis de estresse oxidativo permaneceram alterados, marcado pelo aumento do isoprostano, quando comparados ao grupo controle. E a atividade antioxidante, marcada pelos níveis de tocoferol permaneceu inferior ao estabelecido como valor de referência, quando comparados ao grupo controle. E os níveis de GSH aumentados quando comparados tanto com o grupo controle como com grupo experimental no momento pré-transplante.
- Aos 12 meses pós-transplante, mesmo melhorando o controle metabólico dos pacientes com DM1, ora associa-se a piora do balanço redox, com o aumento dos níveis de isoprostano, ora mantém aumentada a produção de antioxidantes, mantendo uma atividade de defesa, marcada pelo aumento dos níveis de GSH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGNELLO E, MALFI G, CONSTANTINO AM, MASSARENTI P, PUGLIESE M, FORTUNATI N, CATALANO MG, PALMO A. Tumor necrosis factor alpha and oxidative stress as maintaining factors in the evolution of anorexia nervosa. **Eat Weight Disord**, 17(3): 194-199, 2014.
2. ALBERTI KGMM, ZIMMET PZ, for the WHO Consultation. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Provisional Report of a WHO Consultation. **Diabet Med**, 15:539-553, 1999.
3. AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION: dietary guidance for healthy children ages 2 to 11 years. **J Am Diet Assoc**, 104: 660-77, 2004.
4. ASAYAMA K, UCHIDA N, NAKANE T, HAYASHIBE H, DOBASHI K, AMEMIYA S, KATO K, NAKAZAWA S. Antioxidantes in serum of children with insulin-dependent diabetes mellitus. **Free Radic Biol Med**. 15: 597-602, 1993.
5. BARBOSA KBF, COSTA NMB, ALFENAS RCG, DE PAULA SO, MINIM VPR, BRESSAN J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev Nutr**, 23(4): 629-643, 2010.
6. BARCLAY A, GILBERTSON H, MARSH K, SMART C. Dietary management in diabetes. **Aust Fam Physician**, 39(8): 579-83, 2010.
7. BARREIROS ALBS, DAVID JM, DAVID JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, 29(1): 113-123, 2006.
8. BATTAGLIA M, RONCAROLO MG. Immune intervention with T regulatory cells: past lessons and future perspectives for type 1 diabetes. **Seminars in Immunology**, 23: 182-194, 2011.
9. BENZIE IF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **Int J Food Sci Nutr**, 47(3): 233-61, 1996.
10. BLOCH-DAMTI A, BASHAN N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, 7(11 & 12): 1553-1567, 2005.
11. BOSI PL, CARVALHO, AM, *et al.* Prevalência de diabetes melito e tolerância à glicose diminuída na população urbana de 30 a 79 anos da cidade de São Carlos, São Paulo. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 53(6), 2009.
12. BRAZEAU AS, MIRCESCU H, DESJARDINS K, LEROUX C, STRYCHAR I, EKOÉ JM, RABASA-LHORET R. Carbohydrate counting accuracy and blood glucose variability in adults with type 1 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**, 99(1): 19-23, 2013.

13. BROWNLEE M. Glycation and diabetic complications. **Diabetes**, 43(6): 836-41, 1994.
14. CAMPOS JJB, ALMEIDA HGG, IOCHIDA LC, FRANCO LJ. Incidência de diabetes mellitus insulín dependente (tipo 1) na cidade de Londrina, PR, Brasil. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 42(1): 36-44, 1998.
15. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Youth risk behavior surveillance – United States, 2011. **MMWR Surveill Summ**, 61(1): 1-162, 2012.
16. CHIMEN M, KENNEDY A, NIRANTHARAKUMAR K, PANG TT, ANDREWS R, NARENDHAN P. What are the healthy benefits of physical activity in type 1 diabetes mellitus? A literature review. **Diabetologia**, 55(3): 542-51, 2012.
17. CHUDHARY P. Review of dietary recommendation for diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 65S: 9S-15S, 2004.
18. CODONER-FRANCH P, PONS-MORALES S, BOIX-GARCÍA L, VALLS-BALLÉS V. Oxidant/antioxidant status in obese children compared to pediatric patients with type 1 diabetes mellitus. **Pediatric Diabetes**, 11: 251-257, 2010.
19. COURI CEB, OLIVEIRA MCB, STRACIERI ABPL, MORAES DA, PIERONI F, BARROS GMN, MADEIRA MIA, MALMEGRIM KCR, FOSS-FREITAS MC, SIMÕES BP, MARTINEZ EZ, FOSS MC, BURT RK, VOLTARELLI JC. C-peptide levels and insulin Independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. **JAMA**, 301(15): 1573-1579, 2009.
20. CUENCA-GARCÍA M, JAGO R, SHIELD JP, BURREN CP. How does physical activity and fitness influence glycaemic control in young people with type 1 diabetes? **Diabet Med**, 29: e369-e376, 2010.
21. DALLE-DONNE I, ROSSI R, COLOMBO R, GIUSTARINI D, MILZANI A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clinical Chemistry**, 52(4): 601-623, 2006.
22. DAVÌ G, CHIARELLI F, SANTILLI F, POMILIO M, VIGNERI S, FALCO A, BASILI S, CIABATTONO G, PATRONO C. Enhanced lipid peroxidation and platelet activation in the early phase of type 1 diabetes mellitus. Role of interleukin-6 and disease duration. **Circulation**, 107, 2003.
Disponível em: <http://circ.ahajournals.org>
23. DIAS VM, PANDINI JA, NUNES RR, SPERANDEI SLM, PORTELLA ES, COBAS RA, GOMES MB. Effect of the carbohydrate counting method on glycemic control in patients with type 1 diabetes. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, 2(54): 1-7, 2010.
24. DIB SA, TSCHIEDEL B, NERY M. Diabetes melito tipo 1: da pesquisa à clínica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 52(2): 143-45, 2008.

25. DOMÍNGUEZ C, RUIZ E, GUSSINYE M, CARRASCOSA A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. **Diabetes Care** 21: 1736-1742, 1998.
26. DONALD S, YOUNG MB. Implementation of SI units for clinical laboratory data. Style specifications and conversion tables. **Annals of Internal Medicine**, 106: 114-129, 1987.
27. DPT-1 Study Group: Diabetes in America, 2nd Ed. Bethesda: **National Institutes of Health**, 1995.
28. DREWS G, KRIPPIT-DREWS P, DÜFER M. Oxidative stress and beta-cell dysfunction. **Pflugers Arch – Eur J Physiol**, 460: 703-718, 2010.
29. ERCIYAS F, TANELI F, ARSLAN B, USLU Y. Glycemic control, oxidative stress, and lipid profile in children with type 1 diabetes mellitus. **Arch Med Res**, 35: 134-40, 2004.
30. EUROPEAN RANDOMIZED TRIAL GROUP. Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention. **Diabetes**, 37: 1574-82, 1988.
31. FABIANEK J, DEFILIPPI J, RICKARDS T. Micromethod for tocopherol determination in blood serum. **Clinical Chemistry**, 14(5), 1968.
32. FERREIRA SRG, FRANCO LJ, VIVOLO MA, NEGRATO CA, SIMOES ACP, VENTURELLI CR. Population-based incidence of IDDM in the state of São Paulo, Brazil. **Diabetes Care**, 16(5): 701-704, 1993.
33. FRANCO LJ, MAMERI C, PAGLIARO H, IOCHIDA LC, GOLDENBERG C. Diabetes como causa básica ou associada de morte no estado de São Paulo, 1992. **Rev. Saúde Pública**, 32(3): 237-45, 1998.
34. GERARD-MONNIER D, ERDELMEIER I, REGNARD K, MOZE-HENRY N, YADAN JC, CHAUDIERE J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. **Chem Res Toxicol**, 11(10):1176-83, 1998.
35. GLEISNER A, MARTINEZ L, PINO R, ROJAS IG, MARTINEZ A, ASENJO S, RUDOLPH MI. Oxidative stress markers in plasma and urine of prepubertal patients with type 1 diabetes mellitus. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, 19(8): 995-1000, 2006.
36. GREEN A, GALE EA, PATTERSON CC. Incidence of childhood-onset insulin-dependent diabetes mellitus: the EURODIABACE Study. **Lancet**, 399(8798): 905-9, 1992.
37. GRIESMACHER A, KINDHAUSER M, ANDERT SE, SCHREINER W, TOMA C, KNOEBL P, PIETSCHMANN P, PRAGER R, SCHNACK C, SCHERNTHANER

G, *et al.* Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. **Am J Med**, 98(5): 469-75, 1995.

38. GUYTON AC. Endocrinologia e Reprodução. In: Guyton AC. **Fisiologia Humana**. Ed. Guanabara Koogan, 6ª ed, 455-483, 1988.
39. HAMERSCHLAK N, RODRIGUES M, MORAES DA, *et al.*. Brazilian experience with two conditioning regimens in patients with multiple sclerosis: BEAM/horse ATG and CY/rabbit ATG. **Bone Marrow Transplantation**, 45(2): 239-48, 2010.
40. HIRSH IB, BODE BW, GARG S, SUSSMAN A, HU P, SANTIAGO OM, KOLACZYNSKI JW. Continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) of insulin aspart versus multiple daily injection of insulin aspart/insulin glargine in type 1 Diabetic patients previously treated CSII. **Diabetes Care**, 28(3): 533-38, 2005.
41. HUGUENIN GVB, OLIVEIRA GMM, MOREIRA ASB, SAINT'PIERRE TD, GONÇALVES RA, PINHEIRO-MULDER AR, TEODORO AJ, LUIZ RR, ROSA G. Improvement of antioxidant status after Brazil nut intake in hypertensive and dyslipidemic subjects. **Nutrition Journal**, 15(54), 2015.
42. HSU WT, TSAI LY, LIN SK, HSIAO JK, CHEN BH. Effects of diabetes and glycemic control on free radicals in children with type 1 diabetes mellitus. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, 36(2): 174-178, 2006.
43. JAIN SK. Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. **J Biol Chem**, 264(35): 21340-21345, 1989.
44. JAIN SK, LEVINE SN, DUETT J, HOLLIER B. Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin-treated diabetic rats. **Metabolism**, 39(9): 971-975, 1990.
45. JAIN SK, MCVIE R, DUETT J, HERBST JJ. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. **Diabetes**, 38(12): 1539-1543, 1989.
46. KARVONEN M, VIK-KAJANDER M, MOLTCHANOVA E, LIBMAN I, LAPORTE R, TUOMILEHTO J. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. **Diabetes Care**, 23(10):1516-1526, 2000.
47. KAVEY REW, ALLADA V, DANIELS SR, HAYMAN LL, MCCRINDLE BW, NEWBURGUER JW, PAREKH RS, STEINBERGUER J. Cardiovascular Risk Reduction in High-Risk Pediatric Patients. **American Heart Association**, 114:2710-38, 2006.
48. KOLESNIKOVA LI, DARENSKAYA MA, SEMENOVA NV, GREBENKINA LA, SUTURINA LV, DOLGIKH MI, GNUSINA SV. Lipid peroxidation and antioxidant protection in girls with type 1 diabetes mellitus during reproductive system development. **Medicina**, 51: 107-111, 2015.
Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>

49. KNIP M, VEIJOLA R, VIRTANEN SM, HYOTY H, VAARALA O, AKERBLÖM HK. Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. **Diabetes**, 54(2): S125-S136, 2005.
50. KRZYSZEK-KOSPAKKA M, SALMONOWICZ B, BOEHM D, BERDOWSKA I, ZIELINSKI B, PATRYN E, NOCZYNSKA A, GAMIAN A. Diagnostic potential of oxidative stress markers in children and adolescents with type 1 diabetes. **Clinical Biochemistry**, 41: 48-55, 2008.
Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>
51. LACHIN JM, GENUTH S, NATHAN DM, ZINMAN B, RUTLEDGE BN. DCCT/EDIC RESEARCH GROUP. Effect of glycemic exposure on the risk of microvascular complications in the diabetes control and complications trials – revisited. **Diabetes**, 57(4): 1298-306, 2008.
52. LEITE SAO, ZANIM LM, GRANZOTTO PCD, HEUPA S, LAMOUNIER RN. Pontos básicos de um programa de educação ao paciente com diabetes melito tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 52(2): 233-242, 2008.
53. LIMA ES, ABDALLA DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Rev Bras Cien Farm**, 37(3), set-dez, 2001.
54. LOTTENBERG AMP. Características da dieta nas diferentes fases da evolução do diabetes melito tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 52(2): 250-59, 2008.
55. LUKÁCS A, MAYER K, JUHÁSZ E, VARGA B, FODOR B, BARKAI L. Reduced physical fitness in children and adolescents with type 1 diabetes. **Pediatr Diabetes**, 13: 432-37, 2012.
56. MADSBAD S. Prevalence of residual B cell function and its metabolic consequences in Type 1 (insulin-dependent) diabetes. **[Journal Article] Diabetologia**. 24(3): 141-7, 1983.
57. MAFFEIS C, PINELLI L. Teaching children with diabetes about adequate dietary choices. **British Journal of Nutrition**. 99(1): S33-S39, 2008.
58. MALERBI D, DAMIANI D, RASSI N, CHACRA AR, NICLEWICZ EDA, DA SILVA FILHO RL, DIB SA. Posição de consenso da Sociedade Brasileira de Diabetes – Insulinoterapia intensiva e terapêuticas com bomba de insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 50(1): 123-35, 2006.
59. MALERBI DA, FRANCO LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. **Diabetes Care**, 15(11): 1509-1516, 1992.
60. MARTÍN-GALLÁN P, CARRASCOSA A, GUSSINYE M, DOMÍNGUEZ C. Estimation of lipoperoxidative damage and antioxidant status in diabetic children: relationship with individual antioxidants. **Free Radic Res**, 39(9): 933-942, 2005.

61. MEHTA SN, QUINN N, VOLKENING LK, LAFFEL LMB. Impacto f carbohydrate counting on glycemic control in children with type 1 diabetes. **Diabetes Care**, 32(6): 1014-16, 2009.
62. MELO MS, LOLIO CA, LUCENA MAF, KIRZNER CF, MARTINS SM, BARROS MNDS. Causas múltiplas de morte em diabéticos no município de Recife. **Rev. Saúde Pública**, 25(6): 432-35, 1991.
63. MICHALISZYN SF, SHAIBI GQ, QUINN L, FRITSCHI C, FAULKNER MS. Phsysical fitness, dietary intake ans metabolic control in adolescentes with tipe 1 diabetes. **Pediatr Diabetes**, 10(6): 386-394, 2009.
64. MULLARKEY CJ, EDELSTEIN D, BROWNLEE M. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. **Biochem Biophys Res Commun**, 173(3): 932-9, 1990.
65. MURAKAMI K, KONDO T, OHTSUKA Y, FUJIWARA Y, SHIMADA M, KAWAKAMI Y. Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. **Metabolism**, 38(8): 753-8, 1989.
66. MYLONA-KARAYANNI C, GOURGIOTIS D, BOSSIOS A, KAMPER EF. Oxidative stress and adhesion molecules in children with type 1 diabetes mellitus: a possible link. **Pediatric Diabetes**, 7: 51-59, 2006.
67. NADEAU KJ, REGENSTEINER JG, BAUER TA, *et al.* Insulin resistance in adolescentes with type 1 diabetes and its relationship to cardiovascular function. **J Clin Endocrinol Metab**, 95: 513-21, 2010.
68. NOTKINS AL, LERNMARK A. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. **Journal of Clinical Investigation**, 108 (9): 1247-1252, 2001.
69. PALMER JP, FLEMING GA, GREENBAUM CJ, HEROLD KC, JANSALD, KOLB H, LACHIN JM, POLONSKY KS, POZZILLI P, SKYLER JS, STEFFES MW. C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function: report of an ADA workshop, 21-22 October 2001. **Diabetes**, 53: 250-264, 2004.
70. PIRES AC, CHACRA AR. Evolução da insulinoaterapia do diabetes melito tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 52(2): 268-78, 2008.
71. QUEIROZ KC, SILVA IN, ALFENAS RCG. Associação entre fatores nutricionais e o controle glicêmico de crianças e adolescents com diabetes melito tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 54(3): 319-25, 2010.
72. RACHMIEL M, BUCCINO J, DANEMAN D. Exercise and type 1 diabetes mellitus youth: review and recommendations. **Pediatric Endocrinol Rev**, 5(2): 656-65, 2007.

73. RAINS JL, JAIN SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radic Biol Med**, 50: 567-575, 2011.
74. RODACKI M, MILECH A, DE OLIVEIRA JEP. A secreção residual do peptide C faz diferença no tratamento do diabetes melito tipo 1? **Arq Bras Endocrinol Metab**, 52(2): 322-33, 2008.
75. ROSEN P, NAWROTH PP, KING G, MOLLER W, TRITSCHLER HJ, PACKER L. Te role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. **Diabetes Metab Res Rev**, 17: 189-212, 2001.
76. SALMONOWICZ B, KRZYTEK-KORPACKA M, NOCZYNSKA A. Trace elements, magnesium and the efficacy of antioxidant system in children with type 1 diabetes mellitus and in their siblings. **Adv Clin Exp Med**, 23(2): 259-268, 2014.
77. SCHAFER FQ, BUETTNER GR. Redox environment of the cells as viewed through the redox state of the glutathione. **Free Radic Biol Med**, 30(11): 1191-212, 2001.
78. SCHNEIDER C. An update on products and mechanisms of lipid peroxidation. **Mol Nutr Food Res**, 53:315-21, 2009.
79. SEDLACK J, LINDSAY RH. Estimation of total, protein-bound, and non protein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.
80. SEGHROUCHNI I, DRAI J, BANNIER E, RIVIERE J, CALMARD P, GARCIA I, ORGIAZZI J, REVOL A. Oxidative stress parameters in type I and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. **Clinica Chimica Acta**, 321: 89-96, 2002.
81. SHAMIR R, KASSIS H, KAPLAN M, NAVEH T, SHEHADEH N. Glycemic control in adolescents with type 1 diabetes mellitus improves lipid serum levels and oxidative stress. **Pediatric Diabetes**, 9: 104-09, 2008.
82. SHAPIRO AM, RICORDI C, HERING BJ, AUCHINCLOSS H, LINDBLAD R, ROBERTSON RP, SECCHI A, BRENDEN MD, BERNEY T, BRENNAN DC, CAGLIERO E, ALEJANDRO R, RYAN EA, DIMERCURIO B, MOREL P, POLONSKY KS, REEMS JA, BRETZEL RG, BERTUZZI F, FROUD T, KANDASWAMY R, LAKEY JR. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. **New England Journal of Medicine**, 355 (13): 1318-1330, 2006.
83. SIES H. Role of reative oxygen species in biological processes. **Klin Wochenschr**, 69 (21-23): 965-968, 1991.

84. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diabetes na imprensa: diabetes já atinge um milhão de crianças no Brasil, 2014.
Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/diabetes-na-imprensa/diabetes-ja-atinge-um-milhao-de-criancas-no-brasil>
85. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Revisão sobre análogos de insulina. Indicações e recomendações para a disponibilização pelos serviços públicos de saúde, 2011.
Disponível em: formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/13863/2160950_109700.pdf
86. SRIKANTA S, GANDA OP, EISENBARTH GS, SOELDNER JS. Islet-cell antibodies and beta-cell function in monozygotic triplets and twins initially discordant for Type I diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**. 308 (6): 322-5, 1983.
87. TAKAYANAGI R, INOUCHI T, OHNAKA K. Clinical and experimental evidence for oxidative stress as an exacerbating factor of diabetes mellitus. **J Clin Biochem Nutr**, 48 (1): 72-77, 2011.
88. TANDON A. Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects. **Indian J Endocrinol Metab**, 19(1): S39-S43, 2015.
89. VANNUCCHI H, MOREIRA EAM, CUNHA DF, JUNQUEIRA-FRANCO MVM, BERNARDES MM, JORDÃO JR AA. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Med Ribeirão Preto**, 31: 31-44, 1998.
90. VARVAROVSKA J, RACEK J, STETINA R, *et al.* Aspects of oxidative stress in children with type 1 diabetes mellitus. **Biomed Pharmacother**, 58: 539-45, 2004.
91. VASCONCELOS SML, GOULART MOF, MOURA JBF, MANFREDINI V, BENFATO MS, KUBOTA LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova**, 30(5): 1323-38, 2007.
92. VESSBY J, BASU S, MOHSEN R, BERNE C, VESSBY B. Oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus. **Journal of Internal Medicine**, 251: 69-76, 2002.
93. VICTOR VM, ROVIRA-LLOPIS S, SAIZ-ALARCON V, SANGÜESA MC, ROJO-BOFILL L, BAÑULS C, FALCÓN R, CASTELLÓ R, ROJO L, ROCHA M, HERNÁNDEZ-MIJARES A. Altered mitochondrial function and oxidative stress in leukocytes of anorexia nervosa patients. **PLoS One**, 9(9), 2014.
94. VIRTANEN SM, KNIP M. Nutritional risk predictors of beta cell autoimmunity and type 1 diabetes at a young age. **Am J Clin Nutr**, 78(6): 1053-1067, 2003.

95. VOLTARELLI JC, COURI CEB, STRACIERI ABPL, OLIVEIRA MC, MORAES DA, PIERONI F, COUTINHO M, MALMEGRIM KCR, FOSS-FREITAS MC, SIMÕES BP, FOSS MC, SQUIERS E, BURT RK. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. **JAMA**, 297(14): 1568-1576, 2007.
96. VOLTARELLI JC, OLIVEIRA MC, STRACIERI AB et al. Haematopoietic stem cell transplantation for refractory Takayasu's arteritis. **Rheumatology** 2004; 43:1308-1309
97. VOLTARELLI JC, OUYANG J. Hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases in developing countries: current status and future prospectives. **Bone Marrow Transplantation** 2003; 32(Suppl 1): S69-S71.
98. WADÉN J, FORSBLOM C, THORN LM, GORDIN D, SARAHEIMO M, GROOP PH. A1C variability predicts incident cardiovascular events, microalbuminuria, and overt diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. **Diabetes**, 58: 2649-55, 2009.
99. WU D, GONG C, MENG X, YANG Q. Correlation between blood glucose fluctuations and activation of oxidative stress in type 1 diabetic children during the acute metabolic disturbance period. **Chinese Med Journal**, 126(21): 4019-22, 2013.

APÊNDICES

8. APÊNDICES

Apêndice A. Dados de peso dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 submetidos ao transplante de células-tronco hematopoéticas. Ribeirão Preto (2004-2010).

	Altura	Peso pré-diagnóstico (Kg)*	Peso pré-mobilização (Kg)	Peso pré-condicionamento (Kg)	Peso 12 meses após transplante (Kg)
1	1,68	79	67	65,9	65,8
2	1,56	55,7	50,7	51	49,7
3	1,71	64	54	52	54,3
4	1,56	52,2	50,2	49,9	52,1
5	1,64	57	53	54,5	56
6	1,77	61	56	54,1	55,8
7	1,76	85	79	75,9	75,1
8	1,75	61	56,4	57	58,2
9	1,82	76	67	65	68,8
10	1,85	75,7	73,7	70	76
11	1,75	71,2	61,2	62	60
12	1,68	64	58	62,6	82
13	1,79	73	60,3	60,3	65,7
14	1,6	51	52	50	62
15	1,6	65	62,7	61,4	61
16	1,87	81,2	78,6	77,6	82
17	1,87	65,2	65,4	66,7	68,3
18	1,63	60	63,9	63,7	59,4
Média	1,71	66,5	61,6	61,0	64,0
DP	0,10	10,0	8,9	8,3	9,7

***Peso pré-diagnóstico:** Peso referido pelo paciente precedendo o início dos sintomas de DM1, antes do diagnóstico.

Apêndice B: Evolução das necessidades de insulina exógena entre os períodos pré-mobilização e 12 meses pós-transplante dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas. Ribeirão Preto (2004-2010).

Paciente	insulina exógena pré-mobilização (UI/Kg/dia)	insulina 12 meses pós-transplante (UI/Kg/dia)
1	0,48	0
2	0,4	0,2
3	0,33	0
4	0,3	0,18
5	0,44	0
6	0,49	0
7	0,36	0
8	0,64	0,36
9	0,59	0
10	0,41	0
11	0,56	0
12	0,51	0,58
13	0,5	0
14	0,52	1,28
15	0,38	0,2
16	0,55	0,15
17	0,47	0,32
18	0,69	0,34

Apêndice C: Análises descritivas dos valores de glutathiona reduzida (GSH), malonaldeído (MDA), isoprostano, superóxido dismutase (SOD), vitamina E (tocoferol) entre os grupos controle, experimental pré e experimental pós-transplante, todos controlados pela idade.

Grupo	Variável	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	1º quartil	Mediana	3º quartil	Máximo
Controle	IDADE	18	23,33	4,69	14,00	21,00	22,00	28,00	32,00
	GSH	18	0,57	0,12	0,40	0,51	0,54	0,61	0,86
	MDA	18	7,02	7,31	0,29	3,42	4,61	8,98	33,85
	ISOPROSTANO	18	155,41	202,76	0,00	16,96	31,19	276,50	524,96
	SOD	18	12,52	1,37	10,86	11,27	12,25	13,85	15,40
	Vitamina E (umol/L)	18	20,89	11,77	3,03	11,05	21,65	28,64	38,87
experimental (pré)	IDADE	18	17,94	4,58	13,00	15,00	16,00	21,00	31,00
	GSH	14	6,44	5,92	0,64	0,89	5,15	12,13	14,32
	MDA	9	8,34	2,25	5,62	6,69	7,51	9,76	11,86
	ISOPROSTANO	12	464,18	147,57	65,63	524,96	524,96	524,96	524,96
	SOD	6	11,50	0,95	10,16	10,78	11,57	12,14	12,77
	HEMOGLOBINA GLICADA	18	8,97	1,52	5,30	8,10	9,30	10,00	11,60
	PEPTÍDEO C	18	247,41	226,23	12,00	88,50	162,00	447,50	816,60
	Vitamina E (umol/L)	15	13,71	8,94	2,81	7,57	11,26	20,67	34,38
experimental (pós)	IDADE	18	17,94	4,58	13,00	15,00	16,00	21,00	31,00
	GSH	8	12,23	1,36	10,24	11,41	12,34	12,62	14,85
	MDA	6	8,20	2,64	4,90	6,74	7,89	9,02	12,76
	ISOPROSTANO	10	522,05	9,21	495,83	524,96	524,96	524,96	524,96
	SOD	6	10,80	1,99	8,49	8,63	10,99	12,09	13,62
	HEMOGLOBINA GLICADA	18	6,51	1,51	4,40	5,60	6,15	7,10	10,70
	PEPTÍDEO C	18	380,22	265,07	23,40	144,00	375,50	588,00	945,50
	Vitamina E (umol/L)	12	9,02	7,48	1,66	2,73	5,51	14,84	23,31

Apêndice D: Comparações dos valores de glutathiona reduzida (GSH), malonaldeído (MDA), isoprostano, superóxido dismutase (SOD) e vitamina E (tocoferol) entre os grupos: controle – experimental pré; controle – experimental pós e experimental pré – experimental pós. E comparações dos valores de hemoglobina glicada (HbA1C) e peptídeo-C entre os grupos: experimental pré – experimental pós.

GSH				
Comparação	Diferença estimada	Valor-p	Intervalo de confiança (95%)	
Controle - experimental (pré)	-5,08	0,01	-8,61	-1,55
Controle - experimental (pós)	-10,68	<0,01	-14,91	-6,45
experimental (pré) - experimental (pós)	-5,60	0,02	-9,61	-1,58
MDA				
Comparação	Diferença estimada	Valor-p	Intervalo de confiança (95%)	
Controle - experimental (pré)	-0,54	0,85	-8,57	7,50
Controle - experimental (pós)	-0,96	0,74	-9,26	7,34
experimental (pré) - experimental (pós)	-0,42	0,72	-3,83	2,99
Isoprostano				
Comparação	Diferença estimada	Valor-p	Intervalo de confiança (95%)	
Controle - experimental (pré)	-330,77	<0,01	-487,50	-174,04
Controle - experimental (pós)	-394,25	<0,01	-564,67	-223,82
experimental (pré) - experimental (pós)	-63,47	0,39	-231,37	104,43
SOD				
Comparação	Diferença estimada	Valor-p	Intervalo de confiança (95%)	
Controle - experimental (pré)	1,08	0,37	-7,91	10,07
Controle - experimental (pós)	1,82	0,24	-7,39	11,03
experimental (pré) - experimental (pós)	0,74	0,51	-8,89	10,37
Vitamina E				
Comparação	Diferença estimada	Valor-p	Intervalo de confiança (95%)	
Controle - experimental (pré)	4,26	0,28	-4,29	12,82
Controle - experimental (pós)	8,38	0,07	-0,96	17,71
experimental (pré) - experimental (pós)	4,11	0,30	-4,49	12,71
Hemoglobina glicada				
Comparação	Diferença estimada	Valor-p	Intervalo de confiança (95%)	
experimental (pré) - experimental (pós)	2,47	<0,01	1,40	3,53
Peptídeo C				
Comparação	Diferença estimada	Valor-p	Intervalo de confiança (95%)	
experimental (pré) - experimental (pós)	-132,80	0,11	-296,90	31,31

ANEXOS

9. ANEXOS

Anexo A: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil do estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 submetidos ao transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas, Ribeirão Preto, SP

Pesquisador: Marília Alessi Guena de Camargo

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 17084513.7.0000.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 565.313

Data da Relatoria: 12/03/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa doutorado da aluna Marília Alessi Guena de Camargo sob orientação da Profa. Dra. Maria Carolina de Oliveira Rodrigues. A hipótese deste estudo consiste em, levando em consideração que os pacientes com diabetes mellitus tipo 1, dependentes de insulina, têm um perfil prejudicado em relação ao estresse oxidativo com o aumento da produção de radicais livres e/ou redução de antioxidantes, os pacientes que se encontram na qualidade dependentes de insulina mesmo no pós transplante, possuem esse perfil dependente do status oxidante.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Delinear o perfil do estresse oxidativo de pacientes DM1 submetidos ao transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas e comparar com o perfil do estresse oxidativo de pacientes DM1 controlados e com o grupo controle.

Objetivo Secundário: Analisar o perfil oxidativo, através da dosagem de TBARS (marcador de peroxidação lipídica - MDA), de pacientes com DM1 transplantados, antes e 12 meses pós transplante (grupo experimental), de pacientes com DM1 não transplantados, mas metabolicamente controlados (grupo diabético controle) e de pacientes não portadores de diabetes (grupo controle saudável). Analisar o perfil oxidativo, através da dosagem de GSH

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

(glutathione reduzida antioxidante endógeno), de pacientes com DM1 transplantados, antes e 12 meses pós transplante (grupo experimental), de pacientes com DM1 não transplantados, mas metabolicamente controlados (grupo diabético controle) e de pacientes não portadores de diabetes (grupo controle saudável). Analisar o perfil oxidativo, pela dosagem de vitamina E (tocoferol γ antioxidante lipossolúvel) de pacientes com DM1 transplantados, antes e 12 meses pós transplante (grupo experimental), de pacientes com DM1 não transplantados, mas metabolicamente controlados (grupo diabético controle) e de pacientes não portadores de diabetes (grupo controle saudável). γ Comparar os resultados das análises de perfil oxidativo dos pacientes incluídos nos grupos experimental (transplantados), controle diabético e controle saudável.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Riscos da punção: dor, sangramento local, formação de hematomas, transfixação da veia, raramente lesão de nervos e artérias. Quebra de sigilo: faremos o possível para manter o sigilo, e não divulgaremos nome ou dados pessoais. Todas as informações serão divulgadas tendo a identificação codificada. Entretanto, sempre existe o risco de quebra de sigilo, e do nome tornar-se público.

Benefícios: Um dos benefícios do presente estudo será a possível associação entre radicais livres x diabetes mellitus tipo 1, que, sendo verdadeira e positiva não existirá entre o grupo dos pacientes diabéticos transplantados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

No projeto de pesquisa consta:

1) Grupo experimental (n=10): será avaliado em dois momentos. No primeiro, serão analisadas amostras de soro colhidas logo antes de ser realizado o TCTH (momento pré TCTH). No segundo, amostras de soro dos mesmos indivíduos serão analisadas 360 dias após o TCTH (momento pós TCTH). As amostras previamente colhidas dos pacientes transplantados encontram-se criopreservadas em banco de amostras, sob processo aprovado pelo CEP sob número 4911/2008. O responsável pelo banco de amostras é o Prof. Dr. Wilson Araújo Júnior.

2) Grupo DM1 controle (n=10): Participarão desse grupo indivíduos DM1 recém diagnosticados (tempo máximo de diagnóstico igual a 6 semanas) e que estejam com a glicemia controlada pelo uso de insulina. Esses pacientes estarão sendo acompanhados pelo ambulatório de Endocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

3) Grupo controle saudável (n=10): o grupo controle será preenchido por indivíduos sadios que trabalham ou estudam na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e que preencherem os

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 565.313

requisitos para participar desse grupo. Grupos de estudantes dos cursos de Medicina, Fisioterapia e Terapia Ocupacional, serão abordados e convidados a voluntariamente participar do estudo, doando amostra de sangue uma única vez. Não serão abordados estudantes que estejam cursando disciplinas que tenham participação da Prof. Dra. Maria Carolina de Oliveira Rodrigues, evitando assim relação de poder entre voluntários e pesquisadores. Funcionários que encontrem-se dentro de faixa etária semelhante à dos pacientes transplantados poderão também ser convidados a participar voluntariamente, desde que não trabalhem junto às unidades de Transplante de Medula Óssea, às enfermarias de Reumatologia ou qualquer ambiente em que possa haver relação de poder entre voluntários e pesquisadores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram anexados os seguintes novos documentos:

- 1)TCLE grupo DM1 transplantado - versão 11 de março de 2014;
- 2)TCLE grupo DM1 não transplantado - versão 11 de março de 2014;
- 3)TCLE grupo DM1 não transplantado pais ou responsável legal - versão 11 de março de 2014;
- 4)TCLE grupo controle não diabético - versão 11 de março de 2014;
- 5)TCLE grupo controle não diabético pais ou responsável legal - versão 11 de março de 2014.
- 6)Anexou carta de autorização do Prof. Dr. Wilson Araújo Júnior para a utilização das amostras dos pacientes com DM transplantados armazenadas no banco (Processo HCRP 4911/2008) e justificativa de dispensa do termo para estas amostras.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP analisou e aprovou os seguintes documentos:

- 1)Projeto de Pesquisa versão janeiro 2014;
- 2)TCLE grupo DM1 transplantado - versão 11 de março de 2014;
- 3)TCLE grupo DM1 não transplantado - versão 11 de março de 2014;
- 4)TCLE grupo DM1 não transplantado pais ou responsável legal - versão 11 de março de 2014;
- 5)TCLE grupo controle não diabético - versão 11 de março de 2014;
- 6)TCLE grupo controle não diabético pais ou responsável legal - versão 11 de março de 2014;
- 7)Termo de Assentimento grupo diabético controle (24/02/2014);
- 8)Termo de Assentimento grupo controle (24/02/2014).

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

Continuação do Parecer: 565.313

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

RIBEIRÃO PRETO, 24 de Março de 2014

Assinador por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para indivíduos do grupo controle menores de 18 anos.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“PERFIL DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1 SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS, EM RIBEIRÃO PRETO, SP”.

GRUPO CONTROLE SAUDÁVEL.

PARA PAIS OU RESPONSÁVEL LEGAL DE PACIENTES COM MENOS DE 18 ANOS

A Seu filho está sendo convidado a participar deste estudo, que poderá nos levar a um maior entendimento sobre o papel dos radicais livres (átomo ou molécula com existência independente e que contém um ou mais elétrons na sua última camada) em pacientes com diabetes mellitus tipo 1.

O diabetes *mellitus* tipo 1 é uma doença de autoagressão, ou seja, células do próprio corpo ataca o pâncreas, onde é produzida a insulina (hormônio cuja função é colocar para dentro da célula a glicose (açúcar) presente no sangue). Quando a insulina deixa de ser produzida, ou quando os níveis ficam muito baixos, ocorre um acúmulo de glicose no corpo, que faz com que você sinta-se mal, perca peso, tenha sede e urine muito, além das complicações que ocorrem após alguns anos. O diabetes *mellitus* tipo 1 é tratado rotineiramente com injeções múltiplas diárias de insulina e dieta controlada. Este tratamento deve ser feito por toda a vida e reduz, mas não elimina completamente, as complicações crônicas do diabetes sobre o coração, rins, olhos, vasos, etc.

O estresse oxidativo, que pode ser definido como o desequilíbrio entre a formação e remoção de agentes oxidantes no organismo, decorrente da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (que são os radicais livres) e/ou diminuição de antioxidantes endógenos (que são substâncias produzidas pelo próprio organismo cuja função é a defesa contra os agentes oxidantes), está diretamente envolvido no impacto da função das células do pâncreas durante o desenvolvimento da doença. Por conta dessa baixa capacidade antioxidante, as células do pâncreas são extremamente sensíveis ao estresse oxidativo.

O objetivo deste estudo consiste em avaliar se o transplante altera o perfil oxidativo dos pacientes com diabetes.

Esse estudo incluirá três grupos de participantes, sendo o primeiro constituído por pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 transplantados, o segundo por pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 não transplantados e o terceiro por indivíduos saudáveis. O grupo ao qual seu filho se encaixa é o de indivíduos saudáveis. Usaremos o sangue para comparar o estresse oxidativo com aquele dos pacientes transplantados e também com os pacientes diabéticos não transplantados.

Quando você autorizar a participação do seu filho neste estudo, colheremos um pequeno volume (cerca de 3 a 5ml, ou seja, de 1 a 2 colheres de chá) de sangue, a partir de uma veia de um dos braços. A punção poderá trazer alguns desconfortos, como dor local e formação de hematomas. Ocasionalmente, é preciso repetir a punção para obter a quantidade necessária de sangue. Com essa amostra de sangue, faremos análises em laboratório para identificar os níveis de estresse oxidativo. Ele não será beneficiado por esse estudo e os resultados terão única finalidade comparativa. Os riscos referentes à coleta de

sangue são: dor, sangramento no local, formação de hematomas (roxos), transfixação da veia (machucar a veia) e, raramente lesão de nervos e artérias. Em caso de alteração dos exames (se os resultados estiverem fora da normalidade), entraremos em contato com você através dos dados que constam nesse termo, para explicar o que há de errado.

B Ele tem direito a esclarecimentos sobre o andamento e resultados da pesquisa referentes à sua pessoa, antes e durante a realização do procedimento.

C Ele poderá desistir de participar do estudo em qualquer momento, sem qualquer prejuízo financeiro.

D Os nomes não serão divulgados, porém as informações obtidas com esse estudo poderão ser usadas com fins científicos e publicadas. Todas as informações serão divulgadas tendo sua identificação codificada. Ele não será obrigado a participar de entrevistas para a imprensa, a menos que concorde. Faremos o possível para evitar a divulgação de nomes e de dados pessoais, entretanto, existe o risco remoto de quebra accidental de sigilo.

E Ele não terá custo algum por participar deste estudo.

F Ele tem direito de solicitar na Justiça indenização por danos decorrentes da sua participação na pesquisa.

Eu, _____
Abaixo assinado(a), fui devidamente esclarecido(a) sobre todas as condições que constam do documento “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aos pais ou responsável legal de pacientes menores de 18 anos”, de que trata o projeto de pesquisa intitulado “**Perfil do estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 submetidos ao transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas, em Ribeirão Preto**”, que tem como pesquisadora principal a nutricionista *Marília Alessi Guena de Camargo*. Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto minha autorização para que o meu filho/paciente participe desse projeto.

Pai ou representante legal _____
Assinatura _____
Local _____ Data _____
Rua ou avenida _____
Número _____ Complemento _____
Bairro _____ Cidade _____ Estado _____
Telefones para contato () _____ () _____
Pesquisador responsável pelas orientações _____

Pesquisador responsável pela obtenção do consentimento: _____

Assinatura _____
Local _____ Data _____

Este estudo está sendo desenvolvido pela Faculdade de Medicina do Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Pesquisadores responsáveis:

Marília Alessi de Camargo

Unidade de Transplante de Medula Óssea
Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
Avenida dos Bandeirantes 3900
14048-900 Ribeirão Preto - SP
Telefone: (16) 3602-2229

Maria Carolina de Oliveira Rodrigues

Divisão de Imunologia Clínica
Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
Avenida dos Bandeirantes 3900
14048-900 Ribeirão Preto - SP
Telefone: (16) 3602-2717

Alceu Afonso Jordão Junior

Divisão de Nutrição e Metabolismo
Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
Avenida dos Bandeirantes 3900
14048-900 Ribeirão Preto - SP
Telefone: (16) 3602-4564

Carlos Eduardo Barra Couri

Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
Avenida dos Bandeirantes 3900
14048-900 Ribeirão Preto - SP
Telefone: (16) 3602-2229

Dados da pesquisadora responsável:

*Marília Alessi Guena de Camargo
Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Departamento de Clínica Médica, Unidade de Transplante de
Medula Óssea
Avenida dos Bandeirantes 3900. CEP 14048-900 Ribeirão Preto - SP
Telefones para contato: (16) 36022229*

Esclarecimentos ou denúncias poderão ser enviados ao CEP:

*Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.
Avenida dos Bandeirantes 3900. CEP 14048-900 Ribeirão Preto - SP
Contato: (16) 3602-2228 ou cep@hcrp.usp.br*

Ribeirão Preto, 21 de janeiro de 2014

Ilma. Sra. Dra. Márcia Guimarães Villanova
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP

Prezada Senhora,

O projeto de pesquisa **"Perfil do estresse oxidativo em pacientes com doença de base o diabetes mellitus tipo I submetidos ao transplante autólogo de células tronco hematopoéticas, em Ribeirão Preto, SP"** recentemente encaminhado ao CEP para apreciação ética, prevê análise de amostras de soro armazenadas em banco de amostras. Dessa forma, encaminho abaixo a anuência do responsável pelo banco de amostras, Dr. Wilson Araújo Silva Junior, para uso de tais amostras.

Adicionalmente, solicitamos a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, pois essas amostras estão estocadas no banco de amostras intitulado "Criação do banco de amostras para estudos laboratoriais e clínicos do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Departamento de Genética da FMRP-USP" (Processo HCRP Nº 4911/2008; Coordenador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior), previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP em 21/07/2008 (Ofício 2645/2008). Os pacientes assinaram os respectivos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido no contexto de projetos anteriores já concluídos.

Colocamo-nos a disposição para quaisquer esclarecimentos.

Atenciosamente,

Marília Alessi Guena de Camargo
Pós-graduanda do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP
Coordenadora do Projeto

Prof. Dra. Maria Carolina de Oliveira Rodrigues
Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP
Orientadora de pós-graduação da Coordenadora o Projeto

De acordo,

Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior
Departamento de Genética da FMRP-USP
Coordenador do Banco de Amostras

Anexo C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para indivíduos do grupo controle maiores de 18 anos.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“PERFIL DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1 SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS, EM RIBEIRÃO PRETO, SP”.

GRUPO CONTROLE SAUDÁVEL.

PARA O PACIENTE COM MAIS DE 18 ANOS

A Você está sendo convidado a participar deste estudo, que poderá nos levar a um maior entendimento sobre o papel dos radicais livres (átomo ou molécula com existência independente e que contém um ou mais elétrons na sua última camada) em pacientes com diabetes mellitus tipo 1.

O diabetes *mellitus* tipo 1 é uma doença de autoagressão, ou seja, células do próprio corpo agredem o pâncreas, onde é produzida a insulina (hormônio cuja função é colocar para dentro da célula a glicose (açúcar) presente no sangue). Quando a insulina deixa de ser produzida, ou quando os níveis ficam muito baixos, ocorre um acúmulo de glicose no corpo, que faz com que você sintam-se mal, perca peso, tenha sede e urine muito, além das complicações que ocorrem após alguns anos. O diabetes *mellitus* tipo 1 é tratado rotineiramente com injeções múltiplas diárias de insulina e dieta controlada. Este tratamento deve ser feito por toda a vida e reduz, mas não elimina completamente, as complicações crônicas do diabetes sobre o coração, rins, olhos, vasos, etc.

O estresse oxidativo, que pode ser definido como o desequilíbrio entre a formação e remoção de agentes oxidantes no organismo, decorrente da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (que são os radicais livres) e/ou diminuição de antioxidantes endógenos (que são substâncias produzidas pelo próprio organismo cuja função é a defesa contra os agentes oxidantes), está diretamente envolvido no impacto da função das células do pâncreas durante o desenvolvimento da doença. Por conta dessa baixa capacidade antioxidante, as células do pâncreas são extremamente sensíveis ao estresse oxidativo.

O objetivo deste estudo consiste em avaliar se o transplante altera o perfil oxidativo dos pacientes com diabetes.

Esse estudo incluirá três grupos de participantes, sendo o primeiro constituído por pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 transplantados, o segundo por pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 não transplantados e o terceiro por indivíduos saudáveis. O grupo ao qual você se encaixa é o de indivíduos saudáveis. Usaremos o sangue para comparar o estresse oxidativo com aquele dos pacientes transplantados e também com os pacientes diabéticos não transplantados.

Quando você aceitar participar deste estudo, colheremos um pequeno volume (cerca de 3 a 5ml, ou seja, de 1 a 2 colheres de chá) de sangue, a partir de uma veia de um dos seus braços. A punção poderá trazer alguns desconfortos, como dor local e formação de hematomas. Ocasionalmente, é preciso repetir a punção para obter a quantidade necessária de sangue. Com essa amostra de sangue, faremos análises em laboratório para identificar os seus níveis de estresse oxidativo. Você não será beneficiado por esse estudo e os

resultados terão única finalidade comparativa. Os riscos referentes à coleta de sangue são: dor, sangramento no local, formação de hematomas (roxos), transfixação da veia (machucar a veia) e, raramente lesão de nervos e artérias. Em caso de alteração dos exames (se os resultados estiverem fora da normalidade), entraremos em contato com você através dos dados que constam nesse termo, para explicar o que há de errado.

B Você tem direito a esclarecimentos sobre o andamento e resultados da pesquisa referentes à sua pessoa, antes e durante a realização do procedimento. Se você tiver menos de 18 anos quando concordar em participar da pesquisa, este termo de consentimento será assinado por seu representante legal (pais ou outros), mas você também receberá um Termo de Assentimento informando sobre todos os aspectos da pesquisa que lhe dizem respeito.

C Você poderá desistir de participar do estudo em qualquer momento, sem qualquer prejuízo financeiro.

D Os nomes não serão divulgados, porém as informações obtidas com esse estudo poderão ser usadas com fins científicos e publicadas. Todas as informações serão divulgadas tendo sua identificação codificada. Você não será obrigado a participar de entrevistas para a imprensa, a menos que concorde. Faremos o possível para evitar a divulgação de seu nome e de seus dados pessoais, entretanto, existe o risco remoto de quebra accidental de sigilo.

E Você não terá custo algum por participar deste estudo.

F Você tem direito de solicitar na Justiça indenização por danos decorrentes da sua participação na pesquisa.

Paciente ou representante legal _____

Assinatura _____

Local _____ Data _____

Pesquisador responsável pelas orientações _____

Endereço do paciente para contato:

Rua ou avenida _____

Número _____ Complemento _____

Bairro _____ Cidade _____ Estado _____

Telefones para contato () _____

() _____

Pesquisador responsável _____

Assinatura _____

Local _____ Data _____

Anexo D: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para indivíduos do grupo dos diabéticos transplantados.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“PERFIL DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1 SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS, EM RIBEIRÃO PRETO, SP”.

GRUPO DIABÉTICO TRANSPLANTADO.

PARA O PACIENTE COM MAIS DE 18 ANOS

A Você está sendo convidado a participar deste estudo, que poderá nos levar a um maior entendimento sobre o papel dos radicais livres (átomo ou molécula com existência independente e que contém um ou mais elétrons na sua última camada) em pacientes com diabetes mellitus tipo 1.

O diabetes *mellitus* tipo 1 é uma doença de autoagressão, ou seja, células do próprio corpo atacam o pâncreas, onde é produzida a insulina (hormônio cuja função é colocar para dentro da célula a glicose (açúcar) presente no sangue). Quando a insulina deixa de ser produzida, ou quando os níveis ficam muito baixos, ocorre um acúmulo de glicose no corpo, que faz com que você sintase mal, perca peso, tenha sede e urine muito, além das complicações que ocorrem após alguns anos. O diabetes *mellitus* tipo 1 é tratado rotineiramente com injeções múltiplas diárias de insulina e dieta controlada. Este tratamento deve ser feito por toda a vida e reduz, mas não elimina completamente, as complicações crônicas do diabetes sobre o coração, rins, olhos, vasos, etc.

O estresse oxidativo, que pode ser definido como o desequilíbrio entre a formação e remoção de agentes oxidantes no organismo, decorrente da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (que são os radicais livres) e/ou diminuição de antioxidantes endógenos (que são substâncias produzidas pelo próprio organismo cuja função é a defesa contra os agentes oxidantes), está diretamente envolvido no impacto da função das células do pâncreas durante o desenvolvimento da doença. Por conta dessa baixa capacidade antioxidante, as células do pâncreas são extremamente sensíveis ao estresse oxidativo.

O objetivo deste estudo consiste em avaliar se o transplante altera o perfil oxidativo dos pacientes com diabetes.

Esse estudo incluirá três grupos de participantes, sendo o primeiro constituído por pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 transplantados, o segundo por pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 não transplantados e o terceiro por indivíduos saudáveis. O grupo ao qual você se encaixa é o de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 transplantados. Usaremos o sangue para comparar com o de pacientes diabéticos não transplantados e com os indivíduos saudáveis.

Quando você aceitar participar deste estudo, faremos análises em laboratório com o soro do seu sangue já doado para estudo anterior. Essas amostras de soro que estão congeladas, serão descongeladas para a submissão de análises do estresse oxidativo. Não haverá necessidade do seu comparecimento no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

B Você tem direito a esclarecimentos sobre o andamento e resultados da pesquisa referentes à sua pessoa, antes e durante a realização do procedimento. Se você tiver menos de 18 anos quando concordar em participar da pesquisa, este termo de consentimento será assinado por seu representante legal (pais ou outros), mas você também será informado diretamente sobre todos os aspectos da pesquisa que lhe dizem respeito.

C Você poderá desistir de participar do estudo em qualquer momento, sem qualquer prejuízo financeiro ou do seu tratamento com seu médico de origem.

D Os nomes não serão divulgados, porém as informações obtidas com esse estudo poderão ser usadas com fins científicos e publicadas. Todas as informações serão divulgadas tendo sua identificação codificada. Você não será obrigado a participar de entrevistas para a imprensa, a menos que concorde. Faremos o possível para evitar a divulgação de seu nome e de seus dados pessoais, entretanto, existe o risco remoto de quebra accidental de sigilo.

E Você não terá custo algum por participar deste estudo.

F Você tem direito de solicitar na Justiça indenização por danos decorrentes da sua participação na pesquisa.

Paciente ou representante legal _____

Assinatura _____

Local _____ Data _____

Pesquisador responsável pelas orientações _____

Endereço do paciente para contato:

Rua ou avenida _____

Número _____ Complemento _____

Bairro _____ Cidade _____ Estado _____

Telefones para contato () _____

() _____

Pesquisador responsável _____

Assinatura _____

Local _____ Data _____

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Oxidative stress profile in patients with type 1 diabetes *mellitus* treated with autologous hematopoietic stem cell transplantation

de Camargo MAG, Jordão-Júnior AA, Couri CEB, Ovidio PP, Ambrosio LMCS, Voltarelli JC, Oliveira MC.

Abstract

Oxidative stress, induced by reactive species, is directly involved with β -cell function during the development of type 1 diabetes mellitus (T1DM) and with the development of hyperglycemia-induced complications. Autologous hematopoietic stem cell transplantation (AHSCT) is an immunological therapeutic strategy to preserve the function of the endocrine pancreas, if performed early after T1DM diagnosis, while the patient still has significant pancreatic β -cell residual mass. Thus, this study aims to investigate how oxidative stress behaves before and after AHSCT and how it may be related with glycemic control. Eighteen patients transplanted between 2004 and 2010, which had serum samples cryopreserved immediately before and 12 months after transplantation, were retrospectively evaluated. These patients were also divided into responders (insulin-free at 12 months post-transplant) and non-responders (in use of insulin 12 months post-transplant). Data on oxidative stress (malondialdehyde and isoprostane levels) and antioxidant capacity (reduced glutathione, superoxide dismutase and tocopherol levels), from diabetic patients, were compared before and 12 months after AHSCT, and also with a healthy control group. We observed that 12 months after transplantation, T1DM patients showed improvement in glycated hemoglobin levels and exogenous insulin doses, besides recovery of pre-diabetes body weight levels. At 12 months post-transplantation, the group of responders had significantly higher C-peptide levels than the non-responders. When compared to the health individuals (control group), we found higher levels of reduced glutathione and isoprostane in T1DM patients, both before and after transplantation. We also observed that tocopherol levels (vitamin E) were reduced below the reference value, when compared to the control group. In conclusion, we found that patients with T1DM present abnormal oxidative stress, marked by increased isoprostane, and antioxidant activity, marked by the increase of reduced glutathione (GSH) already a few weeks after diagnosis and that AHSCT did not contribute to normalize their levels.

Keywords: oxidative stress, antioxidants, diabetes *mellitus*, autologous hematopoietic stem cell transplantation.

INTRODUCTION

Type 1 diabetes (T1D) is a multifactorial, chronic autoimmune disease, leading to progressive destruction of pancreatic insulin-producing β -cells and, as consequence, hyperglycemia.¹⁻² β -cell function can be measured through quantification of C-peptide, which is an inactive protein fragment eliminated after the cleavage (breaking) of proinsulin into insulin.³ Other ways to estimate β -cell function are measurement of exogenous insulin requirements and glycated hemoglobin (HbA1c), which increase in inverse proportion to the endogenous production of insulin.³ Diabetes becomes clinically overt after months to years of pancreatic inflammation and progressive destruction of β -cells, with consequent production of decreasing levels of insulin, usually when approximately 60 to 80% of the β -cells have already been destroyed and the amount of insulin produced is insufficient to adequately metabolize glucose levels.⁴ Often after diagnosis and correction of hyperglycemic levels, endogenous insulin secretion spontaneously recovers, in the honey-moon phase. During this period, which may last up to a year after diagnosis, exogenous insulin requirements decrease considerably. However, this effect is temporary, and after 8 to 10 years following clinical onset, loss of β cells is considered complete.⁵ Therefore, exogenous insulin replacement becomes unavoidable.

Chronic elevation of plasma glucose, longer duration of illness and poor glycemic control are responsible for several of the major complications of T1D, involving micro and macrovascular disorders such as nephropathy, retinopathy, neuropathy and cardiovascular disease.^{6,7} One of the pathogenic mechanisms that explain the increased risk of atherosclerosis and coronary heart disease in diabetes, along with endothelial dysfunction, may be an imbalance between pro- and anti-oxidant agents.⁶⁻⁸ Hyperglycemia, resulting from oxidation of glucose, non-enzymatic glycation and monocytic dysfunction, leads to increased production of free radicals.⁹⁻¹⁰ This is exacerbated by a decrease in antioxidant levels, leading to oxidative damage, as demonstrated by high levels of lipid peroxidation and DNA products found in patients with diabetes^{11,12}. Studies have shown that poor metabolic control in T1D is associated with increased oxidative stress.¹³⁻¹⁴ Its importance in the etiology of diabetes complications is based on the fact that biochemical pathways such as oxidation of glucose and protein glycation may increase free-radical formation, mostly during periods of reported hyperglycemia.¹⁴ Since the loss of β -cells in the pancreas is slow and gradual, it is believed that an immune intervention, aiming to keep the immunological aggression under control, would preserve the small, but functional, remaining portion of the endocrine pancreas. Thus, the preserved insulin-producing β -cells would minimize the exogenous insulin requirements, promote better glycemic control, and possibly reduce the consequences of chronic disease. Based on this concept, during the 1980s immunosuppressive approaches aiming to control autoimmunity and avoid complete pancreatic destruction were investigated.³ Some of these interventions showed partial results, mostly sustained only during the period of immunosuppression.¹⁵ Overall, these results indicate that it is necessary to employ more extensive immunosuppressive approaches that modulate the immune system as a whole, and not restricted to certain inflammatory pathways. In this context, autologous hematopoietic stem cell transplantation (AHSCT) has been investigated as a therapeutic approach to control β -cell destruction. Therefore, taking into

account that T1D patients have an impaired profile of oxidative stress, with increased production of free radicals and/or decreased antioxidants, we aim to investigate if AHSCT is able to modify this profile.

PATIENT AND METHODS

Study design and data collection

This study included patients with T1DM who underwent AHSCT between 2004 and 2010, at the Ribeirão Preto Medical School University Hospital, and who had cryopreserved serum samples from before and/or at 12 months after AHSCT. Healthy subjects with fasting glucose levels lower than 110 mg/dL were used as controls. Data from the T1DM transplanted patients were retrospectively retrieved from medical records, under local Ethics Committee approval, to identify demographic, lifestyle, clinical, and anthropometric information, and exogenous insulin doses.

Quantification of oxidative stress

Lipid peroxidation was determined by quantification of malondialdehyde (MDA) in the sera, and performed according to the method proposed by Monnier-Gerard, with some adjustments.¹⁶ Briefly, 200µl of serum from each patient was added to 650µl of 10 mM solution of 1-methyl-phenylindole in acetonitrile and methanol (2: 1, v / v) and 150µl of pure HCl (37%). Subsequently, eppendorfs were stirred in a vortex shaker and incubated in 45°C water bath for 40 minutes. Then, the samples were ice-cooled and tubes were centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes. Absorbance of the supernatants was read at a wavelength of 586nm. The concentration of MDA was calculated based on a curve of hydrolyzated 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP).

Isoprostane levels were determined by ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) using the 8-isoprostane EIA® kit (Cayman Chemical Co). There was no need for purification of serum samples, since different dilution tests resulted in similar values (difference <20%), according to manufacturer instructions. Plates were read on a spectrophotometer, at wavelength of 410 nm, and results were expressed in ng / mmol.

Reduced Glutathione (GSH) was determined according to the method described by Sedlack and Lindsay (1968).¹⁷ 200 microliters of serum were mixed with 1.0 ml of 50% trichloroacetic acid (TCA) and DTNB 0.1 ml (0.01 M in methanol). Reading was performed by a spectrophotometer, at wavelength of 412 nm, 5 minutes after the addition of DTND against a white EDTA (0.02 M) instead of serum. The concentration was calculated using a standard curve of GSH in EDTA (0.02 M).

Superoxide dismutase (SOD) levels were determined by the indirect method of NBT (nitroblue tetrazolium) using the SOD® 19160 kit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH®). Twenty microliters of the serum were added to white solution 2 plus 20µl of double distilled water in white solutions 1 and 3 were added to 20µl of WST

solution provided in the kit in each white solution and mixed. A further 20µl of buffer solution also supplied by the kit in white solutions 2 and 3 were added to 20µl of the enzyme solution (provided by manufacturer) and the white in the sample solution 1 and then mixed continuously. Was placed in an incubator at 37 ° C for 20 minutes. Finally, absorbance was read at 450nm.

For serum Tocopherol (vitamin E) levels, 400µl of sample (test) were pipetted into a glass test tube (12x75mm) with 400µl of standard α-tocopherol solution (curve) and 400µl water (white). 400µl of ethanol were added to the test and to blank. The solution was stirred in a vortex mixer for 30 seconds. 400µl of hexane were added and the solution was stirred for 30 seconds and then centrifuged for 10 min/1500 g /4°C. The top layer (hexane) was collected and transferred to another glass tube, and covered with parafilm to prevent evaporation. Then, 200µl of the hexane were pipetted into an Eppendorf tube with 50ul of 0.4% bathophenanthroline, 150µl 0.06% ferric chloride and 100 of 0.5% orthophosphoric acid (85%). The mixture was stirred in a vortex type glass and the reading was made at absorbance of 536nm. The curve was obtained by plotting absorbance data x concentration of α-tocopherol.¹⁸

Statistical Analysis

All sets of values were analyzed for parametric or non-parametric distribution. The mean (standard deviation) values with parametric distribution and median (range) of values with non-parametric distribution were calculated. To evaluate the differences between oxidative stress values before and after the transplant, we were applied t test or Mann-Whitney test. To evaluate the differences between experimental and control groups, the ANOVA test was applied, with Tukey post-test or Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test. To compare values from the experimental group (pre and post-transplantation) with those from the control group, we used the paired t test or Wilcoxon test. Significance was set at 0.05.

RESULTS

Twenty-five T1DM patients who had undergone AHSCT were initially considered for the study. However, only 18 (72%) of them had serum samples cryopreserved in sufficient quantity for laboratory analysis. These patients were retrospectively divided into two groups, according to insulin-dependence at 12 months post-transplantation; those who were free of exogenous insulin use up to 12 months after transplantation (responders) and those who were in use of exogenous insulin at 12 months after transplantation (non-responders).

Median age (range) of the T1DM group at transplantation was 16 (13-31) years. When compared to the control group, there was significant difference regarding distribution of age (Wilcoxon test, p=0.08) and gender (Chi-square test, p=0.01), but no difference regarding ethnicity (Chi-square test, p=0.23).

Quantification of oxidative stress and antioxidant capacity

Malondialdehyde (MDA) levels

We did not detect differences in serum levels of MDA in the experimental group (DM1) between pre- and post-transplantation ($p=0.3864$) time points. We also found no difference between the control group and the experimental group at pre-transplant time point ($p>0.05$). However, after AHSCT, the experimental group had significantly higher MDA levels than the control group ($p<0.005$). When we analyzed these data in the group of diabetic patients divided into responders and non-responders, we found differences between groups in the overall analysis (Kruskal-Wallis, $p=0.0478$), however the Dunn's post-test did not identify specific differences between groups (Figure 1).

Figure 1: Malondialdehyde (MDA) values in diabetic patients and controls. **A)** The figure represents the MDA levels in patients with T1DM, before (PRE) and at 12 months post-transplantation (POST), and the control group. Pre- and post-transplant data were compared through Mann-Whitney test. Experimental (DM1) and control groups were compared through Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test. **B)** The figure represents MDA levels in T1DM patients divided into responders and non-responders in their respective pre- and post-transplant time points, Kruskal-Wallis test, Dunn's post-test. The horizontal lines represent the mean and upper and lower limits of standard deviation. * $p=0.0478$. The horizontal lines correspond to the median (larger) and the 1st and 3rd quartiles (smaller). PRE: just before starting the first stage of transplantation. POST: 12 months post-transplant.

Isoprostane

We found no significant difference ($p = 0.8647$) in serum levels of isoprostane between the experimental group (DM1) at pre- and 12 months after transplantation. Pre- ($p < 0.001$) and post-transplant ($p < 0.01$) levels were higher than controls. When clustering the experimental group in responders and non-responders, we found that there was no significant difference between the subgroups. However, in the group of responders, isoprostane levels were higher than controls only at pre-transplant time point ($p < 0.05$), while in the non-responder group, isoprostane levels were higher than controls in both pre- and post-transplant time points ($p < 0.001$) (Figure 2). Where the dosage exceeded isoprostane concentration of 524pg / ml, the values became qualitative ($> 524\text{pg / ml}$). Therefore, for graphical representations and statistical analysis, we considered the maximum value of 524pg/mL.

Figure 2: isoprostane levels in T1DM patients and controls. **A)** The figure represents the isoprostane levels in patients with DM1 before (PRE) and 12 months after transplantation (POST), and in the control group. Comparison of pre- and post-transplant using the Mann-Whitney test. Comparison between the experimental group (DM1) and control using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test. **B)** The figure represents isoprostane levels in T1DM patients divided into responders and non-responders in their respective pre- and 12 months post-transplant time points, and isoprostane levels in the control group. Comparison of pre- and post-transplant using the Mann-Whitney test. Comparison between the experimental groups (DM1) and controls through the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test. The horizontal lines are the means and upper and lower limits of standard deviation. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. The horizontal lines correspond to the median (larger) and the 1st and 3rd quartiles (smaller). PRE: just before starting the first stage of transplantation. POST: 12 months post-transplant.

Glutathione (GSH)

Serum levels of GSH in the experimental group (DM1) in the pre- and post-transplant (12 months) time points were significantly higher ($p < 0.0001$) than the control group levels. We did not find significant differences in the experimental group between pre and 12 months after transplantation ($p = 0.1282$). When we separate the experimental group in responders (patients who were free from exogenous insulin at 12 months post-transplant) and non-responders (patients who were not free from exogenous insulin at 12 months post-transplant) found a statistically significant difference ($p < 0.001$) between the control group and each of the moments of the experimental group (Figure 3). However, there is no difference between the times of the experimental group ($p > 0.05$).

Figure 3: Values of reduced glutathione (GSH) in T1DM patients and controls. **A)** GSH levels in patients with DM1 before (PRE) and 12 months after transplantation (POST), as well as in control subjects. Comparison of pre- and post-transplant using the Mann-Whitney test. Comparison between experimental group (DM1) and control by Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test. **B)** The figure represents GSH levels in T1DM patients divided into responders and non-responders before and after transplant, and in the control group. Comparison of pre- and post-transplant using the Mann-Whitney test. Comparison between experimental group (DM1) and controls using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test. The horizontal lines correspond to median and upper and lower limits of standard deviation. ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$. The horizontal lines correspond to the median (larger) and 1st and

3rd quartiles (smaller). PRE: just before starting the first stage of transplantation. POST: 12 months post-transplant.

Superoxide dismutase (SOD)

No significant difference ($p = 0.2424$) was found at the experimental group (DM1) between pre- and 12 months post-transplantation time points. However, at the post-transplantation time point, we observed lower serum levels of SOD in the experimental group compared to controls ($p < 0.05$). When separating the experimental group in responders and non-responders, we found that there was no significant difference between the pre- and post-transplant in each subgroup, as well as between each subgroup and controls ($p = 0.0877$) (Figure 4).

Figure 4: Values of superoxide dismutase (SOD) in T1DM patients and controls. **A)** Levels of SOD in T1DM patients before (PRE) and 12 months after transplantation (POST) and the control group. Comparison of pre- and post-transplant using the Mann-Whitney test. Comparison between the experimental group (DM1) and control using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test. **B)** The figure represents levels of SOD in diabetic patients divided into responders and non-responders in their respective pre- and 12 months post-transplant, and SOD levels in the control group. Comparison of pre- and post-transplant using the Mann-Whitney test. Comparison between the experimental groups (DM1) and control using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test. * $p < 0.05$. Horizontal lines correspond to the median (larger) and the 1st and 3rd quartiles (smaller). PRE: just before starting the first stage of transplantation. POST: 12 months post-transplant.

Tocopherol

Tocopherol serum levels from the experimental group (DM1) at pre- and 12 months post-transplant time points were not significantly different ($p = 0.2399$). Lower serum tocopherol levels were found in the post-transplant compared with the control group ($p < 0.01$). When separating the experimental group in responders and non-responders, we found that there was no significant difference between the subgroups, but found lower tocopherol levels in the post-transplant time point in the non-responders subgroup when compared to the control group ($p < 0.05$) (Figure 5).

B

Figure 5: Tocopherol values in T1DM patients and controls. **A)** The figure represents the tocopherol levels in patients with T1DM before (PRE) and 12 months after transplantation (POST) and the control group. Comparison of pre- and post-transplant by unpaired t-test. Comparison between the experimental group (DM1) and control by ANOVA with Dunnett's post-test. **B)** The figure represents tocopherol levels in diabetic patients divided into responders and non-responders in their respective pre- and 12 months post-transplant, and tocopherol levels in the control group. Comparison of pre- and post-transplant using the Mann-Whitney test. Comparison between the experimental groups (DM1) and control using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test. The horizontal lines represent the means and upper and lower limits of standard deviation. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. The horizontal lines correspond to the median (larger) and the 1st and 3rd quartiles (smaller). PRE: just before starting the first stage of transplantation. POST: 12 months post-transplant.

DISCUSSION

Oxidative stress results from an imbalance between the production of free radicals and the availability of antioxidants.¹⁹ In the present study, we investigated whether patients with newly diagnosed type 1 diabetes showed changes in oxidative stress levels and autologous transplantation of hematopoietic stem cells (AHSCT) influenced such levels. We investigate also whether patients with glycemic control without using insulin, evaluated 12 months after transplantation, had levels of oxidative markers and antioxidant activity different from those that were in use of exogenous insulin. In fact, we observed that patients with DM1 had in the first weeks after diagnosis, increased serum levels of reduced glutathione (GSH) and isoprostane compared to non-diabetic patients. In addition, we found that 12 months after the AHSCT, diabetic patients maintained these levels unchanged, and other markers of oxidative stress and antioxidant activity. These results suggest that AHSCT does not influence the final balance of oxidative stress, although promoting an increase in C-peptide levels, thereby decreasing glycosylated hemoglobin levels (HbA1c) and exogenous insulin requirements.

Several studies emphasize that oxidative reactions occur more frequently in diabetic than in healthy individual.²⁰⁻²² The literature shows that increased oxidative stress occurs both at the beginning, and through development of diabetes.²³ It is related to the duration of disease and the efficacy of glucose control.²⁴ Thus, individuals with diabetes have increased free radical generation with consumption of circulating antioxidant levels.²² Such evidence corroborates our findings, showing that oxidative stress changes may be present already in the early stages after diagnosis of DM1.

Results from clinical and experimental studies have suggested that the process of lipid peroxidation is activated during different stages of DM1, and even while in its subclinical form.²⁵⁻²⁷ The extent of lipid peroxidation in red blood cells is directly proportional to the concentration of glucose in vitro²⁸ and the concentration of glycated hemoglobin.²⁹ Additionally, increased lipid peroxidation can be softened after glycemic control with the use of insulin in rats. In this sense, hyperglycemia is one of the factors that contributes to oxidative stress in individuals with DM1.²²

In our study, we found no differences in the levels of oxidative stress markers at 12 months after transplantation among patients who were, or not, in the use of exogenous insulin. We observed only lower tocopherol values in non-responder T1DM patients at 12 months post-transplant, when compared with controls. We believe this lack of significant difference may be explained, because even in use of insulin, patients had glucose levels under control at the time of the evaluation. The hypothesis is even more evident when we observe that only two patients in the non-responders had glycated hemoglobin levels above 8.0 at 12 months after transplantation, indicating that glycemic control was effective. On the other hand, the oxidative stress is considered a major risk factor in the onset and progression of diabetes, hyperglycemia as contributing relating to the progression and maintenance of that event. So once that is achieved glycemic control, there is a reduction in the formation of reactive oxygen species and the control of this redox status becomes restored.²²

We also observed higher concentration of isoprostane in patients with DM1 both at the pre- and 12 months post-transplant time points. Additionally, when evaluating malondialdehyde (MDA) levels, we observed increased concentrations only at the 12 months time point after transplantation, compared to the control group. Similarly, Dominguez C, *et al.* (1998)³⁰ observed that T1DM subjects had higher concentrations of MDA levels than non-diabetic controls both at the diagnosis and throughout the treatment. This was the first study to demonstrate elevated concentrations of MDA in early clinical T1DM. They also showed that once metabolic control had returned to normal, MDA concentrations decreased, suggesting that free radicals have its toxic effect at early stages of the disease. This finding contradicts a previous study, that did not find any differences in MDA levels among individuals with DM1 in use of exogenous insulin and a healthy control group.³¹ Other authors, who analyzed oxidative markers in obese children, showed higher MDA levels in patients with DM1 compared to those from other groups.³² Thus, we question whether, in the non-responsive group, the AHSCT the procedure could, by different mechanisms from those associated with DM1, contribute to a worsening of oxidative stress levels and thus determine the loss of glycemic control and increased insulin requirements. However, this argument does not explain why when divide patients into responders and non-responders, both groups had similar MDA levels before and 12 months after transplantation. The small number of

patients included may have hampered the analysis. We believe, moreover, that more than one mechanism is contributing to the imbalance of oxidative stress.

When we analyzed the antioxidant status of T1DM patients through GSH, we observed that its levels were increased in patients with DM1 already before transplantation, and that 12 months later it still remained higher than controls. GSH levels in patients with T1DM have been measured in previous studies with results that were different from our study. Chinese children with type 1 diabetes who were on insulin therapy, tended to have reduced levels of GSH, compared with healthy Chinese children.²⁴ In another study, GSH levels from females with DM1 in pubertal reproductive phase were lower than those from control subjects.³³ GSH levels were below normal from disease onset and during follow-up of children with T1DM, suggesting that chronic hyperglycemia increases the formation of free radicals, leading to increased oxidation and, therefore, to the depletion of GSH.³⁰ This information does not meet the results found in the present study, where GSH levels remained elevated even when the patients were metabolically controlled. Furthermore, our data suggest the existence of antioxidant activity even before the transplantation, probably due to the underlying disease, DM1, which naturally increases the production of free radicals. The fact that the GSH remained high, after 12 months of transplantation, even among the group of responders, suggests that there is a possible influence determined by the transplant procedure itself.

Another marker of antioxidant activity, the SOD was found reduced only 12 months after transplantation, suggesting that transplantation has increased oxidative stress and thus consumed agents with antioxidant activity. Alternatively, transplantation may have impaired the formation of such endogenous antioxidants. Similarly, when assessing diabetic children from diagnosis, they found SOD levels increased at diagnosis and during follow-up, compared with the control group. They also observed that the concentration of SOD was higher at diagnosis and decreased as treatment evolved, but without statistical difference.³⁰ Also in agreement with this study, SOD levels were measured in children and adolescents divided into three groups: individuals with DM1, siblings of individuals with DM1 and healthy individuals from non-diabetic families. SOD levels were decreased in the groups of patients with T1DM and brothers of patients with T1DM, when compared with controls.³⁴ In contrast, another study found lower levels of SOD in control group individuals when compared to those of patients with DM1 individuals, but without statistical difference.³³

Similarly to SOD, tocopherol was also found reduced only at the 12 months time point after transplantation. These findings may suggest that in the early stages of the disease, patients with type 1 diabetes produce more antioxidants to combat the increased free radical production, and that the oxidative stress worsens after transplantation, with low concentration of markers of antioxidant activity at 12 months post-transplant. Hsu et al (2006)²⁴ found increased levels of this marker, but only when patients with DM1 were decompensated ($HbA1c \geq 8.5$). Different results were found in another study, pointing to the largest concentration of tocopherol in the control group individuals when compared to diabetics. However, the study did not assess whether levels of tocopherol altered between the control and the uncontrolled metabolism of DM1 patients.³³ There are also findings that insulinized diabetics have a higher concentration of tocopherol as compared to the control group, but without statistical difference.³⁵

When comparing patients subdivided into responders and non-responders, we found a higher concentration of isoprostane at the pre-transplantation time point

in the group of non-responders, and a greater concentration of this marker in both pre- and 12 months post-transplantation time points in the subset of responders. This suggests that these patients already have the redox imbalance before transplantation, and that oxidative stress had worsened after 12 months of AHSCT. The literature demonstrates associations between glycemic control and oxidative stress levels. A study diabetic patients divided according to the time insulin treatment - at least 10 years or more - observing increased levels of SOD as the disease progressed, suggesting that insulinized patients remained protected against oxidative stress.³⁶ Thus, we believe that the transplant has contributed to worsen oxidative stress in these patients. Possible mechanisms for this outcome could be late effects of chemotherapy used for transplantation,³⁷ or even excessive dietary restriction^{38,39} in patients after transplantation in an attempt to maintain glycemic control through reduced caloric intake.

Contributing to these observations, we found that the GSH levels remained high in both subgroups of our study, and in both moments: pre and post-transplant. This suggests that the antioxidant activity of these patients was not altered in different metabolic conditions. GSH levels were higher in pre-transplantation time points, in which patients were metabolically controlled with the use of insulin, and remained at these levels at the 12 month after transplantation time point, whether patients were on or off insulin use. These results disagree with literature evidence showing a negative correlation between levels of GSH and HbA1C,³⁶ reinforcing the hypothesis that the transplant procedure may contribute to worsen the levels of oxidative stress.

This study has several limitations. Importantly, the retrospective nature of the study, not only limited the availability of samples, but also more detailed information related to dietary habits, social and physical activities of the patients. It is known that several exogenous sources contribute to the generation of reactive species (free radicals) such as ultraviolet rays, ionizing radiation, chemotherapeutic drugs and xenobiotics.³⁷ Therefore, association analyzes of oxidative stress markers with chemotherapeutic drugs used in the transplant protocol should be performed and analyzed. Also in this context, the antioxidant defense also derives from a non-enzymatic system, which undergoes changes primarily through food intake,⁴⁰ so nutritional counseling based on food consumption would be important to avoid bias relating to nutritional habits. On the other hand, it is an original study, that in assessing the effects of AHSCT on oxidative stress of T1DM patients, provides basis for future expectations and interventions upon the transplant protocol.

As oxidative stress levels correlates directly to the incidence and severity of chronic complications determined by diabetes, we believe that proper control of this metabolic aspect may influence the clinical outcome of patients in the long term. However, as we observed no improvement in oxidative stress levels after AHSCT, with a risk that it may even have increased as a result of the procedure, we question whether it would be beneficial to replenish antioxidants during AHSCT in order to obtain better balance between the reduction and oxidation reactions. Before reaching such a degree of intervention, however, it is mandatory to define how the transplant procedure contributes to this imbalance of oxidative stress and, additionally to other stimuli, participates in this reaction.

For the future, controlled, prospective studies with larger numbers of patients and biological samples, and longer duration of clinical and laboratory monitoring could clarify the outstanding questions. Thus, to overcome some of the limitations observed in this study, we propose applying detailed dietary and physical activity

records through pre-established questionnaires, and collection of biological samples at other time points after transplantation to characterize and if possible, quantify the contribution of each factor on oxidative stress. Additionally, investigation of the effects of AHSCT on oxidative stress at the molecular level, exploring gene expression and possible epigenetic changes may contribute to the field.

References

1. Guyton AC. Endocrinologia e Reprodução. In: Guyton AC. **Fisiologia Humana**. Ed. Guanabara Koogan, 6ª ed, 455-483, 1988.
2. Srikanta S, Ganda OP, Einsenbarth GS, Soeldner JS. Islet-cell antibodies and beta-cell function in monozygotic triplets and twis initially discordant for Type I diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**. 308 (6): 322-5, 1983.
3. Palmer JP, Fleming GA, Greenbaum CJ, Herold KC, Jansa LD, Kolb H, Lachin JM, Polonsky KS, Pozzilli P, Skyler JS, Steffes MW. C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function: report of an ADA workshop, 21-22 October 2001. **Diabetes**, 53: 250-264, 2004.
4. Notkins AL, Lernmark A. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. **Journal of Clinical Investigation**, 108 (9): 1247-1252, 2001.
5. Rodacki M, Milech A, De Oliveira JEP. A secreção residual do peptide C faz diferença no tratamento do diabetes melito tipo 1? **Arq Bras Endocrinol Metab**, 52(2): 322-33, 2008.
6. Mylona-Karayanni C, Gourgiotis D, Bossios A, Kamper EF. Oxidative stress and adhesion molecules in children with type 1 diabetes mellitus: a possible link. **Pediatric Diabetes**, 7: 51-59, 2006.
7. Wadén J, Forsblom C, Thorn LM, Gordin D, Saraheimo M, Groop PH. A1C variability predicts incident cardiovascular events, microalbuminuria, and overt diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. **Diabetes**, 58: 2649-55, 2009.
8. Sies H. Role of reative oxygen species in biological processes. **Klin Wochenschr**, 69 (21-23): 965-968, 1991.
9. Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. **Biochem Biophys Res Commun**, 173(3): 932-9, 1990.
10. Brownlee M. Glycation and diabetic complications. **Diabetes**, 43(6): 836-41, 1994.
11. Murakami K, Kondo T, Ohtsuka Y, Fujiwara Y, Shimada M, Kawakami Y. Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. **Metabolism**, 38(8): 753-8, 1989.
12. Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE, Schreiner W, Toma C, Knoebl P, Pietschmann P, Prager R, Schnack C, Schernthaner G, *et al*. Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. **Am J Med**, 98(5): 469-75, 1995.

13. Erciyas F, Taneli F, Arslan B, Uslu Y. Glycemic control, oxidative stress, and lipid profile in children with type 1 diabetes mellitus. **Arch Med Res**, 35: 134-40, 2004.
14. Shamir R, Kassis H, Kaplan M, Naveh T, Shehadeh N. Glycemic control in adolescents with type 1 diabetes mellitus improves lipid serum levels and oxidative stress. **Pediatric Diabetes**, 9: 104-09, 2008.
15. Battaglia M, Roncarolo MG. Immune intervention with T regulatory cells: past lessons and future perspectives for type 1 diabetes. **Seminars in Immunology**, 23: 182-194, 2011.
16. Gerard-Monnier D, Erdelmeier I, Regnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudiere J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. **Chem Res Toxicol**, 11(10):1176-83, 1998.
17. Sedlack J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and non protein sulphydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.
18. Fabianek J, Defilippi J, Rickards T. Micromethod for tocopherol determination in blood serum. **Clinical Chemistry**, 14(5), 1968.
19. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cells as viewed through the redox state of the glutathione. **Free Radic Biol Med**, 30(11): 1191-212, 2001.
20. Jain Sk, Levine SN, Duett J, Hollier B. Elevated lipis peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin-treated diabetic rats. **Metabolism**, 39(9): 971-975, 1990.
21. Bloch-Damti A, Bashan N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, 7(11 & 12): 1553-1567, 2005.
22. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radic Biol Med**, 50: 567-575, 2011.
23. Martín-Gallán P, Carrascosa A, Gussinye M, Domínguez C. Estimation of lipoperoxidative damage and antioxidant status in diabetic children: relationship with individual antioxidants. **Free Radic Res**, 39(9): 933-942, 2005.
24. Hsu WT, Tsai LY, Lin SK, Hsiao JK, Chen BH. Effects of diabetes and glycemic control on free radicals in children with type 1 diabetes mellitus. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, 36(2): 174-178, 2006.
25. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clinical Chemistry**, 52(4): 601-623, 2006.

26. Krzystek-Kospacka M, Salmonowicz B, Boehm D, Berdowska I, Zielinski B, Patryn E, Noczynska A, Gamian A. Diagnostic potential of oxidative stress markers in children and adolescents with type 1 diabetes. **Clinical Biochemistry**, 41: 48-55, 2008.
Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>
27. Takayanagi R, Inoguchi T, Ohnaka K. Clinical and experimental evidence for oxidative stress as an exacerbating factor of diabetes mellitus. **J Clin Biochem Nutr**, 48 (1): 72-77, 2011.
28. Jain SK. Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. **J Biol Chem**, 264(35): 21340-21345, 1989.
29. Jain SK, McVie R, Duett J, Herbst JJ. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. **Diabetes**, 38(12): 1539-1543, 1989.
30. Domínguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. **Diabetes Care** 21: 1736-1742, 1998.
31. Vessby J, Basu S, Mohsen R, Berne C, Vessby B. Oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus. **Journal of Internal Medicine**, 251: 69-76, 2002.
32. Codoñer-Franch P, Pons-Morales S, Boix-García L, Valls-Ballés V. Oxidant/antioxidant status in obese children compared to pediatric patients with type 1 diabetes mellitus. **Pediatric Diabetes**, 11: 251-257, 2010.
33. Kolesnikova LI, Darenskaya MA, Semenova NV, Grebenkina LA, Suturina LV, Dolgikh MI, Gnusina SV. Lipid peroxidation and antioxidant protection in girls with type 1 diabetes mellitus during reproductive system development. **Medicina**, 51: 107-111, 2015.
Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>
34. Salmonowicz B, Krzystek-Korpacka M, Noczynska A. Trace elements, magnesium and the efficacy of antioxidant system in children with type 1 diabetes mellitus and in their siblings. **Adv Clin Exp Med**, 23(2): 259-268, 2014.
35. Asayama K, Uchida N, Nakane T, Hayashibe H, Dobashi K, Amemiya S, Kato K, Nakazawa S. Antioxidantes in serum of children with insulin-dependent diabetes mellitus. **Free Radic Biol Med**. 15: 597-602, 1993.
36. Seghrouchni I, Draï J, Bannier E, Riviere J, Calmard P, Garcia I, Orgiazzi J, Revol A. Oxidative stress parameters in type 1 and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. **Clinica Chimica Acta**, 321: 89-96, 2002.
37. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova**, 30(5): 1323-38, 2007.

38. Agnello E, Malfi G, Constantino AM, Massarenti P, Pugliese M, Fortunati N, Catalano MG, Palmo A. Tumor necrosis factor alpha and oxidative stress as maintaining factors in the evolution of anorexia nervosa. **Eat Weight Disord**, 17(3): 194-199, 2014.
39. Victor VM, Rovira-Llopis S, Saiz-Alarcon V, Sangüesa MC, Rojo-Bofill L, Bañuls C, Falcón R, Castelló R, Rojo L, Rocha M, Hernández-Mijares A. Altered mitochondrial function and oxidative stress in leukocytes of anorexia nervosa patients. **PLoS One**, 9(9), 2014.
40. Huguenin GVB, Oliveira GMM, Moreira ASB, Saint'pierre TD, Gonçalves RA, Pinheiro-Mulder AR, Teodoro AJ, Luiz RR, Rosa G. Improvement of antioxidant status after Brazil nut intake in hypertensive and dyslipidemic subjects. **Nutrition Journal**, 15(54), 2015.