BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Dados: 1391783

DBDCA: 26539

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas e Toxicológicas

Terminal OK

**DETERMINAÇÃO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE
ELETRONEGATIVA (LDL) E ANTICORPOS ANTI-LDL EM
INDIVÍDUOS INTOLERANTES À GLICOSE E DIABÉTICOS**

Elaine Apolinário

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador: Dra. Dulcineia S. P. Abdalla

São Paulo
2004

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas e Toxicológicas

**DETERMINAÇÃO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE
ELETRONEGATIVA (LDL⁻) E ANTICORPOS ANTI-LDL⁻ EM
INDIVÍDUOS INTOLERANTES À GLICOSE E DIABÉTICOS**

Elaine Apolinario

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador: Dra. Dulcineia S. P. Abdalla

São Paulo
2004

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005985

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

A643d Apolinario, Elaine
Determinação da lipoproteína de baixa densidade eletronegativa (LDL⁻) e anticorpos anti-LDL⁻ em indivíduos intolerantes à glicose e diabéticos / Elaine Apolinario. -- São Paulo, 2004.
98p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Abdalla, Dulcineia Saes Parra

I. Lipídio : Bioquímica clínica 2. Bioquímica clínica : Medicina
I. T. II. Abdalla, Dulcineia Saes Parra, orientador.

616.0756 CDD

Elaine Apolinário

**DETERMINAÇÃO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE
ELETRONEGATIVA (LDL⁻) E ANTICORPOS ANTI-LDL⁻ EM INDIVÍDUOS
INTOLERANTES À GLICOSE E DIABÉTICOS**

**Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

**Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla
orientador/presidente**

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	4
LISTA DE TABELAS.....	5
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	6
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Oxidação da LDL.....	10
1.2 Subfrações da LDL.....	11
1.3 LDL eletronegativa.....	12
1.4. Diabetes Mellituse Intolerância à Glicose.....	14
1.5. Oxidação da LDL e Diabetes.....	17
1.6 Anticorpos anti-LDL e Diabetes.....	18
2. OBJETIVO.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Pacientes.....	23
3.2 Dados dos Pacientes.....	23
3.3 Coleta.....	24
3.4 Purificação da LDL ⁻	24
3.5 Análises Bioquímicas.....	24
3.6 Isolamento da LDL⁻.....	25
3.7 Caracterização do Antígeno Isolado (LDL⁻)	25
3.7.1 Determinação de Proteínas Totais.....	25
3.7.2 SDS-PAGE.....	26
3.7.3 Preparo das Placas.....	26

3.7.4	Preparo das Amostras e do Padrão de Peso Molecular.....	26
3.7.5	Eletroforese em gel de Poliacrilamida.....	27
3.8	Determinação de anticorpos anti-LDL. eletronegativa.....	27
3.9	Detecção de LDL Eletronegativa no Plasma.....	28
3.10	Análise Estatística.....	29
4.	RESULTADOS E COMENTÁRIOS.....	30
5	DISCUSSÃO.....	45
6	CONCLUSÃO.....	52
7.	ANEXOS.....	53
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Determinação da glicose nos grupos estudados	32
Figura 2	Determinação de Hb-glicada	33
Figura 3	Determinação de Frutosamina	34
Figura 4	Determinação de Anticorpos IgG Anti-LDL eletronegativa	36
Figura 5	Determinação de Anticorpos IgG e IgM Anti-LDL eletronegativa no diabetes	37
Figura 6	Anticorpos IgG Anti-LDL eletronegativa no grupo DM1 em relação à concentração de HbG (Hemoglobina glicada)	38
Figura 7	Anticorpos IgG Anti-LDL eletronegativa e uso de insulina e hipoglicemiantes orais	39
Figura 8	Detecção de LDL eletronegativa	41
Figura 9	Correlação entre as concentrações de LDL eletronegativa, colesterol total e triglicerídeos	42
Figura10	LDL eletronegativa no grupo DM1 relacionada aos valores de HbG (Hemoglobina glicada)	43
Figura11	LDL eletronegativa em relação ao uso de insulina e hipoglicemiantes orais	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Idade e Sexo dos indivíduos dos grupos estudados	23
Tabela 2	Determinação do perfil lipídico nos grupos estudados.	30
Tabela 3	Determinação da glicose nos grupos estudados	31
Tabela 4	Medidas-resumo dos parâmetros lipídicos dos pacientes.	54
Tabela 5	Medidas-resumo dos parâmetros lipídicos dos pacientes.	55
Tabela 6	Medidas-resumo dos parâmetros glicêmicos dos pacientes	56
Tabela 7	Medidas-resumo dos parâmetros glicêmicos dos pacientes	57
Tabela 8	Medidas-resumo da Idade, Tempo de doença e IMC dos pacientes	58
Tabela 9	Medidas-resumo da Idade, Tempo de doença e IMC dos pacientes	59
Tabela 10	Medidas-resumo do LDL e Ac dos pacientes.	60
Tabela 11	Medidas-resumo do LDL e Ac dos pacientes.	61
Tabela 12	Matriz das estimativas dos coeficientes de correlação linear de Pearson no grupo controle	62
Tabela 13	Matriz das estimativas dos coeficientes de correlação linear de Pearson no Grupo DM1	63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS: 2,2'-azino-bis (ácido 3-etil benzotiazolino-6-sulfônico)

Ac Anticorpo

ApoB: apolipoproteína B

BHT: hidroxitolueno butilado

C: controle

c-HDL: colesterol-HDL

c-LDL: colesterol-LDL

c-VLDL: colesterol-VLDL

DAC: doença arterial coronária

DM 1: Diabetes Mellitus Tipo 1

DM 2: Diabetes Mellitus Tipo 2

DMSO: dimetil sulfóxido

EDTA: ácido etileno-diaminotetracético

ERO: espécies reativas do oxigênio

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HO· : radical hidroxila

HbG: hemoglobina glicada

IFN-γ: interferon γ

INT. : Intolerante a glicose

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LDL⁻: lipoproteína de baixa densidade eletronegativa

MDA: malondialdeído

MHC-II: complexo de histocompatibilidade principal-II

MM-LDL: lipoproteína de baixa densidade minimamente modificada

nLDL: lipoproteína de baixa densidade nativa

$\cdot$ NO: óxido nítrico

$O_2^{\cdot -}$: ânion superóxido

ONOO $\cdot$: peroxinitrito

Ox-LDL: lipoproteína de baixa densidade oxidada

PBS: salina tamponada-fosfato

PMSF: fenilmetil sulfonil fluoreto

SOD: enzima superóxido dismutase

TBS: salina tamponada-TRIS

TNF-: fator de necrose tumoral-

TRIS: (hidroximetil) aminometano

VCAM: molécula de adesão da célula vascular

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade

RESUMO

A LDL eletronegativa (LDL⁻) é uma subfração da LDL, modificada *in vivo*, constituída por partículas com maior carga negativa superficial, concentrações mais elevadas de lipídeos oxidados (hidroperóxidos e óxidos de colesterol) e menores teores de antioxidantes lipossolúveis, quando comparadas às da subfração LDL nativa. Neste estudo analisou-se as concentrações da LDL⁻ e de anticorpos das classes IgG e IgM, reativos a esta subfração, no plasma de indivíduos diabéticos dos tipos 1 e 2, intolerantes à glicose e normoglicêmicos. Constatou-se aumento da LDL⁻ e dos anticorpos anti-LDL⁻ das classes IgG e IgM nos diabéticos e nos intolerantes à glicose, quando comparados aos indivíduos normoglicêmicos. Os indivíduos diabéticos com concentrações de hemoglobina glicada superiores ao limite da faixa de referência apresentaram concentrações mais elevadas de LDL⁻, o que indica a importância do controle glicêmico para prevenir a formação endógena da LDL modificada. Considerando-se que a modificação oxidativa das lipoproteínas, em especial da LDL, tem um papel importante na fisiopatologia da aterosclerose, a LDL eletronegativa poderia ser utilizada como um marcador auxiliar para avaliar complicações cardiovasculares em pacientes diabéticos.

ABSTRACT

Electronegative LDL (LDL⁻) is an *in vivo* modified subfraction of LDL formed by particles with increased superficial negative charge, higher amount of oxidized lipids, mainly lipid hydroperoxides and cholesterol oxides and lower content of lipid soluble antioxidants in comparison to those of native LDL subfraction. In this study, the concentration of LDL⁻ and IgG and IgM antibodies reactive to this subfraction were evaluated in plasma of type 1 and type 2 diabetics, individuals with glucose intolerance and normoglycemics. The results show an increase of LDL⁻ and of IgG and IgM antibodies reactive to LDL⁻ in diabetic patients and in individual with glucose intolerance in comparison to the normoglycemic controls. Diabetic patients with glycated hemoglobin levels higher than the high reference limit showed higher LDL⁻ concentration than those with glycated hemoglobin within the reference range. This indicates that glycemic control is important to prevent *in vivo* modification of LDL. Considering that the oxidative modification of lipoproteins, in particular that of LDL, has an important role in pathophysiology of atherosclerosis, it can be suggested that LDL⁻ levels could be helpful to monitor cardiovascular complications in diabetic patients.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Oxidação da LDL

A elevada oxidabilidade da lipoproteína de baixa densidade (LDL), observada em pacientes com diabetes mellitus, hipercolesterolemia e fumantes demonstra que processos oxidativos, que modificam as lipoproteínas, podem ser considerados como um fator de risco adicional para o desenvolvimento da aterosclerose (Regstrom et al., 1992). A detecção da LDL oxidada (Palinski et al., 1990; Esterbauer et al., 1992; Virella et al., 1993) e de autoanticorpos anti-LDL oxidada nas lesões ateroscleróticas (Prat et al., 1993, Yla-Hertuala et al., 1994), tem confirmado a presença de lipoproteínas oxidadas na circulação e a participação do sistema imunológico no processo da aterosclerose. Sabe-se que monócitos/macrófagos na presença de lipoproteínas modificadas oxidativamente aumentam a expressão de receptores *scavenger* (Brown et al., 1980) e/ou receptores para a fração Fc das imunoglobulinas (Stanton et al., 1992), o que permite a captação de partículas ricas em ésteres de colesterol, através de um processo não controlado por *feed-back* negativo, dando origem às células espumosas (*foam cells*).

A LDL modificada oxidativamente apresenta diversas alterações físico-químicas (Hodis et al., 1994; Demuth et al. 1996 e Sevanian et al., 1997), quando comparada com a LDL nativa, tais como:

- Aumento da carga negativa, densidade e mobilidade eletroforética
- Captação por receptores *scavenger*
- Diminuição da captação por receptores B/E
- Diminuição dos antioxidantes
- Diminuição de ácidos graxos poliinsaturados
- Aumento dos produtos de oxidação do colesterol

- Hidrólise da fosfatidilcolina à lisofosfatidilcolina
- Aumento da formação de aldeídos
- Fragmentação da Apo B
- Perda de lisina, histidina e prolina
- Aumento da fluorescência da apoproteína
- Formação de quinureninas derivadas da oxidação do triptofano
- Formação de material semelhante ao ceróide
- Alterações de propriedades imunológicas
- Formação de hidroperóxidos lipídicos
- Presença de material semelhante aos prostanóides
- Imunogenicidade (formação de autoanticorpos)

1.2 Subfrações da LDL

A fração LDL é composta por subpopulações de partículas heterogêneas quanto ao seu conteúdo lipídico, tamanho e densidade, podendo ser subdividida em três grandes categorias, em relação à densidade: a fração mais densa ou pesada (1,042g/mL), a menos densa ou leve (1,026g/mL) e a intermediária (1,030g/mL) (Austin et al., 1988). Estudos *in vivo* têm demonstrado uma associação direta entre as concentrações elevadas de LDL mais densa e a incidência de aterosclerose em humanos (Kirchenhausen et al., 1980). Isto motivou uma série de estudos visando caracterizar as diferenças entre estas sub-frações, assim como, identificar possíveis associações com a aterosclerose. Estudos realizados por Chapman et al. (1988) demonstraram que as sub-frações da LDL representam uma população microheterogênea com características físicoquímicas que refletem sua

origem e influenciam o metabolismo intravascular, a captação celular e, possivelmente, o potencial aterogênico das mesmas. Até o momento, foram identificadas aproximadamente 15 sub-frações com densidades variando de $>1,019$ a $<1,063$ g/mL, sendo que as principais diferenças monitoradas referem-se ao tamanho das partículas ($255 > \text{LDL} > 255 \text{ \AA}$), as concentrações decrescentes de apoproteínas ($\text{Apo B-100} > \text{Apo E} > \text{Apo(a)} > \text{Apo CIII}$), diretamente relacionadas com a densidade das partículas, e modificações na eletronegatividade, conforme determinado através de eletroforese em gel de agarose. Estas subfrações de LDL têm sido confirmadas através de técnicas sensíveis como a isotacoforese de fluxo livre (Nowicka et al., 1998). Nigon et al. (1991) verificaram que a LDL com densidade intermediária ($d \approx 1,030$ g/mL) apresenta maior afinidade pelos receptores B/E e representava a maior subfração no plasma de indivíduos normolipidêmicos. Em contraste, as LDL(s) mais leves ($d \approx 1,026$ g/mL) e as mais pesadas ($d \approx 1,042$ g/mL) apresentam uma menor taxa de remoção plasmática.

1.3 LDL eletronegativa (LDL⁻)

Cazzolato et al. (1994) caracterizaram uma subfração de LDL eletronegativa, no plasma humano, que foi denominada de LDL⁻. O subfracionamento da LDL isolada por ultracentrifugação ($1,019 < d < 1,063$), através da cromatografia líquida de alto desempenho com coluna de troca aniônica, resulta em uma subfração principal, representada pela LDL nativa e compreendendo 90-98% do total, além de uma subfração LDL⁻, constituindo cerca de 0,5-2% do pool de LDL, em indivíduos normolipidêmicos. A LDL⁻ apresenta maior carga negativa superficial, maior migração eletroforética em gel de agarose, é mais suscetível à

oxidação *in vitro*, contém maiores quantidades de lipídeos oxidados (hidroperóxidos e óxidos de colesterol) e menores teores de α -tocoferol, quando comparada à subfração LDL nativa (Sevanian et al, 1997).

A LDL⁻ está envolvida nas reações de sinalização celular, induzidas pela subfração denominada de LDL minimamente oxidada (Leonarduzzi et al, 2000). A modificação de vários componentes na LDL promove alterações que contribuem para efeitos aterogênicos, quando a LDL modificada interage com células da parede arterial. A alta quantidade de lipídeos hidratados nesta partícula indica uma desordem relevante da sua estrutura lipídica (Parasassi et al, 2001). A LDL⁻ apresenta alterações conformacionais da apoB-100, envolvendo a exposição de resíduos mais hidrofóbicos da proteína (Parasassi et al, 2001). Como a apoB-100 envolve a partícula de LDL, as alterações conformacionais desta proteína podem modificar o tamanho e a forma da partícula e altera a ligação da partícula de LDL aos receptores celulares (Yang et al 1994). As alterações estruturais da LDL⁻, em especial da conformação da apo B100, diminuem sua ligação aos receptores B/E, mas propiciam sua ligação a outros receptores, como o CD36, estimulando o acúmulo de éster de colesterol nas células vasculares (Cazzolato et al, 1991; Sanchez-Quesada et al, 1997; Parasassi et al, 2001, Sevanian A., comunicação pessoal).

A derivatização dos resíduos lisina com aldeídos formados na peroxidação lipídica tem relação direta com a formação da LDL⁻, pelo fato da diminuição da carga positiva dos resíduos lisina da apoB contribuir para a formação de uma subfração mais eletronegativa (Sevanian et al, 1997). Sevanian et al. (1996) investigaram a relação entre a LDL⁻ e a subpopulação mais densa da LDL, demonstrando que a subfração mais densa

da LDL é coincidente com a subfração LDL⁻. Visando comprovar as diferenças na susceptibilidade oxidativa da LDL⁻, quando comparada à LDL nativa, Sevanian et al. (1997) analisaram a composição de ácidos graxos e dos aminoácidos da Apo B destas duas subfrações. Os resultados demonstraram uma menor proporção de ácidos graxos poliinsaturados (os mais susceptíveis à oxidação) e um conteúdo reduzido dos aminoácidos mais suscetíveis à oxidação, como a histidina e a lisina, na LDL⁻ em comparação com a LDL nativa.

A LDL⁻ é citotóxica em concentrações tão reduzidas quanto 50 µg/mL, enquanto que a LDL nativa não apresenta citotoxicidade, mesmo em concentrações iguais a 300 µg/mL (Hodis et al, 1995). O mecanismo de formação da LDL⁻, *in vivo*, não é conhecido, mas é possível que a oxidação dos lipídeos da LDL, pelas células da parede vascular, assim como a incorporação dos lipídeos da dieta, possam contribuir para a sua formação. O aumento da LDL⁻ tem sido observado em indivíduos com doença coronariana (Dac) e hipercolesterolemia (Sevanian et al, 1999).

1.4 Diabetes melitus e intolerância à glicose

O diabetes mellitus é uma doença metabólica, caracterizada pela hiperglicemia crônica, seja por redução ou ausência da secreção de insulina pelas células β-pancreáticas, ou, por ineficácia no sistema dos receptores celulares para a insulina. É influenciada por múltiplos e complexos fatores genéticos e ambientais, que interagem potencializando

sua expressão patológica. O caráter hereditário do diabetes mellitus está relacionado a vários genes reguladores da produção de anticorpos anti-célula β , localizados no braço curto do cromossomo 6 devendo haver, provavelmente, fatores ambientais que estimulam a expressão mais precoce ou tardia desses genes, o que justifica as diferentes faixas etárias de manifestação da sintomatologia (National Diabetes Data Group, 2002 ; World Health Organization, 2002). Se o paciente não produz insulina ou apresenta receptores celulares de insulina alterados, ou ainda, se a ação insulínica estiver diminuída (devido à sua baixa concentração ou diminuição do número ou afinidade de seus receptores celulares), a glicose, não podendo entrar na célula e ser metabolizada, acumula-se no sangue e promove aumento da taxa de glicose plasmática acima dos níveis de normalidade (Davidson et al, 1995).

O diabetes tipo 1 é normalmente diagnosticado em crianças e adolescentes, razão pela qual foi denominado como diabetes juvenil. No diabetes tipo 1, o organismo apresenta deficiência na produção de insulina. O diabetes tipo 2 é a forma mais comum de diabetes. Neste tipo de diabetes, o organismo apresenta resistência à insulina, ou seja, as células não conseguem captar glicose adequadamente. A glicose é o principal combustível para as células do organismo e a insulina promove a captação da glicose do sangue pelas células. Quando a glicose permanece na circulação, ao invés de entrar nas células, pode gerar dois problemas: (i) as células podem apresentar escassez de energia e (ii) altas concentrações de glicose sangüínea, durante longos períodos de tempo, podem afetar diversos tecidos e órgão como a retina, os rins, o tecido nervoso e o coração, dentre outros (The Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2002).

A intolerância à glicose inclui pessoas que apresentam o teste de tolerância à glicose anormal, mas que não apresentam hiperglicemia de jejum. A intolerância à glicose é uma doença geralmente diagnosticada pelo teste de tolerância oral à glicose (TTOG). O TTOG avalia a depuração da glicose na circulação e foi padronizado pela Sociedade Americana de Diabetes (Stolk et al., 1995). Indivíduos não diabéticos, que realizaram o TTOG e apresentaram valores acima de 140mg/dL e abaixo de 200mg/dL, 2 horas após a ingestão glicose, são considerados intolerantes à glicose (Meltzer et al., 1998).

Os critérios para o diagnóstico do diabetes mellitus, definidos pela Sociedade Americana de Diabetes (Gabir et al, 2000), foram introduzidos para facilitar o diagnóstico do diabetes e minimizar a necessidade do teste de tolerância à glicose para identificar pessoas assintomáticas com diabetes não diagnosticado. A Sociedade Americana de Diabetes e a Organização Mundial da Saúde (OMS) mudaram os critérios relativos à glicemia de jejum no diabético, para facilitar a identificação de pacientes diabéticos não diagnosticados (identificando assim pessoas no estágio inicial da doença e evitando maiores complicações), reduzindo a discrepância entre glicemia de jejum e a glicemia de 2 horas pós-prandial (Burke et al, 1998). As concentrações de glicose no diabetes foram padronizados, quanto à glicemia basal (jejum) e pós-prandial, em 7,0 mmol/L (126mg/dL) e >11,1mmol/L (200mg/dL), 2 horas após a ingestão de 75g de glicose, em pacientes que realizaram o teste de tolerância à glicose (Gabir et al, 2000).

A prevalência do diagnóstico de diabetes do tipo 2 está aumentando e estima-se que afete 5,4% da população mundial até 2025 (Zimmet et al., 1999). O diabetes mellitus aumenta o risco de morte por doenças

cardiovasculares em 2 a 3 vezes, nos homens, e 3 a 4 vezes nas mulheres (Stamler et al., 1993; Kannel et al., 1979). Comparados com a população normal, pacientes com diabetes dos tipos 1 e 2 são mais susceptíveis ao desenvolvimento de doenças renais, cegueira e doença vascular aterosclerótica (Mowri et al., 2000). As doenças cardiovasculares constituem a principal causa de mortalidade no diabetes, principalmente no tipo 2. O diabetes tipo 2 (tardio) aumenta em três vezes o risco de doença coronariana. Pessoas pré-dispostas ao diabetes, sem hiperglicemia crônica, tem seu risco aumentado em duas vezes comparado ao de pessoas normais (Hsueh et al., 1998). Modificações na LDL como a glicação e a oxidação, contribuem para o desenvolvimento das disfunções endoteliais, que podem contribuir para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose, assim como, alterações macrovasculares em pacientes diabéticos (Sanguinetti et al., 1998; Niemeijer-Kanters et al., 2001).

1.5 Oxidação da LDL e Diabetes

A LDL nos pacientes diabéticos é mais glicada e mais susceptível à oxidação que em pessoas não diabéticas. A LDL glicada parece estar associada com o aumento da concentração plasmática da LDL⁻ (subfração eletronegativa). Pacientes com diabetes tipo 2 apresentam concentrações mais elevadas de LDL glicada mais propensa à oxidação (Sanchez-Quesada et al, 1996; Moro et al, 1999). A glicação da apoB provavelmente está associada com um aumento significativo da oxidação da LDL, *in vivo*. A porcentagem de LDL⁻ no plasma está mais elevada em pacientes diabéticos com microalbuminúria, comparados àqueles sem

microalbuminúria (Moro et al, 1998). A aterogenicidade da LDL no diabetes é atribuída à subfração mais densa dessa lipoproteína, que está associada com a hipertrigliceridemia. Estas subfrações mais densas têm alta suscetibilidade à oxidação, assim como baixa afinidade pelos receptores B/E. O aumento da subfração mais densa da LDL no diabetes é dependente da extensão da glicação.

No estágio inicial do diabetes, a glicação não enzimática da LDL resulta na formação de bases de Schiff entre a glicose e os grupos ϵ -amino dos resíduos de lisina da apoB. Em fases mais avançadas ocorre a formação de produtos de Amadori, resultando na formação de produtos finais avançados de glicação (AGEs). A glicação e a oxidação poderiam resultar em um aumento da formação da LDL⁺ (Kramer et al, 1997; Sevanian et al 1999). Estas modificações são mais intensas nos pacientes diabéticos nos quais a glicemia é mal controlada (Prescott et al, 1999; Friedlander et al, 1999). A glicação não enzimática das lisinas da LDL tem ação análoga à oxidação, contribuindo para a aterosclerose precoce no diabetes. Lisinas modificadas e pentosidinas são os principais constituintes dos produtos finais da glicação, considerados como produtos de glicoxidação. Portanto, o processo de glicação aumenta a oxidação da LDL e pode contribuir para o desenvolvimento da aterosclerose em pacientes diabéticos (Sanguinetti et al, 1998; Dato et al 2000; Sakata et al, 2000).

1.6 Anticorpos anti-LDL e diabetes

Evidências crescentes indicam a presença de anticorpos circulantes anti-LDL oxidada nos diabéticos. Estes anticorpos formam

imunocomplexos com a LDL, podendo aumentar o potencial aterogênico da lipoproteína. Autoanticorpos que reconhecem a LDL oxidada têm sido detectados no plasma de pacientes com hipertensão, doença coronariana, aterosclerose e diabetes. A LDL é progressivamente alterada por modificações oxidativas, em pacientes diabéticos, levando a maior produção de autoanticorpos anti-LDL oxidada (Festa, et al, 1998). Estágios avançados de glicação constituem o principal mecanismo de desenvolvimento das seqüelas no diabetes. Existem evidências de que os produtos finais de glicação têm propriedades antigênicas, podendo desencadear resposta autoimune (Palinski et al., 1995; Festa et al, 1998; Turk et al, 2001). Em pacientes diabéticos, os autoanticorpos anti-LDL oxidada encontram-se elevados, sendo associados à disfunção endotelial (Makimattila et al, 1998).

A oxidação da apoB da LDL torna a LDL antigênica e induz a produção de autoanticorpos anti-LDL oxidada (Palinski et al 1989, Makimattila et al, 1998). O aumento da LDL oxidativamente modificada, em condições hiperglicêmicas, foi verificado em estudos que demonstraram o aumento da concentração de malondialdeído no plasma (Gallou et al, 1993). Em modelos experimentais de aterosclerose verificou-se altos títulos de autoanticorpos reativos à LDL modificada pelo malondialdeído, assim como a oxidação de epítomos específicos da partícula de LDL nas lesões ateroscleróticas (Yla-Herttuala et al, 1989).

A proposta deste trabalho foi realizar um estudo com a LDL eletronegativa, determinando suas concentrações plasmáticas e dos autoanticorpos anti-LDL⁻, através de imunoensaio ELISA em indivíduos diabéticos, intolerantes à glicose e controles. Além de contribuir para o melhor entendimento da participação da LDL⁻ nestas condições, as informações geradas poderão demonstrar a utilidade da LDL⁻ como marcador bioquímico nos casos de diabetes.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Determinar a presença da subfração da lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada *in vivo*, denominada LDL eletronegativa (LDL⁻) e dos autoanticorpos reativos a essa subfração no plasma de indivíduos diabéticos do tipo 1 e tipo 2, intolerantes à glicose e normoglicêmicos (controles).

2.2 Objetivo Específico

Determinar as concentrações plasmáticas de LDL eletronegativa em indivíduos diabéticos do tipo 1, do tipo2, intolerantes à glicose e controles normoglicêmicos, utilizando anticorpo monoclonal reativo à LDL⁻ e teste de ELISA.

Determinar as concentrações plasmáticas de autoanticorpos em indivíduos diabéticos do tipo 1, do tipo2, intolerantes à glicose e seus respectivos controles, utilizando como antígeno a subfração LDL⁻ isolada do plasma humano e teste de ELISA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Os indivíduos intolerantes à glicose (grupo IGT), os diabéticos do tipo 1 (grupo DM 1), os diabéticos do tipo 2 (grupo DM2) e as crianças normoglicêmicas (grupo controle 1) foram triados na Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (FCMSCSP) e no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), sob a responsabilidade do Dr. Osmar Monte e do Dr. Marcelo Bertolami, respectivamente. Os adultos normoglicêmicos (grupo controle 2) foram triados em uma comunidade adventista de Londrina, com hábitos e estilo de vida saudáveis e não apresentaram fatores de risco e evidências clínicas para doença arterial coronária.

O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética da FCMSCSP, do IDPC e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP. Todos os indivíduos, ou seus responsáveis, foram previamente informados e esclarecidos sobre os objetivos do estudo e a utilização do material biológico para a realização do trabalho e participaram como voluntários.

3.2 Dados dos indivíduos Estudados

Os 15 indivíduos do grupo controle 2 apresentaram média de idade semelhante aos 62 indivíduos do grupo DM 2 e aos 30 intolerantes à glicose (Tabela 1). O grupo DM1 com 27 indivíduos apresentou idade inferior à do respectivo grupo controle que contava com 12 indivíduos (Tabela 1).

Tabela 1 – Idade e sexo dos indivíduos dos grupos estudados

	Controle (C1)	DM1	Controle (C2)	DM2	IGT
Indivíduos	12	27	15	62	30
Idade	14,4±8,2	16,8±11,5	59,21±5,0	58,2±10,0	57,9±8,0
Sexo (M:F)	6:6	12:15	8:7	20:42	13:17

C1: grupo controle dos diabéticos tipo 1; DM1: grupo de diabéticos tipo 1;
 C2: grupo controle dos diabéticos tipo 2; DM2: grupo de diabéticos tipo 2;
 IGT: grupo dos intolerantes à glicose.

3.3 Coleta

O sangue foi coletado em tubos Vacutainer contendo EDTA como anticoagulante (1 mg/mL de sangue), para obtenção do plasma e em tubo seco para a realização das análises bioquímicas. O plasma foi rapidamente separado, a 4°C e 2500 rpm. Após a obtenção do plasma foram adicionados BHT (1µ/mL) como antioxidante e uma combinação de inibidores de protease: benzamidina (2µl/mL), aprotinina (2µl/mL) e PMSF (2µl/mL).

3.4 Purificação da LDL

Posteriormente o plasma foi submetido à ultracentrifugação seqüencial para a separação das lipoproteínas (4°C, 55.000 rpm, 5h).

3.5 Análises Bioquímicas

As análises dos lipídeos plasmáticos (concentrações de colesterol e triacilgliceróis), glicose, hemoglobimna glicada e frutossamina, foram realizadas nas amostras dos pacientes através de métodos enzimáticos, utilizando-se reagentes comerciais (Kits BioSystems S.A, Barcelona, Espanha).

3.6 Isolamento da LDL-

A partir da fração de LDL, a subfração de LDL- foi purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (Sevanian et al., 1997). Inicialmente, as amostras de LDL foram filtradas em filtros Millipore de 0,22 um e separadas por uma coluna de troca iônica (PXR- 500 Hamilton Califórnia, USA), utilizando-se um sistema de separação por gradiente composto pelas seguintes fases móveis: solução A, constituída por Tris a 20mM, pH 7,8 e solução B, Tris-NaCl, 20mM e 1M, respectivamente, pH 7,8. Foram reconhecidos três picos no cromatograma: LDL nativa, LDL-1 e LDL-2. As amostras coletadas foram armazenadas protegidas da luz, à -20°C. Antes do congelamento das amostras, adicionou-se novamente os inibidores de proteases: PMSF (1mM), aprotinina (2ug/mL), benzamidina (2mM) e o BHT (20mM) para evitar a oxidação e proteólise da LDL- durante o armazenamento. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (1951). Possíveis contaminações de albumina e imunoglobulinas foram removidas através de cromatografia por afinidade utilizando-se colunas Hi Trap Blue (Amersham Pharmacia Biotech AB, cod: 17-0412-01).

3.7 Caracterização do Antígeno Isolado (LDL-)

3.7.1 Determinação de Proteínas Totais

As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry (1951), utilizando-se albumina sérica bovina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) como padrão.

3.7.2 SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada para se avaliar a integridade da apoB100 da fração LDL eletronegativa. As bandas de proteínas foram detectadas pela coloração com coomassie blue.

3.7.3 Preparo das placas

Foram utilizadas placas de vidro com dimensões de 9,5cm x 9,5cm, sobrepostas entre espaçadores de 1mm de espessura nas extremidades laterais e inferior da placa. Para vedação foi utilizado agarose 2%, e para aderir a placa na cuba de corrida eletroforética foi utilizada parafina a 2% e vaselina a 50%. O gel de separação foi preparado em gradiente de 5-15%. O sistema foi feito através de vasos comunicantes, preparados em solução tamponada Tris-HCl a 0,5M, pH 8,8 e SDS a 0,025%. O gel de empilhamento utilizado foi de 5%, preparado com Tris-HCl a 0,5M, pH 6,8 e SDS a 0,025%. Após vedar as placas, adicionou-se o gel de separação, e após sua polimerização adicionou-se o gel de empilhamento. Foi inserido o pente que foi cuidadosamente retirado após a polimerização.

3.7.4 Preparo das amostras e do padrão de peso molecular

Para serem analisados pela coloração por coomassie blue, antes de serem aplicados no gel, a LDL- e o padrão de alto peso molecular (Pharmacia LKB, Biotechnology, Piscataway, N.J.,USA) foram diluídos em solução de Tris-HCl a 25mM, glicina a 25%, SDS a 2%, 2-mercaptoetanol a 14,4mM e bromofenol blue a 0,1%. Estas amostras foram fervidas a 100°C por 5 minutos.

3.7.5 Eletroforese em gel de Poliacrilamida

Após a polimerização do gel de empilhamento, o espaçador inferior foi removido e a placa aderida à cuba de eletroforese. O tampão de corrida foi ajustado e as amostras foram aplicadas. As corridas eletroforéticas foram feitas em equipamento Bio-Rad (model 200/2.0- Power Supply, MO, USA, sendo iniciadas a 60V (cerca de 15mA) até o empilhamento das amostras no início do gel de separação. Após esta etapa, a voltagem foi aumentada e mantida a 150V (cerca de 30mA) durante aproximadamente 4 horas

3.8 Determinação de anticorpos anti-LDL eletronegativa

A determinação dos anticorpos foi realizada através de imunoensaio ELISA (Damasceno,2001). Alíquotas da LDL eletronegativa obtidas, conforme previamente descrito no item 5, foram diluídas em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,4, até a concentração final de 1ug/poço. Após o preparo das amostras, placas de 96 poços (EIA/RIA,

Costar, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas e incubadas *overnight* à 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, sendo os sítios livres bloqueados com leite desnatado a 5% diluído em tampão fosfato (PBS), pH 7,4 cujas as proteases haviam sido previamente inativadas pelo calor. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas e, em seguida, foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween (0,05%). Após esta etapa, as amostras de plasma foram diluídas em leite PBS 1%-PBS (1:100). Adicionou-se 50uL de cada amostra/poço e incubou-se por 2 horas à 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas, conforme descrito acima. Posteriormente, adicionou-se 50uL/poço do anticorpo anti-IgG ou anti-IgM humana marcado com peroxidase (1:4000) diluído em leite 1%-PBS, sendo as placas incubadas por 2 horas à 37°C. Após este período, as placas foram lavadas, sendo adicionado o substrato contendo 0,53mg de ABTS/mL de tampão citrato fosfato e 0,25uL de H₂O₂/mL de tampão. As placas foram incubadas a temperatura ambiente, sendo a absorbância monitorada a 405nm. Os resultados foram apresentados como equivalentes de IgG e IgM anti-LDL eletronegativa (absorbância aplicada à equação da curva padrão, sendo o valor obtido multiplicado pelo título). A curva padrão foi feita a partir das preparações com IgG e IgM total humana (10 mg/mL; marca Rockland) nas faixa de diluições de 1/10 a 1/500.

3.9 Detecção de LDL eletronegativa no plasma

A detecção da LDL eletronegativa foi realizada através de imunoensaio ELISA padronizada em nosso laboratório. Alíquotas do anticorpo monoclonal anti-LDL eletronegativa foram diluídas em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,4, até a concentração final de 1ug/poço. Após o preparo das amostras, placas de 96 poços

(EIA/RIA, Costar, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas e incubadas overnight à 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, sendo os sítios livres bloqueados com leite 5% diluído em tampão fosfato (PBS), pH 7,4 cujas proteases haviam sido previamente inativadas pelo calor. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas e, em seguida, foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween (0,05%). Após esta etapa, adicionou-se 50uL de cada amostra de plasma/poço e incubou-se por 2 horas à 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas conforme descrito acima. Posteriormente, adicionou-se 50uL/poço do anticorpo monoclonal anti-LDL eletronegativa biotinilado (1:1000) diluído em leite 1%-TBS, sendo as placas incubadas por 2 horas à 37°C. Após este período, as placas foram lavadas, sendo adicionado a avidina peroxidase (1:3000) diluído em leite 1%-TBS. As placas foram incubadas a por 2 horas à 37°C. Após este período, as placas foram lavadas adicionando-se a solução de substrato luminol (2,3mM), p-iodofenol (0,9mM) e H₂O₂ (3,9nM). A leitura da quimioluminescência produzida foi realizada imediatamente, utilizando-se leitora de placas de ELISA para quimioluminescência (Lumicount, Pacckard, Meriden ,USA). A concentração de LDL eletronegativa nas amostras foi estimada pela curva de calibração realizada com LDL eletronegativa, purificada e isolada como descrito no item 3.6, e expressas em ug/mL de proteína da LDL eletronegativa.

3.10 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram calculados como média $\pm$ desvio padrão e as análises estatísticas foram realizadas pelo método ANOVA, o nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$. As regressões lineares das curvas de calibração foram realizadas pelo programa Origin®. As análises de correlação foram feitas utilizando o programa SigmaStat®, pelo método de correlação de Pearson. As tabelas das medidas resumo dos parâmetros estudados nos diferentes grupos encontram-se no anexo.

4 Resultados

Os indivíduos estudados foram subdivididos nos seguintes grupos: Controle 1 (indivíduos normoglicêmicos com faixa etária semelhante à do DM 1), DM 1 (diabéticos tipo 1), Controle 2 (indivíduos normoglicêmicos com a mesma faixa etária dos grupos IGT e DM 2), IGT (indivíduos intolerantes à glicose) e DM 2 (diabéticos tipo 2). Os resultados do perfil lipídico dos grupos estudados são mostrados na tabela 2. Observou-se aumento significativo das concentrações de triglicerídeo, colesterol total e VLDL-colesterol nos pacientes dos grupos IGT e DM2, comparados ao grupo controle 2.

Tabela 2- Perfil lipídico dos grupos estudados.

	Triacilglicerol (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	HDL- colesterol (mg/dL)	LDL- colesterol (mg/dL)	VLDL- colesterol (mg/dL)
Controle 1	64 ± 20,7	167,1 ± 27,8	55,5 ± 7,8	100,5 ± 24,8	12,7 ± 4,1
DM 1	84,5 ± 50,9	148,2 ± 33,2	43,1 ± 14	84 ± 35,5	18,9 ± 14,4
Controle 2	129,3 ± 40	189,14 ± 22	37,3 ± 13,1	125,9 ± 17,3	25,8 ± 8
IGT	186,3 ± 91,1*	217,5 ± 19,1*	47,6 ± 13,3	134,5 ± 34,3	37 ± 18,4*
DM 2	199,4 ± 10,2*	215, 9 ± 45*	43,3 ± 13	130,3 ± 30,8	39,4 ± 19,6*

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão das concentrações de colesterol total (Col.), colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL), colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL) e colesterol da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) nos grupos Controle 1, DM 1, Controle 2, IGT e DM 2. *Diferença significativa em relação ao grupo controle 2, $p < 0,05$

A tabela 3 mostra o perfil glicêmico dos grupos estudados. As concentrações de glicose foram mais elevadas nos grupos DM 1, DM 2 e IGT, quando comparados aos respectivos grupos controle. Observou-se que os grupos DM 2 e IGT apresentaram concentração de Hb-glicada maior que o respectivo grupo controle (figura 2). Detectou-se maior formação de frutossamina nos grupos IGT e DM 2, quando comparados ao grupo controle 2 (figura 3).

Tabela 3 – Glicose, hemoglobina glicada e frutossamina nos grupos estudados

	Glicose (mg/dL)	Hb Glicada (%)	Frutossamina (mg/dL)
Controle 1	83,166 ± 8,536	N.D.	N.D.
DM 1	190,5±35,779*	10,6 ± 2,674	2,469 ± 0,527
Controle 2	95 ± 8,770	2,506 ± 0,709	2,507 ± 0,709
IGT	133,542 ±14,092*	6,606 ± 1,053*	3,867 ± 0,816*
DM 2	162,267 ± 68,241*	8,614 ± 1,998*	4,186 ± 0,807*

Resultados expressos como média ± desvio padrão. *Diferença significativa em relação aos respectivos grupos controle, $p < 0,05$, teste ANOVA. N.D.: não determinado.

Figura 1- Determinação da glicose nos grupos estudados. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão das concentrações de glicose (mg/dl) nos grupos Controle 1 (DM1), DM 1 (diabéticos tipo 1), Controle 2 (IGT e DM 2), DM 2 (diabéticos tipo 2) e IGT (Intolerante). * Diferença significativa dos grupos DM 1, IGT e DM 2, em relação aos seus respectivos grupos controle $p < 0,05$. Teste ANOVA.

Figura 2. Determinação de Hb-glicada. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da concentração de hemoglobina glicada (%) nos grupos DM 1 (diabéticos tipo 1), Controle 2 (IGT e DM 2), IGT (Intolerante a glicose) e DM 2 (diabéticos tipo 2). *Diferença significativa dos grupos DM 1 e DM2 em relação aos respectivos grupos controle, $p < 0,05$. Teste ANOVA.

Os pacientes dos grupos analisados (DM 1, IGT e DM 2) neste estudo apresentaram concentrações glicêmicas elevadas ("glicemia do dia"), mesmo sendo tratados com hipoglicemiantes. As concentrações de HbA_{1c} dos pacientes dos grupos DM1 e DM2 estão alterados, segundo os valores de referência (5 - 7,5%) da metodologia adotada. Esta leve alteração é reflexo da glicose sangüínea dos últimos 30 dias antes da determinação de HbA_{1c}, que contribui com cerca de 50% na formação da hemoglobina glicada.

Figura 3. Determinação de frutosamina. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão dos níveis de frutosamina (mg/dL) nos grupos DM 1 (diabéticos tipo 1), Controle 2 (IGT e DM 2), DM 2 (diabéticos tipo 2) e IGT (Intolerante). *Diferença significativa dos grupos IGT e DM2 em relação ao grupo controle, $p < 0,05$, teste ANOVA.

A avaliação da presença de anticorpos anti-LDL eletronegativa no plasma demonstrou elevação de IgG anti-LDL⁻ nos grupos de pacientes com diabetes tipo 1, tipo 2 e no grupo IGT, quando comparados aos grupos controles 1 e 2 (normoglicêmicos) (Figura 4). Os anticorpos IgM anti-LDL eletronegativa também estavam aumentados nos diabéticos e intolerantes à glicose em relação aos seus respectivos grupos controle (figura 5). Considerando-se os valores de hemoglobina glicada dos pacientes diabéticos, como indicador do controle glicêmico, observa-se maior quantidade de anticorpos anti-LDL⁻ nos pacientes com melhor controle glicêmico (figura 6). Não houve diferença dos valores de IgG reativo à LDL⁻ nos pacientes tratados somente com hipoglicemiantes orais e naqueles tratados com hipoglicemiante oral associado à insulina (Figura 7).

Figura 4. Determinação de Anticorpos IgG Anti-LDL eletronegativa. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão dos níveis de anticorpos anti LDL- (equivalentes de IgG) nos grupos Controle 1 (DM1), DM 1 (diabéticos tipo 1), Controle 2 (IGT e DM 2), DM 2 (diabéticos tipo 2) e IGT (Intolerante). *Diferença significativa dos grupos DM1, IGT e DM2 em relação aos respectivos grupos controle, $p < 0,05$, teste ANOVA.

Figura 5. Determinação de Anticorpos IgM Anti-LDL eletronegativa no diabetes. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão dos níveis de anticorpos anti LDL- (equivalentes de IgM) nos grupos Controle 1 (DM1), DM 1 (diabéticos tipo 1), Controle 2 (IGT e DM 2), DM 2 (diabéticos tipo 2) e IGT (Intolerante). *Diferença significativa dos grupos DM1, IGT e DM2 em relação aos respectivos grupos controle, $p < 0,05$, teste ANOVA.

Figura 6. Anticorpos IgG Anti-LDL eletronegativa no grupo DM1 em relação à concentração de HbG (Hemoglobina glicada). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão dos níveis de anticorpos anti LDL- (equivalentes de IgG) nos grupos HbG < 7,5 e HbG > 7,5. *Diferença significativa em relação ao grupo HbG > 7,5, $p < 0,05$, teste ANOVA.

Figura 7. Anticorpos IgG Anti-LDL eletronegativa e uso de insulina e hipoglicemiantes orais no grupo DM 2. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão dos níveis de anticorpos anti LDL- (equivalentes de IgG) nos grupos Hipoglicemiante oral + insulina e Hipoglicemiante oral.

As concentrações de LDL⁻ estão demonstradas na figura 8. Houve maior formação de LDL eletronegativa nos grupos de diabéticos e intolerantes à glicose em relação aos respectivos controles normoglicêmicos. Não se observou correlação significativa entre as concentrações plasmáticas de LDL⁻, colesterol total (p 0,302, r 0,111) e triglicerídeos (p 0,777; r 0,031), (Figura 9), indicando que a formação de LDL⁻ não depende apenas das concentrações totais dos lípides plasmáticos.

Na figura 10 observa-se que os pacientes diabéticos com valores elevados de Hb-glicada ($> 7,5\%$) também apresentaram concentrações mais altas de LDL⁻. A importância da associação entre o controle glicêmico e a formação de LDL⁻ é demonstrada na figura 11, na qual se observa que os pacientes do grupo DM 2 que utilizam insulina associada aos hipoglicemiantes orais apresentam concentrações plasmáticas de LDL⁻ mais baixas, quando comparados àqueles que utilizam apenas os hipoglicemiantes orais.

LDL eletronegativa

Figura 8. Detecção de LDL eletronegativa. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão dos níveis de LDL- (ug/mL) nos grupos Controle 1, DM 1, Controle 2, DM 2 e IGT. *Diferença significativa dos grupos DM1, IGT e DM2 em relação aos seus respectivos grupos controle, $p < 0,05$, teste ANOVA.

Figura 9 - Correlação entre as concentrações de LDL- , colesterol total (A) e triglicerídeos (B). CT: colesterol total, TG: triglicerídeos.

Figura 10. LDL eletronegativa no grupo DM1 relacionada aos valores de HbG (Hemoglobina glicada). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão dos níveis de LDL eletronegativa (ug/mL) nos grupos HbG < 7,5 e HbG > 7,5 *Diferença significante em relação ao grupo HbG < 7,5, $p < 0,05$, teste ANOVA.

Figura 11. LDL eletronegativa em relação ao uso de insulina e hipoglicemiantes orais no grupo DM 2. Os resultados estão expressos com média $\pm$ desvio padrão dos níveis de LDL- (ug/mL) nos grupos Hipoglicemiante oral + insulina e Hipoglicemiante oral. *Significante em relação ao grupo Hipoglicemiante oral + insulina, $p < 0,05$, teste ANOVA.

5. Discussão

O diabetes mellitus é considerado um fator de risco para a aterosclerose, sendo que o desenvolvimento de doenças cardiovasculares é duas a três vezes mais elevado nos indivíduos diabéticos, quando comparados aos não diabéticos (Giannini.,1998 Anastasiou et al.,1999). Pelo menos em parte, isto tem sido relacionado à produção de partículas de LDL mais aterogênicas nos diabéticos, as quais têm catabolismo mais lento e são captadas por receptores *scavenger* (Giannini.,1998; Sanchez-Quesada et al.,2000). Nos diabéticos, principalmente naqueles com mau controle da glicemia, também há maior formação de partículas de LDL pequenas e densas (fenótipo B), que são mais aterogênicas (Caixas et al, 1997). Modificações que aumentam a formação de LDL eletronegativa *in vitro*, como a oxidação ou a glicação não enzimática, têm sido demonstradas e contribuem para o acúmulo de colesterol nos macrófagos (Steinberg et al; 1998 Lyons,T.J.1992). A proporção de LDL eletronegativa presente na circulação, correlacionada com o colesterol total (Demuth et al.,1996; Nyyssonen et al.,1996), é muito maior em pessoas com alto risco para doenças cardiovasculares (Sanchez-Quesada et al, 1996). A hiperglicemia tem sido responsabilizada por modificações na LDL não só através da glicação não enzimática da ApoB, mas também pela oxidação resultante do estresse oxidativo gerado pela autooxidação da glicose (Moro et al, 1999), sendo que a insulina poderia estar colaborando na diminuição dessa oxidação, direta ou indiretamente, ou seja, por diminuir a glicemia e a geração de espécies reativas de oxigênio (Sanchez-Quesada 2000). De um modo geral, o acentuado aumento do metabolismo da glicose, na hiperglicemia diabética, está associado a uma formação aumentada de radicais livres, tais como o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e ânion radical superóxido (O_2^-) (Gopaul et al., 2001). O desequilíbrio entre a geração das espécies

reativas de oxigênio e nitrogênio e/ou a diminuição das defesas antioxidantes intracelulares (superóxido dismutases, peroxidases, catalase e glutathione), da membrana celular (tocoferóis, carotenóides e coenzima Q) e extracelulares (ascorbato, proteínas ligantes de metais, como a transferrina e a ceruloplasmina), resulta na condição denominada por estresse oxidativo. O estresse oxidativo se caracteriza por lesões oxidativas em macromoléculas e componente celulares, o que estaria relacionado ao desenvolvimento de diversas complicações no diabetes (Baynes et al.,1999). Muitas vias metabólicas associadas com a hiperglicemia, tais como a autooxidação da glicose, a glicação de proteínas e a ativação da via do poliol, aumentam a produção de radicais livres (Consentino et al.,1997). Adicionalmente, os mecanismos de defesa antioxidante também podem estar diminuídos no diabetes, em particular, a glutathione, a superóxido dismutase e a catalase, o que contribui para o estresse oxidativo.

A hiperglicemia está associada ao aumento na formação de radicais oxigênio (Consentino et al.,1998, Petrie., 2000), contribuindo para a modificação oxidativa das lipoproteínas. Adicionalmente, no diabetes do tipo 2, outros fatores como a hipertensão arterial, as dislipidemias e a resistência à insulina, podem contribuir para as complicações micro e macrovasculares do diabetes. A insulina, além de aumentar a captação celular de glicose e o seu metabolismo, estimula a produção de óxido nítrico, induzindo vasodilatação (Young et al.,2000). Também tem sido proposto que a redução da disponibilidade do óxido nítrico, resultaria em comprometimento da utilização da glicose nos músculos, o que poderia determinar a resistência à insulina e os fenótipos associados da síndrome da resistência à insulina (Petrie et al.,1997; Young et al.,1997). Existem evidências de que o estresse oxidativo, avaliado pela intensidade da peroxidação lipídica no plasma humano, poderia preceder a disfunção endotelial e, subsequente, o desenvolvimento da resistência à insulina no diabetes do tipo 2 (Gopaul et al.,2001). Em paralelo, outros fatores presentes no diabetes do tipo 2 poderiam reduzir a

atividade do óxido nítrico, tais como a LDL oxidada, a LDL pequena e densa e a hipertrigliceridemia (Makimattila et al., 1999). No presente estudo, a insulina estaria contribuindo de forma positiva no controle glicêmico, melhorando a captação da glicose, o que diminuiria o processo de autooxidação da glicose e a oxidação das lipoproteínas (figura 11).

Estágios avançados de glicação constituem o principal mecanismo de desenvolvimento das seqüelas no diabetes. Neste sentido, a terapia com insulina demonstra que existem fatores de proteção que podem diminuir os efeitos da glicação não enzimática, comparados com diabéticos não tratados (Festa, et al, 1998, Meltzer et al, 1998, Feillet et al, 1998). Um mecanismo potencial envolvido na disfunção endotelial no diabético é a formação dos produtos finais de glicação avançada (AGES). Quando as proteínas plasmáticas e da membrana celular estão expostas a concentrações elevadas de glicose por períodos prolongados, essas sofrem glicação não-enzimática podendo se depositar no espaço subendotelial das artérias e induzir disfunção endotelial. Esse evento pode contribuir para o aumento da permeabilidade vascular e para a captação dos AGES por macrófagos subendoteliais, resultando em ativação da resposta local inflamatória, no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelas células inflamatórias e, conseqüentemente, contribuindo para o estresse oxidativo (Calles-Escandon., 2001; Ceriello.,2004). Ambos, a glicação e a oxidação da LDL, foram relacionadas ao aumento da proporção de LDL⁻ encontrada em diabéticos (Moro et al, 1999). Sanchez-Quesada et al. (2001) demonstraram que a produção de LDL⁻ em indivíduos com diabetes mellitus do tipo 1 deveu-se provavelmente à glicação não enzimática, enquanto que no diabetes mellitus tipo 2 a causa predominante teria sido a lipoperoxidação. Como a glicação não enzimática é capaz de aumentar a carga negativa da LDL, esta pode ser uma das vias de formação da LDL eletronegativa no diabetes. Neste grupo de pacientes, observa-se que a deficiência de insulina (no grupo DM 1) e a dificuldade da captação da glicose pelos tecidos (nos grupos IGT e

DM2) não estão cooperando adequadamente para um bom controle da glicemia, o que poderia favorecer o processo de glicoxidação.

No diabetes, a associação entre ativação do sistema imune e disfunção endotelial pode estar relacionada ao dano vascular. A relação entre a formação de auto-anticorpos e a ativação endotelial, mesmo na fase assintomática do diabetes, pode ser indicativo do início de complicação cardiovascular (Ciarla et al, 2001; Ahmed et al, 1999). Anticorpos que reconhecem a LDL oxidada têm sido detectados no plasma de pacientes com hipertensão, doença coronariana, aterosclerose e diabetes. A LDL é progressivamente alterada por modificações oxidativas, tornando-se imunogênica e induzindo uma maior produção de anticorpos anti-LDL oxidada (Festa, et al, 1998). Em pacientes diabéticos, os anticorpos anti-LDL oxidada in vitro encontram-se elevados, sendo associados à disfunção endotelial (Makimattila et al, 1998).

No presente estudo, observamos aumento de anticorpos IgG e IgM reativos à LDL eletronegativa nos diabéticos do tipo 1, nos intolerantes à glicose e nos diabéticos tipo 2, em relação aos respectivos grupos controle (figura 5). Isto sugere maior prevalência de diabéticos com o fenótipo B da LDL (Sanchez-Quesada et al, 2001), pois a partícula pequena e densa de LDL, predominante neste fenótipo, é mais suscetível à oxidação (de Graaf, et al, 1991). No grupo DM 2, os auto-anticorpos IgG anti-LDL⁻ estavam elevados, quando comparado com o respectivo grupo controle. Essa resposta pode ser decorrente do tempo de desenvolvimento da doença e à resistência à insulina (Jialal et al, 2001). Os pacientes do grupo DM 2, que tomavam hipoglicemiantes orais e faziam uso de insulina, mostraram um aumento dos auto-anticorpos IgG anti-LDL⁻ (figura 8) e uma diminuição da LDL eletronegativa circulante (figura 11), sugerindo que a partícula de LDL eletronegativa poderia estar participando da formação de imunocomplexos e/ou estar sendo depositada nas artérias. Na figura 8, observa-se que o uso de insulina poderia contribuir para um efeito positivo em relação à resposta imuno-humoral nos diabéticos dos tipos 1 e 2, visto que há maior quantidade de anticorpos anti-LDL⁻ no

grupo DM 1 e nos pacientes do grupo DM 2 que utilizaram insulina. No entanto, ressalta-se que a insulina poderia ter efeitos em outras vias que poderiam influenciar a oxidação endógena da LDL-, como a hiperglicemia (yudkin et al., 1997) Nos grupos estudados, detectou-se também anticorpos anti-LDL eletronegativa da classe IgM, em menores proporções, quando comparados aos da classe IgG. Os grupos DM 1, DM 2 e IGT apresentaram valores elevados em relação aos respectivos grupos controle (figura 6), indicando que a presença da LDL oxidada induz a formação dessas duas classes de anticorpos (Witztum et al, 1997).

O uso de fármacos hipoglicemiantes não foi suficiente para impedir as modificações da LDL. No entanto, ressalta-se que, em nosso estudo, o uso de hipoglicemiantes orais também não resultou em controle adequado dos índices glicêmicos nos diabéticos tipo 2 (figuras 2, 3 e 4), o que pode ter contribuído para a formação de LDL eletronegativa e a formação de anticorpos reativos à LDL-. Entretanto, observa-se em alguns estudos que as terapias com fármacos anti-hipertensivos (inibidores da ECA) e hipolipemiantes (estatinas) podem alterar a de produção de LDL-. Em particular, o uso de estatinas, que atuam inibindo a síntese do colesterol (Libby & Aikawa, 2003), pode diminuir a formação de LDL-. No entanto, no nosso estudo o uso de estatinas não preveniu o aumento das concentrações plasmáticas da LDL-.

No grupo DM 1, o controle da glicemia foi realizado somente com insulina, o que poderia contribuir com efeitos protetores relacionados à diminuição do estresse oxidativo nesse grupo. Um desses efeitos seria a diminuição da glicação não enzimática após terapia com insulina, o que não ocorreria no diabetes tipo 2 (Sanchez-Quesada et al, 2001). No entanto, o perfil glicêmico do grupo DM 1 estudado estava elevado, como demonstrado pelos valores de hemoglobina glicada acima do limite recomendável. Considerando-se que a hemoglobina glicada seja um bom parâmetro para indicar a glicemia dos últimos dois meses, podemos observar

que esses pacientes estavam descompensados (figuras 7 e 10), o que teria contribuído para o aumento da LDL eletronegativa (figura 7).

A idade, o tempo de doença e a medicação utilizada também podem ser fatores importantes nas variáveis estudadas, pois os pacientes diabéticos podem apresentar diversas complicações micro e macrovasculares com a progressão da doença. O aumento do risco de doenças cardiovasculares observado na população diabética está relacionado ao aumento anormal dos lípides plasmáticos e à modificação oxidativa de lipoproteínas. A oxidação da LDL promove alterações estruturais, que afetam os lípides e a apo B100, que a transformam em um potencial autoantígeno (Varvarovska et al., 2003). As modificações oxidativas da LDL, que ocorreriam progressivamente nos pacientes diabéticos, resultariam em uma resposta imune humoral com aumento na produção de autoanticorpos anti-LDL eletronegativa. Sabe-se que nas fase iniciais do diabetes tipo 1 ocorre destruição das ilhotas de Langerhans, mediada por um processo autoimune, na qual o estresse oxidativo também está associado (Matteucci et al., 2000). A maior produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, localizada nas ilhotas pancreáticas, nessa etapa inicial da doença, poderia contribuir para a oxidação de lipoproteínas presentes nos vasos sanguíneos do pâncreas. Essas lipoproteínas modificadas seriam, portanto, o estímulo inicial para a resposta imune humoral específica com a produção de anticorpos IgM, sendo que após esta fase ocorreria uma maior formação de IgG (Caixas et al, 2002).

Alguns trabalhos mostram que o diabetes mellitus está associado ao aumento do estresse oxidativo, o que contribui para complicações cardiovasculares. Apesar de ainda não estar bem estabelecido, parece provável que o estresse oxidativo favoreça a produção de LDL⁻, considerando-se que as proporções de LDL⁻ encontraram-se aumentadas após o exercício físico e em indivíduos com doença cardiovascular (Sevanian, Asatryan & Ziouzenkova, 1999). Nos pacientes

diabéticos a quantidade de antioxidantes está diminuída (Sargeant et al, 2000; Jain et al, 2000), porém, a concentração de antioxidantes no plasma nem sempre reflete a quantidade total distribuída nos tecidos. Skrha et al (2003) demonstraram que diabéticos do tipo 2 têm menor concentração de antioxidantes, quando comparados com os diabéticos tipo 1 e os indivíduos não diabéticos, o que poderia estar relacionado ao processo de oxidação de lipoproteínas e, consequentemente, ao aumento da LDL eletronegativa no diabetes tipo 2 em relação ao diabetes tipo 1 e aos controles (figura 9). Neste sentido, diversos trabalhos mostram o aumento da lipoperoxidação no diabetes, indicando que não é somente a partir da hiperglicemia que surgem as complicações da doença (Sanchez-Quesada et al, 2001; Oranje et al, 1998; Sato et al, 1979). O processo de glicoxidação pode ter um papel significativo na geração da LDL eletronegativa, aumentando assim a oxidação da LDL e contribuindo para o desenvolvimento da aterosclerose em pacientes diabéticos (Sanguinetti et al, 1998; Dato et al 2000; Sakata et al, 2000; Bowie et al, 1993). A LDL⁻ poderia ser utilizada como uma avaliação direta da presença desta lipoproteína oxidada no plasma, bem como a determinação dos níveis de autoanticorpos anti LDL⁻, que por sua vez, indica a presença deste tipo de LDL modificada circulante. Assim, tanto a LDL eletronegativa como os autoanticorpos reativos a essa partícula oxidada, poderiam ser considerados marcadores da modificação endógena da LDL inclusive no nível de tecidos ou células (Inoue et al., 2001)

Concluindo, a análise dos dados obtidos indica que mesmo com o uso de hipoglicemiantes orais, insulina, estatina e anti-hipertensivos, os indivíduos diabéticos estudados não estavam adequadamente compensados e apresentaram valores mais elevados da LDL eletronegativa e de anticorpos IgG e IgM reativos a esta lipoproteína modificada. Portanto, a LDL⁻ e os autoanticorpos anti- LDL⁻ poderiam ser úteis para auxiliar no monitoramento clínico e terapêutico dos pacientes diabéticos.

6. CONCLUSÕES

- A concentração plasmática da LDL eletronegativa está elevada nos pacientes dos grupos DM1, DM 2 e intolerantes à glicose, quando comparados aos indivíduos normoglicêmicos.
- Nos pacientes diabéticos e nos intolerantes à glicose há maior produção de anticorpos IgG e IgM, reativos à LDL eletronegativa, em comparação aos indivíduos não diabéticos.

7. ANEXOS

Tabela 4. Medidas-resumo dos parâmetros lipídicos dos pacientes.

Grupo	Medidas-resumo	TG	CT	HDL	LDL	VLDL
Controle	N	12	12	12	12	12
	Média	64,000	167,170	55,500	100,080	12,750
	Mediana	58,000	173,000	55,500	99,500	11,500
	Desvio-padrão	20,790	27,800	7,880	24,850	4,140
	Mínimo	35,000	113,000	45,000	42,000	7,000
	Máximo	112,000	206,000	65,000	129,000	22,000
	Assimetris	1,064	-0,651	0,032	-1,110	0,953
	Curtose	1,382	-0,221	-1,882	1,614	0,921
DM1	N	31,000	31,000	31,000	31,000	31,000
	Média	84,480	148,200	43,110	83,950	18,880
	Mediana	62,000	144,000	42,570	87,580	15,000
	Desvio-padrão	50,920	33,260	14,100	35,500	14,460
	Mínimo	32,000	96,000	14,000	12,000	6,000
	Máximo	278,000	255,000	73,000	182,000	74,000
	Assimetris	2,320	1,057	0,194	0,473	2,585
	Curtose	6,384	2,296	-0,431	1,196	7,290

Tabela 5. Medidas-resumo dos parâmetros lipídicos dos pacientes.

Grupo	Medidas-resumo	TG	CT	HDL	LDL	VLDL
Controle para	N	14,000	14,000	14,000	14,000	14,000
	Média	129,360	189,140	37,360	125,910	25,870
	Mediana	135,500	192,000	35,500	121,300	27,100
	Desvio-padrão	40,070	22,010	13,190	17,370	8,010
	Mínimo	65,000	158,000	20,000	96,000	13,000
	Máximo	196,000	216,000	63,000	158,000	39,000
	Assimetria	-0,213	-0,192	0,860	0,364	-0,213
	Curtose	-0,768	-1,687	-0,219	-0,073	-0,768
DM2	N	87,000	88,000	85,000	84,000	83,000
	Média	199,460	215,990	43,310	130,400	39,690
	Mediana	173,000	207,000	44,000	127,000	36,000
	Desvio-padrão	100,280	45,060	13,030	38,890	19,630
	Mínimo	64,000	126,000	4,000	50,000	13,000
	Máximo	560,000	362,000	80,000	272,000	112,000
	Assimetria	1,150	0,692	0,023	0,639	1,167
	Curtose	1,351	0,487	0,885	1,177	1,674
IGt	N	32,000	32,000	32,000	32,000	32,000
	Média	186,380	217,530	47,630	134,560	37,000
	Mediana	165,000	214,500	46,000	128,000	33,000
	Desvio-padrão	91,140	39,130	13,360	34,320	18,460
	Mínimo	72,000	130,000	28,000	72,000	15,000
	Máximo	536,000	311,000	81,000	224,000	107,000
	Assimetria	1,932	0,598	0,699	0,772	1,855
	Curtose	5,841	1,037	0,133	0,578	5,447

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Tabela 6. Medidas-resumo dos parâmetros glicêmicos dos pacientes.

Grupo	Medidas-resumo	Glicose	Hb-glicada	Frutosam
Controle	N	12		
	Média	83,170		
	Mediana	85,000		
	Desvio-padrão	8,540		
	Mínimo	67,000		
	Máximo	95,000		
	Assimetria	-0,403		
	Curtose	-0,249		
DM1	N	31,000	31,000	31,000
	Média	190,510	10,562	2,469
	Mediana	165,110	9,700	2,225
	Desvio-padrão	135,780	2,675	1,221
	Mínimo	38,000	7,141	0,667
	Máximo	589,000	19,066	6,003
	Assimetria	1,301	1,353	1,269
	Curtose	1,220	2,221	1,807

Tabela 7. Medidas-resumo dos parâmetros glicêmicos dos pacientes.

Grupo	Medidas-resumo	Glicose	Hb-glicada	Frutosam
Controle	N	14,000		14,000
	Média	95,000		2,507
	Mediana	93,500		2,543
	Desvio-padrão	8,770		0,709
	Mínimo	86,000		0,523
	Máximo	117,000		3,415
	Assimetria	1,255		-1,585
	Curtose	1,731		4,296
DM2	N	86,000	88,000	88,000
	Média	162,270	8,614	4,186
	Mediana	143,500	8,300	3,144
	Desvio-padrão	68,240	1,998	2,807
	Mínimo	74,000	5,600	1,025
	Máximo	369,000	16,300	12,835
	Assimetria	1,213	1,026	1,545
	Curtose	0,935	1,381	1,961
IGt	N	32,000	31,000	32,000
	Média	107,340	6,606	4,549
	Mediana	107,500	6,500	3,867
	Desvio-padrão	9,640	1,054	1,814
	Mínimo	91,000	4,800	2,345
	Máximo	126,000	10,700	8,524
	Assimetria	-0,007	1,746	0,523
	Curtose	-0,877	6,945	-1,134

Tabela 8. Medidas-resumo da Idade, Tempo de doença e IMC dos pacientes.

Grupo	Medidas-resumo	Idade	Tempo doença	de IMC
DM1	N	31,000	31,000	28,000
	Média	16,810	4,350	19,300
	Mediana	13,000	3,000	19,500
	Desvio-padrão	11,590	3,760	3,593
	Mínimo	3,000	1,000	13,000
	Máximo	59,000	14,000	26,600
	Assimetria	2,080	1,532	0,243
	Curtose	5,141	1,826	-0,784

Tabela 9. Medidas-resumo da Idade, Tempo de doença e IMC dos pacientes.

Grupo	Medidas-resumo	Idade	Tempo de doença	IMC
Controle	N	14,000		
	Média	59,210		
	Mediana	58,000		
	Desvio-padrão	5,590		
	Mínimo	51,000		
	Máximo	68,000		
	Assimetria	0,299		
	Curtose	-1,197		
DM2	N	85,000	36,000	25,000
	Média	58,210	9,170	29,568
	Mediana	59,000	7,500	30,000
	Desvio-padrão	10,000	6,920	5,621
	Mínimo	31,000	1,000	20,880
	Máximo	77,000	30,000	42,600
	Assimetria	-0,366	0,951	0,589
	Curtose	-0,266	0,710	0,185
IGt	N	31,000		
	Média	57,900		
	Mediana	56,000		
	Desvio-padrão	8,420		
	Mínimo	43,000		
	Máximo	76,000		
	Assimetria	0,365		
	Curtose	-0,358		

Tabela 10. Medidas-resumo do LDL e Ac dos pacientes.

Grupo	Medidas-resumo	LDL-	Ac (IgG)
Controle	N	12	12
	Média	15,637	0,214
	Mediana	14,694	0,213
	Desvio-padrão	3,191	0,073
	Minimum	12,235	0,114
	Maximum	22,432	0,322
	Skewness	1,267	0,185
	Curtose	0,953	-1,140
DM1	N	31	31
	Média	37,660	0,598
	Mediana	30,790	0,622
	Desvio-padrão	19,098	0,179
	Mínimo	19,146	0,282
	Máximo	112,490	1,021
	Assimetria	2,159	-0,041
	Curtose	6,769	-0,305

Tabela 11. Medidas-resumo do LDL-e Ac dos pacientes.

Grupo	Medidas-resumo	LDL-	Ac (IgG)
Controle	N	14	14
	Média	22,656	0,260
	Mediana	21,892	0,255
	Desvio-padrão	5,397	0,056
	Mínimo	15,802	0,150
	Máximo	30,076	0,355
	Assimetria	0,288	-0,175
	Curtose	-1,703	-0,360
DM2	N	88	88
	Média	57,167	0,755
	Mediana	46,006	0,758
	Desvio-padrão	39,154	0,337
	Mínimo	11,846	0,220
	Máximo	275,005	1,469
	Assimetria	2,582	0,206
	Curtose	10,376	-1,132
IGt	N	32	32
	Média	42,516	0,577
	Mediana	42,201	0,480
	Desvio-padrão	10,741	0,257
	Mínimo	17,786	0,241
	Máximo	75,621	1,375
	Assimetria	0,664	1,430
	Curtose	2,517	1,944

Anexo 2. Tabelas das Análises de Correlação

Tabela 12. Matriz das estimativas dos coeficientes de correlação linear de Pearson no grupo controle 1.

		LDL eletronegativa	Ac (IgG)
GLICOSE	Coeficiente de correlação	-0,098	0,561
	Nível descritivo (p)	0,762	0,058
	N	12	12
TG	Coeficiente de correlação	-0,057	-0,301
	Nível descritivo (p)	0,861	0,342
	N	12	12
CT	Coeficiente de correlação	0,335	-0,677
	Nível descritivo (p)	0,287	0,016
	N	12	12
HDL	Coeficiente de correlação	0,346	-0,265
	Nível descritivo (p)	0,270	0,406
	N	12	12
LDL	Coeficiente de correlação	0,364	-0,693
	Nível descritivo (p)	0,245	0,012
	N	12	12
VLDL	Coeficiente de correlação	-0,072	-0,298
	Nível descritivo (p)	0,825	0,346
	N	12	12

Tabela 13. Matriz das estimativas dos coeficientes de correlação linear de Pearson no Grupo DM1

		LDL eletronegativa	Ac (IgG)
GLICOSE	Coeficiente de correlação	0,226	-0,361
	Nível descritivo (p)	0,222	0,046
	N	31	31
TG	Coeficiente de correlação	-0,019	0,324
	Nível descritivo (p)	0,921	0,076
	N	31	31
CT	Coeficiente de correlação	-0,070	-0,053
	Nível descritivo (p)	0,708	0,775
	N	31	31
HDL	Coeficiente de correlação	-0,151	-0,128
	Nível descritivo (p)	0,417	0,493
	N	31	31
LDL	Coeficiente de correlação	-0,017	-0,050
	Nível descritivo (p)	0,929	0,788
	N	31	31
VLDL	Coeficiente de correlação	-0,028	-0,014
	Nível descritivo (p)	0,882	0,940
	N	31	31
Hb-glicada	Coeficiente de correlação	0,308	0,043
	Nível descritivo (p)	0,092	0,819
	N	31	31
FRUTOSAM	Coeficiente de correlação	0,119	0,060
	Nível descritivo (p)	0,523	0,747
	N	31	31
IDADE	Coeficiente de correlação	-0,045	-0,169
	Nível descritivo (p)	0,808	0,362
	N	31	31
Tempo de doença	Coeficiente de correlação	-0,152	-0,092
	Nível descritivo (p)	0,413	0,623
	N	31	31
IMC	Coeficiente de correlação	0,005	-0,250
	Nível descritivo (p)	0,979	0,200
	N	28	28

Tabela 14. Matriz das estimativas dos coeficientes de correlação linear de Pearson no grupo controle 2

		LDL eletronegativa	Ac (IgG)
GLICOSE	Coeficiente de correlação	-0,1	0,227
	Nível descritivo (p)	0,733	0,435
	N	14	14
TG	Coeficiente de correlação	-0,112	0,113
	Nível descritivo (p)	0,702	0,7
	N	14	14
CT	Coeficiente de correlação	0,155	0,125
	Nível descritivo (p)	0,596	0,671
	N	14	14
HDL	Coeficiente de correlação	0,143	-0,174
	Nível descritivo (p)	0,625	0,553
	N	14	14
LDL	Coeficiente de correlação	0,14	0,238
	Nível descritivo (p)	0,633	0,413
	N	14	14
VLDL	Coeficiente de correlação	-0,112	0,113
	Nível descritivo (p)	0,702	0,7
	N	14	14
FRUTOS	Coeficiente de correlação	-0,257	-0,322
	Nível descritivo (p)	0,374	0,262
	N	14	14
IDADE	Coeficiente de correlação	-0,173	-0,13
	Nível descritivo (p)	0,555	0,658
	N	14	14

Tabela 15. Matriz das estimativas dos coeficientes de correlação linear de Pearson no grupo DM2.

		LDL eletronegativa	Ac (IgG)
GLICOSE	Coeficiente de correlação	-0,068	-0,056
	Nível descritivo (p)	0,536	0,608
	N	86	86
TG	Coeficiente de correlação	0,031	0,154
	Nível descritivo (p)	0,777	0,155
	N	87	87
CT	Coeficiente de correlação	0,111	0,089
	Nível descritivo (p)	0,302	0,408
	N	88	88
HDL	Coeficiente de correlação	0,027	0,153
	Nível descritivo (p)	0,807	0,163
	N	85	85
LDL	Coeficiente de correlação	0,021	-0,052
	Nível descritivo (p)	0,850	0,635
	N	84	84
VLDL	Coeficiente de correlação	0,028	0,131
	Nível descritivo (p)	0,799	0,236
	N	83	83
Hb-glicada	Coeficiente de correlação	0,029	-0,055
	Nível descritivo (p)	0,785	0,611
	N	88	88
FRUTOSAM	Coeficiente de correlação	-0,094	0,417
	Nível descritivo (p)	0,386	0,000
	N	88	88
IDADE	Coeficiente de correlação	0,081	-0,031
	Nível descritivo (p)	0,460	0,778
	N	85	85
Tempo de doença	Coeficiente de correlação	-0,245	0,045
	Nível descritivo (p)	0,150	0,795
	N	36	36
IMC	Coeficiente de correlação	0,231	0,178
	Nível descritivo (p)	0,267	0,394
	N	25	25

Tabela 16. Matriz das estimativas dos coeficientes de correlação linear de Pearson no grupo IGt.

		LDL eletronegativa	Ac (IgG)
GLICOSE	Coeficiente de correlação	-0,005	0,348
	Nível descritivo (p)	0,977	0,051
	N	32	32
TG	Coeficiente de correlação	0,045	0,222
	Nível descritivo (p)	0,805	0,221
	N	32	32
CT	Coeficiente de correlação	0,117	0,330
	Nível descritivo (p)	0,523	0,065
	N	32	32
HDL	Coeficiente de correlação	-0,058	0,147
	Nível descritivo (p)	0,754	0,423
	N	32	32
LDL	Coeficiente de correlação	0,100	0,334
	Nível descritivo (p)	0,588	0,062
	N	32	32
VLDL	Coeficiente de correlação	0,085	0,216
	Nível descritivo (p)	0,643	0,234
	N	32	32
Hb-glicada	Coeficiente de correlação	-0,024	0,361
	Nível descritivo (p)	0,898	0,046
	N	31	31
FRUTOSAM	Coeficiente de correlação	0,037	-0,023
	Nível descritivo (p)	0,840	0,901
	N	32	32
IDADE	Coeficiente de correlação	0,009	0,279
	Nível descritivo (p)	0,963	0,129
	N	31	31
Glicemia 2H	Coeficiente de correlação	0,037	0,137
	Nível descritivo (p)	0,856	0,496
	N	27	27

Anexo 3.Reagentes e Soluções

A. Antioxidantes para preservação de amostras

Solução de Fenil metil sulfonil fluoreto (PMSF) 0,5M em metanol.

Dissolver 0,871 g de PMSF ($C_7H_7FO_2S$, PM: 174,2) em 10 mL de metanol (CH_3OH) PA. Armazenar em geladeira (4-8°C).

Acrescentar 2 μ l/mL de plasma (concentração final no plasma= 1mM).

Solução de Benzamidina 1M em metanol

Dissolver 1,566 mg de Benzamidina ($C_7H_9ClN_2$, PM: 156,6) em 10 mL de metanol PA. Armazenar em geladeira (4-8°C).

Acrescentar 2 μ l/mL de plasma (concentração final no plasma= 2mM).

Solução de Hidroxitolueno Butilado (BHT) 0,01M em metanol

Dissolver 22,04 mg de BHT ($C_{15}H_{24}O$, PM: 220,4) em 10 ml de metanol PA. Armazenar em geladeira (4-8°C).

Acrescentar 1 μ l/mL de plasma (concentração final no plasma= 20mM).

Solução de Aprotinina 0,1% em metanol

Solução estoque (0,2%): Reconstituir um frasco com 10g de aprotinina ($C_{284}H_{432}N_{84}O_{79}S_7$, PM: 6511,92) liofilizada com 5,0 mL de metanol PA. Armazenar em geladeira (4-8°C)

Solução de Uso (0,1%): Diluir a solução estoque 1:2 com metanol PA. Armazenar em geladeira (4-8°C).

Acrescentar 2 μ l/mL de plasma (concentração final no plasma= 2 μ g/mL).

B. Tampões e substratos para ELISA

PBS (salina tamponada - fosfato) – solução estoque

Na_2HPO_4	20,9 g
KH_2PO_4	3,0 g
NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
H_2O qsp	1000 mL

PBS – solução de uso

Diluir o PBS – solução estoque 1:10

Tampão citrato-fosfato 0,1M pH 4,2

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	21,2 g
H_2O qsp	1000 mL

Tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9,6

Na_2CO_3	0,795 g
NaHCO_3	1,465 g
NaN_3	0,1 g
H_2O qsp	1000 mL

Tampão Tris (PM121,1)-HCl 0,05M pH 7,6

HCl 1N	37 mL
TRIS (Hidroximetil)-aminometano	6,1 g
H_2O qsp	1000 mL

Solução de leite-PBS a 5%

Leite em pó desnatado	5,0 g
PBS - solução de uso	100 mL

Aquecer até a fervura e resfriar em água corrente antes do uso.

Solução de leite-PBS a 1%

Diluir a solução de leite-PBS a 5% 1:5 com PBS - solução de uso

ABTS (2,2'- azino-bis (ácido3-etil benzotiazolino-6-sulfônico)

Preparar no momento do uso

Tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 4,2	5,0 mL
ABTS ($C_{18}H_{18}N_4O_6S_4(NH_3)_2$)	2,65 g
H ₂ O ₂	1,25 mL

Solução de PBS-TWEEN 0,05%

TWEEN 20 (polioxietilenosorbitan)	0,5 mL
Solução PBS de uso qsp	1000 mL

TBS (salina tamponada-TRIS) pH 7,4 – solução estoque

TRIS	6,055 g
NaCl	8,775 g
H ₂ O qsp	1000 mL

TBS pH 7,4 – solução de uso

Diluir a solução estoque 1:10

Solução de leite-TBS a 5%

Leite em pó desnatado	5,0 g
TBS - solução de uso	100 mL

Aquecer até a fervura e resfriar em água corrente antes do uso.

Solução de leite-TBS a 1%

Diluir a solução de leite-TBS a 5% 1:5 com Tampão PBS de uso.

Solução TBS – TWEEN 0,05%

TWEEN	0,5 mL
TBS - solução de uso qsp	1000 mL

Solução de Luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinediona)

Luminol ($C_8H_7N_3O_2$)	208,75 mg
p-iodofenol	91,0 mg
Tampão TRIS – HCl pH 8,5 qsp	500 mL

Substrato de Luminol

Preparar no momento do uso

Solução de Luminol	0,5 mL
H ₂ O	2,5 mL
H ₂ O ₂	0,75 mL

C. Conjugado (Anticorpo biotinilado)

Reagentes

Biotina ($C_2O_4H_3ON_4O_6$, PM: 454,5): éster N-hidroxisuccinimida do ácido D.biotinoil-e-aminocapróico (ROCHE®, Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, IN, USA).

Solução de biotina-DMSO (dimetilsulfóxido) 10 mg/ml

$C_2O_4H_3ON_4O_6$	2 mg
DMSO (C_2H_6SO)	0,2 mL

Tampão borato de sódio ($Na_2B_4O_7$, PM: 201,22) 0,1M, pH 8,8

$Na_2B_4O_7$	20,12 g
H_2O qsp	1000 mL

Solução de Cloreto de Amônio (NH_4Cl , PM: 53,5) 1M

NH_4Cl	0,535 g
H_2O qsp	100 mL

Biotinilação do mAb3D1036

- Dialisar o anticorpo monoclonal em tampão borato de sódio
- Determinar a concentração do anticorpo dialisado (em mg/mL de proteínas)

Proteínas (mg/mL) = Absorbância em 280 nm x coeficiente de extinção molar

Coeficiente de extinção molar = 0,625

- Adicionar 250 µg de biotina em DMSO para cada mg do anticorpo (em mg de proteínas)
- Incubar 4 horas em temperatura ambiente
- Adicionar 20 µl de NH₄Cl 1M para cada 250 µg de biotina
- Dialisar em PBS pH 7,2 durante 24 horas, com trocas após 12 horas e em seguida a cada 6 horas.

D. Tampão de diálise – solução estoque

NaCl	175,32 g
EDTA	7,44 g
TRIS	12,11 g
NaN ₃	1,95 g
H ₂ O qsp	2000 mL

Acertar em pH 7,4 com HCl.

Solução de uso: diluir a solução estoque 1:10.

E. Solução de NaCl 1M

NaCl	58,5 g
H ₂ O	1000 mL

F. Tampão TRIS 20 mM pH 7,8

TRIS	2,422 g
H ₂ O qsp	1000 mL

Ajustar o pH com HCL e filtrar com filtro de 0,22 μ .

G. Tampão TRIS-NaCl 20 mM/1M pH 7,8

TRIS	2,422 g
NaCl	58,44 g
H ₂ O qsp	1000 mL

Ajustar o pH com HCL e filtrar com filtro de 0,22 μ .

Anexo 3. Método de Lowry (J. Biol. Chem. 193:265, 1951)**Solução A**

Na ₂ CO ₃	20 g
NaOH	4 g
H ₂ O qsp	1000 mL

Solução B

CuSO ₄ .5H ₂ O	2 g
H ₂ O qsp	100 mL

Solução C

Tartarato de sódio	4 g
H ₂ O qsp	100 mL

Mistura reativa

Solução A	100 mL
Solução B	1,0 mL
Solução C	1,0 mL

Reativo de Folin-Ciocalteu – solução de uso

Diluir a solução estoque 1:3.

Solução de albumina bovina 20%

Padrões: soluções de albumina 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL a partir da solução de albumina 20 %.

Procedimento

Tubos	Branco	Amostra	
H2O	100		µL
Amostra		100	µL
Mistura reativa	1,0	1,0	L
Misturar, incubar 10 min. em TA			
Reativo de Folin de uso	100	100	ml
Misturar, incubar 10 min. em TA. Ler em 600 nm			

Cálculos

Proteínas ($\mu\text{g/ml}$) = ABS x fator de calibração (F)

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE SAÚDE DA REGIÃO
METROPOLITANA DA GRANDE SÃO PAULO
INSTITUTO "DANTE PAZZANESE" DE CARDIOLOGIA

Av. Dante Pazzanese, 500 (Ibirapuera) - Cx. Postal, 215 - São Paulo
Telefone: 5085-4000

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Data da Aprovação: **04 de Dezembro de 2001**

Título do Protocolo: **"DETERMINAÇÃO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE ELETRONEGATIVA (LDL-) E ANTICORPOS ANTI-LDL- EM PACIENTES INTOLERANTES À GLICOSE E DIABÉTICOS"**

Nomes dos Investigadores: Dr. Marcelo Chiara Bertolami e Dr. André Arpad Falud

Aprovação do Comitê de Ética de Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia avaliou o Protocolo de Estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Paciente, em **04 / dezembro / 2001** e o aprovou.

Membros do Comitê de Ética em Pesquisa

Dr. Pedro Silvio Farsky
Enfermeira Fernanda Anajas Caldas Farias
Enfermeira Célia Hiromi Shiotsu
Dra. Claudia Gravina Taddei
Dra. Clarisse Ogawa Índio do Brasil
Dr. João Manoel Rossi Neto
Engenheiro Eddie Luís Alonso Júnior
Sr. Peterney Neves da Silva

Cargo
Presidente
Secretária
Membro Efetivo
Membro Efetivo
Membro Efetivo
Membro Efetivo
Membro Efetivo
Membro Efetivo

Dr. Pedro Silvio Farsky
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
CRM: 55.073

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE SAÚDE DA REGIÃO
METROPOLITANA DA GRANDE SÃO PAULO
INSTITUTO "DANTE PAZZANESE" DE CARDIOLOGIA

Av. Dante Pazzanese, 500 (Ibirapuera) - Cx. Postal, 215 - São Paulo
Telefone: 5085-4000

São Paulo, 04 de dezembro de 2001

Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia

Caro Dr. Marcelo Chaira Bertolami
Dr. André Arpad Falud

Recebi a orientação fornecida relativa às orientações da Conferência Internacional de Harmonização (ICH) para Boas Práticas Clínicas (GCP) para IRB/IEC. Minha assinatura abaixo certifica que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia funciona de acordo com as orientações para GCP e toda Legislação e Regulamentação pertinentes.

Dr. Pedro Silvio Farsky

04 de dezembro de 2001

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
CRM: 55.073

26.11.2001

Data

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

APROVADO PELA CONEP/MS EM 30/04/97-REF: CONEX/CARTA 32 DDC

Rua Dr. Cassiano Moraes Júnior, 1.111 Santa Cecília CEP 01277-900 São Paulo - SP

FAX (11) 3224-0122 Ramal 3502 - Fax - Ramal: 5710 E-mail: conep@conep.org.br

São Paulo, 23 de outubro de 2002.

Projeto nº 195/02
Informe este número para identificar
seu projeto no CIP

Ilmo.(a).Sr.(a)

Dr.(a) Osmar Monte

Departamento de Medicina

O Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMSP, reunido no dia 16/10/2002 e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa:

"Determinação da lipoproteína de baixa densidade eletronegativa (LDL-) e anticorpos anti-LDL- em pacientes diabéticos", emitiu parecer enquadrando-o na seguinte categoria:

- ☒ Aprovado inclusive o TCLE:
- ☐ Com pendência modificações ou informação relevante a serem atendidas em 60 dias:
- ☐ Retirado, por não ser reapresentado no prazo determinado:
- ☐ Não aprovado: e
- ☐ Aprovado inclusive o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) e

encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa- MS-CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias. Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.

Prof. Dr. Daniel R. Muffoz
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa-
ISCMSP

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

APROVADO PELA CONEP/MS EM 30/04/97-REF: ONE/CARTA 32 DOC.

Rua Dr. Cesário Mota Júnior, 112 Santa Cecília CEP 01277-900 São Paulo - SP

PABX (11) 32240122 Ramal: 5502 - Fax: Ramal: 5710 E-mail: et.conep@ismsp.org.br

São Paulo, 21 de outubro de 2012

Projeto n° 198/02
Informe este número para identificar
seu projeto no CEP

Ilmo.(a).Sr.(a)

Dr.(a) Osmar Monte

Departamento de Medicina

O Comitê de Ética em pesquisa, em obediência ao que determina a Resolução 196/96, deverá encaminhar a CONEP/MS, semestralmente, a relação dos projetos de pesquisa em seres humanos em andamento nos Departamentos desta Instituição. Solicitamos a V.Sª informar sobre o andamento do seu projeto a cada seis meses, isto é, se já foi concluído, se foi suspenso ou se ainda está em andamento; neste último caso comunicar qual o tempo previsto para conclusão do mesmo.

Contando com a sua colaboração, subscrevemo-nos

Atenciosamente

Prof. Dr. Daniel R. Muñoz

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

ISMSP

Anexo 4. TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO DE PESQUISA: DETERMINAÇÃO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE ELETRONEGATIVA (LDL⁻) E ANTICORPOS ANTI-LDL⁻ EM PACIENTES INTOLERANTES À GLICOSE E DIABÉTICOS

I. Proposta de Estudo

O objetivo principal deste trabalho é verificar o aumento da lipoproteína de baixa densidade eletronegativa (LDL⁻) em pacientes intolerantes à glicose e diabéticos através de imunoensaio ELISA, assim como perfil lipídico e hemoglobinas glicadas, comparando -se com pacientes normais. Pacientes com altas taxas glicêmicas tem maior probabilidade de desenvolver aterosclerose e outras doenças cardiovasculares.

II. Procedimentos a serem seguidos serão:

Se concordar, o paciente participará desta pesquisa. Em cada uma das coletas serão retirados cerca de 20 ml de sangue no total. A coleta será sempre realizada por pessoal treinado, incluindo funcionários do laboratório, médicos ou bioquímicos ligados a este projeto. Estas amostras deverão ser obtidas, sempre que possível, juntamente com os demais exames laboratoriais solicitados normalmente pelo médico para não provocar desconforto adicional ao paciente. Estas amostras serão analisadas no Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP. Outros

resultados de exames que o paciente tenha feito, poderão ser analisados para as conclusões finais deste trabalho.

III. Desconforto e riscos

A coleta de sangue e os materiais utilizados não oferecem nenhum risco de contaminação aos pacientes, uma vez que todo material é descartável. Após a coleta alguns pacientes podem vir a apresentar manchas roxas, inflamação ou dor no local de onde o sangue foi retirado. De maneira menos comum, podem ocorrer tonturas ou desmaios durante o procedimento. Tais imprevistos serão prontamente atendidos pelo pessoal responsável pela coleta e não representam risco para o paciente.

IV. Confiabilidade

A participação neste estudo é voluntária, tendo o (a) paciente liberdade para recusar ou retirar seu consentimento para fazer parte do mesmo no momento que desejar, sem que haja prejuízo ao seu atendimento.

Não ocorrerá qualquer tipo de custo adicional com os exames ou procedimentos de coleta relacionados com o projeto.

Os pacientes que participarem do projeto, em hipótese alguma terão sua identidade divulgada. Também serão mantidas em sigilo todas as informações obtidas e que estejam relacionadas com a privacidade dos pacientes.

V. Acesso às informações

Os pesquisadores e o Comitê de Bioética que aprovaram este estudo se comprometem a fornecer todas as informações que venham a obter durante a pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**PROJETO: DETERMINAÇÃO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE ELETRONEGATIVA (LDL⁻) E ANTICORPOS ANTI-LDL⁻ EM PACIENTES INTOLERANTES À GLICOSE E DIABÉTICOS**

Responsável pelo projeto: Elaine Apolinario

Eu, _____ RG _____

internado na Irmandade da Santa Casa de Misericórdia, declaro que em ____/____/____ concordei em participar como grupo de estudo do projeto acima nomeado.

O responsável pelo projeto explicou-me o seguinte:

1. O estudo implica em colher amostras de sangue para análises bioquímicas.
2. Resultados de exames laboratoriais e outros exames complementares realizados rotineiramente poderão ser utilizados no estudo.
3. A minha participação neste estudo é voluntária, tendo a liberdade para recusar ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo ao meu atendimento.
4. O sigilo da minha participação, assim como todas as informações obtidas serão preservadas.

São Paulo, ____ de _____ de 200____.

Assinatura do Paciente

Assinatura do Responsável

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: DETERMINAÇÃO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE ELETRONEGATIVA (LDL⁻) E ANTICORPOS ANTI-LDL⁻ EM PACIENTES INTOLERANTES À GLICOSE E DIABÉTICOS

Responsável pelo projeto: Elaine Apolinario

O responsável pelo projeto explicou-me o seguinte:

5. O estudo implica em colher amostras de sangue para análises bioquímicas.
6. Resultados de exames laboratoriais e outros exames complementares realizados rotineiramente poderão ser utilizados no estudo.
7. A minha participação neste estudo é voluntária, tendo a liberdade para recusar ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo ao meu atendimento.
8. O sigilo da minha participação, assim como todas as informações obtidas serão preservadas.

São Paulo, _____ de _____ de 200____.

Assinatura do Paciente

Assinatura do Responsável

Anexo 4. Dados Clínicos

Nome: _____ sexo ()
 Idade ____ N° ____

RG/Prontuário: _____

Endereço:

1º coleta (A) -

Local:

_____ data: ____ / ____ / ____ hora: _____

2º coleta (B) -

Local:

_____ data: ____ / ____ / ____ hora: _____

Exames Laboratoriais

Dia/hora	/	/	/	/
COL				
HDL				
LDL				
TRIG				
Glicose				
LDL ⁻				
Anti LDL ⁻				

Tabagismo () Hipertensão () Diabetes ()

Medicamentos

pré-

utilizados: _____

Quadros associados: _____ clínicos

Observações: _____

8. Referências Bibliográficas

1. AHMED, E., NITYANAND, S., MUSTAFA, A., BRISMAR, K., LEFVERT, A.K. Antibodies and circulating immune complexes in type 1 diabetes mellitus: increase prevalence and relation to vascular complications. Clin. Exp Immunol., v 115, p 255-259, 1999.
2. ANASTASIOU, E., LEKAKIS J.P., ALEVISAKI, M., PAPAMICHAEL, C.M., MEGAS, J., SOUVATZOGLOU, A., Impaired endothelium dependent vasodilation in women with previous gestational diabetes. Diabetes Care., v 21; p 2111-5; 1998.
3. AUSTIN, M. A. BRESLOW, J.L.; HENNEKENS, C.H. BURING, J.E. WILLETT, W.C.; KRAUS, R. M. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. JAMA. 260:1917-1921, 1988a.
4. BAYNES, J. W., Role of oxidative stress in development of complications of diabetes. Diabetes, v. 40, p. 405-12, 1999.
5. BOWIE, A.; OWENS, D., COLLINS, P., JOHNSON, A. TOMKIN, G.H. Glycosylation low density lipoprotein is more sensitive to oxidation: implications for the diabetic patient ? Atherosclerosis., v 102, p 63-67, 1993.
6. BROWN, M. S.; BASU, S. K.; FALCK, J. R.; HO, Y. K. & GOLDSTEIN, J. L. The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages. J. Supram Med, v. 13, p.67-81, 1980.

7. CAIXAS; A., ORDOÑEZ LLANOS, J., de LEIVA, A., et al. Improvement of glicemic control in diabetes decreases the atherogenic small dense LDL particles. *Diabetes*, v 46, p 1207-1213, 1997.
8. CALLES-ESCANDON. J., CIPPOLA, M., Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr Rev*, v. 22, p.36-52, 2001
9. CAZOLLATO, G.; AVOGARO, P.; BITTOLO-BON G., Characterization of more electronagatively charged LDL subfraction by ion exchange HPLC. *Free Rad. Biol. Med.*, v.11, p.247-253, 1994.
10. CERIELLO, A., MOTZ, E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, Feb, 2004; 10.1161/01. ATV.0000122852.22.604.78.
11. CHAPMAN, M. J.; LAPLAUD, P. M.; LUC, G.; FORGEZ, D.; BRUCKERT, E. GOULINET, S.; LAGRANGE, D. Further resolution of the low density lipoprotein spectrum in normal human plasma: physicochemical characteristics of discrete subspecies separated by density gradient ultracentrifugation. *J. Lipid. Res.*, v.29, p.442-458, 1988.
12. CIARLA, M.V., BOCCIARELLI, A., Di GREGORIO, S., TORDI, A., COTRONEO, P., MARRA, G., GHIRLANDA, G., STROM, R., Autoantibodies and endothelial dysfunction in well-controlled, uncomplicated insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Atherosclerosis* v 158, p 241-246, 2001.

13. CONSENTINO, F., HISHIKAWA, K., KATUSIK, Z.S., LUSCHER T.F.,
High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide
anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation*, v. 96,
p.25-8, 1997.
14. CONSENTINO, F., LUSCHER, T.F., Endothelial dysfunction in diabetes
mellitus. *J. Cardiovascular Pharmacol* , suppl 3, p.S54-S61, 1998.
15. DATO, S.M.A., REBOLLEDO, O.R. La glicacion y glicoxidacion de las
lipoproteínas, su importancia en la Diabetes Mellitus. *Medicina*, v.60,
p.645-656, 2000.
16. DAVIDSON, M.B.; PETERS, A L.; SCHRIGER, D.L. An alternative
approach to the diagnosis of diabetes with review of the literature.
Diabetes Care. v. 18, p. 1065-1071, 1995.
17. de GRAAF; J., ,HAK-LEMMERS, H.T.M., HECTORS, M.P.C.,
DEMACKER, P.N.M., HENDRICKS, J.C.M., STALENHOEF, A.F.H.
Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low lipoprotein
subfraction in healthy subjects. *Arteriosclerosis*, v 11, p298-306, 1991.
18. DEMUTH; K., MYARA, I., CHAPPEY, B. et al. A cytotoxic electronegative
LDL subfraction is present in plasma human. *Arterioscler. Thromb. Vasc.
Biol.* v16, p 773-783, 1996.

19. ESTERBAUER, H.; GEBICKI, J.; PUHL, H.; JURGENS, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.*, v.13, p.341-390, 1992.
20. FEILLET, C., ROCHE, B., TAUVERON, I., et al; Susceptibility to oxidation and physicochemical properties of LDL in insulin-dependent diabetes. *Atherosclerosis*. v 136, p405-407, 1998.
21. FESTA, A; KOOP, H. P.; SCHERNTHANER, G.; MENZEL, E. J. Autoantibodies to oxidised low density lipoproteins in IDDM are inversely related to metabolic control and microvascular complications. *Diabetologia*, v. 41, p. 350-356, 1998.
22. FRIEDLANDER, Y.; KIDRON, M.; CASLAKE, M.; LAMB, T.; McCONNELL, M.; BAR-ON, H. Low density lipoprotein particle size and risk factors of insulin resistance syndrome. *Atherosclerosis*, v.148, p. 141-149, 2000.
23. GABIR, M.M.; HANSON, R. L.; DABELEA, D.; IMPERATORE, G.; ROUMAIN, J.; BENNETT, P. H.; KNOWLER, W.C. The 1997 America Diabetes Association and 1999 World Health Organization criteria for hiperglicemia in the diagnosis and prediction of diabetes. *Diabetes Care*, v.23, p. 1108-1112, 2000.

24. GOPAUL, N.K., MANRAJ, M.D., HÉBÉ, A., LEE KWAL YAN S., JOHNSTON, A. CARRIER, M.J., Oxidative stress could precede endothelial dysfunction and insulin resistance in indians Mauritan with impaired glucose metabolism. *Diabetologia*, v 44, p.706-12, 2001

25. HODIS, H, N.; KRAMSCH, D. M.; AVOGARRO, P.; BITTOLO-BON, G.; CAZZOLATO, G.; HWANG, J.; PETERSON, H, SEVANIAN, A. Biochemical and citotoxic characteristic of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL-). *J. Lipid Res.*, v. 35, p. 669-677, 1994.

26. HODIS, H, N.; KRAMSCH, D. M.; AVOGARRO, P.; BITTOLO-BON, G.; CAZZOLATO, G.; HWANG, J.; PETERSON, H, SEVANIAN, A. Biochemical and citotoxic characteristic of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL-). *J. Lipid Res.*, v. 35, p. 669-677, 1994.

27. HSUEH, W.A., LAW, R.E., Cardiovascular Risk Continuum: Implications of Insulin Resistance and Diabetes. *Am. J. Med*, v.105 (1A): 4S-14S, 1998.

28. JAIN, S.K., McVIE, R., SMITH, T., Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of type 1 diabetic children. *Diabetes Care*, v 23, p 1389-1394, 2000.

29. KANNEL, W. B., McGee D.L., Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA*. v 241, p. 2035-2038. 1979

30. KIRCHENHAUSEN, T.G. FLESS, G.; SCANU, A.M. The ultracentrifugation heterogeneity of low- density lipoproteins: experimental facts and interpretation: a minireview. *Lipids*. 15:464-467, 1980

31. KRAMER-GUTH, A.; QUASCHNING, T.; GALLE, J.; BAUMSTARK, M.W.; KONIGER, M.; MAUCK, P.; SCHOLL-MEYER, P.; MARZ, W.; WANNER, C. Strutural and compositional modifications of diabetic low density lipoproteins influence their receptor-mediated uptake by hepatocytes. *Eur. J. Clin. Invest.* v. 27, p. 460-468, 1997.

32. LYONS; T.J., Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Diabetes*, v 41 p 68-73, 1992.

33. MAKIMATTILA, S.; LUOMA, J.S.; YLA-HERTUALLA, S.; BERGHOLM, R.; UTRIAINEN, T.; VIRKAMAKI, A; MANTYSAARI, M.; SUMMANEN, P.; YKI-JARVINEN. Autoantibodies against oxidized LDL and endothelium-dependent vasodilation in insulin-dependent diabetes mellitus. Helsinki. *Atherosclerosis*. v.147, p.115-122, 1999.

34. MATTEUCCI, E., GIAMPIETRO, O. Oxidative stress in families of type1 diabetic patients. *Diabetes Care*, v. 8, p. 1182-6, 2000.

35. MELTZER, S., LEITER, L., DANEMAM D., GERSTEIN,H.C., LAU D., LUDWIG, S. ET AL . Clinical practice guidelines for the management of diabetes in Canada. *Can Med Assoc J.*, v 159, p. S1-S29.1998.

36. MORO, E.; ALESSANDRINI, P.; ZAMBON, C.; PIANETTI, S.; PAIS, M.; CAZZOLATO, G.; BITTOLO-BON, G. Is glycation of low density lipoproteins in patients with type 2 diabetes mellitus a LDL pre-oxidative condition? *Diabetic Medicine*. v. 16, p. 663-669, 1999

37. MORO, E.; ZAMBON, C.; PIANETTI, S.; CAZZOLATO, G.; PAIS, M.; BITTOLO-BON, G. Electronegative low density lipoprotein subform (LDL-) is increase in type 2 (non-insulin-dependent) microalbuminuric diabetic patients and closely associated with LDL susceptibility to oxidation. *Acta Diabetologia*. v. 35, p. 161-164, 1998.

38. MOWRI, H.O.; FREI, B.; KEANEY, J.F. Glucose enhancement of LDL oxidation is strictly metal ion dependent. *Free Rad. Biol. Med.* v. 29, p. 379-388, 2000.

39. NATIONAL DIABETES DATA GROUP: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*. v. 28, p. 1039-1057, 1979.

40. NIEMEIJER-KANTERS, S.D.J.M., BANGA, J.D., ERKELENS, D.W. Lipid-lowering therapy in Diabetes Mellitus. *The Netherlands Journal of Medicine*. v.58, p.214-222, 2001

41. NIGON, F.; LESNIK, P.; ROUIS, M.; CHAPMAN, M.J. Discrete subspecies of human low density lipoprotein are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor. *J. Lipid Res.* 32:1741-1753, 1991

42. NOWICKA, G.; BRUNING, T.; GROTHAUS, B.; KAHL, G.; SCMITZ, G.
Characterization of apolipoprotein B-containing lipoproteins separated by preparative free flow isotachopheresis. *J. Lipid Res.* 31:1173-1186, 1998.

43. NYSSONEN, K. ; KAIKKONEN J., SALONEN, J.T., Characterization and determinants of an electronegatively charged low density lipoprotein in human plasma. *Scand J.Clin Lab. Invest.* v 56, p 681-689. 1996.

44. PALINSKI, W.; YLA-HERTTUALA, S.; ROSENFELD, M. E.; BUTLER, S. W.; SOCHER, S. A.; PARTHASARATHY, S.; CURTISS, L.K.; WITZTUM, J. Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of low density lipoprotein. *Arteriosclerosis*, v.10, p.325-335, 1990

45. PARASASSI, T.; BITTOLO-BON, G.; BRUNELLI, R.; CAZZOLATO, G.; KRASNOWSKA, E. K.; MEI, G. SEVANIAN, A.; URSINI, F. Loss of apoB-100 secondary structure and conformation in hydroperoxide rich, electronegative LDL-. *Free Rad. Biol. Med.* v. 31, p. 82-89, 2001.

46. PETRIE, J.R., UEDA, S., WEBB, D.J., ELLIOTT, H.L., CONNELL, J.M., Endothelial nitric oxide production and insulin sensitivity. A physiological link with implications for pathogenesis of cardiovascular disease. *Circulation*, v. 93, p. 1477-82, 2000..

47. PINKNEY, J.H., STEHOWER, C.P.A., COPPACK, S.W., YUDKIN, J.S. Endothelial dysfunction cause of the insulin resistance syndrome. *Diabetes*, v. 46, p. S9-S13, 1997.

48. PRAT, L.; TORRES, G.; CARRIÓ, I.; ROCA, M.; RIAMBAU, V.; BERNÁ, L.; ESTORCH, M.; FERRER, I.; GARCÍA, C. Polyclonal In-IgG, 125 I-LDL and 125 I-endothelin-1 accumulation in experimental arterial wall injury. *Eur. J. Nucl. Med.*, v.20, p.1141-1145, 1993.
49. ORANJE, W.A., RONDAS-COLBERS, G.J.W.M., SWENNEN, G.N.M., WOLFFENBUTTEL, B.H.R., Lipid peroxidation in type 2 diabetes: relationship with macrovascular disease? *The Netherlands Journal of Medicine*, v 53, p 61-68, 1998.
50. REGSTROM, J.; TORVALL, P.; NILSSON, J.; LANDOU, C.; HAMSTEN, A. Susceptibility to low density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet*, v.339, p.1183-1186, 1992.
51. SAKATA, N.; UESUGI, N.; TAKEBAYASHI, S.; NAGAI, R.; JONO, T.; HORIUCHI, S.; TAKEYA, M.; ITABE, H.; TAKANO, T.; MYINT, T.; TANIGUCHI, N. Glycooxidation and lipid peroxidation of low-density lipoprotein can synergistically enhance atherogenesis. *Cardiovascular Research*. v. 49, p. 466-475, 2000.
52. SAGUINETTI, S. M.; SCHEREIER, L. E.; ELBERT, A.; FASULO, V.; FERRARI, N.; WIKINSKI, R. L. W. Detection of structural alterations in LDL isolated from type 2 diabetic patients: application of the fructosamine assay to evaluate the extent of LDL glycation. *Atherosclerosis*, v. 143, p. 213-215, 1998.

53. SANCHEZ-QUESADA, J. L.; ORTEGA, H.; PAYES-ROMERO, A.; SERRAT-SERRAT, J.; GONZALEZ-SASTRE, F.; LASUNCION, M. A; ORDONEZ-LIANOS, J. LDL from aerobically-trained subjects shows higher resistance to oxidative to oxidative modification than LDL from sedentary subjects. *Atherosclerosis*, v. 132, p. 207-213, 1997.

54. SANCHEZ-QUESADA, J. L.; PEREZ, A; CAIXAS, A; ORDONEZ-LIANOS, J.; PAYES-ROMERO, A; GONZALEZ-SASTRE, F.; et al. Electronegative low density lipoprotein subform is increased in patients with short duration IDDM and is closely related to glycaemic control. *Diabetologia* . v. 41, p.1469-1476, 1996.

55. SANCHEZ-QUESADA, J. L., PÉREZ, A., CAIXÀS, A., RIGLA, M., PAYÉS, A., BENITEZ, S., ORDÓÑEZ-LLANOS, J., Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, v 86, p 3243-3249, 2001.

56. SARGEANT, L.A., WAREHAM, N.J., BINGHAM, S., DAY, N.E., LUBEN, R.N., OAKES, S., ET AL. Vitamin C and hyperglycemia in the european prospective investigation. *Diabetes Care*, v 23 p 726-732, 2000.

57. SATO, Y., HOTTA, N., SAKAMOTO, N., MATSUOKA, S., OHISHI, N., YAGI, K, Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem Med* , v 21 p 104-107, 1979.

58. SKRHA, J., PRÁZNÝ, M., HILGERTO VÁ, J., WEISERO VÁ, H., Serum a-tocoferol and ascorbic acid concentrations in type 1 and type 2 diabetic patients with and without angiopathy. Clin. Chim. Acta, v 329, p103-108, 2003.
59. SEVANIAN, A.; ASATRYAN, L.; ZIOUZENKOVA, O. Low density lipoprotein (LDL) modification: basic concepts and relationships to atherosclerosis. Blood Purif, v 17: 66-78, 1999.
60. SEVANIAN, A.; BITTOLO-BON, G.; CAZZOLATO, G.; HODIS, H.; HWANG, J.; ZAMBURLINI, A.; MAIORINO, M.; URSINI, F. LDL- is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein. J.Lipid Res. 38:419-428, 1997.
61. SEVANIAN, A.; HWANG, J.; HODIS, H.; CAZZOLATO, G.; AVOGARO, P.; BITTOLO-BON, G. Contribution of an in vivo oxidized LDL to LDL oxidation and its association with dense LDL subpopulations. Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol, v 16: 784-93, 1996.
62. STAMLER, J., VACCARO O., NEATON, J.D., WENTWORTH D. Diabetes over risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. Diabetes Care. v. 16, p.434-444, 1993.

63. STANTON, L. W.; WHITE, R. T.; BRYANT, C. M.; PROTTER, A. A.; ENDERMAN, G. A macrophage Fc receptor for IgG is also a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.*, v.267(31), p. 22446-22451, 1992.

64. STOLK, R.P.; GROBBEE, D.E.; ORCHARD, T.J. Why use the oral glucose tolerance test ? *Diabetes care*. v. 18, p. 1072-1073, 1995

65. THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS: Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. v. 20, p. 1183-1197, 1997.

66. TURK, Z.; LJUBIC, S.; TURK, N.; BENKO, B. Detection of autoantibodies against advanced glycation endproducts and AGE-immune complexes in serum of patients with diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta*. v.303, p. 105-115, 2001.

67. VIRELLA, G.; VIRELLA, I.; LEMAN, R. B.; PRYOR, M. B.; LOPES-VIRELLA, M. F. Anti-oxidized low density lipoprotein antibodies in patients with coronary heart disease and normal healthy volunteers. *Int. J. Clin. Lab. Res.*, v.23, p.95-101, 1993.

68. WORLD HEALTH ORGANIZATION: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: Report of a WHO Consulation. Part 1 Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva, World Health Organization, 1999.

69. YLA-HERTTUALA, S. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesion of rabbit and man. *J. Clin. Invest.*, v. 84, p. 1086-1095, 1989.
70. YLA-HERTTUALA, S.; PALINSKI, W.; BUTLER, W.; PICARD, S.; STEINBERG, D.; WITXTUM, J.L. Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arterioscler. Thromb.*, v. 14, p. 32-40, 1994.
71. YOUNG, M. E. RADDA, G.K., LEIGHTON, B,. Nitric oxide stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle in vitro. *Biochem J.*, v. 322, p. 223-8, 1997.
72. ZIMMET, P.Z. Diabetes epidemiology as a tool to trigger diabetes research and care. *Diabetologia*. v. 42, p. 499-518, 1999.