

ISAAC ETIENNE

ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM NEUROPATIA DIABÉTICA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

E84e
2019 Etienne, Isaac, 2019-
Estresse oxidativo em pacientes com neuropatia diabética /
Isaac Etienne. – Viçosa, MG, 2019.
xi, 42f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Luciana Moreira Lima.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Diabetes mellitus. 2. Neuropatias Diabéticas. 3. Estresse oxidativo. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Medicina e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. II. Título.

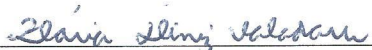
CDD 22 ed. 616.462

ISAAC ETIENNE

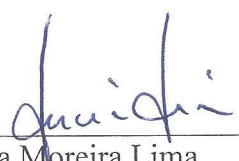
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM NEUROPATIA DIABÉTICA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 08 de abril de 2019.


Flávia Diniz Valadares


Silvia Almeida Cardoso
(Coorientadora)


Luciana Moreira Lima
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

À minha querida esposa Maudeline Joseph, pelo incentivo, pela força e amor.

À minha princesa Victoria Marie Iclide J. Etienne.

Aos meus pais Iclide Augustave e Pierre Armand Etienne pelos princípios e ensinamentos que me passaram.

Aos meus irmãos e irmãs Maxan, Bethanie, Naomie, Amos, Daniel, Armante, Israel e Elisabeth.

À família Elias e Eliane Bonifacio.

AGRADECIMENTOS

A Deus que colocou no meu caminho pessoas muito especiais.

À minha orientadora, a Professora Dra Luciana Moreira Lima, pela paciência, sabedoria, apoio, correções e ensinamentos.

À minha coorientadora, a Professora Dra Silvia Almeida Cardoso, pelas dicas, conselhos e sugestões na escolha e realização deste projeto.

Ao meu coorientador, o Professor Dr Lucas Vilas Boas Magalhães, pelo apoio, auxílio no diagnóstico dos participantes e pelas sugestões e correções necessárias.

Ao Rodrigo Barros de Freitas pela ajuda nos experimentos.

Ao Guilherme Pereira de Oliveira, meu parceiro de mestrado que me ajudou bastante.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, por a realização de um dos grandes projetos da minha vida profissional.

À Leila Aparecida de Souza Oliveira, por estar sempre disponível para resolver os problemas administrativos.

A todos os professores (as) que participaram de uma maneira direta ou indireta na realização deste projeto de mestrado.

Aos participantes que aceitaram fazer parte do estudo.

A todos os colegas do programa que me ajudaram de uma maneira ou outra durante o período do estudo.

À Enedina Maria de Almeida Sacramento pelo auxílio na revisão em inglês do artigo.

RESUMO

ISAAC, Etienne, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Estresse oxidativo em pacientes com neuropatia diabética.** Orientadora: Luciana Moreira Lima. Coorientadores: Lucas Vilas Boas Magalhães e Silvia Almeida Cardoso.

A polineuropatia diabética (PD) é uma das complicações microvasculares mais comuns do diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Evidências indicam que o estresse oxidativo é um dos fatores cruciais para o desenvolvimento do DM e suas complicações. O objetivo deste presente estudo foi avaliar o perfil de estresse oxidativo em pacientes com DM2 e PD, relacionando-os a fatores associados ao desenvolvimento de PD. O estudo contou com a participação de 42 voluntários, que foram distribuídos em três grupos: um grupo com pacientes com DM2 sem PD (n = 15); um grupo com DM2 e PD (n = 14); um grupo controle (n = 13). Foram avaliados os seguintes parâmetros: índice de massa corporal (IMC), hábito de vida, estresse percebido, óxido nítrico (NO), malondialdeído (MDA), capacidade antioxidante total (FRAP) e glutathione S transferase (GST). Não foram encontradas diferenças significativas entre os três grupos estudados para os marcadores NO e GST. Para FRAP, o nível foi significativamente maior no grupo controle quando comparado aos grupos DM2 e DM2 + PD. Os níveis de MDA foram significativamente menor no grupo DM2 + PD ($0,30 \pm 0,08$), comparado aos grupos DM2 sem DP ($1,06 \pm 0,16$) e controle ($1,04 \pm 0,15$), $p < 0,0001$. Os voluntários com DM2, com ou sem polineuropatia diabética, apresentam um nível reduzido de capacidade antioxidante total, em relação aos participantes do grupo controle. Esses resultados sugerem que pacientes diabéticos com ou sem polineuropatia periférica apresentam alterações no sistema de defesa antioxidante e que o MDA reduzido observado no grupo diabético com polineuropatia pode estar ligado ao efeito de medicações e à suplementação de vitaminas A e E.

ABSTRACT

ISAAC, Etienne, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Oxidative stress in patients with diabetic neuropathy**. Advisor: Luciana Moreira Lima. Co-advisors: Lucas Vilas Boas Magalhães and Sílvia Almeida Cardoso.

Diabetic polyneuropathy (PD) is one of the most common microvascular complications of type 2 diabetes mellitus (DM2). Evidence indicates oxidative stress as one of the crucial factors for the development of DM and its complications. The objective of this present study was to evaluate the profile of oxidative stress in patients with DM2 and PD, relating them to factors associated with the development of PD. The study included the participation of 42 volunteers, who were distributed into three groups: one group with patients with DM2 without PD ($n = 15$); a group with DM2 and PD ($n = 14$); a control group ($n = 13$). The following parameters were evaluated: body mass index (BMI), life habit, perceived stress, nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (FRAP) and glutathione S transferase (GST). No significant differences were found between the three groups studied for the NO and GST markers. For FRAP, the level was significantly higher in the control group compared to the DM2 and DM2 + PD groups. MDA was significantly lower in the DM2 + PD group (0.30 ± 0.08), compared to the DM2 group without PD (1.06 ± 0.16) and control (1.04 ± 0.15), $p < 0.0001$. The volunteers with DM2, with or without diabetic polyneuropathy, present a reduced level of total antioxidant capacity, in relation to the participants in the control group. These results suggest that diabetic patients with or without peripheral polyneuropathy present alterations in the antioxidant defense system and that the reduced MDA observed in the diabetic group with polyneuropathy may be linked to the effect of medications and supplementation of vitamins A and E.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs	Produtos finais da glicação avançada
ALA	Ácido alfa lipóico
CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CEP-UFV	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa
DHLA	Ácido dihidro-lipóico
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
eNOS	óxido nítrico-sintase endotelial
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FRAP	Capacidade de Redução Férrica
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione
GST	Glutathione Transferase
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HCl	Ácido Clorídrico
HO ₂ [·]	hidroperoxila
IMC	Índice de Massa Corporal
MDA	Malondialdeído
NADPH	Hidrogênio Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida
NO	Óxido Nítrico
O ₂ ^{·-}	Superóxido

OH ⁻	Radicais Hidroxila
PD	Polineuropatia Diabética
PKC	Proteína quinase C
RAGE	receptores dos produtos finais de glicação avançada
RCS	espécies de cloro
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- α	Fator de Crescimento Transformador alfa
TGF- β	Fator de Crescimento transformador beta
UDP-GlcNAc	uridina 5-difosfato- <i>N</i> - acetilglucosamina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição dos valores da capacidade de redução do ferro no plasma (FRAP) nos três grupos estudados.....	33
Figura 2: Distribuição dos valores de malondialdeído (MDA) nos três grupos estudados.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização da amostra e parâmetros avaliados.....31

Tabela 2: distribuição de frequências de uso de medicamentos e suplementos por grupo.....32

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	01
2 INTRODUÇÃO GERAL.....	02
2.1 Diabetes Mellitus (MD).....	02
2.2 Polineuropatia Diabetica (PD).....	03
2.3 Estresse Oxidativo.....	05
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	08
4 OBJETIVOS.....	13
4.1 Objetivo Geral.....	13
4.2 Objetivos Específicos.....	13
5 PRODUTO FINAL.....	14
6 CONCLUSÕES GERAIS.....	31
ANEXO A – Aprovação do projeto pelo CEP.....	32
ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	36
ANEXO C – Escala do Estresse Percebido.....	38
ANEXO D - Comprovante de submissão do artigo.....	40

1 APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi elaborada de acordo com as normas estabelecidas pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa – UFV. O corpo do trabalho compreende uma introdução geral, objetivos geral e específicos, um artigo científico, um folder educativo para profissionais de saúde e uma conclusão geral. O artigo intitulado “*Oxidative stress markers in patients with diabetic neuropathy*” foi formatado de acordo com as normas da revista *Oxidative Medicine and Cellular Longevity (Online – ISSN 1942-0994)*, para a qual o artigo foi submetido.

2 INTRODUÇÃO GERAL

O Diabetes mellitus (DM) tornou-se nos últimos anos um dos grandes problemas de saúde no mundo. Apesar das melhorias no tratamento e cuidados fornecidos aos pacientes diabéticos, a doença representa ainda uma das principais causas da morbidade e mortalidade (Aoucheri *et al.*, 2015). Segundo dados publicados em 2017, o número de pacientes portadores de DM era aproximadamente de 425 milhões no mundo (Iqbal *et al.*, 2018). Devido a seu caráter crônico, o DM normalmente acompanha várias complicações microvasculares e macrovasculares. Dentre elas, encontram-se a retinopatia, a nefropatia, as doenças cardiovasculares e a polineuropatia (Oyenih *et al.*, 2015). A polineuropatia diabética (PD) afeta cerca de 50% dos portadores de DM e assim esta é considerada uma das complicações mais comuns nos indivíduos com DM tipo 1 (DM1) e DM tipo 2 (DM2) (Giriraja *et al.*, 2017).

Atualmente, apesar do grande número de pesquisas realizadas, as causas da polineuropatia diabética (PD) ainda não são bem definidas (Giriraja *et al.*, 2017). Contudo, alguns estudos apontam a hiperglicemia crônica, idade, duração do DM, hipertensão, dislipidemia, tabagismo, consumo excessivo de álcool como os principais fatores envolvidos no desenvolvimento da PD (Román-Pintos *et al.*, 2016; Cohen *et al.*, 2015). Segundo evidências a hiperglicemia dos portadores de DM representa o fator primordial no desenvolvimento da PD. Esta pode levar o paciente a desenvolver a PD através do aumento do fluxo da via dos polióis, dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), da ativação da proteína quinase C (PKC) e do aumento do fluxo da via hexosamina (Aoucheri *et al.*, 2015). O estresse oxidativo definido como o processo de desequilíbrio entre as espécies reativas (radicais livres) e os antioxidantes em favor de uma produção excessiva de radicais livres é considerado como o elemento subjacente às vias citadas anteriormente (Shakeel, 2015).

2.1 Diabetes mellitus (DM)

O DM refere-se a uma doença metabólica, complexa e multifatorial, que é caracterizada por defeitos na secreção da insulina e/ou na ação da insulina endógena. Esta deficiência leva o organismo a um estado de hiperglicemia (Almogbel e Rasheed, 2017; Assmann, 2016; Rehman e Akash, 2017). Considerando a sua etiologia, o DM pode ser

classificada em DM1, DM2, DM gestacional e outros tipos específicos (American Diabetes Association, 2014). O DM1 é caracterizado pela destruição das células beta do pâncreas que consequentemente provoca uma deficiência na produção da insulina. Esta destruição das células beta pancreáticas presente no DM1 pode estar ligada a um processo autoimune ou devido a outras causas desconhecidas (Punthakee *et al.*, 2018; American Diabetes Association, 2017). O DM2 representa a forma mais comum da doença e corresponde a mais de 90% dos indivíduos diabéticos. Neste tipo de DM, o indivíduo apresenta deficiência de insulina relativa e resistência periférica de insulina. Mas ao contrário do DM1, os indivíduos com DM2 não apresentam destruição das células beta (American Diabetes Association, 2017). As causas do DM2 são múltiplas e não são bem definidas ainda, mas o desenvolvimento da doença pode ser influenciado por fatores genéticos, pelo estilo de vida e também pelo envelhecimento (Lee e Halter, 2017). Já o DM gestacional (DMG) é considerado como qualquer grau de intolerância à glicose diagnóstica durante o período da gravidez independentemente se permanecer ou não após o parto (American Diabetes Association, 2017).

2.2 Polineuropatia diabética

A Polineuropatia diabética (PD) refere-se a um conjunto de distúrbios que afetam diferentes partes do sistema nervoso, com manifestações clínicas variadas, após a exclusão de outras causas. É considerado como uma das complicações mais severas do DM (Pop-Bisui *et al.*, 2017; Giriraja *et al.*, 2017; Roman-Pintos *et al.*, 2016; Papanas e Ziegler, 2015). As polineuropatias podem ser classificadas de diversas maneiras, mas a mais usada é a classificação de Thomas. Segundo ele, as neuropatias diabéticas podem ser classificadas em: neuropatia da hiperglicemia; polineuropatias simétricas generalizadas que podem ser sensitivo-motora crônica, sensitivo-aguda ou autonômica; neuropatia focal e multifocal; polineuropatia inflamatória desmielinizante (Giriraja *et al.*, 2017).

O desenvolvimento da PD está associado a vários fatores, dentre eles destacam-se: hiperglicemia crônica, idade, duração do DM, hipertensão, dislipidemia, tabagismo, consumo excessivo de álcool (Cohen *et al.*, 2015). Dentre esses fatores citados anteriormente, a hiperglicemia é apontada como o principal fator na patogenia da PD (Cohen *et al.*, 2015; Bruschi *et al.*, 2017). Os mecanismos nos quais a hiperglicemia crônica causa a ND incluem o

aumento do fluxo da via dos polióis, o aumento dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), a ativação da proteína quinase C (PKC) e o aumento do fluxo da via hexosamina (Bruschi *et al.*, 2017; Roman-Pintos *et al.*, 2016). Segundo Shakeel (2015), o estresse oxidativo, provocado pela hiperglicemia crônica, é considerado como o elemento subjacente aos mecanismos citados anteriormente.

A via do poliol é definida como o processo no qual as moléculas de glicose, catalisada pela enzima aldose redutase, são reduzidas em sorbitol que após a oxidação se transformam em frutose (Oyenihi *et al.*, 2015). A via do poliol é um processo normal de toda célula, mas, na hiperglicemia crônica, ela sofre um aumento significativo do seu fluxo (Shakeel, 2015). O acúmulo de sorbitol provoca o estresse osmótico e efluxo compensatório de mioinositol e taurina. Essa perda de mioinositol causa o comprometimento fisiológico das células nervosas (Feldman *et al.*, 2017; Giri *et al.*, 2018).

Os AGEs são grupos de compostos formados a partir da reação de Maillard (Oyenihi *et al.*, 2015). Nessa reação, as moléculas de glicose reagem com o grupo amino das proteínas para formar os produtos Amadori que posteriormente se transformam em AGEs (Feldman *et al.*, 2017). Uma vez ligados com as proteínas, os AGEs alteram a função das proteínas provocando danos celulares. Além disso, os AGEs podem se ligar aos receptores dos produtos finais de glicação avançada (RAGE) para aumentar o estresse oxidativo por meio da ativação de NADPH oxidase e/ou ativar as vias de sinalização pró-inflamatórias. Essas interações afetam a integridade dos neurônios (Feldman *et al.*, 2017; Oyenihi *et al.*, 2015).

As PKCs podem ser definidas como uma família de enzima que participam no controle da função de outras proteínas por meio da fosforilação do grupo hidroxila (OH) em resíduos de resina e treonina (Sharkeel, 2014). No caso de hiperglicemia crônica ocorre normalmente um acúmulo de dihidroxiacetona fosfato que se transforma posteriormente em glicerol-3-fosfato. Após sua conjugação, o glicerol-3-fosfato dá origem ao diacilglicerol que tem a capacidade de ativar a PKC. Esta ativação provoca a ativação em cascata dos fatores pro-inflamatórios e a superprodução dos radicais livres que consequentemente podem causar a disfunção dos nervos (Oyenihi *et al.*, 2014).

A via hexosamina é considerada uma das vias metabólicas da glicose celular que geralmente utiliza cerca de 2 e 3% de toda glicose na célula (Cork et al., 2018). Nesta via, a frutose-6-fosfato, intermediário da glicólise, é convertida em glucosamina-6-fosfato que gera posteriormente o substrato uridina 5-difosfato- *N*- acetilglucosamina (UDP-GlcNAc). Na presença de hiperglicemia a via hexosamina tende a aumentar (Cork et al., 2018; Oyenihí et al., 2014). O aumento dos produtos UDP-GlcNAc provoca a inibição de enzimas tal como a óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) ou pode ativar os fatores de crescimento transformador alfa (TGF- α) e beta (TGF- β) que são considerados fatores envolvidos na patogénia da neuropatia diabética (Roman-Pintos et al., 2016; Oyenihí *et al.*, 2014).

2.3 Estresses oxidativo

Os radicais livres são definidos como espécies químicas que possuem um ou mais elétrons não pareados. São moléculas muito instáveis e reativas (Usmat *et al.*, 2016). Exercem normalmente um papel importante na sinalização celular e na regulação dos processos biológicos e fisiológicos (Schieber e Chandel, 2014). Mas, quando estes passam seus elétrons desemparelhados, provocam oxidação de vários componentes celulares e moleculares induzindo danos celulares (Usmat *et al.*, 2016). Dentre as moléculas mais afetadas pelos radicais livres estão os carboidratos, as proteínas, os lipídeos e os ácidos nucleicos (Roman-Pintos *et al.*, 2016). Devido à sua grande concentração no organismo, as proteínas representam moléculas prediletas dos ataques dos radicais livres (Ahmad *et al.*, 2017).

Os ataques dos radicais livres às proteínas provocam modificações nas cadeias laterais dos aminoácidos e, conseqüentemente, levam a alterações das estruturas e perda de algumas funções das proteínas. Estas modificações geralmente comprometem o metabolismo celular (Ahmad *et al.*, 2017). A oxidação das proteínas é considerada um fator importante no desenvolvimento do DM2 e suas complicações (Ahmad *et al.*, 2017; Davies, 2016). Os produtos gerados pela oxidação das proteínas incluem os grupos carbonila, aldeídos e cetonas (Ahmad *et al.*, 2017). Nos lipídios, o ataque dos radicais livres é denominado de peroxidação lipídica. Neste processo, os radicais abstraem um hidrogênio alílico para formar um radical lipídico centrado no carbono. Em seguida, esse radical lipídico reage com o oxigênio para formar um radical peróxido lipídico que depois de abstrair um hidrogênio de outra molécula forma um novo radical lipídico e um hidroperóxido lipídico (Ayala *et al.*, 2014). Os

principais produtos finais desse processo incluem o malondialdeído (MDA), propanal, hexanal e 4-hidroxinonenal (Rehman e Akash, 2017; Ayala *et al.*, 2014).

Os radicais livres são classificados em três tipos: as espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (RNS) e as espécies de cloro (RCS), mas as EROs e RNS são os mais comuns (Rochette *et al.*, 2014). Os EROs incluem os radicais superóxido (O_2^-), Hidroxila (-OH) e o radical hidroperoxila (HO_2^-) (Schieber e Chandel, 2014). São considerados subprodutos naturais do metabolismo aeróbico e podem ser endógenos ou exógenos. Os endógenos são produzidos pelas mitocôndrias, a membrana plasmática, o retículo endoplasmático e as peroxissomas (Ayala *et al.*, 2014). A formação dos EROs está relacionada com a radiação, metabolismo de hidrocarbonatos clorados, óxidos de nitrogênio, processo de combustão. Os RNS são todos os produtos das reações do óxido nítrico (NO) (Adams *et al.*, 2015). Como os EROs, os RNS são altamente reativos e instáveis (Usmat *et al.*, 2016).

Para evitar as ações prejudiciais dos radicais livres nas células, o organismo produz normalmente antioxidantes que tem como papel de neutralizar os efeitos dos radicais livres (Usmat *et al.*, 2016). Nas doenças crônicas tal como o DM, o organismo apresenta um excesso de radicais livres e uma diminuição dos antioxidantes resultando no processo denominado de estresse oxidativo (Aouacheri *et al.*, 2015).

Os antioxidantes são substâncias que servem para inibir ou reduzir a oxidação de um substrato, como por exemplo, os danos provocados pelos radicais livres (Usmat *et al.*, 2016; Roman-Pintos *et al.*, 2016). Os antioxidantes, substâncias enzimáticas ou não enzimáticas, são normalmente endógenos ou exógenos (Kurutas, 2016). Os principais antioxidantes enzimáticos são a superóxido dismutase (SOD), a Catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione S-transferase (GST) (Roman-Pintos *et al.*, 2016). Os antioxidantes não enzimáticos incluem geralmente as vitaminas A, E e C, o ácido alfa lipóico (ALA), a melatonina e os flavonoides (Oyenihini *et al.*, 2015).

A SOD é uma metaloenzima que atua como componente do sistema de defesa de primeira linha contra os EROs (Ighodaro e Akinloye, 2018). Considerada o antioxidante mais importante, a SOD tem a função de catalisar a dismutação de ânions superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, com a finalidade de amenizar os ataques do superóxido na célula (Ighodaro e Akinloye, 2018; Rehman e Akash, 2017). A CAT é uma enzima

antioxidante que se encontra na maioria dos tecidos que utilizam oxigênio (Ighodaro e Akinloye, 2018). Esta enzima catalisa as moléculas de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (Usmat *et al.*, 2016). GPx é outra enzima importante que tem a função de catalisar o peróxido de hidrogênio em água. Além disso, a GPx reduz os peróxidos lipídicos e seus alcoóis (Ighodaro e Akinloye, 2018). As GSTs representam uma família de enzimas cujo papel principal é de catalisar a conjugação da glutathione redutase (GSH) a diversos substratos. Esse processo faz com que os GSTs participem do processo de desintoxicação celular (Mazzeti *et al.*, 2015).

A vitamina A é uma vitamina lipossolúvel que tem a função antioxidante. Pode ser encontrada de duas formas: o retinol e o carotenoide. A forma retinol é uma vitamina A pré-formada encontrada em alimentos de origem animal. Já a forma carotenoide é considerada precursora de vitamina A e é encontrada geralmente em vegetais (Hamishehkar *et al.*, 2016). A vitamina E é também uma vitamina lipossolúvel que tem um papel importante no sistema de defesa antioxidante. Pode ser apresentada sob oito formas diferentes: as classes alfa, beta, gama e delta de tocoferol e também de tocotrienol (Rizvi *et al.*, 2014). Uma das funções importantes desta vitamina é a inibição de produção de EROs durante a peroxidação lipídica (Rizvi *et al.*, 2014). A vitamina C, também chamada de ácido ascórbico, é uma vitamina hidrossolúvel que tem papel variado. Como antioxidante, esta protege o grupo tiol proteico contra a oxidação provocada pelos radicais livres (Kurutas, 2016). O ácido alfa lipóico (ALA) é um composto de dissulfeto de oito carbonos com um centro quirál (El Barky *et al.*, 2017). Após a sua absorção nas células, a ALA é reduzida em ácido dihidro-lipóico (DHLLA) (Oyenihi *et al.*, 2015). Além de regenerar de outros antioxidantes como as vitaminas C, E e a GSH, a ALA consegue inibir produtos finais de glicação avançada e hexosamina reduzindo, consequentemente, o estresse oxidativo (Oyenihi *et al.*, 2014). A melatonina é o principal produto secretado pela glândula pineal. É considerada limpadora direta de radicais livres e tem um papel indireto de antioxidante. Além de estimular outras enzimas antioxidantes, consegue doar elétrons a fim de remover grande quantidade de radicais livres, sobretudo a hidroxila (Kurutas, 2016). Os flavonoides são produtos que pertencem a uma classe de compostos fenólicos e são encontrados geralmente nas plantas. Eles podem exercer no organismo uma grande variedade de funções. Podem ser usados como antioxidante, anti-inflamatórios e anti-mutagênicos (Panch *et al.*, 2016).

O FRAP é um dos métodos mais usados para avaliar a capacidade de antioxidante no plasma ou outros líquidos do organismo. Desenvolvido por Benzie e Strain (Lim e Lim, 2013), o FRAP consiste numa dosagem colorimétrica baseada no princípio de redução do complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) em tripiridiltriazina ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ) pelos antioxidantes de uma amostra em pH baixo (Benzie e Strain, 1996). Na presença da hiperglicemia presente nos pacientes com DM2, o FRAP apresentou um valor muito baixo comparando com os indivíduos com a glicemia normal (Padhy *et al.*, 2015).

Entre os testes que permitem verificar a capacidade antioxidante, o FRAP se diferencia devido a sua capacidade de medir não somente um antioxidante específico, mas a capacidade de antioxidante total do organismo (Lim e Lim, 2013). É considerado um teste rápido e simples de executar. A principal desvantagem deste método reside no tempo de reação. Devido a isso, o FRAP não permite de medir alguns antioxidantes que contêm os grupos tióis (Rubio *et al.*, 2016).

Diante das evidências apresentadas anteriormente sobre o papel do estresse oxidativo no desenvolvimento do DM2 e suas principais complicações, a avaliação dos marcadores do estresse oxidativo, óxido nítrico e antioxidantes torna-se importante na avaliação do nível de proteção dos pacientes em relação a DM2 e suas complicações, além da possibilidade de fornecer informações valiosas sobre o sistema antioxidante dos pacientes diabéticos com ou sem neuropatia.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams L, Franco MC, Estevez AG. Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Exp Biol Med* (Maywood). 2015; 240(6): 711–717.

Ahmad S, Khan H, Shahab U, Rehman S, Rafi Z, Khan MY et al. Protein oxidation: an overview of metabolism of sulphur containing amino acid, cysteine. *Front Biosci* (Schol Ed). 2017;9:71-87.

Almogbel E, Rasheed N. Protein Mediated Oxidative Stress in Patients with Diabetes and its Associated Neuropathy: Correlation with Protein Carbonylation and Disease Activity Markers. *J Clin Diagn Res*. 2017; 11(2): 21-25.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37(1):S81-90.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2017;40(1):S11–S24.

Aouacheri O, Saka S, Krim M. The Investigation of the Oxidative Stress-Related Parameters in Type 2 Diabetes Mellitus. *Can J Diabetes*. 2015;39(1):44-9.

Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress - A concise review. *Saudi Pharm J*. 2016; 24(5): 547–553.

Assmann TS, Brondani LA, Bouças AP, Rheinheimer J, Souza BM De, Canani LH, et al. Nitric Oxide Nitric oxide levels in patients with diabetes mellitus : A systematic review and meta-analysis. *Nitric Oxide*. 2016;61:1-9.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation : Production , Metabolism , and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:1-31

Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power ”: The FRAP Assay. *Anal Biochem*. 1996;239(1):70-6.

Bruschi, LKM., Rocha, DA, Filho, ELG, Barboza, NMP, Frisanco, PAB, Callegaro, RM, et al. Diabetes Mellitus and Diabetic Peripheral Neuropathy. *Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases*. 2017: 7, 12-21

Cohen K, Shinkazh N, Frank J, Israel I, Fellner C. Pharmacological Treatment Of Diabetic Peripheral Neuropathy. *P T*. 2015; 40(6): 372, 375-388

Cork GK, Thompson J, Slawson C. Real Talk: The Inter-play Between the mTOR, AMPK, and Hexosamine Biosynthetic Pathways in Cell Signaling. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9 (522): 1-9.

Davies MJ, D'Alessio DA, Fradkin J, Kernan WN, Mathieu C, Mingrone G, et al. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*. 2018 Dec;41(12): 2669-2701.

Davies MJ. Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J*. 2016; 473: 805–825.

El Barky AR, Hussein SA and Mohamed TM. The Potent Antioxidant Alpha Lipoic Acid. *J Plant Chem and Ecophysiol*. 2017; 2(1): 1-5.

Feldman EL, Bennett DLH, Nave K, Jensen TS. New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. *Neuron*. 2017; 93(6): 1296–1313.

Giri B, Dey S, Das T, Sarkar M, Banerjee J, Sandeep Kumar Dash SK. Chronic hyperglycemia mediated physiological alteration and metabolic distortion leads to organ dysfunction, infection, cancer progression and other pathophysiological consequences: An update on glucose toxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018; 107: 306–328

Giriraja KV, Pavitra C, Bindumathi PL. Antioxidant status in diabetic neuropathy. *J. Evid. Based Med. Healthc*. 2017; 4(78):4588-4592.

Hamishehkar H, Ranjdoost F, Asgharian P, Mahmoodpoor A, Sanaie S. Vitamins, Are They Safe?. *Adv Pharm Bull*. 2016;6(4):467-477.

Ighodaro MO , Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 2018; 54 (4): 287-293

Iqbal Z, Azmi S, Yadav R, Ferdousi M, Kumar M, Cuthbertson DJ, et al. Diabetic Peripheral Neuropathy: Epidemiology, Diagnosis, and Pharmacotherapy. *Clin Ther*. 2018; 40(6):828-849.

Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J*. 2016;15(1):1-22.

Lee, PG, Halter, JB. The Pathophysiology of Hyperglycemia in Older Adults: Clinical Considerations. *Diabetes Care*. 2017;40:444–452.

Lim CSHm, Lim SL, Ferric Reducing Capacity Versus Ferric Reducing Antioxidant Power for Measuring Total Antioxidant Capacity, *Laboratory Medicine*, 2013; 44,(1), 51–55.

Marín-Peñalver JJ, Martín-Timón I, Sevillano-Collantes C, Del Cañizo-Gómez FJ. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2016;7(17): 354-95.

Mazzetti AP, Fiorile MC, Primavera A, Bello ML. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochemistry International*. 2015; 82: 10–18.

Oyenihi AB, Ayeleso AO, Mukwevho E, Masola B. Antioxidant Strategies in the Management of Diabetic Neuropathy. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:1-15.

Padhy R, Acharya SS, Devi N, S. Swain, Rattan R. Association of nitrosative and oxidative stress in young type 2 diabetic patients. *Int J Res Med Sci* 2015;3:2694-7,

Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 2016; 47(5): 1- 15.

Papanas N, Ziegler D. Efficacy of a -lipoic acid in diabetic neuropathy. *Expert Opin Pharmacother*. 2015;15(18): 2721-2731.

Pop-busui R, Boulton AJM, Feldman EL, Bril V, Freeman R, Malik RA, et al. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2017;40(1):136-154.

Punthakee Z, Goldenberg R, Katz P. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. 2018;42 (1):S10-S15.

Rehman K, Sajid M, Akash H. Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked?. *J Cell Biochem*. 2017;118(11):3577-3585.

Rizvi S, Raza ST, Ahmed F, Ahmad A, Abbas S, Mahdi F. The role of vitamin e in human health and some diseases. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2014;14(2):157-65.

Rochette L, Ghibu S, Muresan A, Vergely C. Alpha-lipoic acid: molecular mechanisms and therapeutic potential in diabetes. *Can J Physiol Pharmacol*. 2015; 93(12):1021-1027.

Román-Pintos LM, Villegas-Rivera G, Rodríguez-Carrizalez AD, Miranda-Díaz AG, Cardona-Muñoz EG. Diabetic Polyneuropathy in Type 2 Diabetes Mellitus: Inflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Function. *J Diabetes Res*. 2016;2016: 1-16.

Rubio CP, Hernández-Ruiz J, Martínez-Subiela S, Tvarijonaviciute A, Ceron JJ. Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update. *BMC Vet Res*. 2016;12(1):166.

Schreiber AK, Nones CFM, Reis RC, Chichorro JG, Cunha JM, Schreiber AK, et al. Diabetic neuropathic pain : Physiopathology and treatment. *World J Diabetes*. 2015;6(3):432-44.

Shakeel, M. Recent advances in understanding the role of oxidative stress in diabetic neuropathy. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2015: 9(4), 373–378.

Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Robert H. Eckel RH, Groop L et al. Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. *Diabetes*. 2017; 66(2): 241–255.

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo Geral

Avaliar os níveis séricos dos marcadores do estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 com e sem polineuropatia.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil antropométrico dos participantes;
- Estabelecer a relação entre o nível do estresse oxidativo, idade, gênero, IMC e o estresse percebido;
- Quantificar os níveis de óxido nítrico e da superóxido dismutase (SOD) em amostra de sangue periférico dos participantes;
- Determinar os níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA);
- Verificar a capacidade antioxidante total dos participantes, por meio do método da capacidade de redução férrica (FRAP);
- Quantificar a glutathione s-transferase (GST);

5 RESULTADOS: PRODUTO FINAL

5.1 Artigo original

Original Article

Oxidative stress markers in patients with diabetic neuropathy

Isaac Etienne¹, Lucas Vilas Boas Magalhães¹, Silvia Almeida Cardoso¹, Rodrigo Barros de Freitas¹, Guilherme Pereira de Oliveira², Luciana Moreira Lima^{1,2*}

¹*Postgraduate Program in Health Sciences, Department of Medicine and Nursing,
Universidade Federal de Viçosa, MG, Brazil*

²*Postgraduate Program in Physical Education, Department of Physical Education,
Universidade Federal de Viçosa, MG, Brazil*

* Corresponding author:

Professor Luciana Moreira Lima, DS, - *Department of Medicine and Nursing*, Universidade Federal de Viçosa. Av. PH Rolfs, s/n – Centro – Viçosa, Minas Gerais – CEP 36570-000 – Tel: (31) 3899-3904 – e-mail: luciana.lima@ufv.br

Author contribution:

Rodrigo Barros de Freitas: participated in the process of laboratory analysis

ABSTRACT

Introduction: Diabetic polyneuropathy (PD) is one of the most common microvascular complications of type 2 diabetes mellitus (DM2). Evidence indicates oxidative stress as one of the crucial factors for the development of DM and its complications. **Objective:** To evaluate the profile of oxidative stress in patients with DM2 and PD, relating them to factors associated with the development of PD. **Methods:** the study included the participation of 42 volunteers, who were distributed into three groups: one group with patients with DM2 without PD (n = 15); a group with DM2 and PD (n = 14); a control group (n = 13). The following parameters were evaluated: body mass index (BMI), life habit, perceived stress, nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (FRAP) and glutathione S transferase (GST). **Results:** No significant differences were found between the three groups studied for the NO and GST markers. For FRAP, the level was significantly higher in the control group compared to the DM2 and DM2 + PD groups. MDA was significantly lower in the DM2 + PD group (0.30 ± 0.08), compared to the DM2 group without PD (1.06 ± 0.16) and control (1.04 ± 0.15), $p < 0.0001$. **Conclusion:** The volunteers with DM2, with or without diabetic polyneuropathy, present a reduced level of total antioxidant capacity, in relation to the participants in the control group. These results suggest that diabetic patients with or without peripheral polyneuropathy present alterations in the antioxidant defense system and that the reduced MDA observed in the diabetic group with polyneuropathy may be linked to the effect of medications and supplementation of vitamins A and E.

Keywords: Type 2 diabetes mellitus, diabetic polyneuropathy, oxidative stress, nitric oxide.

INTRODUCTION

Among the severe complications of type 2 diabetes mellitus (DM2), diabetic polyneuropathy (PD) is considered one of the most common [1, 2]. PD affects about one-third of the diabetic population. It causes a great impact on patients' quality of life and increases the rate of morbidity and mortality [1, 3]. According to the literature, oxidative stress is considered as one of the main factors in the development of DM2 and its complications [4].

Oxidative stress is usually defined as the process of imbalance between free radicals and antioxidants that favors the increase of free radicals [5]. The main free radicals are reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). ROS includes radicals such as superoxide, hydroxyl, peroxy and hydroperoxyl. RNS includes nitrite oxide [6]. Due to its great participation in the development of DM2 and its likely role in the pathogenesis of PD, the oxidative stress profile must be investigated [2].

DM2 and its complications are considered multifactorial. Thus, the pathogenesis of PD is quite complex. It has not been well defined yet, but some studies point to several pathways that may lead a diabetic individual to develop PD, including hyperglycemia, dyslipidemia and impaired insulin signaling [8]. Currently, hyperglycemia is considered as one of the most described mechanisms. There is evidence that chronic hyperglycemia can cause cell damage through several pathways. First, excess glycolysis leads to mitochondrial electron transport chain overload and increased ROS and RNS [8]. Through the polyol pathway, hyperglycemia increases cellular osmolarity by reducing the nicotinamide adenine phosphate dinucleotide NADPH, which, consequently, leads to oxidative stress [4, 8]. Through the hexosamine pathway, hyperglycemia can cause inflammatory injury [8]. In addition, increased blood glucose may generate advanced late glycation end products (AGEs). In general, the latter causes the oxidation of biomolecules and irreversible tissue damage, including peripheral nerve damage [4, 9]. Recent studies have been conducted to verify the association between oxidative stress and the development of type 2 diabetes mellitus (DM2) or PD [2]. Many of these studies evidence a relationship between oxidative stress and DM2.

In light of such evidence on the role of oxidative stress in the development of DM2 and its complications, the present study aims to evaluate the profile of oxidative stress in patients with DM2 and PD and relate them to factors associated with the development of PD.

MATERIALS AND METHODS

Study design

This is a cross-sectional study, with descriptive and inferential statistical analysis.

Patients and control subjects

The study protocol was approved by the Committee for Ethics in Research of the Federal University of Viçosa (CAAE 59855516.0.0000.5153). All subjects signed legal consent forms. Information on demographic characteristics, lifestyle habits and perceived stress level (Annex C) was also assessed.

We assessed a total of 42 male and female subjects at the ages ranging from 40 to 72 years. DM2 patients were selected in the Centro Estadual de Atenção Especializada in Viçosa, Minas Gerais, Brazil. DM2 + DP patients were selected in a Neurology Clinic in Viçosa. The diagnosis was confirmed by nerve conduction studies and the presence of peripheral neurological symptoms. The control group was composed of healthy subjects with no previous history of DM and complications or any type of chronic illness. They were through dissemination of the research in the electronic news system of the Federal University of Viçosa. On the basis of clinical criteria, the subjects were distributed into three groups: control (n = 13), DM2 (n = 15) and DM2+DP (n = 14).

Subjects with renal, hepatic, autoimmune, and mieloproliferative diseases, coagulation disorders and cancer, and those in a post-operative period or immobilized during a long time were excluded from the study. All participants with Type 1 diabetes mellitus were also excluded. The individuals were classified as having DM2 if plasma glucose was equal to or superior than 126 mg/dL, under fasting conditions, or if they were receiving oral anti-diabetics or insulin.

Sample collection

Venous blood samples were taken from all subjects after fasting for 12 hours. Five milliliters of venous blood without anticoagulant were collected from each participant using Vacutainer® System tubes (Becton-Dickinson). The samples were centrifuged at 1.100 g for 15 minutes, for rapid serum separation. the serum aliquots were stored at -70°C.

Laboratory measurements

The tissue damage marker Malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), antioxidant mediators GlutathioneS-transferase (GST) and total antioxidant capacity were measured, to evaluate the oxidative stress.

The lipid peroxidation (MDA) was measured by reactive substances with thiobarbituric acid (TBARS), according to the methodology proposed by Buege and Aust [10]. Thus, 200 µL of each sample were added to 400 µL of TBARS solution (15% TCA, 0.375% TBA and 0.25M HCl), vortexed for 10 seconds and placed in water bath, at 90°C, for 40 minutes. After cooling, the thiobarbituric acid reactive substances were extracted with the addition of 600 µL of n-butanol, followed by centrifugation at 3500 rpm, for 5 minutes. Finally, after centrifugation, 200 µL of the supernatants were removed and subjected to reading at 535 nm. TBARS values were expressed as malondialdehyde (MDA) ηmols per mg protein.

Nitric oxide was evaluated by the Griess method [11]. In this method, nitric is used as an indicator of nitric oxide synthesis and is detected by the Griess Reactive, composed of 1% sulfanilamide and 0.1% naphthylethylene diamine in 2.5% H₃PO₄. Based on this method, 50 µL of serum was added to 96-well microplates containing 100 µL of the Griess Reagent. This mixture was incubated in the dark for 10 minutes, at room temperature. After incubation, the Thermo Scientific Multiskan GO spectrophotometer, 570 nm wave, was used for analysis. The concentration of nitric oxide was measured using the standard curve with known concentrations (µM) of sodium nitrite.

The analysis of the enzymatic activity of GST was performed by the method described by Habig et al. [12]. In a Quartz cuvette, 682 µL of Phosphate buffer (0.1 M and pH 7.0) was pipetted along with 6 µL of CDNB 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (0.1 M), 6 µL of sample and 6 µL of GSH solution (0.1 M). The reaction rate of the enzyme present in the samples was monitored at 340 nm in a spectrophotometer for 90 seconds to monitor the enzymatic kinetics.

A blank was also made for the experiment, which had no addition of the sample and was used to verify the rate of non-enzymatic reactions. The enzyme activity was expressed in $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$, where one unit of activity refers to the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μmol of product per minute and per gram of sample, under the conditions of the assay.

The total antioxidant capacity (FRAP) was determined by the method described by Benzie and Strain [13]. The reaction was performed by adding 10 μL of sample or standard, and 220 μL of the FRAP solution were added to polystyrene microplates. The microplates were incubated in the dark for 30 minutes.

Statistical analysis

The data were analyzed by the Graph Pad Prism version 7.0 software system, using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey test. the categorical variables (risk factors) were analyzed by the Chi-square contingency test. The Pearson's correlation coefficient was used to measure the linear association between two continuous variables.

The minimum size of the sample was defined using the coefficient of variation previously obtained for FRAP (21.6%) and GSH (20.2%) in the literature [14], considering fifteen and twelve percent of variation around the average, respectively, with a minimum number of nine individuals per group. It was possible to verify statistical differences with a 5% level of significance [15].

RESULTS

Table 1 presents the characteristics of age, sex and body mass index of the three study groups, as well as the evaluation parameters of the oxidative stress profile and the result of the stress perceived by the participants.

Table 1 - Characterization of sample and evaluated parameters

	Control (n=13)	DM2 (n=15)	DM2+PD (n=14)	<i>p</i>
Age (years)	61 ± 6	60 ± 6	61 ± 5	0.6555
Male/Female	7/6	7/8	7/7	---
BMI (Kg/m ²)	27 ± 7	33 ± 4	31 ± 5	0.0187
Perceived stress	---	12 ± 9	14 ± 8	0.6190
Nitric Oxide (µM)	19.6 ± 5.7	19.5 ± 8.4	19.8 ± 6.1	0.9929
MDA (nmol/mg)	1.04 ± 0.15	1.06 ± 0.16	0.30 ± 0.08****	<0.0001
FRAP (µM)	332 ± 87**	278 ± 59	256 ± 36	0.0236
GST (nmol g ⁻¹)	0.59 ± 0.27	0.74 ± 0.38	0.51 ± 0.23	0.1911

n = sample size, BMI = Body Mass Index, p = probability for the hypothesis tests, MDA = malondialdehyde, FRAP = Ferric reduction capacity, GST = glutathione S transferase. ANOVA followed by Tukey's test, data presented as mean ± standard deviation. (****) Significant difference in relation to the Control and DM2 groups. (**) Significant difference in relation to the DM2 and DM2+PD groups.

Table 2 presents data on medications and supplements (vitamins A, C, E) used by the participants in the DM2 and DM2 + PD groups.

Table 2 - Distribution of frequencies of use of drugs and supplements per group

	Control (n=13)	DM2 (n=15)	DM2+PD (n=14)	<i>p</i>
Simvastatin	0 (0%)	0 (0%)	6 (42.8%)	---
Metformin	0 (0%)	1 (6.66%)	9 (64.28.8%)	0.0011*
Glimepiride	0 (0%)	1 (6.66%)	2 (14.3%)	0.5008
Insulin	0 (0%)	0 (0%)	8 (57.1%)	---
Vitamin A	0 (0%)	0 (0%)	4 (28.5%)	---
Vitamin C	0 (0%)	0 (0%)	4 (28.5%)	---
Vitamin E	0 (0%)	0 (0%)	5 (35.7%)	---

n= sample size; p= probability for hypothesis testing, (*). significant difference between DM2 and DM2 + NP groups (chi-square test).

Figures 1 and 2 show the significant differences observed for the FRAP and MDA variables, respectively.

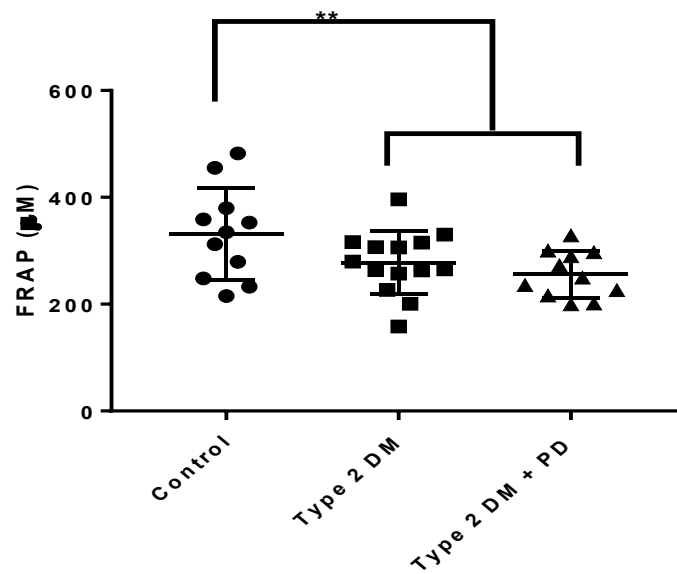


Figure 1 - Distribution of Ferric reduction capacity (FRAP) values in the three groups studied. FRAP is expressed in micromoles μM . The control group showed significantly higher plasma levels of FRAP than the type 2 DM and type 2 DM + PD groups ($p = 0.0236$).

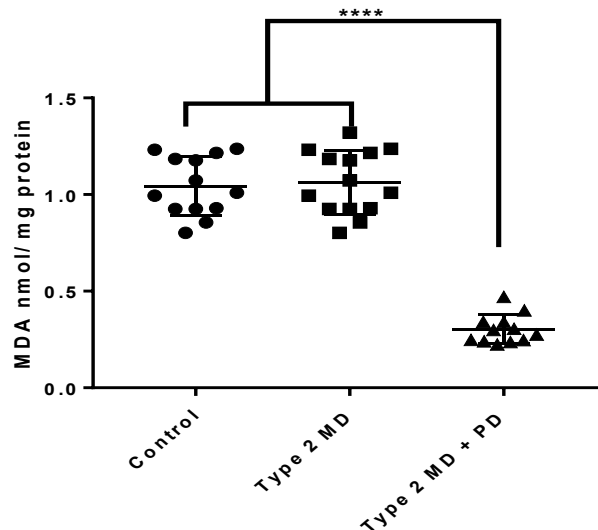


Figure 2. Distribution of malondialdehyde (MDA) values in the three groups studied. MDA concentrations were expressed in nanoMol / mg proteins. The type 2 DM + PD group presented significantly lower MDA values than the Control and type 2 DM groups ($p < 0.0001$).

DISCUSSION

When uncontrolled, chronic hyperglycemia can lead to macrovascular and microvascular complications [7]. Polyneuropathy is considered to be one of the most severe and common microvascular complication [31]. One of the causes associated with the development of polyneuropathy in diabetic individuals is oxidative stress, which is defined as an imbalance process between ROS and antioxidants, with the occurrence of increased radical production and decreased rate of antioxidants [5, 31]. In this study, we investigated the parameters related to oxidative stress in patients with DM2 and PD. A decreased total antioxidant capacity was observed in the serum of patients with DM2 and PD, when compared with participants considered normal in the control group. These findings suggest that patients with DM2 with or without PD present alterations in the antioxidant defense system in relation to controls. Contrary to other studies, such as de Palem and Abraham (2015) and Ganjifrockwala et al. (2017), a significantly reduced MDA level was observed in the DM2 + PD group compared to the DM2 and control groups [16,18].

The characteristics of the participants that were considered in the present study include age, gender, BMI and perceived stress. According to some studies, these factors may directly or indirectly affect the oxidative profile of an individual [18,19,20]. Age may alter the markers of oxidative stress, which, in its turn, will increase the risk of developing various diseases, including PD [3,18,19]. Regarding gender, there is still controversy, but some authors found a significant difference in the profile of oxidative stress in female and male diabetic patients [21], while others did not observe this difference [22]. Despite some controversies, BMI is considered as one of the factors that may also alter the markers of oxidative stress [20]. There is lack of very consistent studies on the processes in which psychological stress participates in the development of DM2 and its complications, but some studies point to an association between perceived stress and DM2 [23]. In most of these studies, a high level of perceived stress was observed in DM2 patients when compared with non-patients. The study by Thangavel et al. (2015) concluded that perceived stress along with BMI can be considered as high risk factors for the development of hyperglycemia [24].

The reaction between NO and superoxide anion forms the peroxynitrite radical, which may damage macromolecules such as proteins and their functions [25]. In addition, the literature indicates that high NO production is considered an underlying factor in the pathogenesis of PD [26]. Studies that evaluated the level of NO in DM2 patients present controversial results [27]. In some studies, the level of NO in diabetic groups increased, compared with non-diabetic subjects [25]. However, other studies have observed a decreased NO between the diabetic and control groups [28]. The present study was not able to establish a significant difference between the three groups in relation to NO.

MDA is one of the end products of peroxidation of polyunsaturated fatty acids in cells [29] and one of the biomarkers most used for the evaluation of oxidative stress in patients with T2DM [23,30]. In chronic diseases, such as DM2 and its complications, there is usually excessive formation of MDA [31]. However, the present study presented decreased MDA in the DM2 + PD group in relation to the DM2 group and in the control group. No significant difference was observed between the DM2 group and the control group. This reduced MDA in patients with diabetes with neuropathy can be explained by some hypotheses that remain unclear. Among them, we can point out the daily use of alpha lipoic acid, vitamin A, C and E supplements [9].

The daily use of vitamins A, C and E supplements is one of the strategies to treat or control DM2 + PD patients. So far, there is a dearth of information on the role of vitamin A and vitamin C supplements, but studies have already shown some benefits of vitamin E for diabetic patients with peripheral neuropathy [7, 32], including decreased final products of lipid peroxidation, such as MDA [7, 32]. In addition to vitamin supplements, the study by Villegas-Rivera et al (2015) shows the effects of the drug simvastatin, which significantly reduces the MDA marker in patients with DM2 + PD [33]. Therefore, we can relate the results of our study with the vitamins A, C and E supplements ingested by some participants of the DM2 + PD group, as well as the significantly higher use of simvastatin, oral hypoglycemic agents and insulin [34].

A significant FRAP decrease was observed in the DM2 and DM2 + PD groups compared to the control group. This marker is widely used for measuring total antioxidant capacity in DM2 patients [35]. Unlike other methods, FRAP provides us information not only on a

specific antioxidant or enzyme, but on the overall profile of all antioxidants in the body [35]. A study conducted by Dasegowda and collaborators in a diabetic population presented results to those of the present study [36]. Another study conducted by Padel and colleagues also obtained reduced FRAP values in patients with DM2 compared to controls [35]. The FRAP decrease evidenced in the present study can corroborate the information about the changes in the antioxidant defense system in patients with T2DM. However, no difference was observed for this marker between DM2 carriers with and without diabetic neuropathy. The non-significant difference found in the FRAP results for the DM2 and DM2 + PD groups may be associated with the daily use of significantly higher rates of vitamin A, C and E supplements in the DM2 + PD group [7].

Glutathione is an enzyme present in almost all cells that plays a crucial role in the metabolism of several elements [5, 30], mainly in the detoxification, by acting in the defense and protection of cells against free radicals [37]. In this study, no significant differences were found between patients with DM2 or PD, compared with healthy individuals. Giriraja et al. found significantly lower levels of GST among individuals with DM2 with neuropathy, compared to the control group [31]. In addition, most studies evaluating GST in patients with T2DM, with or without DN, found a significantly reduced GD [2, 31]. Decreased GST in patients with ND seems to be associated with nerve damage and neural apoptosis [38]. The present study did not present a significant difference between the three groups for GST, which can be explained, in part, by the supplementation of vitamins C and E ingested by patients with DM2 + PD, as well as the increased use of lipid-lowering and antidiabetic agents [32, 34].

The results obtained lead to the conclusion that patients with DM2 and PD presented reduced total antioxidant capacity compared to normal individuals, which may indicate higher oxidative stress in the diabetic subjects studied. The MDA marker in the diabetic group with polyneuropathy may be linked to the effect of medications and supplementation of vitamins A and E, ingested by the patients.

Acknowledgments

The authors are thankful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarship granted to G. P. Oliveira.

Funding

This research was funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Academic Linkage

This article is part of the master's dissertation of Isaac Etienne, a student at the Federal University of Viçosa - UFV.

REFERENCES

1. Iqbal Z, Azmi S, Yadav R, Ferdousi M, Kumar M, Cuthbertson DJ, et al. Diabetic Peripheral Neuropathy: Epidemiology, Diagnosis, and Pharmacotherapy. *Clin Ther*. 2018; 40(6):828-849.
2. Strom A, Kaul K, Brüggemann J, Ziegler I, Rokitta I, Püttgen S, et al. Lower serum extracellular superoxide dismutase levels are associated with polyneuropathy in recent-onset diabetes. *Exp Mol Med*. 2017; 49(11): 1-6.
3. Papanas N, Ziegler D. Efficacy of a -lipoic acid in diabetic neuropathy. *Expert Opin Pharmacother*. 2015;15(18): 2721-2731.
4. Almogbel E, Rasheed N. Protein Mediated Oxidative Stress in Patients with Diabetes and its Associated Neuropathy: Correlation with Protein Carbonylation and Disease Activity Markers. *J Clin Diagn Res*. 2017; 11(2): 21-25.
5. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharm J*. 2016; 24(5): 547–553.
6. Mrakic-sposta S, Vezzoli A, Maderna L, Gregorini F, Montorsi M, Moretti S, et al. Research Article R (+) -Thioctic Acid Effects on Oxidative Stress and Peripheral Neuropathy

in Type II Diabetic Patients : Preliminary Results by Electron Paramagnetic Resonance and Electroneurography. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 2018:1-15.

7. Oyenih AB, Ayeleso AO, Mukwevho E, Masola B. Antioxidant Strategies in the Management of Diabetic Neuropathy. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:1-15.

8. Pop-busui R, Boulton AJM, Feldman EL, Bril V, Freeman R, Malik RA, et al. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2017;40(1):136-154.

9. Schreiber AK, Nones CFM, Reis RC, Chichorro JG, Cunha JM, Schreiber AK, et al. Diabetic neuropathic pain : Physiopathology and treatment. *World J Diabetes*. 2015;6(3):432-44.

10. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation *Methods Enzymol*. 1978;(52): 302-10.

11. Griess P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt .Ueber einige azoverbindungen. *Chem Ber*. 1879 (12): 426-428.

12. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 1974;249:7130–9.

13. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power ”: The FRAP Assay. *Anal Biochem*. 1996;239(1):70-6.

14. Gawlik K, Naskalski JW, Fedak D, Pawlica-Gosiewska D, Grudzień U, Dumnicka P et al. Markers of Antioxidant Defense in Patients with Type 2 Diabetes. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 2352361.

15. Hulley SB, Cummings SR. Estimating sample size and power. In: *Designing Clinical Research*. Baltimore, Md: Williams and Wilkins: 1988:148, Appendix 13A, 215.

16. Palem SP, Abraham P. A Study on the Level of Oxidative Stress and Inflammatory Markers in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with Different Treatment Modalities. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2015; 9(9): 04- 07.

17. Ganjifrockwala FA , Joseph JT, George G. Decreased total antioxidant levels and increased oxidative stress in South African type 2 diabetes mellitus patients, *Journal of Endocrinology, Metabolism and Diabetes of South Africa*. 2017; 22(2):21-25.

18. Takahashi M, Miyashita M, Park J, Kim H, Nakamura Y. The Association between Physical Activity and Sex-Specific Oxidative Stress in Older Adults. *J Sports Sci Med*. 2013;12(3):571-8

19. Papanas N, Ziegler D. Risk Factors and Comorbidities in Diabetic Neuropathy: An Update 2015. *Rev Diabet Stud*. 2015, 12(1-2):48-62.

20. Zamani E, Djalali M, Eshraghian M, Sotoudeh G, Sadrzadeh-Yeganeh H, Koohdani F. Association of body mass index with oxidative stress in patients with Type 2 diabetes: do

- apolipoprotein A-II -265T > C polymorphism alter this association?. *J Nutr Sci & Diet*. 2015; 1(3): 127-33.
21. Brunelli E, Domanico F, Russa D La, Pellegrino D. Sex Differences In Oxidative Stress Biomarkers . *Curr Drug Targets*. 2014;15(8):811-5.
 22. Palekar AV, Ray KS. Oxidative stress in patients with diabetes mellitus. *J Diabetes Metab Disord Control*. 2016;3(6):138–143.
 23. Hackett RA, Steptoe A. Type 2 diabetes mellitus and psychological stress - a modifiable risk factor. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(9):547-560.
 24. Thangavel D, Pitchaipillai V, Rangan V, Muthusamy A, Sivaprakasam R, Dinesh T, et al. Relationship between duration of type 2 diabetes mellitus and stress levels based on age, gender, anthropometry and vital signs. *Int J Adv Med*. 2015;2(4):401-405.
 25. Adela R, Nethi SK, Bagul PK, Barui AK. Hyperglycaemia Enhances Nitric Oxide Production in Diabetes : A Study from South Indian Patients. *PLoS One*. 2015;10(4):1-17.
 26. Agrawal RP, Jain S, Goyal S, Singhal S, Lindgren L, Sthengel E. A Clinical Trial of Nitrosense patch for the treatment of patients with painful diabetic neuropathy. *J Assoc Physicians India*. 2014;62(5):385-90.
 27. Assmann TS, Brondani LA, Bouças AP, Rheinheimer J, Souza BM De, Canani LH, et al. Nitric Oxide Nitric oxide levels in patients with diabetes mellitus : A systematic review and meta-analysis. *Nitric Oxide*. 2016;61:1-9.
 28. Mishra S, Mishra BB. Study of lipid peroxidation , nitric oxide end product , and trace element status in type 2 diabetes mellitus with and without complications. *Int J Appl Basic Med Res*. 2017;7(2):88-93.
 29. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation : Production , Metabolism , and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:1-31
 30. Rehman K, Sajid M, Akash H. Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked?. *J Cell Biochem*. 2017;118(11):3577-3585.
 31. Giriraja KV, Pavitra C, Bindumathi PL. Antioxidant status in diabetic neuropathy. *J. Evid. Based Med. Healthc*. 2017; 4(78):4588-4592.
 32. Balbi ME, Tonin FS, Mendes AM, Borba HH, Wiens A, Fernandez-Llimos F, et al. Antioxidant effects of vitamins in type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetol Metab Syndr*. 2018; 10: 18.
 33. Villegas-Rivera G, Román-Pintos LM, Cardona-Muñoz EG, Arias-Carvajal O, Adolfo Daniel Rodríguez-Carrizalez AD,²Rogelio Troyo-Sanromán R et al., “Effects of Ezetimibe/Simvastatin and Rosuvastatin on Oxidative Stress in Diabetic Neuropathy: A

Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015; 2015: 1-10.

34. Román-Pintos LM, Villegas-Rivera G, Rodríguez-Carrizalez AD, Miranda-Díaz AG, Cardona-Muñoz EG. Diabetic Polyneuropathy in Type 2 Diabetes Mellitus: Inflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Function. *J Diabetes Res*. 2016;2016: 1-16.

35. Patel V, Kanani D, Chauhan K, Haridas N, Makadia M, Patel V; Assessment of oxidative stress in type 2 diabetes mellitus by measurement of plasma lipid hydroperoxides and total antioxidant capacity. *Int. J. of Adv. Res*; 2015; 3 (5):1078-1084.

36. Dasegowda SM, Jeppu AK, Kumar KA. Serum adenosine deaminase as oxidative stress marker in type 2 diabetes mellitus. 2015;3(5):1195–8.

37. Stoian A, Claudia B, Ioana R, Mo A, Stoian M, Moldovan VG, et al. Type 2 Diabetes Mellitus and Diabetic Sensorimotor Peripheral Neuropathy Risk. 2015;2015:1-10.

38. Aouacheri O, Saka S, Krim M. The Investigation of the Oxidative Stress-Related Parameters in Type 2 Diabetes Mellitus. *Can J Diabetes*. 2015;39(1):44-9

5.1 Folder educativo

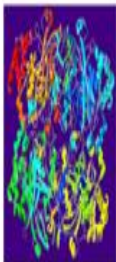
Este presente folder foi criado para auxiliar os profissionais da área da saúde a entender melhor os marcadores oxidantes e antioxidantes. O folder descreve inicialmente o estresse oxidativo, depois mostra o papel do estresse oxidativo no desenvolvimento da polineuropatia, em seguida explica a importância da avaliação dos marcadores do do estresse oxidativo e, por fim, apresenta os principais marcadores utilizados.

MARCADORES DO PERFIL OXIDATIVO?



Superóxido dismutase (SOD)

Protege as células das reações danosas do superóxido



Catalase (CAT)

Catalisa as moléculas de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular



Glutathione S-transferase (GST)

Família de enzimas que participam do processo de desintoxicação celular



Capacidade de Redução Férrica do Plasma (FRAP)

Ensaio antioxidante que determina o poder de redução do íon ferro. Quanto maior a intensidade da coloração, maior será o potencial antioxidante da amostra



Universidade Federal de Viçosa

Autores:
Isaac Etienne e Luciana Moreira Lima

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde / Departamento de Medicina e Enfermagem



UNIVERSIDADE
FEDERAL DE VIÇOSA



**ESTRESSE
OXIDATIVO E
DIABETES
MELLITUS TIPO 2**

ESTRESSE OXIDATIVO

Condição na qual ocorre uma produção excessiva dos radicais livres e uma redução dos antioxidantes do organismo. Este desequilíbrio pode provocar vários danos celulares.



Considerado um dos fatores mais importantes no desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e da polineuropatia diabética (PD).

POLINEUROPATIA E ESTRESSE OXIDATIVO

DM2

Hiperglicemia

- ♦ Via do Poliol
- ♦ Aumento de AGE s
- ♦ Aumento da atividade PKC e Via da hexosamina

- Expressão gênica alterada
- Sinais apoptóticos
- Aumento de produção de citocina
- Complicações microvasculares

Comprometimento da função nervosa

Polineuropatia

POR QUE AVALIAR O ESTRESSE OXIDATIVO?

- Permite de quantificar o nível de proteção do paciente em relação ao DM2 com PD.

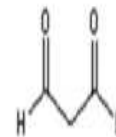
- Possibilidade para o clínico de conhecer o sistema antioxidante do paciente, importante na escolha da estratégia terapêutica.

MARCADORES DO PERFIL OXIDATIVO



Óxido nítrico (NO)

Seu aumento está envolvido na patogênese da polineuropatia diabética



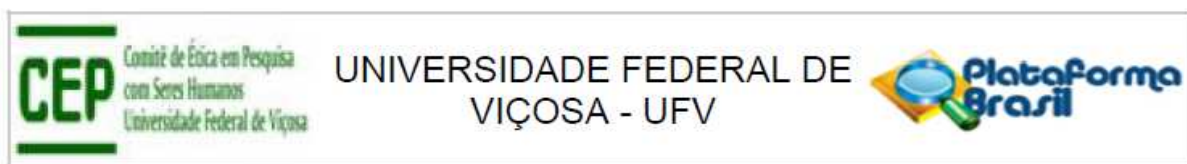
Malondialdeído (MDA)

Um dos produtos finais da peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados nas células

6 CONCLUSÕES GERAIS

Os pacientes portadores de *Diabetes mellitus* com ou sem polineuropatia diabética apresentaram redução da capacidade antioxidante total em relação aos indivíduos hígidos, o que pode indicar maior estresse oxidativo nos pacientes estudados. A diminuição dos níveis séricos do MDA no grupo de pacientes diabéticos com polineuropatia pode estar associado ao efeito dos medicamentos e à suplementação das vitaminas A e E, ingeridos pelos pacientes.

ANEXO A- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Viçosa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES PORTADORES DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 COM NEUROPATIA PERIFÉRICA

Pesquisador: Luciana Moreira Lima

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 85511617.0.0000.5153

Instituição Proponente: Departamento de Medicina e Enfermagem

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.652.913

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto da área de Ciências da Saúde.

Objetivo da Pesquisa:

Segundo formulário online: "Objetivo Primário: Avaliar o estresse oxidativo de portadores e não portadores de DM2 e ND, relacionando-os com a composição corporal e hábitos de vida.

Objetivo Secundário: Mensurar no soro dos pacientes os biomarcadores superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), óxido nítrico, proteínas carboniladas e produtos de peroxidação lipídica- Analisar o nível de comprometimento neuropático dos pacientes.- Avaliar as variáveis antropométricas dos pacientes.- Correlacionar as variáveis todas as variáveis estudadas"

Objetivo Secundário: Mensurar no soro dos pacientes os biomarcadores superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), óxido nítrico, proteínas carboniladas e produtos de peroxidação lipídica- Analisar o nível de comprometimento neuropático dos pacientes.- Avaliar as variáveis antropométricas dos pacientes.- Correlacionar as variáveis todas as variáveis estudadas"

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo formulário online: "A coleta de sangue será realizada por profissional habilitado e serão tomadas todas as medidas sanitárias para que não ocorra risco de contaminação biológica e desconforto excessivo ao avaliado. Os procedimentos antropométricos de mensuração das dobras cutâneas, poderão gerar mínimo desconforto de compressão do aparelho, contudo serão realizados por um profissional treinado para minimizar o desconforto. As

medidas antropométricas e a aplicação dos questionários serão realizadas em local apropriado, sem a presença de estranhos, havendo somente a presença do avaliado, avaliador e no máximo

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
Bairro: Campus Universitário **CEP:** 36.570-900
UF: MG **Município:** VICOSA
Telefone: (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br



Continuação do Parecer: 2.652.913

um auxiliar, diminuindo assim o risco de inibição. A pesquisa pode também provocar um desconforto pelo tempo exigido ou até um constrangimento pelo teor dos questionamentos. No entanto, a equipe envolvida no estudo tentará minimizar os riscos com atendimento individual e humanizado pautado no respeito e atenção com os pacientes. Você poderá, caso queira, simplesmente não responder determinada pergunta.

Benefícios: o participante do projeto irá receber um relatório com os resultados dos seus testes e os resultados finais do estudo. Caso seja encontrada qualquer anormalidade, você será encaminhado para um profissional específico para o tratamento. Os resultados do presente estudo também poderão auxiliar nos cuidados e tratamentos das pessoas com Diabetes tipo 2 com ou sem neuropatia periférica, bem como na prevenção de algumas complicações do DM2."

Avaliação de riscos e benefícios: Adequadamente descritos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Para a pesquisa serão realizadas aplicação de questionário, coleta de sangue, antropometria.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Considerações sobre o s termos:

O pesquisador apresentou:

- Folha de rosto
- Formulário online
- Questionário_denominado ANEXOS
- Projeto
- TCLE_modificado
- Cronograma_modificado
- Carta-resposta

Considerações: Adequadamente descritos

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Considerações sobre o s termos:

O pesquisador apresentou:

- Folha de rosto
- Formulário online
- Questionário_denominado ANEXOS
- Projeto
- TCLE_modificado
- Cronograma_modificado
- Carta-resposta

Considerações: Adequadamente descritos

Recomendações:

Quando da coleta de dados, o TCLE deve ser elaborado em duas vias, rubricado em todas as suas páginas e assinado, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa ou responsável legal, bem como pelo pesquisador responsável, ou pessoa(s) por ele delegada(s), devendo todas as assinaturas constar na mesma folha.

Não é necessário apresentar os TCLEs assinados ao CEP/UFV. Uma via deve ser mantida em arquivo pelo pesquisador e a outra é do participante da pesquisa.

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
Bairro: Campus Universitário **CEP:** 36.570-900
UF: MG **Município:** VICOSA
Telefone: (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br



Continuação do Parecer: 2.652.913

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Ao término da pesquisa é necessário apresentar, via notificação, o Relatório Final (modelo disponível no site www.cep.ufv.br). Após ser emitido o Parecer Consubstanciado de aprovação do Relatório Final, deve ser encaminhado, via notificação, o Comunicado de Término dos Estudos para encerramento de todo o protocolo na Plataforma Brasil.

Projeto aprovado autorizando o início da coleta de dados com os seres humanos a partir da data de emissão deste parecer.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1020248.pdf	20/04/2018 20:27:54		Aceito
Outros	Carta_Resposta_CEP.docx	20/04/2018 20:26:56	Luciana Moreira Lima	Aceito
Cronograma	Cronograma_Modificado.docx	20/04/2018 20:25:52	Luciana Moreira Lima	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Modificado.docx	20/04/2018 20:25:11	Luciana Moreira Lima	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	05/03/2018 18:03:37	Luciana Moreira Lima	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoAssinada.pdf	23/11/2017 10:53:51	Luciana Moreira Lima	Aceito
Outros	ANEXOS.pdf	01/11/2017 11:45:58	Isaac Etienne	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	01/11/2017 11:34:27	Isaac Etienne	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.docx	31/10/2017 19:34:16	Isaac Etienne	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
 Bairro: Campus Universitário CEP: 36.570-900
 UF: MG Município: VICOSA
 Telefone: (31)3899-2492 E-mail: cep@ufv.br



Continuação do Parecer: 2.652.913

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

VICOSA, 14 de Maio de 2018

Assinado por:
HELEN HERMANA MIRANDA HERMSDORFF
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
Bairro: Campus Universitário **CEP:** 36.570-900
UF: MG **Município:** VICOSA
Telefone: (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

• TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TCLE confeccionado em observância à Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde.

TÍTULO DO PROJETO: AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES PORTADORES DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 COM NEUROPATIA PERIFÉRICA.

COORDENADORES DA PESQUISA (Pesquisadores responsáveis): Profa. Dra. Luciana Moreira Lima, Departamento de Medicina e Enfermagem/UFV, (31) 3899-3905, (31) 99470-3418, luciana.lima@ufv.br

EQUIPE PRINCIPAL DE TRABALHO:

Pesquisadores corresponsáveis	Prof. Dr. Lucas Villas Boas Magalhaes, Dep. de Medicina e Enfermagem UFV, Tel. 3899 – 3905 – lucvmaq@yahoo.com.br	Profa. Dra Silvia Almeida Cardoso, Dep. De Medicina e Enfermagem UFV, Tel. 3899-3905 – cardosossil@yahoo.com.br
Pesquisadores Auxiliares	Isaac Etienne – Mestrando em Ciências da Saúde, (31) 99494-3449 – etienneisaac14@hotmail.com	Guilherme Pereira Oliveira – Mestrando em Educação Física, (31) 99169-1119 guilhermepo19@gmail.com

Você está sendo convidado (a) a participar desse estudo cujo objetivo é avaliar o estresse oxidativo de portadores e não portadores de DM2 e ND, relacionando-os com a composição corporal, hábitos de vida e nível atividade física habitual.

Sua colaboração neste estudo é MUITO IMPORTANTE, mas a decisão de participar é VOLUNTÁRIA, o que significa que o(a) senhor(a) terá o direito de decidir se quer ou não participar, ou mesmo recusar de participar de alguma parte do estudo em especial. Também poderá desistir de participar do estudo em qualquer momento.

CONFIDENCIALIDADE DOS DADOS E ANONIMATO

Garantimos que será mantida a CONFIDENCIALIDADE das informações e o ANONIMATO. Ou seja, o seu nome não será mencionado em qualquer hipótese ou circunstância, mesmo em publicações científicas. Informamos que os resultados obtidos irão compor uma base de dados que poderão ser utilizados em outros estudos desenvolvidos pelo grupo responsável de pesquisadores da Universidade Federal de Viçosa.

PROCEDIMENTOS DA DINÂMICA DO ESTUDO QUE ESTARÁ SENDO REALIZADO

A dinâmica do estudo corresponderá a uma visita no Departamento de Medicina e Enfermagem da UFV, com tempo previsto de aproximadamente 1h30m. Você responderá aos questionários relacionados aos hábitos de vida, comprometimento neuropático, depressão e ansiedade, assim como irá realizar a avaliação de medidas corporais e coleta de 5mL do sangue venoso. Os participantes serão assistidos com transporte para os locais de coleta de dados, sem qualquer custo. Todos os procedimentos serão totalmente gratuitos, realizados por profissionais capacitados e por pesquisadores desse estudo. Os testes serão realizados em sala reservada, estando somente o avaliado, o avaliador e se caso necessário mais um auxiliar.

INFORMAÇÕES FINANCEIRAS

Os pesquisadores deixam claro que não haverá nenhuma compensação financeira por participar do estudo, ou custos de transporte, exceto o previsto entre os diferentes departamentos, e de alimentação. Também não será exigido por parte do avaliado nenhuma cobrança financeira por estar participando do estudo.

São considerados como benefícios de sua participação:

Você irá receber um relatório com os resultados dos seus testes e os resultados finais do estudo. Caso seja encontrada qualquer anormalidade, você será encaminhado para um profissional específico para o tratamento. Os resultados do presente estudo também poderão auxiliar nos cuidados e tratamentos das pessoas com Diabetes tipo 2 com ou sem neuropatia periférica, bem como na prevenção de algumas complicações do DM2.

Quanto aos riscos de participação do Estudo:

A coleta de sangue será realizada por profissional habilitado e serão tomadas todas as medidas sanitárias para que não ocorra risco de contaminação biológica e desconforto excessivo ao avaliado. Os procedimentos antropométricos de mensuração das dobras

cutâneas, poderão gerar mínimo desconforto de compressão do aparelho, contudo serão realizados por um profissional treinado para minimizar o desconforto. As medidas antropométricas e a aplicação dos questionários serão realizadas em local apropriado, sem a presença de estranhos, havendo somente a presença do avaliado, avaliador e no máximo um auxiliar, diminuindo assim o risco de inibição. A pesquisa pode também provocar um desconforto pelo tempo exigido ou até um constrangimento pelo teor dos questionamentos. No entanto, a equipe envolvida no estudo tentará minimizar os riscos com atendimento individual e humanizado pautado no respeito e atenção com os pacientes. Você poderá, caso queira, simplesmente não responder determinada pergunta.

DÚVIDAS SOBRE O ESTUDO

Em caso de dúvida o senhor poderá entrar em contato com a Profa. Dra. Luciana Moreira Lima (31)38993905, do Departamento de Medicina e Enfermagem da Universidade Federal de Viçosa e coordenadora da pesquisa. e-mail: Prof. Luciana - luciana.lima@ufv.br,

Para que possamos manter contato posteriormente, mandando informações sobre seus resultados, gostaríamos caso tenha interesse em preencher os seguintes dados:

[] Não tenho interesse de receber os resultados. [] Tenho interesse de ter minhas informações.

Nome: _____ Data de nascimento: __/__/__ Sexo: __ Nacionalidade: _____
 Telefone: _____ e-mail: _____ Endereço: _____
 _____ Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____
 _____ CEP: _____

Eu, _____, declaro estar esclarecido(a) sobre os termos apresentados quanto aos objetivos, dinâmica do estudo, confidencialidade de meus dados, benefícios e riscos, além da possibilidade de recusar minha participação parcial do estudo, ou mesmo solicitar minha exclusão posteriormente. Também fui esclarecido de todas as dúvidas. Fui informado e autorizo que meus dados registrados em meu prontuário, ou decorrente de amostras coletadas/armazenadas sejam usados para compor futuros estudos de levantamento estatístico de prevalência de certas doenças. Fui orientado também pelos pesquisadores que poderei compor um grupo especial do estudo denominado “controle”, realizando as avaliações indicadas pelos pesquisadores. Desta forma, consinto por minha livre e espontânea vontade, em participar desta pesquisa e assino o presente documento em duas vias de igual teor e forma, ficando uma em minha posse. Para qualquer dúvida ou queixa geral sobre esse estudo poderei entrar em contato com o seguinte setor: Comitê de ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa, CEP/UFV, localizada no Prédio Arthur Bernardes, ou pelo e-mail cep@ufv.br, pelo site www.cep.ufv.br ou ainda pelo telefone: (31) 3899-2492.

Viçosa, ____/____/____

 (Assinatura do pesquisador responsável)

 (Assinatura do participante)

ANEXO C. Escala do Estresse Percebido.

Perceived Stress Scale – PSS (10 item)
Cohen, Kamarck & Mermelstein (1983)

Nome _____ Data _____

Instrução: Para cada questão, pedimos que indique com que frequência se sentiu ou pensou de determinada maneira, **durante o último mês**. Apesar de algumas perguntas serem parecidas, existem diferenças entre elas e deve responder a cada uma como perguntas separadas. Responda de forma rápida e espontânea. Para cada questão indique, com uma cruz (X), a alternativa que melhor se ajusta à sua situação.

	Nunca	Quase nunca	Algumas vezes	Frequentemente	Muito frequente
	0	1	2	3	4
1. No último mês, com que frequência esteve preocupado(a) por causa de alguma coisa que aconteceu inesperadamente?					
2. No último mês, com que frequência se sentiu incapaz de controlar as coisas importantes da sua vida?					
3. No último mês, com que frequência se sentiu nervoso(a) e em stresse?					
4. No último mês, com que frequência sentiu confiança na sua capacidade para enfrentar os seus problemas pessoais?					
5. No último mês, com que frequência sentiu que as coisas estavam a correr à sua maneira?					

6. No último mês, com que frequência sentiu que não aguentava com as coisas todas que tinha para fazer?					
7. No último mês, com que frequência foi capaz de controlar as suas irritações?					
8. No último mês, com que frequência sentiu ter tudo sob controlo?					
9. No último mês, com que frequência se sentiu furioso(a) por coisas que ultrapassaram o seu controlo?					
10. No último mês, com que frequência sentiu que as dificuldades se estavam a acumular tanto que não as conseguia ultrapassar?					
	0	1	2	3	4

ANEXO D - Comprovante de submissão do artigo



[Submit a Manuscript](#)
[Author Activities](#)

6460540.v1 (Research Article)

Title	 Oxidative stress markers in patients with diabetic neuropathy
Journal	Oxidative Medicine and Cellular Longevity
Issue	Regular
Manuscript Number	6460540 (Research Article)
Submitted On	2019-02-08
Author(s)	 Isaac Etienne ,  Lucas Vilas Boas Magalhães,  Silvia Almeida Cardoso,   Rodrigo Barros de Freitas,  Guilherme Pereira de Oliveira,   Luciana Moreira Lima
Editor	 Daniela Pellegrino
Status	Under Review

[Terms of Service](#) | [Privacy Policy](#)