



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

RICARDO RODRIGUES

VARIABILIDADE GLICÊMICA, ESTABILIDADE DE MEMBRANA ERITROCITÁRIA
E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM *DIABETES
MELLITUS* TIPO 1

Uberlândia, MG
2017

RICARDO RODRIGUES

**VARIABILIDADE GLICÊMICA, ESTABILIDADE DE MEMBRANA ERITROCITÁRIA
E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM *DIABETES
MELLITUS* TIPO 1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. **Elmiro Santos Rezende**

Co-orientador: Prof. Dr. **Nilson Penha-Silva**

Co-orientador: Prof. Dr. **Paulo Tannus Jorge**

**Uberlândia, MG
2017**

R696v
2017

Rodrigues, Ricardo, 1975

Variabilidade glicêmica, estabilidade de membrana eritrocitária e marcadores de estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 1: variabilidade glicêmica e membrana eritrocitária / Ricardo Rodrigues. - 2017. 87 f. : il.

Orientador: Elmiro Santos Resende.

Coorientador: Nilson Penha-Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.23>

Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. Diabetes - Teses. 3. Eritrócitos - Teses. 4. Membranas - Teses. I. Resende, Elmiro Santos, . II. Penha Silva, Nilson, . III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

RICARDO RODRIGUES

VARIABILIDADE GLICÊMICA, ESTABILIDADE DE MEMBRANA ERITROCITÁRIA E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM *DIABETES MELLITUS* TIPO 1

Presidente da banca (orientador): Prof. Dr. Elmiro Santos Resende

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.
Área de concentração: **Ciências da Saúde**

Banca Examinadora

Titular: Prof. Dr. Carlos Eduardo Barra Couri

Instituição: Universidade de São Paulo (USP), Campus de Ribeirão Preto

Titular: Profa. Dra. Maria de Fátima Borges

Instituição: Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Titular: Prof. Dra. Elisabete Montovani Resende

Instituição: Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Titular: Prof. Dra. Debora Cristiane Gomes

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Aos meus pais, Antonio Rodrigues e Vanda Ragazzo;

ao meu irmão, Élcio Rivelino Rodrigues;

à minha esposa, Gissele Magalhães Rodrigues;

ao meu filho, Ricardo Rodrigues Filho.

Minha amada Família, da qual me criei e me fortaleço para enfrentar os desafios de todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Elmiro Santos Resende, pela amizade e apoio que possibilitaram meu doutoramento;

Aos meus co-orientadores, Prof. Dr. Nilson Penha-Silva, pela orientação, acolhimento, paciência e todos os ensinamentos transmitidos, e Prof. Dr. Paulo Tannus Jorge, pela inspiração e exemplo para minha formação profissional;

À Prof.^a Dra. Vania Olivetti Steffen Abdallah, pela oportunidade inicial nesta jornada;

À Prof.^a Dra. Débora Cristiane Gomes pelo apoio, incentivo ao meu desenvolvimento científico;

Aos meus amigos do Laboratório de Biofísicoquímica (LaBFIQ), Luciana Alves de Medeiros, Lucas Moreira Cunha, Mario da Silva Garrote-Filho, Alice Vieira da Costa, Lara Ferreira Paraiso, Maria Aparecida Knychala, Rodney Coelho da Paixão, Rosiane Soares Saturnino, Wener Barbosa Resende, Lucas Tadeu de Andrade, Márcia Aires Rodrigues de Freitas por toda a ajuda e desprendimento para a realização deste trabalho e principalmente pela acolhida nesta família LaBFIQ;

Ao Prof. Dr. Morun Bernardino Neto pela paciência e prontidão em me auxiliar e ensinar estatística;

À Prof.^a Dra. Cibele Aparecida Crispim pela contribuição científica e estrutural no trabalho;

Aos docentes do Programa de Pós Graduação das Ciências da Saúde (PPGCS);

Aos profissionais do Laboratório Checkup/CMAD pela parceria e cuidados com os pacientes nas coletas dos exames;

Aos profissionais de saúde do Centro de Atenção ao Diabetes pela parceria e apoio para a realização deste trabalho;

Aos meus colegas da pós-graduação, pela convivência harmoniosa e colaboração mútua no decorrer do curso;

Às secretárias, Gisele e Viviane, pelo apoio, prontidão e carinho com que sempre atendem a todos os estudantes do PPGCS;

Aos participantes da pesquisa, agradeço pela confiança e disponibilidade em colaborarem com o desenvolvimento científico;

A todos que participaram e contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos;

À minha esposa Gissele Magalhães Rodrigues pela sua compreensão quando em muitos momentos não posso estar presente, pela sua dedicação, apoio e incentivo a minha carreira e pelo simples, mas imprescindível fato de estar ao meu lado com amor;

Ao meu filho Ricardo Rodrigues Filho pelos abraços carinhosos que me fortalecem e pelos olhares de amizade, admiração, orgulho, amor e respeito, que com toda certeza são recíprocos;

À Universidade Federal de Uberlândia, que me recebeu na graduação em Medicina e permitiu todo meu progresso científico na Residência em Endocrinologia, no meu Mestrado e agora no Doutorado em Ciências da Saúde. Muito obrigado!

“Seu trabalho vai preencher uma parte grande da sua vida, e a única maneira de ficar realmente satisfeito é fazer o que você acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um excelente trabalho é amar o que você faz” (Steve Jobs).

RESUMO

Variabilidade glicêmica, estabilidade de membrana eritrocitária e marcadores de estresse oxidativo em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1

Introdução: A variabilidade glicêmica (VG) tem sido descrita como um fator independente de risco para as complicações crônicas do diabetes. **Objetivos:** avaliar a variabilidade glicêmica entre portadores de DM1 e estudar possíveis correlações da VG com parâmetros de estabilidade de membrana celular e com marcadores de estresse oxidativo. **Material e Métodos:** Foram estudados 90 pacientes com DM1 em tratamento intensivo. As avaliações incluíram: índices antropométricos, dosagens bioquímicas (glicose, ácido úrico, lipidograma, hemoglobina glicada, microalbuminúria, creatinina, ferro), hemograma completo e reticulócitos, cálculos dos parâmetros de estabilidade de membrana e dosagens de marcadores de estresse oxidativo (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e glutathiona reduzida). Todos os conjuntos de valores foram analisados quanto à distribuição. Valores com distribuição normal foram expressos em média e desvio padrão e comparados com teste t para amostras independentes, enquanto valores com distribuição não normal foram expressos em mediana e intervalo interquartilício e comparados com teste de Mann-Whitney. As análises de correlação de dados com distribuição normal e não normal foram feitas com a utilização dos métodos de Pearson ou de Spearman, respectivamente. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. **Resultados:** A VG pelo desvio padrão (SD) da média glicêmica diária (DAG) foi de 89,8 (72-111) mg/dL e apresentou forte correlação linear com os níveis de HbA1c ($\rho=0,63$; $p<0,0001$). Marcadores de variabilidade glicêmica a curto e longo prazo (SD e Δ HbA1c, respectivamente) mostraram correlações com parâmetros de estabilidade de membrana e análise destes mesmos parâmetros entre os subgrupos de menor VG versus maior VG também demonstrou diferenças estatisticamente significativas. A atividade de glutathiona redutase (GR), marcador de estresse oxidativo, apresentou correlação com a VG ($\rho=0,4$ e $p<0,05$). **Conclusão:** A variabilidade glicêmica entre indivíduos com DM1 mesmo em tratamento intensivo é de grande intensidade e apresenta correlação direta com os níveis de hemoglobina glicada, podendo ser usada como

uma ferramenta na identificação dos pacientes com maior chance de não alcançarem as metas de bom controle da doença. A VG também apresentou correlações com alguns parâmetros de estabilidade de membrana eritrocitária, reforçando a existência de potencial papel destas células nos mecanismos relacionados ao desenvolvimento de complicações crônicas do diabetes.

Palavras chaves: *diabetes mellitus* tipo 1, variabilidade glicêmica, eritrócitos, estabilidade de membrana

ABSTRACT

Glycemic variability, erythrocyte membrane stability and oxidative stress markers in patients with type 1 diabetes mellitus

Introduction: Glycemic variability (GV) has been described as an independent risk factor for chronic complications of diabetes. **Objectives:** To evaluate glycemic variability among DM1 patients and to study possible correlations of GV with cell membrane stability parameters and with oxidative stress markers. **Material and Methods:** We studied 90 patients with DM1 undergoing intensive treatment. The evaluations included: anthropometric indexes, biochemical measurements (glucose, uric acid, lipidogram, glycated hemoglobin, microalbuminuria, creatinine and iron), complete blood count and reticulocytes, calculations of membrane stability parameters and dosages of oxidative stress markers (thiobarbituric acid reactive substances and reduced glutathione). All sets of values were analyzed for distribution. Values with normal distribution were expressed as mean and standard deviation and compared with t-test for independent samples, while values with non-normal distribution were expressed in median and interquartile range and compared with the Mann-Whitney test. Data correlation analyzes with normal and non-normal distribution were done using the Pearson or Spearman methods, respectively. Values of p less than 0.05 were considered statistically significant. **Results:** The standard deviation (SD) of the daily glycemic mean (DAG) was 89.8 (72-111) mg/dL and presented a strong linear correlation with HbA1c levels ($\rho = 0.63$, $p < 0.0001$). Markers of short-term and long-term glycemic variability (SD and Δ HbA1c, respectively) showed correlations with membrane stability parameters and analysis of these same parameters between the subgroups of lower GV versus higher GV also showed statistically significant differences. The activity of glutathione reductase (GR), a marker of oxidative stress, showed a correlation with GV ($r = 0.4$ and $p < 0.05$). **Conclusion:** Glycemic variability in individuals with DM1, even under intensive treatment, is of great intensity and presents a direct correlation with glycated hemoglobin levels, and can be used as a tool in the identification of patients who are more likely to fail to achieve good control goals. GV also showed correlations with some parameters of erythrocyte membrane stability, reinforcing the existence of

potential role of these cells in the mechanisms related to the development of chronic complications of diabetes.

Key words: type 1 *diabetes mellitus*, glycemic variability, erythrocytes, membrane stability

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1.1 Estágios hipotéticos e perda de massa de células beta na progressão do <i>diabetes mellitus</i> tipo 1	21
Figura 1.2 Estágios propostos pela ADA para desenvolvimento de <i>diabetes mellitus</i> tipo 1	22
Figura 1.3 Consequências da hiperglicemia via ativação da PKC	25
Figura 1.4 Perfil de ação de diferentes formulações de insulina e análogos	27
Figura 1.5 Ajuste sigmoidal da relação entre absorbância a 540 nm de uma alíquota de sangue humano e a diminuição na concentração de NaCl.....	33
Figura 2.1 Dispersion diagram of the daily average glucose (DAG) and glycated hemoglobin (HbA1c) in the studied population (n=90)	51
Figura 2.2 Dispersion diagram of the standard deviation of the daily average	52

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 2.1 Baseline characteristics of the study population.....	48
Tabela 2.2 Comparison of the studied variables between types of intensive insulin therapy in volunteers with type 1 diabetes	49
Tabela 2.3 Spearman's σ coefficients for the correlations between all pairs of variables studied.....	50
Tabela 3.1 Clinical and laboratory characteristics of volunteers with type 1 diabetes studied	70
Tabela 3.2 Markers of erythrocyte membrane stability, hematimetry and oxidative stress in volunteers with type 1 diabetes mellitus.....	71
Tabela 3.3 Comparison of parameters of oxidative stress and membrane stability between subgroups of lower and higher glycemic variability	72
Tabela 3.4 Values of Spearman's correlation coefficients (ρ) between all pairs of variables in the population studied	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AGE	Produto Final de Glicação Avançada, do inglês <i>Advanced Glycation End-Products</i>
A_{max}	Absorbância máxima da lise osmótica de eritrócitos
A_{min}	Absorbância mínima da lise osmótica de eritrócitos
Anti-GAD 65	Anticorpo contra a enzima descarboxilase do ácido glutâmico 65, do inglês <i>Anti-Glutamic Acid 65</i>
Anti-IA2	Anticorpo contra tirosina fosfatase
CAD	Cetoacidose diabética
CV	Coefficiente de Variabilidade
CVDAG	Coefficiente de Variabilidade da Glicemia Média Diária, do inglês <i>Coefficient of Variability of the Daily Average Glycemia</i>
dA	Intervalo de absorbância entre os platôs maior e menor de absorbância na curva de lise osmótica de eritrócitos
DAG	Glicemia Média Diária, do inglês <i>Daily Average Glycemia</i>
DCV	Doenças Cardiovasculares
DM-1	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 1
DM2	<i>Diabetes Mellitus</i> Tipo 2
dX	$\frac{1}{4}$ da variação na concentração de NaCl necessária para promover 100% de hemólise hiposmótica
dX/ A_{min}	Índice dado pela razão entre as variáveis de estabilidade osmótica de eritrócitos dX e A_{min}
dX/H ₅₀	Índice dado pela razão entre as variáveis de estabilidade osmótica de eritrócitos dX e a variável de fragilidade osmótica de eritrócitos H ₅₀
ET1	Endotelina 1

GAD	Descarboxilase do Acido Glutâmico, do inglês <i>Glutamic Acid Decarboxylase</i>
GSH	Glutathiona Reduzida
GSSG	Glutathiona Oxidada
H ₀	Concentração salina em que a hemólise hiposmótica se inicia
H ₁₀₀	Concentração salina em que ocorre 100% de hemólise hiposmótica
H ₅₀	Concentração salina onde ocorre 50% de hemólise hiposmótica
HbA1c	Fração A1c da hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade, do inglês <i>High-Density Lipoprotein</i>
HDL-C	Colesterol da Lipoproteína de Alta Densidade, do inglês <i>High-Density Lipoprotein Cholesterol</i>
IAA	Auto-Anticorpo Anti-Insulina, do inglês <i>Insulin Auto-Antibody</i>
ICA	Anticorpos Anti-Ilhotas, do inglês <i>Islet Cell Antibodies</i>
IMC	Índice de Massa Corporal
IQR	Intervalo interquartilico, do inglês <i>Interquartile Range</i>
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade, do inglês <i>Low-Density Lipoprotein</i>
LDL-C	Colesterol da Lipo Lipoproteína de Baixa Densidade, do inglês <i>Low-Density Lipoprotein Cholesterol</i>
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
NF-K β	Fator Nuclear Kappa Beta, do inglês <i>Nuclear Factor Kβ</i>
NOS _e	Óxido Nitrico Sintetase endotelial, do inglês <i>Nitric Oxide Synthase endothelial</i>
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio 1, do inglês <i>Plasminogen Activator Inhibitor 1</i>

PKC	Proteína Quinase C, do inglês <i>Protein Kinase C</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
SD	Desvio Padrão da Média, do inglês <i>Standard Deviation</i>
SDDAG	Desvio Padrão da Glicemia Média Diária, do inglês <i>Standard Deviation of the Daily Average Glycemia</i>
t-C	Colesterol total, do inglês <i>total Cholesterol</i>
TGF- β	Fator de transformação do crescimento Beta, do inglês <i>Transforming Growth Factor β</i>
UDP-GlcNAc	Uridina Difosfato-N-Acetil Glicosamina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade, do inglês <i>Very-Low-Density Lipoprotein</i>
VLDL-C	Colesterol da Lipoproteína de Muito Baixa Densidade, do inglês <i>Very-Low-Density Lipoprotein Cholesterol</i>

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	19
2. Fundamentação	19
2.1. <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 1	19
2.1.1. Conceito	19
2.1.2. Epidemiologia	23
2.1.3. Manifestações Clínicas e Complicações	23
2.1.4. Tratamento.....	26
2.2. Estabilidade de Membrana Celular e <i>Diabetes Mellitus</i>	29
2.3. Análise da Estabilidade de Eritrócitos	30
2.4. Estresse Oxidativo e <i>Diabetes Mellitus</i>	32
3. Objetivos	34
4. Artigos	35
4.1. Artigo 1(Capítulo 2).....	35
4.2. Artigo 2 (Capítulo 3).....	53
5 Referências.....	74
ANEXO 1 - Termo de Consentimento livre e Esclarecido	81
ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Responsável Legal	82
ANEXO 3 - Termo de Esclarecimento do Menor	83

Capítulo 1

Introdução e Fundamentação Teórica

1. Introdução

O desenvolvimento de novas tecnologias na área da saúde trouxe grandes avanços no acompanhamento e tratamento do *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) (Atkinson e Eisenbarth, 2001; Ayano-Takahara *et al.*, 2015; Garvey e Wolfsdorf, 2015). Tanto novos medicamentos, como os análogos de insulina de ação prolongada e os de ação ultrarrápida, quanto os sistemas de monitoramento da glicose tornaram-se ferramentas cotidianas na prática médica com o paciente e deste com o tratamento da sua doença. Através de uma melhor monitoração da glicose conseguiu-se maiores informações do padrão de variabilidade glicêmica individual e a possibilidade de atuar sobre estas flutuações que tem potencial para ser um fator de risco independente para as complicações crônicas do diabetes ou para predizerem indivíduos com maior risco para hipoglicemias graves (Brownlee, 2005; Bragd *et al.*, 2008; Pitsillides *et al.*, 2011; Devries, 2013; Gubitosi-Klug *et al.*, 2017). Além disso, muitos estudos apontam para um papel importante da variabilidade glicêmica sobre a formação de espécies reativas de oxigênio (Hsu *et al.*, 2006; Cherney *et al.*, 2011) e também na glicação proteica (Weber e Schnell, 2009), mecanismos estes intimamente relacionados à lesão celular do diabetes. A variação da concentração de glicose do meio e sua influencia sobre a estabilidade das membranas celulares *in vivo* ainda é pouco compreendido, e também pode ser componente importante na gênese dos mecanismos de lesão celular das complicações crônicas desta doença (Jain *et al.*, 1989). Portanto, diante deste cenário conhecer melhor a utilidade destas ferramentas para identificar a variabilidade glicêmica dos pacientes com DM1 torna-se fundamental.

2. Fundamentação teórica

2.1 *Diabetes Mellitus* tipo 1

2.1.1 Conceito

O DM-1 é caracterizado pela destruição das células beta pancreáticas, resultando numa ausência completa ou quase completa de produção de insulina e consequente hiperglicemia (Atkinson e Eisenbarth, 2001; Chamberlain *et al.*, 2016). Consiste em uma doença multifatorial, poligênica, com diferentes *loci* envolvidos,

sendo a predisposição genética mais evidente mediada por genes do antígeno leucocitário humano HLA, localizado na região do complexo principal da histocompatibilidade, no braço curto do cromossoma 6 (denominado IDDM1), e pelo gene da insulina no cromossoma 11 (IDDM2). Juntos IDDM1 e IDDM2 respondem por cerca de 60% dos casos de agregação familiar da doença (Tandon, 2015).

Essa susceptibilidade genética associada à presença de um ou mais fatores ambientais implicará no desenvolvimento da doença, hipótese esta corroborada pela taxa discordante para DM1 entre gêmeos homozigóticos, pela enorme variabilidade geográfica e racial, e pelo aumento rápido na sua incidência.

Aproximadamente 90% dos pacientes com DM1 têm marcadores detectáveis para auto-anticorpos e são classificados como DM tipo 1A, sendo a minoria restante com pesquisa de auto anticorpos negativa classificada como 1B (Chamberlain *et al.*, 2016). Nesse processo de autoimunidade, os anticorpos anti-ilhotas (ICAs) foram os primeiros a serem utilizados há mais de 30 anos. Nas últimas décadas o auto-anticorpo anti-insulina (IAA), anticorpo contra a enzima descarboxilase do ácido glutâmico 65 (anti-GAD 65) e anticorpo contra uma tirosina fosfatase (anti-IA2) têm sido utilizados como marcadores mais sensíveis e específicos para confirmação ou predição da doença (Ziegler *et al.*, 2013). Esta autoimunidade contra as ilhotas pode ser detectada em indivíduos com risco vários meses ou anos antes da manifestação clínica do DM1, porém nem todos os indivíduos com anticorpos positivos desenvolvem diabetes. A destruição celular seria um processo mediado pelos linfócitos T CD4 e CD8 (Eisenbarth, 2010).

O desenvolvimento do DM1, que era classicamente dividido em 5 estágios, segundo Atkinson e Eisenbarth (Eisenbarth, 1986), iniciando-se com a susceptibilidade genética (estágio 1) e terminando com a destruição completa das células beta das ilhotas (estágio 5), conforme mostrado Figura 1, foi descrito na atualidade por Insel e colaboradores em 3 estágios, conforme mostrado na Figura 2.

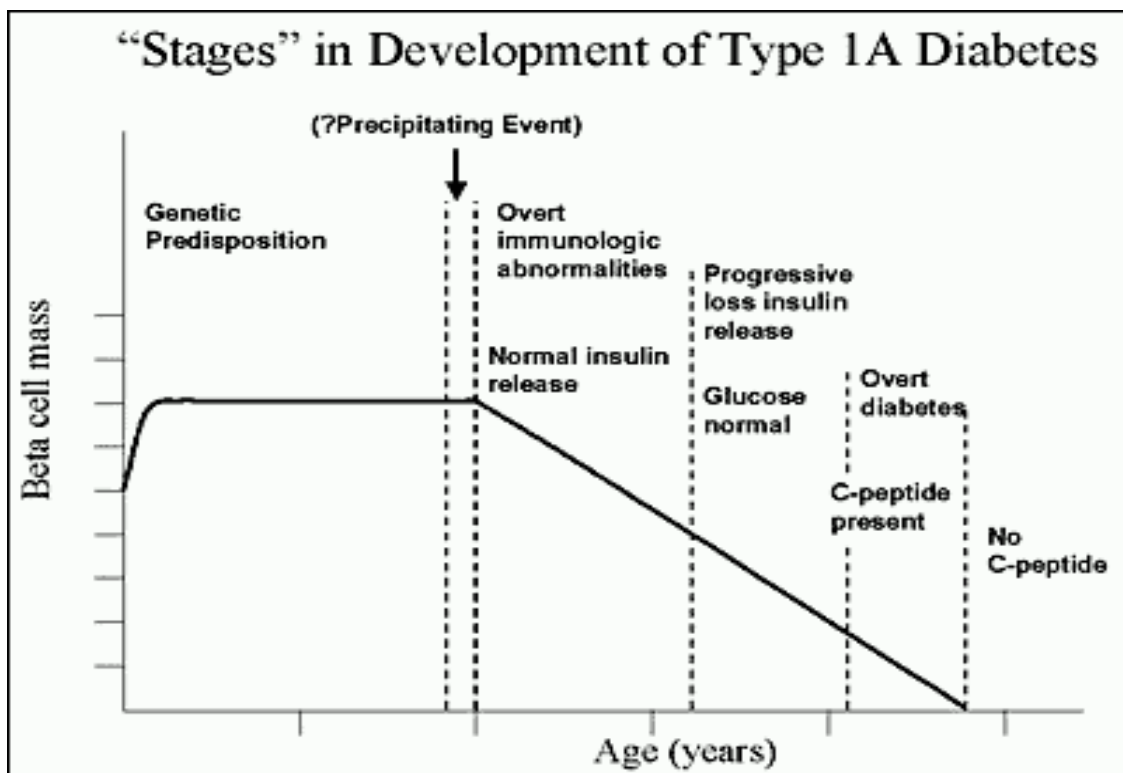


Figura 1. Estágios hipotéticos e perda de massa de células beta pancreáticas na progressão do *diabetes mellitus* tipo 1. Fonte: Eisenbarth, NEJM, V18, 1986.

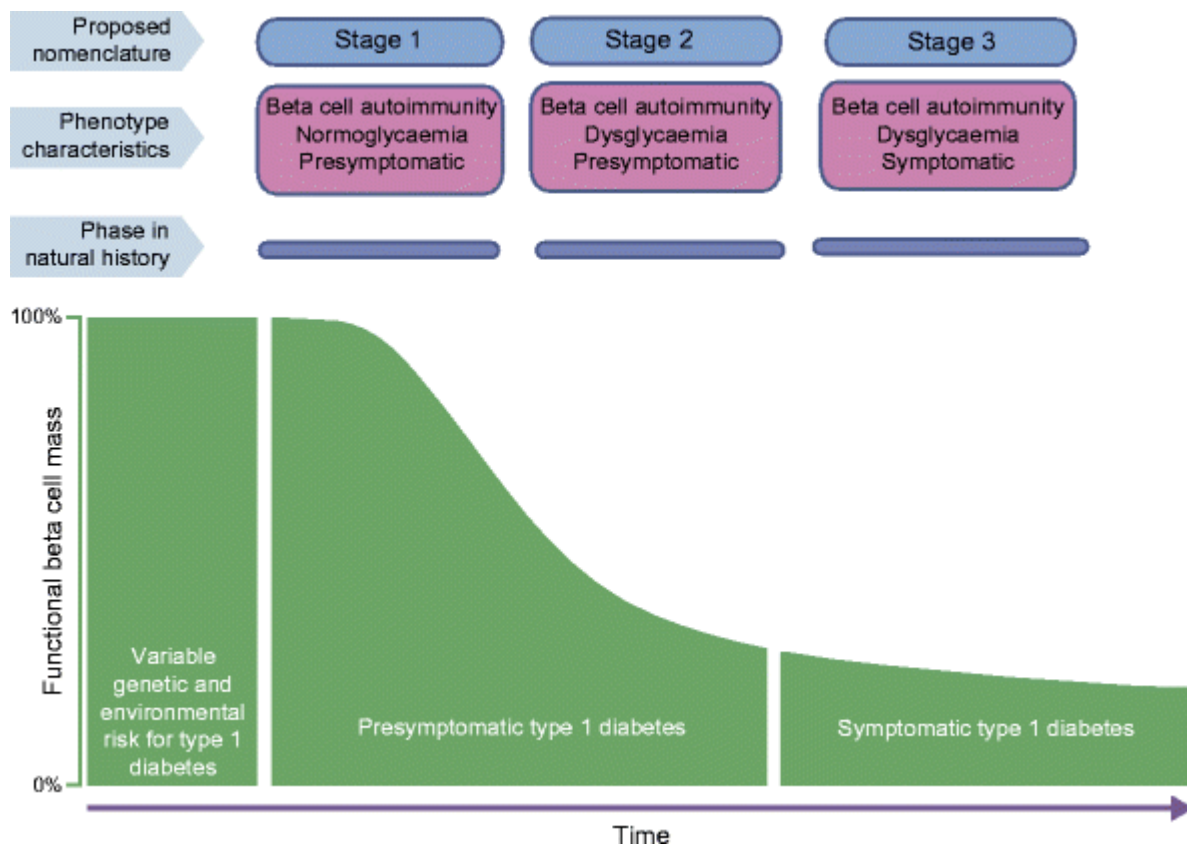


Figura 2. Estágios propostos por Insel e colegas (Insel *et al.*, 2015) para desenvolvimento do *diabetes mellitus* tipo 1. A etiologia é representada por risco genético e ambiental variável. A patogênese é representada por três estágios. No estágio 1, apesar da presença de auto anticorpos anti-células beta, a glicemia é normal e não há sintomas da doença. No estágio 2, a quantidade presente de auto anticorpos com as células beta pode afeta a patogênese a afetar a glicemia, mas ainda sem sintomas de *diabetes*. No estágio 3, os auto anticorpos contra as células beta pancreáticas ainda estão presents e já há sintomas da doenças. Fonte: The American Diabetes Association (2015).

2.1.2 Epidemiologia

O diabetes tem se tornado uma das doenças crônico-degenerativas mais importantes do nosso século, tendo em vista sua elevada prevalência. De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (IDF), há no mundo aproximadamente 415 milhões de pessoas com a doença e a estimativa para 2040 é que este número aumente para 642 milhões (Ogurtsova *et al.*, 2017). Além disso, o diabetes determina uma grande morbimortalidade, que repercute em enorme prejuízo social e econômico para seu portador e também para a saúde pública, tendo em vista sua natureza crônica, gravidade das complicações e os meios necessários para controlá-las (Bommer *et al.*, 2017). Especificamente o DM-1 representa cerca de 10% dos casos de diabetes, e, embora possa ser diagnosticado em qualquer idade, é a segunda doença crônica mais frequente na infância, apresentando uma distribuição bimodal, com picos de prevalência dos 5 aos 7 anos de idade e próximo à puberdade, entre 11 e 14 anos (Atkinson e Eisenbarth, 2001). Sua incidência e prevalência variam muito com as áreas geográficas, encontrando-se altas taxas na Finlândia e Sardenha (Itália) com incidência de 50/100.000 por ano e taxas baixas na China, com 0,5 casos/100.000 por ano. No Brasil, a incidência foi variável conforme a região; em Londrina, PR, foi de 12,7/100.000 por ano (De Campos e Al., 1998) e no estado de São Paulo 7,6/100.000 por ano (Ferreira, 1993). Estima-se que os custos diretos com diabetes no Brasil sejam de 3,9 bilhões de dólares americanos ao ano (Sbd, 2009).

2.1.3 Manifestações Clínicas e Complicações

A hiperglicemia resultante da deficiência absoluta de insulina no DM1 leva à poliúria (devido à diurese osmótica), polidipsia, desidratação, perda de peso, distúrbios hidroeletrólíticos, cetoacidose diabética (CAD) e até óbito, se não tratada. Entre as complicações agudas, a CAD, decorrente da utilização da gordura como fonte de energia na ausência da insulina levando a formação dos corpos cetônicos e contribuindo para a acidose metabólica, é uma das mais frequentes e graves, podendo ser a forma de apresentação inicial da doença em 15 a 70% dos casos (Wolfsdorf *et al.*, 2014).

O desenvolvimento das complicações crônicas do diabetes é decorrente da exposição dos tecidos à hiperglicemia em longo prazo, resultando em lesão celular, que fisiopatologicamente decorre de quatro mecanismos principais (Brownlee, 2005):

1- Aumento da atividade da aldose redutase - Esse aumento da via dos polióis determina aumento na conversão de glicose para sorbitol, com maior consumo de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida (NADPH + H⁺) e Glutathiona Reduzida (GSH), que são antioxidantes intracelulares. Isto significa diminuição na capacidade antioxidante e aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS);

2- Formação de produtos de glicação avançada (AGEs) - Os AGEs são proteínas ou lipídios que se tornam glicosados e sofrem glicosidação, modificando proteínas da matriz extracelular e mesmo proteínas intracelulares envolvidas em mecanismos de sinalização e regulação da expressão gênica, causando disfunção celular e ativando interleucinas inflamatórias;

3- Ativação da proteína quinase C (PKC) por diacilglicerol (DAG) em resposta à hiperglicemia - A PKC é uma das três principais quinases envolvidas na transdução de sinais intracelulares, respondendo a estímulos específicos hormonais, neuronais e de fatores de crescimento; a ativação desta via favorece as lesões celulares por uma cascata de mecanismos conforme mostrado na **Figura 3**.

4- Aumento da atividade da via das hexosaminas - O aumento da glicose intracelular resulta em metabolização final da frutose-6-fosfato a uridina difosfato-N-acetil glucosamina (UDP-GlcNAc), resultando alterações patológicas na expressão gênica, aumentando a produção de citocinas inflamatórias e de fatores de transcrição.

Essas lesões celulares, principalmente endoteliais, levarão às injúrias teciduais e manifestações destas nos diferentes órgãos alvos, como a retinopatia diabética, a nefropatia diabética, a neuropatia diabética e a doença cardiovascular propriamente dita, que é a principal causa de óbito entre os pacientes com *diabetes* (Idf Diabetes Atlas Group, 2015).

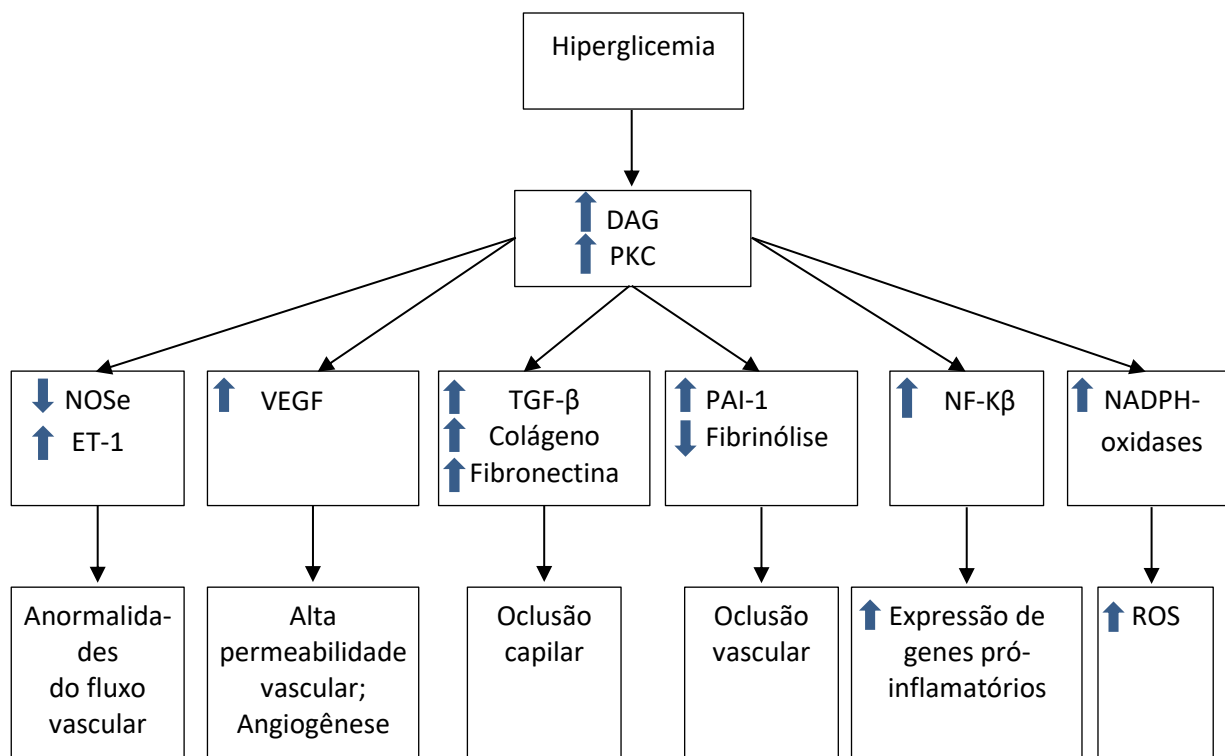


Figura 3. Conseqüências da hiperglicemia via ativação da PKC.

2.1.4 Tratamento

O tratamento do *diabetes* está fundamentado em um tripé formado pela abordagem nutricional, a reposição insulínica e a educação em *diabetes*. Quanto à alimentação, as recomendações para uma dieta saudável e equilibrada, reduzindo-se o consumo de carboidratos simples e utilizando-se da técnica da contagem de carboidratos, têm obtido melhores resultados no controle da doença (Brazeau *et al.*, 2013). Em linhas gerais a recomendação para diabéticos é que do valor calórico total (VCT) diário recomendado, 45-55% sejam de carboidratos (preferencialmente complexos), 20-30% sejam de proteínas e 20-35% de lipídeos preferencialmente constituídos por ácidos graxos mono- ou poli-insaturados (Evert, 2014).

Para o tratamento farmacológico propriamente dito, a reposição da insulina, atualmente dispõe-se de diversos tipos de insulina ou análogos que diferem em sua farmacocinética, basicamente em ações prolongadas e ações rápidas (Hahr e Molitch, 2010). Entre as insulinas de ação prolongada dispõe-se da NPH, cuja característica é de uma ação intermediária com duração do efeito em torno de 16 horas e com um pico de ação entre 6 e 10 h após sua aplicação; os análogos basais Glargina U100 e U300, Detemir e Degludeca, que possuem uma ação prolongada de aproximadamente 24 h, não possuem picos de ação. Quanto às insulinas de ação rápida, dispõe-se da insulina Regular com pico de ação dentro de 3 h após sua aplicação e término de ação em 6 h, e os análogos de ação rápida Aspart, Lispro e Glulisina, que possuem pico de ação mais precoce, em 1 hora após aplicação e duração de efeito de aproximadamente 3 h (**Figura 4**). A combinação destas diferentes formas de insulina ou análogos visando mimetizar a secreção fisiológica de insulina constitui a escolha mais racional de tratamento (Chamberlain *et al.*, 2016).

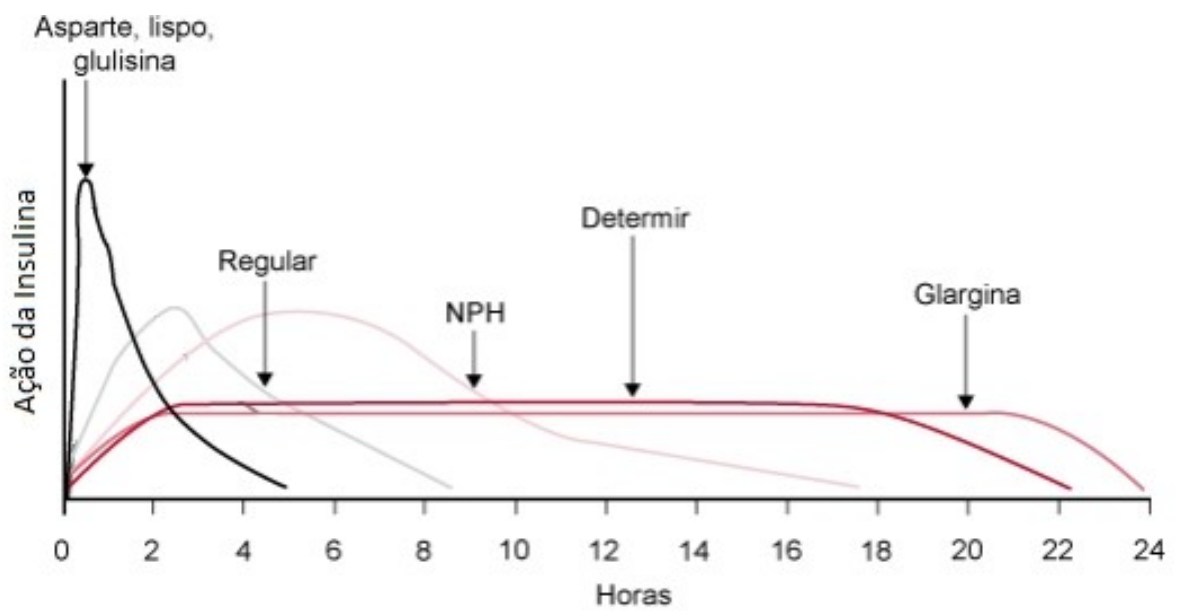


Figura 4. Perfil de ação de diferentes formulações de insulina e análogos

A reposição da insulina através de múltiplas doses diárias, abordagem chamada de tratamento intensivo, tem demonstrado reduzir ou retardar o desenvolvimento das complicações crônicas microvasculares, em comparação a esquemas convencionais com menos de três aplicações ao dia (Zinman, 1998; Steffes *et al.*, 2005; Armstrong *et al.*, 2017). Tal esquema de tratamento visa um controle glicêmico mais próximo da normalidade, o que efetivamente atuaria sobre o risco de desenvolver as complicações crônicas. Essa forma de insulinização intensiva pode ser realizada através de múltiplas aplicações de insulina de ação rápida (*bolus* de insulina) associadas a uma insulina de ação prolongada (insulina basal) ou por meio de um sistema de infusão contínua de insulina (bomba de insulina), no qual uma insulina de ação rápida é infundida continuamente, em microdoses (insulina basal) e doses de liberação rápida dessa mesma insulina são infundidas junto às refeições ou para correções de taxas glicêmicas elevadas, denominados *bolus* alimentares e corretivos, respectivamente (Jenkins *et al.*, 2010; Grunberger, 2014).

Ambas as formas de tratamento intensivo necessitam de um método de acompanhamento frequente dos níveis da glicose ao longo do dia, que comumente é realizado com múltiplas glicemias capilares através de punção digital e mais recentemente por medida da glicose intersticial com um sensor implantado no tecido subcutâneo. Dessa forma, guiado pelos valores de glicose, as doses de insulina são adequadamente programadas ou reajustadas para a manutenção desses níveis dentro das metas de bom controle da doença. As novas tecnologias aplicadas na área da saúde têm sido importantes aliadas no tratamento do *diabetes*. Atualmente diversos sistemas de monitoração contínua da glicose em tempo real, acoplados a sistemas de infusão contínua de insulina, possibilitam melhores resultados nos parâmetros de controle do *diabetes* (Buse *et al.*, 2012; Buckingham *et al.*, 2015) e caminham em direção ao desenvolvimento de um verdadeiro pâncreas artificial.

A educação em *diabetes* engloba as medidas para a convivência com a doença e seus cuidados no dia-a-dia, como técnicas de aplicação da insulina, monitoração da glicose e seu registro adequado, medidas de correção de hiper- ou hipoglicemias ocasionais e em situações especiais como dias de doença ou viagens. Ela é voltada não só para o/a paciente, mas também para os familiares ou seus cuidadores e deve ser realizada por uma equipe multiprofissional (enfermeira,

nutricionista, psicóloga, assistente social, educador físico e endocrinologista) trabalhando de maneira interprofissional (Swift, 2007).

O monitoramento da glicose e seu registro tem sido uma das áreas mais privilegiadas com os avanços da tecnologia na área da saúde (Garvey e Wolfsdorf, 2015). Glicosímetros cada vez mais precisos e portáteis, com *softwares* de gerenciamento dos registros e recursos para transmissão dos dados em rede ou comunicação com *smartphones* facilitam tanto o acesso como a interpretação dos dados pelo paciente, cuidadores e equipe médica. Além disso, novas formas de registro da glicose, de forma contínua, através de sensores que fazem a leitura dessas concentrações no interstício, propiciam ao usuário maior segurança no controle das hipoglicemias, tendo em vista a possibilidade de previsão ou tendência dos níveis de glicose nas próximas horas. Os leitores contínuos de glicose trouxeram também uma solução a uma das barreiras da monitoração glicêmica que são às múltiplas punções digitais diárias para obtenção da glicemia capilar.

A importância do seguimento da glicemia no controle da doença já foi evidenciada em estudos que relacionaram maior número de glicemias capilares realizadas pelos pacientes com quedas de 0,5 a 1% na HbA1c (Ziegler *et al.*, 2011), por isso, espera-se que a monitoração contínua da glicose traga um novo patamar ao controle do DM1.

2.2.1. Estabilidade de Membrana Celular e *Diabetes Mellitus*

As membranas biológicas são complexos biológicos estruturalmente organizados em uma bicamada essencialmente lipídica, com a presença de diversas outras moléculas, como glicolipídeos, colesterol e proteínas, sendo sua principal função atuar como barreira seletiva, controlando entrada e saída de substâncias do meio intra-celular e extra-celular (Nicolson e Singer, 1972; Singer e Nicolson, 1972).

A funcionalidade da membrana celular está bastante relacionada com sua estrutura físico-química. Diversas condições fisiológicas e patológicas podem interferir nessa estrutura e, conseqüentemente, em sua funcionalidade (Lemos *et al.*, 2011). As membranas biológicas possuem uma determinada capacidade de preservação de sua estrutura físicoquímica mesmo quando submetida à ação de agentes e/ou condições desfavoráveis, sendo esta propriedade denominada de

estabilidade. As alterações na estabilidade da membrana podem desencadear um impacto considerável sobre as funções celulares, promovendo prejuízos à saúde do indivíduo.

A composição lipídica é um dos principais fatores que pode afetar a estabilidade das membranas. Em condições de hipercolesterolemia (Cooper, 1977; Schick e Schick, 1985), o excesso de colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL) é em parte direcionado para as membranas dos eritrócitos (Martinez *et al.*, 1996), reduzindo sua fluidez e, portanto, causando seu enrijecimento (Cooper, 1977), o que altera as características reológicas do sangue, contribuindo para o aumento da viscosidade e diminuição do aporte de oxigênio aos tecidos (Chabanel *et al.*, 1983; Koter *et al.*, 2004).

As proteínas presentes na membrana do eritrócito também possuem papel relevante na determinação de sua estabilidade, principalmente as que estão ligadas ao citoesqueleto, uma vez que elas são essenciais na manutenção da sua estrutura e preservação da sua integridade física. As proteínas que aparecem inseridas na membrana do eritrócito apresentam uma heterogeneidade de funções, que compreendem a determinação da deformabilidade e estabilidade de membrana. Dentre as funções das proteínas destacam-se o transporte, a sinalização, a adesão e a interação com outras células do sangue ou do endotélio dos vasos sanguíneos, dentre outras atividades (De Freitas *et al.*, 2014). Dentre as proteínas de membrana com função de transporte destaca-se o GLUT1 (transportador de glucose), que é muito importante na regulação da glicemia e metabolismo da glicose. Entretanto pouco se sabe sobre a influência da concentração da glicose sobre a estabilidade das membranas celulares (Lemos *et al.*, 2011). Mas tendo em vista o importante papel da hiperglicemia e seus consequentes prejuízos ao organismo, como as possíveis alterações bioquímicas e hematológicas que podem estar relacionadas a esta condição, avaliar possíveis relações da variabilidade glicêmica e seus efeitos sobre as membranas biológicas, bem como, sua correlação com as alterações bioquímicas e hematológicas que podem estar associados ao DM1, é fundamental para melhor entendimento desta doença e de seus possíveis efeitos deletérios. Como ainda existem poucos estudos sobre o papel destes mecanismos fisiopatológicos aventados na gênese das complicações crônicas do DM1, novas pesquisas são necessárias para melhor esclarecimento e para que se possa ter um

consenso sobre a necessidade ou não de atuar sobre a variabilidade glicêmica com maior ênfase.

2.2.2. Análise da Estabilidade Eritrocitária

A membrana do eritrócito constitui um modelo primário para estudo de membranas, pelo fato de ser desprovida de núcleo e organelas (Murray, 2003)

A estabilidade de membrana do eritrócito pode ser determinada em gradiente de concentração de NaCl (fragilidade osmótica eritrocitária ou FOE) (Jain *et al.*, 1989; Penha-Silva *et al.*, 2007; De Arvelos *et al.*, 2013; De Freitas *et al.*, 2014). De acordo com este método, os eritrócitos são incubados em soluções com diferentes concentrações de NaCl, em tempo fixo, propiciando um gradiente de lise, determinado pela aferição da absorvância à 540 nm (A_{540}), a partir da hemoglobina liberada em cada condição de incubação. Os valores de A_{540} variam conforme a concentração de NaCl e podem ser ajustados por regressão não-linear sigmoide, de acordo com a equação de Boltzmann. À medida que aumenta a concentração do agente caotrópico ou diminui a tonicidade do meio, aumenta a lise dos eritrócitos. A curva de lise gerada através da diminuição da tonicidade do meio por decréscimo na concentração salina é dada por uma curva sigmoide decrescente (Penha-Silva *et al.*, 2008).

A partir do perfil da lise eritrocitária em gradiente de concentração salina, podemos observar que a liberação de hemoglobina inicia-se a partir de um platô mínimo estável (A_2 ou A_{\min}), que se refere ao valor estacionário médio de absorvância em que há uma baixa taxa de hemoglobina liberada no meio. À medida que a concentração salina no meio diminui, há um aumento gradativo da lise eritrocitária, que a partir de um determinado ponto sofre uma aceleração exponencial. Ao atingir o ponto intermediário da curva, a liberação de hemoglobina sofre uma desaceleração hiperbólica, até atingir um platô máximo estável (A_1 ou A_{\max}), que se refere ao valor estacionário máximo de absorvância. A variação na concentração de sal (X) que promove a transição entre os valores de A_{\min} e A_{\max} representa 4 vezes o valor da variável dX.

O ponto intermediário da concentração salina em que há uma taxa de 50% de lise dos eritrócitos presente no sistema é representado pela variável H_{50} . As variáveis dX e $1/H_{50}$ estão relacionadas diretamente com a estabilidade de

membrana dos eritrócitos (**Figura 5**) e foram utilizadas no nosso estudo para a análise de suas possíveis correlações com a variabilidade glicêmica, bem como com os parâmetros bioquímicos e hematológicos.

2.3 Estresse Oxidativo e *Diabetes Mellitus*

A fisiopatologia das complicações do diabetes pode ser considerada como resultado de duas principais alterações metabólicas deletérias: a glicação excessiva de proteínas e a geração de estresse oxidativo (Brownlee, 2005; Ceriello e Ihnat, 2010). O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade antioxidante endógena; seu papel como determinante principal do início e da progressão das complicações crônicas associadas ao DM tem sido alvo de grande interesse. Alguns estudos recentes têm mostrado que tanto a produção de ROS quanto os produtos finais da glicação avançada (AGEs) são influenciados pela hiperglicemia, tanto a de jejum quanto a que ocorre durante períodos pós-prandiais e também pelas flutuações glicêmicas (Brownlee, 2005; Monnier *et al.*, 2007; Monnier e Colette, 2008; Ceriello, 2010; Siegelaar *et al.*, 2010; Standl *et al.*, 2011). Atualmente, não há dúvida que níveis elevados de glicemia de jejum e durante período pós-prandial ativem o processo de glicação, o que pode ser investigado pela medida de níveis de HbA1c. Além disso, a hiperglicemia tanto em jejum, quanto em períodos pós-prandiais, aguda ou crônica, bem como amplas flutuações dos níveis de glicose, ativam o estresse oxidativo. A alteração de qualquer um destes três fatores resultaria em aumento do risco de complicações do diabetes. Nesse contexto, seria importante, portanto, avaliar a variabilidade glicêmica do paciente e não somente a média das glicemias dos últimos meses.

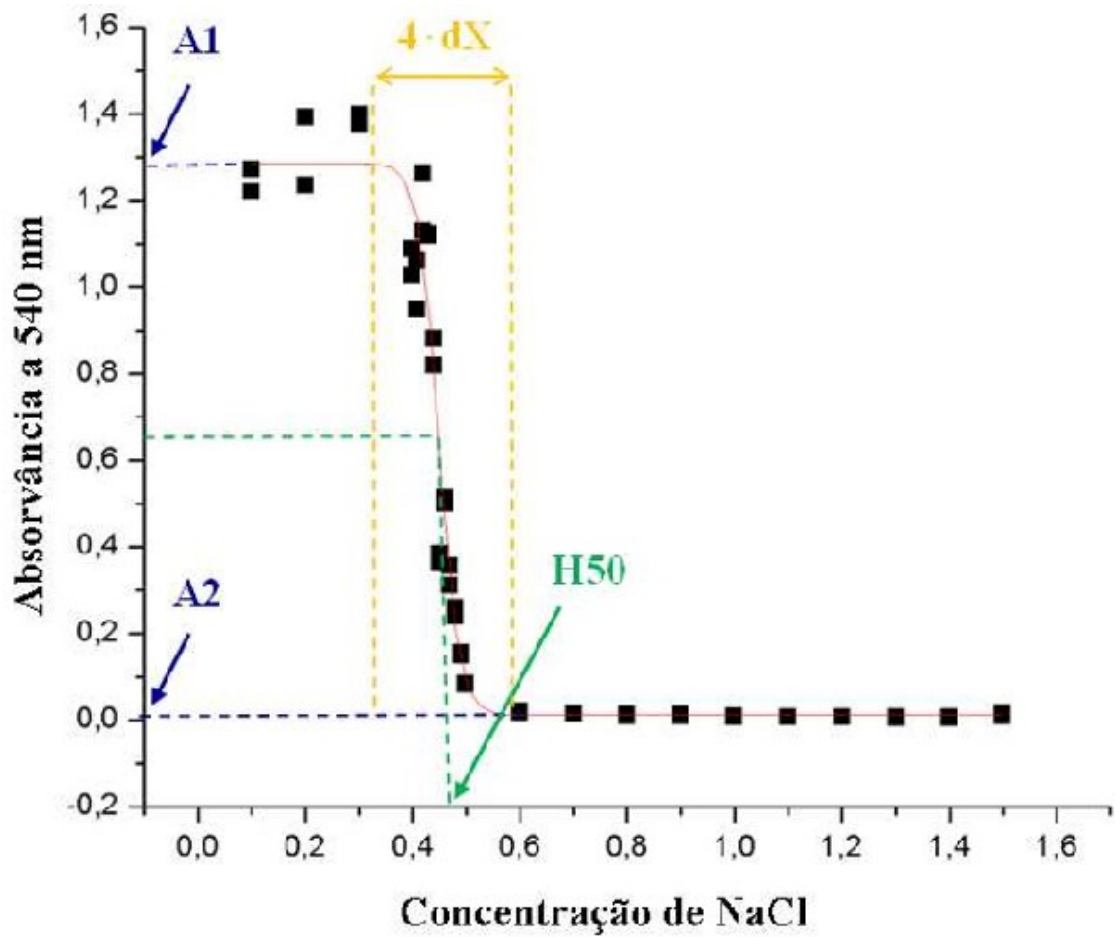


Figura 5. Ajuste sigmoidal da relação entre absorvância a 540nm de uma alíquota de sangue humano e a diminuição na concentração de NaCl.

3. Objetivos

- Conhecer o padrão de variabilidade glicêmica de uma amostra de pacientes com DM1 em tratamento intensivo;
- Estudar parâmetros de estabilidade da membrana eritrocitária de pacientes com DM1;
- Avaliar possíveis correlações da variabilidade glicêmica com a estabilidade da membrana celular eritrocitária no DM1;
- Quantificar níveis de marcadores de estresse oxidativo entre pacientes com DM1;
- Verificar se diferentes níveis de variabilidade glicêmica influenciam marcadores de estresse oxidativo e parâmetros de estabilidade da membrana de eritrócitos;
- Determinar possíveis correlações entre a estabilidade de membrana eritrocitária e as variáveis hematológicas e bioquímicas em pacientes com DM1.

Capítulo 2

How effective is the use of glycemic variability in the follow-up of type 1 diabetes under intensive care?

Ricardo Rodrigues¹, Luciana A. Medeiros², Lucas M. Cunha², Mario S. Garrote-Filho², Morun Bernadino Neto³, Paulo T. Jorge¹, Elmiro S. Resende¹, Nilson Penha-Silva²

¹ Faculty of Medicine, Federal University of Uberlândia, MG, Brazil

² Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

³ Department of Basic and Environmental Sciences, University of São Paulo, Lorena, SP, Brazil.

✉ Ricardo Rodrigues:
ricardo.rodriques@ufu.br

Abstract

Aims Glycemic variability (GV) has been identified as an important tool in the monitoring of type 1 diabetes mellitus (DM1), due to its ability to identify patients at greater risk of severe hypoglycemia and to constitute an independent risk factor for chronic complications of this disease. This study aimed to evaluate the GV pattern between individuals with DM1 under different types of intensive treatment and the correlations of this GV with different clinical and biochemical variables.

Methods Volunteers with DM1 (n = 90) under different types of intensive treatment (NPH insulin, n=54; insulin glargine, n=19; and continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) system, n=17) were analyzed in relation to glycemic control and GV. The glycated hemoglobin (HbA1c) and estimated average glucose (eAG) were used to estimate glycemic control. The daily average glucose (DAG) and its standard deviation (SDDAG) and coefficient of variability (CVDAG), as well the change in the levels of glycated hemoglobin (Δ HbA1c) were used to estimate GV.

Results Patients under CSII presented lower values of HbA1c, eAG, DAG, SDDAG and CVDAG than the other groups. DAG (mean = 189 mg/dL and IQR = 75) and SDDAG (mean = 89.8 mg/dL and IQR = 39) correlated positively with HbA1c, with correlations coefficients of 0.67 and 0.64, respectively.

Conclusions The glycemic variability in patients with type 1 diabetes, even under intensive treatment, is of great amplitude, and has direct correlations with the classic parameters of disease control. DAG and SDDAG can be used in the short term as predictors of the glycated hemoglobin levels in order to allow directions and earlier adaptations in clinical management.

Keywords Type 1 diabetes ▪ Glycemic variability ▪ Intensive treatment

Abbreviations

CGM	Continuous Glucose Monitoring
CSII	Continuous Subcutaneous Insulin Infusion
CV	Coefficient of Variability of Daily Average Glucose
DAG	Daily Average Glucose
DDI	Daily Dose of Insulin

DM1	Type 1 Diabetes Mellitus
eAG	Estimated Average Glucose
FPG	Fasting Plasma Glucose
GV	Glycemic Variability
HbA1c	Glycated Hemoglobin
HBGI	High Blood Glucose Index
LBGI	Low Blood Glucose Index
MA	Microalbuminuria
SDDAG	Standard Deviation of the Daily Average Glucose
SMBG	Self-Monitoring of Blood Glucose
Δ HbA1c	HbA1c Change

Introduction

Besides the ability to predict the chronic complications of diabetes (1), glycemic variability (GV) may also allow identification of patients at higher risk of developing severe hypoglycemia (2, 3). This is why the approach of GV in the treatment of type 1 diabetes has been quite prominent in recent years. The development of new technologies to monitor blood glucose levels, such as the continuous interstitial glucose monitoring systems, have made possible and practical the evaluation of GV in the daily life of patients with type 1 diabetes. This is very relevant because the better knowledge of the blood glucose behavior in patients under different types of intensive treatment can provide subsidies for therapeutic decisions and, thus, provide a better control of the disease (4-6).

Since the results of the DCCT (Diabetes Control and Complications Trial), a multicenter clinical study of 1441 volunteers with DM1, the indication of an intensive form of treatment has been considered fundamental to reduce the risks of the chronic microvascular complications of this disease (7). In recent years, with the development of new analogues of insulin and continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) systems, different treatment schemes have been used to conduct intensive insulin therapy (6, 8). However, this type of treatment increases the risk of severe hypoglycemia (9), an acute complication that may lead the patient to stop pursuing a more rigorous glycemic control or to present greater GV due to

hyperglycemic rebound after hypoglycemia attacks. This is the reason why the present study aimed to evaluate the GV pattern in individuals with DM1 under different types of intensive treatment and the correlations of this GV with different clinical and biochemical variables.

Methods

Participants and Ethics The study was approved (294.635/2013) by the Research Ethics Committee of the Federal University of Uberlândia. All procedures were performed after participants had signed an informed consent term.

A cross-sectional study was done with volunteers with DM1 (n = 90) assisted by the Diabetes Care Center of the Municipality of Uberlândia and the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia.

For 2 years, 383 patients were attended in these facilities. Of these, 90 were part of the study because they fit into the inclusion criteria and did not present any exclusion factors. The inclusion criteria were: to have a diagnosis of type 1 diabetes and to be under intensive care with multiple daily doses of insulin (basal bolus scheme) or with continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) system for at least 6 months. Exclusion criteria were: use of multivitamins, uncertain diagnosis of type of diabetes, severe chronic complications, febrile illness in the last month, skin changes that made sensor use impossible, blood dyscrasias, use of corticosteroids, heparin or oral anticoagulant. Patients who did not obtain the minimum number (5 to 7) of capillary glycemia to determine glycemic variability were also excluded from the study.

The volunteers were divided into 3 different groups according to the intensive treatment regimen: G1 (n=54), basal NPH insulin and multiple daily doses of fast-acting insulin (bolus); G2 (n=19), basal insulin analog (glargine) and multiple daily doses of fast-acting insulin (bolus); and G3 (n=17), CSII systems.

Evaluation of glycemic control and glycemic variability Glycemic control was assessed by the glycated hemoglobin (HbA1c) levels over the past year, the estimated average glucose (eAG) and the daily average glucose (DAG). DAG was calculated from the records of self-monitoring blood glucose (SMBG), 5-7 times a

day, using a blood glucometer (Accu-Chek Active™, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) and a management software (Accu-Chek 360° diabetes management system, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), or from the records of the continuous glucose monitoring (CGM) system, for 3 to 6 days, using the Guardian RT system™ (Medtronic, Northridge, CA, USA). GV was estimated from the standard deviation of the daily average glucose (SDDAG), the coefficient of variability (%) of the daily average glucose (CVDAG), given by $CVDAG = (SDDAG/DAG) \times 100$, and the change in the levels of glycated hemoglobin ($\Delta HbA1c$), given by the difference between the highest and the lowest value of HbA1c over a year. HbA1c levels were assessed by high performance liquid chromatography (HPLC, Shimadzu, Kyoto, Japan).

Other evaluations The data collected here also included anthropometric measurements, blood count, fasting plasma glucose (FPG), triglycerides (TGC), total-cholesterol (t-C), LDL-cholesterol (LDL-C) HDL-cholesterol (HDL-C), creatinine (Cr), microalbuminuria (MA) and thyroid stimulating hormone (TSH), in addition to the daily dose of insulin (DDI) used by each volunteer of the study. The probabilities of the volunteers developing hypoglycemia and hyperglycemia were estimated by the low blood glucose index (LBGI) and by the high blood glucose index (HBGI), which were obtained using the following equations:

$$LBGI = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n rl(x_i)^2 \quad (1),$$

and

$$HBGI = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n rh(x_i)^2 \quad (2),$$

respectively (10).

Statistical analysis The categorical variables were compared using the χ^2 -test. The Shapiro-Wilk test was used to investigate the existence of normality in the data distribution. The comparisons of normal and non-normal variables among the different groups were done using ANOVA, followed by Bonferroni post-test, and the Kruskal-Wallis test, with Dunn-Bonferroni post-test, respectively. Correlation analyzes were performed using the Pearson's or Spearman's test, when the distributions of the results were normal and non-normal, respectively. Differences

associated with p values ≤ 0.05 and $0.05 < p < 0.06$ were considered statistically significant and borderline, respectively. All statistical analyzes were performed using the software Origin 2016 (Microcal, Northampton, MA, USA) and SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

The baseline characteristics of the study participants are summarized in Table 1. The total number of volunteers with DM1 evaluated in this study is 90 (40 females, 44%; and 50 males, 56%).

Table 2 presents the comparison of the variables studied between types of intensive insulin therapy in volunteers with type 1 diabetes. There were no significant differences in age, sex ratio, FPG, t-C, HDL-C, TSH, MA, LBG1 and HBGI. The group under continuous insulin infusion treatment presented lower levels of the glycemic control indicators HbA1c, eAG and DAG and also lower values of the glycemic variability indicators SDDAG, CVDAG and Δ HbA1c, in relation to the G1 and G2 groups. The group under treatment with basal NPH insulin and multiple daily doses of fast-acting insulin presented a borderline elevation in the DDI and blood levels of LDL-C in relation to other groups.

The relationships between the different variables were also investigated through correlation tests. The results obtained are shown in Table 3. Some significant correlations are worth mentioning. The glycemic control indicators HbA1c, eAG and DAG had positive correlations with levels of TGC. DAG also presented a significant positive correlation with HbA1c (Fig 1) and, as would be expected, a positive correlation also with eAG. It is especially important to note that the indicator of glycemic variability SDDAG showed a significant positive correlation with the levels of HbA1c (Fig 2).

Discussion

The amplitude of glycemic variability in this study volunteers exceeded the acceptable tolerance range (2, 11, 12). SDDAG values above 1/3 of the mean or

greater than 50 mg/day and CV values greater than 36% are considered inadequate, since they represent a higher risk of severe hypoglycemia and elevation in the production of reactive oxygen species, factor associated with the generation of the cell injury that lead to the chronic complications of the disease (1).

The use of glycemic mean (DAG), standard deviation of the mean (SDDAG) and coefficient of variation of the mean (CV), determined by capillary glycemia or continuous interstitial glucose sensor as parameters for the quantification of glycemic variability was well established in recent studies (2, 9, 12-14), providing new tools to aid in therapeutic decisions. In the present study, the observation of a strong correlation between intraday glycemic variability and HbA1c, may allow the identification of patients who are more likely to fail in reaching the HbA1c goals in the coming months and thus allowing modification of treatment or early identification of their insulin needs.

The correlations observed in this study between glycemic variability parameters and HbA1c and / or Δ HbA1c are in agreement with the results reported in the ADAG study (2) for a population with DM1 in which the glycemic mean was 172 ± 37 mg/dL and SDDAG was 75 ± 18.5 mg/dL. That study reported correlations between SDDAG and other GV parameters such as the mean-amplitude glucose excursions (MAGE) and the continuous overall net glycemic action (CONGA) (2, 10). When compared to individuals without diabetes, in which GV fluctuates between 0 and 55 mg/dL (15), patients with DM1 showed GV about 2 to 3 times higher, which demonstrates the difficulty in achieving an insulin replacement system more similar to the physiological secretion pattern, which shows the need to develop new techniques and new parameters to minimize glycemic variability.

The use of Δ HbA1c, defined as the simple difference between the highest and the lowest HbA1c, has recently been proposed as a parameter for the evaluation of the long-term effects of glycemic variability, in order to identify patients with chronic profile of greater glycemic instability, in order to predict the risk of development of the chronic complications of diabetes (7, 16, 17). It is important to note that, in the present study, Δ HbA1c was significantly lower in the group under treatment with CSII.

The positive correlations of HbA1c, eAG and DAG with plasma levels of TGC are certainly resulting from lower activity of lipoprotein lipase in the liver, due to lower availability of insulin (18, 19).

In relation to treatments, only the intensive treatment group with CSII approached these goals of good disease control, with a low GV and HbA1c close to 7%. Among the possible reasons for this improved performance of the group under treatment with CSII is the use of fast acting insulin analogue for both basal and meal coverage (bolus dose), while other forms of intensive treatment always combine one slow-acting insulin with fast-acting insulin applications. It is well known that intermediate and slow-acting insulin, mainly NPH insulin, presents great intra-individual pharmacokinetic variability, which can justify greater fluctuation in blood glucose (20, 21). Another important reason for that difference is the way in which insulin is administered; fractional and gradual release in CSII better mimics the physiological pancreatic secretion in relation to other systems, without the deposition of higher amount of slow acting insulin in the subcutaneous tissue as occurs in those systems. In fact, the use of significantly lower doses of insulin in the volunteers being treated with CSII is consistent with the best results presented by the disease control indicators.

The limitations of this study are those of real-life studies, where the groups are not controlled and therefore what determines the therapeutic choice used by each patient group could constitute a selection bias. However, the real-life studies are important because they contribute with clinical answers on the effectiveness of a treatment or intervention in routine situations and, with this, allow high generalization of the findings (22, 23).

It is important to note that the population of the present study was fully constituted of volunteers attended by government public assistance services, with strict criteria to define the type of treatment to be used. According to these criteria, the use of basal insulin analog (glargine) and multiple daily doses of fast-acting insulin (G2) is only authorized by the public health system after therapeutic failure with the scheme based in basal NPH insulin and multiple daily doses of fast-acting insulin (G1), and the use of the CSII system (G3) is only released after therapeutic failure with the others two types of intensive treatment, due to the high cost of this therapy. Therefore, very possibly group 3 was composed of patients with more difficult clinical conditions in relation to groups 2 and 1. The higher values of microalbuminuria, with a borderline significance, of group 3 in relation to group 1, seem to support this idea.

Due to the multifactorial nature of the mechanisms involved in the pathogenesis of the chronic complications of diabetes, which include ischemia, inflammation and glycototoxicity, it was expected to find weak to moderate correlations between the variables studied. However, the existence of these correlations reinforces the need to develop new and more specific studies on the implications of glycemic variability in the pathogenesis of the chronic DM1 complications.

Conclusions

The glycemic variability in patients with type 1 diabetes, even under intensive treatment, is of great amplitude, and has direct correlations with the classic parameters of disease control, such as HbA1c and eAG, which are good risk indicators for the chronic complications of the disease.

Similar to what was found in the literature with controlled studies, in this real-life study greater efficacy was observed in the glycemic control of the group with continuous subcutaneous insulin infusion, which had values closer to the goal of good control of HbA1c and lower glycemic variability in relation to the other types of intensive treatment analyzed here.

In addition, the positive correlation observed between SDDAG and HbA1c indicates that this GV marker can be used in the short term as a predictor of the glycosylated hemoglobin levels in order to allow directions and earlier adaptations in clinical management.

Funding: This study received financial support (APQ-03602-13) of 'Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) for the acquisition of the CGM system and the sensors used during its implementation. N. Penha-Silva was supported by a scientific productivity grant from "Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento" (CNPq).

Duality of interest: The authors confirm that there is no duality of interest associated with this manuscript.

References

1. Brownlee, M., *The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1615-25.
2. Borg, R., et al., *Associations between features of glucose exposure and A1C: the A1C-Derived Average Glucose (ADAG) study*. Diabetes, 2010. **59**(7): p. 1585-90.
3. Kim, S.K., et al., *Three-day continuous glucose monitoring for rapid assessment of hypoglycemic events and glycemic variability in type 1 diabetic patients*. Endocr J, 2011. **58**(7): p. 535-41.
4. Breton, M., et al., *Fully integrated artificial pancreas in type 1 diabetes: modular closed-loop glucose control maintains near normoglycemia*. Diabetes, 2012. **61**(9): p. 2230-7.
5. Breton, M.D. and B.P. Kovatchev, *Impact of blood glucose self-monitoring errors on glucose variability, risk for hypoglycemia, and average glucose control in type 1 diabetes: an in silico study*. J Diabetes Sci Technol, 2010. **4**(3): p. 562-70.
6. Garvey, K. and J.I. Wolfsdorf, *The Impact of Technology on Current Diabetes Management*. Pediatr Clin North Am, 2015. **62**(4): p. 873-88.
7. Kilpatrick, E.S., A.S. Rigby, and S.L. Atkin, *A1C variability and the risk of microvascular complications in type 1 diabetes: data from the Diabetes Control and Complications Trial*. Diabetes Care, 2008. **31**(11): p. 2198-202.
8. Prieto-Tenreiro, A., et al., *[Benefits of subcutaneous continuous insulin infusion in type 1 diabetic patients with high glycemic variability]*. Endocrinol Nutr, 2012. **59**(4): p. 246-53.
9. Gubitosi-Klug, R.A., et al., *Risk of Severe Hypoglycemia in Type 1 Diabetes Over 30 Years of Follow-up in the DCCT/EDIC Study*. Diabetes Care, 2017. **40**(8): p. 1010-1016.
10. Service, F.J., *Glucose variability*. Diabetes, 2013. **62**(5): p. 1398-404.
11. Monnier, L., et al., *Toward Defining the Threshold Between Low and High Glucose Variability in Diabetes*. Diabetes Care, 2017. **40**(7): p. 832-838.

12. Rodbard, D., *Interpretation of continuous glucose monitoring data: glycemic variability and quality of glycemic control*. Diabetes Technol Ther, 2009. **11 Suppl 1**: p. S55-67.
13. Baghurst, P.A., D. Rodbard, and F.J. Cameron, *The minimum frequency of glucose measurements from which glycemic variation can be consistently assessed*. J Diabetes Sci Technol, 2010. **4(6)**: p. 1382-5.
14. DeVries, J.H., *Glucose variability: where it is important and how to measure it*. Diabetes, 2013. **62(5)**: p. 1405-8.
15. Hill, N.R., et al., *Normal reference range for mean tissue glucose and glycemic variability derived from continuous glucose monitoring for subjects without diabetes in different ethnic groups*. Diabetes Technol Ther, 2011. **13(9)**: p. 921-8.
16. Marcovecchio, M.L., et al., *A1C variability as an independent risk factor for microalbuminuria in young people with type 1 diabetes*. Diabetes Care, 2011. **34(4)**: p. 1011-3.
17. Kilpatrick, E.S., A.S. Rigby, and S.L. Atkin, *Effect of glucose variability on the long-term risk of microvascular complications in type 1 diabetes*. Diabetes Care, 2009. **32(10)**: p. 1901-3.
18. Fick, T., et al., *Severe hypertriglyceridemia at new onset type 1 diabetes mellitus*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2017. **30(8)**: p. 893-897.
19. Dunn, F.L., *Plasma lipid and lipoprotein disorders in IDDM*. Diabetes, 1992. **41 Suppl 2**: p. 102-6.
20. Bolli, G.B., *The pharmacokinetic basis of insulin therapy in diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract, 1989. **6(4)**: p. S3-15; discussion S15-6.
21. Heinemann, L., *Variability of insulin absorption and insulin action*. Diabetes Technol Ther, 2002. **4(5)**: p. 673-82.
22. Saturni, S., Bellini, F., Braido, F., Paggiaro, P., Sanduzzi, A., Scichilone, *Randomized controlled trials and real life studies. Approaches and methodologies: a clinical point of view*. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics, 2014. **27 (2)**: p. 129-138.

23. Saturni, S., Bellini, F., Braido, F., Paggiaro, P., Sanduzzi, A., Scichilone, *Randomized controlled trials and real life studies. Approaches and methodologies: a clinical point of view*. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics, 2014. **27** (2): p. 129-138.

Figure Legends

Fig. 2.1. Dispersion diagram of the daily average glucose (DAG) and glycated hemoglobin (HbA1c) in the studied population (n=90).

Fig. 2.2. Dispersion diagram of the standard deviation of the daily average glucose (SDDAG) and glycated hemoglobin (HbA1c) in the studied population (n=90).

Table 2.1 Baseline characteristics of the study population*

Variables	N	Median (IQR)	Min	Max
Age (years)	90	23.5 (18-33)	8	55
Body Mass Index (kg/m ²)	90	23 (20.7-25)	17	36.3
Duration of Diabetes (years)	90	10 (6-15)	3	42
Daily Dose of Insulin (IU/kg)	90	0.86 (0.7-1.1)	0.24	2.1
HbA _{1c} (%)	90	8.6 (7.7-9.9)	5.8	14.6
HbA _{1c} (mmol/mol)	90	69.5 (61-85)	40	136
ΔHbA _{1c}	90	0.99 (0.6-1.4)	0.13	4.54
Estimated Average Glucose (mg/dL)	90	199 (175-237)	120	372
Daily Average Glucose (mg/dL)	90	189 (157-232)	111	371
Standard Deviation of Daily Average Glucose (mg/dL)	90	89.8 (72-111)	50	166.4
Coefficient of Variation of Daily Average Glucose (%)	90	47.3 (40.1-53.9)	23	90
Low Blood Glucose Index (%)	75	1.9 (0.8-4.3)	0.1	12.7
High Blood Glucose Index (%)	75	16.7 (9.5-26.2)	1.7	48.6
Fasting Plasma Glucose (mg/dL)	90	153 (101-220)	44	390
Total Cholesterol (mg/dL)	88	160.4 (136.5-188.7)	95	342
HDL-Cholesterol (mg/dL)	88	52.1 (16.6)	16	94
LDL-Cholesterol (mg/dL)	88	88 (71-111)	33	218.7
Triglycerides (mg/dL)	88	83.9 (55.4-122.2)	35	379
Thyroid Stimulating Hormone (mIU/L)	90	2.4 (1.6-3.9)	0.3	13.3
Microalbuminuria (μg/mg Creatinine)	89	4.9 (2.0-11.3)	0.8	758

*All variables were non-normally distributed and are presented as median (IQR), except HDL-C, which was normally distributed and is presented as mean (SD).

Table 2.2. Comparison of the studied variables* between types of intensive insulin therapy in volunteers with type 1 diabetes

Variables	G1 (n=54)	G2 (n=19)	G3 (n=17)	<i>p</i> -Value (G1&G2)	<i>p</i> -Value (G1&G3)	<i>p</i> -Value (G2&G3)
Age (years)	23.5 (19-33)	24 (20-36)	23 (13-35)	0.693	0.686	0.375
Men/women (n/n)	34/20	10/9	10/7			
BMI (kg/m ²)	23.8 (21-26)	22.3 (21-25)	20 (19-22)	0.420	0.005	0.094
Duration of Diabetes (years)	8 (6-13)	14 (8-18)	12 (6-18)	0.029	0.253	0.430
Insulin dose (IU/kg)	0.92 (0.7-1.1)	0.88 (0.7-1.1)	0.71 (0.6-0.8)	0.909	0.017	0.057
HbA _{1c} (%)	8.9 (8.2-10.1)	8.2 (7.8-9.3)	7.5 (6.8-7.9)	0.191	<0.001	0.009
HbA _{1c} (mmol/mol)	74 (66-86)	66 (62-78)	58 (51-62)	0.177	<0.001	0.011
ΔHbA _{1c}	1.14 ± (0.6-1.8)	1.22 (0.76-1.43)	0.6 (0.5-0.8)	0.720	0.005	0.003
Estimated Average Glucose (mg/dL)	209 (188-243)	190 (180-221)	169 (148-181)	0.211	<0.001	0.008
Daily Average Glucose (mg/dL)	205 (169-242)	172 (155-232)	167 (147-176)	0.162	0.001	0.097
Standard Deviation of Daily Average Glucose (mg/dL)	100.1 (83-119)	88 (76-127)	64 (57-72)	0.487	<0.001	0.001
Coefficient of Variation of Daily Average Glucose (%)	46.9 (40.1-57.9)	51.6 (46.6-53.6)	37.5 (32.3-47.3)	0.244	0.008	0.002
Low Blood Glucose (%)	1.7 (0.8-4.2)	1.8 (0.9-3.8)	4.3 (0.6-6.6)	0.937	0.201	0.272
High Blood Glucose (%)	15.8 (9.5-25.4)	19.2 (16.5-22.3)	10.4 (5.8-27.7)	0.440	0.641	0.368
Fasting Plasma Glucose (mg/dL)	176.5 (101-224)	141 (95-244)	134 (121-186)	0.609	0.309	0.662
Total Cholesterol (mg/dL)	173.4 (136-197)	150.3 (136-175.5)	160 (137-176.7)	0.118	0.288	0.757
HDL-Cholesterol (mg/dL)	49.4 (15.1)	54.5 (16.8)	58.6 (20)			
LDL-Cholesterol (mg/dL)	97.3 (77.2-118.6)	80.7 (64.6-98.9)	79 (66-108)	0.038	0.108	0.810
Triglycerides (mg/dL)	92 (67-140)	87 (55-112)	55 (48-76)	0.276	0.001	0.050
Thyroid Stimulating Hormone (mIU/L)	2.8 (1.7-4.0)	2.4 (1.8-5.4)	1.8 (1.1-2.8)	0.927	0.040	0.073
Microalbuminuria (mcg/mg Creatinine)	4.7 (1.9-8.8)	4 (2.4-8.4)	11.4 (2.7-58.4)	0.971	0.061	0.120

* Except for HDL-C, which was normally distributed and is presented as mean (SD), all other variables were non-normally distributed and are presented as median (IQR). Comparisons were done by ANOVA with Bonferroni post-hoc test for HDL-C and by Kruskal-Wallis with Dunn-Bonferroni post-hoc test for all other variables.

Table 2.3. Spearman's σ coefficients for the correlations between all pairs of variables studied

# Variables	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1 SDDAG	1.00																			
2 DAG	0.64 [§]	1.00																		
3 Δ HbA1c	0.42 [§]	0.32 [§]	1.00																	
4 HbA1c	0.67 [§]	0.64 [§]	0.41 [§]	1.00																
5 eAG	0.67 [§]	0.65 [§]	0.41 [§]	1.00 [§]	1.00															
6 CV	0.55 [§]	-0.23 [*]	0.27 [*]	0.10	0.11	1.00														
7 FPG	0.13	0.21 [*]	0.28 [§]	0.36 [§]	0.37 [§]	-0.07	1.00													
8 LBG1	0.03	0.09	0.05	0.06	0.06	-0.02	-0.08	1.00												
19 HBGI	0.07	-0.15	-0.03	-0.08	-0.08	0.22	0.05	-0.28 [*]	1.00											
10 Age	-0.11	-0.15	-0.13	-0.21 [*]	-0.20	0.05	-0.15	0.07	0.04	1.00										
11 BMI	0.02	-0.15	0.08	0.06	0.06	0.19	0.12	-0.27 [*]	0.28 [*]	0.43 [§]	1.00									
12 Disease Duration	0.03	-0.16	-0.05	-0.14	-0.13	0.20	-0.08	0.07	-0.01	0.60 [§]	0.24 [*]	1.00								
13 Dose	0.25 [*]	0.39 [§]	0.24 [*]	0.25 [*]	0.25 [*]	-0.11	0.12	-0.07	-0.17	-0.50 [§]	-0.16	-0.29 [§]	1.00							
14 Microalbuminuria	-0.13	-0.03	0.14	0.09	.086	-0.12	0.22 [*]	0.25 [*]	-0.12	0.02	-0.05	0.18	0.02	1.00						
15 t-C	-0.04	0.14	0.00	0.22 [*]	0.22 [*]	-0.22 [*]	0.31 [§]	0.01	-0.05	0.14	0.23 [*]	-0.03	0.08	0.26 [*]	1.00					
16 TGC	0.19	0.27 [*]	0.31 [§]	0.40 [§]	0.40 [§]	-0.09	0.40 [§]	-0.11	0.05	0.01	0.27 [*]	-0.08	0.29 [§]	0.15	0.48 [§]	1.00				
17 LDL-C	0.01	0.14	0.03	0.20	0.20	-0.11	0.28 [§]	-0.05	-0.06	0.01	0.28 [§]	-0.07	0.16	0.21	0.85 [§]	0.40 [§]	1.00			
18 HDL-C	-0.14	-0.12	-0.19	-0.12	-0.12	-0.09	-0.06	0.08	0.03	0.12	-0.17	0.06	-0.21	-0.07	0.25 [*]	-0.33 [§]	-0.08	1.00		
19 TSH	0.09	0.19	-0.05	0.07	0.08	-0.06	0.14	-0.03	0.12	0.01	0.12	-0.07	0.09	-0.05	0.06	0.30 [§]	0.14	-0.31 [§]	1.00	

*p<0.05 and [§]p<0.01.

Figure 1

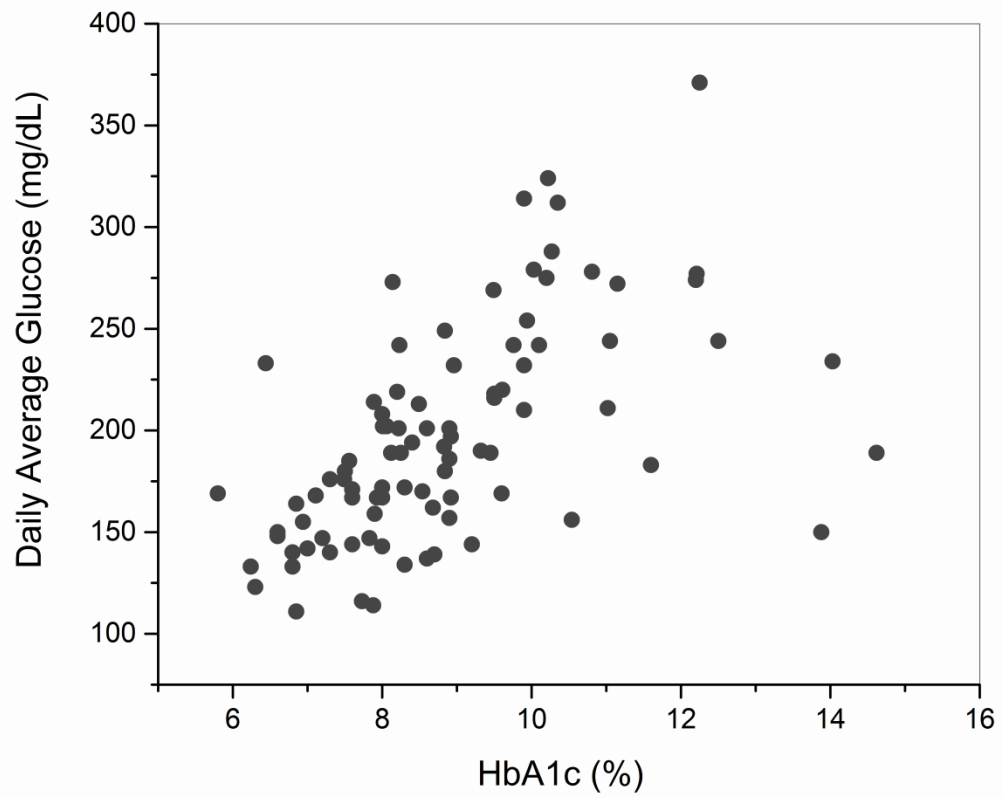
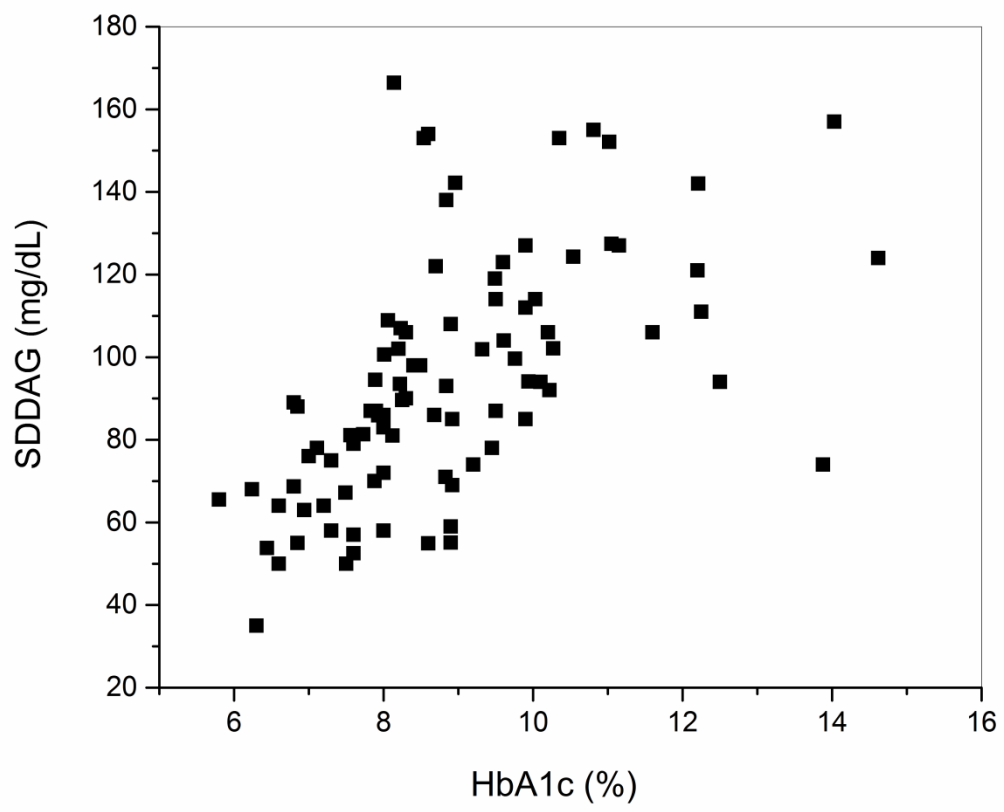


Figure 2



Capítulo 3

Correlations of the glycemic variability with oxidative stress and erythrocytes membrane stability in patients with type 1 diabetes under intensive treatment

Glycemic variability and erythrocytes membrane stability

Ricardo Rodrigues¹, Luciana Alves de Medeiros², Lucas Moreira Cunha², Mario da Silva Garrote-Filho², Morun Bernardino Neto³, Paulo Tannus Jorge¹, Elmiro Santos Resende¹, Nilson Penha-Silva²

¹Faculty of Medicine, Federal University of Uberlândia, MG, Brazil

²Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

³Department of Basic and Environmental Sciences, University of São Paulo, Lorena, SP, Brazil.

Corresponding author: Ricardo Rodrigues

ricardo.rodrigues@ufu.br

Universidade Federal de Uberlândia

Abstract

Objectives: This study aimed to evaluate the correlations of glycemic variability with erythrocyte membrane stability parameters and oxidative stress markers in patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM) under intensive treatment. **Material and Methods:** 90 patients with T1DM and under intensive treatment of the disease were evaluated in relation to anthropometric indices, records of glycemic averages and parameters of glycemic variability, biochemical dosages (glucose, uric acid, lipidogram, glycated hemoglobin, microalbuminuria, creatinine and iron) reticulocyte count, erythrocyte membrane stability parameters and oxidative stress markers (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS, and glutathione reductase, GR). **Results:** Indicators of glycemic variability in the short and long term showed correlations with parameters of membrane stability and markers of oxidative stress (GR). In addition, the comparison of these same parameters between the subgroups consisting of quartiles of GV or glycemic control also showed significant differences. **Conclusion:** In the T1DM patients studied here, glycemic variability showed correlations with oxidative stress and erythrocyte membrane stability variables. This corroborates the hypothesis that glycemic fluctuations interfere with lipid peroxidation and cell membrane behavior, emphasizing its participation in mechanisms related to the development of chronic complications of diabetes.

Key Words: type 1 diabetes, glycemic variability, erythrocytes, membrane stability; oxidative stress

1. Introduction

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is characterized by the destruction of pancreatic beta cells, resulting in a complete or near complete absence of insulin production and consequent hyperglycemia [1, 2], which will lead to acute and chronic complications of the disease.

The pathophysiology of diabetes complications can be considered as a result of two major deleterious metabolic changes: excessive glycation of proteins and generation of oxidative stress [3-5]. Oxidative stress is a state of imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the endogenous antioxidant capacity; its role as a major determinant of the onset and progression of chronic complications associated with DM has been of great interest.

Some recent studies have shown that both ROS production and advanced glycation end products (AGES) are influenced by both fasting and postprandial hyperglycemia, as well as glycemic fluctuations [3, 6-8]. Currently, there is no doubt that high levels of fasting and postprandial glycemia activate the glycation process, which can be investigated by measuring levels of HbA1c [4, 9, 10]. In addition, acute or chronic hyperglycemia, as well as wide fluctuations in glucose levels, activates oxidative stress [11]. Thus, changes in any of these three factors would result in an increased risk of complications from diabetes. In this context, it would be important, therefore [4], to evaluate the influence of the glycemic variability of the patient, and not only glycated hemoglobin, on oxidative stress.

Furthermore, little is known about the influence of blood glucose concentration on the stability of cell membranes *in vivo*. [12]. In view of the important role of hyperglycemia and related biochemical and hematologic alterations, evaluating the possible relationships between glycemic variability and erythrocyte membrane stability may be essential for a better understanding of the disease. As there are still few studies on the mechanisms of the pathophysiological processes proposed for the genesis of the chronic complications of type 1 diabetes, new research is needed to better clarify them. In addition, the recognition of other possible pathophysiological consequences of glycemic variability may help to establish a consensus about the real need to act on its control.

2. Material and Methods

2.1. Study design and subjects

The study was approved and authorized by the Ethics Committee in Research of the Federal University of Uberlândia (Protocol 294.635/2013). All procedures were performed after participants had signed the Free and Informed Consent Form.

This is a cross-sectional study that evaluated patients with type 1 diabetes treated at the outpatient clinics of the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia (HC-UFU) and the Municipal Center for Diabetic Care (CMAD) during the consecutive period of two years. Patients in whom the diagnosis of type of diabetes was not clear, and those with severe chronic complications (chronic renal failure, for example), febrile illness in the last month, skin alterations that made it impossible to use the sensor or perform capillary glycemia, blood dyscrasias, in addition to those who used corticosteroids, heparin, oral anticoagulants or vitamin E supplements (capsules), were excluded. Patients who did not perform a minimum number of capillary glycemia required for the evaluation of glycemic variability were also excluded.

2.2. Average glucose levels and glycemic variability parameters

The glycemic variability was determined using the continuous interstitial glucose monitoring system (CGMS, Guardian Real Time, Medtronic™) or through self-monitoring of blood glucose (SMBG) with registration in a diabetes management software (Accu-Chek 360, Roche). The standard deviation of daily average glycemia (SD_{DAG}) and the coefficient of variation of daily average glucose (%CV), where $\%CV = (SD_{DAG}/DAG) \times 100$, were used to estimate GV. The low blood glucose index (LBGI) and the high blood glucose index (HBGI) were used to estimate risk for hypo and hyperglycemia, respectively [13]. The HbA1c variation over the last year was used as a parameter for the evaluation of long-term GV.

2.3. Dosage of oxidative stress markers

Malondialdehyde (MDA) is a common product of lipid peroxidation. Lipid peroxidation is a well-established mechanism of membrane injury and is used as indicator of oxidative stress. The measurement of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) was done for monitoring lipid peroxidation in plasma samples, using a commercial kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA). The product formation was measured colorimetrically at 530-540 nm and expressed as MDA concentration [14].

Glutathione reductase (GR) is an enzyme involved in the redox cycle of glutathione and essential for protection against oxidative stress. Its activity was determined on a plasma sample by specific kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) and its activity was determined colorimetrically and expressed in nmol/min/mL.

2.4. Determination of erythrocyte membrane stability parameters

The determination of membrane stability parameters was performed following procedures already described in the literature [12]. Calculations, data editions and statistical analyzes of the dependence between hemolysis and NaCl concentration were performed using the Origin Pro 9.1 (Microcal Inc., Northampton, Massachusetts, EUA) or GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) application. The relation between the absorbance at 540 nm (A_{540}) and the NaCl (X) concentration was adjusted to a sigmoidal regression line according to the Boltzmann equation:

$$A_{540} = \frac{A_{\max} - A_{\min}}{1 + e^{(X-H_{50})/dX}} + A_{\min} \quad (1),$$

where A_{\min} and A_{\max} represent the mean values of A_{540} in the minimum and maximum plateaus of the sigmoid, H_{50} is the concentration of NaCl capable of promoting 50% hemolysis and dX represents $\frac{1}{4}$ of the change in salt concentration responsible for the full lysis of the erythrocytes population used in each assay. Fig. 1 illustrates a typical curve obtained in this type of analysis, with the definition of two

other variables, H_0 and H_{100} , which represent the values of saline concentration where hemolysis begins and ends, respectively.

Lower values of H_0 , H_{50} , H_{100} and A_{min} , as well as higher values of dX , dX/A_{min} and dX/H_{50} , indicate greater erythrocyte membrane stability [15].

2.5. Laboratory Assays

The complete blood count was performed using an automated system (Sysmex K4500, Sysmex Corporation, Mundelein, IL, EUA).

The levels of total cholesterol (t-C), HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol, and triglycerides (TGC) were measured in an automatic analyzer (Hitachi 917, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA).

The fraction of glycated hemoglobin HbA1c was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu, Kyoto, Japan), with a normal range of 4.5 to 5.2%. The obtained values of glycated hemoglobin were converted into estimated average glycemia (eAG), given in mg/dL, according to the mathematical model described by Nathan et al: $eAG = [(A1c \times 28.7) - 46.7]$.

2.6. Statistical analysis

All sets of data were analyzed for data normality using the D'Agostino-Pearson test. Data analysis was performed using the Origin 9.1 (Microcal, Northampton, MA, USA) or SPSS (IBM, Armonk, NY, USA) application. Data with normal distribution of values were expressed as mean \pm standard deviation (SD) and compared with Student's t-test for independent samples, while non-normal distribution data were expressed as median (IQR) and compared with the Wilcoxon rank-sum and Mann-Whitney test. Correlation analyzes were performed using the Pearson or Spearman method, when distributions were normal and non-normal, respectively. Values of p less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

90 patients with type 1 diabetes, 52 men (58%) and 38 women (42%) were evaluated. The clinical characteristics of this population were summarized in Table 1. The values of membrane stability parameters, hematimetric indexes and oxidative stress markers were presented in Table 2. Table 3 shows the comparison between quartiles of lower and higher GV in relation to the parameters of osmotic stability of the erythrocyte membrane.

3.1 Glycemic Variability

The study population had an average age 26.1 ± 10.1 years, with a median duration of disease of 10 (6-15) years and BMI of 23 (20.7-25) kg/m². The median insulin dose used was 0.86 (0.71-1.11) IU/kg and median HbA1c was 8.57 (7.75-9.86)% or 69.5 (61.25-84.5) mmol/mol. The value of DAG was 189 (157.5-232) mg/dL and the values of the glycemic variability indices, SD_{DAG} and %CV, were 94.1 ± 29.2 mg/dL and 47.3% (40.1%-53.8%), respectively.

In the analysis of the short-term GV parameters, the glycemic variability measured by standard deviation (SDDAG) and coefficient of variation (%CV) of the patients did not present correlations with gender, BMI and insulin dose used. Positive and strong correlations were found between SDDAG and HbA1c levels ($\rho = 0.64$) and between SDDAG and DAG ($\rho = 0.64$). A moderate intensity correlation was found between SDDAG and Δ HbA1c ($\rho = 0.42$). The coefficient of variability (%CV) had direct correlation with Δ HbA1c ($\rho = 0.26$) and with SDDAG ($\rho = 0.54$) and inverse correlation with total cholesterol levels ($\rho = -0.21$). The correlation of GV with BMI and duration of diabetes was borderline (with $\rho = 0.18$ and 0.20 respectively).

The variability of HbA1c (Δ HbA1c) over the course of one year has been proposed as a marker of long-term GV and it is considered high when greater than 1. [10]. The population studied presented a Δ HbA1 median value of 0.98 (0.6-1.42) with a minimum of 0.13 and a maximum of 4.54. There was a weak inverse correlation of borderline significance between Δ HbA1c and the hematologic parameters RBC, Hto and Hb.

3.2 Glycemic Variability, erythrocyte membrane stability and lipid profile

The comparison between the subgroups of lower and higher %CV in relation to the parameters of erythrocyte membrane stability showed that the group of higher %CV presented greater erythrocyte membrane stability, since the parameters H_{50} and H_0 , which have direct relation with membrane fragility, had significantly lower mean values in the group with highest %CV (Table 3). In the study population, %CV values showed a direct correlation with HBGI values ($\rho = 0.22$; $p < 0.05$).

The presence of chronic complications also had negative correlations with RBC ($\rho = -0.30$), Hto ($\rho = -0.30$) and Hb ($\rho = -0.24$). Chronic complications presented a negative borderline correlation with Amin ($\rho = -0.23$).

A positive significant correlation ($p < 0.05$) was observed between ΔHbA1c and the membrane stability parameter H_{100} ($\rho = 0.27$), and a negative correlation with borderline significance ($p = 0.05$) was observed between ΔHbA1c and the membrane stability parameter $1/H_{50}$ ($\rho = -0.24$).

The comparison between the subgroups of better and worse glycemic control, according to HbA1c quartiles, regarding the dX/H50 membrane stability parameter, showed a borderline difference ($p = 0.06$) between these two subgroups.

The levels of t-C, LDL-C and HDL-C did not present significant correlations with the membrane stability parameters in the group as a whole, and the subgroup analysis with hypercholesterolemia did not show significant differences either. But, TGC levels showed a significant direct correlation with H50 ($\rho = 0.25$). The group with better glycemic control in relation to HbA1c also had lower levels of TGC ($p < 0.01$).

3.3 Glycemic variability and oxidative stress

In the evaluation of oxidative stress markers in $n = 40$ of the studied patients, TBARS levels ranged from 0.94 to 6.53 μM MDA, with median of 2.31 (1.62-2.69) μM MDA. The GR activity ($n = 40$) ranged from 10.2 nmol/min/mL to 636.7 nmol/min/mL with median of 187.8 (29.1-280.9) nmol/min/mL. The GR activity showed a significant direct correlation with SD_{DAG} ($\rho = 0.39$) and direct borderline correlations with %CV ($\rho = 0.29$). In the group of patients who had their levels of oxidative stress markers quantified, these levels did not present correlations with age, BMI, time of illness, dose of insulin used, current glycemic control parameters, lipid levels or hematimetric indexes.

Comparing the study population in two subgroups of better and worse glycemic control, according to HbA1c quartile, higher GR activity was observed in the group with higher levels of HbA1c ($p = 0.02$).

Regarding the indices of glycemic variability, the comparison between the subgroup of lower SD_{DAG} and %CV (Q1) and that of higher SD_{DAG} and %CV (Q3), higher GR activity was associated with higher SD_{DAG} and %CV values ($p < 0.05$) (Table 3).

4. Discussion

The analysis of glycemic variability in the follow-up of patients with diabetes mellitus has been gaining increasing importance because of its potential risk for chronic complications (micro and macrovascular) of the disease [16, 17] and its predictive ability of hypoglycemia serious [8, 9, 18]. The development of new technologies that are easy to use by patients and the popularization of their use may allow the medical team to better know and analyze the data obtained in these equipments [5, 19]. The present study analyzes the possible implications of glycemic variability in patients with T1DM under different forms of intensive treatment on erythrocyte membrane stability and some markers of oxidative stress.

Fluidity, deformability and stability are properties of the erythrocyte membrane that are important for determining the hemorheologic behavior of these cells and, therefore, they are potentially linked to the microvascular complications of diabetes (9). The osmotic stability variables of the erythrocyte membrane considered here were dX , $dX/H50$ and $dX/Amin$, which are directly proportional to membrane stability and inversely proportional to $H100$, $H50$ and $H0$, which are parameters of osmotic fragility of the erythrocyte membrane (9). It is important to note that membrane stability does not present a linear relationship with its functionality; in some situations, greater membrane stability may mean greater stiffness and thus less deformability and greater erythrocyte lysis.

4.1. Correlations of glycemic variability with erythrocyte membrane stability

The glycemic control parameters HbA1c, DAG and FPG showed a direct correlation with the stability index dX/A_{min} . The higher membrane stability observed in the subgroup of higher %CV, by means of the H_{50} and H_0 parameters (Table 3), shows that greater glycemic variability (*in vivo*) affects the erythrocyte membrane behavior (*in vitro*), making it more stable to hyposmotic lysis. This fact may be related to the exposure of the cell to the higher osmolality associated with higher glycemic levels, present in individuals with higher CV%. Indeed, %CV presented a direct correlation with HBGI.

In a recent study, Monnier et al identified a %CV value (36%) capable of expressing an increased risk of hypoglycemia, which could be used as a threshold of glycemic variability [20]. In the population studied here, the group with %CV above 50% had higher values of $1/H_{50}$ ($p = 0.02$) and lower values of H_0 ($p = 0.04$); this means that a %CV above 50% would be related to increased osmotic stability of the erythrocyte membrane.

$\Delta HbA1c$ did not behave in the same way as the other glycemic indexes, since it had a negative correlation with $1/H_{50}$, although it had a direct correlation with H_{100} . Therefore, its correlation with membrane stability is unclear. $\Delta HbA1c$ may not reflect well not only glycemic variability but also mean blood glucose levels, and therefore $\Delta HbA1c$ would not separate those with high glycemic variability at the expense of frequent hypoglycemia or oscillations with very high blood glucose peaks.

Controversial findings are reported in the literature regarding alterations in erythrocytes of patients with T1DM, with some authors finding alterations in the membrane fluidity pattern as a result of changes in lipid composition [21] or due to membrane protein glycations [22], and other authors reporting the absence of glycemia interference in membrane fluidity [23]. In relation to the membrane stability and glucose concentrations of the medium *in vitro*, a previous study demonstrates the potential stabilization of the membrane as a function of the increase in the osmolality of the medium by glucose [12]. In the present study, the DAG and HbA1c values tended to have a direct relation with dX/H_{50} , associating the greater stability of erythrocyte membranes with comparatively higher glycemic averages. The GV parameters had similar behavior, probably due to the greater variability occurred at the expense of higher glycemia peaks, which is corroborated when the smaller and larger dX/H_{50} quartiles are compared in relation to the HBGI index.

One question to be answered is how much of this stabilization can influence cellular functionality? If there is interference, erythrocyte may be playing a key role in the microvascular complications of diabetes.

4.2 Correlations of plasma lipids with parameters of erythrocyte membrane stability

The fact that the lipid levels found in most of the studied patients are within normal range, despite their high glycemic rates, may be related to the low age range and the normal BMI of the group, characteristics usually common to the profile of patients with type 1 diabetes. However, 23% of the participants in the present study had lipid abnormalities and weak but significant correlations were observed between BMI and t-C, LDL-C and TGC levels. Santos and colleagues [24] also found a high prevalence of lipid abnormalities in type 1 diabetics in childhood (10%), reinforcing the role of dysglycemia in the development of these metabolic abnormalities. Among the lipid alterations found, the most common was low HDL-C levels (21/90); followed by elevated levels of TGC (9/90) and LDL-C (2/90). The existence of correlations between the erythrocyte stability parameters and the lipid profile was expected, since cholesterol is one of the components of the cell membrane and changes in its membrane content are capable of affecting the properties of these cells [25]. However, the fact that LDL-C levels are within normality in almost all patients should have prevented the existence of correlations of this variable with the main parameters of erythrocyte stability. In the studied group of patients with T1DM, there was a correlation between TGC and 1/H50, and the higher the TGC levels the lower the membrane stability.

4.3. Correlations of glycemic variability with oxidative stress markers

The levels of TBARS among the T1DM patients studied were elevated compared to levels of controls without the disease described in the literature [26], but this variable did not correlate with any of the markers of glycemic variability in the short or long term. This fact may mean that the hyperglycemia situation per se already generates a high level of lipid peroxidation, as previously describe [27], and that glycemic fluctuations did not contribute independently to the glycemic average. In addition, although it is one of the most widely used methods, the dosage of

TBARS is not a very sensitive method to evaluate oxidative stress and, perhaps because of this, no correlations were found with this variable.

GR activity was also elevated when compared to volunteers without diabetes and may reflect an organism response in an attempt to balance increased ROS formation and redox balance. Therefore, indirectly, higher levels of GR could be interpreted as a marker of greater oxidative stress in the body of the volunteers of this study. Indeed, in the evaluation of subgroups of lower and higher GV there was a uniform pattern between SDDAG, %CV and Δ HbA1c with respect to GR, with the group with the highest GV mean also showing higher GR levels. Similarly, in a recent study, Camargo and colleagues also found elevated RG levels in the first few months after diagnosis of T1DM [28]. However, within this context the literature is divergent, with some studies also demonstrating reduced levels of GR activity in T1DM patients [11, 29].

4.4. Other notes

The percentage of patients that were within the goals of good glycemic control recommended by the ADA and EASD [1], was compatible with those described previously in the literature, where only about 20% reach these goals [30], which reinforces the difficulty of control of this disease and the need to develop new tools and strategies to achieve the goals of treatment. The fact that DAG, obtained through SMBG or CGMS, has been very close to eAG, which is estimated by HbA1c, confirms the reliability and great utility of the patient's glucose recording methods to guide insulin therapy on a daily basis and its utility as a parameter of disease control in the short and medium term [9, 16]. HbA1c is one of the best indexes for assessing glycemic control in patients with diabetes and as a marker of risk for developing chronic complications of diabetes [31]. One of its failures, pointed out in the literature, would be not to demonstrate the patient's glycemic fluctuation [32], since patients may have the same HbA1c, but with completely different glycemic behaviors. However, the present study shows that HbA1c also has a strong correlation with GV ($r = 0.64$ and $p = 0.001$), i.e., patients with higher HbA1c values reflect patients with higher daily GV.

The time of exposure to hyperglycemia is classically one of the risk factors for the development of chronic complications of the disease [4, 33, 34] and, in the study

population, characterized by an average diagnosis time of 11 years, this same relation was also found. Significant correlation between disease time and higher creatinine levels ($\rho = 0.34$) was also found. But unlike the description in the literature, an inverse correlation between disease time and insulin dose was found in this study, which can be attributed to many causes, such as good adherence of the group to diabetes treatment, especially with regard to non-pharmacological treatment, such as eating habits and self-care with the disease acquired with a longer period of living with diabetes.

The fact that the insulin dose used had a positive and linear correlation with HbA1c, eAG and DAG clinically reflects the fact that these disease control parameters are the main determinants of treatment dose adjustments. The inverse correlation found between the used dose of insulin and Cr could be explained by renal clearance and reduced metabolism of insulin and, therefore, the need for lower doses or higher risk of hypoglycemia in patients with a lower glomerular filtration rate [35, 36]. As previously described in the literature, in T1DM patients there is a greater risk for diabetic nephropathy, characterized in its early stages by the increase in urinary albumin excretion rate, and this risk is classically associated with disease time and poor glycemic control in the over the years [37].

In the present study, there was agreement of this higher prevalence of microalbuminuria and its correlation with duration of disease. Although we do not have a long-term glycemic control marker that reflects the degree of disease control for years, the variability of glycated hemoglobin or the mean of HbA1c over 1 year may represent somewhat longer exposure to levels higher glucose levels [24].

Glycemic variability may influence several other aspects not directly related to the mechanisms of cell injury in the patient with T1DM, but which may affect their treatment and control, and consequently acting on the risk of developing chronic complications. According to Algothani and colleagues [38], glycemic variability in children has a modulatory impact on the control of the counterregulatory response to hypoglycemia, leading to a loss in glucagon response to hypoglycemia in those with a higher glycemic index. In addition, glycemic variability seems to negatively impact quality of life scores (DQOL and DTSSQ) in patients with T1DM [32]. Both the fear of severe hypoglycemia and the negative repercussions on quality of life may lead the patient away from the intensive control of glycemia and thus facilitate the development of microvascular complications.

Among the limitations of the study, the number of individuals who had an assessment of oxidative stress markers, which was lower ($n = 40$) than the total number of volunteers in the study ($n = 90$), should be highlighted, since this may have minimized the ability to identify other correlations with oxidative stress markers.

The use of more than one technique for recording GV parameters may also be a limiting factor, since there are differences between the analysis of capillary glycemia and interstitial glucose [39, 40]. Although glucose levels may be very close at stable times, such as periods of fasting or before meals, rapid fluctuations in blood glucose concentration may not be reflected in interstitial measurement or occur over a longer time. However, since the individual determination of patient parameters was performed using only one of these methods, with the intention of characterizing a mean group parameter and not the inter-individual variability, the nature of the tool used to obtain this parameter was less relevant.

Finally, the presence of low to moderate intensity correlations between the various parameters evaluated reinforces the multifactorial nature that acts on cell membranes, consequently without the presence of a single factor with very strong correlation or isolated action on them. Certainly, independent factors for the development of chronic complications of diabetes should behave in a similar way.

5. Conclusion

The glycemic variability in type 1 diabetes, even under intensive treatment, is of great amplitude, well above that suggested as good control, and presents a direct correlation with glycated hemoglobin levels. It can be a tool in the identification of patients with a greater chance of not achieving the goals of good disease control.

As expected, the glycemic mean obtained from capillary glycemia showed a strong correlation with HbA1c, showing how much a parameter extracted from a glucose meter in a simple way can be useful. GV also showed a strong correlation with the glycemic mean and thus also the ability to predict the risks associated with higher mean blood glucose levels.

In the present study glycemic variability correlated with some parameters related to osmotic stability of erythrocytes and oxidative stress, reinforcing the potential role of these cells in the mechanisms that determine the chronic

complications of diabetes, since changes in membrane stability (increase in rigidity) of these cells may affect its functionality, resulting in a higher difficulty passing through microvessels, almost occluded by plaque or by a damaged endothelium, conditions commonly found in diabetes.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest. This study received financial support (APQ-03602-1) of the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais* (FAPEMIG) for the purchase of CGMS and its sensors, as well as kits used to measure oxidative stress. N. Penha-Silva was supported by a scientific productivity grant from “Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento” (CNPq).

Acknowledgments: The authors thank the patients and caregivers who participated in this study, the technicians of the Laboratory of Clinical Analyzes, the MDCC team and the collaborators of the Laboratory of Biophysical Chemistry (LaBFiQ) of the Institute of Genetics and Biochemistry of the Federal University of Uberlândia.

References

1. Chamberlain, J.J., et al., *Diagnosis and Management of Diabetes: Synopsis of the 2016 American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes*. Ann Intern Med, 2016. **164**(8): p. 542-52.
2. Atkinson, M.A. and G.S. Eisenbarth, *Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment*. Lancet, 2001. **358**(9277): p. 221-9.
3. Brownlee, M., *The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1615-25.
4. Kilpatrick, E.S., A.S. Rigby, and S.L. Atkin, *Effect of glucose variability on the long-term risk of microvascular complications in type 1 diabetes*. Diabetes Care, 2009. **32**(10): p. 1901-3.
5. Monnier, L., et al., *The effect of glucose variability on the risk of microvascular complications in type 1 diabetes*. Diabetes Care, 2007. **30**(1): p. 185-6; author reply 187-8.
6. Standl, E., O. Schnell, and A. Ceriello, *Postprandial hyperglycemia and glycemic variability: should we care?* Diabetes Care, 2011. **34 Suppl 2**: p. S120-7.
7. Monnier, L. and C. Colette, *Glycemic variability: should we and can we prevent it?* Diabetes Care, 2008. **31 Suppl 2**: p. S150-4.
8. Siegelaar, S.E., et al., *Glucose variability; does it matter?* Endocr Rev, 2010. **31**(2): p. 171-82.
9. Borg, R., et al., *Associations between features of glucose exposure and A1C: the A1C-Derived Average Glucose (ADAG) study*. Diabetes, 2010. **59**(7): p. 1585-90.
10. Kilpatrick, E.S., A.S. Rigby, and S.L. Atkin, *A1C variability and the risk of microvascular complications in type 1 diabetes: data from the Diabetes Control and Complications Trial*. Diabetes Care, 2008. **31**(11): p. 2198-202.
11. Hsu, W.T., et al., *Effects of diabetes duration and glycemic control on free radicals in children with type 1 diabetes mellitus*. Ann Clin Lab Sci, 2006. **36**(2): p. 174-8.
12. Lemos, G.S., et al., *Influence of glucose concentration on the membrane stability of human erythrocytes*. Cell Biochem Biophys, 2011. **61**(3): p. 531-7.
13. Service, F.J., *Glucose variability*. Diabetes, 2013. **62**(5): p. 1398-404.
14. Yagi, K., *Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine*. Adv Exp Med Biol, 1994. **366**: p. 1-15.
15. Bernardino Neto, M., et al., *Bivariate and multivariate analyses of the correlations between stability of the erythrocyte membrane, serum lipids and hematological variables*. Biorheology, 2013. **50**(5-6): p. 305-20.
16. Weber, C. and O. Schnell, *The assessment of glycemic variability and its impact on diabetes-related complications: an overview*. Diabetes Technol Ther, 2009. **11**(10): p. 623-33.
17. Bragd, J., et al., *Can glycaemic variability, as calculated from blood glucose self-monitoring, predict the development of complications in type 1 diabetes over a decade?* Diabetes Metab, 2008. **34**(6 Pt 1): p. 612-6.
18. DeVries, J.H., *Glucose variability: where it is important and how to measure it*. Diabetes, 2013. **62**(5): p. 1405-8.
19. McCall, A.L. and B.P. Kovatchev, *The median is not the only message: a clinician's perspective on mathematical analysis of glycemic variability and modeling in diabetes mellitus*. J Diabetes Sci Technol, 2009. **3**(1): p. 3-11.
20. Monnier, L., et al., *Toward Defining the Threshold Between Low and High Glucose Variability in Diabetes*. Diabetes Care, 2017. **40**(7): p. 832-838.
21. Maulucci G., et al., *Phase separation of the plasma membrane in human red blood cells as a potential tool for diagnosis and progression monitoring of type 1 diabetes mellitus*. PLoS One, 2017. **7**(12).
22. Rivelli, J.F., et al., *High glucose levels induce inhibition of Na,K-ATPase via stimulation of*

- aldose reductase, formation of microtubules and formation of an acetylated tubulin/Na,K-ATPase complex.* Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(8): p. 1203-13.
23. Hill, M.A. and J.M. Court, *Erythrocyte Membrane Fluidity in Type 1 Diabetes Mellitus.* Pathology, 1983. **15**(4): p. 449-451.
 24. Santos, M.I., et al., *[Causes and consequences of glycated hemoglobin variability on pediatric population].* Acta Med Port, 2011. **24**(6): p. 913-8.
 25. Uydu, H.A., et al., *The effects of atorvastatin therapy on rheological characteristics of erythrocyte membrane, serum lipid profile and oxidative status in patients with dyslipidemia.* J Membr Biol, 2012. **245**(11): p. 697-705.
 26. Ruia, S., et al., *Correlation of biomarkers thiobarbituric acid reactive substance, nitric oxide and central subfield and cube average thickness in diabetic retinopathy: a cross-sectional study.* Int J Retina Vitreous, 2016. **2**: p. 8.
 27. Jain, S.K., et al., *Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes.* Diabetes, 1989. **38**(12): p. 1539-43.
 28. Camargo, M.A.G., *Perfil do estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas, em Ribeirão Preto, SP, in Clínica médica.* 2015, Universidade de São Paulo - USP.
 29. Domínguez, C., et al., *Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents.* Diabetes Care, 1998. **21**(10): p. 1736-42.
 30. Rodrigues, T.C. and et al., *Characterization of patients with type 1 diabetes mellitus in southern Brazil : chronic complications and associated factors.* Revista da Associação Médica Brasileira, 2010. **56**(1): p. 67-73.
 31. Saudek, C.D. and J.C. Brick, *The clinical use of hemoglobin A1c.* J Diabetes Sci Technol, 2009. **3**(4): p. 629-34.
 32. Ayano-Takahara, S., et al., *Glycemic variability is associated with quality of life and treatment satisfaction in patients with type 1 diabetes.* Diabetes Care, 2015. **38**(1): p. e1-2.
 33. Zinman, B., *Glucose control in type 1 diabetes: from conventional to intensive therapy.* Clin Cornerstone, 1998. **1**(3): p. 29-38.
 34. Lachin, J.M., et al., *Update on cardiovascular outcomes at 30 years of the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study.* Diabetes Care, 2014. **37**(1): p. 39-43.
 35. Rabkin, R., et al., *Effect of renal disease on renal uptake and excretion of insulin in man.* N Engl J Med, 1970. **282**(4): p. 182-7.
 36. Snyder, R.W. and J.S. Berns, *Use of insulin and oral hypoglycemic medications in patients with diabetes mellitus and advanced kidney disease.* Semin Dial, 2004. **17**(5): p. 365-70.
 37. Astrup, A.S., et al., *Markers of endothelial dysfunction and inflammation in type 1 diabetic patients with or without diabetic nephropathy followed for 10 years: association with mortality and decline of glomerular filtration rate.* Diabetes Care, 2008. **31**(6): p. 1170-6.
 38. Alghothani, N. and K.M. Dungan, *The effect of glycemic variability on counterregulatory hormone responses to hypoglycemia in young children and adolescents with type 1 diabetes.* Diabetes Technol Ther, 2011. **13**(11): p. 1085-9.
 39. Bailey, T., et al., *The Performance and Usability of a Factory-Calibrated Flash Glucose Monitoring System.* Diabetes Technol Ther, 2015. **17**(11): p. 787-94.
 40. Tamborlane, W.V., et al., *Continuous glucose monitoring and intensive treatment of type 1 diabetes.* N Engl J Med, 2008. **359**(14): p. 1464-76.

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of volunteers with type 1 diabetes studied (n=90)*

Parameters	Values
Age (years)	26.1 ± 10.1
BMI (kg/m ²)	23 (20.7-25)
Duration of DM (years)	10 (6-15)
Insulin dose (UI)/kg	0.9 (0.7-1.1)
HbA _{1c} (%)	8.6 (7.7-9.8)
HbA _{1c} (mmol/mol)	69.5 (61.2-84.5)
eAG (mg/dL)	199 (175.7-236)
ΔHbA _{1c} (%)	1.0 (0.6-1.42)
DAG (mg/dl)	189 (157.5-232)
SDDAG (mg/dL)	94.2 ± 29.1
%CV	47.3 (40.1-53.8)
LBGI	1.9 (0.8-4.3)
HBGI	16.7 (9.9-25.8)
FPG (mg/dL)	171 ± 88.5
Total Cholesterol (mg/dL)	160.4 (16.7-188.6)
LDL Cholesterol (mg/dL)	88 (72-111)
HDL Cholesterol (mg/dL)	52.1 ± 16.6
Triglycerides (mg/dL)	83.9 (55.6-118.1)
Uric Acid (mg/dL)	3.9 (3.2-4.5)
TSH (mUI/mL)	2.44 (1.6-3.9)
Creatinine (mg/dL)	0.9 (0.73-1)
Albuminuria (mg/g Creatinine)	4.9 (2.1-11.4)

* The variables that were normally distributed are presented as mean ± SD and the variables that were non-normally distributed are presented as median (IQR).

Abbreviations: n, number of participants; BMI, body mass index; HbA_{1c}, glycated hemoglobin; ΔHbA_{1c}, variation of glycated hemoglobin; eAG, estimated average glucose; DAG, Daily Average Glucose; SDDAG, Standard Deviation of Daily Average Glucose; %CV, Coefficient of Variation of Daily Average Glucose; LBGI, low blood glucose index; HBGI, high blood glucose index; FPG, fasting plasma glucose; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; TSH, thyroid stimulating hormone.

Table 2. Markers of erythrocyte membrane stability, hematimetry and oxidative stress in volunteers with type 1 diabetes mellitus*

Variables	Total (n=90)	Male (n=52)	Female (n=38)	<i>p</i>
A_{max}	1.294 ± 0.17	1.4 ± 0.12	1.15 ± 0.14	<0.01
A_{min}	0.02 (0.01-0.03)	0.02 (0.01-0.03)	0.02 (0.01-0.02)	0.54
H_0	0.41 (0.39-0.43)	0.41 (0.38-0.43)	0.41 (0.39-0.43)	0.61
H_{50}	0.44 (0.42-0.46)	0.43 (0.43-0.46)	0.44 (0.43 -0.46)	0.85
$1/H_{50}$	2.3 ± 0.17	2.27 ± 0.1	2.27 ± 0.1	0.24
H_{100}	0.46 (0.45-0.49)	0.47 (0.46-0.48)	0.47 (0.46-0.48)	0.32
dX	0.01 [0.01-0.02]	0.01 (0.01-0.02)	0.01 (0.01-0.02)	0.27
RBC	5.01 ± 0.47	5.2 ± 0.36	4.5 ± 0.37	<0.01
Ht	43.3 ± 3.7	45.2 ± 2.48	39.8 ± 3.6	<0.01
Hb	14.8 ± 1,4	15.6 ± 1.01	13.4 ± 1.07	<0.01
RDW	13 (12.6-13.4)	13.0 (12.6-13.5)	13.1 (12.4-13.4)	0.31
MCH	29.8 ± 1.8	29.8 ± 1.8	29.7 ± 2.02	0.84
MCHC	34.1 ± 1.2	34.4 ± 1.06	33.7 ± 1.3	0.79
MCV	87.4 (83.5-89.6)	87 (83.9-88)	87.1 (83.5-92.8)	0.45
Rtc	1.15 (0.8-1.6)	1.1 (0.7-1.5)	1.2 (0.8-1.8)	0.59
Iron	87.4 ± 26.5	93.4 ± 26.1	76.4 ± 29.7	<0.01
TBARS	2.31 (1.6-2.7)	2.3 (1.6-2.6)	2.4 (1.4-3.6)	0.70
GR	187.8 (28.8-282.5)	195.8 (29.1- 284.1)	135.3 (26.2-336.6)	0.55

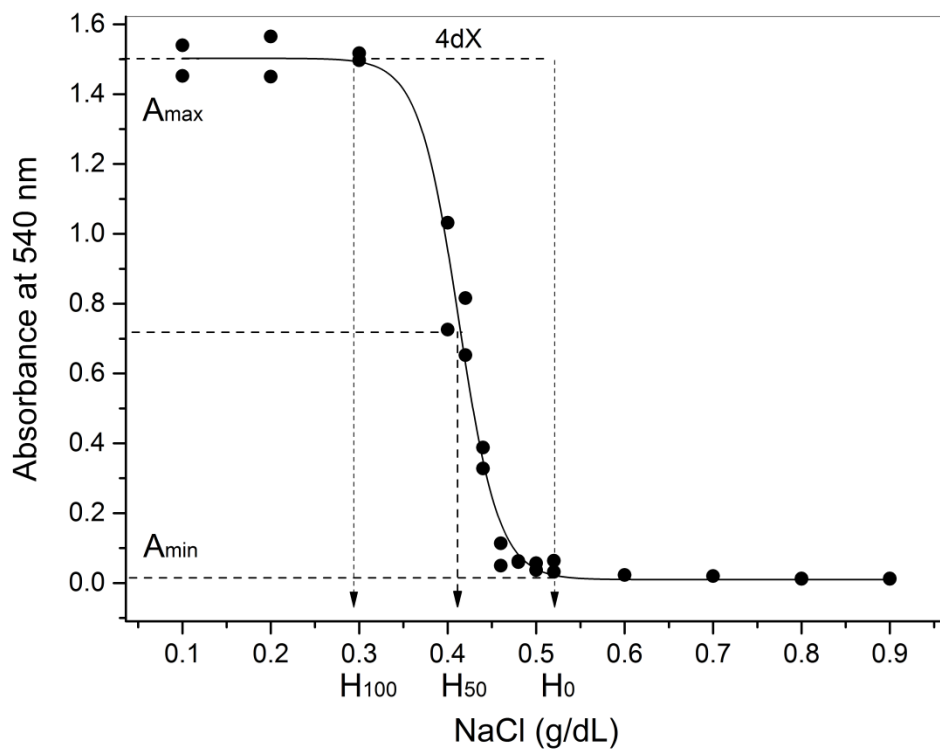
*The variables that were normally distributed are presented as mean ± SD and the variables that were non-normally distributed are presented as median (IQR).

Abbreviations: RBC, erythrocytes; Ht, hematocrit; Hb, hemoglobin; RDW, red cell distribution width; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; Rtc, reticulocytes; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; GR, glutathione reductase.

Table 3. Comparison of parameters of oxidative stress and membrane stability between subgroups of lower and higher glycemc variability (SD_{DAG} , %CV and $\Delta HbA1c$)

Variables	SD_{DAG} (md/dL)		%CV (%)		$\Delta HbA1c$ (%)	
	Q1	Q3	Q1	Q3	Q1	Q3
GSH	44.1	253.1	27.54	218.1	143.2	286.5
TBARS	2.43	2.23	2.28	2.49	1.64	2.51
H50	0.44	0.43	0.44	0.43	0.43	0.44
dX	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02
dX/H50	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.04
dX/Amin	0.64	0.82	0.65	0.65	0.65	0.65
H100	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.47
H0	0.42	0.40	0.42	0.40	0.40	0.41
Amax	1.31	1.28	1.27	1.38	1.37	1.16
Amin	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02

[§] $p < 0.05$ and $*0.05 < p < 0.1$ indicate, respectively, statistically significant and borderline differences between quartiles (Wilcoxon rank sum test). Q1 and Q3 indicate, respectively, the lowest and the highest quartile of the variables studied.



Referências

ARMSTRONG, A. C. et al. Association of Cardiovascular Risk Factors and Myocardial Fibrosis With Early Cardiac Dysfunction in Type 1 Diabetes: The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study. **Diabetes Care**, v. 40, n. 3, p. 405-411, Mar 2017. <https://doi.org/10.2337/dc16-1889>

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet**, v. 358, n. 9277, p. 221-9, Jul 2001. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05415-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05415-0)

AYANO-TAKAHARA, S. et al. Glycemic variability is associated with quality of life and treatment satisfaction in patients with type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 38, n. 1, p. e1-2, Jan 2015. <https://doi.org/10.2337/dc14-1801>

BOMMER, C. et al. The global economic burden of diabetes in adults aged 20-79 years: a cost-of-illness study. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 5, n. 6, p. 423-430, Jun 2017. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(17\)30097-9](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(17)30097-9)

BRAGD, J. et al. Can glycaemic variability, as calculated from blood glucose self-monitoring, predict the development of complications in type 1 diabetes over a decade? **Diabetes Metab**, v. 34, n. 6 Pt 1, p. 612-6, Dec 2008.

BRAZEAU, A. S. et al. Carbohydrate counting accuracy and blood glucose variability in adults with type 1 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 99, n. 1, p. 19-23, Jan 2013. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2012.10.024>

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615-25, Jun 2005. ISSN 0012-1797.

BUCKINGHAM, B. A. et al. Erratum. Predictive Low-Glucose Insulin Suspension Reduces Duration of Nocturnal Hypoglycemia in Children Without Increasing Ketosis. *Diabetes Care* 2015;38:1197-1204. **Diabetes Care**, v. 38, n. 9, p. 1813, Sep 2015. <https://doi.org/10.2337/dc15-er09>

BUSE, J. B. et al. Effects of sensor-augmented pump therapy on glycemic variability in well-controlled type 1 diabetes in the STAR 3 study. **Diabetes Technol Ther**, v. 14, n. 7, p. 644-7, Jul 2012. <https://doi.org/10.1089/dia.2011.0294>

CERIELLO, A. Point: postprandial glucose levels are a clinically important treatment target. **Diabetes Care**, v. 33, n. 8, p. 1905-7, Aug 2010.

<https://doi.org/10.2337/dc10-0634>

CERIELLO, A.; IHNAT, M. Oxidative stress is, convincingly, the mediator of the dangerous effects of glucose variability. **Diabet Med**, v. 27, n. 8, p. 968, Aug 2010.

CHABANEL, A. et al. Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. **Biophys J**, v. 44, n. 2, p. 171-6, Nov 1983.

[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(83\)84288-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(83)84288-X)

CHAMBERLAIN, J. J. et al. Diagnosis and Management of Diabetes: Synopsis of the 2016 American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes.

Ann Intern Med, v. 164, n. 8, p. 542-52, Apr 2016. <https://doi.org/10.7326/M15-3016>

CHERNEY, D. Z. et al. The acute effect of clamped hyperglycemia on the urinary excretion of inflammatory cytokines/chemokines in uncomplicated type 1 diabetes: a pilot study. **Diabetes Care**, v. 34, n. 1, p. 177-80, Jan 2011.

<https://doi.org/10.2337/dc10-1219>

COOPER, R. A. Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. **New England Journal of Medicine**, v. 297 n. 7, p. 371-377, 1977.

<https://doi.org/10.1056/NEJM197708182970707>

DE ARVELOS, L. R. et al. Bivariate and multivariate analyses of the influence of blood variables of patients submitted to Roux-en-Y gastric bypass on the stability of erythrocyte membrane against the chaotropic action of ethanol. **J Membr Biol**, v. 246, n. 3, p. 231-42, Mar 2013.

<https://doi.org/10.1007/s00232-013-9524-0>

DE CAMPOS; AL., J. J. B. E. Incidência de Diabetes Mellitus Insuline Dependente (Tipo 1) na Cidade de Londrina, PR-Brasil. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 42, n. 1, p. 37, 1998.

DE FREITAS, M. V. et al. Influence of age on the correlations of hematological and biochemical variables with the stability of erythrocyte membrane in relation to sodium dodecyl sulfate. **Hematology**, v. 19, n. 7, p. 424-30, Oct 2014.

<https://doi.org/10.1179/1607845413Y.0000000145>

DEVRIES, J. H. Glucose variability: where it is important and how to measure it.

Diabetes, v. 62, n. 5, p. 1405-8, May 2013. <https://doi.org/10.2337/db12-1610>

EISENBARTH, G. S. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. **N Engl J Med**, v. 314, n. 21, p. 1360-8, May 1986.

<https://doi.org/10.1056/NEJM198605223142106>

_____. Banting Lecture 2009: An unfinished journey: molecular pathogenesis to prevention of type 1A diabetes. **Diabetes**, v. 59, n. 4, p. 759-74, Apr 2010.

<https://doi.org/10.2337/db09-1855>

EVERT, A. B. E. A. Nutrition therapy recommendations for the management of adults with diabetes. . **Diabetes care**, v. 37, n. S 1, p. S 120- S 143, 2014.

FERREIRA, S. R. E. A. Population-based incidence of IDDM in the state of São Paulo, Brazil. **Diabetes Care**, v. 16, n. 5, p. 701-704, 1993, v. 16, n. 5, p. 701-704, 1993.

GARVEY, K.; WOLFSDORF, J. I. The Impact of Technology on Current Diabetes Management. **Pediatr Clin North Am**, v. 62, n. 4, p. 873-88, Aug 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.pcl.2015.04.005>

GRUNBERGER, G. E. A. Consensus statement by the American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology insulin pump management task force. **Endocrine Practice**, v. 20, n. 5, p. 463-489, 2014.

<https://doi.org/10.4158/EP14145.PS>

GUBITOSI-KLUG, R. A. et al. Risk of Severe Hypoglycemia in Type 1 Diabetes Over 30 Years of Follow-up in the DCCT/EDIC Study. **Diabetes Care**, v. 40, n. 8, p. 1010-1016, Aug 2017 <https://doi.org/10.2337/dc16-2723>

HAHR, A. J.; MOLITCH, M. E. Optimizing insulin therapy in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus: optimal dosing and timing in the outpatient setting. **Dis Mon**, v. 56, n. 3, p. 148-62, Mar 2010. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2009.12.009>

HSU, W. T. et al. Effects of diabetes duration and glycemic control on free radicals in children with type 1 diabetes mellitus. **Ann Clin Lab Sci**, v. 36, n. 2, p. 174-8, 2006.

IDF DIABETES ATLAS GROUP. Update of mortality attributable to diabetes for the IDF Diabetes Atlas: Estimates for the year 2013. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 109, n. 3, p. 461-5, Sep 2015. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2015.05.037>

INSEL, R. A. et al. Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 38, n. 10, p. 1964-74, Oct 2015. <https://doi.org/10.2337/dc15-1419>

JAIN, S. K. et al. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. **Diabetes**, v. 38, n. 12, p. 1539-43, Dec 1989. <https://doi.org/10.2337/diabetes.38.12.1539>

JENKINS, A. J. et al. Evaluation of an algorithm to guide patients with type 1 diabetes treated with continuous subcutaneous insulin infusion on how to respond to real-time continuous glucose levels: a randomized controlled trial. **Diabetes Care**, v. 33, n. 6, p. 1242-8, Jun 2010. <https://doi.org/10.2337/dc09-1481>

KOTER, M. et al. Damage to the structure of erythrocyte plasma membranes in patients with type-2 hypercholesterolemia. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 2, p. 205-15, Feb 2004. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00195-X](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00195-X)

LEMOS, G. S. et al. Influence of glucose concentration on the membrane stability of human erythrocytes. **Cell Biochem Biophys**, v. 61, n. 3, p. 531-7, Dec 2011. <https://doi.org/10.1007/s12013-011-9235-z>

MARTINEZ, M. et al. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on red blood cell membrane lipids and haemorheological parameters, in patients affected by familial hypercholesterolemia. **Haemostasis**, v. 26 Suppl 4, p. 171-6, Oct 1996. <https://doi.org/10.1159/000217295>

MONNIER, L.; COLETTE, C. Glycemic variability: should we and can we prevent it? **Diabetes Care**, v. 31 Suppl 2, p. S150-4, Feb 2008. <https://doi.org/10.2337/dc08-s241>

MONNIER, L. et al. The effect of glucose variability on the risk of microvascular complications in type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 30, n. 1, p. 185-6; author reply 187-8, Jan 2007. <https://doi.org/10.2337/dc06-1594>

MURRAY, R. K. E. A. **Harper's Illustrated Biochemistry**. Twenty, 2003.

NICOLSON, G. L.; SINGER, S. J. Electron microscopic localization of macromolecules on membrane surfaces. **Ann N Y Acad Sci**, v. 195, p. 368-75, Jun 1972. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1972.tb54817.x>

OGURTSOVA, K. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 128, p. 40-50, Jun 2017. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.03.024>

PENHA-SILVA, N. et al. Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. **Bioelectrochemistry**, v. 73, n. 1, p. 23-9, Jun 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2008.04.002>

PENHA-SILVA, N. et al. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. **Mech Ageing Dev**, v. 128, n. 7-8, p. 444-9, 2007 Jul-Aug 2007.

PITSILLIDES, A. N.; ANDERSON, S. M.; KOVATCHEV, B. Hypoglycemia risk and glucose variability indices derived from routine self-monitoring of blood glucose are related to laboratory measures of insulin sensitivity and epinephrine counterregulation. **Diabetes Technol Ther**, v. 13, n. 1, p. 11-7, Jan 2011. <https://doi.org/10.1089/dia.2010.0103>

SBD, Ed. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**: AC Pharmaceuticals, p.400, 3 ed. 2009.

SCHICK, B. P.; SCHICK, P. K. The effect of hypercholesterolemia on guinea pig platelets, erythrocytes and megakaryocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 833, n. 2, p. 291-302, 1985. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(85\)90201-2](https://doi.org/10.1016/0005-2760(85)90201-2)

SIEGELAAR, S. E. et al. Glucose variability; does it matter? **Endocr Rev**, v. 31, n. 2, p. 171-82, Apr 2010. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0021>

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 720-31, Feb 1972. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>

STANDL, E.; SCHNELL, O.; CERIELLO, A. Postprandial hyperglycemia and glycemic variability: should we care? **Diabetes Care**, v. 34 Suppl 2, p. S120-7, May 2011. <https://doi.org/10.2337/dc11-s206>

STEFFES, M. et al. Hemoglobin A1c measurements over nearly two decades: sustaining comparable values throughout the Diabetes Control and Complications Trial and the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications study. **Clin Chem**, v. 51, n. 4, p. 753-8, Apr 2005. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.042143>

SWIFT, P. G. E. A. ISPAD clinical practice consensus guidelines 2006-2007. Diabetes education. **Pediatric diabetes**, v. 8, n. 2, p. 103, 2007, v. 8, n. 2, p. 103, 2007.

TANDON, N. Understanding type 1 diabetes through genetics: Advances and prospects. **Indian J Endocrinol Metab**, v. 19, n. Suppl 1, p. S39-43, Apr 2015.

WEBER, C.; SCHNELL, O. The assessment of glycemic variability and its impact on diabetes-related complications: an overview. **Diabetes Technol Ther**, v. 11, n. 10, p. 623-33, Oct 2009. <https://doi.org/10.1089/dia.2009.0043>

WOLFSDORF, J. I. et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. Diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar state. **Pediatr Diabetes**, v. 15 Suppl 20, p. 154-79, Sep 2014. <https://doi.org/10.1111/pedi.12165>

ZIEGLER, A. G. et al. Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. **JAMA**, v. 309, n. 23, p. 2473-9, Jun 2013. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.6285>

ZIEGLER, R. et al. Frequency of SMBG correlates with HbA1c and acute complications in children and adolescents with type 1 diabetes. **Pediatr Diabetes**, v. 12, n. 1, p. 11-7, Feb 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5448.2010.00650.x>

ZINMAN, B. Glucose control in type 1 diabetes: from conventional to intensive therapy. **Clin Cornerstone**, v. 1, n. 3, p. 29-38, 1998. [https://doi.org/10.1016/S1098-3597\(98\)90016-3](https://doi.org/10.1016/S1098-3597(98)90016-3)

ANEXO 1
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GLICÊMICA EM PACIENTES PORTADORES DE DIABETES MELITO TIPO 1 E SEU IMPACTO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E A ESTABILIDADE DE MEMBRANA ERITROCITÁRIA, sob a responsabilidade dos pesquisadores: Ricardo Rodrigues, Nilson Penha-Silva e Paulo Tannus Jorge.

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender - o padrão da variabilidade da glicose nos pacientes diabéticos tipo 1 e estudar o impacto desta variabilidade na membrana das células e nos níveis de marcadores de estresse oxidativo, avaliando possíveis diferenças entre pacientes com maior e menor grau de variabilidade glicêmica sobre estes aspectos. Para determinação destes parâmetros será realizada coleta de sangue (através de uma punção venosa) e uma amostra de urina. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pelo pesquisador Ricardo Rodrigues, no momento de atendimento ambulatorial do paciente, no HC-UFU ou CMAD (instituição onde ele esta sendo acompanhado). Na sua participação você será submetido a uma entrevista no consultório com o pesquisador para obtenção de dados pertinentes a pesquisa e instalação do sensor de glicose no tecido subcutâneo da região de abdômen ou braço ou perna (realizado pelo pesquisador Ricardo Rodrigues) através de técnica segura e amplamente já realizada pelo pesquisador e com a utilização de um dispositivo instalador próprio, para leitura dos níveis de glicose, pelo período de 3 a 5 dias (tempo recomendado de permanência do sensor no local). Também será realizada a coleta de uma amostra sanguínea (5 ml) por punção venosa (veia em região cubital – braço) e coleta de amostra de urina (meio do jato urinário). Os dados obtidos destes procedimentos serão analisados pela equipe de pesquisa. Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa. Os riscos consistem em ocorrência de hematoma em local de punção venosa e do local de instalação do sensor e reação alérgica no local (pele) devido ao adesivo para fixação do sensor (ambas raras). Os benefícios serão conhecer melhor seus níveis de glicose e a partir disto obter melhor controle da doença. Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com: Ricardo Rodrigues (telefone 3218-2119, Hospital de Clínicas da UFU e/ou telefone 3219-0811, no Centro Municipal de Atenção ao Diabético), Paulo Tannus Jorge (telefone 3218-2119, FAMED-UFU), Nilson Penha-Silva (telefone 3225-8536, ramal 23, no INGEB-UFU). Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos da Universidade Federal de Uberlândia, situado à Av. João Naves de Ávila, número 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica, Uberlândia, MG, CEP 38408-100; telefone 34-3239-4131.

Uberlândia, ____ de _____ de _____

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa

ANEXO 2
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (responsável legal)

Prezado (a) senhor (a), o (a) menor, pelo qual o (a) senhor (a) é responsável, está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada: AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GLICÊMICA EM PACIENTES PORTADORES DE DIABETES MELITO TIPO 1 E SEU IMPACTO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E A ESTABILIDADE DE MEMBRANA ERITROCITÁRIA, sob a responsabilidade dos pesquisadores: Ricardo Rodrigues, Paulo Tannus Jorge, Nilson Penha-Silva.

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender o padrão da variabilidade da glicose nos pacientes diabéticos tipo 1 e estudar o impacto desta variabilidade na membrana das células e nos níveis de marcadores de estresse oxidativo, avaliando possíveis diferenças entre pacientes com maior e menor grau de variabilidade glicêmica sobre estes aspectos. Para determinação destes parâmetros será realizada coleta de sangue (através de uma punção venosa) e uma amostra de urina. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pelo pesquisador O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pelo pesquisador Ricardo Rodrigues, no momento de atendimento ambulatorial do paciente, no HC–UFU ou CMAD (instituição onde ele esta sendo acompanhado). Na participação do (a) menor, ele (a) será submetido a uma entrevista no consultório com o pesquisador para obtenção de dados pertinentes a pesquisa e instalação do sensor de glicose no tecido subcutâneo da região de abdômen ou braço ou perna (realizado pelo pesquisador Ricardo Rodrigues) através de técnica segura e amplamente já realizada pelo pesquisador e com a utilização de um dispositivo instalador próprio, para leitura dos níveis de glicose, pelo período de 3 a 5 dias (tempo recomendado de permanência do sensor no local). Também será realizada a coleta de uma amostra sanguínea (5 ml) por punção venosa (veia em região cubital –braço) e coleta de amostra de urina (meio do jato urinário). Os dados obtidos destes procedimentos serão analisados pela equipe de pesquisa. Em nenhum momento o (a) menor será identificado (a). Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. O (A) menor não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa. Os riscos, da participação do (a) menor na pesquisa, consistem em ocorrência de hematoma em local de punção venosa e do local de instalação do sensor e reação alérgica no local (pele) devido ao adesivo para fixação do sensor (ambas raras). Os benefícios serão conhecer melhor seus níveis de glicose e a partir disto obter melhor controle da doença. O (A) menor é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o (a) senhor (a), responsável legal pelo (a) menor. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, o (a) senhor (a), responsável legal pelo(a) menor, poderá entrar em contato com: Ricardo Rodrigues (telefone 3218-2119, no Hospital de Clínicas da UFU e/ou telefone 3219-0811, no Centro Municipal de Atenção ao Diabético), Paulo Tannus Jorge (telefone 3218-2119, na FAMED-UFU) e Nilson Penha-Silva (telefone 3225-8436, ramal 23, no INGEB-UFU). Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos da Universidade Federal de Uberlândia, situado à Av. João Naves de Ávila, número 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica, Uberlândia, MG, CEP 38408-100; telefone: 34-3239-4131.

Uberlândia, _____ de _____ de 201__

Assinatura dos pesquisadores

Eu, responsável legal pelo (a) menor _____, consinto na sua participação no projeto citado acima, caso ele(a) deseje, após ter sido devidamente esclarecido.

Responsável pelo (a) menor participante da pesquisa

ANEXO 3

TERMO DE ESCLARECIMENTO DO MENOR

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada “AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GLICÊMICA EM PACIENTES PORTADORES DE DIABETES MELITO TIPO 1 E SEU IMPACTO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E A ESTABILIDADE DE MEMBRANA ERITROCITÁRIA”, sob a responsabilidade dos pesquisadores: Ricardo Rodrigues, Paulo Tannus Jorge e Nilson Penha-Silva.

Nesta pesquisa nós estamos buscando Nesta pesquisa nós estamos buscando entender o padrão da variabilidade da glicose nos pacientes diabéticos tipo 1 e estudar o impacto desta variabilidade na membrana das células e nos níveis de marcadores de estresse oxidativo, avaliando possíveis diferenças entre pacientes com maior e menor grau de variabilidade glicêmica sobre estes aspectos. Para determinação destes parâmetros será realizada coleta de sangue (através de uma punção venosa) e uma amostra de urina. Na sua participação você será submetido a uma entrevista no consultório com o pesquisador para obtenção de dados pertinentes a pesquisa e instalação do sensor de glicose no tecido subcutâneo da região de abdômen ou braço ou perna (realizado pelo pesquisador Ricardo Rodrigues) através de técnica segura e amplamente já realizada pelo pesquisador e com a utilização de um dispositivo instalador próprio, para leitura dos níveis de glicose, pelo período de 3 a 5 dias (tempo recomendado de permanência do sensor no local). Também será realizada a coleta de uma amostra sanguínea (5 ml) por punção venosa (veia em região cubital – braço) e coleta de amostra de urina (meio do jato urinário). Os dados obtidos destes procedimentos serão analisados pela equipe de pesquisa. Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa. Os riscos consistem em ocorrência de hematoma em local de punção venosa e do local de instalação do sensor e reação alérgica no local (pele) devido ao adesivo para fixação do sensor (ambas raras). Os benefícios serão conhecer melhor seus níveis de glicose e a partir disto obter melhor controle da doença. Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Mesmo seu responsável legal tendo consentido na sua participação na pesquisa, você não é obrigado a participar da mesma se não desejar. Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Uma via original deste Termo de Esclarecimento ficará com você. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com: Ricardo Rodrigues (telefone 3218-2119, no Hospital de Clínicas da UFU e/ou telefone ou 3219-0811, no Centro Municipal de Atenção ao Diabético), Paulo Tannus Jorge (telefone 3218-2119, na FAMED-UFU), Nilson Penha-Silva (telefone 3225-8436, ramal 23, no INGEB-UFU). Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos da Universidade Federal de Uberlândia, situado à Av. João Naves de Ávila, número 2121, bloco A, sala 224, no Campus Santa Mônica, em Uberlândia, MG, CEP: 38408-100; telefone 34-32394131.

Uberlândia, _____ de _____ de 201__

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa