



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**  
**CENTRO BIOMÉDICO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

Juliana Almeida Pandini

**Avaliação da influência das absorbâncias obtidas em três comprimentos de onda da lipoproteína de baixa densidade sobre sua oxidação *in vitro* em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1.**

**Rio de Janeiro**

**2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Juliana Almeida Pandini

**Avaliação da influência das absorbâncias obtidas em três comprimentos de onda da lipoproteína de baixa densidade sobre sua oxidação *in vitro* em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1.**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marília de Brito Gomes**

**Rio de Janeiro  
2009**

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

P189 Pandini, Juliana Almeida.

Avaliação da influência das absorbâncias obtidas em três comprimentos de onda da lipoproteína de baixa densidade sobre sua oxidação in vitro em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1. / Juliana Almeida Pandini. - 2009.

xiv, 59f. : il.

Orientador : Marília de Brito Gomes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental..

Bibliografia: f. 46-59.

1. Diabetes Mellitus - Teses. 2. Oxidação - Teses. 3. Lipoproteínas LDL - Teses. I. Gomes, Marília de Brito. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.379-008.64

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

---

Assinatura

---

Data

Juliana Almeida Pandini

**Avaliação da influência das absorbâncias obtidas em três comprimentos de onda da lipoproteína de baixa densidade sobre sua oxidação *in vitro* em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1.**

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Faculdade de Ciências Médicas.

Aprovada em: \_\_\_\_\_

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marília de Brito Gomes (Orientadora)  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adriana Ribeiro Silva  
Fundação Oswaldo Cruz

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carla Maria Avesani  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cecília Lacroix de Oliveira  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2009.

## DEDICATÓRIA

A Deus, por sua presença constante em minha vida, e por me dar sabedoria e força em todos os momentos.

A minha mãe e meu “paidrasto”, Giana e Eduardo, meus verdadeiros mestres, o meu eterno reconhecimento pelo exemplo de dignidade e perseverança.

A minha querida irmã, Nathalia, pela admiração, carinho e amizade.

Ao meu noivo, Felipe, companheiro de todos os sonhos, pelo amor, apoio, compreensão, paciência e por sempre acreditar em mim.

## AGRADECIMENTOS

Todas as palavras que eu poderia escrever aqui não demonstram a plenitude da minha gratidão a muitas pessoas. Primeiramente: meus pais... Por me garantirem uma base sólida a partir da onde eu consigo dar meus saltos em direção a um futuro melhor; por me apoiarem em qualquer que fosse a minha escolha, pelo incentivo e pelos puxões de orelha quando eu realmente saía dos trilhos. Para mim é um orgulho ver que consegui deixá-los orgulhosos de mim...

Ao meu noivo Felipe, obrigado não é bem a palavra que eu queria lhe dizer. Eu queria poder encontrar outra forma de lhe falar o quanto você foi e é importante para essa minha conquista e um simples obrigado não possibilitaria isso.

A professora Dr<sup>a</sup> Marília de Brito, minha orientadora, que demonstrou acreditar no meu potencial (sem ao menos me conhecer), quando cheguei à sua sala pedindo uma oportunidade de estágio, pela orientação e por compartilhar seus conhecimentos, minha eterna admiração e gratidão.

Aos professores, Adriana Ribeiro Silva, Cecília Lacroix, Carla Avesani e Eduardo Tibiriçá, por aceitarem gentilmente participar desta banca examinadora.

Ao Edson de Assis, pela imensa ajuda disponibilizando seus conhecimentos para a viabilização deste trabalho.

As amigas Danusa e Miriam, obrigado pelo apoio e carinho durante todo o período e as amigas que cresceram e amadureceram junto a esse trabalho Viviane Dias e Raquel Nunes.

Aos profissionais do ambulatório de Diabetes, personagens da “Doce História do Diabetes” que contribuíram de uma forma direta ou indireta no meu trabalho: enfermeira Eliete Leão, Deise Mezavila, Elisângela Nascimento, Fátima Bevilacqua, Michele Nery, Nicole, Dr<sup>a</sup> Roberta Cobas, e a todos os que passaram por lá nesses 2 anos.

A Amélia Gomes, sempre muito atenciosa, competente e paciente.

A Sandro Sperandei, que contribuiu para as minhas análises estatísticas e pela paciência designada pela difícil tarefa de me fazer entender “bioestatística”.

A todos os pacientes que concordaram participar do estudo.

Aos voluntários, sem os quais não seria possível a realização deste estudo.

A Deus, por permitir que essas pessoas e muitas outras que não foram citadas fizessem parte da minha vida.

É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.

*Theodore Roosevelt*

Se pelo menos pudéssemos viver duas vezes: a primeira vez, para cometer todos os inevitáveis erros; a segunda para lucrar com eles.

*Autor Desconhecido*

Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia. Pois o triunfo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante.

*Charles Chaplin*

A persistência é o caminho do êxito.

*Charles Chaplin*



Este trabalho realizado no Hospital Universitário Pedro Ernesto. As determinações de todos os exames laboratoriais foram efetuadas no Laboratório Central deste hospital e no Laboratório de Pesquisa em Diabetes. A análise da suscetibilidade da lipoproteína de baixa densidade à oxidação *in vitro* foi efetuada no Laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica da FIOCRUZ.

## RESUMO

Pandini, Juliana Almeida. Avaliação da influência das absorvâncias obtidas em três comprimentos de onda da lipoproteína de baixa densidade sobre sua oxidação *in vitro* em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. Rio de Janeiro, 2009. 59p Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental – Clinex. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Com a intensificação do controle glicêmico e maior sobrevivência dos pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), houve mudança progressiva das causas de mortalidade, com maior destaque para a doença cardiovascular (DCV). Em função da LDL oxidada ser considerada ponto fundamental na patogênese da doença aterosclerótica, o presente estudo objetivou avaliar as absorvâncias obtidas nos diferentes comprimentos de onda dos fosfolípidios oxidados e o coeficiente de oxidação da partícula de LDL *in vitro* em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. Foram avaliados 54 pacientes com DM1 com idade de  $29,1 \pm 12,11$  e de duração de doença de  $14,6 \pm 8,43$  e 28 voluntários não diabéticos. Os pacientes e voluntários foram submetidos à avaliação clínica e laboratorial onde foram mensurados perfil lipídico, glicêmico, ácido úrico, níveis pressóricos, excreção urinária de albumina e análise espectrofotométrica da oxidação do LDL colesterol antes e 1, 3, 6 e 24 horas após adição de substância oxidante- sulfato de cobre. Os coeficientes de oxidação (Cox) do LDL dos dois grupos apresentaram leitura semelhante em todos os momentos com diferença significativa entre o tempo basal e após 1h ( $p < 0,001$ ) e entre o momento após 3 e 6 horas após adição de sulfato de cobre ( $p < 0,001$ ) para os grupos avaliados. No modelo de regressão múltipla, o resultado obtido foi o modelo  $Cox = 8,246 - 13,93a - 2,71b + 10,21c$  ( $R^2=0,835$ ), onde “a”, “b” e “c” representam as absorvâncias (205 nm, 232 nm e 280 nm, respectivamente). Concluímos que em nossa amostra os comprimentos de onda 232 nm e 280 nm referentes à leitura dos dienos conjugados e a fração protéica da LDL, respectivamente apresentaram maior importância na determinação do coeficiente de oxidação da partícula.

Palavras-chaves: Diabetes tipo 1, LDL oxidado, Suscetibilidade.

## ABSTRACT

With the intensive glycemic control and longer survival of type 1 diabetes mellitus (T1DM) patients, cardiovascular disease has been the main cause of mortality. Oxidized LDL is considered a critical factor in the atherosclerotic process and the aim of our study was evaluate the absorbance of different wavelengths of oxidized phospholipids and oxidation rate of LDL particles in vitro in T1DM. We studied 54 patients aged  $29.1 \pm 12.11$  years and with a disease duration of  $14.6 \pm 8.43$  years and 28 non-diabetic volunteers. The two groups had carried where they were measured lipid profile, glucose, uric acid, blood pressure, urinary albumin excretion and spectrophotometry analysis of the oxidation of LDL cholesterol before and 1, 3, 6 and 24 hours after addition of substance oxidant copper sulfate. The coefficients of oxidation (Cox) of LDL from both groups had similar reading at all times with a significant difference between the baseline and after 1 hour ( $p < 0.001$ ) and between the time after 3 and 6 hours after addition of sulfate copper ( $p < 0.001$ ) for both groups. In the multiple regression model, the result was the Cox model =  $8.246 + 13.93a + 10.21b - 2.71c$  ( $R^2 = 0.835$ ), where "a", "b" and "c" represent the absorbance (205 nm, 232 nm and 280 nm, respectively). We conclude that in our sample the wavelengths 232 nm and 280 nm related to the reading of conjugated diene and protein fraction of LDL, respectively, were more important in determining the oxidation rate of the particle.

Keywords: Type 1 diabetes, Oxidized LDL; Susceptibility.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Esquema da LDL com seu conteúdo lipídico e protéico. Apo significa apolipoproteína .....	23
Figura 2-	O dano oxidativo afeta os componentes lipídicos e protéicos da LDL .....	25
Gráfico 1-	Média do coeficiente de oxidação do LDL-colesterol, em função do tempo, em diabéticos e não diabéticos.....	37
Gráfico 2-	Média do coeficiente de oxidação do LDL-colesterol, em função do tempo, em diabéticos com e sem complicações e não diabéticos.....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características demográficas e clínicas da população estudada.....	34
Tabela 2 -	Características demográficas e clínicas dos diabéticos tipo 1 portadores e não portadores de complicações microvasculares e não diabéticos. ....	34
Tabela 3 -	Variáveis do controle metabólico dos diabéticos tipo 1 portadores e não portadores de complicações microvasculares e não diabéticos.....	35
Tabela 4 -	Variáveis do controle metabólico dos diabéticos tipo 1 portadores e não portadores de complicações microvasculares e não diabéticos.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1C	Hemoglobina glicada
ADA	American Diabetes Association
AAPH	Azoiniciadores radicalares hidrossolúveis
AGEs	Produtos avançados de glicação
AMVN	Azoiniciadores radicalares lipossolúveis
Apo B	Apolipoproteína B
Cox	Coefficiente de oxidação
CuSO <sub>4</sub>	Cobre
DAC	Doença arterial coronariana
DAG	Diacilglicerol
DCV	Doença cardiovascular
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GME	Glicemia média estimada
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IL1	Interleucina 1
IMC	Índice de massa corporal
KRr	Brometo de potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LDL-ox	LDL altamente oxidada
LDL-ox min	LDL minimamente oxidada
LH	Grupo metileno bisalílico
LO·	Radical alcoxila
LOH	Hidróxidos de lipídio
LOO·	Radical peroxila
LOOH	Hidroperóxidos de lipídio
Me	Íon metálico
ND	Nefropatia diabética
NO	Óxido nítrico
NOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
NOS	Óxido nítrico sintase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
OMS	Organização Mundial de Saúde
PKC	Proteína quinase C
RD	Retinopatia diabética
RL	Radicais livres
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
TGF-B	Fator de crescimento transformador
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1	<b>Definição de diabetes mellitus</b> .....	<b>15</b>
1.2	<b>Estatísticas mundiais e brasileiras</b> .....	<b>15</b>
1.3	<b>Classificação de diabetes mellitus</b> .....	<b>16</b>
1.4	<b>Diabetes mellitus tipo 1</b> .....	<b>16</b>
1.5	<b>Diabetes mellitus tipo 1 e as complicações microvasculares</b> .....	<b>17</b>
1.5.1	<u>Hiperglicemia e complicações microvasculares</u> .....	<b>18</b>
1.6	<b>Diabetes mellitus tipo 1 e as complicações macrovasculares</b> .....	<b>19</b>
1.7	<b>Estresse oxidativo e diabetes</b> .....	<b>20</b>
1.8	<b>A lipoproteína de baixa densidade</b> .....	<b>22</b>
1.8.1	<u>Oxidabilidade da partícula de LDL in vitro</u> .....	<b>23</b>
1.8.2	<u>Modificações (oxidação) na partícula de LDL e desenvolvimento da lesão aterosclerótica</u> .....	<b>24</b>
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
3	<b>PACIENTES E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
3.1	<b>Desenho do estudo</b> .....	<b>29</b>
3.2	<b>População</b> .....	<b>29</b>
3.2.1	<u>Pacientes</u> .....	<b>29</b>
3.2.2	<u>Controles</u> .....	<b>29</b>
3.2.3	<u>Crítérios de exclusão</u> .....	<b>29</b>
3.3	<b>Avaliação clínica dos pacientes diabéticos</b> .....	<b>30</b>
3.4	<b>Avaliação laboratorial dos pacientes diabéticos</b> .....	<b>30</b>
3.5	<b>Avaliação da suscetibilidade do LDL colesterol à oxidação in vitro</b> .....	<b>32</b>
3.6	<b>Análise estatística</b> .....	<b>32</b>
4	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>45</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>46</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Definição de diabetes mellitus**

O diabetes mellitus (DM) é um grupo de distúrbios metabólicos caracterizados por hiperglicemia resultante de alterações na secreção de insulina, ação de insulina ou ambos. Atualmente, é um dos maiores e mais sérios problemas de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento devido a elevadas prevalência e morbidade, mortalidade prematura e custos envolvidos no seu controle e no tratamento de suas complicações (1).

A etiologia do DM é múltipla, caracterizando-se por hiperglicemia crônica com distúrbios no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios. Suas conseqüências em longo prazo incluem as complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovasculares (doença isquêmica cardíaca, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica) ocasionando a falência de vários órgãos como: rins, olhos, coração e vasos sanguíneos (2-4).

### **1.2 Estatísticas mundiais e brasileiras**

O DM ganhou contorno de epidemia mundial sendo hoje um importante e crescente problema de saúde pública para todos os países, independente do seu grau de desenvolvimento (5). Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) calculam que em 2030 existirão, aproximadamente 333 milhões de pacientes diabéticos, sendo projetado para o nosso país um universo de 11 milhões de indivíduos (6).

No Brasil os dados epidemiológicos são escassos. No final dos anos de 1980, a prevalência de DM na população adulta foi estimada em 7,6% (7). Dados mais recentes de Ribeirão Preto / SP demonstram aumento de aproximadamente 79% nesta prevalência, chegando a 12,1% (8). Sabe-se que este índice aumenta com a idade como evidenciaram os estudos: 1) multicêntrico sobre a Prevalência de Diabetes no Brasil cujo percentual atingiu 17,4% na faixa etária de 60 a 69 anos (7); 2) o estudo SABE (Estudo longitudinal das condições de vida e saúde das pessoas do município de São Paulo) em que o percentual foi de 17,5% nas pessoas acima de 60 anos (9) e 3) o Vigitel 2008 (estudo sobre vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico) cujo percentual foi maior que 20% nas pessoas acima de 64 anos (10).



No Brasil, a mortalidade por DM é supostamente subestimada, visto que a doença não é mencionada nos atestados de óbito pelo fato de suas complicações, especialmente as cardiovasculares, cerebrovasculares e renais, serem a causa de morte. Apesar disso já se encontra entre a quarta e a oitava causa de morte no mundo. No Brasil, as taxas de mortalidade por DM (por 100.000 habitantes) variam entre 0,58 na faixa etária de 0-29 anos e 181,1 para a faixa etária de 60 anos ou mais (11).

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é considerada a endocrinopatia mais comum da infância e adolescência (12). Sua incidência tem algumas particularidades geográficas, apresentando taxas por 100.000 habitantes com menos de 15 anos de 38,4 na Finlândia; 7,6 no Brasil e 0,5 na Coreia (13). Apesar da baixa incidência, esse tipo de diabetes tem impacto social importante, pois acomete indivíduos na juventude, e a prolongada exposição à hiperglicemia antecipa o desenvolvimento de complicações crônicas em indivíduos economicamente ativos, incapacitando-os para o trabalho.

### **1.3 Classificação do diabetes mellitus**

A classificação do DM, hoje adotada no Brasil pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), é baseada na sua etiologia, eliminando os termos diabetes mellitus insulino-dependente e não-insulino dependente e inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e DM gestacional. Ainda existem duas categorias, referidas como pré-diabetes, que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída. Essas categorias não são entidades clínicas, mas são consideradas como fatores de risco para o desenvolvimento do DM e de doenças cardiovasculares (DCV) (14).

### **1.4 Diabetes mellitus tipo 1**

O DM1 é causado pela progressiva destruição das células beta das Ilhotas de Langerhans do pâncreas, responsáveis pela produção de insulina (15). Sua etiologia não é totalmente conhecida, mas há evidências da participação de componentes imunológicos, genéticos e ambientais. A presença de marcadores de auto imunidade como, anticorpos anti-ilhotas, anti-insulina, antidescarboxilase do ácido glutâmico e antitirosina fosfatase caracterizam a destruição autoimune, principal processo responsável pela falência da produção de insulina (14).

Evidências clínicas, epidemiológicas e bioquímicas indicam que a glicemia cronicamente elevada favorece o surgimento de complicações micro e macrovasculares e tem efeito deletério ao organismo através de diferentes mecanismos como: glicação de proteínas, hiperosmolaridade e estresse oxidativo (16-17).

### **1.5 Diabetes mellitus tipo 1 e as complicações microvasculares**

Uma das complicações microvasculares mais importantes do DM é a retinopatia diabética (RD) que hoje é a principal causa de cegueira legal entre pessoas de 25 a 74 anos nos países desenvolvidos e, após longo tempo de duração, ocorre em cerca de 95% dos pacientes com DM1 (18-20). No Brasil estima-se que a metade dos pacientes portadores de DM seja afetada pela RD, sendo responsável por 7,5% das causas de incapacidade de adultos para o trabalho (20).

A nefropatia diabética (ND) é uma complicação microvascular, que acomete aproximadamente 40% dos indivíduos com DM (21) e está associada a aumento na mortalidade cardiovascular (22). Quando os níveis de glicose estão aumentados, a filtração renal fica comprometida, há o extravasamento de proteínas na urina (microalbuminúria, macroalbuminúria e proteinúria nos casos mais graves) (14, 23). Além disso, a hipertensão e o edema estão associados e a falência renal total podendo o indivíduo ser submetido à diálise (24). Os mecanismos de deterioração da função renal pelo DM não estão totalmente esclarecidos, mas a hipertensão glomerular e expansão mesangial são fatores associados à insuficiência renal (24).

A neuropatia diabética é um grupo de doenças que afeta todos os tipos de nervos e, geralmente, aparece em 5 ou mais anos de diagnósticos do DM1 (14). Possui apresentações clínicas diversas que dependem de quais tipos de fibras nervosas foram afetadas. Acredita-se que a exposição prolongada à hiperglicemia cause desmielinização dos nervos e, conseqüente, alteração na condução nervosa.

A polineuropatia sensoriomotora é um tipo de neuropatia diabética que afeta os nervos distalmente, em especial os membros inferiores levando a perda de sensação de dor e pressão, propiciando a formação de úlceras e amputação periférica (23). É importante ressaltar que este tipo de complicação tem sido classificado comumente como microvascular.

### 1.5.1 Hiperglicemia e complicações microvasculares

A importância da hiperglicemia na fisiopatologia das lesões microvasculares do DM depende em muito de sua duração e magnitude, estando estes fatores fortemente relacionadas com a extensão e a progressão das mesmas (25-26). Outros determinantes também estão envolvidos no curso clínico destas alterações. Os efeitos advindos da hiperglicemia persistem mesmo nos períodos de compensação da doença devido ao fenômeno chamado de memória hiperglicêmica (27).

Estudos clínicos em pacientes com DM 1 demonstraram relação direta entre os níveis de hiperglicemia cronicamente mantida e o desenvolvimento de complicações crônicas. (28) O aumento da glicose intracelular é determinante do dano tecidual causado pelo DM e a participação do estresse oxidativo neste processo é de grande importância. Acredita-se que possa participar como fator desencadeante ou perpetuador do dano celular.

A hiperglicemia gera aumento da concentração intracelular de glicose e aumento do metabolismo da mesma pela via do sorbitol. Isto determina alterações no estado redox e conseqüentemente aceleração da síntese *de novo* de diacilglicerol (DAG) e glicação não enzimática dos constituintes intracelulares (29). O aumento da atividade da via do sorbitol reduz a captação de mioinositol, o que leva a uma diminuição da atividade da bomba Na/K ATPase (30).

A síntese *de novo* de DAG juntamente com o aumento de cálcio livre intracelular, produzido pelo aumento intracelular de inositol trifosfato que foi formado na mesma reação que o DAG a partir do fosfatidilinositol bifosfato, ativa a proteína quinase C (PKC) (31) que faz parte de uma superfamília de proteínas quinases, serina e treonina, dependentes de lipídios de pelo menos 10 isoenzimas (32). Esta proteína está envolvida na dessensibilização de receptores, na modulação de eventos estruturais nas membranas, na regulação de transcrição, na mediação de respostas imunes e na regulação do crescimento celular entre outras funções (33).

Uma conseqüência reversível da ativação da PKC e/ou da diminuição da atividade da Na/K ATPase é a alteração do relaxamento arterial, devido à liberação de prostanóides vasoconstritores e a diminuição da produção de óxido nítrico pelo endotélio, respectivamente (34). Sugere-se também que a ativação da PKC induz ao aumento da permeabilidade vascular devido sua interação com proteínas do citoesqueleto. Esta enzima está relacionada ainda com o aumento da produção de matriz extracelular e citocinas, proliferação das células vasculares, ativação da fosfolipase A2 citoplasmática e com a inibição da Na/K ATPase (35).

A hiperglicemia, de forma indireta, causa também a ativação do NF- $\kappa$ B, que é um fator de transcrição envolvido em mudanças na expressão de genes relevantes para a fisiologia e fisiopatologia das complicações vasculares, incluindo citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão de leucócitos, assim como genes que regulam a proliferação celular e mediam a sobrevivência da célula (36).

Os mecanismos irreversíveis dizem respeito à formação dos produtos avançados da glicação (AGEs) (37). Estes produtos geram alteração na matriz extracelular que, em última análise, levam a uma diminuição da sulfatação das moléculas de heparan e conseqüentemente alteração da integridade da membrana basal (38-39). Isto, em longo prazo, contribui para o aumento da permeabilidade vascular. Os AGEs também interferem com a interação célula/matriz - os monócitos e macrófagos interagem com proteínas modificadas pelos produtos avançados de glicação e secretam dentre outras substâncias o TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral) e a IL1 (interleucina 1), os quais são capazes de aumentar o fator tissular e, conseqüentemente, a ativação da via extrínseca da coagulação (38;41-42) - e produzem alterações no DNA e nas proteínas nucleares.

A hiperglicemia está relacionada também com um estado de estresse oxidativo que é o processo final de lesão celular da grande maioria dos fatores de risco cardiovascular (42), pois cursa com formação aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição dos mecanismos compensatórios em decorrência da glicação das enzimas antioxidantes (43).

## **1.6 Diabetes mellitus tipo 1 e complicações macrovasculares**

O DM pode promover o desenvolvimento de doenças arteriais além de exacerbar o processo aterosclerótico e suas complicações (44-46). Em 1979, o estudo de Framingham já chamava atenção para o fato de que o DM dobrava o risco de DCV em homens e triplicava em mulheres (47). Em geral, pacientes com DM1 têm risco duas a quatro vezes maior de desenvolver aterosclerose em relação à população não-diabética (48), e nestes pacientes, os eventos cardiovasculares são responsáveis por até 44% da mortalidade total (49-50).

A patogênese das complicações macrovasculares no diabetes pode ser complexa e tanto mecanismos diretos como indiretos podem estar implicados (51). Em recente revisão, Bertoluci e colaboradores (52) descreveram o papel da disfunção endotelial na doença vascular do diabético. A disfunção endotelial no DM pode estar relacionada a mecanismos já descritos anteriormente: atividade aumentada da via do sorbitol, expressão aumentada de

TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador) e fator de crescimento do endotélio vascular, ativação da cascata de coagulação, glicação não enzimática ou estresse oxidativo.

Apesar dos pacientes com DM1 apresentarem um risco muito aumentado de doença arterial coronariana (DAC) em relação à população geral (50), outros fatores de risco, além da associação com a ND e a hipertensão arterial devem ser investigados (53). Os fatores de risco tradicionais como, por exemplo, a dislipidemia e o tabagismo não apresentam alteração importante neste grupo para explicar o maior risco ou o desenvolvimento precoce desta patologia (54).

Segundo Droga e colaboradores (55), os pacientes com DM1 apresentam disfunção endotelial mesmo com níveis glicêmicos próximos da normalidade e taxa de excreção urinária de albumina normal, sugerindo que este fenômeno precede a microalbuminúria como um marcador de risco precoce para a doença cardiovascular. Além disso, Dahl-Jorgensen e colaboradores (56) demonstraram que mesmo crianças com DM1 já estão sujeitas às complicações cardiovasculares da doença e apresentam espessamento de paredes arteriais comparadas aos indivíduos não-diabéticos, antes mesmo da detecção clínica de complicações micro ou macrovasculares (57-58). Estes achados levantam a hipótese da existência de outros fatores, além da magnitude e tempo de exposição à hiperglicemia, envolvidos na fisiopatologia da aterosclerose no DM1.

Em função destes dados as atenções se voltaram para o estudo de novos componentes pró-ateroscleróticos no DM1. A teoria mais aceita para explicar sua patogênese é a hipótese oxidativa. Existem grandes evidências do importante papel da lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox) na etiologia da aterosclerose (59- 60).

## **1.7 Estresse oxidativo e diabetes mellitus**

As EROs são átomos, íons ou moléculas que contêm oxigênio com um elétron não-pareado em sua órbita externa. São caracterizadas por grande instabilidade e elevada reatividade e tendem a ligar o elétron não-pareado com outros presentes em estruturas próximas de sua formação, comportando-se como receptores (oxidantes) ou doadores (redutores) de elétrons (61). Os radicais livres (RL) podem reagir com as principais classes de biomoléculas, sendo os lipídios os mais suscetíveis (62-63).

O estresse oxidativo tem sido amplamente relacionado ao processo fisiopatológico de várias doenças (64) e se traduz em um estado de desequilíbrio entre a produção de EROs e as

defesas antioxidantes (65). Seu papel como determinante principal do início e da progressão das complicações cardiovasculares associadas ao DM tem sido alvo de grande interesse.

Estudos clínicos em pacientes com DM 1 demonstraram relação direta entre os níveis de hiperglicemia cronicamente mantida e o desenvolvimento de complicações crônicas. (66) O aumento da glicose intracelular é determinante do dano tecidual causado pelo DM e a participação do estresse oxidativo neste processo é de grande importância.

As EROs produzidas na parede vascular estão envolvidas em vários eventos celulares como mitose, apoptose, migração, hipertrofia e modificação de matriz extracelular, alterações na transcrição gênica e síntese protéica. (67) Adicionalmente podem funcionar como mediadores da memória celular à hiperglicemia. Foi demonstrado que células endoteliais e retinianas humanas expostas a hiperglicemia *in vitro*, mantinham níveis elevados de marcadores de estresse oxidativo como proteína quinase C (PKC)-  $\beta$  e subunidade p47phox da NADPH oxidase, mesmo após normalização dos níveis glicêmicos. (68)

A auto-oxidação da glicose também é capaz de gerar RL. Postula-se que o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) mitocondrial atue como um fator iniciador de uma cascata de eventos que resulta em maior produção de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) através da ativação do NF- $\kappa$ B com produção de citocinas inflamatórias, ativação da PKC e da NADPH oxidase. A ativação da PKC regula uma série de funções vasculares como permeabilidade vascular, contratilidade, proliferação celular, síntese de matriz extracelular e transdução de sinais para produção de citocinas.

Adicionalmente, no endotélio de pacientes diabéticos, a óxido nítrico sintase (NOS) pode desviar a produção de óxido nítrico (NO) para gerar  $O_2^-$  em condições de deficiência de l-arginina ou tetrahydropterina. (69) Quando ambos são produzidos ocorre formação de peroxinitrito ( $NOO^-$ ), causador de dano a estruturas celulares (70).

Em situações normais, a presença de EROs induz a expressão de enzimas antioxidantes como mecanismo de defesa, fato observado em fibroblastos de pacientes com DM1 sem nefropatia quando expostos à hiperglicemia. Entretanto, em fibroblastos de pacientes com DM1 com nefropatia clínica, a exposição à hiperglicemia levou ao aumento da peroxidação lipídica e não houve aumento compensatório no nível das enzimas antioxidantes Cu-Zn superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. (71).

Marra *et al* demonstraram que diabéticos tipo 1 sem complicações crônicas e com curta duração de doença apresentaram menor capacidade antioxidante do plasma e níveis de ácido úrico e maior formação de hidroperóxidos lipídicos comparados a não diabéticos (72) sugerindo que o estresse oxidativo ocorre precocemente nos pacientes com DM1.

Apesar de geralmente não apresentarem alterações quantitativas importantes, DM1 pode apresentar alterações qualitativas na composição de suas lipoproteínas (73).

## **1.8 A lipoproteína de baixa densidade**

As lipoproteínas plasmáticas são partículas constituídas por uma parte central de lipídios hidrofóbicos, circundados por uma monocamada de lipídios polares e apoproteínas. São sintetizadas e secretadas pelo fígado (VLDL) ou intestino (quilomícrons), ou resultam de transformações sofridas por estas partículas, como é o caso da lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL). Tem duas funções principais: solubilizar os lipídios no plasma e regular o movimento destes em sua entrada e saída de células-alvo e tecidos específicos. Classificam-se de acordo com sua densidade, e a partícula LDL encontra-se na faixa entre 1,019 a 1,063 g/ml (74- 75), apresentando, em média, 22nm de diâmetro (76).

A LDL é uma partícula esférica, contendo na parte central cerca de 170 moléculas de triglicérides e 1600 moléculas de ésteres de colesterol. A superfície da LDL é formada por uma monocamada constituída por cerca de 700 moléculas de fosfolipídios (principalmente fosfatidilcolina e esfingomielina), 600 moléculas de colesterol não-esterificado e uma única molécula de ApoB-100, que é composta por 4536 resíduos de aminoácidos(76-77), componente que liga as partículas da LDL a receptores específicos, os chamados receptores B, E, situados na superfície da membrana plasmática celular (figura 1). Depois da ligação, a LDL é internalizada e, após hidrolise dos lipídes do centro, o colesterol livre é usado pelas células (74-75).

A regulação do receptor de LDL é o principal fator que controla as concentrações plasmáticas do colesterol de LDL. Defeitos no receptor ou na apoB-100 dificultam a captação celular da partícula, resultando na remoção plasmática deficiente da mesma e conseqüente aumento da concentração plasmática de colesterol LDL.

A infiltração e retenção de LDL na íntima da parede arterial iniciam uma resposta inflamatória que culmina com a formação da placa aterosclerótica (78).

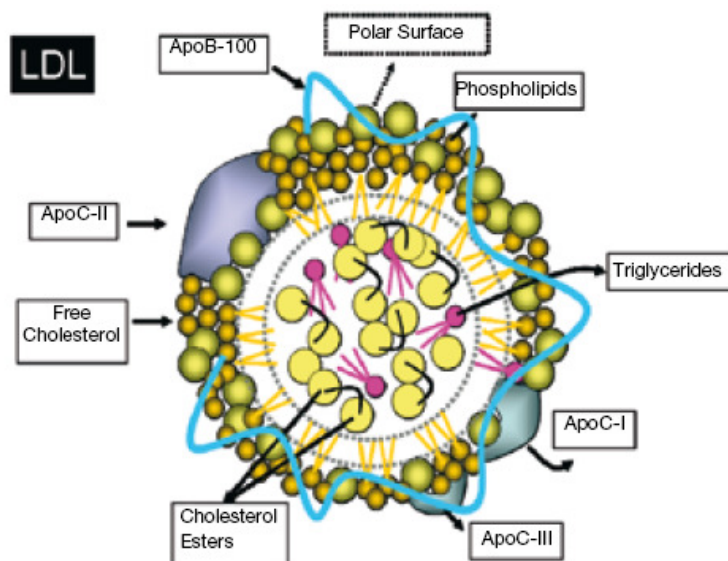


Figura 1. Esquema da LDL com seu conteúdo lipídico e protéico. Apo significa apolipoproteína (79).

### 1.8.1 Oxidabilidade da partícula de LDL in vitro

A suscetibilidade das partículas de LDL à oxidação pode ser avaliada *in vitro*, após a indução da peroxidação lipídica por azoiniciadores radicalares lipossolúveis (AMVN), hidrossolúveis (AAPH), ou, mais comumente, pelos íons cobre. O cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) é amplamente utilizado e inicia as etapas de peroxidação lipídica por meio da redução dos hidroperóxidos lipídicos pré-formados nos ácidos graxos presentes na lipoproteína, gerando radical alcoxila ( $\text{LO}^\cdot$ ) (80-81).

A oxidabilidade da LDL *in vitro* (cinética da oxidação *in vitro* da LDL) ocorre em três etapas: Na primeira etapa, ou iniciação, ocorre a formação dos radicais de carbono ou alcoxila, denominada de fase de indução (*lag phase*); na segunda etapa, ou fase de propagação, os radicais alcoxila e peroxila ( $\text{LOO}^\cdot$ ) inicialmente formados interagem com outras moléculas de ácido graxos polinsaturados oxidando-as e na terceira fase, ou terminação, ocorre à reação entre radicais  $\text{LO}^\cdot$  e  $\text{LOO}^\cdot$  formando produtos não-radicalares, finalizando o processo de lipoperoxidação. Na fase de indução ocorre o consumo dos antioxidantes lipossolúveis e o tempo de indução (*lag time*) é, portanto, dependente da concentração destes antioxidantes nas partículas de LDL. Na fase seguinte, a propagação das reações em cadeia da lipoperoxidação é proporcional à quantidade de ácidos graxos



insaturados da LDL. A velocidade de propagação (*log rate*) é proporcional ao teor de ácidos graxos poliinsaturados presentes na partícula (80).

O processo de oxidação da LDL *in vitro* é realizado pela medida do tempo de indução (*lag time*) e da velocidade de propagação (*log rate*) da peroxidação dos ácidos graxos, monitorado espectrofotometricamente, por intermédio da absorção das duplas ligações conjugadas dos ácidos graxos oxidados na região ultravioleta (232 nm) dienos conjugados, das duplas ligações da cadeia dos fosfolipídios (205 nm) e das proteínas (280 nm) (81-82).

Castro *et. al.*, demonstrou maior suscetibilidade da LDL à oxidação *in vitro* nos pacientes com DM1 em relação a indivíduos não-diabéticos, sendo a hiperglicemia a única variável independente associada a este maior efeito oxidativo (83).

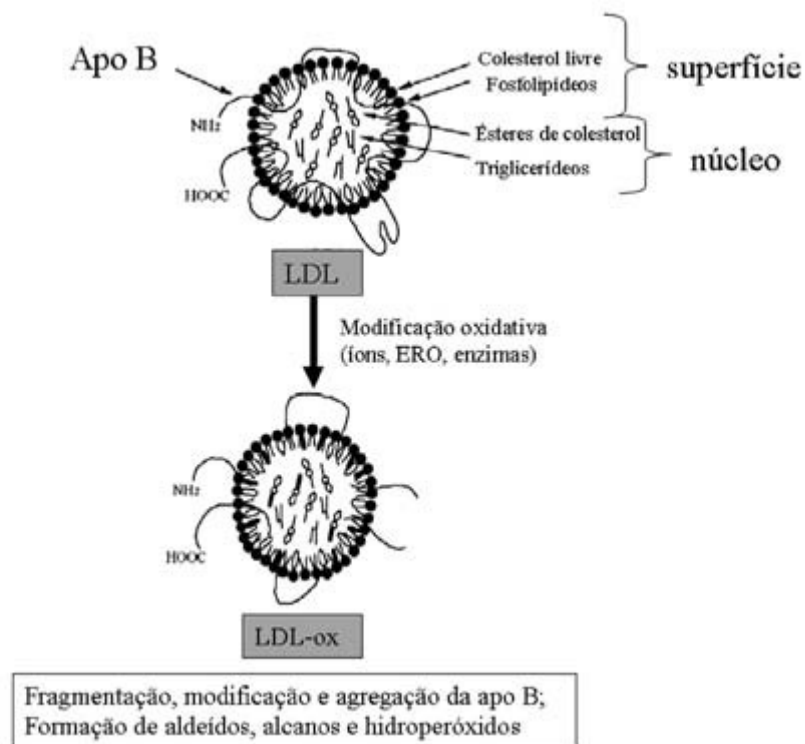
### 1.8.2 Modificações (oxidação) na partícula de LDL e desenvolvimento da lesão aterosclerótica

O mecanismo de oxidação da LDL *in vivo* é ainda assunto de grande especulação. Acredita-se que a oxidação da LDL não ocorra na circulação por causa das propriedades antioxidantes do plasma. Presume-se que a oxidação da LDL *in vivo* aconteça no espaço subendotelial, mediada principalmente por agentes oxidantes derivados de células ali presentes com posterior retorno da partícula modificada à circulação. No entanto, a transição bidirecional da LDL através do espaço subendotelial pode resultar em uma pequena quantidade de LDL oxidada na circulação sanguínea (84).

De acordo com um dos mais prováveis cenários, a peroxidação lipídica começaria nos ácidos graxos poliinsaturados da superfície fosfolipídica da LDL e então se propagaria para o núcleo, terminando com a oxidação de todos os lipídios da partícula, seguida pela degradação dos grupos lisina da apoB (85). A apo B modificada pelos produtos de degradação lipídica (aldeídos) tem sua afinidade pelo receptor alterada, fazendo com que a LDL seja capturada pelos receptores scavenger dos macrófagos de uma maneira descontrolada, levando assim ao desenvolvimento das células espumosas (“foam cells”) e da lesão aterosclerótica (85).

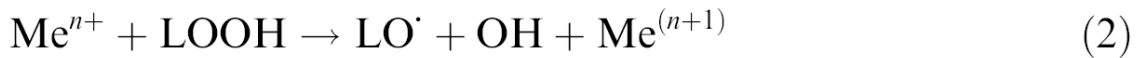
A modificação oxidativa da LDL acontece na íntima do vaso e parece ocorrer em duas fases. Na primeira fase, ou fase inflamatória, os lipídios da LDL sofrem oxidação (peroxidação lipídica), sem que ocorram grandes modificações na apolipoproteína B, o que resulta na formação da LDL minimamente oxidada (LDL-ox min) (86). Nesta fase, há formação inicial de EROs dentro da partícula contribuindo para o estado inflamatório da parede vascular, pois pode recrutar monócitos circulantes através do aumento da expressão de

glicoproteínas de adesão da superfície das células. Os monócitos, então, se aderem à superfície da parede vascular e outras moléculas específicas (proteína quimiotática específica, proteína-1 quimiotática monocitária), podem atraí-los para o espaço subendotelial, onde se diferenciam em macrófagos (87). Na camada íntima do vaso, as partículas de LDL-ox min podem sofrer intensiva oxidação por EROs e enzimas produzidas pelos macrófagos, como a mieloperoxidase e a lipoxigenase, transformando-as em partículas de LDL altamente oxidadas (LDL-ox), caracterizando, assim, a segunda fase da modificação oxidativa da LDL (88) (Figura 2). Nesta fase, surgem produtos de decomposição lipídica, onde os hidroperóxidos lipídicos formados dentro da partícula de LDL decompõem-se em aldeídos e cetonas reativas, os quais podem reagir com resíduos de lisina da apolipoproteína-B, modificando- os, o que torna a LDL mais eletronegativa (89-90).



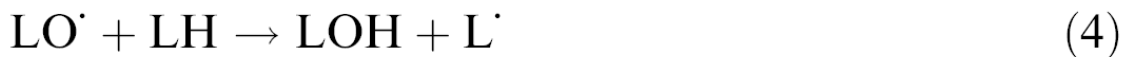
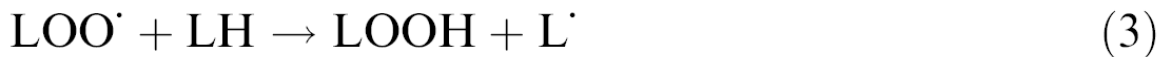
**Figura 2.** O dano oxidativo afeta os componentes lipídicos e protéicos da LDL. Adaptado de Yamaguchi et al., 2002 (91).

Uma vez que os hidroperóxidos lipídicos tenham se estabelecido na partícula de LDL, fica realmente fácil gerar radicais livres, especialmente na presença de íons metálicos como mostrado nas equações (1) e (2).



Em sistemas lipídicos que contenham quantidades traço de hidroperóxidos de lipídio (LOOH), íons metálicos (Me) como o cobre ou o ferro pode catalisar a decomposição de hidroperóxidos de lipídio em radicais peroxil (LOO•) e alcoxil (LO•) como mostrado nas equações (1) e (2) respectivamente.

Estes radicais peroxil e alcoxil rapidamente reagem com outros grupos metileno bisalílico (LH) de ácidos graxos poliinsaturados extraíndo átomos de hidrogênio e formando hidroperóxidos de lipídio (LOOH) e hidróxidos de lipídio (LOH), bem como radicais de carbono (L•) como representado nas Equações (3), (4) e (5), respectivamente (90).



As LDL-ox passam a ser reconhecidas pelos receptores do tipo scavenger dos macrófagos, que não são regulados pelo conteúdo celular de colesterol (92-93). Ocorre captação indiscriminada de LDL-ox e acúmulo maciço de colesterol nos macrófagos, formando-se as células espumosas (83; 94). Após essa fase inicial, desenvolvem-se as estrias gordurosas, que se caracterizam pelo acúmulo de células espumosas e lipídios extracelulares, levando à inflamação e espessamento da parede arterial (95); além disso, acontece a migração de células musculares da camada média da parede vascular para a íntima, estimulada pelos fatores de crescimento derivados das plaquetas, fator de crescimento derivado do fibroblasto e fator de crescimento b. A estria gordurosa é a lesão inicial da aterosclerose, que pode progredir e, à medida que isso acontece, forma-se uma capa fibrosa que envolve as células espumosas, leucócitos, lipídios e células musculares lisas no centro da lesão (96).

Diferentes mediadores inflamatórios são liberados no espaço intimal, perpetuando e ampliando o processo, levando finalmente à formação da placa aterosclerótica. As placas podem ser divididas em estáveis ou instáveis (96). As mais instáveis, portanto mais propensas à ruptura, possuem alto conteúdo lipídico em seu interior (97-98). A fissura e o rompimento

de placas instáveis pode levar à formação de trombos, responsáveis muitas vezes pelos acidentes vasculares e pelos infartos (99-100), conseqüências mais graves da aterosclerose.

Além de contribuir significativamente para o surgimento das células espumosas, a LDL-ox possui várias outras atividades pró-aterogênicas, dentre elas: formação de intermediários e produtos finais da reação de oxidação que são citotóxicos para células da parede vascular (83; 101); induz e perpetua o estado inflamatório no local de seu acúmulo, por ser quimiotática para monócitos e por aumentar a expressão de genes das células endoteliais que sintetizam substâncias responsáveis por recrutar monócitos (102); e favorece a secreção de interleucina-1 pelos monócitos, o que aumenta a proliferação de células musculares lisas na lesão (103).

A reação de lipoperoxidação em cadeia dos lipídios da LDL tem sido muito utilizada em métodos experimentais que visam avaliar a oxidação da LDL *in vitro*, deste modo inferindo no seu processo oxidativo *in vivo*.

## **2 OBJETIVOS**

2.1- Avaliar a influência das absorvâncias obtidas em três diferentes comprimentos de onda no coeficiente de oxidação da lipoproteína de baixa densidade em um grupo de pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1.

2.2- Identificar se há diferença no coeficiente de oxidação da partícula de LDL entre os momentos de oxidação observados.

2.2.3- Avaliar a inter-relação do coeficiente de oxidação da LDL com as variáveis do controle metabólico.

### **3 PACIENTES E MÉTODOS**

#### **3.1 Desenho do estudo**

Trata-se de um estudo observacional de corte transversal. O protocolo do estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) (projeto 1659- CEP/HUPE).

#### **3.2 População**

##### **3.2.1 Pacientes**

Os pacientes participantes do estudo são diabéticos tipo 1 em acompanhamento clínico e tratamento no serviço de Diabetes do HUPE. O diagnóstico de DM1 foi definido de acordo com os critérios da associação Americana de Diabetes e Sociedade Brasileira de Diabetes que incluem idade menor que 40 anos ao diagnóstico, história de cetoacidose diabética ou cetonemia, uso obrigatório de insulina sem interrupção desde o diagnóstico. Os critérios de inclusão foram diagnóstico de DM1, acompanhamento regular no ambulatório e aceitação e cumprimento do protocolo do estudo.

##### **3.2.2 Controles**

Os controles são jovens, não diabéticos de diferentes classes sociais, incluindo alunos e funcionários da UERJ, médicos residentes e candidatos voluntários. Os dados referentes à idade e sexo foram obtidos através de questionário preenchido pelo indivíduo.

##### **3.2.3 Critérios de exclusão**

Foram excluídos todos os pacientes e controles que tivessem história atual de tabagismo, etilismo, infecção sistêmica e/ou uso de medicamentos que pudessem alterar os resultados da determinação da suscetibilidade do LDL colesterol à oxidação, como uso de

inibidores da enzima conversora da angiotensina, os inibidores da HMG CoA redutase, o sulfato ferroso e complexos vitamínicos e de sais minerais contendo vitaminas C e E e Zn, Se, Fe e Cu (104-105). No grupo não diabético foram excluídos indivíduos com história familiar de DM em parentes de primeiro grau (106).

### **3.3 Avaliação clínica dos pacientes diabéticos e não-diabéticos**

Todos os pacientes foram submetidos a inquérito clínico-demográfico no qual são apurados dados relativos ao sexo, idade (anos), idade no diagnóstico (anos), história de tabagismo atual ou prévio, história familiar de DM em parentes de primeiro grau, dose diária de insulina, exame físico completo, avaliação laboratorial e tempo de duração do diabetes (anos).

A pressão arterial foi determinada com o paciente em posição supina após 15 minutos de repouso. Baseado nos critérios do JNC VII (107), hipertensão arterial foi definida como pressão arterial sistólica (PAS)  $\geq 140$ mmHg e/ou pressão arterial diastólica (PAD)  $\geq 90$ mmHg, em adultos, quando as aferições anormais se repetissem em duas ou mais consultas. Foi utilizado um esfigmomanômetro de coluna de mercúrio padronizado e calibrado e manguitos de tamanhos recomendados. A PAS foi determinada pelo aparecimento dos sons de Korotkoff e a PAD pelo seu desaparecimento. Foram calculadas, a partir destes dados, as médias aritméticas das aferições realizadas em três visitas ao Hospital, obtendo-se as médias de PAS e PAD.

O índice de massa corporal (IMC) foi calculado dividindo-se a massa corporal (kg) pelo quadrado da altura ( $m^2$ ), onde foi utilizado como critério de sobrepeso e obesidade um IMC igual ou superior a  $25 \text{ kg}/m^2$  e  $30 \text{ kg}/m^2$ , respectivamente (108).

A avaliação da retina foi realizada pelo serviço de oftalmologia do HUPE por oftalmoscopia indireta sob efeito de medicação midriática tópica. O resultado de exame de fundoscopia foi classificado em normal, presença de retinopatia não proliferativa e retinopatia proliferativa, utilizando-se para diagnóstico o olho mais afetado.

### **3.4 Avaliação laboratorial dos pacientes diabéticos e controles**

Após jejum de 12h, foi realizada coleta de sangue venoso, para análise por método enzimático e colorimétrico (Cobas Mira Roche) da glicemia, creatinina sérica, colesterol total, HDL-colesterol e triglicérides. O paciente foi instruído a realizar sua refeição habitual,

aplicar a dose prescrita de insulina, permanecer em repouso e retornar ao laboratório após duas horas para nova coleta de sangue para determinação da glicemia pós-prandial. A hemoglobina glicada (HbA1c) foi determinada por HPLC (Hitachi L-9100), cujo valor de referência é de 2,6 a 6,2%. O LDL-colesterol foi calculado pela fórmula de Friedewald [LDL= colesterol total – (HDL + Triglicerídios/5)] quando os valores de triglicerídios não ultrapassassem 400 mg/dl (109). Para o cálculo da glicemia média estimada (GME) utilizado o proposto por Nathan DM et al, 2008, de acordo com a seguinte equação 6 (110):

$$28,7 \times A1c - 46,7 \quad (6)$$

Amostra de urina noturna foi coletada em recipiente limpo sem preservativos iniciada às 20h do dia anterior e guardada na geladeira até às 6h da manhã do dia de entrega ao laboratório. Este procedimento foi repetido três vezes com intervalo mínimo de uma semana entre cada coleta em um período máximo (entre a primeira e a última coleta) de seis meses. Os pacientes foram orientados a evitar esforço físico, ingestão excessiva de proteínas e relação sexual no dia da coleta de urina. No momento da entrega foram colhidas amostras de urina para a realização de Multistix® (Bayer, Diagnostics), urinálise e urinocultura. Sedimento urinário normal (valores normais de hemácias, hemoglobina, leucócitos, cilindros e reação de nitrito negativa) foi usado como critério para exclusão de outras patologias do trato urinário.

As dosagens da concentração urinária de albumina foram realizadas por imunoenensaio enzimático de quimioluminescência (Immulite 1000 Systems, DPC Medlab, Los Angeles, CA, sensibilidade de 0.9 µg/ml) com coeficiente de variação intradosagem e interdosagem de 2.4% e 5.7 %, respectivamente. Foi então determinada a taxa noturna de excreção urinária de albumina (EUA) através da seguinte fórmula:  $EUA (\mu g/min) = \text{volume urinário (ml)} \times \text{concentração de albumina}(\mu g/ml) / 600(\text{min})$ . Consideramos micro e macroalbuminúria valores de EUA respectivamente de 20 a 199 µg/min e  $\geq 200 \mu g/min$  em pelo menos duas de três amostras consecutivas. Foi considerada presença de nefropatia o diagnóstico de micro ou macroalbuminúria ou queda da taxa de filtração glomerular ( $< 60 \text{ ml/min}$ ).



### 3.5 Avaliação da suscetibilidade do LDL colesterol à oxidação *in vitro*

O plasma para a análise da suscetibilidade do LDL colesterol à oxidação foi obtido através da centrifugação do sangue coletado com EDTA a 800 g por 20 minutos a 4°C e teve sua densidade ajustada para 1,3 g/ml pela adição de brometo de potássio (4,5 g de KBr a cada 9 mL de plasma). Em seguida o material foi preparado para ser ultracentrifugado, a 50.000rpm por 3 horas em rotor TV 860 na ultracentrífuga Sorvall, em tubos de ultracentrifugação com 20 ml de solução salina a 0,9% e os 9 mL de plasma anteriormente preparado. Após a ultracentrifugação, a banda de lipoproteínas com densidade entre 1,019 e 1,063 g/ml, compatível com a do LDL colesterol, foi coletada (111). Este material teve sua concentração protéica dosada pelo método do Biureto (112) e ajustada para 0,2 mg/ml. Às frações separadas foi adicionados substância oxidante - sulfato de cobre e esta solução foi deixada em banho-maria a 37 °C por 24 horas.

A avaliação da LDL oxidada foi feita de forma indireta através do cálculo do coeficiente de oxidação desta partícula (cox). Este coeficiente foi deduzido a partir do conhecimento da composição da partícula de LDL colesterol e das alterações por ela sofridas durante o processo oxidativo. A fórmula utiliza a leitura da absorbância em 3 comprimentos de onda, a saber: 205 nm – leitura das duplas ligações da cadeia dos fosfolipídios; 232 nm – leitura de dienos conjugados; e 280 nm – leitura de proteínas (113). Foram realizadas leituras das amostras obtidas no espectrofotômetro Shimadzu nos três comprimentos de onda de luz UV já citados, nos momentos 0h, 1h, 3hs, 6sh e 24hs após adição de sulfato de cobre (substância oxidante) para avaliar a susceptibilidade da LDL ao processo oxidativo (113). O coeficiente de oxidação foi calculado da seguinte forma (7):

$$\text{Abs 205} - \text{Abs 280} / \text{Abs 232} - \text{Abs 280}, \text{ onde Abs} = \text{absorbância. (7)}$$

### 3.6 Análise Estatística

Os dados foram armazenados e analisados através do software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows, versão 17.0.

Os indivíduos foram divididos em três grupos (controle, DM1 sem complicação e DM1 com complicação) e as variáveis antropométricas e metabólicas foram comparadas entre

os grupos utilizando análises de variância (ANOVA). Quando indicado, o teste *post hoc* de Scheffé foi aplicado na localização das diferenças significativas.

Na análise do coeficiente de oxidação, os comprimentos foram apresentados em valores médios por grupo. O coeficiente foi comparado entre os grupos e a cada tempo utilizando uma análise de variância dupla com medidas repetidas (*repeated measures two-way ANOVA*) para o tempo (basal, 1h, 3hs, 6hs e 24hs). Foram realizados contrastes entre cada medida e a medida subsequente.

Por último, devido ao grande número de comparações executadas, os p valores obtidos foram corrigidos utilizando o procedimento simples de Sidák para correção de testes múltiplos. Esse procedimento é fundamental para a redução da probabilidade de erro do tipo I, que consiste em rejeitar uma hipótese nula verdadeira, por outras palavras, chegar a um resultado que tem significância estatística quando na verdade ele aconteceu por acaso. As diferenças foram consideradas significativas sempre que  $p \leq 0,05$ .

Quando os pacientes com DM1 foram reagrupados independentemente da presença de complicações, foi utilizado teste t-student para amostras independentes na comparação entre os grupos.

Na determinação do peso da absorvância de cada um dos comprimentos de onda na construção do coeficiente de oxidação foram desenvolvidos modelos de regressão linear múltiplos, tendo como resposta o coeficiente de oxidação e como variáveis explicativas os valores dos três comprimentos de onda. A importância de cada comprimento de onda foi estabelecida pelo módulo do seu coeficiente no modelo. Foi desenvolvido um modelo de regressão para cada momento, sendo todos os momentos agrupados no modelo final. Foram também desenvolvidos modelos múltiplos de regressão para estabelecer possíveis associações entre o coeficiente de oxidação e as variáveis do controle metabólico.

## 4 RESULTADOS

A amostra foi composta por 54 pacientes diabéticos tipo 1 e 28 não-diabéticos. As características demográficas e clínicas estão apresentadas nas tabelas 1 e 2.

**Tabela 1. Características demográficas e clínicas da população estudada.**

<b>Variáveis</b>	<b>Diabéticos Tipo 1</b>	<b>Não diabéticos</b>
n	54	28
Idade (anos)	29,1 ± 12,11	28,2 ± 6,79
Idade de diagnóstico de diabetes (anos)	15,6 ± 9,20	--
Duração do diabetes (anos)	14,6 ± 8,43	--
Pressão arterial sistólica (mmHg)	114,1 ± 14,25	117,7 ± 12,51
Pressão arterial diastólica (mmHg)	69,7 ± 12,44	67,3 ± 9,61
Índice de massa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	23,7 ± 3,32	24,8 ± 4,39

Dados apresentados sob a forma de média ± desvio-padrão.

**Tabela 2. Características demográficas e clínicas dos diabéticos tipo 1 portadores e não portadores de complicações microvasculares e não diabéticos.**

<b>Variáveis</b>	<b>Diabéticos sem complicações</b>	<b>Diabéticos com complicações</b>	<b>Não diabéticos</b>
n	34	20	28
Idade (anos)	25,9 ± 12,09	34,6 ± 10,29	28,3 ± 6,79
Idade de diagnóstico de diabetes (anos)	14,9 ± 9,23	16,4 ± 9,18	--
Duração do diabetes (anos)	11,1 ± 7,72	18,2 ± 9,14	--
Pressão arterial sistólica (mmHg) <sup>a</sup>	108,3 ± 10,12 <sup>a</sup>	124,4 ± 14,99	117,7 ± 12,51
Pressão arterial diastólica (mmHg)	65,7 ± 9,86	76,9 ± 13,58	67,3 ± 9,61
Índice de massa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	23,4 ± 3,07	24,2 ± 3,76	24,8 ± 4,39

Valores das variáveis contínuas apresentados como média ± desvio-padrão.

<sup>a</sup> p < 0,05 diabéticos sem complicações vs. diabéticos com complicações.

A avaliação das variáveis metabólicas mostrou diferença entre os dois grupos apenas nas referentes ao metabolismo glicídico e das purinas. Apesar da diferença nos níveis de ácido úrico entre os dois grupos, ambos se encontram dentro dos limites da normalidade. Os níveis séricos de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol e triglicerídeos não apresentaram diferença significativa entre os pacientes diabéticos e os não-diabéticos (tabela 3).

**Tabela 3. Variáveis do controle metabólico dos diabéticos tipo 1 portadores e não portadores de complicações microvasculares e não diabéticos.**

<b>Variáveis</b>	<b>Diabéticos Tipo 1</b>	<b>Não diabéticos</b>
n	54	28
Glicemia jejum (mg/dL) *	174,7 ± 107	82,9 ± 23,1
Glicemia pós prandial (mg/dL) *	235,4 ± 119,3	100,7 ± 51,2
A1C (%) *	10,2 ± 2,5	5,2 ± 0,3
Glicemia média estimada *	245,3 ± 72,3	103,0 ± 9,9
Colesterol total	178,6 ± 33,0	183,3 ± 37,0
Triglicerídeos	94,1 ± 56,5	90,8 ± 53,0
HDL	50,2 ± 12,9	51,0 ± 12,3
LDL	109,5 ± 23,6	116,2 ± 32,4
LDL/HDL	2,3 ± 0,73	2,9 ± 2,4
NONHDL	128,4 ± 28,9	134,6 ± 39,1
COL/HDL	3,7 ± 0,89	4,3 ± 2,7
Ácido úrico *	3,6 ± 1,40	5,1 ± 1,5

Valores das variáveis contínuas apresentados como média ± desvio-padrão.

\* p < 0,05

Foi observada diferença significativa nos níveis de glicemia de jejum, glicemia pós prandial, hemoglobina glicada, glicemia média estimada e ácido úrico entre pacientes com e sem complicações crônicas e não-diabéticos (tabela 4).

**Tabela 4. Variáveis do controle metabólico dos diabéticos tipo 1 portadores e não portadores de complicações microvasculares e não diabéticos.**

<b>Variáveis</b>	<b>Diabéticos sem complicações</b>	<b>Diabéticos com complicações</b>	<b>Não diabéticos</b>
n	34	20	28
Glicemia jejum (mg/dL) <sup>b</sup>	176,6 ± 102,81	171 ± 116,33	82,9 ± 23,15
Glicemia pós prandial (mg/dL) <sup>b, c</sup>	226,4 ± 106,29	250,9 ± 140,96	100,7 ± 51,29
A1C (%) <sup>b, c</sup>	10,0 ± 2,63	10,4 ± 2,38	5,2 ± 0,35
Glicemia média estimada <sup>b, c</sup>	240,6 ± 75,34	252,8 ± 68,31	103,0 ± 9,95
Colesterol total	173,9 ± 30,28	186,3 ± 36,63	183,3 ± 37,03
Triglicerídeos	85,9 ± 54,46	107,7 ± 58,64	90,8 ± 53,02
HDL	49,4 ± 12,69	51,6 ± 13,53	51,0 ± 12,37
LDL	107,4 ± 22,15	113,1 ± 26,07	116,2 ± 32,38
LDL/HDL	2,3 ± 0,73	2,3 ± 0,82	2,9 ± 2,40
NONHDL	124,6 ± 26,55	134,6 ± 32,15	134,6 ± 39,11
COL/HDL	3,7 ± 0,89	3,8 ± 0,97	4,3 ± 2,66
Ácido úrico <sup>b</sup>	3,4 ± 1,40	3,8 ± 1,36	5,1 ± 1,51

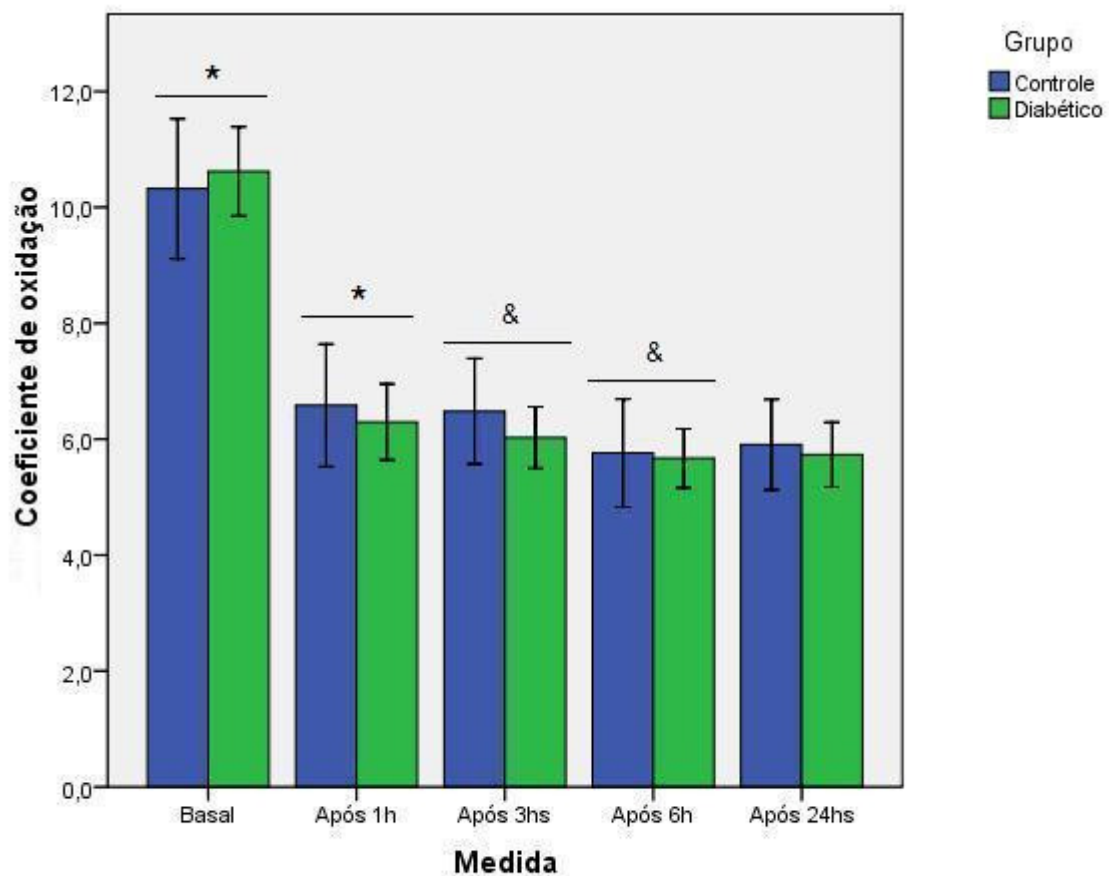
Valores das variáveis contínuas apresentados como média ± desvio-padrão.

<sup>a</sup> p < 0,05 diabéticos sem complicações vs. diabéticos com complicações.

<sup>b</sup> p < 0,05 Diabéticos sem complicações vs. não diabéticos.

<sup>c</sup> p < 0,05 Diabéticos com complicações vs. não diabéticos.

Os pacientes com diabetes tipo 1 apresentaram média de coeficiente de oxidação basal semelhante a dos controles. Apesar de não ter sido observado diferença entre os diabéticos e os controles, a suscetibilidade do LDL colesterol *in vitro* mostrou diferença significativa entre o momento basal e após 1h ( $p < 0,001$ ) e entre o momento após 3 e 6 horas após adição de sulfato de cobre ( $p < 0,001$ ) para os grupos avaliados (gráfico 1).

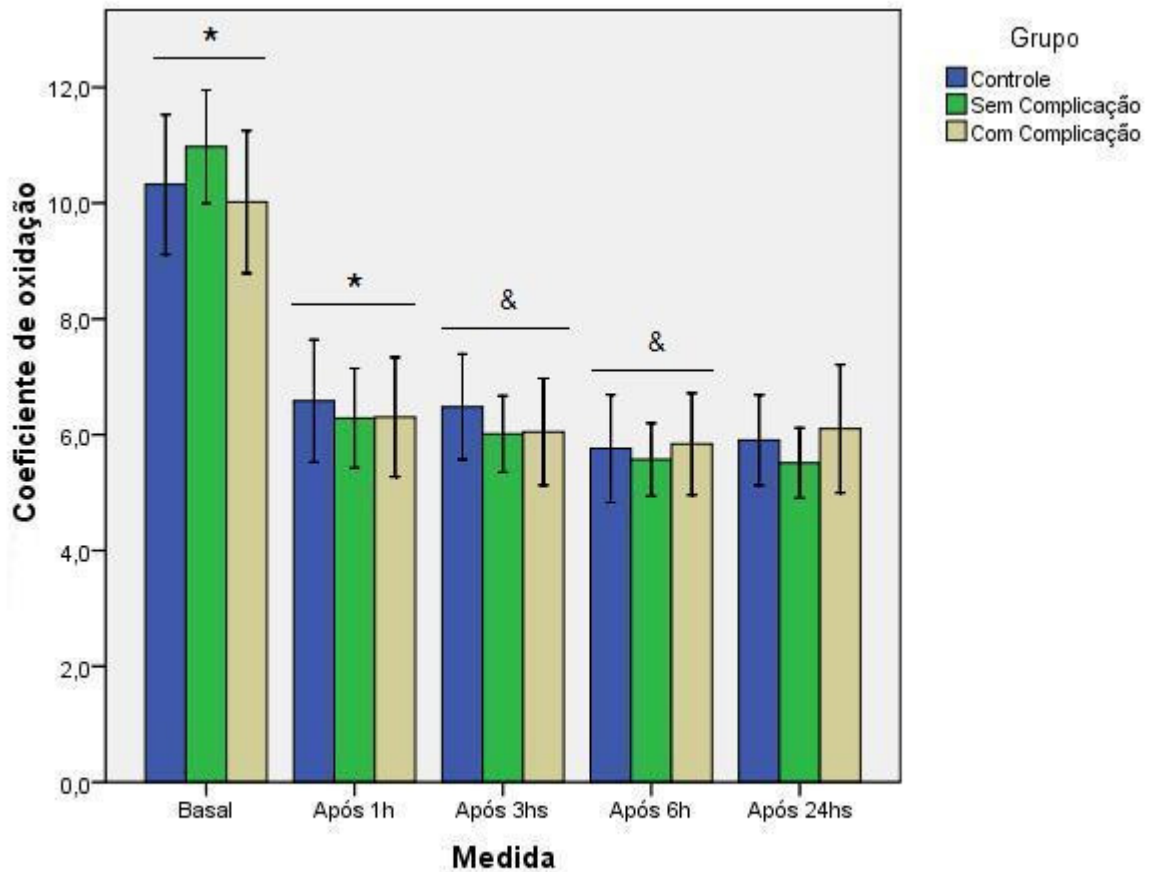


**Gráfico 1. Média do coeficiente de oxidação do LDL-colesterol, em função do tempo, em diabéticos e não diabéticos**

\*  $p < 0,05$  basal vs. após 1h.

&  $p < 0,05$  após 3h vs. após 6hs.

A comparação dos coeficientes de oxidação basal e 1h, 3hs, 6hs e 24horas após adição de sulfato de cobre entre os pacientes com e sem complicações microvasculares é demonstrado no gráfico 2. Apesar de não ter sido observado diferença entre os diabéticos com e sem complicações e os controles, a média de coeficiente de oxidação basal foi semelhante nos grupos. A suscetibilidade do LDL colesterol *in vitro* mostrou diferença significativa entre o momento basal e após 1h ( $p < 0,001$ ) e entre o momento após 3 e 6 horas após adição de sulfato de cobre ( $p < 0,001$ ) para os grupos avaliados



**Gráfico 2. Média do coeficiente de oxidação do LDL-colesterol, em função do tempo, em diabéticos com e sem complicações e não diabéticos.**

\*  $p < 0,05$  basal vs. após 1h.

&  $p < 0,05$  após 3h vs. após 6hs.

Uma vez que não foram observadas diferenças entre os grupos no coeficiente de oxidação, os modelos foram construídos para os dados dos dois grupos combinados.

Independentemente dos momentos analisados (basal, 1h, 3h, 6h e 24h após adição de sulfato de cobre) a absorvância obtida através do comprimento de onda com maior peso na determinação do coeficiente de oxidação foi o 232nm sendo muito similar ao 280 nm. O comprimento de onda 205 nm, embora com menor peso, também se mostrou estatisticamente significativo, não devendo ser excluído. O modelo a seguir foi obtido combinando os dados de todos os momentos (basal, 1h, 3hs, 6hs e 24hs) e utilizando o tempo como covariável.

$$Cox = 8,246 - 13,93a + 2,71b + 10,21c \quad (8)$$

Onde “a”, “b” e “c” representam as absorvâncias 205 nm, 232 nm e 280 nm, respectivamente. O coeficiente de correlação de Pearson foi 0,835.

Utilizando apenas a absorvância obtida através do comprimento de onda 232 nm, observou-se um coeficiente de correlação de 0,624 indicando que este comprimento de onda, sozinha, foi responsável por aproximadamente 39% da variação do coeficiente de oxidação.

De todas as variáveis metabólicas analisadas, a lipoproteína de baixa densidade, a pressão arterial sistólica, a glicemia média estimada e a glicemia pós-prandial apresentaram associação significativa ( $p < 0,05$ ) com o coeficiente de oxidação levando em conta todos os momentos juntos (basal, 1h, 3h, 6h e 24hs). O coeficiente de correlação foi de 0,589.

$$Cox = 18,206 - 1,122*medida - 0,071*LDL - 0,044*PAS + 0,043*NHDL - 0,006*GME + 0,003*GPP \quad (9)$$



## 5 DISCUSSÃO

O DM1 é uma doença crônica atualmente considerada a endocrinopatia mais comum na infância e na adolescência (114). Com a intensificação do controle glicêmico e maior sobrevida desses pacientes, houve mudança progressiva das causas de mortalidade, com maior destaque para a DCV (48). Devido à elevada morbimortalidade associada ao DM1, com risco de complicações crônicas micro e macrovasculares precoces, torna-se importante identificar a presença de fatores de risco para DCV nessa população. Como a LDL oxidada tem sido considerada ponto fundamental na patogênese da doença aterosclerótica (115), avaliamos neste estudo a influência das absorvâncias obtidas em três diferentes comprimentos de onda da lipoproteína de baixa densidade sobre sua oxidação *in vitro* em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. Para iniciar/estimular o processo de oxidação foi utilizada a incubação da LDL com íon de metal de transição, como o cobre (sulfato de cobre). Este método é bastante empregado em modelos de indução oxidativa e produz resposta semelhante àquela determinada pela presença de macrófagos ativados, refletindo possivelmente o comportamento do LDL colesterol frente ao estímulo oxidativo *in vivo* (82). Permite avaliar a oxidação lipídica através do acompanhamento da cinética da reação de formação de dienos conjugados, fosfolipídios e proteínas (113) durante a oxidação da LDL, monitorando continuamente a mudança na absorvância da amostra nos comprimentos de ondas citados.

Em nosso estudo, de acordo com a literatura, a absorvância obtida através do comprimento de onda 232 nm, demonstrou maior influência no processo oxidativo da LDL, seguido do 280 nm e 205 nm, demonstrando que a oxidação não ocorre instantaneamente, e o tempo decorrido entre a adição do íon cobre e a formação dos dienos conjugados possa ser utilizada como um parâmetro do estado oxidativo inicial da LDL (116).

Experimentalmente, estes dados são utilizados como parâmetros de comparação em populações estudadas (117), porém o tempo requerido para se fazer este teste e a dificuldade de padronização existente torna difícil o emprego deste método na rotina clínica laboratorial (118).

Na maioria dos estudos em animais experimentais e em humanos, a oxidação da LDL vem sendo avaliada por métodos indiretos e, até recentemente, o único meio para acessar a oxidação da LDL *in vivo* tem sido a quantificação de autoanticorpos contra a LDL-ox por métodos imunológicos (119).

Em avaliações clínicas, para diagnóstico ou acompanhamento de pacientes de alto risco, os métodos utilizados para determinar a oxidação da LDL são os métodos imunológicos, por

seu reduzido tempo de execução, fácil adaptação à rotina laboratorial e disponibilidade de kits comerciais. Estes métodos podem avaliar a presença da LDL-ox na amostra, utilizando anticorpos anti-LDL-ox ou, ainda, medir os autoanticorpos, usando a própria lipoproteína oxidada. A LDL-ox possui um papel imunogênico no processo da aterosclerose, pois é considerada um autoantígeno formado na lesão aterosclerótica (120). A evidência que apóia esta afirmação é o fato de que são encontrados no sangue e nas lesões de pacientes com aterosclerose, além de animais experimentais, anticorpos IgM e IgG, específicos para LDL-ox (120). Os níveis de LDL-ox podem ser mensurados por ensaios de ELISA, do tipo sanduíche, utilizando anticorpos monoclonais dirigidos contra determinantes antigênicos destacados na molécula Apo B oxidada. Geralmente, em um mesmo ensaio, são usados mais de um anticorpo aderido à parede da placa (121). A diversidade dos anticorpos monoclonais e dos tipos de imunoenaios utilizados torna difícil a comparação dos resultados entre os diferentes ensaios.

Estudos em animais evidenciaram que a dislipidemia associada ao diabetes não é necessária para induzir inflamação arterial no início da lesão aterosclerótica. Em estudo experimental, o aumento do processo aterosclerótico no rato diabético pôde ser normalizado após tratamento insulínico intensivo, indicando o papel fundamental do ambiente diabetogênico, mais provavelmente associado à hiperglicemia (122). Por outro lado, o aumento nos triglicérides ricos em VLDL induzido pelo diabetes contribui para progressão da lesão e formação de placas avançadas com hemorragia intralésional. Dessa forma, tanto a hiperglicemia quanto a dislipidemia diabética aceleram diferentes fases de aterogênese no diabetes (122).

Apesar de geralmente não apresentarem alterações quantitativas importantes, o DM1 podem apresentar alterações qualitativas na composição de suas lipoproteínas. A elevação dos níveis de LDL colesterol e triglicérides e diminuição do HDL colesterol são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento da doença aterosclerótica na população em geral (82). Nos pacientes com DM1 os níveis de LDL colesterol e triglicérides são similares ou menores que no restante da população, enquanto o HDL colesterol está normal ou aumentado. A participação da LDL-oxidada nesse processo tem sido apontada como fator fundamental no processo aterosclerótico em modelos animais, assim como em humanos (123). A hiperglicemia crônica resulta maior oxidação e glicação de partículas de LDL, com acúmulo de partículas densas mais aterogênicas (60).

Em nosso estudo, os pacientes com DM1 não apresentaram pior perfil lipídico em relação aos controles e em geral seus níveis lipídicos são favoráveis, mesmo com controle glicêmico

insatisfatório. Apesar de pacientes com DM1 serem jovens e, em geral, não apresentarem alterações lipídicas importantes, as complicações micro e macrovasculares que ocorrem no DM1 podem ser devidas a outros fatores que poderiam ser explicados pela hiperglicemia *per se*. Dessa forma, elevações prolongadas da glicemia podem levar à glicosilação de proteínas no sangue e na parede arterial, gerando os produtos finais de glicação (AGE), o que determina aumento da concentração de EROs e piora a função endotelial (73).

Em estudo prévio de nosso grupo, observamos maior suscetibilidade do LDL colesterol à oxidação *in vitro* nos pacientes com DM1 em relação a indivíduos não-diabéticos, sendo a hiperglicemia a única variável independente associada a este maior efeito oxidativo. Foi demonstrado que mesmo discreta glicação do LDL afeta o tônus microvascular no musculoesquelético por reduzir o diâmetro, tanto de pequenas artérias quanto de arteríolas terminais. Fato este que pode ocorrer também no estado pós-prandial (60).

Essa oxidação do LDL assume grande importância no início e na perpetuação da aterosclerose por meio da geração de lipídios inflamatórios e da modificação covalente dessa partícula. Alguns dos efeitos pró-aterogênicos do LDL modificado são a toxicidade às células endoteliais, os monócitos, o recrutamento de neutrófilos e eosinófilos e a inibição da mobilidade dos macrófagos e a promoção da formação de células espumosas (60).

Vários estudos enfocaram as lipoproteínas nos pacientes com diabetes, avaliando não apenas as suas concentrações plasmáticas, mas também a sua estrutura. Estes trabalhos revelaram que as lipoproteínas sofrem alterações que aumentam sua suscetibilidade à oxidação (124), como a mudança na composição de ácidos graxos, a glicosilação aumentada destas moléculas (125) e a alteração na densidade da lipoproteína (126). Porém, todos eles usaram amostra formada apenas por pacientes com diabetes mellitus tipo 2, que apresenta fisiopatologia diversa do tipo 1. Em 2001, entretanto, Liguori e colaboradores avaliaram a composição do LDL colesterol em grupo de diabéticos tipo 1 com controle glicêmico ruim e após melhora do controle. Foi mostrado que o grupo com bom controle não apresenta diferença significativa na composição desta molécula no que diz respeito à: ácidos graxos, vitamina E, conteúdo protéico, fosfolipídios, colesterol livre, triglicérides e éster de colesterol. Entretanto, antes da otimização do tratamento com a melhora dos parâmetros de controle do diabetes, ficou evidente a redução da massa protéica e de vitamina E no LDL colesterol (127).

Os dados na literatura são controversos no que diz respeito ao comportamento do LDL colesterol de pacientes com diabetes tipo 1 frente ao estresse oxidativo (127), provavelmente decorrente da diferença nas populações estudadas no que diz respeito ao grau de

hiperglicemia, presença e severidade de complicações do diabetes, conteúdo de vitaminas na dieta e, possivelmente, raça (43).

Em nossa amostra não houve diferença entre os diabéticos tipo 1 e os controles nos momentos avaliados (basal, 1h, 3hs, 6hs e 24hs após adição do agente oxidante-sulfato de cobre), mostrando que no grupo estudado não houve diferença neste componente pró-aterogênico. Entretanto, apesar de no presente estudo a população não ter sido diferente estatisticamente, observamos diferença significativa entre o momento basal e uma hora após a adição do sulfato de cobre e entre 3 horas e 6 horas após a adição do sulfato de cobre, não demonstrando diferença para o momento 24hs. Desta forma, destacamos a hipótese de que após o momento 24hs o processo oxidativo da LDL tem a sua intensidade diminuída voltando ao estado basal. Em estudo prévio do nosso grupo, observamos semelhança entre os pacientes com DM1 e os controles em relação à média de coeficiente de oxidação basal. Entretanto, após a adição de sulfato de cobre, houve oxidação mais precoce nos pacientes com DM1 do que nos controles. Houve diferença significativa na resposta do LDL dos controles e dos pacientes com DM1 ao estímulo oxidativo 3 horas após a adição do sulfato de cobre (83).

No grupo total estudado, encontramos correlação negativa do Coeficiente de oxidação com a LDL, a PAS, GME e a GPP, ou seja, quanto maiores os níveis destas últimas variáveis mais oxidado estava o LDL colesterol. Este resultado está de acordo com os dados de Liguori e colaboradores, 2001, e Castro e colaboradores, 2004, que também identificaram maior suscetibilidade do colesterol LDL à oxidação e correlação significativa com o controle glicêmico (127).

Esta correlação com o controle glicêmico talvez possa ser explicada pelo fato do LDL glicosilado ser mais suscetível à oxidação (127) ou ainda pela capacidade que o estado hiperglicêmico tem de estimular a formação de radicais livres, o que causaria maior consumo dos antioxidantes endógenos e permitiria que o LDL colesterol se tornasse mais suscetível à oxidação pelo sulfato de cobre (127).

Fatores externos à molécula do LDL também estão envolvidos com a sua suscetibilidade à oxidação no diabetes mellitus, a saber: a formação aumentada de radicais livres em função da hiperglicemia e a diminuição dos mecanismos antioxidantes em decorrência da glicação das enzimas varredoras dos mesmos (43).

O metabolismo das purinas também está relacionado com o processo oxidativo do LDL, sendo o ácido úrico um importante constituinte plasmático com potencial de proteger o LDL da oxidação *in vitro* tão efetivo quanto à vitamina C (128). O efeito antioxidante do ácido úrico é decorrente de sua habilidade como “varredor” de radicais hidroxilas, de oxigênio não

pareado (129) e de peroxinitrito (130) ou quelante de ferro (129). Ainda segundo Schlotte, o ácido úrico é capaz de poupar a oxidação do  $\alpha$ -tocoferol *in vitro* mesmo em concentrações menores que 10 vezes as consideradas no ser humano, e a prevenção da oxidação de outros antioxidantes seria a possível explicação para os efeitos protetores de baixos níveis desta molécula em termos de oxidação de ácidos graxos poliinsaturados (129).

Em relação aos níveis de ácido úrico nos diabéticos tipo 1 sabemos que eles são menores quando comparados aos de indivíduos não diabéticos independente do controle glicêmico (130). Nossos dados repetem esta observação, sendo a concentração de ácido úrico menor nos diabéticos tipo 1 que nos não diabéticos. Apesar dos níveis menores, mesmo os pacientes com diabetes avaliados apresentam valores de ácido úrico dentro da faixa da normalidade.

Apesar de poucos estudos, como o nosso próprio, demonstrarem a importância dos dienos conjugados e da fração protéica da LDL na sua oxidação *in vitro*, são necessários mais estudos a fim de definir melhor os fatores responsáveis por esta característica e a importância deste evento na evolução para complicações crônicas microvasculares e macrovasculares nos pacientes com diabetes mellitus tipo 1.

## 6 CONCLUSÃO

Em nosso estudo, a absorvância obtida através dos comprimentos de onda que mais demonstraram influenciar na oxidação do LDL colesterol foram 232 nm e 280 nm que refletem a leitura dos dienos conjugados e da fração protéica da partícula de LDL colesterol respectivamente, sem destacar a colaboração dos fosfolipídios. Este evento não esteve diretamente relacionado com a presença da doença e ocorreu de forma independente de alterações quantitativas do perfil lipídico.

Apesar dos avanços no estudo lipídico, a LDL continua sendo um dos principais fatores de risco cardiovascular e o mais amplamente utilizado. No entanto, uma das limitações do emprego desta lipoproteína refere-se ao fato de que o aumento da sua concentração sanguínea não é suficiente para explicar a ocorrência de síndromes agudas. Isso denota que as alterações qualitativas da partícula, ou seja, sua composição química e seu poder de agressão à parede arterial, têm importância fundamental para o entendimento de tais eventos.

Desta forma, concluímos que a presença da doença, assim como a hiperglicemia é um fator de risco independente para a maior suscetibilidade do LDL colesterol à oxidação influenciado pela formação de dienos conjugados caracterizando o início do processo oxidativo da partícula e, possivelmente, a evolução da aterosclerose. A modificação da LDL é um fator importante no desenvolvimento da doença. Por isso, a determinação da LDL-ox plasmática é essencial, não apenas para investigar sua relevância para as doenças cardiovasculares, mas também, para auxiliar no diagnóstico destas doenças.

## REFERÊNCIAS

- 1- American Diabetes Association. Clinical practice recommendations: diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2009; 32: 3:S3-5.
- 2- World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva: WHO; 1999.
- 3- Gross JL, Silveiro SP, Camargo JL, Reichelt A, Azevedo MJ. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. *Arquivos Brasileiros Endocrinologia e Metabologia*. 2002; 46 (1): 16-26.
- 4- Walsh MG, Zgibor J, Borch-Johnsen K, Orchard TJ, DiaComp investigators. A multinational comparison of complications assessment in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27( 7): 1610–1617.
- 5- Sociedade Brasileira de Diabetes. Tratamento e acompanhamento do diabetes mellitus. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. Rio de Janeiro: Diagraphic Editora; 2007.
- 6- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004; 27 (5): 1047-53.
- 7- Malerbi DA & Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. *Diabetes Care*. 1992; 15 (11): 1509-16.
- 8- Torquato MTCG, Montenegro Jr. RM, Viana LAL, Souza RAHG, Lanna CMM, Lucas JCB et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil. *São Paulo Medical Journal*. 2003; 121 (6): 224-30.

- 9- Alves LC, Leimann BCQ, Vasconcelos MEL, Carvalho MS, Vasconcelos AGG, Fonseca TCO, et al. A influência das doenças crônicas na capacidade funcional dos idosos do Município de São Paulo, Brasil. *Caderno de Saúde Pública* 2007; 23 (8):1924-30.
- 10- Ministério da Saúde. *Vigitel Brasil 2008: Vigilância de fatores de risco e proteção de doenças crônicas por inquérito telefônico*. Brasília; 2009.
- 11- Franco LJ. Um problema de saúde pública. *Epidemiologia*. In: Oliveira JEP, Milech A, editors. *Diabetes mellitus: clínica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar*. São Paulo: Editora Atheneu; 2004. cap. 4, p. 19-32.
- 12- American Diabetes Association (ADA). [acesso 2008 jan 08] Disponível em: <<http://www.diabetes.org/diabetes-statistics/prevalence.jsp>>.
- 13- Onkamo P, Väänänen S, Karvonen M, Tuomilehto J. Worldwide increase in incidence of type 1 diabetes: the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia*. 1999; 42(12): 1395-403.
- 14- Sociedade Brasileira de Diabetes. *Tratamento e acompanhamento do diabetes mellitus*. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. Rio de Janeiro: Diagraphic Editora; 2006.
- 15- Zimmet P, Alberti KGMM, Shaw J. Global and social implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2000 (6.865); 414: 782-7.
- 16- Lang F. Hormones: late complications of prolonged hyperglycemia (Diabetes Mellitus). In: Silbernagl S & Lang F. *Color atlas of pathophysiology*. New York: Thieme Stuttgart; 2000.
- 17- Reis JS, Veloso CA, Mattos RT, Purish S, Machado-Nogueira JA. Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no Diabetes Tipo 1. *Arquivos Brasileiros Endocrinologia e Metabologia*. 2008; 52: 1096-105.



- 18- Lovestam-Adrian M, Agardh CD, Torffvit O, Agardh E. Diabetic retinopathy, visual acuity, and medical risk indicators: a continuous 10-year follow-up study in type 1 diabetic patients under routine care. *Journal of Diabetes and its Complications*. 2001; 15:287-294.
- 19- Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, et al. Retinopathy in diabetes. *Diabetes Care* 2004;27(suppl. 1):84-7.
- 20- Boelter MC, Azevedo MJ, Gross JL, Lavinsky J. Risk factors for diabetic retinopathy. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 2003;66:239-47.
- 21- Gross JL, de Azevedo MJ, Silverio SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care* 2005; 28(1):164-76.
- 22- Valmadrid CT, Klein R, Moss SE, Klein BE. The risk of cardiovascular disease mortality associated with microalbuminuria and gross proteinuria in persons with older-onset diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 2000;160:1093-100.
- 23- Smeltzer SC, Bare BG, editor. *Enfermagem médico-cirúrgica*. 9ªed. Philadelphia: Lippincot 2002. Histórico e tratamento de pacientes com Diabetes Mellitus; p.933-983.
- 24- American Diabetes Association. *Medical management of type 1 diabetes*. 3ªed. Virgínia: ADA; 1998. (Clinical Education Series).
- 25- Adler AI, Stratton IM, Neil HA, Yudkin JS, Matthews DR, Cull CA, et al. Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *BMJ* 2000;321(7258):412-9.
- 26- UK Prospective diabetes study group intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352(9131):837-53.

- 27- Ihnat MA, Thorpe JE, Kamat CD, Szabó C, Green DE, Warnke LA, et al. Reactive oxygen species mediate a cellular 'memory' of high glucose stress signaling. *Diabetologia*. 2007; 50:1523-31.
- 28- The Diabetes Control and Complications Trial. Epidemiology of diabetes interventions and complications research group. *New England Journal of Medicine*. 2003; 348: 2294- 303.
- 29- Ceriello A, Morocutti A, Mercuri F, Quagliaro L, Moro M, Damante G, Viberti GC. Defective intracellular antioxidant enzyme production in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes*. 2000, 49 (12): 2170-77.
- 30- Brownle, M. The pathobiology of diabetic complications – A Unifying Mechanism. *Diabetes*, 2005; 56: 1615-1625.
- 31- Kitada, M; Koya, D; Sugimoto, T; Isono, M; Araki, S; Kashiwagi, A; Haneda, M. Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase C-[beta] activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy. *Diabetes*, 2003. 52(10):2603-2614
- 32- Brownle, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 2001. 414:813-820.
- 33- Idris I, Gray S, Donnelly. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia*, 44:659-73, 2001.
- 34- Gupta S; Sussman I; McArthur CS; Cohen RA; Ruderman NB. Endothelium dependent inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity in rabbit aorta by hyperglycemia: possible role of endothelium derived nitric oxide. *The Journal of Clinical Investigation*, 90: 727-732, 1992.

- 35- Van Ittersum FJ, de Man AM, Thijssen S, de Knijff P, Slagboom E, Smulders Y, et al. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and complications of insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15(7): 1000-7.
- 36- Cöllins T; Cybulsky MI. NF- $\kappa$ B:pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *The Journal of Clinical Investigation*, 107(3): 255-264, 2001.
- 37- Barbosa JHP; Oliveira SL; Seara LT. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. *Revista de Nutrição*, 22(1): 113-24.
- 38- Monnier VM. Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Arch Biochem Biophys*. 2003; 419(1):1-15.
- 39- Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005; 54(6):1615-25.
- 40- Ahmed N. Advanced glycation end-products-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005; 67(1):3-21.
- 41- Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JEB. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*. 2006; 29(6):1420-32.
- 42- Griendling KK, Fitzgerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003;108:1912-6.
- 43- Kuyvenhoven JP; Meinders AE. Oxidative stress and diabetes mellitus. Pathogenesis of long term complications. *European Journal of internal Medicine* 10:9 – 19, 1999.
- 44- Dahl-Jorgensen K, Larsen JR, Hanssen KF. Atherosclerosis in childhood and adolescent type 1 diabetes: early disease, early treatment? *Diabetologia*. 2005;48:1445-53.

- 45- Wadwa RP, Kinney GL, Maahs DM, Snell-Bergeon J, Hokanson JE, Garg SK et al. Awareness and treatment of dyslipidemia in young adults with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:1051-6.
- 46 - Larsen J, Brekke M, Sandvik L, Arnesen H, Hanssen KF, Dahl-Jorgensen K. Silent coronary atheromatosis in type 1 diabetic patients and its relation to long-term glyceamic control. *Diabetes* 2002;51:2637-41.
- 47 – Kannel WB. The Framingham Study: Its 50-year legacy and future promise. *J Atheroscler Tromb* 2000; 6(2):60-6.
- 48 - Arcanjo CL, Piccirillo LJ, Machado IV, Andrade CRM, Clemente EL, Gomes MB. Avaliação de dislipidemia e de índices antropométricos em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005;49(6):951-8.
- 49 - Ruy Lira, Ney Cavalcanti, organizadores. *Diabetes mellitus*. 1ª ed. BR: Diagraphic; 2006. p. 208.
- 50 - Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, Burden AC, Morris A, Waugh NR, et al. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia.* 2003;46:760-5.
- 51 - Giugliano D; Ceriello A; Paolisso G Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19 (3): 257 – 267, 1996.
- 52 - Bertoluci MC, et al. Disfunção endotelial no diabetes melito tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab,* 52(2): 416-26, 2008 .
- 53 – Rodrigues T, et al. Homeostase pressórica e complicações microvasculares em pacientes diabéticos. *Arq Bras Endocrinol Metab,* 49(6): 882-90, 2005.
- 54 - Wajchenberg BL; Rassi N; Feitosa ACR; Lerário AC; Betti RTB. Doença cardiovascular no diabetes melito tipo 1. *Arq. bras. endocrinol. metab;*52(2):387-397, mar. 2008.

55 - Droga G; Rich L; Stanton K; Watts GF. Endothelium-dependent and independent vasodilation studied at normoglycaemia in Type I diabetes mellitus with and without microalbuminuria. *Diabetologia*: 44: 593-601, 2001.

56 - Dahl-Jorgensen K, Larsen JR, Hanssen KF. Atherosclerosis in childhood and adolescent type 1 diabetes: early disease, early treatment? *Diabetologia* 2005;48:1445-53.

57 - Giannattasio C, Failla M, Piperno A, Grappiolo A, Gamba P, Paleari F, et al. Early impairment of large artery structure and function in Type I diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1999;42:987-94.

58 - Rönback M, Fagerudd J, Forsblom C, Pettersson-Fernholm K, Reunanen A, Per-Henrik Groop and on behalf of the Finnish Diabetic Nephropathy. Altered age-related blood pressure pattern in type 1 diabetes. *Circulation*. 2004;110:1076-82.

59 - Haney EM, Huffman LH, Bougatsos C, Freeman M, Steiner RD, Nelson HD. Screening and treatment for lipid disorders in children and adolescents: systematic evidence review for the US Preventive Services Task Force. *Pediatrics*. 2007;120(1): e189-207.

60 - Castro SH, Faria-Neto HCC, Gomes MB. Association of postprandial hyperglycemia with in vitro LDL oxidation in nonsmoking patients with type 1 diabetes – a cross-sectional study. *Rev Diabetic Stud*. 2005;2(3):157-64.

61 - Berry C, Brosnan MJ, Fennell J, Hamilton CA, Dominiczak AF. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001; 10: 247-55.

62 - Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radical in biology and medicine*. 2. ed. New York: Oxford University Press; 1989.

63 - Kuyvenhoven JP; Meinders AE. Oxidative stress and diabetes mellitus. Pathogenesis of long term complications. *European Journal of internal Medicine* 10:9 – 19, 1999.

64 - Meagher EA; Fitzgerald GA. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radical Biol Med* 28: 1745-1750, 2000

65 - Yoshihiro T, Kathy K. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. *Hypertension*. 2003;42:1075-108.

66 - The Diabetes Control and Complications Trial. Epidemiology of diabetes interventions and complications research group. *N Engl J Med*. 2003; 348: 2294- 303.

67 - Heerebeek LV, Meischl C, Stoker W, Meijer CJLM, Niessen HWM, Roos D. NADPHoxidase: new source of reactive oxygen species in the vascular system? *J Clin Pathol*. 2002; 55: 561-68.

68 - Ihnat MA, Thorpe JE, Kamat CD, Szabó C, Green DE, Warnke LA, et al. Reactive oxygen species mediate a cellular 'memory' of high glucose stress signaling. *Diabetologia*. 2007; 50:1523-31.

69 - Channon KM, Guzik TJ. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: Relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J Physiol Pharmacol*. 2002; 53 (4): 515-24.

70 - Ballinger SW, Patterson C, Yan CN, Doan R, Burow DL, Young CG, et al. Hydrogen peroxide and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res*. 2000; 86: 960-6.

71 - Ceriello A, Morocutti A, Mercuri F, Quagliario L, Moro M, Damante G, Viberti GC. Defective intracellular antioxidant enzyme production in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes*. 2000, 49 (12): 2170-77.

72 - Marra G, Cotroneo P, Pitocco D, Manto A, Di Leo MAS, Ruotolo V, et al. Early increase of oxidative stress and reduced antioxidant defenses in patients with uncomplicated type 1 diabetes. A case for gender difference. *Diabetes Care*. 2002; 25: 370-5.

73 - Matheus AS; Cobas RA; Gomes MB. Dislipidemias no diabetes melito tipo 1: abordagem atual. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 52(2): 334-9, 2008 .

74 - Stryer L. Biosynthesis of membrane lipids and steroids. In: Stryer L, editor. *Biochemistry*. 4th edition. New York: WH Freeman, 697-8, 1996.

75- Mahley RW, Weisgraber KH, Farese RV. Disorders of lipid metabolism. In: Williams textbook of endocrinology, 10<sup>th</sup> ed. New York: Elsevier Science, 2003, p.1646-52.

76- Hevonoja T, Pentikainen MO, Hyvonen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1488(3): 189-210.

77- Sevanian A, Bittolo-Bon G, Cazzolato G, Hodis H, Hwang J, Zamburlini A, et al. LDL- is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein. *J Lipid Res*. 1997; 38(3):419-28.

78- Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*, v.84, n.4, Oct, p.1381-478. 2004.

79- Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteins, platelets, and atherothrombosis. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62(10):1161-78.

80- Hevonoja T, Pentikainen MO, Hyvonen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1488(3): 189-210.

81- Chang YH, Adballa DS, Sevanian A. Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein. *Free Radic Biol Med*. 1997; 23(2): 202-14.

- 82- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biol Med.* 1992; 13(4):341-90.
- 83- Castro SH, Faria-Neto HCC, Gomes MB. Association of postprandial hyperglycemia with in vitro LDL oxidation in nonsmoking patients with type 1 diabetes – a cross-sectional study. *Rev Diabetic Stud.* 2005;2(3):157-64.
- 84- Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004; 84(4): 1381-478.
- 85- Esterbauer, H., G. Wag, et al. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br Med Bull*, 49(3):566-76, 1993.
- 86- Berliner, J. A., M. Navab, et al. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*, 91(9):2488-96, 1995.
- 87- Goldman L, Ausiello D. *Cecil Tratado de Medicina Interna*. 22ed. Amsterdam: Elsevier, 2005.
- 88- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407:233.
- 89- Jialal I, Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem* 1996; 42: 498-506.
- 90- Keaney, J. F., Jr. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med*, 21(4-5):99-166, 2000.
- 91- Yamaguchi Y, Kunitomo M, Haginaka J. Assay methods of modified lipoproteins in plasma. *J Chromatog. B* 2002; 781:313-330.
- 92- Brown MS, Goldstein JL. Scavenging for receptors. *Nature* 1990; 343: 508-509.



- 93- Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D. A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1989; 264: 2599-2604.
- 94- Leake DS. Effects of mildly oxidised low density lipoprotein on endothelial cell function. *Curr Opin Lipidol* 1991; 2:301-305.
- 95- Tsimikas S, Beyer RW, Patel R et al. Prospective evaluation of the role of oxidized LDL in acute coronary syndromes treated with percutaneous intervention. *Circulation*. 2000; 102: 11-13.
- 96- Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
- 97- Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J* 1993; 69:377-381.
- 98- Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989; 84:1086-1095.
- 99- Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 326:242-50, 1992.
- 100- Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Méd*. 326:310-18, 1992.
- 101- Xavier HT, Parra ADS, Rocha MTS, Franchini RJA, Toledo GAR. Efeitos da lipoproteína LDL-oxidada sobre a proliferação e a motilidade espontânea in vitro de células endoteliais de artérias coronárias humanas. *Arq Bras Cardiol* 2004; 83:488-492.
- 102- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature*. 362: 801-9, 1993.

103- Ku G, Thomas CE, Akeson AL, Jackson RL. Induction of interleukin 1 beta expression from human peripheral blood monocyte-derived macrophages by 9-hydroxyoctadecadienoic acid. *J Biol Chem.* 267:14183-88, 1992.

104- Portal, V.L.; Moriguchi, E.H.; Vieira, J.L.; Schio, S.; Mastalir, E.T.; Buff, F.; Bortolini, E.B.; Brach, R.S.; Rodrigues, R. Comparison of the effect of two HMG CoA reductase inhibitors on LDL susceptibility to oxidation. *Arq Bras Cardiol* 80: 156-161, 2003

105- Varin R; Mulder P; Tamion F; Richard V; Henry JP; Lallemand F; Lerebours G; Thuillez C. Improvement of endothelial function by chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure: role of nitric oxide, prostanoids, oxidant stress, and bradykinin. *Circulation* 102: 351-356, 2000

106- Matteucci, E.; Giampietro, O. Oxidative stress in families of type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 23: 1182-1186, 2000

107- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA.* 2003; 289:2560-72.

108- World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: WHO, 1998.

109- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* .14:499-502, 1972.

110- Nathan DM, Kuenen J, Borg MD, Zheng H, Schoenfeld D, Heine RJ. Translation of the A1c assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care.* 2008; 31:1473- 8.

111- Heery JM; Kozak M; Stafforini DM; Jones DA; Zimmerman GA; McIntyre TM. Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells. *J Clin Invest* 96: 2322-30, 1995.

112- Gornall AG; Bardawill CJ; David MM. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J Biol Chem* 177: 751-766, 1949.

113- Marathe GK, Davies SS, Harrison KA, Silva AR, Murphy RC, Castro-Faria-Neto SH, et al., Inflammatory plateletactivating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 28395–28404.

114- American Diabetes Association. Diabetes statistics for Youth. Disponível em: <http://www.diabetes.org/utills/printthispage.jsp>, 2004.

115- Chilsom GM; Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: na overview. *Free Radical Biol Med* 28: 1815-26, 2000.

116- Esterbauer H, Striegel G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Commun.* 1989; 6:67-75.

117- Hendrickson A, Mckinstry LA, Lewis JK et al. Ex vivo measures of LDL oxidative susceptibility predict carotid artery disease. *Atherosclerosis* 2005;179: 147-153.

118- Carru C, Zinellu A, Galistu F et al. The evaluation of the oxidative state of native-LDL: three methods compared.*J Biochem Biophys Methods* 2004; 61: 271-281.

119- Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R et al. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet.*1992; 339:883-887.

120- Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002; 91:281-291.

121- Shimada K, Mokuno H, Matsunaga E, Miyazaki T, Sumiyoshi K, Miyauchi K, Daida H. Circulating oxidized low-density lipoprotein is an independent predictor for cardiac event in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2004; 174:343-347.

122- Renard CB, Kramer F, Johansson F, Lamharz N, Tannock LR, et al. Diabetes and diabetes-associated lipid abnormalities have distinct effects on initiation and progression of atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 114(5):659-68, 2004.

123- Haney EM, Huffman LH, Bougatsos C, Freeman M, Steiner RD, Nelson HD. Screening and treatment for lipid disorders in children and adolescents: systematic evidence review for the US Preventive Services Task Force. *Pediatrics.* 120(1):189-207, 2007.

124- Kreisberg RA. Diabetic dyslipidemia. *Am J Cardiol* 82: 67U-73U, 1998.

125- Dimitriadis E; Griffin M; Owens D; Johnson A; Collins P; Tomkin GH. Oxidation of low-density lipoprotein in NIDDM: its relation to fatty acid composition. *Diabetologia* 38: 1300-1306, 1995.

126- Makimattila S; Liu ML; Vakkilainen J; Schlenzka A; Lahdenpera S; Syvanne M; et al. Impaired endothelium-dependent vasodilation in type 2 diabetes: relation to LDL size, oxidized LDL, and antioxidants. *Diabetes Care* 22: 973-981, 1999.

127- Liguori A; Abete P; Hayden JM; Cacciatore F; Rengo F; Ambrosio G; et al. Effect of glycaemic control and age on low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in diabetes mellitus type 1. *Eur Heart J* 22: 2075-2084, 2001.

128- Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its biological significance. *J Biol Chem* 272: 20963-20966, 1997.

129- Schlotte V; Sevanian A; Hochstein P; Weithmann U. Effect of uric acid and chemical analogues on oxidation of human low density lipoprotein in vitro. *Free Radical Biol Med* 25: 839-847, 1998.

130- Hoeldtke RD; Bryner KD; Mcneill DR; Hobbs GR; Riggs JE; Warehime SS; Christie I; Ganser G; Van Dyke K. Nitrosative stress, uric acid, and peripheral nerve function in early type 1 diabetes. *Diabetes* 51: 2817-2825, 2002.

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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