

JANICE SEPÚLVEDA REIS

**DIABETES TIPO 1: ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O BALANÇO
OXIDANTE/ANTIOXIDANTE COM PARÂMETROS CLÍNICOS E
BIOQUÍMICOS**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação e Pesquisa da Santa Casa**
de Belo Horizonte, para obtenção do título de
Mestre em Medicina/Endocrinologia.

ORIENTADORES:

Prof. Dr. José Augusto Nogueira Machado
Dra. Adriana Aparecida Bosco

**MINAS GERAIS
2006**

SANTA CASA DE BELO HORIZONTE

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

PROVEDOR:

Dr. Saulo Levindo Coelho

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA
MÉDICA/BIOMEDICINA:

Prof. Dr. Francisco das Chagas Lima e Silva

ÓRGÃOS FINANCIADORES:

CNPq – Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Arildo e Darcy, que mesmo nos momentos mais difíceis nunca deixaram de acreditar que eu conseguiria completar mais esta etapa.

Ao meu irmão Aldo, que apesar de todas as dificuldades que tem enfrentado, sempre me dedicou o maior amor do mundo.

Ao meu irmão Bruno, por todo o apoio, força, coragem e exemplo de paciência.

A Ana Paula, minha cunhada, a quem considero irmã, muito obrigada por todo o amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof. Dr. José Augusto Nogueira Machado e Dra. Adriana Aparecida Bosco, por todo o incentivo, paciência, disponibilidade, ensinamentos e motivação durante todo este percurso.

Aos colegas constantes do laboratório, Clara, Rafael, Érica e Camila: sem vocês teria sido muito, muito difícil chegar a este momento.

A todos os professores e funcionários da pós-graduação, pelo carinho com que me receberam e apoiaram no laboratório.

Ao Dr. Saulo Purisch, Coordenador da Clínica de Endocrinologia da Santa de Belo Horizonte, a quem agradeço por todas as oportunidades, pelo carinho e por todo o incentivo que sempre recebi ao longo destes anos de convívio.

Ao Dr. Pedro W. Souza do Rosário, por todo o incentivo e oportunidades em seis anos de convívio e por ter sido sempre o grande incentivador da pesquisa na Clínica de Endocrinologia, motivando a todos a acompanhá-lo em sua carreira brilhante.

À toda a equipe de Endocrinologia da Santa Casa de Belo Horizonte, pelo incentivo, carinho e apoio durante todo este trajeto, incluindo Cláudia e Vera, nossas secretárias e grandes incentivadoras do meu sucesso.

À Dra. Angélica M.P. Tibúrcio e ao Dr. Daniel Dutra , pela disponibilidade e dedicação com que me ajudaram na execução deste trabalho e a seus primos e sobrinhos maravilhosos, que não hesitaram em colaborar tão prontamente.

À Dra. Patrícia A.F.C.Menezes, coordenadora do ambulatório de diabetes tipo 1 da Santa Casa de Belo Horizonte, grande incentivadora das minhas conquistas: muito obrigada por tudo!

À Bárbara, Débora e Beatriz, por todos os momentos felizes e conquistas no ambulatório de diabetes tipo 1.

Às minhas amigas queridas, Ana Luiza, Joyce e Ludmilla, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais importantes dos últimos anos.

Ao meu amigo Rodrigo N. Lamounier, que de “tão longe, tão perto” participou ativamente de todas as minhas conquistas neste ano: muito obrigada pelas incontáveis horas dedicadas em palavras de apoio, ensinamentos e carinho.

Ao Dr. Hélio Gomes Guimarães e toda a equipe do Laboratório Analys, pelo apoio, colaboração, eficiência e pronta disponibilidade com que sempre me ajudaram.

A todos os pacientes e doadores que participaram do trabalho, sem os quais nada disto poderia ser realizado.

E finalmente, a Deus, por me permitir conviver com todas estas pessoas especiais!

Sumário	Página
Lista de abreviaturas	i
Lista de tabelas	iii
Lista de esquemas	v
Lista de figuras	vi
Lista de gráficos	vii
Resumo	viii
Índice Geral	
Introdução	1
Objetivos	12
Material e métodos	13
Resultados	20
Discussão	39
Conclusões	45
Referências	46

LISTA DE ABREVIATURAS

AGES: produtos avançados da glicosilação não enzimática

DAG: diacilglicerol

DP: desvio-padrão

E/C: experimento em presença (E) e em ausência (C) de PDB

EP: erro-padrão

ET-1: endotelina-1

HDL: lipoproteína de alta densidade

HO₂: hidroperoxila

HOCL: ácido hipocloroso

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LO: alkoxila

LO₂: peroxila

MTT: 3-(4,5-dimetithylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

N: número de amostras

NAD(P)H- Forma reduzida de NADP⁺

NF-κB: fator nuclear κB

nm: nanômetro

NS: não significativo

O₃: ozônio

O₂⁻: superóxido

OH: hidroxila

PAI-1: inibidor do plasminogênio tecidual – 1

PBS: tampão fosfato salino

PDB: éster de forbol (12,13 forbol dibutirato)

PKC: proteína quinase C

RLU: unidades relativas de luz

ROS: espécies reativas de oxigênio

TGF- β : fator de crescimento transformador β

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial

μ L: microlitros

LISTA DE TABELAS

PÁGINA

Tabela 1.	Espécies reativas de oxigênio	4
Tabela 2.	Características clínicas da população avaliada	20
Tabela 3.	Parâmetros bioquímicos da população avaliada	21
Tabela 4.	Quantificação do status antioxidante do plasma em diabéticos tipo 1 e não diabéticos	22
Tabela 5.	Produção de ROS por granulócitos de diabéticos tipo 1 e não diabéticos	24
Tabela 6.	Correlação do status antioxidante do plasma e produção de ROS em diabéticos tipo 1 e não diabéticos	25
Tabela 7.	Correlação do status antioxidante do plasma e níveis de albumina e ácido úrico em diabéticos tipo 1 e não diabéticos	28
Tabela 8.	Correlação entre a produção de ROS em ausência de PDB e níveis de albumina e ácido úrico em diabéticos tipo 1 e não diabéticos	30
Tabela 9.	Correlação entre a produção de ROS em presença de PDB e níveis de albumina e ácido úrico em diabéticos tipo 1 e não diabéticos	30
Tabela 10.	Correlação do status antioxidante do plasma e parâmetros clínicos e bioquímicos em diabéticos tipo 1	32
Tabela 11.	Correlação do status antioxidante do plasma e parâmetros clínicos e bioquímicos em não diabéticos	33
Tabela 12.	Correlação entre a produção de ROS em ausência de PDB e parâmetros clínicos e bioquímicos em diabéticos tipo 1	34
Tabela 13.	Correlação entre a produção de ROS em presença de PDB e parâmetros clínicos e bioquímicos em diabéticos tipo 1	35

LISTA DE TABELAS

PÁGINA

Tabela 14.	Correlação entre a produção de ROS em ausência de PDB e parâmetros clínicos e bioquímicos em não	36
------------	--	----

diabéticos

Tabela 15. Correlação entre a produção de ROS em presença de PDB e parâmetros clínicos e bioquímicos em não diabéticos

37

LISTA DE ESQUEMAS

PÁGINA

Esquema 1. Representação das anormalidades estruturais e funcionais decorrentes da ativação da via DAG-PKC hiperglicemia induzida	8
Esquema 2. Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia	10
Esquema 3. Purificação de granulócitos	17

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1.	Via dos polióis	3
Figura 2.	Aumento da produção de AGEs e suas conseqüências patológicas	5
Figura 3.	Ativação da NADPH oxidase	7
Figura 4.	Fontes de DAG	7
Figura 5.	Aumento da atividade da via das hexosaminas pela hiperglicemia	9
Figura 6.	Produção de ROS por granulócitos de diabéticos tipo 1 e não diabéticos na ausência de PDB	23

LISTA DE GRÁFICOS

PÁGINA

Gráfico 1.	Correlação entre o <i>status</i> antioxidante do plasma e a produção de ROS, em presença de PDB, em diabéticos tipo 1.	26
Gráfico 2.	Correlação entre o <i>status</i> antioxidante do plasma e a produção de ROS, em presença de PDB, em não diabéticos.	26
Gráfico 3.	Correlação entre o <i>status</i> antioxidante do plasma e os níveis de ácido úrico, em não diabéticos.	29
Gráfico 4.	Correlação entre a produção de ROS, em presença de PDB, e os níveis de ácido úrico, em não diabéticos.	31
Gráfico 5.	Correlação entre a produção de ROS, em presença de PDB, e o IMC, em não diabéticos.	38

RESUMO

No diabetes, hiperglicemia persistente tem sido implicada na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e em alterações nas vias de sinalização, com alterações no balanço oxidante/antioxidante estando diretamente relacionada à patogenia das complicações da doença. O objetivo deste estudo foi quantificar o *status* antioxidante do plasma e a produção de ROS por granulócitos de diabéticos tipo 1, nos primeiros cinco anos após o diagnóstico, em comparação a não diabéticos, correlacionando-os com parâmetros clínicos e bioquímicos. Observamos semelhança no *status* antioxidante do plasma entre diabéticos tipo 1 e não diabéticos ($p > 0,05$), maior produção de ROS nos diabéticos tipo 1 ($p < 0,05$) e correlação direta entre aumento da capacidade antioxidante e produção de ROS nos dois grupos. Em relação aos parâmetros avaliados (idade, duração da doença, dose diária de insulina, IMC, controle glicêmico, perfil lipídico e PCR ultra-sensível), não encontramos correlação com *status* antioxidante ou produção de ROS no grupo de diabéticos. Os nossos resultados sugerem, que ao menos nos primeiros anos após o diagnóstico, o organismo mantém uma resposta antioxidante compensatória ao estresse oxidativo, preservando o balanço oxidante/antioxidante.

INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) representa um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia. Essa hiperglicemia é resultado de alterações entre a insulina e seu respectivo receptor, na secreção de insulina ou em ambos (1).

Com base em um significativo conjunto de evidências, tem sido sugerido que uma epidemia de diabetes está em curso. Em 1985 estimava-se 30 milhões de adultos com DM no mundo; este número alcançou 135 milhões em 1995, atingindo 175 milhões em 2002, com projeção de chegar a 360 milhões em 2030. Cerca de dois terços destes indivíduos vivem nos países em desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade, com crescente proporção de pessoas afetadas em grupos etários mais jovens (1).

O número de indivíduos diabéticos está aumentando devido ao crescimento e ao envelhecimento populacional, à maior urbanização, à crescente prevalência de obesidade e sedentarismo, além da maior sobrevida do paciente com diabetes. No Brasil, no final dos anos 1980, a prevalência de DM na população adulta foi estimada em 7,6% (2); dados mais recentes apontam para taxas mais elevadas, como 12,1 % no estudo de Ribeirão Preto, SP (3). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2030, o Brasil terá cerca de 11,3 milhões de indivíduos diabéticos, ocupando então o sexto colocado no *ranking* de números de casos da doença.

A classificação atual do DM, proposta pela OMS e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) inclui quatro classes clínicas, sendo as mais prevalentes (4,5):

1. **Diabetes Mellitus tipo 1 (DM 1):** representa 5-10% dos casos e é o resultado de uma destruição das células beta pancreáticas com conseqüente deficiência de secreção de insulina. Na maioria dos casos, essa destruição é mediada por efetores auto-ímmunes (auto-anticorpos): antiinsulina (IAA), antidescarboxilase do ácido glutâmico (GAD) e antitirosina-fosfatase (IA2) (6). Clinicamente, o diagnóstico de DM 1 é definido pela OMS como hiperglicemia sintomática e/ou cetoacidose diabética à apresentação da doença, com necessidade de tratamento com insulina imediatamente após o diagnóstico (4).

2. **Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2):** é a forma presente em 90-95% dos casos e caracteriza-se por defeitos na ação (resistência à insulina) e na secreção de insulina. A maioria desses pacientes apresenta sobrepeso ou obesidade e cetoacidose diabética raramente ocorre. Os pacientes não são dependentes de insulina exógena para sobrevivência, porém podem necessitar desta modalidade de tratamento para a obtenção de um controle metabólico adequado. Diferentemente do DM 1, não há indicadores específicos para o DM 2 (5).

Os principais sintomas do diabetes incluem poliúria, polidipsia, perda de peso e polifagia. As conseqüências agudas, que podem acarretar risco de vida ao paciente não controlado, são a cetoacidose e a síndrome hiperosmolar não cetótica, respectivamente nos tipos 1 e 2, além da hipoglicemia, que pode ocorrer em ambos. A longo prazo, porém, é que se estabelece o grande impacto social de sua morbidade e mortalidade, devido às complicações, que incluem: retinopatia com potencial perda da visão; nefropatia levando à insuficiência renal; neuropatia periférica com risco de úlceras nos pés; neuropatia autonômica causando sintomas gastrointestinais e gênito-urinários e doenças cardiovasculares (7).

As razões para a arteriosclerose acelerada manifestada em pacientes com DM ainda não são completamente compreendidas, tendo sido sugeridos como mecanismos prováveis os efeitos tóxicos diretos da glicose sobre a vasculatura, a resistência à insulina e a associação do DM a outros fatores de risco (8). Os resultados do *The Diabetes Control and Complications Trial Research Group* (DCCT) (9) e do *UK Prospective Diabetes Study* (UKPDS) (10) demonstraram a relação direta entre os níveis de hiperglicemia cronicamente mantida e as complicações micro e macrovasculares, mostrando que a hiperglicemia é o fator determinante inicial principal na patogênese das complicações do DM. O aumento de glicose intra-celular é o principal determinante do dano tecidual causado pelo DM, dano este que pode ser reversível quando restaurada a condição de normoglicemia, ou irreversível, mesmo revertida a hiperglicemia, porém em um momento em que já ocorreram lesões em órgãos alvo (11).

Vários mecanismos bioquímicos têm sido propostos para explicar as anormalidades estruturais e funcionais associadas com a exposição prolongada dos tecidos vasculares à hiperglicemia, tais como:

A) Aumento da atividade da aldose redutase – Via dos polióis

A hiperglicemia, com conseqüente aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) (tabela 1) pode reduzir os níveis de óxido nítrico (NO) e daí ativar a aldose redutase. O aumento do fluxo pela via dos polióis, induzido pelo aumento de ROS, determina maior conversão de glicose a sorbitol, o que acarreta concomitantemente redução de NADPH e glutathione (antioxidante intracelular), aumentando o estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia. O sorbitol é convertido a frutose, resultando em aumento da relação $NADH: NAD^+$, o que aumentaria a síntese “de novo” de diacilglicerol, e daí ativação da PKC (figura 1) (12).

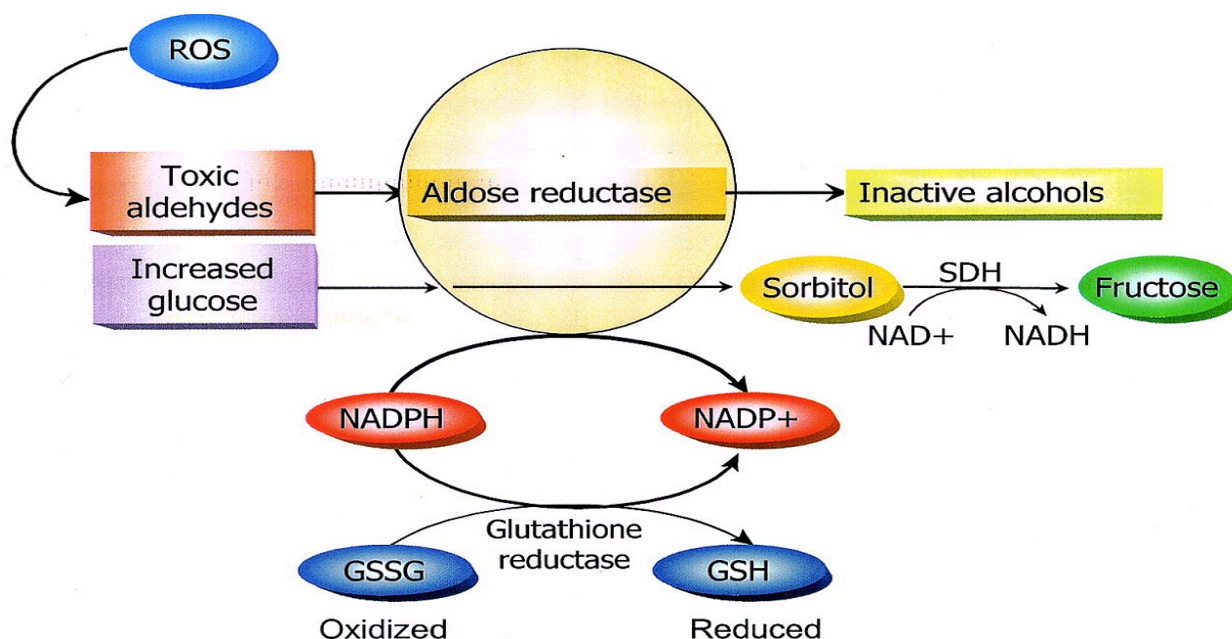


Figura 1. Via dos polióis.

Fonte: Brownle, M. (13)

Tabela 1: Espécies Reativas de Oxigênio

Radicais	Não radicais
----------	--------------

Superóxido $\cdot O_2$
Hidroxiila $OH\cdot$
Peroxila LO_2
Alkoxila $LO\cdot$
Hidroxi-peroxila HO_2

Peróxido de hidrogênio H_2O_2
Ácido hipocloroso $HOCl$
Ozônio O_3
Oxigênio “singlet”
Peróxidos lipídicos

Fonte: Darley-Usmar et al. (14)

B) Formação de produtos avançados da glicosilação não-enzimática (AGEs)

Os AGEs são proteínas ou lipídios que se tornam glicosilados após a exposição a açúcares oxidados e contribuem para o desenvolvimento de arteriosclerose. Acredita-se que atuam modificando:

1. Proteínas intracelulares envolvidas na regulação gênica;
2. Moléculas da matriz extracelular vizinha, interferindo na sinalização entre a matriz e a célula, causando disfunção celular;
3. Proteínas, como a albumina, que então ativam os receptores de AGEs, levando à aumento da produção de ROS, aumento da transcrição do fator nuclear NF- κ B, causando a produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento (figura 2) (15).

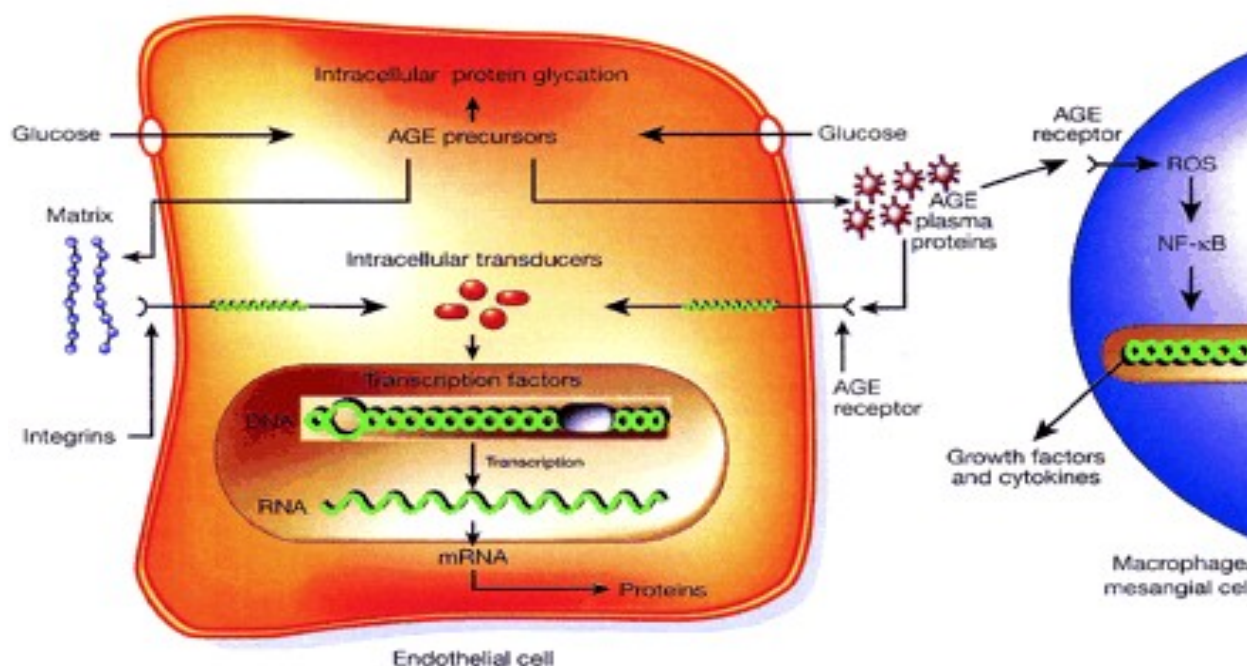


Figura 2. Aumento da produção dos AGEs e suas conseqüências patológicas.
 Fonte: Brownle,M. (13)

C) Ativação da proteína quinase C (PKC) por diacilglicerol (DAG) induzido pela hiperglicemia

Estudos recentes (16) indicam que uma NAD(P)H-oxidase tipo fagocítica é a maior fonte de produção de ROS em muitas células não fagocíticas, incluindo fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliais, células mesangiais renais e células tubulares renais. Este sistema enzimático foi originalmente descoberto em neutrófilos, que são potenciais fontes de quantidades milimolares de superóxido durante a fagocitose e são vitais para a defesa inata. A produção de ROS pela oxidase, em pequenas quantidades, pode funcionar na sinalização metabólica e, em grandes quantidades, pode originar um dano oxidativo. Os tipos celulares encontrados nas paredes dos vasos geralmente possuem NAD(P)H-oxidases semelhantes às fagocíticas, as quais são ativadas em condições fisiológicas. Essas oxidases parecem ter múltiplas funções, controlando funções vasculares, respostas à expressão gênica, sinalização em numerosos processos celulares como crescimento, apoptose, migração e remodelação da matriz extracelular. No entanto, em determinadas patologias, como o

diabetes mellitus, ocorre um aumento na produção de ROS que ultrapassa o limiar fisiológico, causando danos celulares, principalmente às células endoteliais (17).

A NAD(P)H-oxidase é formada por sub-unidades de membrana, tais como gp91^{phox}, p22^{phox} e sub-unidades citosólicas, tais como p47^{phox} e p67^{phox}. Quando ativadas algumas sub-unidades são fosforiladas por várias quinases, incluindo a PKC, sendo translocadas para a membrana, formando a oxidase ativa cataliticamente (figura 3) (18,19).

A PKC é uma das 3 principais quinases serina-treonina (fosforilam proteínas em resíduos de serina e de treonina). Ela está envolvida em eventos de transdução de sinais, respondendo a estímulos específicos hormonais, neuronais e de fatores de crescimento. Atua catalisando a transferência de um grupo fosfato do ATP (adenosina tri-fosfato) a várias proteínas. Da mesma forma, a PKC também sofre fosforilações antes de ser ativada, o que ocorre durante sua translocação do citosol para a membrana da célula. Sua ativação e translocação do citosol à membrana plasmática ocorrem em resposta a aumento transitório de DAG ou exposição a agentes exógenos, como por exemplo, os ésteres de forbol (20).

A família PKC inclui 11 isoformas (α , β 1, β 2, γ , δ , ϵ , ξ , η , θ , λ , μ), classificadas em convencionais (cPKC, cálcio-dependentes, ativadas pela fosfatidil-serina e pelo DAG); original (nPKC, cálcio-independentes, reguladas pelo DAG e fosfatidilserina) e atípicas (aPKC, cálcio-independentes, não requerem DAG para ativação, mas fosfatidil-serina para regular sua atividade) (21).

O DAG é o principal ativador fisiológico da PKC; deriva de múltiplas fontes, incluindo a hidrólise de fosfatidil-inositídeos, metabolismo da fosfatidil-colina por ação de fosfolipases ou pela síntese “de novo”. Também é possível que a ativação da via DAG-PKC induzida pela hiperglicemia seja resultado de glico-oxidação, já que existem evidências de que alguns oxidantes, como H₂O₂, podem ativar a PKC (figura 4) (13).

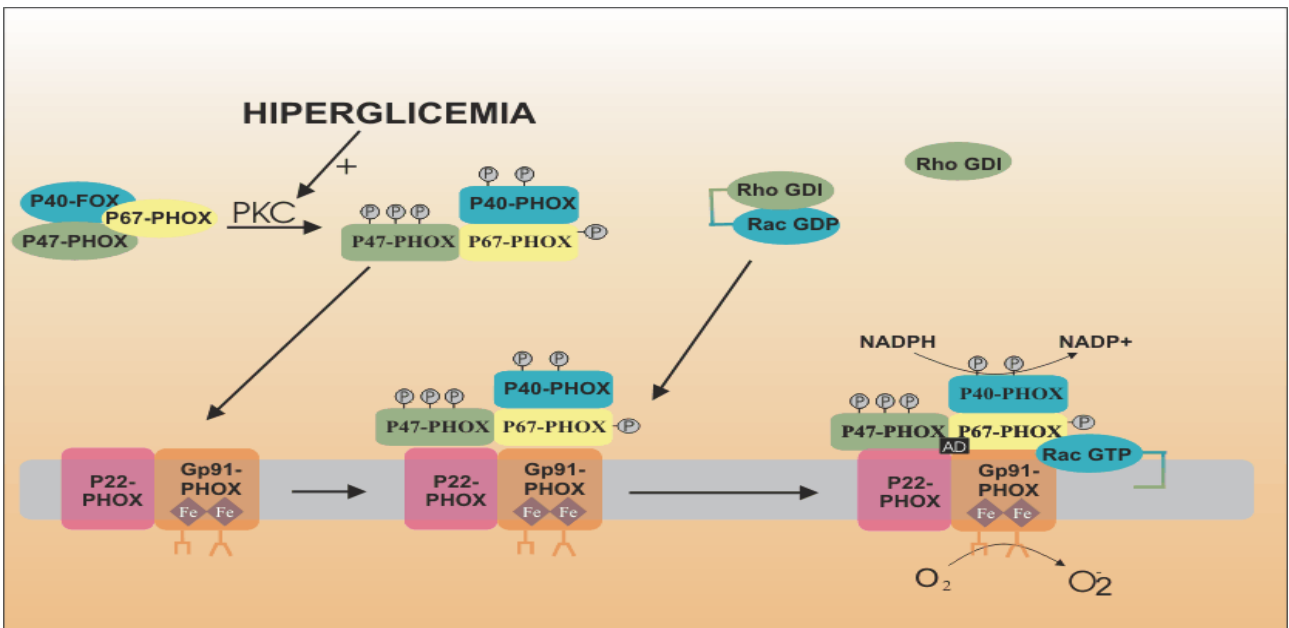


Figura 3. Ativação da NADPH oxidase. Em células em repouso, os componentes da NADPH oxidase estão distribuídos no citosol e na membrana. Quando a célula é ativada, os componentes citosólicos p47^{phox}, p67^{phox} e p40^{phox} são fosforilados e migram para a membrana, onde associam com os componentes da membrana gp91^{phox} e p22^{phox}. Ao mesmo tempo, a rac 2 muda seu GDP para GTP, dissocia de seu inibidor rho-GDI e migra para a membrana. O citocromo b₅₅₈, que contém grupos heme e flavina, é então ativado pelo p67^{phox} via ativação do seu domínio e da rac 2, que promove a interação entre p67^{phox} e citocromo b₅₅₈. A NADPH oxidase ativada usa a NADPH citosólica para reduzir o oxigênio e formar ânions superóxido.

Fonte: El-Benna, J. et al. (19).

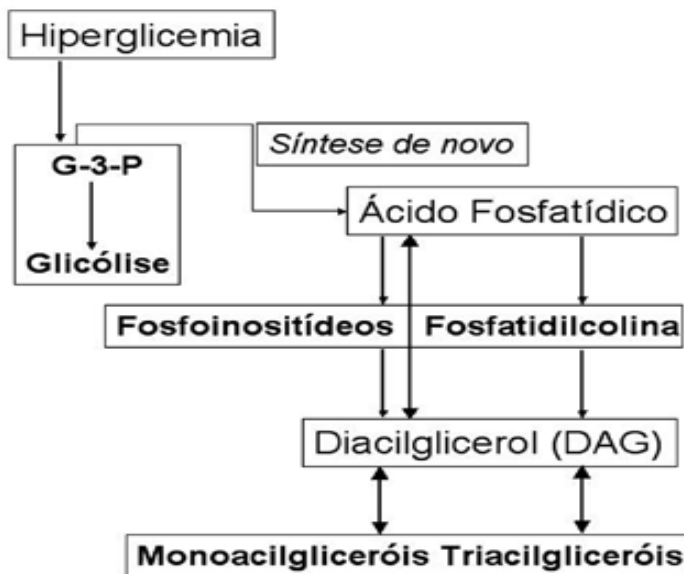
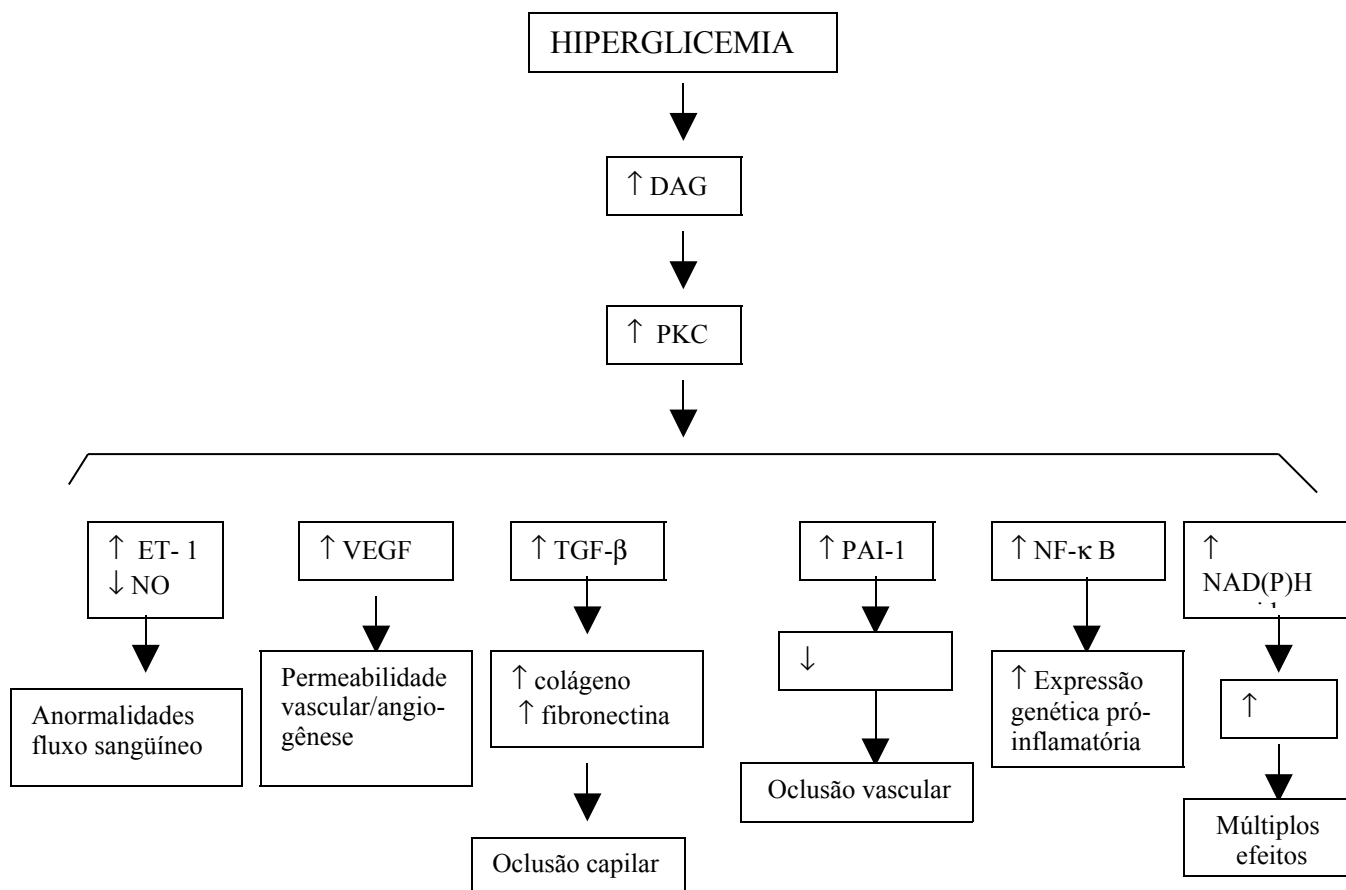


Figura 4. Fontes de DAG.

Fonte: Brownle, M. (13)

A via DAG-PKC é importante na regulação da permeabilidade vascular, contratilidade, proliferação celular, angiogênese, ação de citocinas, adesão leucocitária, sendo todas estas alterações descritas e importantes no diabetes (esquema 1) (22).



Esquema 1. Representação das anormalidades estruturais e funcionais decorrentes da ativação da via DAG-PKC hiperglicemia induzida.

ET-1: endotelina-1; NO: óxido nítrico; VEGF: fator de crescimento celular derivado do endotélio; TGF-β: fator transformador do crescimento-beta; PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio 1; NF-κ B: fator nuclear κ-B; NAD(P)H- Forma Reduzida de NADP⁺ ; ROS: espécies reativas de oxigênio.
Fonte: Koya D e cols. (22)

D) Aumento da atividade da via das hexosaminas

Por este mecanismo, o aumento da glicose intracelular resulta em metabolização final de frutose-6-fosfato a uridina difosfato-N-acetil glucosamina (UDPGlcNAc), resultando em mudanças patológicas na expressão gênica, podendo aumentar a produção de citocinas inflamatórias e fatores de transcrição (figura 5) (23).

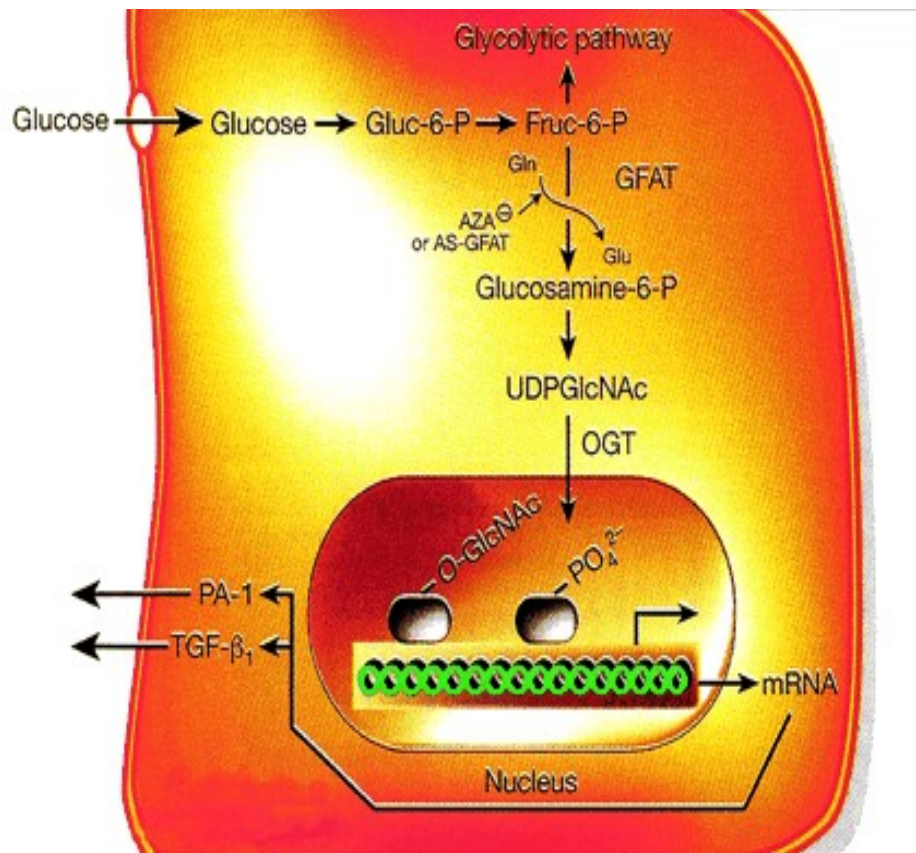
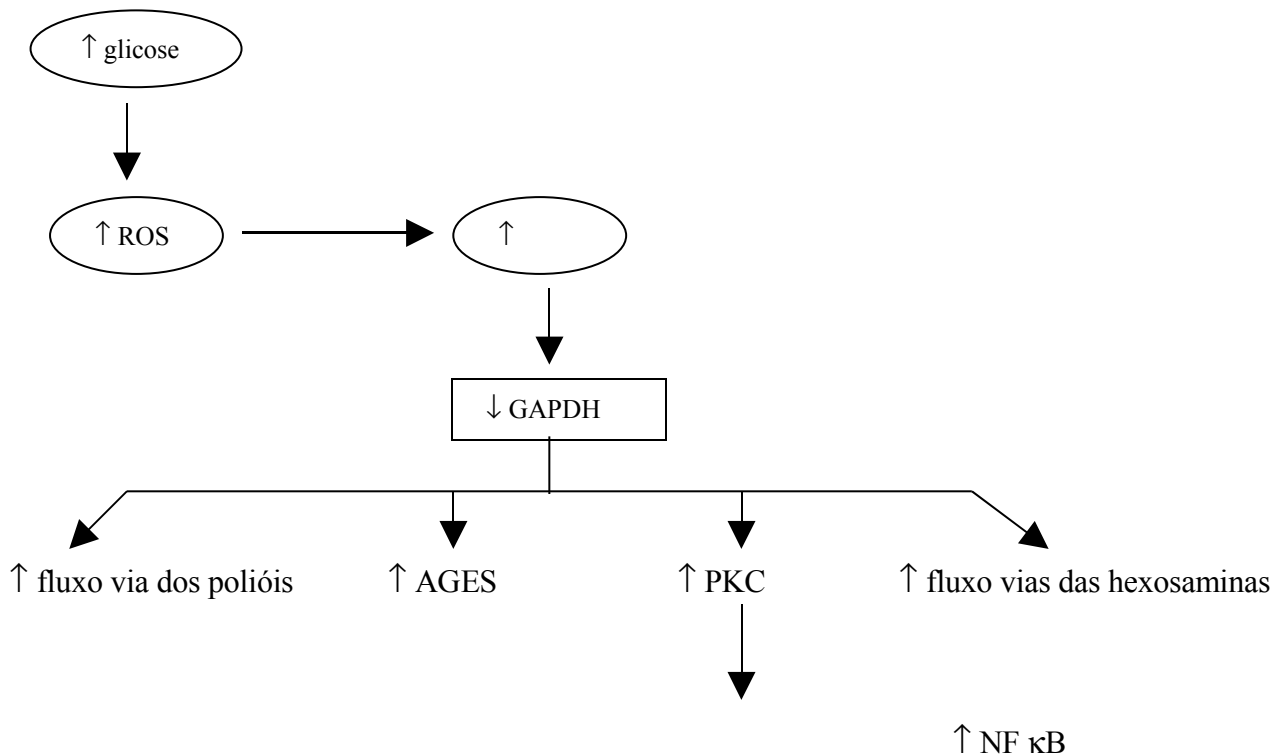


Figura 5. Aumento da atividade da via das hexosaminas pela hiper-glicemia.
Fonte: Brownle,M. (13)

Tem sido sugerido que o mecanismo que parece ser comum a todas as células lesadas, como consequência da hiper-glicemia, é a produção aumentada de ROS, sendo esta uma hipótese capaz de

unificar todas as vias. A hiperglicemia leva a aumento da PARP (poli ADP-ribose polimerase), enzima envolvida no reparo de danos ao DNA, e conseqüentemente, à diminuição da GAPDH (gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase), responsável pela metabolização final da glicose, ativando todas as vias (12).



Esquema 2. Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia.

ROS: espécies reativas de oxigênio; PARP: poli ADP-ribose polimerase; GAPDH: gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase; AGES: produtos avançados da glicosilação não-enzimática; PKC: proteína quinase C; NF-κ B: fator nuclear κ B.

Fonte: Brownle,M. (12)

O grande aumento de ROS sem o equivalente aumento dos efetores antioxidantes origina o “estresse oxidativo”. Normalmente, o organismo possui sistemas de defesa antioxidantes que incluem

as moléculas degradadoras de ROS (ROS *scavengers*), ácido úrico, ácido ascórbico, α -tocoferol, moléculas que contêm sulfidril e enzimas antioxidantes como catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutases (24,25). Em condições patológicas, onde a produção excessiva de ROS ultrapassa a defesa antioxidante, o estresse oxidativo pode modificar irreversivelmente macromoléculas biológicas tais como DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos, contribuindo para a aterogênese (26). Acredita-se que a capacidade antioxidante do plasma deva-se principalmente à presença de albumina, através de seus grupos tióis, sendo esta considerada a principal molécula antioxidante extracelular (27).

O ensaio de metabolização dos sais de tetrazólio (MTT) [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], reação usada na medida de viabilidade e proliferação celular, tem sido utilizado na avaliação do *status* antioxidante e baseia-se na redução do MTT através da succinato desidrogenase mitocondrial (SHD), que age como doadora de elétrons na redução do MTT. Esta redução, descrita inicialmente como um fenômeno intracelular, envolve NADH₂ e FADH₂ e é primariamente uma medida da taxa de produção de NADH na hiperglicemia, resultando na formação de cristais de formazan, um produto insolúvel (28).

Recentemente, Medina e cols. (29) demonstraram, em pacientes diabéticos tipo 2, que o plasma pode reduzir diretamente o MTT, como um fenômeno extracelular, envolvendo mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Estes mesmos autores relataram ainda uma redução do *status* antioxidante do plasma nestes pacientes.

Calsolari et al. (30) demonstraram, em pacientes diabéticos tipo 2, um aumento de ROS na ausência de equivalente aumento na capacidade antioxidante de granulócitos. Observaram ainda correlação positiva e negativa entre produção de ROS e níveis de LDL e HDL, respectivamente, em indivíduos não diabéticos. Sugeriram que a ausência de correlação entre ROS e LDL e HDL em diabéticos tipo 2 seria devido ou influenciado pelos medicamentos usados. Muitos questionamentos sobre os exatos mecanismos envolvidos e as possíveis formas de regulação destas anormalidades ainda são levantados, principalmente quando a população em estudo inclui pacientes diabéticos tipo 1,

com poucos artigos encontrados na literatura abordando o balanço oxidante/antioxidante nestes pacientes.

Na presente dissertação, pretendemos avaliar a resposta antioxidante de pacientes diabéticos tipo 1 pela quantificação do *status* antioxidante do plasma e a resposta oxidante, pela produção de ROS por granulócitos, assim como correlacionar fatores deste balanço com parâmetros bioquímicos e clínicos.

Para alcançar este objetivo pretendemos comparativamente:

1. Quantificar o *status* antioxidante do plasma entre diabéticos e não diabéticos;
2. Quantificar a produção de ROS entre diabéticos e não diabéticos, na presença ou não de estímulo com éster de forbol (PDB);
3. Correlacionar o *status* antioxidante do plasma com a produção de ROS por granulócitos, em diabéticos e não diabéticos.
4. Identificar marcador clínico e/ou bioquímico correlacionável com o *status* antioxidante do plasma e/ou com a produção de ROS por granulócitos, em diabéticos e não diabéticos. Os seguintes parâmetros foram avaliados:
 - 4.1. Glicemia de jejum; colesterol total, HDL e LDL; triglicérides; albumina; ácido úrico; PCR ultrasensível, IMC: em diabéticos e não diabéticos.
 - 4.2. Glicohemoglobina, tempo de doença e dose diária total de insulina (unidades/Kg/dia): apenas nos diabéticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

A - REAGENTES

1.1) **PDB:** (12, 13 forbol dibutirato) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) originando uma solução de 10^{-4} M. (SIGMA Co., St. Louis)

1.2) **PBS:** solução salina tamponada foi preparada como abaixo:

pH = 7,3 PBS = tampão fosfato salino

NaHPO₄ anidro ----- 8,12 g

KH₂PO₄ ----- 1,35 g

NaCl ----- 8,0 g

H₂O destilada, q.s. ----- 1 litro

1.3) **Luminol:** 1,77 g de luminol (SIGMA, Co.) foram diluídos em 1,0 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) originando uma concentração de 10^{-2} M. A partir daí, a solução foi diluída em PBS e usada a 10^{-4} M.

1.4) Soluções de Leukopaque e Monopaque:

As soluções de leukopaque e monopaque, nas diferentes densidades, foram preparadas segundo a técnica de Bicalho e cols. (31). Estas soluções foram fornecidas pela BION LTDA.

1.5) **Azul de Trypan** (SIGMA Co.): O azul de Trypan foi usado a 1% em PBS.

B - EQUIPAMENTOS

2.1) **Luminômetro:** Ciba-Corning – Magic Lite Analyzer

2.2) **Microscópios:** Edu VU 1300 – WESCO

Ken – A vision TT – 1500 N acoplado a câmara “digital color” SDC- 312 (Samsung) e ao monitor de computador Proview.

2.3) **Centrífugas:** Centrifugador Excelsa Fanem Ltda

Bio Eng – 6000

C- SELEÇÃO DE PACIENTES

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética (CEP) da Santa Casa de Belo Horizonte (SCM-BH). Os pacientes foram selecionados pela autora no ambulatório de diabetes tipo 1 da Clínica de Endocrinologia da Santa Casa de Belo Horizonte.

Critérios de inclusão:

Diabéticos tipo 1, com idade inferior a 30 anos, com menos de 5 anos de diagnóstico, comprovadamente sem complicações da doença ou outras doenças associadas, com índice de massa corporal (IMC) inferior a 24,9 Kg/m², em uso exclusivamente de insulina NPH e regular. Todos os pacientes incluídos tiveram o diagnóstico de diabetes tipo 1 confirmado por história pregressa de cetoacidose diabética e/ou anticorpos positivos (anti-GAD e/ou IA-2) e/ou peptídeo C < 0.5 ng/mL.

Foram selecionados 13 controles, com idade inferior a 30 anos, saudáveis, com IMC inferior a 24,9 Kg/m².

Critérios de exclusão:

Pacientes diabéticos tipo 1 em uso de estatinas, metformina, polivitamínicos, fumantes, com complicações da doença ou que durante o decorrer do estudo manifestassem complicações da doença ou outra patologia.

Entre os controles não foram selecionados pacientes fumantes, em uso de qualquer medicação ou com qualquer morbidade.

Todos os participantes foram submetidos à entrevista e exame clínico.

O termo de consentimento foi assinado por todos os participantes.

As características da população estudada são apresentadas nos resultados (tabela 2).

D - COLETA DE SANGUE

Foram coletados 10 mL de sangue venoso periférico dos pacientes diabéticos tipo 1 e dos controles, através da punção venosa, em tubos *vacutainer*, contendo heparina como anticoagulante.

E – EXAMES REALIZADOS E MÉTODOS DE ANÁLISES LABORATORIAIS

Os exames complementares solicitados, com seus valores de referência (VR), a todos os participantes foram:

1. Glicemia de jejum (VR = 60 a 99 mg/dL)
2. Colesterol total e frações (VR: total < 200 mg/dL; LDL <100 mg/dL; HDL > 45mg/dL)
3. Triglicérides (VR <150 mg/dL)
4. Ácido úrico (VR: homens = 3,5 a 7,0 mg/dL; mulheres: 2,6 a 6.0 mg/dL)
5. Albumina (VR = 3,5 a 5,5 mg/dL)
6. Proteína C reativa ultra-sensível (VR: baixo risco< 1,0 mg/dL; médio risco = 1-3 mg/dL; alto risco > 3,0 mg/dL)

- A glicohemoglobina (HbA1c) foi realizada apenas nos pacientes diabéticos (VR = 4,5 a 6,5 %) Hemograma, uréia, creatinina e TSH foram realizados em todos os participantes, afim de excluir doenças concomitantes, encontrando-se dentro dos valores de referência.

MÉTODOS LABORATORIAIS:

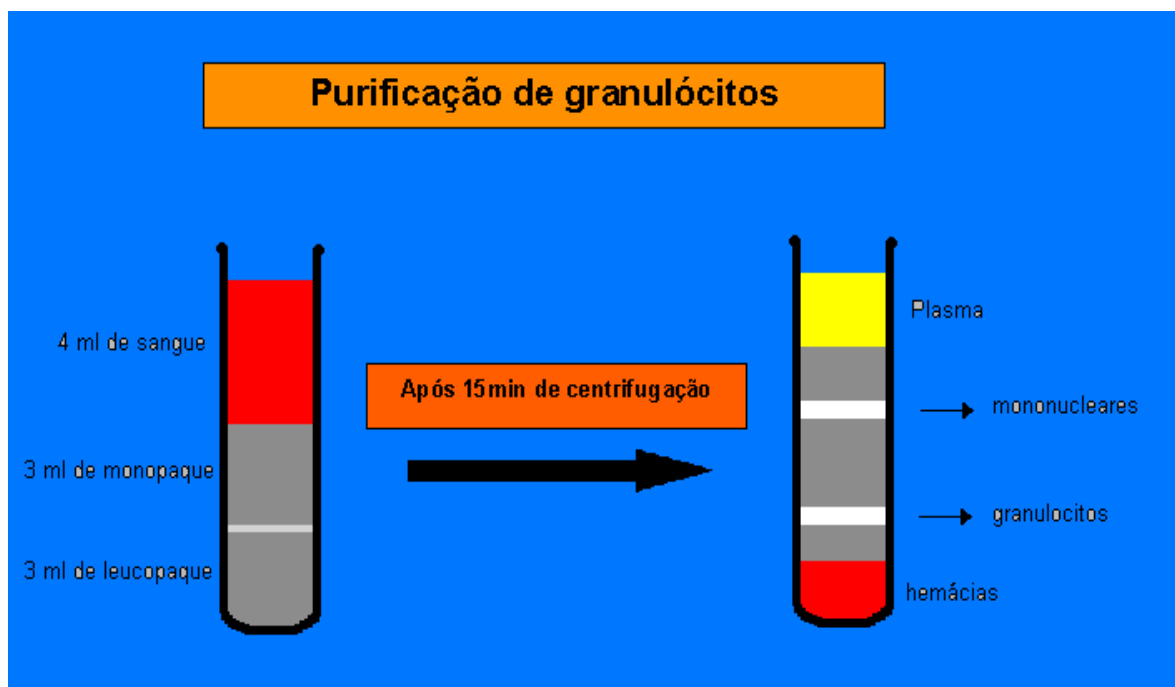
1. CITOMETRIA DE FLUXO: hemograma
2. COLORIMÉTRICO (Jaffe modificado): creatinina
3. COLORIMÉTRICO ENZIMÁTICO: ácido úrico; colesterol total e frações (LDL: Friedewald); triglicérides; glicemia de jejum; uréia; hemoglobina glicada (HbA1c)
4. COLORIMÉTRICO – VERDE DE BROMOCRESOL: albumina
5. NEFELOMETRIA: Proteína C Reativa , quantitativa, ultra-sensível
6. QUIMIOLUMINESCÊNCIA: TSH ultra-sensível

Os exames foram realizados nos Laboratórios Analys e Cientificalab, utilizando os mesmos métodos.

F - SEPARAÇÃO DE GRANULÓCITOS

Os diferentes tipos celulares foram obtidos a partir do sangue periférico, de acordo com Bicalho e cols. (31), usando gradientes desenvolvidos pela BION LTDA. Quatro mililitros de sangue periférico heparinizado foram adicionados a seis mililitros de gradiente duplo de leukopaque e monopaque (densidade 1,12 e 1,08, respectivamente), em tubos siliconizados. Esses tubos foram centrifugados a 200g por 15 minutos, originando duas fases separadas por dois anéis interfásicos, sendo o anel superior formado por células mononucleares e o inferior por granulócitos. O anel rico em granulócitos foi recolhido e colocado em tubo siliconizado usando-se uma pipeta Pasteur e lavado três vezes em PBS. Após as lavagens, os granulócitos foram ressuspensos em 1 mililitro de PBS. A contagem de granulócitos foi feita no microscópio usando-se uma câmara de Neubauer e o número de

células ajustado para 1×10^6 /mL. A viabilidade celular de cada amostra foi superior a 95%, como determinado pelo teste de exclusão pelo azul de Trypan. O plasma foi recolhido para avaliação do poder redutor.



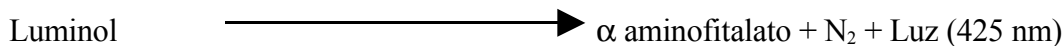
Esquema 3. Purificação de granulócitos.

F- ENSAIO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA DEPENDENTE DE LUMINOL: QUANTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

O ensaio de quimioluminescência permite avaliar, indiretamente, a atividade da NAD(P)H-oxidase, a enzima responsável pela geração de ROS durante a fagocitose das células. A produção de ROS, ao ser liberada, produz uma luminosidade natural, definida como quimioluminescência nativa ou natural. Contudo, esta luminosidade pode ser amplificada usando-se reagentes químicos de acordo com a reação abaixo:

Espécies oxidantes





A técnica baseia-se na reação entre luminol (5 – amino – 2, 3 – dihydro- 1,4 phthalozinedione) e as espécies reativas de oxigênio geradas.

1. Quimioluminescência

Granulócitos ($2 \times 10^5/200 \mu\text{L}$); $200 \mu\text{L}$ de luminol (10^{-4} M) e $310 \mu\text{L}$ de PBS foram incubados durante 30 minutos em um tubo no luminômetro. A quimioluminescência foi medida a cada minuto e os resultados expressos em RLU/min (unidades relativas de luz/minuto).

Em alguns experimentos, tubo com o mesmo conteúdo foi acrescido de $10 \mu\text{L}$ de PDB e a leitura realizada como descrito.

2. Quantificação do *status* antioxidante do plasma

Para avaliar o poder antioxidante do plasma, utilizamos o ensaio de redução direta do MTT (27).

Em um tubo siliconizado colocamos plasma ($200 \mu\text{l}$); MTT ($25\mu\text{l}$ a 5 mg/mL) e PBS ($200\mu\text{l}$) que foram incubados por 120 minutos a 37°C . Após incubação, foi adicionado $1,0 \text{ ml}$ de uma solução de isopropanol: HCl ($0,04\text{N}$) aos tubos, e estes foram fortemente homogeneizados no Vortex, por 1 minuto, para dissolução dos cristais de formazan, produto da redução do MTT. Os tubos foram centrifugados para clareamento do líquido.

O conteúdo dos tubos, após recolhidos, foram analisados no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 570 nm . Os experimentos foram realizados em triplicata.

3. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR: INCORPORAÇÃO DE AZUL DE TRYPAN

O teste de viabilidade celular foi feito com o Azul de Trypan a 1%. As células que incorporaram o Azul de Trypan foram consideradas mortas e contadas em uma câmara de Neubauer. Foram utilizadas no experimento apenas as amostras que continham, pelo menos, 95% de células vivas.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi baseada em um estudo descritivo de caracterização dos pacientes. Foram usados os testes “t” de Student e o teste de Mann-Whitney na comparação de médias de grupos independentes e o coeficiente de correlação de Pearson para avaliação das diversas variáveis. O nível de significância considerado foi de 5%.

Parte da análise estatística foi realizada por Aleida N. Soares.

Os resultados estão representados em tabelas, figuras e gráficos. Para facilitar o entendimento, vamos apresentá-los dentro de um modelo de perguntas e respostas.

A tabela 2 mostra as características clínicas da população estudada e como pode ser observado, as duas se equivalem. Somente houve diferença estatisticamente significativa entre a pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica entre os dois grupos ($p < 0.05$), no entanto, todos os valores encontravam-se dentro dos limites da normalidade. Além dos parâmetros desta tabela, quantificamos e avaliamos o perfil bioquímico da população de diabéticos e não diabéticos. Estes resultados encontram-se na tabela 3.

Tabela 2. Características clínicas da população avaliada.

	<i>DIABETICOS TIPO 1</i>	<i>NÃO DIABÉTICOS</i>	<i>p*</i>
n	16	13	
Sexo	F: 6 (37.5%) M: 10(62.5%)	F: 7 (53.8%) M: 6 (46.2%)	
Idade (anos)	15, 25 ± 3,83	18 ± 5,47	NS
IMC (Kg/m ²)	19,52 ± 2,24	19,21 ± 1,71	NS
Circunferência abdominal (cm)	67,66 ± 7,79	68,19 ± 7,33	NS
PAS (mmHg)	110 ± 10,95	97,99 ± 11,66	<0.05
PAD (mmHg)	72,5 ± 10	66,07 ± 6,3	<0.05
Tempo de doença (anos)	2,62 ± 2,24	Não se aplica	
Dose diária de insulina (unidades/Kg/dia)	0,94 ± 0,26	Não se aplica	
Peptídeo C (ng/mL)	0,46 ± 0.28	Não realizado	

Valores expressos em média ± desvio-padrão

n: número de diabéticos e não diabéticos avaliados

IMC: índice de massa corporal [peso / altura (metros)²]

PAS: pressão arterial sistólica

PAD: pressão arterial diastólica

* As médias foram comparadas pelo teste “t” de Student no nível de 5% de significância.

NS: não significante

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos da população avaliada.

	<i>DIABÉTICOS TIPO 1</i>	<i>NÃO DIABÉTICOS</i>	<i>p *</i>
n	16	13	
Glicemia de jejum (mg/dL)	200.87 ± 92.8	86 ± 5.35	<0.05
Colesterol total (mg/dL)	160.44 ± 28.96	162.08 ± 21.61	NS
Colesterol LDL (mg/dL)	92.85 ± 21.68	92.69 ± 18.62	NS
Colesterol HDL (mg/dL)	51.81 ± 12.66	54.38 ± 12.28	NS
Triglicérides (mg/dL)	63.37 ± 24.45	71.07 ± 20.19	NS
Ácido úrico (mg/dL)	2.93 ± 0.63	4.06 ± 1.01	<0.05
Albumina (g/dL)	4.19 ± 0.31	4.27 ± 0.20	NS
PCR-us (mg/dL)	1.85 ± 2.91	1.34 ± 1.62	NS
HbA1c (%)	10.18 ± 2.56	Não realizado	

Valores expressos em média ± desvio-padrão

n: número de diabéticos e não diabéticos avaliados

PCR-us: Proteína C Reativa, ultra-sensível, quantitativa.

HbA1c: glicohemoglobina

*As médias foram comparadas pelo teste “t” de Student no nível de 5% de significância.

NS: não significante

Após análise destes parâmetros observamos que somente houve diferença significativa ($p < 0,05$) para os níveis de glicemia de jejum e ácido úrico. Resolvemos então avaliar, comparativamente, a resposta antioxidante e oxidante dos diabéticos tipo 1 com os não diabéticos. A resposta oxidante foi avaliada pela produção de ROS por granulócitos e a antioxidante pela quantificação do *status* antioxidante do plasma. Inicialmente avaliamos o *status* antioxidante do plasma.

PRIMEIRA PERGUNTA: EXISTE DIFERENÇA NO STATUS ANTIOXIDANTE DO PLASMA ENTRE DIABÉTICOS TIPO 1 E NÃO DIABÉTICOS?

O *status* antioxidante do plasma foi avaliado através da redução direta do MTT (sal de tetrazólio) pelo plasma. As médias foram comparadas pelo teste “t” de Student no nível de significância de 5% e observou-se que não existe diferença significativa na capacidade de redução direta do MTT pelo plasma entre diabéticos tipo 1 e não diabéticos ($p > 0,05$).

Tabela 4. Quantificação do *status* antioxidante do plasma de diabéticos tipo 1 e não diabéticos.

<i>Origem do plasma</i>	$DO_{570\text{ nm}} \pm EP \times 10^{3*}$	<i>p</i>
Diabéticos tipo 1 (n = 16)	32 ± 3,0	NS
Não diabéticos (n = 13)	41 ± 5,0	

Valores expressos em média ± erro-padrão

n= número da população avaliada

DO: densidade óptica

EP: erro padrão

NS: não significante

Após avaliação do *status* antioxidante do plasma quantificamos o poder oxidante de granulócitos de diabéticos tipo 1 e não diabéticos, na ausência e em presença de éster de forbol (PDB), afim de mimetizar a ação “in vivo” do diacilglicerol. Os resultados aparecem na figura 6.

SEGUNDA PERGUNTA: A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) POR GRANULÓCITOS DE DIABÉTICOS TIPO 1 DIFERE DOS NÃO DIABÉTICOS?

A produção de ROS por granulócitos de pacientes diabéticos tipo 1 e não diabéticos foi quantificada através de quimioluminescência dependente de luminol e os resultados foram expressos em RLU/min x 10⁻³. Para comparação das médias utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney no nível de significância de 5% e observou-se que existe diferença significativa na produção de ROS entre diabéticos tipo 1 e não diabéticos (p < 0,05).

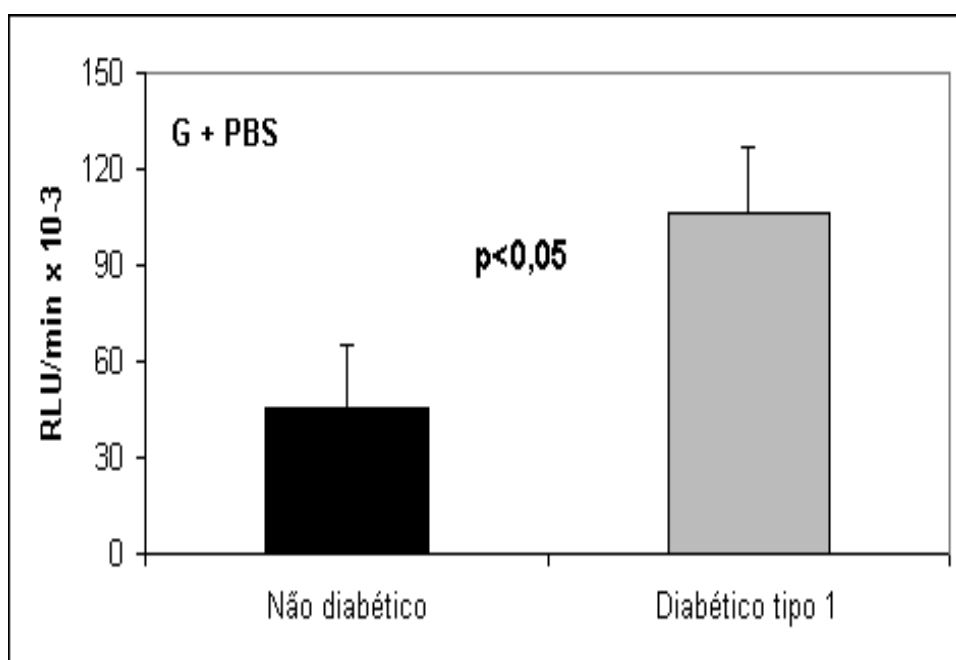


Figura 6. Produção de ROS por granulócitos de diabéticos tipo 1 e não diabéticos na ausência de PDB.

Valores expressos em média ± erro-padrão; G + PBS: granulócitos + PBS; RLU /min = unidades relativas de luz.

A seguir, comparamos a sensibilidade da proteína quinase C (PKC) ao estímulo com éster de forbol. Os resultados aparecem na tabela 5.

TERCEIRA PERGUNTA: A SENSIBILIDADE DA PROTEÍNA QUINASE C (PKC) DE GRANULÓCITOS À ESTIMULAÇÃO POR ÉSTER DE FORBOL (PDB) DIFERE ENTRE DIABÉTICOS TIPO 1 E NÃO DIABÉTICOS ?

Para responder à pergunta acima, utilizamos o ensaio de quimioluminescência na presença (E) ou na ausência (C) de PDB. Os resultados aparecem na tabela abaixo expressos em E/C. Como podemos ver, não houve diferença significativa na sensibilidade da PKC à estimulação por PDB em granulócitos de pacientes diabéticos e não diabéticos ($p = 0,065$).

Tabela 5. Produção de ROS por granulócitos de diabéticos tipo 1 e não diabéticos na presença de PDB.

<i>Origem dos granulócitos</i>	<i>E/C ± EP</i>
Diabéticos tipo 1 (n = 10)	6.2 ± 2.5
	NS
Não diabéticos (n= 08)	9.7 ± 4.5

n = número da população avaliada

EP: erro padrão

NS: não significativo

Com os resultados apresentados até o momento foi possível concluir que o balanço oxidante/antioxidante mostrava um aumento dos oxidantes (ROS) em diabéticos tipo 1 (figura 6) e que a resposta antioxidante do plasma não se alterava pela doença (tabela 4). Contudo, a resposta em presença de PDB (mimetizando o efeito do DAG) mostrou que ambas as populações respondem de forma semelhante (tabela 5).

Em vista disso, passamos a estudar a possibilidade de correlação entre as respostas antioxidante do plasma com a oxidante, dada pela produção de ROS por granulócitos, com parâmetros bioquímicos. A primeira avaliação foi com a resposta oxidante.

QUARTA PERGUNTA: EXISTE CORRELAÇÃO ENTRE O STATUS ANTIOXIDANTE DO PLASMA E A PRODUÇÃO DE ROS EM DIABÉTICOS TIPO 1 E NÃO DIABÉTICOS?

Na tabela 6 aparecem os resultados da correlação entre a redução do MTT pelo plasma e produção de ROS. Observou-se que não houve correlação significativa entre a redução direta do MTT e a produção de ROS, na ausência de PDB, nos grupos avaliados.

Em relação à produção de ROS, em presença de PDB, observou-se uma tendência de correlação média direta com a redução do MTT, tanto no grupo de diabéticos ($r = 0.552$; $p = 0.098$), quanto no grupo de não diabéticos ($r = 0.645$; $p = 0.084$) (gráficos 1-2).

Tabela 6. Correlação entre *status* antioxidante do plasma e produção de ROS em diabéticos tipo 1 e não diabéticos.

<i>Correlação entre:</i>	<i>Diabéticos tipo 1</i>	<i>Não diabéticos</i>
--------------------------	--------------------------	-----------------------

MTT/ROS - em ausência de PDB

$r = 0,252$
 $p = 0.364$

$r = 0.345$
 $p = 0.271$

MTT/ROS - em presença de PDB

$r = 0.552$
 $p = 0.098$

$r = 0.645$
 $p = 0.084$

r: coeficiente de correlação de Pearson

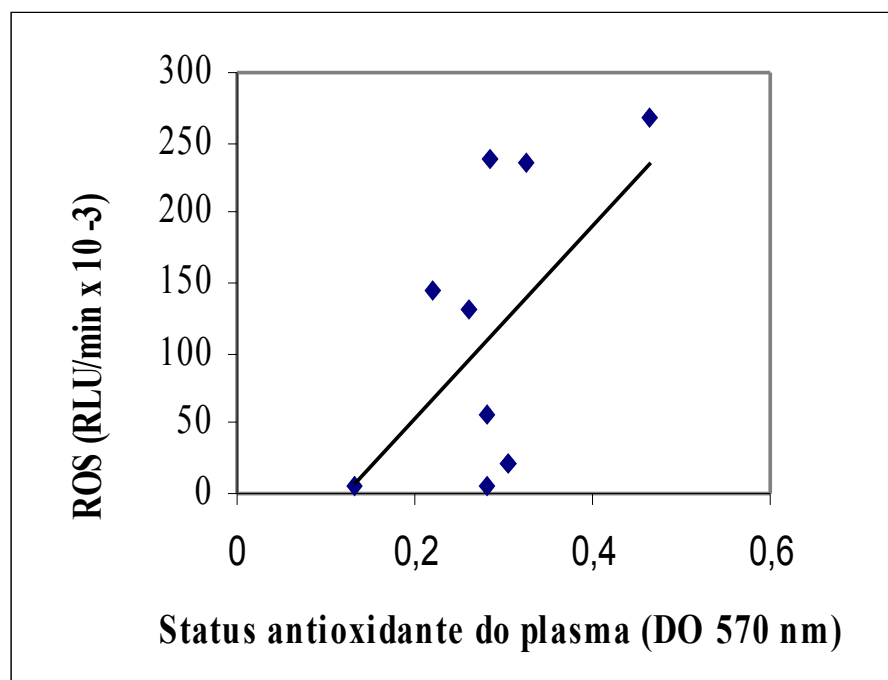


Gráfico 1. Correlação entre o *status* antioxidante do plasma e a produção de ROS, em presença de PDB, em diabéticos tipo 1.

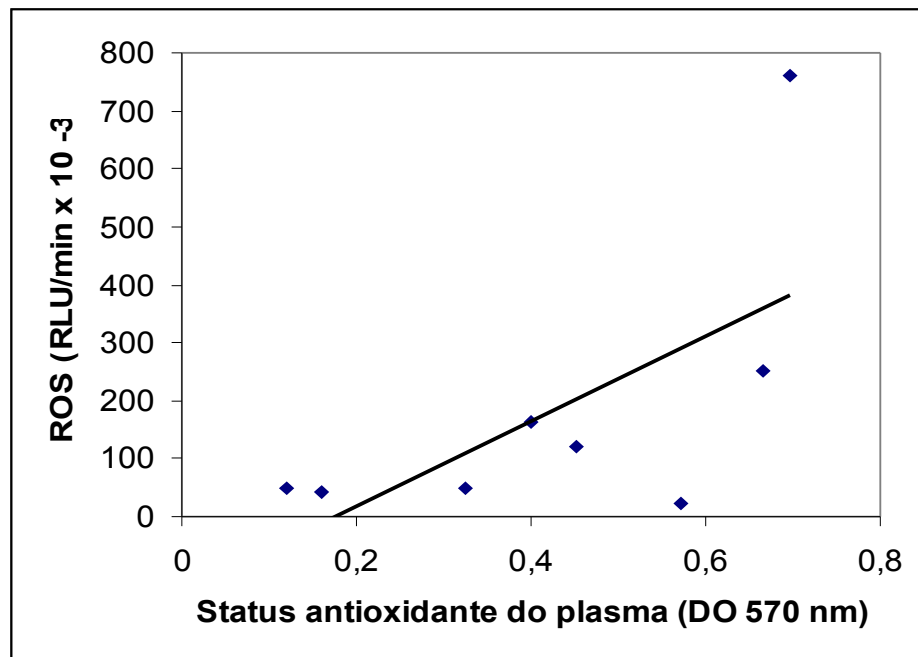


Gráfico 2. Correlação entre o *status* antioxidante do plasma e a produção de ROS, em presença de PDB, em não diabéticos.

Além da correlação cujos resultados foram apresentados na tabela 6, estendemos os nossos estudos, avaliando a redução do MTT pelo plasma e a produção de ROS por granulócitos com os níveis de ácido úrico e albumina, considerados importantes antioxidantes extracelulares. Os resultados são apresentados na tabela 7.

QUINTA PERGUNTA: EXISTE CORRELAÇÃO ENTRE O STATUS ANTIOXIDANTE DO PLASMA, A PRODUÇÃO DE ROS E OS NÍVEIS DE ÁCIDO ÚRICO E ALBUMINA EM DIABÉTICOS TIPO 1 E NÃO DIABÉTICOS?

Os resultados apresentados na tabela 7 mostram que houve correlação significativa e inversa entre os níveis de ácido úrico e redução direta do MTT pelo plasma somente na população de não diabéticos ($r = -0.694$; $p = 0,008$) (gráfico 3).

Os níveis de albumina não foram correlacionáveis com a redução direta do MTT pelo plasma de diabéticos tipo 1 ou de não diabéticos.

Tabela 7. Correlação entre *status* antioxidante do plasma e níveis de albumina e ácido úrico em diabéticos tipo 1 e não diabéticos.

	<i>CORRELAÇÃO</i>	
	<i>MTT/ALBUMINA</i>	<i>MTT/ÁCIDO ÚRICO</i>
<i>DIABÉTICOS TIPO I</i> <i>(n = 16)</i>	r = - 0.013 p = 0,96	r = - 0.016 p = 0,95
<i>NÃO DIABÉTICOS</i> <i>(n = 13)</i>	r = 0.202 p = 0,5	r = - 0.694 p = 0.008

n = número da população avaliada
r: coeficiente de correlação de Pearson

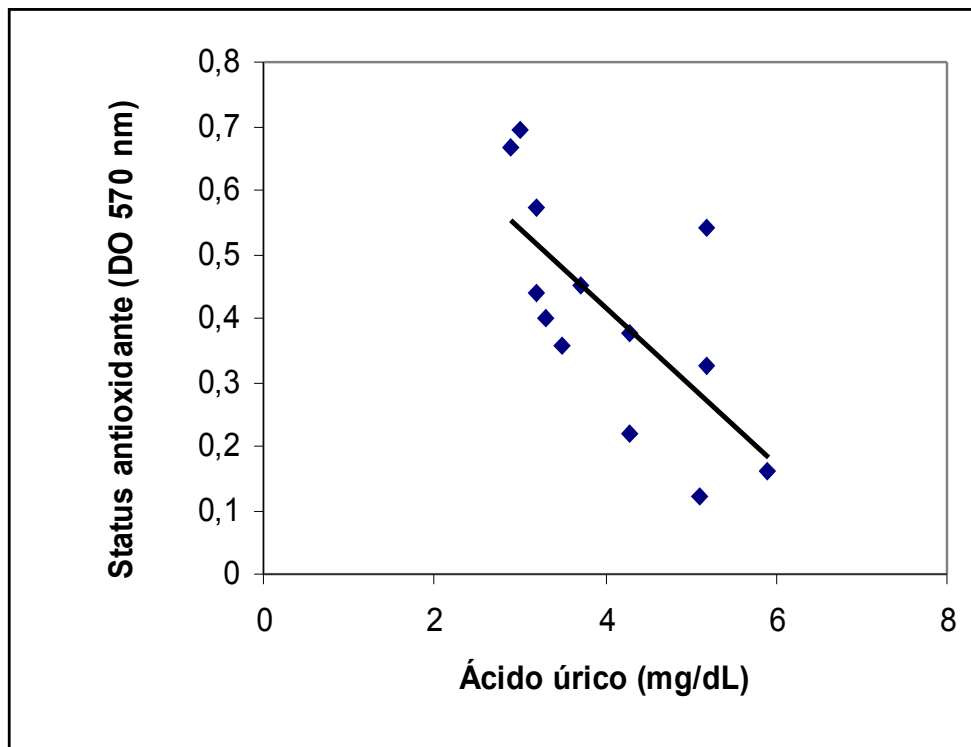


Gráfico 3. Correlação entre o *status* antioxidante do plasma e os níveis de ácido úrico em não diabéticos.

Esta mesma análise foi realizada com a produção de ROS. Os resultados nas tabelas 8 e 9 mostram que não houve correlação significativa entre os níveis de ácido úrico e albumina e a produção de ROS por granulócitos, na ausência de PDB, nos grupos avaliados, sendo que, em presença de PDB, observou-se uma tendência a correlação média inversa com o ácido úrico ($r = -0.53$; $p = 0,18$), somente no grupo de não diabéticos (gráfico 4).

Tabela 8. Correlação entre a produção de ROS em ausência de PDB e níveis de albumina e ácido úrico em diabéticos tipo 1 e não diabéticos.

	CORRELAÇÃO	
	ROS/ALBUMINA	ROS/ÁCIDO ÚRICO
<i>DIABÉTICOS TIPO 1</i> (n = 15)	r = 0,189 p = 0,5	r = - 0.06 p = 0,81
<i>NÃO DIABÉTICOS</i> (n = 12)	r = - 0,192 p = 0,5	r = - 0.248 p = 0.43

n = número da população avaliada
r: coeficiente de correlação de Pearson

Tabela 9. Correlação entre a produção de ROS, em presença de PDB (ROS-PDB), e níveis de albumina e ácido úrico em diabéticos tipo 1 e não diabéticos.

	CORRELAÇÃO	
	ROS-PDB/ALBUMINA	ROS-PDB/ÁCIDO ÚRICO
<i>DIABÉTICOS TIPO 1</i> (n = 10)	r = 0,370 p = 0,29	r = 0,119 p = 0,74
<i>NÃO DIABÉTICOS</i> (n = 8)	r = - 0,06 p = 0,87	r = - 0.53 p = 0.18

n = número da população avaliada
r: coeficiente de correlação de Pearson

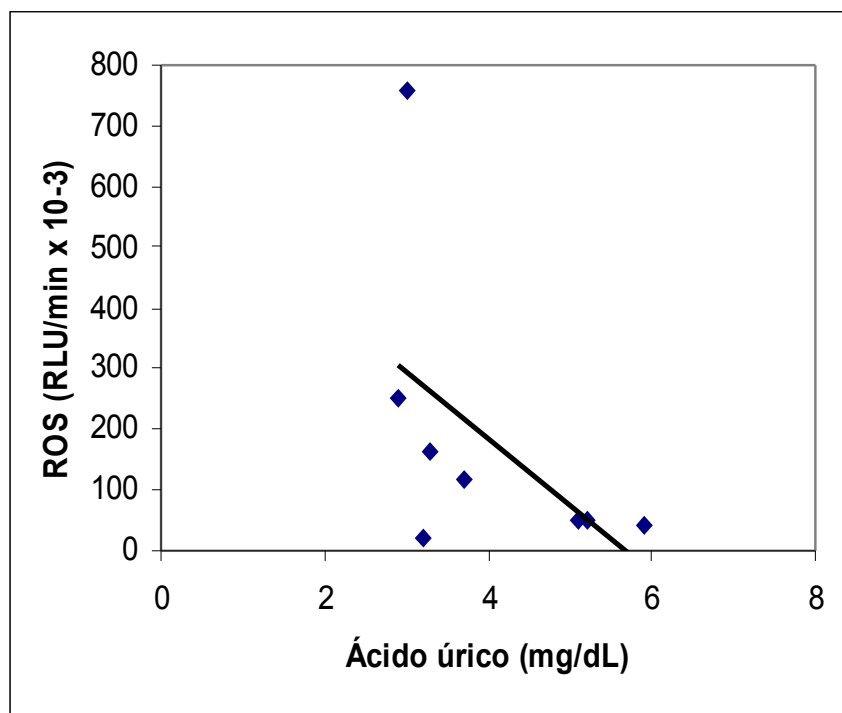


Gráfico 4. Correlação entre a produção de ROS, em presença de PDB, e os níveis de ácido úrico, em não diabéticos.

Em seguida, correlacionamos o *status* antioxidante do plasma e a produção de ROS por granulócitos, entre diabéticos tipo 1 e não diabéticos, com outros parâmetros clínicos e bioquímicos.

SEXTA PERGUNTA: EXISTE CORRELAÇÃO ENTRE O “STATUS” ANTIOXIDANTE DO PLASMA, A PRODUÇÃO DE ROS E OUTROS PARÂMETROS CLÍNICOS E BIOQUÍMICOS EM DIABÉTICOS TIPO 1 E NÃO DIABÉTICOS?

Inicialmente, avaliamos a correlação entre o *status* antioxidante do plasma com parâmetros clínicos e bioquímicos, nas duas populações. Os resultados são apresentados nas tabelas 10 e 11 e mostram que não houve correlação significativa entre as variáveis analisadas e a redução direta do MTT pelo plasma.

Tabela 10. Correlação entre o *status* antioxidante do plasma e parâmetros clínicos e laboratoriais em diabéticos tipo 1.

<i>Correlação entre a redução do MTT por plasma e:</i>	DIABÉTICOS TIPO 1*	
	<i>r</i>	<i>Significância</i>
Idade (anos)	- 0,071	NS
Tempo de doença (anos)	-0,232	NS
Dose diária de insulina (unidades/Kg/dia)	-0,169	NS
IMC (Kg/m ²)	-0,108	NS
Circunferência abdominal (cm)	-0,09	NS
PAS (mmHg)	0,111	NS
PAD (mmHg)	0,410	NS
Glicemia de jejum (mg/dL)	0,069	NS
Colesterol total (mg/dL)	0,084	NS
Colesterol LDL (mg/dL)	-0,038	NS
Colesterol HDL (mg/dL)	0,169	NS
Triglicérides (mg/dL)	-0,143	NS
PCR-us (mg/dL)	0,328	NS
HbA1c (%)	0,018	NS

* n=16; IMC: índice de massa corporal [peso / altura (metros)²]; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PCR-us: Proteína C Reativa, ultra-sensível, quantitativa; HbA1c: glicohemoglobina; *r*: coeficiente de correlação de Pearson ; NS: não significante

Tabela 11. Correlação entre o *status* antioxidante do plasma e parâmetros clínicos e laboratoriais em não diabéticos

<i>Correlação entre a redução do MTT por plasma e:</i>	<i>NÃO DIABÉTICOS*</i>	
	<i>r</i>	<i>Significância</i>
Idade (anos)	- 0,195	NS
IMC (Kg/m ²)	-0,312	NS
Circunferência abdominal (cm)	-0,06	NS
PAS (mmHg)	- 0,105	NS
PAD (mmHg)	- 0,200	NS
Glicemia de jejum (mg/dL)	-0,220	NS
Colesterol total (mg/dL)	0,224	NS
Colesterol LDL (mg/dL)	0,149	NS
Colesterol HDL (mg/dL)	0,068	NS
Triglicérides (mg/dL)	0,069	NS
PCR-us (mg/dL)	0,420	NS

* n=13

IMC: índice de massa corporal [peso / altura (metros)²]

PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica

PCR-us: Proteína C Reativa, ultra-sensível, quantitativa.

r: coeficiente de correlação de Pearson

NS: não significativa

Em seguida, avaliamos a correlação entre a produção de ROS, na ausência e presença de PDB, com parâmetros clínicos e bioquímicos, nas duas populações. Os resultados são apresentados nas tabelas 12-15 e mostram uma tendência a correlação média inversa entre produção de ROS, em presença de PDB e o IMC ($r = - 0.602$; $p = 0.11$), somente no grupo de não diabéticos (tabela 15, gráfico 5).

Tabela 12. Correlação entre a produção de ROS, em ausência de PDB, e parâmetros clínicos e bioquímicos em diabéticos tipo 1.

<i>Correlação entre a produção de ROS por granulócitos e:</i>	<i>DIABÉTICOS TIPO 1*</i>	
	<i>r</i>	<i>Significância</i>
Idade (anos)	- 0,275	NS
Tempo de doença (anos)	-0.352	NS
Dose diária de insulina (unidades/Kg/dia)	-0.453	NS
IMC (Kg/m ²)	-0.197	NS
Circunferência abdominal (cm)	-0.240	NS
PAS (mmHg)	0.031	NS
PAD (mmHg)	0.305	NS
Glicemia de jejum (mg/dL)	-0.038	NS
Colesterol total (mg/dL)	-0.320	NS
Colesterol LDL (mg/dL)	-0.501	NS
Colesterol HDL (mg/dL)	-0.121	NS
Triglicérides (mg/dL)	-0.202	NS
PCR-us (mg/dL)	- 0,352	NS
HbA1c (%)	-0.016	NS

* n=15

IMC: índice de massa corporal [peso / altura (metros) ²]

PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica

PCR-us: Proteína C Reativa, ultra-sensível, quantitativa.

HbA1c: glicohemoglobina

r: coeficiente de correlação de Pearson

NS: não significante

Tabela 13. Correlação entre produção de ROS, em presença de PDB, e parâmetros clínicos e bioquímicos em diabéticos tipo 1.

<i>Correlação entre a produção de ROS por granulócitos e:</i>	<i>DIABÉTICOS TIPO 1*</i>	
	<i>r</i>	<i>Significância</i>
Idade (anos)	- 0,358	NS
Tempo de doença (anos)	-0.173	NS
Dose diária de insulina (unidades/Kg/dia)	-0.081	NS
IMC (Kg/m ²)	0.017	NS
Circunferência abdominal (cm)	-0.272	NS
PAS (mmHg)	-0.183	NS
PAD (mmHg)	-0.125	NS
Glicemia de jejum (mg/dL)	0.032	NS
Colesterol total (mg/dL)	-0.327	NS
Colesterol LDL (mg/dL)	-0.176	NS
Colesterol HDL (mg/dL)	-0.435	NS
Triglicérides (mg/dL)	-0.061	NS
PCR-us (mg/dL)	-0.214	NS
HbA1c (%)	-0.059	NS

* n=10

IMC: índice de massa corporal [peso / altura (metros)²]

PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica

PCR-us: Proteína C Reativa, ultra-sensível, quantitativa.

HbA1c: glicohemoglobina

r: coeficiente de correlação de Pearson

NS: não significante

Tabela 14. Correlação entre a produção de ROS, em ausência de PDB, e parâmetros clínicos e bioquímicos em não diabéticos.

<i>Correlação entre a produção de ROS por granulócitos e:</i>	<i>NÃO DIABÉTICOS*</i>	
	<i>r</i>	<i>Significância</i>
Idade (anos)	-0,017	NS
IMC (Kg/m ²)	-0.413	NS
Circunferência abdominal (cm)	0.269	NS
PAS (mmHg)	-0.209	NS
PAD (mmHg)	-0.263	NS
Glicemia de jejum (mg/dL)	-0.043	NS
Colesterol total (mg/dL)	0.208	NS
Colesterol LDL (mg/dL)	0.014	NS
Colesterol HDL (mg/dL)	0.357	NS
Triglicérides (mg/dL)	0.005	NS
PCR-us (mg/dL)	-0,073	NS

* n=12

IMC: índice de massa corporal [peso / altura (metros)²]

PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica

PCR-us: Proteína C Reativa, ultra-sensível, quantitativa.

r: coeficiente de correlação de Pearson

NS: não significante

Tabela 15. Correlação entre a produção de ROS, em presença de PDB, e parâmetros clínicos e bioquímicos em não diabéticos.

<i>Correlação entre a produção de ROS por granulócitos e:</i>	<i>NÃO DIABÉTICOS*</i>	
	<i>r</i>	<i>Significância</i>
Idade (anos)	-0,392	NS
IMC (Kg/m ²)	-0.602	-0.11
Circunferência abdominal (cm)	-0.634	NS
PAS (mmHg)	-0.366	NS
PAD (mmHg)	-0.135	NS
Glicemia de jejum (mg/dL)	0.072	NS
Colesterol total (mg/dL)	0.114	NS
Colesterol LDL (mg/dL)	0.061	NS
Colesterol HDL (mg/dL)	0.074	NS
Triglicérides (mg/dL)	0.151	NS
PCR-us (mg/dL)	-0.029	NS

* n= 8

IMC: índice de massa corporal [peso / altura (metros)²]

PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica

PCR-us: Proteína C Reativa, ultra-sensível, quantitativa.

r: coeficiente de correlação de Pearson

NS: não significativa

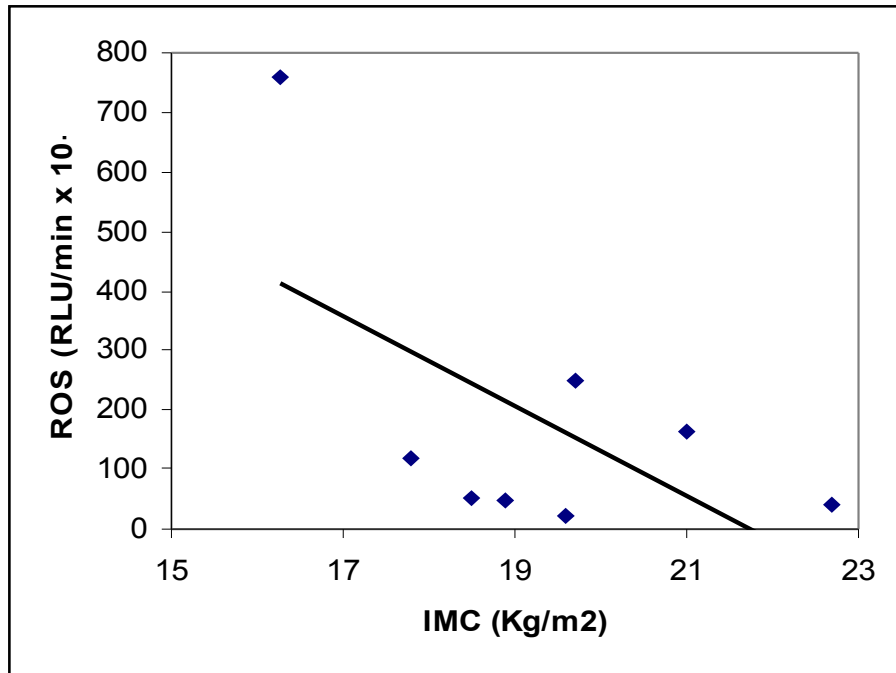


Gráfico 5. Correlação entre a produção de ROS, em presença de PDB, e o IMC, em não diabéticos.

DISCUSSÃO

Na presente dissertação estudamos, comparativamente, o *status* antioxidante do plasma e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por granulócitos de diabéticos tipo 1 e não diabéticos. Avaliamos ainda, a correlação entre as respostas antioxidantes/oxidantes com diversas variáveis bioquímicas e clínicas. Nosso objetivo primordial foi descrever parâmetros que pudessem refletir o controle metabólico nos pacientes diabéticos tipo 1.

Estabelecer controle metabólico adequado é o objetivo principal no tratamento de pacientes diabéticos. Estudos clínicos como o DCCT e o UKPDS, demonstraram redução de complicações crônicas (retinopatia, neuropatia e nefropatia) com o adequado controle glicêmico, com maiores benefícios observados no grupo de pacientes com glicohemoglobina média de 7%, sendo menos expressivos os efeitos benéficos nas complicações macrovasculares (9,10).

A doença aterosclerótica é causa importante de morbimortalidade em pacientes diabéticos, sendo a lesão endotelial considerada o evento crítico inicial. Diversos fatores, considerados de risco, predisõem à lesão endotelial, como hipertensão arterial, fumo e dislipidemia, não sendo, porém, suficientemente esclarecedores para a alta incidência de lesão vascular nestes pacientes (32).

Nas últimas décadas, acumularam-se evidências de que a geração de ROS e o estresse oxidativo têm importante papel na patogênese das complicações diabéticas. Vias metabólicas estimuladas pela hiperglicemia, como oxidação da glicose, via dos polióis e formação de produtos finais da glicosilação avançada, levam a injúria celular em resposta ao estresse oxidativo. Em adição, a exposição de células endoteliais à alta concentração de glicose aumenta a produção de ânions superóxido, com diminuição do óxido nítrico, um potente vasodilatador endotelial, reduzindo o relaxamento dependente do endotélio e prejudicando a restauração celular (33). Em condições normais, defesas antioxidantes naturais mantém um balanço oxidante/antioxidante, preservando a integridade celular. Considerando a importância destas vias na patogenia do diabetes, o estudo e quantificação das mesmas poderiam fornecer subsídios tanto para o entendimento dos mecanismos

básicos envolvidos, quanto para uma mais eficaz abordagem clínica, o que procuramos fazer avaliando diabéticos tipo 1.

Observamos que o *status* antioxidante do plasma, avaliado através da redução direta do MTT, foi semelhante entre os diabéticos e não diabéticos ($p > 0,05$) (tabela 4). Em relação aos antioxidantes individuais, atenção especial foi dada ao ácido úrico e à albumina. Encontramos diferença estatisticamente significativa nos níveis de ácido úrico entre os dois grupos ($p= 0.001$) e nenhuma diferença em relação aos níveis de albumina ($p > 0,05$) (tabela 3). Ao correlacionarmos estas variáveis com o MTT, encontramos correlação significativa e inversa entre *status* antioxidante do plasma e ácido úrico no grupo de não diabéticos ($r = - 0.694$; $p= 0.008$) (tabela 7).

As controvérsias em relação ao *status* antioxidante em diabéticos tipo 1 ainda persistem. Willems e cols. (34), avaliando um grupo de diabéticos tipo 1 com menos de 5 anos de doença, não observaram redução nas defesas antioxidantes, independente da presença de complicações subclínicas e com controle glicêmico não distante das metas desejadas. Entretanto, redução do *status* antioxidante total do soro foi descrita em outros estudos (35). Santini e cols. (36), utilizando dosagens diretas de vitaminas C e E e ácido úrico, demonstraram diminuição da capacidade antioxidante nos diabéticos, porém, não encontrando diferenças estatísticas entre diabéticos e não diabéticos, em relação aos níveis de ácido úrico.

O ácido úrico responde por cerca de 60% da capacidade antioxidante do plasma, já as vitaminas A, C e E, proteínas contendo grupos tióis e bilirrubina, dentre outros, sendo implicados em proporções diferentes na defesa antioxidante. Acredita-se que a melhor resposta antioxidante seja alcançada com a ação conjunta de todos estes fatores (37, 38).

Tendo em vista que a hiperglicemia no diabetes induz a um aumento da excreção de ácido úrico, levando a hipouricemia (39), talvez uma possível explicação para a ausência de diferença no *status* antioxidante entre os dois grupos seja um aumento compensatório da atividade dos outros agentes antioxidantes no diabetes.

Recentemente foi demonstrado que a albumina é um potente antioxidante devido à sua capacidade de reduzir diretamente o MTT (29). Usualmente, seus níveis plasmáticos encontram-se em

torno de 4,0 g/dL. Assim, discretos aumentos ou diminuição em sua quantidade ou mesmo a produção de albumina alterada (oxidada) em quantidades mínimas, tornam-se diluídas em relação à quantidade total, induzindo a obtenção de resultados comparativos não significativos. Acreditamos que a ausência de correlação em nosso estudo possa, a princípio, ser devido a este fato, tendo em vista que os níveis de albumina nos dois grupos foram semelhantes (tabela 3).

Calsolari e cols. (40), em recente estudo, demonstraram uma modulação na produção de ROS por granulócitos, em pacientes diabéticos tipo 2, após serem submetidos à terapia antioxidante com vitaminas A, C e E, por curto período de tempo.

No presente estudo, não encontramos qualquer outra variável que se correlacionasse com o *status* antioxidante do plasma, em nenhum dos grupos avaliados (tabelas 10, 11). Uma possível explicação seria a grande semelhança no perfil bioquímico entre o grupo de diabéticos tipo 1 e não diabéticos (tabela 3), visto que os pacientes selecionados tinham menos de cinco anos de diagnóstico, período onde são infreqüentes as complicações clínicas e metabólicas da doença.

Na avaliação do estresse oxidativo, observamos uma diferença estatisticamente significativa na produção de ROS por granulócitos de diabéticos tipo 1 em relação aos não diabéticos, na ausência de estímulo com PDB ($p < 0.05$) (figura 6), embora não tenhamos encontrado diferença na sensibilidade da PKC à estimulação pelo PDB entre os dois grupos. Isto pode sugerir que o tempo de doença (menos de 5 anos) não tenha sido suficiente para indução das alterações ou adaptações metabólicas dependentes da hiperglicemia e relacionadas à via de sinalização DAG-PKC. Esta sugestão parece ser reforçada pela semelhança dos diversos parâmetros estudados entre os dois grupos.

Não observamos correlação entre controle glicêmico e produção de ROS na população avaliada. Em relação às demais variáveis, observamos uma tendência à correlação média inversa entre produção de ROS, em presença de PDB, com o ácido úrico ($r = -0.527$; $p = 0.18$) e com o IMC ($r = -0,602$; $p = 0.11$) na população de não diabéticos (tabelas 9, 15).

Os poucos estudos que avaliaram o estresse oxidativo em diabéticos tipo 1 ainda apresentam resultados conflitantes. Dominguez e cols. (41), avaliando pacientes entre 7 e 10 dias após o início clínico do diabetes, quando o controle metabólico já estava restaurado, demonstrou concentrações

elevadas de malonaldeído (MDA) plasmático, um produto final da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, sugerindo que radicais livres do oxigênio podem exercer seus efeitos tóxicos em estágios precoces da doença, mantendo-se elevados no curso da mesma. Estes mesmos autores não encontraram correlação entre estes achados e os parâmetros de controle glicêmico (glicohemoglobina e frutossamina). Estes dados são concordantes com o que observamos em nosso estudo (tabelas 12-15).

Em estudo mais recente, Hata e cols. (42) demonstraram correlação direta entre 8-OhdG (8-hidroxi-2'-deoxiguanosina), um marcador de estresse oxidativo, com o controle glicêmico e a presença de microalbuminúria. Em outros estudos, estas conclusões se confirmaram (43, 44).

A associação entre aumento de peso (IMC > 24.9 Kg/m²), relacionado ou não à síndrome metabólica e ao estresse oxidativo já se encontra bem estabelecida, com evidências consistentes de aumento do risco cardiovascular e diabetes nos indivíduos acometidos (45). Também é bem documentado o aumento dos marcadores do estresse oxidativo nesta situação (46, 47). Entretanto, pouco estudada é a associação entre IMC normal ou baixo e estresse oxidativo. Higashi e cols. (48) demonstraram que prejuízo na vasodilatação endotélio-dependente e aumento de marcadores do estresse oxidativo (8ohDG e MDA) estão presentes tanto em obesos, quanto em indivíduos com IMC <18,5 Kg/m². Villas Boas e cols. (49) demonstraram maiores níveis de MDA em pacientes idosos com IMC < 22 Kg/m², quando comparados a IMC > 22 Kg/m². Não encontramos relatos na literatura da associação entre baixo peso no diabetes e estresse oxidativo.

Ao correlacionarmos o *status* antioxidante com a produção de ROS, observamos que houve uma tendência a correlação média direta entre a produção de ROS, em presença de PDB, com a redução direta do MTT pelo plasma no grupo de diabéticos tipo 1 ($r = 0,552$; $p = 0,098$) e nos não diabéticos ($r = 0,645$; $p = 0,084$). Na ausência de PDB, não observamos correlação entre as variáveis na população estudada (tabela 6).

Ao compararmos intrinsecamente os resultados apresentados em relação ao balanço oxidante/antioxidante, observamos: os dois grupos apresentaram semelhantes poder antioxidante do plasma (tabela 4) e aumento antioxidante proporcional ao estímulo da via DAG-PKC (produção de ROS ao estímulo com PDB) (tabela 6), o que não caracteriza “estresse oxidativo típico”. Este é

definido como aumento da atividade da via oxidante com simultânea diminuição da resposta antioxidante (29).

Calsolari e cols. (30), utilizando semelhante metodologia de quantificação de ROS, demonstraram, em diabéticos tipo 2, um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio em comparação com não diabéticos, com aumento simultâneo na resposta antioxidante. Este achado, refletindo uma condição intracelular, também não caracterizou um estresse oxidativo típico, o que pode estar relacionado ao uso de medicamentos com efeitos antiinflamatórios e/ou antioxidantes por este grupo. Estes resultados são corroborados por Dandona e cols. (50), que observaram resultados similares em células mononucleares de diabéticos tipo 1 e tipo 2, em relação à produção de ROS.

Tem sido observado que a superóxido dismutase (SOD) pode ser rapidamente ativada em condições nas quais células ou organismos são expostos ao estresse oxidativo (51). O aumento da atividade da SOD, demonstrada por Dominguez e cols. (41), no início do diabetes, pode ser interpretada como um mecanismo de ativação compensatório ao aumento da geração de radicais superóxido. Este grupo também observou que a atividade desta enzima diminui com a progressão da doença, desde que passam a predominar os produtos finais da glicação não enzimática.

Estes dados sugerem que ao longo da doença o balanço oxidante/antioxidante é deslocado, ocorrendo diminuição das respostas antioxidantes e aumento das vias oxidantes (estresse oxidativo).

O nosso estudo relata, pela primeira vez, o *status* antioxidante do plasma de diabéticos tipo 1 e demonstra a ausência de estresse oxidativo típico nos primeiros anos de doença.

Os nossos resultados sugerem, que ao menos nos primeiros cinco anos após o diagnóstico, o organismo mantém uma resposta antioxidante compensatória ao estresse oxidativo, independente dos níveis glicêmicos. Esta condição pode, em princípio, funcionar como proteção às lesões sabidamente predominantes nos diabéticos, porém, como relatado anteriormente, esta resposta adaptativa não perdura indefinidamente e com a hiperglicemia mantida ao longo dos anos, vias metabólicas de sinalização são ativadas, outras adaptadas, com evolução para lesões vasculares patológicas.

O estudo intitulado *Epidemiology of Diabetes Intervention and Complication* (EDIC) (52), observacional e longitudinal, com ex-pacientes do DCCT, surpreendentemente demonstrou que nos 8

anos de acompanhamento após término do DCCT, apesar dos níveis de glicohemoglobina entre o grupo tratado anteriormente com terapia convencional ou intensiva não diferirem mais, o grupo inicialmente em terapia intensiva continuou com menor prevalência de complicações micro e macroangiopáticas, quando comparados ao grupo previamente em terapia convencional. Para explicar este fato, os autores postularam a teoria da “memória metabólica”, pela qual as células menos agredidas pelo insulto hiperglicêmico no início do diabetes se manteriam por um maior tempo livres dos efeitos deletérios da glicotoxicidade, enquanto as mais agredidas no início da patologia precisariam de um maior tempo para se recuperarem do insulto metabólico.

À luz dos conhecimentos adquiridos com nossos resultados, acreditamos que ainda são necessários estudos para esclarecimento do real prejuízo ao organismo, como consequência da hiperglicemia *per se*, na fase inicial da doença. Ainda permanece sem uma explicação clara a relação entre a ausência de um estresse oxidativo típico neste período e o aumento da incidência de lesões futuras, em pacientes com controle inadequado, nos primeiros anos de doença. Estas respostas certamente irão fornecer importantes subsídios para o entendimento da fisiopatologia das complicações diabéticas, abrindo novas perspectivas terapêuticas adicionais à insulina para pacientes diabéticos tipo 1, visando a modulação de lesões futuras.

CONCLUSÃO

Os nossos resultados mostram, em diabéticos tipo 1, um discreto aumento na produção de espécies oxidantes (ROS), ausência de alterações na resposta antioxidante e de correlações entre estas respostas (oxidante/antioxidante) e diversos parâmetros bioquímicos e clínicos. Isto nos permite concluir ausência de “estresse oxidativo típico”. Contudo, é possível inferir que esta situação evolua para um desequilíbrio metabólico com consequências diretas e futuras sobre a lesão vascular, tão presente nos diabéticos. Com isso, é possível sugerir que se obtenha um controle metabólico satisfatório desde o início da doença e em qualquer idade. Trabalhos futuros serão necessários para

identificar e esclarecer os parâmetros metabólicos correlacionáveis com o aparecimento e agravamento das lesões vasculares em diabéticos tipo 1.

REFERÊNCIAS

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care** 2004; 27(5):1047-53.
2. 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** 1992;15(11):1509-16
3. Torquato MTCG, Montenegro Jr RN. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil. **São Paulo Med J.** 2003; 121(6):224-30.

4. Alberti KGMM, Zimmet PZ, for the World Health Organization Consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Report of a WHO Consultation. Geneva:WHO, 1999.**
5. American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care, 1988**; Suppl 1:S5.
6. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. **Science, 1983** ;222(4630):1337-9
7. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus **Diabetes Care 2006** 29: S43-48
8. Haffner SM, Lehto S, Ronnemaa T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without myocardial infarction. **N Engl J Med 1998** ;339:229-34
9. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (DCCT): The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med 1993** ;329:977-86
10. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). **Lancet 1998**; 352:837-53
11. Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. **Kidney Int Suppl 2000** ;58:S26-S30
12. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications – A Unifying Mechanism. **Diabetes 2005**; 56: 1615-1625.
13. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature, 2001.** 414:813-820.
14. Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. **FEBS Lett. 1995**;369(2-3):131-5.

15. Goldin BAA, Beckman JÁ, Schmidt AM, Creager MA. Advanced Glycation End Products – Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. **Circulation**, **2006**; 114:597-605.
16. Li JM, Shah AM. ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol**. **2003**;14(Suppl 3):S221-6.
17. Zalba G, San Jose G, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, Diez J. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. **Hypertension**. **2001**;38(6):1395-9
18. Kitada, M; Koya, D; Sugimoto, T; Isono, M; Araki, S; Kashiwagi, A; Haneda, M. Translocation of Glomerular p47phox and p67phox by Protein Kinase C-[beta] Activation Is Required for Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. **Diabetes**, **2003**. 52(10):2603-2614
19. El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**. **2005**;53(3):199-206.
20. Idris I, Gray S, Donnelly. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. **Diabetologia** **2001** ;44:659-73
21. Newton AC. Protein kinase C: structure, function and regulation: minireview. **J Biol Chem** **1995**;270:28495-8.
22. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. **Diabetes** **1998**;47:859-66.
23. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. **2000** ; 97(22):12222-6.
24. Stinefelt B, Leonard SS, Blemings KP, Shi X, Klandorf H. Free radical scavenging, DNA protection, and inhibition of lipid peroxidation mediated by uric acid. **Ann Clin Lab Sci**. **2005**;35(1):37-45.
25. Frei B.; Stocker R.; Ames, B.N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. **Proc. Natl. Acad. Sci**. **1988**; 85: 9748-9752.

26. Faure P, Troncy L, Lecomte M, Wiernsperger N, Lagarde M, Ruggiero D, Halimi S. Albumin antioxidant capacity is modified by methylglyoxal. **Diabetes Metab.** 2005;31(2):169-77.
27. Mera K, Anraku M, Kitamura K, Nakajou K, Maruyama T, Tomita K, Otagiri M. Oxidation and carboxy methyl lysine-modification of albumin: possible involvement in the progression of oxidative stress in hemodialysis patients. **Hypertens Res.** 2005 ;28(12):973-80
28. Berridge, M.V.; Wang, R.. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use terazolium salts. **Biochemica**, n. 4, 1996.
29. Medina L.O., Veloso C.A. , Borges E. A. , Isoni C. A, Calsolari M.R., Chaves M.M., Nogueira-Machado JA. Determination of the antioxidant status of plasma from type 2 diabetic patients. **Diabetes Research and clinical practice**, 2006 (submetido).
30. Calsolari MR, Oliveira Medina L, Cunha EP, Araujo Veloso C, Martins Chaves M, Bosco A, Nogueira-Machado JA. Oxidizing and reducing responses of granulocytes from type 2 diabetic patients. **Metabolism.** 2006;55(10):1426-8.
31. Bicalho HMS; Gontijo MC; Nogueira-Machado JA. A simple technique for simultaneous human leukocytes separation. **J Immunol. Methods** 1981;40:115-116.
32. Stettler C, Allemann S, Juni P, Cull CA, Holman RR, Egger M, Krahenbuhl S, Diem P. Glycemic control and macrovascular disease in types 1 and 2 diabetes mellitus: Meta-analysis of randomized trials. **Am Heart J.** 2006;152(1):27-38.
33. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. **Diabetes Care**, 1996;19(3):257-67.
34. Willems D, Dorchy H, Dufrasne D. Serum antioxidant status and oxidized LDL in well-controlled young type 1 diabetic patients with and without subclinical complications. **Atherosclerosis**, 1998;137, Suppl: S61-4.
35. Maxwell SR, Thomason H, Sandler D, Leguen C, Baxter MA, Thorpe GH, Jones AF, Barnett AH. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Eur J Clin Invest.** 1997;27(6):484-90.

- 36.Santini SA, Marra G, Giardina B, Cotroneo P, Mordente A, Martorana GE, Manto A, Ghirlanda G. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. **Diabetes** ,1997;46(11):1853-8.
- 37.Asayama K, Uchida N, Nakane T, Hayashibe H, Dobashi K, Amemiya S, Kato K, Nakazawa S: Antioxidants in the serum of children with insulin-dependent diabetes mellitus. **Free Rad Biol Med** 1993; 15:597-602.
- 38.Tsai EC, Hirsch IB, Brunzell JD, Chait A: Reduced plasma peroxy radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. **Diabetes**, 1994; 43:1010-1014.
- 39.Erdberg A, Boner G, van Dyk DJ, Carel R. Urine uric acid excretion in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Nephron**. 1992; 60(2):134-7.
- 40.Calsolari MR. Estudo comparativo da produção de espécies reativas de oxigênio por granulócitos de pacientes diabéticos tipo 2 e não diabéticos. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, para obtenção do título de mestre em medicina, 2005.
- 41.Dominguez 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**, 1998;21(10):1736-42.
- 42.Hata I, Kaji M, Hirano S, Shigematsu Y, Tsukahara H, Mayumi, M. Urinary oxidative stress markers in young patients with type 1 diabetes. **Pediatr Int**. 2006;48(1):58-61 .
- 43.Vessby J, Basu S, Mohsen R, Berne C, Vessby B. Oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus. **J Intern Med**. 2002;251(1):69-76.
- 44.Davi G, Ciabattoni G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, Pennese E, Vitacolonna E, Bucciarelli T, Costantini F, Capani F, Patrono C. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. **Circulation**. 1999 19;99(2):224-9.
- 45.Lastra G, Manrique C, Sowers JR. Obesity, cardiometabolic syndrome, and chronic kidney disease: the weight of the evidence. **Adv Chronic Kidney Dis**. 2006;13(4):365-73.

46. Fujita K, Nishizawa H, Funahashi T, Shimomura I, Shimabukuro M. Systemic oxidative stress is associated with visceral fat accumulation and the metabolic syndrome. **Circ J.** 2006;70(11):1437-42
47. Milagro FI, Campion J, Martinez JA. Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. **Obesity (Silver Spring).** 2006;14(7):1118-23.
48. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Kimura M, Noma K, Sasaki S, Hara K, Matsuura H, Goto C, Oshima T, Chayama K, Yoshizumi M. Low body mass index is a risk factor for impaired endothelium-dependent vasodilation in humans: role of nitric oxide and oxidative stress. **J Am Coll Cardiol.** 2003;42(2):256-63
49. Villas Boas, PJF. Avaliação nutricional de estresse oxidativo e ocorrência de infecção em indivíduos institucionalizados do Asilo Padre Euclides de Botucatu-SP. Tese de Doutorado em Fisiopatologia em Clínica Médica, **UNIFESP, 2006.**
50. Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, Nicotera T. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. **Lancet.** 1996 ; 347(8999):444-5.
51. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radic Biol Med.** 1994;17(3):235-48.
52. The DCCT/EDIC Research Group. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. **N Engl J Med** 2000; 342:381-9.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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