



**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Luciana da Silveira Cavalcante

**OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DO
COLESTEROL DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE
PEQUENA E DENSA (sd-LDL-C)**

Florianópolis

2011

LUCIANA DA SILVEIRA CAVALCANTE

**OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DO
COLESTEROL DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE
PEQUENA E DENSA (sd-LDL-C)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmácia na Área de concentração Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz da Silva

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

C376o Cavalcante, Luciana da Silveira
Otimização e aplicação da quantificação do colesterol
da lipoproteína de baixa densidade pequena e densa (sd-LDL-C)
[dissertação] / Luciana da Silveira Cavalcante ; orientador,
Edson Luiz da Silva. - Florianópolis, SC, 2011.
134 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Lipoproteínas LDL. 3. Otimização.
4. Dislipidemias. 5. Diabetes. 6. Risco cardiovascular.
7. Colesterol. I. Silva, Edson Luiz da. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

Luciana da Silveira Cavalcante

**OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DO
COLESTEROL DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE
PEQUENA E DENSA (sd-LDL-C)**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de MESTRE EM FARMÁCIA e, aceita em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2011

Prof. Eloir Paulo Schenkel, Dr.
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Banca Examinadora:

Prof. Edson Luiz da Silva, Dr.
Presidente (UFSC)

Prof. Geraldo Picheth, Dr.
Membro Externo (UFPR)

Prof^a Flávia Martinello, Dra.
Membro (UFSC)

Prof^a Tania Beatriz Creczynski Pasa, Dra.
Membro (UFSC)

Dedico esta obra à minha família, parte fundamental da minha vida. E em especial aos meus pais, Ana e Humberto, pelo apoio e incentivo que sempre me dispensaram.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Edson Luiz da Silva, por compartilhar do seu conhecimento, incentivar o pensamento crítico, pela paciência e dedicação incessante, por ter confiado a mim este trabalho e permitido desenvolver minhas habilidades ao longo destes dois anos.

Aos meus pais, Ana e Humberto, pelo apoio emocional e financeiro, pelo investimento na minha educação, pelo incentivo, pelos valores passados e por terem me ensinado a fazer sempre o melhor que eu posso.

Aos meus irmãos, Adriano e Fabiana, pela amizade e companheirismo que compartilhamos desde sempre, por serem meus conselheiros e por terem gerado meus três grandes amores: Isabela, Gabriela e Patrick.

Aos meus amigos, com quem ao longo deste período pude compartilhar não só os medos, angústias e incertezas, mas também as alegrias e as boas risadas.

À minha tia Bia (*in memoriam*) que, infelizmente, não pôde me ver concluir mais esta etapa, porém, valeu por todo o tempo em que esteve presente na minha vida. Saudade eterna!

À Dona Olinda (*in memoriam*) que me acolheu como a uma neta durante seis dos sete anos em que resido em Florianópolis.

Aos meus antigos orientadores, com quem construí uma relação de amizade e aprendi lições valiosas. À professora Biba, que me abriu as portas do seu laboratório ainda na graduação, e ali pude ter as primeiras noções sobre análises laboratoriais, trabalho em equipe e tomada de decisões. À professora Claudia, minha orientadora de iniciação científica, que me introduziu no mundo da pesquisa e que me ensinou a aceitar que, às vezes, os experimentos dão errado! Ao professor Marcos, meu orientador de TCC em Análises Clínicas, que me fez gostar ainda mais da estatística e que foi um grande incentivador da minha entrada no mestrado. Todos vocês são parte desta conquista e de outras que virão, por isto serei sempre grata.

Ao Hospital Universitário da UFSC (HU-UFSC), em nome das professoras Maria de Lourdes Rovaris, Diretora de Apoio Assistencial, e Maria Luiza Bazzo, chefe do Laboratório de Análises Clínicas, por terem viabilizado a realização de alguns ensaios analíticos do presente trabalho.

Aos bioquímicos e técnicos do setor de Bioquímica do Laboratório de Análises Clínicas HU/UFSC, Cris, Jorge, Érico, Laura, Carlão, Joelson, Valdair e Elayne, que me receberam admiravelmente e me ajudaram em tudo que puderam.

Aos profissionais técnicos do Setor de Coleta do Laboratório de Análises Clínicas, que prestaram inestimável auxílio com a obtenção das amostras de sangue dos voluntários participantes deste estudo, especialmente Luciano, Rodrigo, Assis, Luiz, Lauro e Fabrícia.

Aos estudantes da 10ª fase do Curso de Farmácia - Análises Clínicas, que ajudaram igualmente nas coletas de sangue, Gustavo, Gabriela Maliska, Felipe, Gabriela Rauber, Marco, Rafael, Débora, Cláudia, os quais, inclusive, participaram como voluntários deste estudo, e às bolsistas de extensão, Flávia e Priscila pelo auxílio prestado.

À professora Elisabeth Wazlawik, do Departamento de Nutrição da UFSC, pela ajuda com os pacientes diabéticos.

Aos voluntários que aceitaram participar desta pesquisa.

À técnica-administrativa Jeane, SPP-HU, que entendeu as particularidades do meu projeto e me permitiu consultar os prontuários dos pacientes quando necessário.

Aos professores Dr. Raul C. Maranhão, Laboratório de Pesquisa em Lipídeos do InCor-HC-FM-USP, e Dra. Dulcinéia S. P. Abdalla, Laboratório de Pesquisa em Oxidação de Lipoproteínas e Aterogênese - FCF/USP, por terem gentilmente disponibilizado o uso dos respectivos laboratórios e equipamentos.

À farmacêutica-bioquímica Ligia, Laboratório de Análises Clínicas do HU/USP, por ter gentilmente cedido as amostras de soro. Ao funcionário técnico Maurício do LAC/USP, por ter disponibilizado o uso do equipamento de análises bioquímicas.

Aos professores Dr. Geraldo Picheth, Dra. Flávia Martinello e Dra. Tânia C. Pasa, por terem aceitado participar da constituição da comissão avaliadora desta dissertação.

Às colegas de laboratório e outras pessoas que tive a oportunidade de conhecer nestes dois anos: Elenise, Aline, Fernanda, Daisy, Grazi, Gabi, Michele, Leila, Fran, Patrícia Gelcimar.

A todos que, de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e concretização deste trabalho. Muito obrigada!

Luciana da Silveira Cavalcante

“Temos que fazer o melhor que podemos. Esta é a nossa sagrada responsabilidade humana.”

(Albert Einstein)

RESUMO

A elevação sérica do LDL-colesterol (LDL-C) está bem estabelecida como importante fator de risco para as doenças cardiovasculares (DCV). No entanto, foi demonstrado que as características qualitativas da LDL também desempenham papel importante no desenvolvimento da doença cardíaca, particularmente a predominância da subfração pequena e densa de LDL (sd-LDL, do inglês *small, dense LDL*) (padrão ou fenótipo B), composta por partículas de diâmetro menor que 25,5 nm e faixa de densidade entre 1,044 e 1,063 g/mL. Tendo em vista a importância da sd-LDL para as DCV e a dificuldade metodológica para a sua quantificação, o objetivo deste estudo foi aprimorar a metodologia para a determinação desta subfração visando a sua inserção na rotina laboratorial. A sd-LDL foi isolada pelo método de precipitação com heparina e magnésio e quantificada no sobrenadante aplicando o método homogêneo para LDL-C. A otimização do método de precipitação foi feita no sentido de promover a sedimentação de lipoproteínas em amostras lipêmicas, as quais não formam *pellet*. Para tanto, foram utilizadas estratégias como filtração, adição de surfactantes na amostra, aumento da concentração de poliânions e cátions divalentes e diluição do soro. Para confirmar a equivalência do método de precipitação foram feitos ensaios em paralelo pelo método de referência, por ultracentrifugação. Após a confirmação desta associação, foi avaliada a concentração de sd-LDL-C em amostras de soro de indivíduos normolipidêmicos, dislipidêmicos e diabéticos. Para detectar diferenças, foram utilizados o teste *t* pareado de Student, ou o teste de Wilcoxon, nos ensaios de otimização; a regressão linear simples e a correlação de Pearson na confirmação da associação entre os métodos; e o teste *t* para amostras independentes, ou o teste de Mann-Whitney, na comparação do sd-LDL-C entre os grupos de indivíduos. As amostras de soro se mantiveram estáveis a 4 e -20 °C pelos períodos de 4 e 15 dias, respectivamente, enquanto o reagente de precipitação se manteve inalterado durante o período avaliado de sete meses. Dentre as estratégias de otimização do método de precipitação avaliadas, a diluição do soro foi a que forneceu resultados mais promissores, sendo que o diluente que se mostrou mais eficaz em promover a sedimentação das amostras lipêmicas foi o tampão fosfato 100 mmol/L pH 8,5. O método de precipitação apresentou boa associação com a ultracentrifugação ($y = -2,22 + 0,99x$, $r = 0,791$, $p < 0,0001$). A quantificação sérica do sd-LDL-C foi realizada em 137 indivíduos normolipidêmicos, 191 dislipidêmicos (sendo 68 em tratamento com

hipolipemiantes), e 106 pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2. Os indivíduos dislipidêmicos sem tratamento, os dislipidêmicos sob tratamento e os pacientes diabéticos apresentaram concentração de sd-LDL-C em média 2, 2,5 e 2,6 vezes maior que os indivíduos normolipidêmicos, respectivamente ($p < 0,05$). Entre os indivíduos normolipidêmicos, houve predominância de sd-LDL-C (padrão B, $> 50\%$ do LDL-C total) em 2,2% dos participantes e o padrão intermediário (40-50% da LDL total) em 9,5%. A estratificação por faixa etária, revelou que existe, em média, aumento de 8,3% na concentração de sd-LDL-C (2 mg/dL) a cada 10 anos de idade ($p < 0,05$). Os homens de 18 a 28 anos apresentaram concentração de sd-LDL-C, em média, 24% maior do que as mulheres de mesma faixa etária ($p < 0,05$), assim como as mulheres de 40 a 78 anos também possuem valores de sd-LDL-C superiores em relação às mulheres mais jovens ($p < 0,05$). Os indivíduos dislipidêmicos sob tratamento apresentaram concentração de sd-LDL-C 25,8% menor, quando comparados àqueles sem tratamento ($p < 0,0001$). Dentre os indivíduos dislipidêmicos sem tratamento, aqueles com hiperlipidemia mista têm concentração de sd-LDL-C 36,6% maior do que os indivíduos com hipercolesterolemia. A concentração de sd-LDL-C nos pacientes diabéticos apresentou correlação positiva com a concentração de hemoglobina glicada ($r = 0,305$; $p = 0,001$). Os valores de sd-LDL-C de todos os participantes apresentaram correlação positiva com o índice de aterogenicidade ($\log \text{ TG/HDL-C}$; $r = 0,503$, $p < 0,0001$). Em resumo, no presente estudo aperfeiçoamos um método prático e de custo acessível, o qual poderá ser utilizado na rotina laboratorial para a identificação de risco aumentado para as DCV, bem como para o acompanhamento da concentração de sd-LDL em grupos de risco, como diabéticos e dislipidêmicos.

Palavras chave: LDL pequena e densa, quantificação laboratorial, método de precipitação, otimização, dislipidemias, diabetes tipo 2, risco cardiovascular, colesterol.

ABSTRACT

High levels of LDL-cholesterol (LDL-C) are well established as an important risk factor for cardiovascular diseases (CVD). However, it has been shown that qualitative characteristics of LDL may also play an important role in the development of heart diseases, particularly in view of the predominance of small dense LDL (sd-LDL) (pattern or phenotype B), with particle size less than 25.5 nm and density range between 1.044 and 1.063 g/mL. Taking into account the importance of sd-LDL for CVD, as well the methodological difficulties for its quantification, the aim of this study was to improve a method of sd-LDL-C measurement in order to include such assay in the clinical practice routine. The sd-LDL was isolated by the precipitation method with heparin and magnesium and quantified in the supernatant using the homogeneous direct method for LDL-C. The optimization of the precipitation method was carried out in order to promote the sedimentation of lipoproteins in hyperlipemic serum, which did not form pellets. For this purpose, we used the following strategies: filtration, addition of surfactants in the sample, increasing the concentration of polyanions and divalent cations, and serum dilution. Measurements of sd-LDL-C were also carried out by heparin-magnesium precipitation and ultracentrifugation to confirm the equivalence between methods. Thereafter, sd-LDL-C levels were evaluated in serum of normolipidemic or dyslipidemic subjects, and diabetic patients. To detect differences, we used Student's paired *t* test, or Wilcoxon's test, in the optimization assays; simple linear regression and Pearson correlation to confirm the association between methods; and Student's *t* test for independent samples, or Mann-Whitney's test, for comparison of sd-LDL-C among groups of individuals. Serum samples were stable at 4 and -20 °C for the periods of 5 and 15 days, respectively, while the heparin-magnesium reagent remained stable during the study period of 7 months. Among the strategies for optimization of the precipitation method, the serum dilution provided the most promising results and, in addition, 100 mmol/L phosphate buffer, pH 8.5, was more effective in promoting sedimentation of hyperlipemic samples. The precipitation assay showed good correlation with ultracentrifugation ($y = -2.22 + 0.99 x$, $r = 0.791$, $p < 0.0001$). Serum levels of sd-LDL-C were measured in 137 normolipidemic subjects, 191 dyslipidemic (68 on lipid-lowering therapy) and 106 patients with type 2 diabetes *mellitus*. Dyslipidemic individuals, dyslipidemic patients on lipid-lowering treatment and diabetic patients

had sd-LDL-C levels 2, 2.5 and 2.6-fold, respectively, higher than that of normolipidemic subjects ($p < 0.05$). There was a predominance of sd-LDL-C (pattern B, $> 50\%$ of total LDL) in 2.2% of normolipidemic individuals, and the intermediate pattern (40-50% of total LDL) in 9.5%. Stratification by age showed sd-LDL-C increase of 8.3% (or 2 mg/dL), in average, at each 10 y ($p < 0.05$). Young male (18-28 y) showed sd-LDL-C levels 24% higher, in average, than those of female at similar age ($p < 0.05$), as well as female aged 40 to 78 y also have enhanced sd-LDL-C values in relation to younger ones ($p < 0.05$). Dyslipidemic individuals on lipid-lowering therapy presented levels of sd-LDL-C 25.8% lower than those not receiving drugs ($p < 0.0001$). Dyslipidemic subjects with combined hyperlipidemia had concentration of sd-LDL-C 36.6% higher than that of hypercholesterolemic subjects. Levels of sd-LDL-C in diabetic patients were positively correlated to glycated hemoglobin values ($r = 0.305$, $p = 0.001$). Serum concentration of sd-LDL-C of all volunteers had positive association with the atherogenic index ($\log \text{ TG/HDL-C}$; $r = 0.503$, $p < 0.0001$). In summary, in the present study we improved a practical and inexpensive assay for measurement of sd-LDL-C, which could be used in the laboratory routine to identify increased risk for CVD development, and/or monitoring sd-LDL-C levels in subjects of high risk, such as diabetic and dyslipidemic patients.

Keywords: Small dense LDL, laboratory assay, precipitation method, optimization, dyslipidemia, type 2 diabetes, cardiovascular risk, cholesterol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição das principais classes de partículas de lipoproteínas no plasma humano de acordo com a sua densidade e tamanho	32
Figura 2.	Principais fases da aterogênese	35
Figura 3.	Origem metabólica das subfrações de LDL contendo menos colesterol	36
Figura 4.	Aspecto da mistura “soro-reagente precipitante” após centrifugação. (A) Soro normolipêmico e (B) soro hipertrigliceridêmico (TG = 400-700 mg/dL)	46
Figura 5.	Estabilidade dos reagentes cloreto de magnésio e solução precipitante completa (MgCl ₂ e Heparina) armazenados a 4 °C	53
Figura 6.	Estabilidade do reagente precipitante armazenado a 4 °C por 220 dias	54
Figura 7.	Estabilidade das amostras de soro a 4 °C, contendo concentrações baixas (A), médias (B) e altas (C) de sd-LDL-C	55
Figura 8.	Estabilidade do sobrenadante, obtido após a precipitação das amostras de soro, armazenado a 4 °C	56
Figura 9.	Estabilidade do soro e do sobrenadante (obtido após precipitação do soro) armazenados a -20 °C por até 15 dias	56
Figura 10.	Efeito da lipemia na precipitação e sedimentação do agregado de lipoproteínas. (A) Mistura de amostra hiperlipêmica e reagente precipitante de sd-LDL indicando ausência de sedimentação do agregado de lipoproteínas; (B) Mistura de amostra normolipêmica e reagente precipitante de sd-LDL indicando formação do <i>pellet</i>	57
Figura 11.	Efeito da adição de VLDL na quantificação do sd-LDL-C em soros normolipêmicos (A) e hipertrigliceridêmicos (B)	58
Figura 12.	Efeito da filtração da mistura “soro lipêmico e reagente pricipante” na quantificação do sd-LDL-C ..	59
Figura 13.	Efeito da concentração do surfactante SDS na quantificação de (A) sd-LDL-C e (B) HDL-C em amostras lipêmicas (adicionado na proporção de 1:100, v/v)	60

Figura 14.	Efeito da concentração de cátions divalentes (Mg^{2+}) na quantificação de sd-LDL-C em amostras lipêmicas	61
Figura 15.	Efeito da concentração do reagente precipitante Mg^{2+} -heparina na quantificação de sd-LDL-C em amostras lipêmicas	62
Figura 16.	Efeito da diluição de amostras lipêmicas com diferentes soluções (1:2, v/v). (A) Diluição utilizando-se solução fisiológica (NaCl 0,85%), água e PBS; (B) Diluição com tampão fosfato 100 mmol/L de diferentes concentrações hidrogeniônicas	64
Figura 17.	Interferência da lipemia na sedimentação do agregado de lipoproteínas. (A) Soro normotrigliceridêmico; (B) Soro hipertrigliceridêmico (TG, 550 mg/dL) antes da diluição e (C) após diluição com tampão fosfato pH 8,5 (1:2, v/v)	65
Figura 18.	Efeito da concentração de triglicerídeos na quantificação do sd-LDL-C antes (controle) ou após a diluição com tampão fosfato pH 8,5 (1:2, v/v)	67
Figura 19.	Isolamento da sd-LDL por ultracentrifugação. (A) Formação do gradiente de densidade após adição de KBr à amostra de soro, antes da ultracentrifugação; (B) Faixa de densidade contendo LDL, após a ultracentrifugação	68
Figura 20.	Padrões de distribuição da sd-LDL após ultracentrifugação. (A) Padrão A (< 40% de sd-LDL em relação à LDL total); (B) Padrão intermediário (40-50% de sd-LDL em relação à LDL total) e (C) Padrão B (> 50% de sd-LDL em relação à LDL total)	69
Figura 21.	Associação entre o método de precipitação para a quantificação do sd-LDL-C e o método de referência por ultracentrifugação	70
Figura 22.	Gráfico de Bland-Altman. Diferença entre o método de ultracentrifugação e o método de precipitação <i>versus</i> a média dos valores obtidos pelos dois métodos	70
Figura 23.	Estimativa do sd-LDL-C por cálculo utilizando sistema fechado Dimension e reagente Siemens ou o sistema aberto Cobas e reagente Labtest	71

Figura 24.	Correlação entre os sistemas fechado e aberto para a quantificação de (A) colesterol total e (B) HDL-C	72
Figura 25.	Efeito da diluição do reagente precipitante de HDL na determinação do HDL-C no sobrenadante de amostras previamente precipitadas com o reagente para sd-LDL	73
Figura 26.	Correlação entre o método direto para HDL-C e o método de precipitação seletiva, após diluição do reagente precipitante. (A) diluição 1:2,8 (v/v); (B) diluição 1:3 (v/v)	74
Figura 27.	Quantificação do sd-LDL-C por diferentes conjuntos diagnósticos	75
Figura 28.	Concentração de sd-LDL-C (A) e em porcentagem de sd-LDL-C em relação ao LDL-C total (B) no soro dos participantes dos diferentes grupos de estudo	81
Figura 29.	Concentração de sd-LDL-C em indivíduos normolipidêmicos estratificada por faixa etária	82
Figura 30.	Concentração do sd-LDL-C em mulheres e homens normolipidêmicos	83
Figura 31.	Concentração de sd-LDL-C em mulheres e homens normolipidêmicos estratificados por faixa etária	83
Figura 32.	Distribuição percentual do sd-LDL-C em relação ao LDL-C total	84
Figura 33.	Distribuição do sd-LDL-C entre os indivíduos normolipidêmicos. (A) Concentração absoluta de sd-LDL-C e (B) porcentagem do LDL-C total	85
Figura 34.	Medicamentos hipolipemiantes, em porcentagem, utilizados pelos indivíduos dislipidêmicos	86
Figura 35.	Concentração de sd-LDL-C em indivíduos dislipidêmicos com e sem tratamento hipolipemiante	87
Figura 36.	Concentração de sd-LDL-C em indivíduos com diferentes tipos de dislipidemias	87
Figura 37.	Concentração de sd-LDL-C em indivíduos com HDL-C baixo isolado, associado a TG elevado ou associado a LDL-C elevado	88
Figura 38.	Concentração de sd-LDL-C em indivíduos diabéticos tipo 2 com ou sem tratamento hipolipemiante	89
Figura 39.	Correlação de Pearson entre a concentração de sd-LDL-C e hemoglobina glicada em pacientes diabéticos tipo 2	89

Figura 40.	Associação entre a concentração de sd-LDL-C e o índice de aterogenicidade ($IAP = \log [TG/HDL-C]$) em todos os indivíduos participantes do estudo (Correlação e Pearson)	90
Figura 41.	Distribuição de sd-LDL-C no soro dos indivíduos participantes do estudo. (A) Normolipidêmicos; (B) Dislipidêmicos sob tratamento hipolipemiante; (C) Dislipidêmicos sem tratamento hipolipemiante e; (D) Diabéticos	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Efeito da diluição da amostra com tampão fosfato pH 8,5 em amostras hipertrigliceridêmicas	66
Tabela 2.	Características biodemográficas dos participantes	78
Tabela 3.	Parâmetros bioquímicos do perfil lipídico e glicêmico dos participantes	79
Tabela 4.	Intervalos de concentração da sd-LDL-C (mg/dL) no soro dos participantes do estudo.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	<i>American Diabetes Association</i>
CETP	Proteína de transferência de ésteres de colesterol
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronariana
DCV	Doenças cardiovasculares
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
HbA _{1c}	Hemoglobina glicada fração A _{1c}
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL-C	Concentração de colesterol associada à HDL (HDL-colesterol)
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IMC	Índice de massa corporal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	Concentração do colesterol associada à LDL (LDL-colesterol)
lb-LDL	<i>Large, buoyant LDL</i> (LDL grande e leve)
sd-LDL	<i>Small, dense LDL</i> (LDL pequena e densa)
sd-LDL-C	Concentração de colesterol associada à sd-LDL (sd-LDL-colesterol)
NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>
NMR	Espectroscopia de ressonância nuclear magnética
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato salino)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TG	Triglicerídeos
VLDL	Lipoproteína de muita baixa densidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
1.1	Apresentação do estudo	29
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1	DOENÇAS CARDIOVASCULARES	31
2.1.1	Lipoproteínas	31
2.1.2	Dislipidemias	32
2.1.3	Aterosclerose	33
2.1.4	LDL pequena e densa	35
2.1.4.1	Origem metabólica	35
2.1.4.2	sd-LDL e risco para DAC	36
2.1.4.3	sd-LDL e hipolipemiantes	37
2.1.4.4	Métodos de quantificação da sd-LDL	38
2.1.4.4.1	<i>Eletroforese por gradiente em gel sem desnaturação (NDGGE)</i>	38
2.1.4.4.2	<i>Ultracentrifugação por gradiente de densidade (DGU)</i>	38
2.1.4.4.3	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear ...</i>	39
2.1.4.4.4	<i>Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) ...</i>	39
2.1.4.4.5	<i>Método de precipitação com Mg²⁺ e heparina</i>	40
2.1.4.4.6	<i>Método homogêneo para sd-LDL-C</i>	40
3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	MATERIAIS	43
4.2	MÉTODOS	43
4.2.1	Isolamento por precipitação e quantificação da sd-LDL	43
4.2.2	Ensaio de estabilidade dos reagentes e das amostras	44
4.2.3	Otimização da metodologia	45
4.2.4	Estabelecimento de “controle” para amostras hipertrigliceridêmicas	46
4.2.5	Interferência da lipemia	47
4.2.6	Confirmação da associação entre o método de precipitação e o método de referência	47
4.2.7	Estimativa da sd-LDL por cálculo	48

4.2.8	Determinação da concentração de sd-LDL-C em soro de indivíduos normolipidêmicos, dislipidêmicos e diabéticos	49
4.2.9	Análise estatística	50
5	RESULTADOS	53
5.1	ESTABILIDADE	53
5.1.1	Estabilidade dos reagentes	53
5.1.2	Estabilidade das amostras	54
5.2	OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO DE PRECIPITAÇÃO	57
5.2.1	Filtração da amostra	58
5.2.2	Adição de surfactante	59
5.2.3	Efeito da concentração de poliânions	60
5.2.4	Diluição do soro	62
5.3	INTERFERÊNCIA DOS LIPÍDEOS NA SEDIMENTAÇÃO DAS LIPOPROTEÍNAS.....	66
5.3.1	Colesterol e triglicerídeos.....	66
5.4	CONFIRMAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O MÉTODO DE PRECIPITAÇÃO E O MÉTODO DE REFERÊNCIA	67
5.5	OBTENÇÃO DO sd-LDL-C POR CÁLCULO	71
5.6	QUANTIFICAÇÃO DO sd-LDL-C EM INDIVÍDUOS NORMOLIPIDÊMICOS, DISLIPIDÊMICOS OU DIABÉTICOS TIPO 2	76
5.6.1	Características biodemográficas e clínicas dos participantes	76
5.6.2	Concentração de sd-LDL-C em indivíduos normolipidêmicos, dislipidêmicos e diabéticos tipo 2	80
5.6.3	Concentração de sd-LDL-C em função da idade e do sexo em indivíduos normolipidêmicos	80
5.6.4	Concentração de sd-LDL-C em indivíduos dislipidêmicos com e sem tratamento hipolipemiante	86
5.6.5	Concentração de sd-LDL-C em pacientes diabéticos tipo 2	88
5.6.6	Associação entre o sd-LDL-C e o índice de aterogenicidade	90

5.6.7	Intervalos de concentração e frequência de distribuição de sd-LDL-C no soro dos participantes	91
6	DISCUSSÃO	93
7	CONCLUSÕES	107
	REFERÊNCIAS	109
	APÊNDICE A Termo de Livre Consentimento	125
	APÊNDICE B Questionário de Avaliação Clínica ...	129
	ANEXO A Aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina	133

1 INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação do estudo

No século XX, observou-se mudança nos padrões de morbimortalidade da população brasileira. Dentre as tendências observadas, destacam-se a diminuição da mortalidade por doenças infecciosas e parasitárias e o aumento da mortalidade por doenças crônico-degenerativas. As doenças cardiovasculares (DCV), sendo as primeiras dentre as doenças crônico-degenerativas, apresentaram taxa de 146,4 mortes por 100.000 habitantes em 1999, seguidas pelas causas externas e pelas neoplasias, com taxas de 70,2 e 66,4, respectivamente (CARMO; BARRETO; DA SILVA, 2003). Atualmente, a doença arterial coronariana é a segunda causa cardiovascular de morte no Brasil, mas a primeira em São Paulo, estado e capital, e em outras capitais (LESSA, 2003). A doença arterial coronariana (DAC) é uma das três manifestações da DCV, incluindo também o acidente vascular cerebral e doença vascular periférica. Estudos de caso-controle e estudos epidemiológicos prospectivos demonstraram que o LDL-colesterol (LDL-C) é um fator de risco independente e modificável para DCV. Todavia, existe um grande número de pacientes com DCV que possuem valores desejáveis de LDL-C, indicando, assim, a presença de outros fatores envolvidos na gênese e progressão dessa doença. De fato, a LDL não é uma entidade única, mas, um grupo heterogêneo de partículas variando em tamanho e densidade, podendo ocorrer o predomínio de partículas menores e mais densas que são mais aterogênicas (ZHAO et al., 2009). O aumento da aterogenicidade dessas partículas, denominadas LDL pequena e densa (sd-LDL, do inglês *small, dense LDL*), é devido à diminuição de afinidade pelo receptor da LDL, resultando em menor captação da lipoproteína pelo fígado; maior infiltração na camada subendotelial das artérias; mudanças na conformação da apolipoproteína B e maior susceptibilidade à oxidação devido à diminuição no seu conteúdo antioxidante (ZHAO et al., 2009; BETTERIDGE, 1997). Considerando que o tamanho da partícula está inversamente associado à sua aterogenicidade, pacientes com predominância de sd-LDL têm um perfil mais aterogênico do que aqueles que possuem LDL grande e leve (lb-LDL, do inglês *large buoyant LDL*), apesar de possuir concentrações idênticas de LDL-colesterol (ZHAO et al., 2009).

Tendo em vista a importância da sd-LDL para a DCV e a inexistência de métodos laboratoriais de baixo custo, se faz necessário o

desenvolvimento de método de quantificação, ou a melhoria de métodos já existentes e usuais apenas em pesquisa clínica, que seja de fácil aplicação na rotina laboratorial. Além disso, é importante o estabelecimento de valores de referência para a população saudável, para que, futuramente, este parâmetro seja incluído na avaliação laboratorial do perfil lipídico de pacientes e indivíduos com risco para a DCV, melhorando, assim, a prevenção e o acompanhamento desta doença.

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

2.1.1 Lipoproteínas

Devido à necessidade de transporte dos lipídeos no meio aquoso do plasma sanguíneo para vários tecidos, os lipídeos são agrupados em partículas juntamente com proteínas, chamadas lipoproteínas. As lipoproteínas são complexos macromoleculares de lipídeos (colesterol, triglicerídeo, fosfolipídeos e ácidos graxos) e proteínas (apolipoproteínas e enzimas) (MARSHALL & BANGERT, 1995). Cada lipoproteína contém um núcleo lipídico hidrofóbico, constituído primariamente de ésteres de colesterol e triglicerídeos. Esse núcleo é recoberto por uma camada composta de apolipoproteínas, fosfolípidos e colesterol livre (não-esterificado). Os componentes polares da superfície conferem solubilidade à partícula, o que torna possível o transporte na circulação sanguínea de ésteres de colesterol e triglicerídeos, altamente insolúveis no meio aquoso (BISHOP, ENGELKIRK & FODY, 1996).

As lipoproteínas são classificadas com base na sua densidade, obtidas na separação por ultracentrifugação (Fig. 1) (MARSHALL, 1995; MARSHALL & BANGERT, 1995). As cinco principais classes de lipoproteínas são quilomicrons, lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL, do inglês *Very Low-Density Lipoprotein*), lipoproteína de densidade intermediária (IDL, *Intermediate Density Lipoprotein*), lipoproteína de baixa densidade (LDL, *Low-Density Lipoprotein*) e lipoproteína de alta densidade (HDL, *High-Density Lipoprotein*). Nenhuma classe de lipoproteínas apresenta uma composição homogênea, sendo cada uma delas representada por um conjunto de partículas de diferentes tamanhos e densidades (MARSHALL & BANGERT, 1995). As lipoproteínas também diferem quanto à sua composição química, tamanho e potencial aterogênico. Os quilomicrons são as maiores lipoproteínas, com diâmetro de 80-1200 nm e faixa de densidade < 0,95 g/mL. São as principais transportadoras de triglicerídeos (TG) exógenos, os quais correspondem a aproximadamente 90% da sua composição. A VLDL também é rica em triglicerídeos (cerca de 50% da sua composição), sendo a principal transportadora do triglicerídeo endógeno (sintetizado no fígado), possui diâmetro de 40-80 nm e faixa de densidade entre 0,95-1,006 g/mL. A IDL, lipoproteína que surge a partir do metabolismo da VLDL, contém

quantidades semelhantes de triglicerídeos e colesterol, com diâmetro de 25-35 nm e faixa de densidade de 1,006-1,019 g/mL. A LDL é a lipoproteína mais rica em colesterol (cerca de 50%), diâmetro de 18-25 nm e faixa de densidade de 1,019-1,063 g/mL. A HDL apresenta a maior composição protéica dentre todas as lipoproteínas e possui diâmetro de 5-12 nm e faixa de densidade de 1,063-1,21 g/mL (BISHOP, ENGELKIRK & FODY, 1996).

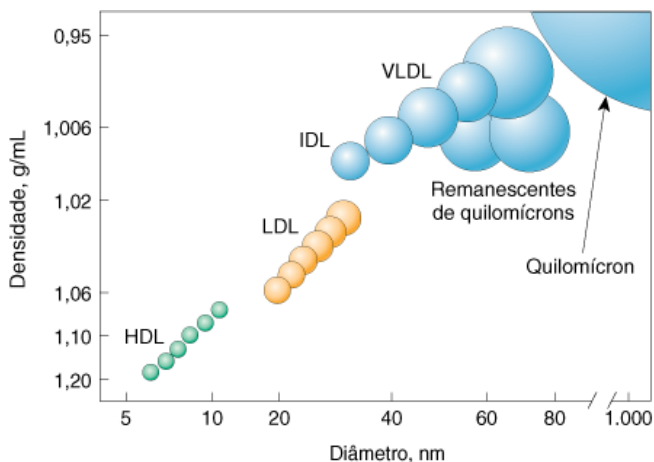


Figura 1. Distribuição das principais classes de partículas de lipoproteínas no plasma humano de acordo com a sua densidade e tamanho. As lipoproteínas são classificadas de acordo com a sua densidade e tamanho, que são inversamente relacionados. VLDL, lipoproteínas de densidade muito baixa; IDL, lipoproteínas de densidade intermediária; LDL, lipoproteínas de baixa densidade; HDL, lipoproteínas de alta densidade. Retirado de Fauci et al., 2009.

2.1.2 Dislipidemias

Modificações no metabolismo das lipoproteínas desencadeiam alterações nas suas concentrações plasmáticas, provocando o surgimento das dislipidemias, as quais, por sua vez, favorecem o desenvolvimento das DCV. A classificação laboratorial das dislipidemias compreende quatro situações bem definidas: hipercolesterolemia isolada (valores aumentados de CT); hipertrigliceridemia isolada (valores aumentados dos TG); hiperlipidemia mista (valores aumentados de CT e de TG); e a diminuição de HDL-colesterol (HDL-C), isolada ou em associação com

aumento de LDL-C e/ou de TG. De acordo com a etiologia, as dislipidemias podem ser primárias – consequentes a causas genéticas – e secundárias – causadas por outras doenças, uso de medicamentos ou estilo de vida (IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemia e Aterosclerose, 2007). Dentre as dislipidemias primárias, a hiperlipidemia familiar combinada é a mais prevalente e está associada ao aumento de 2-5 vezes no risco de DCV. A hiperlipidemia familiar combinada é caracterizada por diversos fenótipos, incluindo aumento de colesterol total e de LDL-C, aumento de triglicerídeos ou diminuição de HDL-C. É comum também o aumento na concentração plasmática da apolipoproteína B-100 e a presença de sd-LDL, também conhecido como padrão, ou fenótipo, B (HOKANSON et al., 1995; HOKANSON et al., 1993; GRUNDY et al., 1987). A prevalência desse fenótipo é de aproximadamente 30% em homens adultos normolipidêmicos, 5-10% em homens e mulheres jovens com menos de 20 anos e 15-25% em mulheres após a menopausa (AUSTIN et al., 1990; CAMPOS et al., 1992; SELBY et al., 1993). Foi demonstrado que o tamanho da LDL é geneticamente influenciado em diferentes graus (35-45% com base em herança autossômica dominante ou modelos co-dominantes), com vários efeitos adicionais e poligênicos (AUSTIN, 1992). Assim, fatores não-genéticos e comportamentais também influenciam a expressão do fenótipo B (RIZZO et al., 2003).

2.1.3 Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre. Os dados disponíveis sugerem que a dislipidemia aterogênica, o processo inflamatório vascular e o estresse oxidativo são os principais mecanismos relacionados ao desenvolvimento da aterosclerose e suas complicações (RIZZO et al., 2009). A análise dos primeiros eventos celulares na aterogênese demonstrou um tipo especializado de resposta inflamatória crônica que antecede a migração e a proliferação das células da musculatura lisa arterial. Os primeiros eventos incluem aumento do acúmulo de lipídeos e lipoproteínas no espaço subendotelial, presumivelmente por acréscimo do transporte e/ou permeabilidade da membrana endotelial. Este evento é rapidamente seguido pela aderência e disseminação de monócitos e de linfócitos T

do sangue periférico. Estas células se aderem ao endotélio devido à elevação na síntese e expressão de moléculas de adesão, como glicoproteínas, na superfície das células endoteliais. Assim, uma das primeiras mudanças induzidas pela hipercolesterolemia e/ou hipertensão parece ser a alteração da permeabilidade endotelial, juntamente com a adesão de leucócitos, representando a primeira fase da resposta inflamatória. Devido à atração quimiotática, os leucócitos migram através dos espaços entre as células endoteliais adjacentes, processo conhecido como diapedese, para o espaço subendotelial, onde começam a se acumular na camada íntima (Fig. 2) (ROSS, 1999).

Na presença de LDL modificada por espécies reativas de oxigênio e/ou de nitrogênio (LDL oxidada), os monócitos são convertidos em macrófagos e através dos seus receptores *scavengers* captam esta LDL modificada e se transformam em células espumosas. A formação e o acúmulo contínuo de células espumosas na íntima levam à lesão aterosclerótica inicial, a estria gordurosa. Se o agente agressor, como a hipercolesterolemia ou outro fator de risco, persistir, então a resposta inflamatória também continuará. Assim, o processo que começou como resposta inflamatória e protetora pode se tornar deletério para as células da parede arterial e, se a resposta continuar por tempo suficiente, pode ocorrer remodelamento da lesão com a formação de capa fibrosa. A capa consiste de numerosas células musculares lisas, cercadas por colágeno, fibras elásticas e proteoglicanos, juntamente com diferentes quantidades de restos celulares necróticos, lipídeos intra e extracelulares e, principalmente, grande quantidade de tecido conjuntivo recém formado (ROSS, 1998).

Mudanças nas características da superfície da capa fibrosa, tais como ulceração ou ruptura, levam à formação de trombo plaquetário que pode causar a morte súbita ou conduzir à progressão da lesão comprometendo o fluxo sanguíneo local (ROSS, 1999; ROSS, 1997). O fluxo sanguíneo coronariano inadequado pode causar isquemia e dor (angina *pectoris*) e, se for severo o suficiente, pode provocar completa isquemia e necrose de parte do músculo cardíaco (infarto do miocárdio) ou do cérebro (acidente vascular cerebral). A maioria dos casos de angina *pectoris* e infarto do miocárdio são atribuídos à aterosclerose coronariana subjacente severa (COHN & ROTH, 1996). As lesões ateroscleróticas são responsáveis por alterações cardíacas que, além do infarto do miocárdio, podem levar ao derrame cerebral, à gangrena e à perda de função na vascularização periférica (ROSS, 1995).

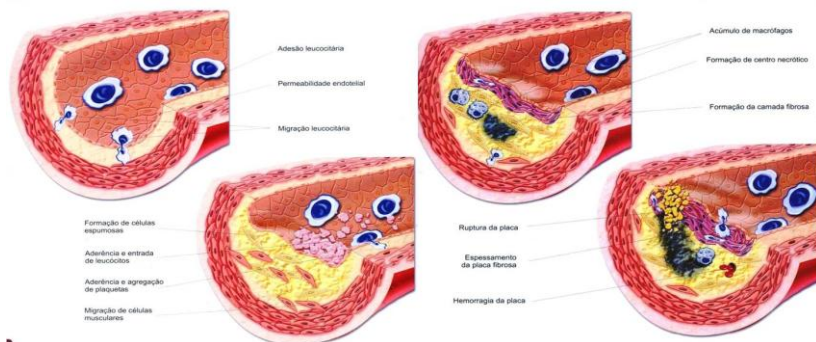


Figura 2. Principais fases da aterosclerose: migração e adesão leucocitária; formação das células espumosas; formação da camada fibrosa e ruptura da placa. Adaptado de Ross (1999).

2.1.4 LDL pequena e densa

2.1.4.1 Origem metabólica

Conforme mencionado anteriormente, as partículas de LDL são compostas por espécies distintas que apresentam propriedades físico-químicas heterogêneas e consistem de três principais subclasses: LDL grande e leve (lb-LDL), LDL intermediária e, LDL pequena e densa (sd-LDL). Essas subclasses diferem em tamanho, densidade, composição química, propriedades oxidativas e aterogênicas (KONTUSH et al., 2003; KRAUSS, 2001; TRIBBLE, 2001). O tamanho da LDL está relacionado à atividade de enzimas lipolíticas, como por exemplo, o aumento da atividade da lipase hepática acarreta a predominância de partículas de LDL menores (ZAMBON et al., 1999) enquanto indivíduos com deficiência total ou parcial desta enzima apresentam partículas de LDL maiores e menos densas (AUWERX et al., 1989).

Quando as concentrações plasmáticas de triglicerídeos estão elevadas, mesmo que modestamente, torna-se importante a reação catalisada pela proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), na qual moléculas de triglicerídeos provenientes do núcleo de lipoproteínas ricas em triglicérides (principalmente VLDL) são trocadas por moléculas de éster de colesterol no núcleo da LDL. Quando a LDL

grande perde colesterol e ganha triglicerídeos, a partícula se torna substrato para a lipase hepática e pode, como resultado da hidrólise de triglicerídeos do núcleo e remodelação estrutural, se transformar em partículas menores e mais densas de LDL (Fig. 3) (OTVOS et al., 2002).

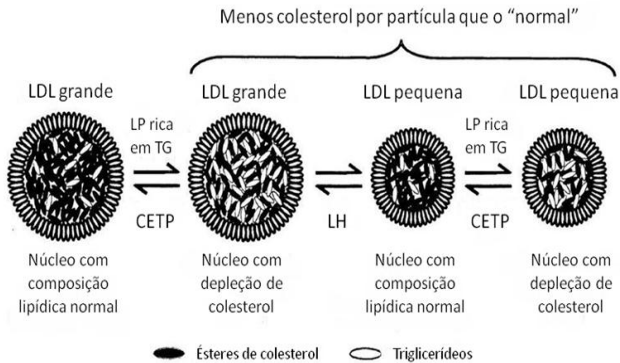


Figura 3. Origem metabólica das subfrações de LDL contendo menos colesterol. CETP = proteína de transferência de ésteres de colesterol, LH = lipase hepática, LP = lipoproteína, TG = triglicerídeos. Adaptado de Otvos et al. (2002).

2.1.4.2 Sd-LDL e risco para DAC

A elevação sérica de LDL-C está bem estabelecida como importante fator de risco para a DAC (SATTAR, PETRIE & JAAP, 1998). Recentemente, foi demonstrado que as características qualitativas da LDL também desempenham papel importante no desenvolvimento da doença cardíaca, particularmente em vista da predominância da subfração sd-LDL. A atribuição de maior potencial aterogênico à subfração pequena e densa se deve à sua maior facilidade de penetração na camada subendotelial da artéria, menor afinidade pelos receptores clássicos da LDL, meia-vida plasmática prolongada e maior susceptibilidade à oxidação (KOBÁ et al., 2008; OGITA et al., 2008; OGITA et al., 2007; KOBÁ et al., 2006).

O aumento na concentração plasmática da sd-LDL foi demonstrado em indivíduos com adiposidade abdominal (TERRY et al., 1989), em mulheres que usam contraceptivo oral (de GRAAF et al., 1993), indivíduos com síndrome metabólica (NOZUE et al., 2007) e mulheres com síndrome do ovário policístico (WILD et al., 2011; DOI et al., 2008).

Fatores dietéticos também são importantes. Foi relatado que dieta pobre em gordura e rica em carboidrato pode induzir o fenótipo B em pessoas geneticamente propensas (DREON et al., 1997). Além do padrão B ser normalmente encontrado em pacientes com hiperlipidemia familiar combinada, ele está presente também na hiperapobetalipoproteinemia (TENG et al., 1983), na hipoalfalipoproteinemia (GENEST et al., 1993), em pacientes com artrite reumatóide (RIZZO et al., 2009), hipotireodismo (ABBAS et al., 2008), lúpus eritematoso sistêmico (NUTTALL et al., 2003) e em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 (RIZZO & BERNEIS, 2007; WIERZBICKI, 2006; BETTERIDGE, 1996). Devido à maior aterogenicidade desta subclasse de LDL (KOBAYASHI et al., 2002; TRIBBLE et al., 2001; AUSTIN, 2000), existe grande interesse na quantificação da concentração plasmática de sd-LDL, incluindo o desenvolvimento de metodologias viáveis para a rotina laboratorial.

2.1.4.3 sd-LDL e hipolipemiantes

Dentre os hipolipemiantes, as estatinas apresentam maior impacto na redução do LDL-C e, por isso, seu efeito sobre a sd-LDL tem sido igualmente estudado. Foi relatado que o tratamento com fluvastatina aumentou em 7,9% o tamanho das partículas de LDL em pacientes diabéticos (YOSHINO, HIRANO & KAZUMI, 2002). Baldassarre et al. (2005) mostraram que em indivíduos com DAC comprovada ou mais de dois fatores de risco, o tratamento com 10 mg de atorvastatina promoveu redução de 28% na concentração de sd-LDL e 45% com as doses de 20 e 40 mg. Da mesma forma, pacientes com síndrome metabólica sob tratamento com rosuvastatina tiveram redução de 70% na concentração de sd-LDL, diminuição de 43,5% com atorvastatina e redução de 50% sob tratamento com outras estatinas (BAHADIR et al., 2009). Os fibratos são potentes redutores de TG e o seu efeito na redução da sd-LDL vem sendo estudado em comparação ao efeito das estatinas. A utilização de pitavastatina em pacientes diabéticos promoveu redução de 26% na concentração de sd-LDL enquanto o tratamento com fenofibrato provocou diminuição de 23% (TOKUNO et al., 2007).

2.1.4.4 Métodos de quantificação da sd-LDL

2.1.4.4.1 *Eletroforese por gradiente em gel sem desnaturação (NDGGE)*

Em laboratórios de pesquisa, o tamanho da partícula de LDL é, normalmente, medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, conforme descrito por Krauss e Burke (1982). No entanto, este procedimento requer período de tempo prolongado para a análise e não permite a determinação quantitativa da sd-LDL. Atualmente, existem conjuntos diagnósticos para eletroforese em gel disponíveis comercialmente, como o sistema Lipoprint® para subfrações de LDL (Quantimetrix Cooperation, Redondo Beach – CA, EUA) que reduzem o tempo de análise de 24 para 2,5 horas e fornecem outras informações relacionadas à sd-LDL, além da medida do tamanho médio das partículas de LDL, como a percentagem de sd-LDL, mobilidade relativa (Rf) e identificação do padrão fenotípico com base no tamanho das partículas de LDL (TSUZAKI et al. 2009; TSIMIHODIMOS et al., 2007).

Apesar dos avanços nos métodos eletroforéticos, foi demonstrado que o potencial aterogênico da sd-LDL aumenta com a elevação no número dessas lipoproteínas no plasma, enquanto o risco para DCV diminui proporcionalmente à redução da concentração de sd-LDL (KOBAYASHI et al., 2002; TRIBBLE et al., 2001; AUSTIN, 2000). Assim, para a avaliação do risco aterogênico, a quantificação da concentração sérica da sd-LDL seria preferível à medida do tamanho da partícula.

2.1.4.4.2 *Ultracentrifugação por gradiente de densidade (DGU)*

A ultracentrifugação foi uma das primeiras metodologias utilizadas para a separação das lipoproteínas do soro para a posterior análise da distribuição e composição química dos constituintes, como descrito por Havel et al. (1955). Na década de 80, surgiram os primeiros estudos de caracterização das subfrações de LDL, observadas após o isolamento por ultracentrifugação, e com isto surgiram também diversas propostas para o refinamento da metodologia para a separação das subfrações (CHAPMAN et al., 1988; SWINKLES et al., 1987; KRAUSS & BURKE, 1982; LEE & DOWNS, 1982; SHEN et al., 1981). A partir do momento que estudos passaram a evidenciar a associação entre a sd-LDL e as DCV, o interesse no isolamento desta subfração também

aumentou. O método de separação por ultracentrifugação mais empregado é aquele descrito por Griffin et al. (1990), que garante a separação total das subfrações dentro de 24 h. Métodos otimizados de separação propostos mais recentemente podem reduzir o tempo de análise para 18 h (MENYS et al., 2003), ou para 3 h com a utilização de corantes e do contraste radiológico iodixanol (DAVIES, GRAHAM & GRIFFIN, 2003).

A ultracentrifugação é o método considerado de referência para o isolamento e posterior quantificação da sd-LDL. No entanto, a necessidade de equipamentos específicos, o tempo prolongado da metodologia e o número limitado de amostras analisadas por vez, inviabiliza a utilização deste método na rotina laboratorial.

2.1.4.4.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Outra técnica considerada “padrão ouro” para a quantificação da sd-LDL é a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR). Apesar de ser considerado um método mais eficiente que os tradicionais, como a eletroforese e a ultracentrifugação, por não necessitar de fracionamento físico das lipoproteínas, a NMR é mais complexa e requer equipamento especial além de material de referência, como os espectros correspondentes a cada subfração de lipoproteínas, tornando-se um método dispendioso e que, por isto, não se difundiu na prática clínico-laboratorial (TSIMIHODIMOS et al., 2007; HIRANO, ITO & YOSHINO, 2005; OTVOS et al. 2002).

2.1.4.4.4 Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)

A utilização de HPLC não foi muito difundida, uma vez que requer a separação prévia de toda a fração de LDL por ultracentrifugação e fornece apenas o tamanho das partículas. Porém, existem relatos sobre o uso de cromatografia de alta resolução para a separação das partículas pelo tamanho por gel-filtração (HPGC, do inglês *high-performance gel-filtration chromatography*) para a quantificação de sd-LDL (SCHEFFER et al., 1997).

2.1.4.4.5 Método de precipitação com Mg^{2+} e heparina

Pesquisadores japoneses descreveram uma metodologia para o isolamento e quantificação da sd-LDL, utilizando a precipitação das demais subfrações de LDL com heparina e magnésio (HIRANO et al., 2003). Segundo os autores, o método apresentou boa correlação com a ultracentrifugação e poderia ser utilizado em analisadores automatizados, permitindo, assim, a análise rápida de um grande número de amostras, tornando-o aplicável à rotina laboratorial. No entanto, em estudo preliminar em nosso laboratório, a utilização dessa metodologia por precipitação com heparina e magnésio (HIRANO et al., 2003) não se mostrou viável para a rotina laboratorial, devido à falta de reprodutibilidade em amostras de soro de pacientes com dislipidemias. Em seguida, uma companhia japonesa em parceria com os autores lançou no mercado um conjunto de reagentes para a quantificação da sd-LDL com base na mesma metodologia proposta por Hirano et al. (2003). Porém, foi incluído no *kit* de reagentes um micro-tubo com membrana filtrante para a eliminação do excesso de lipoproteínas interferentes. Entretanto, este conjunto diagnóstico não se encontra disponível no mercado brasileiro e é de alto custo para importação (cerca de US\$ 28.00 por ensaio), fatos que estimulam o desenvolvimento de melhorias nesta metodologia para a quantificação da sd-LDL em nossa população.

2.1.4.4.6 Método homogêneo para sd-LDL-C

Recentemente, o mesmo grupo de pesquisa japonês responsável pelo desenvolvimento do método de precipitação, patenteou um novo método para a quantificação direta de sd-LDL-C com base na utilização de fosfolipases e surfactantes específicos para esta subfração (ITO et al., 2011; VANDERMEERSCH et al., 2010). O novo método encontra-se disponível para comercialização em outros países desde 2010 pela mesma empresa que lançou o método de precipitação. No entanto, não está disponível no mercado brasileiro e o custo de importação continua sendo elevado.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar a metodologia para a quantificação da sd-LDL para uso diagnóstico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o método de isolamento da sd-LDL por precipitação seletiva:
 - Verificar a estabilidade do reagente precipitante e das amostras de soro;
 - Aperfeiçoar o método de precipitação para eliminar as interferências em amostras lipêmicas.
- Comparar o método de precipitação e o método padrão ouro, por ultracentrifugação.
- Avaliar a utilização de equação matemática para a estimativa da sd-LDL.
- Analisar a concentração sérica da fração sd-LDL em indivíduos normolipidêmicos, dislipidêmicos e diabéticos tipo 2.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

A heparina (5.000 UI/mL Lote: 0907039 - Blasiesgel Indústria e Comércio Ltda. - Cotia, SP) foi gentilmente fornecida pela farmácia do Hospital Universitário – HU/UFSC. O cloreto de magnésio e os demais reagentes utilizados para a preparação de tampões, dentre outras soluções, todos com grau de pureza analítico, foram obtidos de marcas nacionais.

Os conjuntos diagnósticos para a determinação de colesterol total, triglicerídeos, LDL-C e HDL-C (métodos de precipitação e homogêneo) foram obtidos das empresas Labtest Diagnóstica S/A (Lagoa Santa, MG), Gold Analisa Diagnóstica Ltda (Belo Horizonte, MG) e Siemens Healthcare Diagnostics Inc. (Deefield, IL, EUA). Para a quantificação dos analitos foram utilizados os equipamentos Cobas Mira Plus da F. Hoffmann - La Roche (Basel, BS, Suíça), que permite a utilização de sistemas abertos, e o analisador automatizado Dimension® RxL da Siemens Healthcare Diagnostics Inc. (Deefield, IL, EUA), que utiliza sistema fechado de cartuchos de reagentes (Flex® reagent cartridge).

Para o controle interno de qualidade, foram utilizados os soros controles provenientes do Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC), de origem humana e liofilizado, contendo, portanto, matriz protéica idêntica às das amostras avaliadas.

O isolamento da sd-LDL por ultracentrifugação foi realizado utilizando-se a ultracentrífuga Sorvall® Ultra Pro® 80, com o rotor vertical STEP Saver™ 65V13 e tubos de polialômeros de 13,5 mL com sistema de fechamento Quick-Seal® da Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, EUA).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Isolamento por precipitação e quantificação da sd-LDL

A sd-LDL foi isolada pelo método de precipitação com heparina e magnésio, conforme previamente descrito por Hirano et al. (2003). Neste método, a mistura de heparina e cloreto de magnésio precipitam seletivamente as lipoproteínas que contêm a apolipoproteína B,

inclusive as partículas de LDL grandes e leves. O reagente precipitante contendo 150 U/mL de heparina sódica e 90 mmol/L de cloreto de magnésio foi adicionado às amostras de soro (1:1, v/v) . Em seguida, a mistura foi agitada em vórtex por 30 s e incubada a 37 °C por 10 min. Após esse período, as amostras foram mantidas em banho de gelo por 15 min e centrifugadas a 9.500 x g, por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante contendo a sd-LDL e a HDL foi coletado e a concentração de sd-LDL foi quantificada pela medida do LDL-colesterol (LDL-C) por meio do método homogêneo (Siemens®, em equipamento automatizado Dimension RxL; Labtest ou Gold Analisa em equipamento semi-automatizado Cobas Mira Plus), conforme as instruções dos fabricantes. O coeficiente de variação (CV) do método de precipitação para sd-LDL-C utilizando-se o reagente Labtest no aparelho Cobas Mira foi de 8,2% (CV intra-dia) e 7,0% (CV inter-dia) para 20 determinações em soro controle PNCQ. Os conjuntos diagnósticos das diferentes marcas utilizadas apresentam o mesmo princípio de reação e os mesmos reagentes, embora o tipo de detergente e as concentrações dos reagentes não sejam descritas com exatidão pelos fabricantes.

4.2.2 Ensaios de estabilidade dos reagentes e das amostras

Os testes de estabilidade dos reagentes foram realizados em duas etapas. Na primeira, o cloreto de magnésio foi previamente preparado, armazenado a 4 °C e, posteriormente misturado à heparina no momento de uso; na segunda etapa, o reagente precipitante completo, contendo cloreto de magnésio e heparina, foi preparado e armazenado a 4 °C. Os reagentes foram preparados em períodos de tempo diferentes e todos os ensaios foram realizados no mesmo dia, com cinco amostras de soro para cada período de tempo avaliado. A estabilidade foi avaliada por até 220 dias.

Para os testes de estabilidade das amostras biológicas foram utilizadas cinco diferentes misturas (*pools*) de soros humanos (frescos, límpidos, não ictericos e sem hemólise), isolados por centrifugação e sem adição de estabilizantes. Os *pools* de soro foram separados em alíquotas e armazenados a 4 °C ou a -20 °C até o momento da precipitação e quantificação do sd-LDL-C. Ensaios adicionais foram feitos com a precipitação prévia das amostras de soro com a mistura de MgCl₂-heparina e armazenamento do sobrenadante, contendo apenas a

sd-LDL e a HDL, a 4 °C ou -20 °C. As amostras de soro e sobrenadantes armazenados a 4 °C foram analisadas durante 10 e cinco dias consecutivos, respectivamente, enquanto as amostras e sobrenadantes mantidos a -20 °C foram analisados nos períodos de tempo de 0, 5, 10 e 15 dias.

4.2.3 Otimização da metodologia

Após a verificação da estabilidade das amostras e dos reagentes, procedeu-se à otimização do método, no sentido de eliminar as interferências observadas previamente em amostras lipêmicas, nas quais se formam agregados de lipoproteínas, mas não se forma o *pellet* no fundo do micro-tubo (Fig. 4B). Para tanto foram consideradas quatro estratégias: *i*) filtração da mistura soro-reagente precipitante; *ii*) adição de surfactante na amostra de soro; *iii*) aumento das concentrações de poliânions e cátions divalentes e; *iv*) diluição do soro. No primeiro ensaio, soro lipêmico (TG 400-700 mg/dL) foi misturado com o reagente sd-LDL e a mistura soro-precipitante foi filtrada (n = 5) utilizando-se membranas com poros de 0,20 µm (Millipore, São Paulo, SP). No segundo ensaio, as amostras de soro lipêmico (TG 400-700 mg/dL) foram misturadas com soluções do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1, 2,5, 5 e 10% (n = 6 de cada), na proporção de 1:100 (v/v) e, em seguida foram submetidas à precipitação. Na terceira estratégia, foram avaliadas diferentes concentrações do reagente precipitante, inicialmente aumentando-se a concentração do cloreto de magnésio isoladamente para 110 (n = 5), 130 (n = 16), 150 (n = 16) e 170 mmol/L (n = 10) e mantendo-se constante a concentração da heparina (150 U/mL). Em seguida, aquela concentração de cloreto de magnésio que apresentou resultados mais satisfatórios para a precipitação do soro lipêmico (TG 400-700 mg/dL) foi misturada à heparina na concentração de 250 U/mL (n = 20). No quarto e último ensaio, as amostras de soro lipêmico (n = 2-14) foram diluídas (1:2, v/v) com diferentes soluções, como água deionizada, cloreto de sódio 135 mmol/L, tampão PBS pH 7,4 e tampão fosfato 100 mmol/L pH 6,1, 7,4, 8,0 e 8,5 e, em seguida, submetidas à precipitação com a mistura de MgCl₂-heparina.

Em todos os ensaios, foi utilizado como controle o valor de sd-LDL-C quantificado na porção inferior (infranadante) ao agregado de

lipoproteínas no topo da mistura soro-reagente (tubo com amostra lipêmica; Fig. 4B).

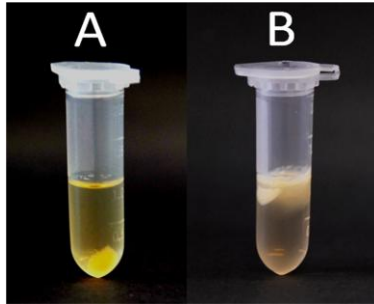


Figura 4. Aspecto da mistura “soro-reagente precipitante” após centrifugação. (A) Soro normolipêmico e (B) soro hipertrigliceridêmico (TG = 400-700 mg/dL).

4.2.4 Estabelecimento de “controle” para amostras hipertrigliceridêmicas

No sentido de verificar o grau de interferência da lipemia na concentração de sd-LDL-C, ensaios de precipitação e quantificação da sd-LDL foram realizados com soro normolipêmico ($n = 4$) antes e após a adição de diferentes concentrações de VLDL (TG = 80 a 610 mg/dL). Para o isolamento das partículas de VLDL, 5 mL de soro hiperlipêmico (*pool*, TG = 600-800 mg/dL) teve sua densidade ajustada para 1,21 g/mL pela adição de KBr sólido, de acordo com Havel et al. (1955). Em seguida, 1 mL de NaCl $d = 1,006$ g/mL foi adicionado cuidadosamente sobre o soro em micro-tubos, formando um gradiente descontínuo de densidades, e as partículas de VLDL foram isoladas por centrifugação (15.000 x g, 30 min, 4 °C – Eppendorf Centrifuge, Hamburg, Alemanha). Após a aspiração das partículas de VLDL no topo do tubo, as mesmas foram transferidas para membranas com poros de 12.000-14.000 Da, concentradas em sacarose e dialisadas contra 4 L de PBS pH 7,4, durante 2 h. Após a determinação da concentração de triglicérides, a VLDL foi utilizada imediatamente nos ensaios de quantificação do sd-LDL-C por precipitação.

Para tanto, quantidades crescentes de VLDL (25 a 100 μ L) foram adicionadas a 100 μ L de soros normolipêmicos (TG, 65 ± 14 mg/dL) ou 100 μ L de soros hiperlipêmicos (TG, 170 ± 56 mg/dL) para obter as

concentrações finais de, em média, 125 a 610 mg/dL de triglicerídeos nas amostras. Quando necessário, o volume da mistura soro-VLDL foi ajustado para 200 μ L com PBS pH 7,4. Aos tubos controle de soros normolipêmicos ou hiperlipêmicos não foi adicionado VLDL ou PBS. Em seguida, os soros assim transformados em hiperlipêmicos e os controles foram precipitados e o sd-LDL-C foi quantificado. Os resultados das amostras com VLDL foram corrigidos pelo fator de diluição em relação ao tubo controle.

4.2.5 Interferência da lipemia

O último teste da otimização visou estabelecer quais são as concentrações de triglicerídeos e de colesterol que interferem no método de precipitação e sedimentação. Para tanto, foram analisadas amostras de soro contendo diferentes concentrações de triglicerídeos (200-1500 mg/dL) ou de colesterol (200-350 mg/dL). As amostras de soro que apresentaram formação de agregado das lipoproteínas com o reagente precipitante sd-LDL, porém sem a devida sedimentação após a centrifugação, foram avaliadas após diluição com o tampão fosfato 100 mmol/L, o qual mostrou resultados viáveis de sedimentação do agregado nos ensaios anteriores.

4.2.6 Confirmação da associação entre o método de precipitação e o método de referência

Para confirmar a equivalência do método de precipitação com o método padrão ouro, por ultracentrifugação, foram feitos ensaios paralelos com ambas as metodologias no Laboratório de Pesquisa em Lipídeos do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). As amostras de soro utilizadas (n = 100) foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (LAC/HU/USP).

A metodologia utilizada para o isolamento da sd-LDL por ultracentrifugação foi aquela descrita por Chung et al. (1980) e otimizada para partículas contendo apo-B segundo Capell et al. (1996). A técnica consiste na mistura de soro com solução de KBr (d = 1,21 g/mL), resultando em soro com densidade 1,08 g/mL. Em seguida, foi

adicionada solução de NaCl ($d = 1,006 \text{ g/mL}$), formando gradiente descontínuo de densidade. Os tubos foram, então, centrifugados a 65.000 rpm, por 90 min a $10 \text{ }^\circ\text{C}$ (Ultracentrífuga Sorvall Ultra Pro 80) em rotor vertical STEP Saver 65V13. Após a ultracentrifugação, foram coletadas 48 alíquotas ou frações ($270 \text{ }\mu\text{L}$) de cada tubo utilizando-se sistema de aspiração a vácuo. A análise do colesterol total nas frações foi feita com o conjunto diagnóstico da Gold Analisa, no analisador automatizado Cobas Mira Plus do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de São Paulo (LAC/USP). Conforme descrito por Auwerx et al. (1989), as frações de números 28 a 34, correspondentes à sd-LDL com densidade $1,044\text{-}1,063 \text{ g/mL}$ foram, então, combinadas e o conteúdo de colesterol total foi novamente medido.

4.2.7 Estimativa da sd-LDL por cálculo

Na tentativa de diminuir os custos da metodologia para a quantificação de sd-LDL, foram avaliadas alternativas matemáticas para esta medida. Como mencionado anteriormente, o método de precipitação resulta num sobrenadante contendo sd-LDL e HDL, no qual é determinada a concentração de sd-LDL pelo método de LDL-C homogêneo. Dessa forma, presumimos que a diferença entre o HDL-C e o colesterol total no sobrenadante forneceria a concentração de sd-LDL. Para tanto, as concentrações de colesterol total e de HDL-C, por método homogêneo, foram medidas no sobrenadante utilizando-se os conjuntos de reagentes da Labtest ou da Gold Analisa e o equipamento Cobas Mira Plus (Roche, Basel, Suíça) e, em seguida, procedeu-se à aplicação da equação $\text{sd-LDL-C} = \text{CT} - \text{HDL-C}$. Ensaio adicionais foram realizados com os reagentes e equipamento automatizado da Siemens Healthcare Diagnostics Inc. (Deefield, IL, EUA).

Tendo em vista que o método homogêneo para a quantificação do HDL-C tem igualmente, custo elevado, foi avaliada ainda, a determinação do HDL-C pelo método de precipitação seletiva, de custo inferior e, portanto, frequentemente disponível nos laboratórios. Para a quantificação do HDL-C no sobrenadante por este método, deve-se precipitar a sd-LDL com o reagente precipitante fornecido pelos laboratórios fabricantes do *kit* de HDL-C. Escolhemos o reagente precipitante contendo ácido fosfotúngstico $1,5 \text{ mmol/L}$ e cloreto de magnésio 54 mmol/L , da Labtest ou Gold Analisa, por ser o mais comum nos laboratórios brasileiros. Considerando que o primeiro

sobrenadante formado para a quantificação da sd-LDL já continha a mistura de $MgCl_2$ -heparina, a qual também é utilizada nos métodos de HDL-C por precipitação seletiva, diferentes concentrações do reagente precipitante de HDL-C com ácido fosfotúngstico e $MgCl_2$ foram avaliadas. Assim, a sd-LDL foi precipitada e, após centrifugação, o HDL-C foi determinado neste segundo sobrenadante. O colesterol total foi medido no primeiro sobrenadante e o seu valor foi diminuído do HDL-C para fornecer a concentração de sd-LDL-C. Todas as avaliações foram feitas no equipamento Cobas Mira Plus.

4.2.8 Determinação da concentração de sd-LDL-C em soro de indivíduos normolipidêmicos, dislipidêmicos e diabéticos

Após a confirmação da associação entre os métodos, foi avaliada a concentração de sd-LDL-C em amostras de soro de indivíduos normolipidêmicos saudáveis, indivíduos dislipidêmicos e pacientes diabéticos tipo 2 pelo método de precipitação proposto. Os potenciais voluntários foram recrutados dentre a população ambulatorial atendida no Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC. Após o consentimento de participação no estudo, os indivíduos participantes responderam um questionário com a finalidade de avaliar os hábitos de vida, o estado de saúde e as características biodemográficas, como peso, altura, idade e sexo, hábito de fumar (tabagismo – definido como uso atual, independente do número de cigarros fumados por dia), histórico familiar de DAC (definido como a presença de pais, irmãos e avós que tenham sofrido infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral ou doença vascular periférica), ou histórico familiar de diabetes *mellitus* tipo 2 (parentes de primeiro grau portadores de diabetes *mellitus*). As amostras de sangue foram coletadas utilizando-se sistema a vácuo (Vacutainer-BD - Franklin Lakes-NJ, USA), em tubos sem anticoagulante, após jejum de 12-14 h, conforme recomendação da IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2007).

Como critérios de inclusão para a participação no estudo foram consideradas a ausência de quaisquer doenças ou desequilíbrios metabólicos (grupo normolipidêmicos saudáveis); a presença de dislipidemias, com ou sem tratamento hipolipemiante (grupo dislipidêmico; LDL-C > 130 mg/dL; TG \geq 150 mg/dL; ou HDL-C < 50

e 40 mg/ dL, para mulheres e homens, respectivamente, de acordo com a IV Diretriz Brasileira de Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose (2007)) ou; a presença de diabetes *mellitus* tipo 2, independente do tempo de diagnóstico e do uso de hipolipemiantes (grupo diabéticos). O diagnóstico de diabetes *mellitus* tipo 2 foi confirmado por meio de consulta ao prontuário dos pacientes.

Considerando a importância do Índice Aterogênico do Plasma (IAP), o qual é obtido pela equação $\log(TG/HDL-C)$, como marcador de risco para as DCV e, particularmente, a sua associação inversa com o tamanho da partícula de LDL (DOBIÁŠOVÁ & FROHLICH, 2001), no presente estudo também foi verificada a correlação entre a concentração de sd-LDL-C no soro dos participantes e o IAP.

Os critérios de exclusão foram idade inferior a 18 anos, mulheres no período gestacional, presença de doenças hepáticas, gástricas e renais, desordens tireoidianas, e pacientes com câncer ou em tratamento quimioterápico.

O presente protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina sob o n° 608/11 e os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO A).

4.2.9 Análise estatística

A distribuição dos dados foi verificada pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov. Para os ensaios de padronização e otimização, foram utilizados o teste *t* pareado de Student ou o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Para o estudo de confirmação da associação entre o método de precipitação e o método por ultracentrifugação foram usadas a correlação de Pearson, Regressão Linear Simples e o *plot* de Bland-Altman (*MedCalc® Software* versão 11.3.8.0).

Para verificar as diferenças entre a concentração sérica da sd-LDL-C entre os indivíduos saudáveis, pacientes diabéticos ou dislipidêmicos foram utilizados o teste *t* para amostras independentes ou o teste de Mann-Whitney, para dados com distribuição normal ou não gaussiana, respectivamente. Para avaliar as diferenças referentes às faixas etárias foi utilizada a análise de variância (ANOVA) ou o seu

equivalente não-paramétrico, o teste de Kruskal-Wallis. As variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste qui-quadrado (χ^2).

Todas as análises foram feitas utilizando-se o software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS® versão 17.0). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e o valor de probabilidade (p) menor que 5% foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 ESTABILIDADE

5.1.1 Estabilidade dos reagentes

O teste de estabilidade dos reagentes consistiu de: *i*) preparação prévia da solução de cloreto de magnésio (MgCl_2) 90 mmol/L, com adição de heparina no momento de uso e *ii*) preparação prévia do reagente precipitante completo (MgCl_2 90 mmol/L e heparina 150 U/mL), sendo que todos os reagentes foram armazenados em geladeira a 4 °C por 15, 30 e 60 dias. Todos os ensaios foram realizados no mesmo dia, com as soluções precipitantes com diferentes períodos de tempo de armazenamento e novas soluções de MgCl_2 e reagente precipitante completo sendo preparadas no momento de uso (controles). A estabilidade foi avaliada por meio da medida do sd-LDL-C em 5 *pools* de soro para cada variável. Não foi observada diferença significativa entre os diferentes períodos de tempo avaliados para nenhum dos reagentes armazenados a 4 °C em relação ao controle (tempo 0; Fig. 5).

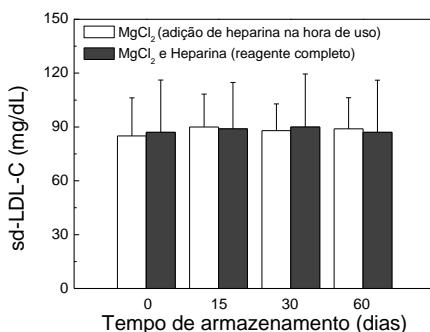


Figura 5. Estabilidade dos reagentes cloreto de magnésio e solução precipitante completa (MgCl_2 e Heparina) armazenados a 4 °C. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão ($n = 5$). Não houve diferença significativa em comparação ao tempo 0 ($p > 0,05$; teste *t* pareado de Student).

Tendo em vista a semelhança de comportamento entre os dois tipos de preparo do reagente precipitante, não foi dado prosseguimento ao teste de estabilidade do cloreto de magnésio isoladamente. No entanto, o reagente precipitante completo continuou sendo avaliado por

até 220 dias e não foram observadas diferenças significativas entre os tempos de armazenamento avaliados (Fig. 6).

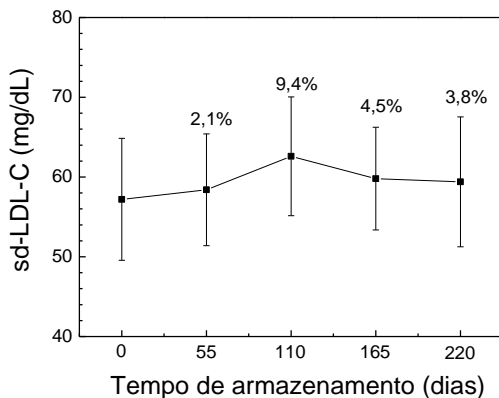


Figura 6. Estabilidade do reagente precipitante armazenado a 4 °C por 220 dias. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n = 5). Não houve diferença significativa quando comparado ao tempo 0 ($p > 0,05$; teste *t* pareado de Student).

5.1.2 Estabilidade das amostras

As Figuras 7 e 8 mostram os resultados da estabilidade de amostras de soro ou do sobrenadante a 4 °C, obtido após a precipitação das lipoproteínas, para a quantificação do sd-LDL-C. A estabilidade das amostras de soro armazenadas a 4 °C foi dependente da concentração de sd-LDL-C no soro. Neste contexto, amostras de soro contendo concentrações baixas (12-21 mg/dL; Fig. 7A) ou médias (40-55 mg/dL; Fig. 7B) de sd-LDL-C foram estáveis somente até o quarto dia de armazenamento, enquanto amostras de soro com valores de sd-LDL-C na faixa de 72-133 mg/dL apresentaram ausência de variação significativa durante o período avaliado de 10 dias (Fig. 7C).

A análise da estabilidade do sobrenadante revelou ausência de variação até o quarto dia e diminuição significativa de 15,1% na concentração de sd-LDL-C após cinco dias armazenados a 4 °C (Fig. 8), indicando que, preferencialmente as amostras devem passar pelo processo de precipitação e em seguida o sobrenadante deve ser

armazenado em geladeira, caso não haja a possibilidade da análise imediata.

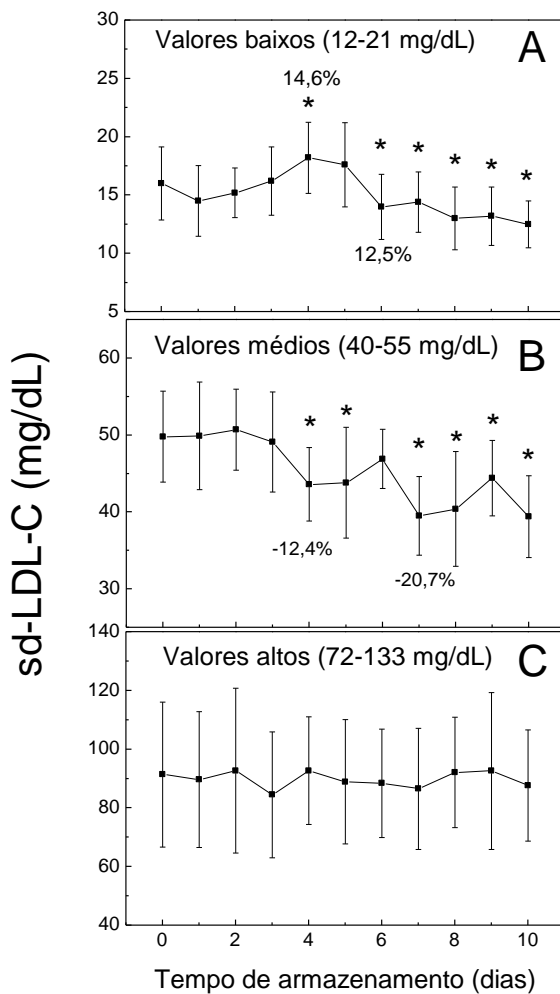


Figura 7. Estabilidade das amostras de soro a 4 °C, contendo concentrações baixas (A), médias (B) e altas (C) de sd-LDL-C. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n = 5). * p < 0,05 comparado ao tempo 0 (teste t pareado de Student).

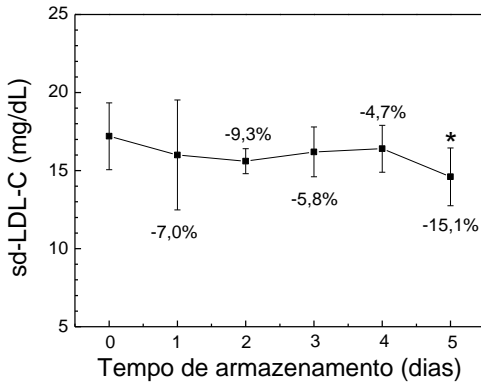


Figura 8. Estabilidade do sobrenadante, obtido após a precipitação das amostras de soro, armazenado a 4 °C. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n = 5). * p < 0,05 comparado ao tempo 0 (teste t pareado de Student).

As amostras de soro armazenadas a -20 °C se mantiveram estáveis durante todo o período de avaliação (Fig. 9). Porém, curiosamente, o sobrenadante contendo a sd-LDL quando armazenado a -20 °C apresentou variações significativas a partir do quinto dia de avaliação, em média 22% no período de 15 dias (Fig. 9).

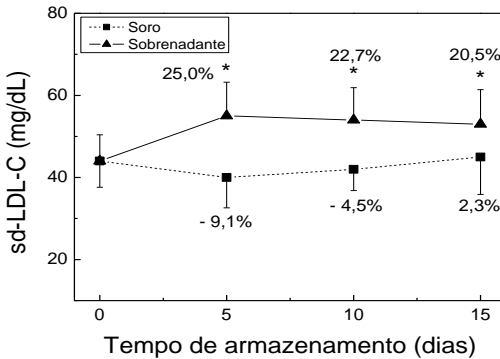


Figura 9. Estabilidade do soro e do sobrenadante (obtido após precipitação do soro) armazenados a -20 °C por até 15 dias. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n = 5). * p < 0,05 comparado ao tempo 0 (teste t pareado de Student).

5.2 OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO DE PRECIPITAÇÃO

Conforme já mencionado, as amostras lipêmicas apresentam problema de sedimentação do agregado de lipoproteínas quando submetidas à precipitação. Ao invés de formar *pellet* e sobrenadante límpido, como ocorre em amostras normolipêmicas (Fig. 10B), o agregado de lipoproteínas permanece na parte superior da mistura gerando, desta maneira, um infranadante límpido como mostra a Figura 10A.

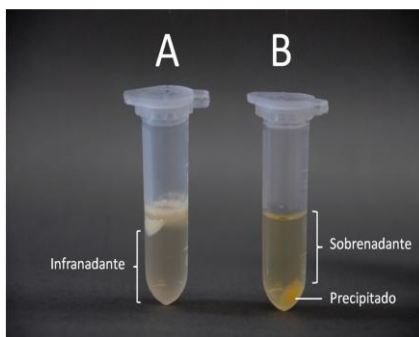


Figura 10. Efeito da lipemia na precipitação e sedimentação do agregado de lipoproteínas. (A) Mistura de amostra hiperlipêmica e reagente precipitante de sd-LDL indicando ausência de sedimentação do agregado de lipoproteínas; (B) Mistura de amostra normolipêmica e reagente precipitante de sd-LDL indicando formação do *pellet*.

A falta de sedimentação, no entanto, não implica na ausência de formação de agregado de lipoproteínas que contêm apolipoproteína B, inclusive da lb-LDL (LDL grande e leve), viabilizando, assim, a quantificação da sd-LDL no chamado infranadante. Para demonstrar isto, isolou-se VLDL de soros lipêmicos e adicionou-se em amostras de soro normolipêmico e hipertrigliceridêmico. Pode-se observar que não houve diferença significativa na quantificação do sd-LDL-C no sobrenadante (tubo controle, sem adição de VLDL ou diluentes) em comparação ao infranadante após adição de VLDL indicando, assim, que as demais lipoproteínas contendo apo B foram de fato agregadas e não interferiram na medida do sd-LDL-C (Fig. 11). Com base nestes resultados e devido à inexistência de soro controle contendo sd-LDL, em todos os ensaios de otimização, em que as amostras passaram por manipulações no sentido de promover a sedimentação do agregado de

lipoproteínas, foi utilizado como controle a concentração de sd-LDL-C medida após pipetagem cuidadosa do infranadante destas amostras lipêmicas.

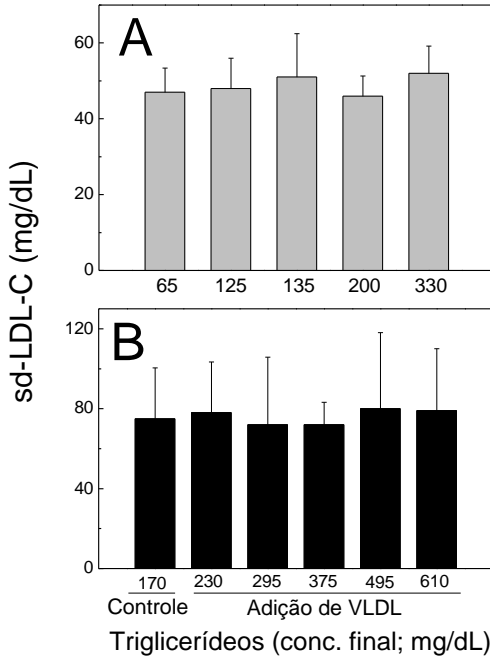


Figura 11. Efeito da adição de VLDL na quantificação do sd-LDL-C em soros normolipêmicos (A) e hipertrigliceridêmicos (B). Aliquotas de VLDL (25-100 μ L) foram adicionadas às amostras de soro (100 μ L) para obtenção de concentrações crescentes de triglicerídeos (concentração final indicada na figura). Os resultados após a adição de VLDL foram corrigidos pelos fatores de diluição e estão expressos em média \pm desvio padrão (n = 4 para cada variável). Não houve diferença significativa quando comparado ao controle, sem adição de VLDL ($p > 0,05$; teste t pareado de Student).

5.2.1 Filtração da amostra

A primeira estratégia utilizada, visando otimizar a quantificação de sd-LDL-C em amostras lipêmicas, foi a filtração em membrana de 0,20 μ m da mistura de soro com o reagente precipitante, a qual contém o

agregado de lipoproteínas não sedimentadas. Para efeito de comparação, as amostras foram avaliadas antes (controle) e após a filtração (filtrado). Apesar da variação observada não ter sido estatisticamente significativa ($p = 0,374$; Fig. 12), o processo de filtração não se mostrou suficientemente prático, além de requerer volume maior de amostra.

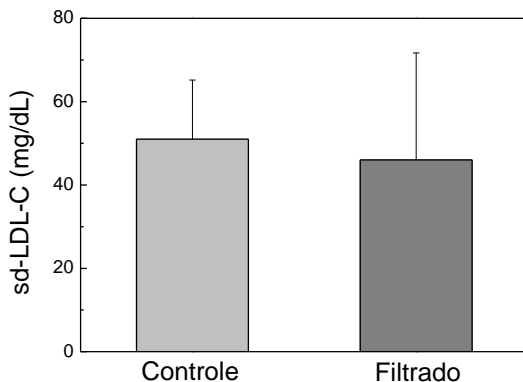


Figura 12. Efeito da filtração da mistura “soro lipêmico e reagente precipitante” na quantificação do sd-LDL-C. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão ($n = 6$ para cada variável). Não houve diferença significativa em relação ao controle ($p > 0,05$; teste t pareado de Student).

5.2.2 Adição de surfactante

Soluções do surfactante SDS foram adicionadas às amostras lipêmicas na proporção de 1:100 (v/v), na tentativa de solubilizar parte do excesso de triglicerídeos que impedem a sedimentação do agregado de lipoproteínas. A adição do surfactante, no entanto, não se mostrou eficaz, uma vez que alterou significativamente a concentração de sd-LDL-C (Fig. 13A) e de HDL-C (Fig. 13B) nas amostras.

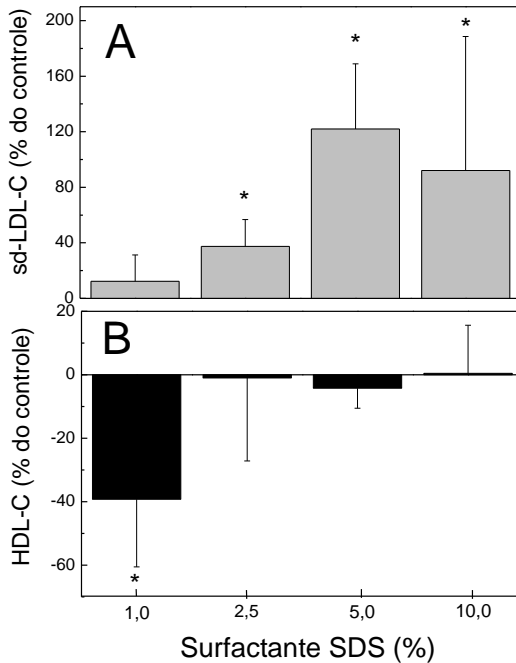


Figura 13. Efeito da concentração do surfactante SDS na quantificação de (A) sd-LDL-C e (B) HDL-C em amostras lipêmicas (adicionado na proporção de 1:100, v/v). Os resultados estão expressos em desvio \pm desvio padrão (n = 5-7). * p < 0,05 comparado ao controle, sem adição de SDS (teste t pareado de Student).

5.2.3 Efeito da concentração de poliânions

Diferentes concentrações da solução de cloreto de magnésio foram preparadas e misturadas à heparina (150 U/mL) com a finalidade de observar se o aumento na concentração de cátions divalentes seria capaz de promover a sedimentação das partículas lipoprotéicas em amostras lipêmicas.

Com base no trabalho publicado por Hirano et al. (2003), foi inicialmente estudado o efeito das concentrações de $MgCl_2$ 110 e 130 mmol/L (Fig. 14), tendo como referência a solução de $MgCl_2$ 90 mmol/L e mantendo constante a concentração de heparina em 150 U/mL

(controle). Conforme pode ser visto nos resultados da Figura 14, não houve diferença significativa na concentração de sd-LDL-C obtida com as diferentes soluções de $MgCl_2$ ($p = 0,226$). Além disso, foi observado que a solução de $MgCl_2$ na concentração 130 mmol/L promoveu sedimentação notadamente maior do que aquelas obtidas com as soluções de 90 e 110 mmol/L. Soluções de $MgCl_2$ a 150 e 170 mmol/L também não apresentaram diferenças significativas na quantificação do sd-LDL-C ($p = 0,556$; Fig. 14) e não aumentaram expressivamente a sedimentação das lipoproteínas das amostras lipêmicas em relação à solução de $MgCl_2$ a 130 mmol/L.

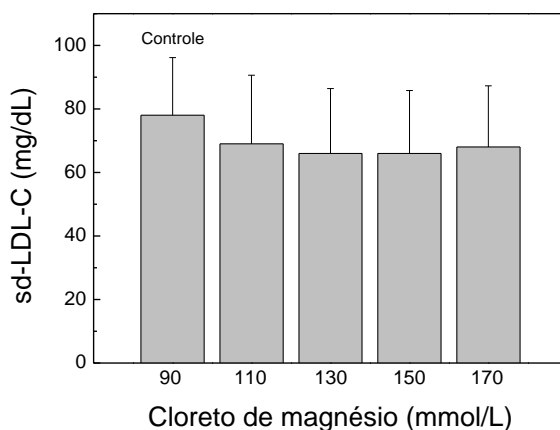


Figura 14. Efeito da concentração de cátions divalentes (Mg^{2+}) na quantificação de sd-LDL-C em amostras lipêmicas. A concentração de heparina permaneceu constante (150 U/mL). Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão ($n = 5-16$). Não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,239$; ANOVA).

Em seguida, a concentração de heparina (poliânions) foi aumentada para 250 U/mL e manteve-se a concentração de $MgCl_2$ a 130 mmol/L constante, tendo em vista que esta forneceu os resultados mais satisfatórios na sedimentação das lipoproteínas. O reagente precipitante modificado (130 mmol/L e 250 U/mL) foi, então, avaliado em comparação ao reagente contendo $MgCl_2$ 90 mmol/L e heparina 150 U/mL, descrito anteriormente por Hirano et al. (2003) e aqui chamado de controle. Apesar de o reagente modificado ter aumentado a sedimentação das partículas, esta evolução não foi suficiente para

eliminar totalmente a interferência da lipemia na precipitação (aspecto visual – dados não mostrados). Além disso, quando comparado ao reagente controle houve diferença significativa na quantificação do sd-LDL-C, independente da quantidade de sd-LDL presente na amostra (Fig. 15).

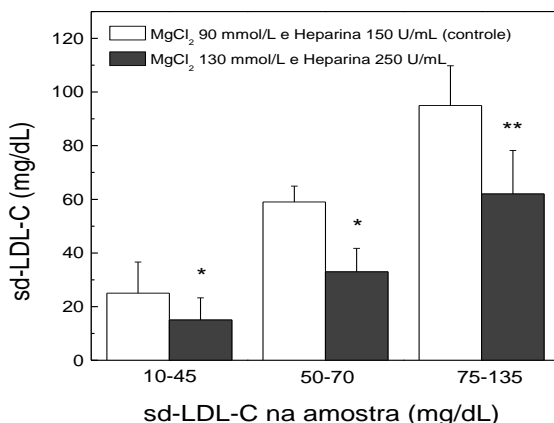


Figura 15. Efeito da concentração do reagente precipitante Mg^{2+} -heparina na quantificação de sd-LDL-C em amostras lipêmicas. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão ($n = 20$). * $p < 0,001$ (teste t pareado de Student) e ** $p < 0,001$ (Wilcoxon) comparado ao respectivo controle ($MgCl_2$ 90 mmol/L e Heparina 150 U/mL).

5.2.4 Diluição do soro

As amostras de soro diluídas (1:2, v/v) foram comparadas aos seus respectivos controles, sem diluição. Todas as soluções diluentes proporcionaram precipitação efetiva das lipoproteínas (dados não mostrados), entretanto, observou-se que soluções comumente utilizadas para a diluição de amostras biológicas em outras metodologias analíticas, como solução fisiológica, água ou PBS, não se mostraram eficazes para o método proposto, interferindo significativamente na quantificação da sd-LDL (Fig. 16A). Em seguida, foram avaliados os efeitos do tampão fosfato com diferentes potenciais hidrogeniônicos (pH) e constatou-se que o pH foi um dos responsáveis pelas interferências observadas com os outros diluentes. Portanto, os

resultados mais satisfatórios foram aqueles obtidos com o pH 8,0 e o pH 8,5 cujas variações apresentadas em relação ao controle não foram estatisticamente significativas ($p = 0,074$ e $p = 0,278$, respectivamente). Além disso, o tampão fosfato pH 8,5 apresentou desempenho superior àquele de pH 8,0, com variação de apenas 1,3% sendo, desta maneira, considerado o pH ótimo para a quantificação de sd-LDL em amostras lipêmicas (Fig. 16B).

Na Figura 17 é possível observar o efeito da diluição de uma amostra hipertrigliceridêmica com tampão fosfato 100 mmol/L pH 8,5. Amostras lipêmicas após serem misturadas com o reagente precipitante formam o agregado de lipoproteínas sem sedimentação (Fig. 17B). Porém, a diluição com tampão fosfato pH 8,5 promoveu a efetiva formação do *pellet* (Fig. 17C) semelhante à amostra de soro normotrigliceridêmico, que não necessita de diluição (Fig. 17A).

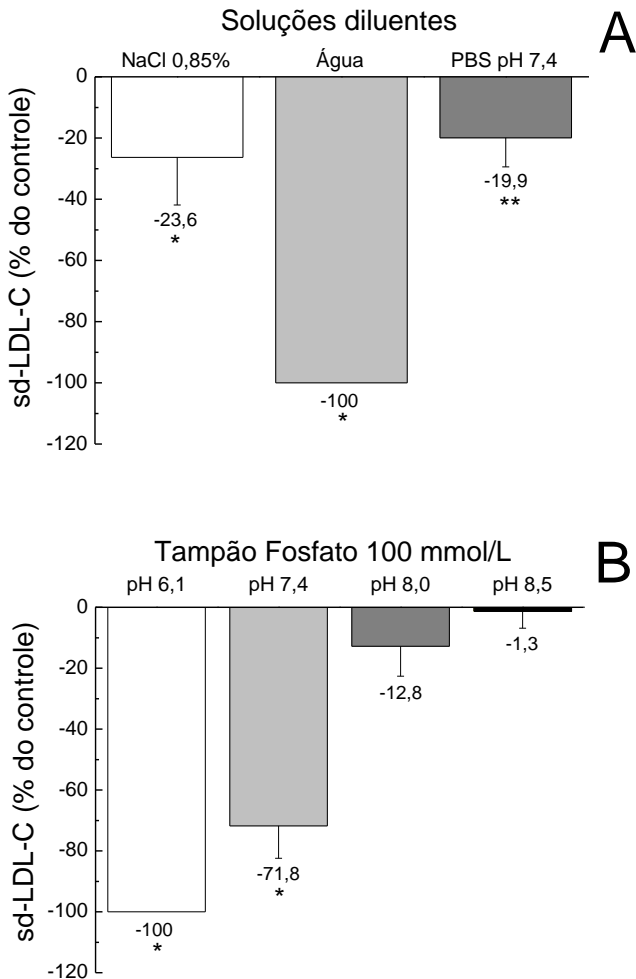


Figura 16. Efeito da diluição de amostras lipêmicas com diferentes soluções (1:2, v/v). (A) Diluição utilizando-se solução fisiológica (NaCl 0,85%), água e PBS; (B) Diluição com tampão fosfato 100 mmol/L de diferentes concentrações hidrogeniônicas. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão (n = 2-14). * p < 0,001 (teste t pareado de Student) e ** p < 0,001 (teste de Wilcoxon) comparados ao controle sem diluição.

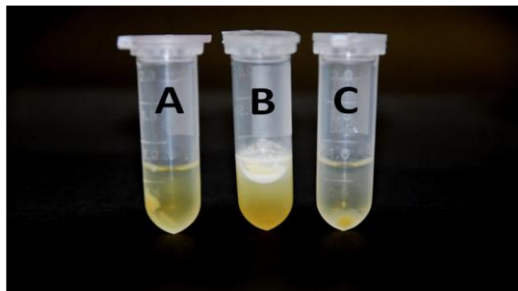


Figura 17. Interferência da lipemia na sedimentação do agregado de lipoproteínas. (A) Soro normotrigliceridêmico; (B) Soro hipertrigliceridêmico (TG, 550 mg/dL) antes da diluição e (C) após diluição com tampão fosfato pH 8,5 (1:2, v/v).

Em seguida, após ter sido estabelecido o melhor diluente para as amostras lipêmicas, tampão fosfato 100 mmol/l pH 8,5, foram avaliados os volumes de tampão necessários à sedimentação das lipoproteínas em função da concentração de triglicerídeos na amostra de soro. Em amostras com concentrações de triglicerídeos variando de 300 a 460 mg/dL, a adição de tampão fosfato (fator de diluição 1,2) foi suficiente para que ocorresse a precipitação. Nas amostras contendo triglicerídeos entre 685 e 1150 mg/dL, a diluição 1:1,2 (v/v) não foi eficaz em promover a sedimentação, sendo necessária a diluição de 1,5 vezes (Tabela 1). Entretanto, mais uma vez foi confirmada que a falta de sedimentação do agregado de lipoproteínas não afeta a quantificação da sd-LDL.

Tabela 1- Efeito da diluição da amostra com tampão fosfato pH 8,5 em amostras hipertrigliceridêmicas.

Triglicerídeos (mg/dL)	sd-LDL-C (mg/dL)			
	Controle	Diluições		
		2,0 x	1,5 x	1,2 x
300 - 460	87 ± 33,5	87 ± 34,4	90 ± 33,5	87 ± 33,6
<i>Sedimentação</i>	(-)	(+)	(+)	(+)
685 - 1150	70 ± 15,8	66 ± 21,4	68 ± 18,9	72 ± 19,6
<i>Sedimentação</i>	(-)	(+)	(+)	(-)

Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão (n = 5-7). (+) Formação de *pellet* adequada; (-) Ausência de sedimentação. Não houve diferença significativa entre os valores de sd-LDL-C do controle e após as diluições (teste *t* pareado de Student).

5.3 INTERFERÊNCIA DOS LIPÍDEOS NA SEDIMENTAÇÃO DAS LIPOPROTEÍNAS

5.3.1 Colesterol e triglicerídeos

Como parte da análise de interferências, foram avaliadas as concentrações limites de colesterol e triglicerídeos que interfeririam no método, causando a não-sedimentação das partículas e fazendo-se necessária diluição prévia com tampão. O colesterol elevado, isoladamente, não interferiu na sedimentação e quantificação da sd-LDL (resultados não mostrados). A concentração mínima de triglicerídeos nas amostras de soro que interferiu na sedimentação do agregado de lipoproteínas foi de aproximadamente 200 mg/dL, como pode ser observado na Fig. 16B, porém os triglicerídeos não afetaram a quantificação da sd-LDL até a concentração avaliada de 1.500 mg/dL (Fig. 18).

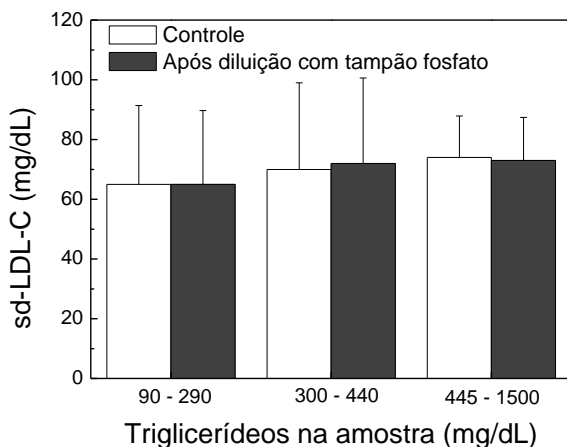


Figura 18. Efeito da concentração de triglicerídeos na quantificação do sd-LDL-C antes (controle) ou após a diluição com tampão fosfato pH 8,5 (1:2, v/v). Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão ($n = 13$). Não houve diferença significativa em comparação ao respectivo controle (teste t pareado de Student).

5.4 CONFIRMAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O MÉTODO DE PRECIPITAÇÃO E O MÉTODO DE REFERÊNCIA

Análises simultâneas foram feitas em 100 amostras de soro pelo método de precipitação proposto e pelo método de referência, por ultracentrifugação (Fig. 19).

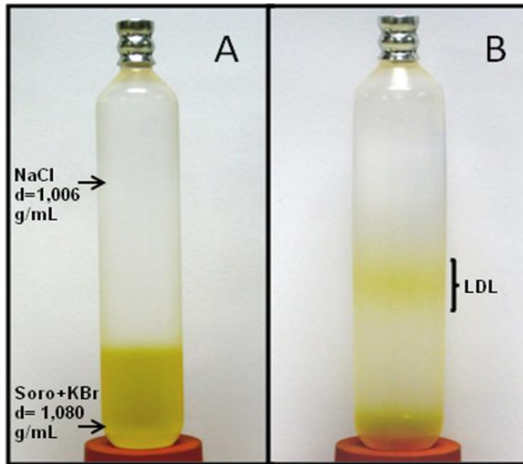


Figura 19. Isolamento da sd-LDL por ultracentrifugação. (A) Formação do gradiente de densidade após adição de KBr à amostra de soro, antes da ultracentrifugação; (B) Faixa de densidade contendo LDL, após a ultracentrifugação.

Após a ultracentrifugação, 48 frações foram aspiradas a partir do topo do tubo e o colesterol total foi medido em cada uma delas. A Figura 20 ilustra a diferente distribuição de colesterol nas frações, as quais correspondem aos diferentes tipos de lipoproteínas. Em relação à sd-LDL, existem três padrões de distribuição entre os indivíduos, o padrão A, com maior predominância de lb-LDL (Fig. 20A); o padrão intermediário (I), com quantidades semelhantes de sd-LDL e de lb-LDL (Fig. 20B); e o padrão B, com predominância da sd-LDL (Fig. 20C).

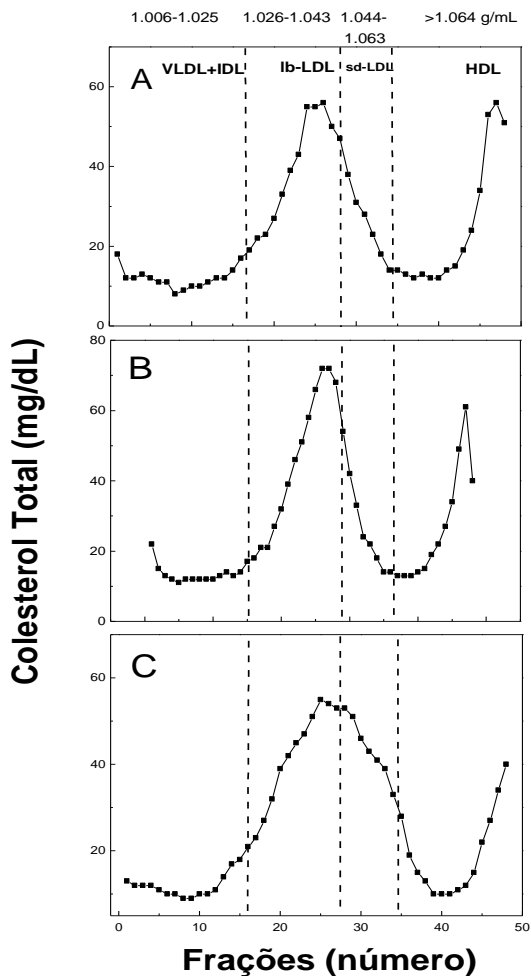


Figura 20. Padrões de distribuição da sd-LDL após ultracentrifugação. (A) Padrão A (< 40% de sd-LDL em relação à LDL total); (B) Padrão intermediário (40-50% de sd-LDL em relação à LDL total) e (C) Padrão B (> 50% de sd-LDL em relação à LDL total).

O método de precipitação apresentou boa associação com a ultracentrifugação. A análise feita pela regressão linear forneceu

coeficiente de correlação (r) de 0,791 ($p < 0,0001$), com a seguinte equação: $Y = -2,22 + 0,99x$ (Fig. 21). As concentrações de sd-LDL-C nas amostras variaram entre 10,0 e 87,0 mg/dL na análise por ultracentrifugação (média \pm desvio-padrão: $41,9 \pm 12,7$ mg/dL, CV = 30,4%) e de 7,0 a 98,0 mg/dL pelo método de precipitação ($39,2 \pm 15,9$ mg/dL, CV = 40,6%).

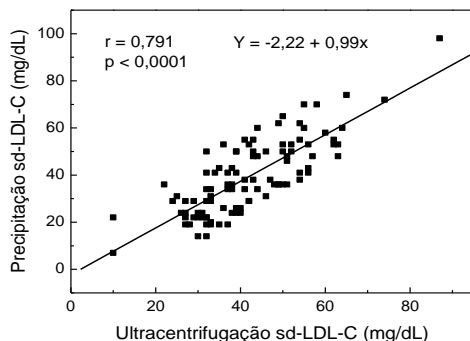


Figura 21. Associação entre o método de precipitação para a quantificação do sd-LDL-C e o método de referência por ultracentrifugação ($n = 100$).

Análise complementar foi realizada utilizando-se o gráfico de Bland-Altman (Fig. 22). Os resultados revelaram que o método de ultracentrifugação forneceu concentração de sd-LDL, em média, 2,7 mg/dL (IC_{95%}: 0,7 – 4,6 mg/dL) maior que o método de precipitação.

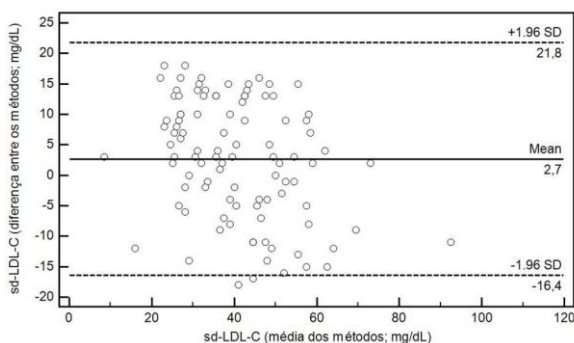


Figura 22. Gráfico de Bland-Altman. Diferença entre o método de ultracentrifugação e o método de precipitação *versus* a média dos valores obtidos pelos dois métodos.

5.5 OBTENÇÃO DO sd-LDL-C POR CÁLCULO

Considerando que após o processo de precipitação as lipoproteínas presentes no sobrenadante são apenas a HDL e a sd-LDL, levantamos a hipótese que por meio das medidas de colesterol total (CT) e do HDL-C no sobrenadante obter-se-ia o valor do sd-LDL-C, de acordo com a seguinte fórmula: $\text{sd-LDL-C} = \text{CT} - \text{HDL-C}$. Os ensaios realizados para comprovar esta suposição foram feitos utilizando-se o analisador Dimension®, com sistema fechado de reagentes, e mostraram que a diferença entre o resultado obtido pelo método homogêneo para LDL-C e aquele obtido pela fórmula foi de 9,9%, ou 2,4 mg/dL ($p < 0,05$; Fig. 23).

No entanto, a utilização de sistemas abertos de reagentes no aparelho Cobas Mira *Plus*, não forneceu resultados satisfatórios para o cálculo da sd-LDL. A diferença entre os resultados da fórmula e da medida direta chegou a 108,5% ($p < 0,001$) (Fig. 23).

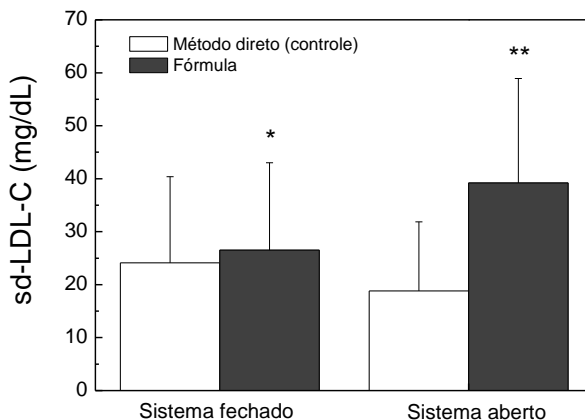


Figura 23. Estimativa do sd-LDL-C por cálculo utilizando sistema fechado Dimension e reagente Siemens ou o sistema aberto Cobas e reagente Labtest. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão ($n = 20$). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ comparado ao controle (teste t de Student e teste t de pareado Student após transformação logarítmica).

Esta diferença entre os dois sistemas foi devida, pelo menos em parte, à soma das variações analíticas dos parâmetros individuais, colesterol total e HDL-C, no sistema aberto. Com os reagentes Labtest e o analisador Cobas Mira observou-se diferença de 7,02% para o

colesterol total e de -7,49% para o HDL-C, em relação ao sistema fechado. Com base nestes dados e na obtenção dos coeficientes da análise de regressão entre os sistemas aberto e fechado (Fig. 24) foi possível corrigir os valores obtidos pelo sistema aberto aplicando-se a seguinte equação: $(sd\text{-}LDL\text{-}C = (CT/1,068) - (HDL\text{-}C/0,898))$ Considerando-se que os laboratórios de análises clínicas podem utilizar diferentes sistemas abertos, desde o analisador disponível até o conjunto diagnóstico mais comumente utilizado, a correção matemática acima não pode ser extrapolada para outros sistemas. Por outro lado, nos laboratórios onde existe a possibilidade de utilização dos sistemas fechados, a quantificação da sd-LDL através da fórmula torna-se uma alternativa viável para a minimização de custos.

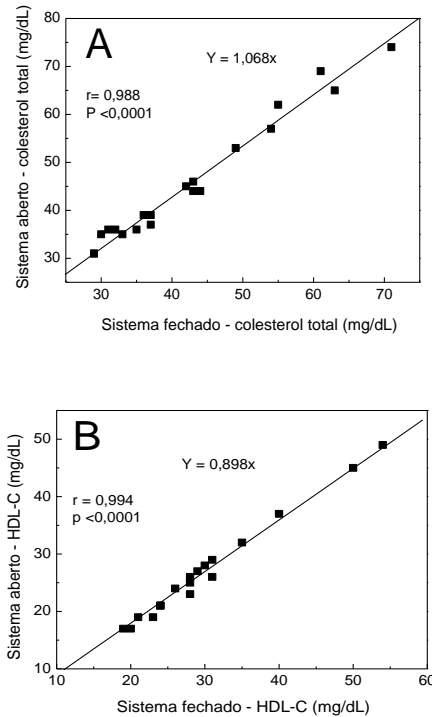


Figura 24. Correlação entre os sistemas fechado e aberto para a quantificação de (A) colesterol total e (B) HDL-C. (n = 20).

Além disso, outra possibilidade de redução nos custos da metodologia para a quantificação da sd-LDL pode ser obtida pela substituição do método homogêneo para HDL-C pelo método de precipitação seletiva. Todavia, o método de precipitação seletiva, o qual também contém poliânions, apresentou interferências na quantificação do HDL-C no sobrenadante. Na tentativa de eliminar essas interferências, foram avaliadas diferentes diluições do reagente precipitante comercial Labtest com água. Os resultados das medidas do HDL-C com os precipitantes diluídos foram comparados àqueles obtidos pelo método homogêneo. A diluição de 2,8 vezes apresentou resultados satisfatórios, enquanto os valores de HDL-C obtidos com as diluições de 3 e 4 vezes foram significativamente diferentes em relação ao método direto (Fig. 25).

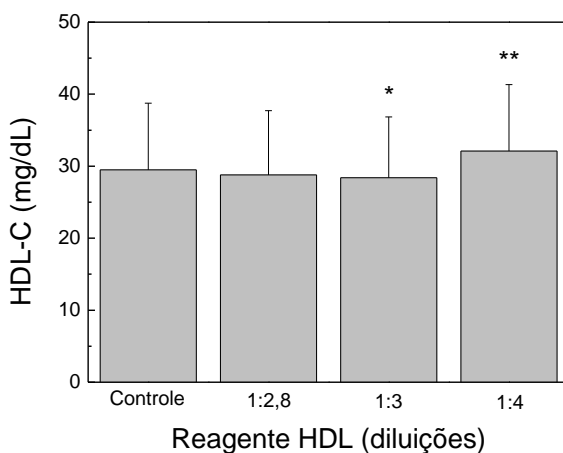


Figura 25. Efeito da diluição do reagente precipitante de HDL na determinação do HDL-C no sobrenadante de amostras previamente precipitadas com o reagente para sd-LDL. Controle = método homogêneo. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n = 20). * p < 0,05 e ** p < 0,001 comparado ao controle (teste t de Student).

Na análise de correlação, a diluição 1:2,8 apresentou $r = 0,974$ ($p < 0,001$) e coeficiente linear e angular de 1,11 e 0,94, respectivamente (Fig. 26A). Enquanto a diluição 1:3, apesar de ter mostrado coeficiente de correlação semelhante àquele da diluição anterior ($r = 0,972$; $p < 0,001$), apresentou coeficientes linear e angular menos expressivos (a = 2,23 e b = 0,89; Fig. 26B).

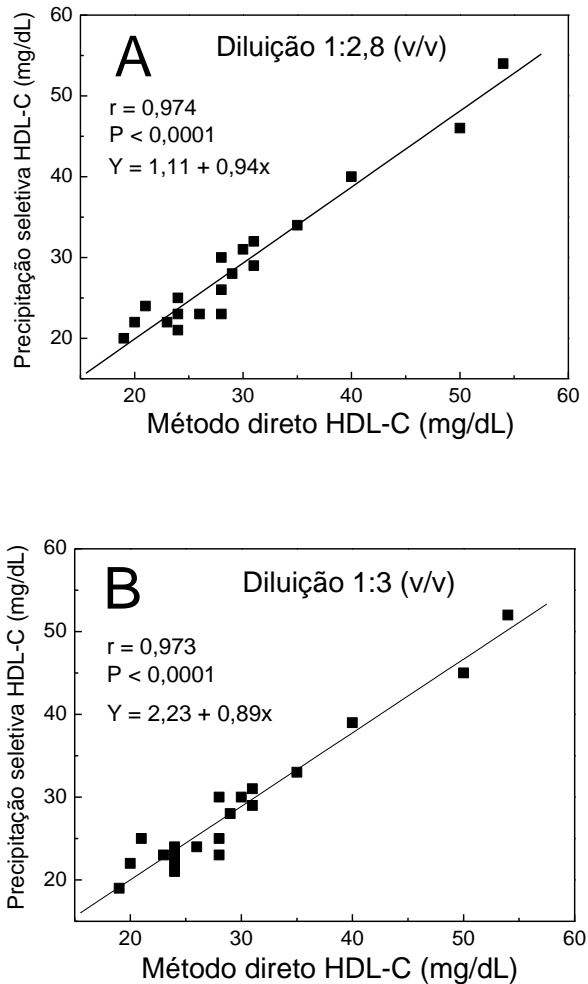


Figura 26. Correlação entre o método direto para HDL-C e o método de precipitação seletiva, após diluição do reagente precipitante. (A) diluição 1:2,8 (v/v); (B) diluição 1:3 (v/v). (n = 19).

Usui et al. (2002) demonstraram haver diferenças de reatividade para determinadas frações da LDL, incluindo a pequena e densa, para os vários métodos homogêneos de quantificação do LDL-C. Com base

nesta informação, duas marcas de reagentes nacionais para este analito foram avaliadas em sistema aberto Cobas Mira. Como controle, considerou-se a análise feita com o equipamento e os reagentes do sistema fechado da Siemens, por apresentar menos variações. Os valores de sd-LDL-C encontrados no sistema fechado automatizado Siemens foram em média, 6,7 mg/dL (ou 21,5%) superiores àqueles obtidos com o reagente da Labtest, enquanto a diferença entre a concentração medida com o reagente da Gold Analisa e com o sistema da Siemens foi de -4,8 mg/dL (ou -15,5%) (Fig. 27). Com base nestes resultados, sugerimos a seguinte correção quando os reagentes da Labtest ou Gold Analisa são utilizados para a quantificação de sd-LDL-C pelo método homogêneo: Labtest, sd-LDL-C x 1,3; e Gold Analisa, sd-LDL-C x 1,2.

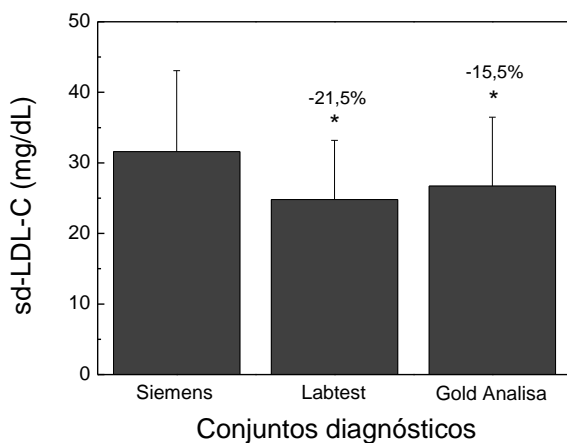


Figura 27. Quantificação do sd-LDL-C por diferentes conjuntos diagnósticos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n = 20). * p < 0,001 comparado ao reagente Siemens (sistema fechado) (teste de Wilcoxon).

5.6 QUANTIFICAÇÃO DO sd-LDL-C EM INDIVÍDUOS NORMOLIPIDÊMICOS, DISLIPIDÊMICOS OU DIABÉTICOS TIPO 2

Na tentativa de iniciar a aplicação do presente método de precipitação para a quantificação de sd-LDL-C, bem como começar a estabelecer valores de sd-LDL-C para a população atendida no ambulatório do Hospital Universitário da UFSC, foram realizadas determinações de sd-LDL-C em indivíduos normolipidêmicos saudáveis, assim como naqueles com elevado risco para DAC, dislipidêmicos e diabéticos tipo 2.

5.6.1 Características biodemográficas e clínicas dos participantes

Quatrocentos e trinta e quatro indivíduos participaram da pesquisa, sendo 177 homens e 257 mulheres, com idade de $46,9 \pm 16,7$ anos e IMC de $24,2 \pm 3,2$ kg/m². Dentre os participantes, 137 eram normolipidêmicos, 191 eram dislipidêmicos (sendo 68 em tratamento com estatinas ou fibratos e 123 sem tratamento hipolipemiante), e 106 pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 (diagnóstico confirmado no prontuário dos pacientes). As características clínicas e biodemográficas dos indivíduos de cada grupo estão descritas na Tabela 2. De modo geral, houve prevalência de indivíduos do sexo feminino em todos os grupos, exceto no grupo dislipidêmico sem tratamento com 49,6 e 50,4% de mulheres e homens, respectivamente. Os indivíduos normolipidêmicos eram mais jovens que os demais participantes, enquanto os pacientes diabéticos apresentaram maior peso corpóreo e IMC. Além disso, o número de indivíduos tabagistas foi semelhante nos diferentes grupos.

Os parâmetros bioquímicos avaliados estão descritos na Tabela 3. A variação analítica inter-dia no aparelho Dimension® RxL (Siemens) para o colesterol total foi de 3,3%, para o HDL-C foi de 6,2%, para o LDL-C foi de 5,1% e para os triglicerídeos foi de 3,3%. No aparelho Cobas Mira *Plus* (Roche) o coeficiente de variação para o colesterol total foi de 4,5%, para o HDL-C foi de 1,9%, para o LDL-C foi de 3,8% e para os triglicerídeos foi de 5,5%. Com exceção do HDL-C dos indivíduos em tratamento com estatinas, todos os demais parâmetros

avaliados apresentaram diferença significativa em relação aos indivíduos normolipidêmicos.

Tabela 2 - Características biodemográficas dos participantes.

	Normolipidêmicos (n=137)	Dislipidêmicos		Diabéticos tipo 2 (n=106)
		Com tratamento (n=68)	Sem tratamento (n=123)	
Homens/Mulheres	56/81 ^a	14/54 ^b	62/61 ^c	(45/61) ^d
Idade (anos)	32,6 ± 13,7 ^a	56,1 ± 10,2 ^b	46,0 ± 13,7 ^c	60,6 ± 10,5 ^b
Peso (kg)	62,4 ± 8,1 ^a	63,9 ± 6,9 ^a	67,6 ± 7,6 ^b	72,2 ± 11,2 ^c
IMC (kg/m ²)	22,2 ± 2,0 ^a	23,6 ± 2,3 ^b	24,2 ± 2,3 ^b	27,0 ± 3,9 ^c
Tabagismo	6 (4,4%)	4 (5,9%)	4 (3,2%)	10 (9,4%)
Sedentarismo	55 (40,1%) ^a	47 (69,1%) ^b	73 (59,3%) ^c	70 (66,0%) ^b
Histórico Familiar de DM2	64 (46,7%) ^a	22 (32,4%) ^b	52 (42,3%) ^a	90 (84,9%) ^d
Histórico Familiar de DAC	68 (49,6%) ^a	38 (55,9%) ^a	63 (51,2%) ^a	77 (72,6%) ^d

Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão. O tabagismo foi definido como uso atual, independente da quantidade de cigarros fumados por dia. O histórico familiar de DAC representa a existência de parentes de primeiro grau que tenham sofrido infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral ou doença vascular periférica. O histórico familiar de DM2 é definido como a existência de parentes de primeiro grau que possuem (ou possuíram) diabetes *mellitus* tipo 2 diagnosticado por profissional médico. M/F = masculino/feminino; IMC = Índice de massa corporal; DM2 = Diabetes *mellitus* tipo 2; DAC = Doença Arterial Coronariana. Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA e teste complementar de Tukey; Teste qui-quadrado).

Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos do perfil lipídico e glicêmico dos participantes.

	Dislipidêmicos			
	Normolipidêmicos (n=137)	Com tratamento (n=68)	Sem tratamento (n=123)	Diabéticos tipo 2 (n=106)
Colesterol total (mg/dL)	165,9 ± 29,8	214,3 ± 42,6*	226,9 ± 46,1*	184,8 ± 44,8*
HDL-C (mg/dL)	53,9 ± 11,9	50,6 ± 14,1	45,9 ± 12,9*	42,2 ± 9,7*
LDL-C (mg/dL)	91,9 ± 23,7	131,3 ± 32,0*	143,7 ± 36,6*	103,6 ± 32,7**
Triglicerídeos (mg/dL)	81,8 ± 31,9	145,9 ± 120,6*	190,8 ± 154,4*	178,3 ± 149,4*
Não-HDL-C (mg/dL)	112,5 ± 25,6	163,4 ± 31,1*	180,7 ± 28,9*	144,1 ± 25,3*
Glicose (mg/dL)	76,0 ± 5,7	87,8 ± 6,2*	86,4 ± 4,8*	162,8 ± 71,7*
HbA _{1c} (%)	N.D.	N.D.	N.D.	8,0 ± 2,3

Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão; M/F = masculino/feminino; HDL-C = colesterol da HDL; LDL-C = colesterol da LDL; sd-LDL-C = colesterol da sd-LDL, HbA_{1c} = hemoglobina glicada, N.D. = Não determinado. * p < 0,001 e ** p = 0,01 quando comparados aos indivíduos normolipidêmicos (teste de Mann-Whitney).

5.6.2 Concentração de sd-LDL-C em indivíduos normolipidêmicos, dislipidêmicos e diabéticos tipo 2

A Figura 28 mostra os resultados da concentração de sd-LDL-C nos indivíduos dos diferentes grupos de participantes da pesquisa, avaliada pelo método de precipitação descrito por Hirano et al. (2003) e com diluição das amostras lipêmicas com tampão fosfato pH 8,5, como descrito na seção Materiais e Métodos. Como esperado, os indivíduos dislipidêmicos (sob tratamento ou não) e os pacientes diabéticos apresentaram concentração significativamente maior de sd-LDL-C em relação aos indivíduos normolipidêmicos (Fig. 28A). Além disso, o percentual de sd-LDL-C do LDL-C foi significativamente menor nos indivíduos normolipidêmicos em relação aos dislipidêmicos e diabéticos (Fig. 28B).

5.6.3 Concentração de sd-LDL-C em função da idade e do sexo em indivíduos normolipidêmicos

A concentração da sd-LDL foi estratificada por faixas etárias e pelo sexo no grupo de indivíduos normolipidêmicos. Observou-se que existe aumento de 2,0 mg/dL, em média, a cada 10 anos de idade e que este aumento tornou-se significativo quando comparada a primeira faixa etária (18 a 28 anos) com a última (52 a 78 anos) (Fig. 29).

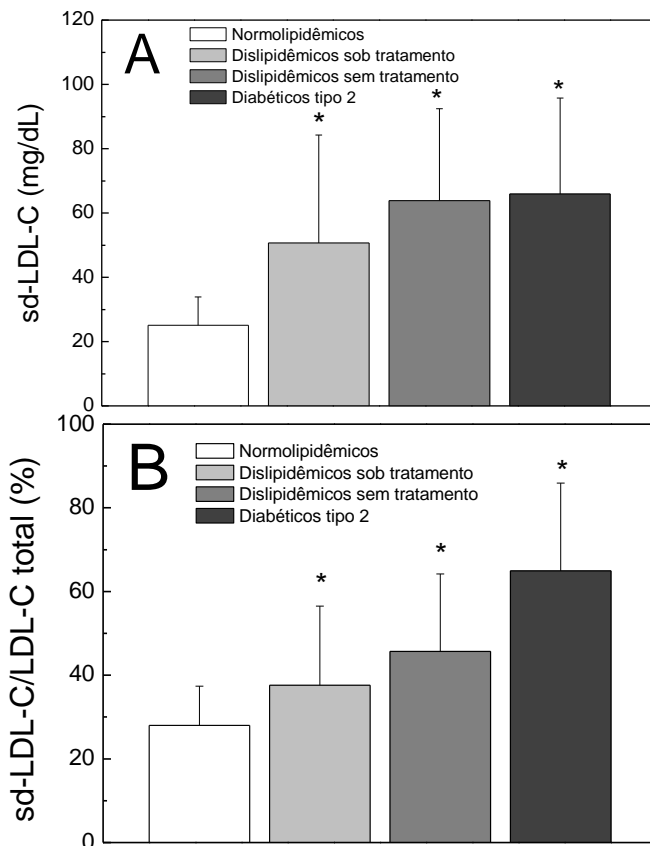


Figura 28. Concentração de sd-LDL-C (A) e em porcentagem de sd-LDL-C em relação ao LDL-C total (B) no soro dos participantes dos diferentes grupos de estudo. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Normolipidêmicos (n = 137), dislipidêmicos (n = 123), dislipidêmicos sob terapia hipolipemiante (n = 68) e diabéticos tipo 2 (n = 106). * p < 0,05 comparado aos indivíduos normolipidêmicos (Mann-Whitney).

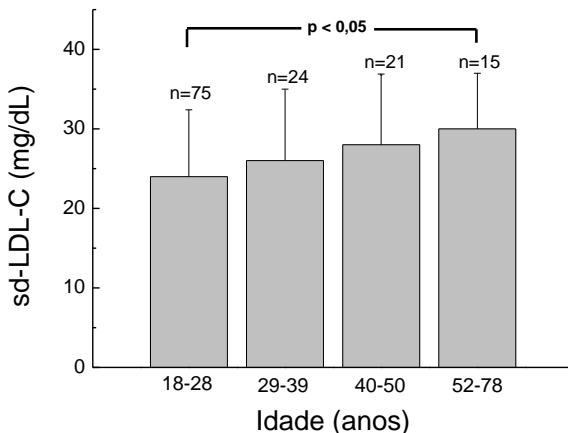


Figura 29. Concentração de sd-LDL-C em indivíduos normolipidêmicos estratificados por faixa etária. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão ($n = 137$). (Kruskall-Wallis e teste complementar de Dunn).

A comparação entre indivíduos do sexo masculino e feminino, independente da faixa etária, não resultou em diferença significativa. A média para os homens foi de 27 mg/dL e para as mulheres 24 mg/dL (Fig. 30; $p = 0,107$). Fazendo-se a mesma comparação, porém, estratificando-se os indivíduos por faixa etária e sexo, foi observado que os homens com idade entre 18 e 28 anos possuem concentração maior de sd-LDL-C em comparação às mulheres de mesma faixa etária ($p < 0,05$). As mulheres das faixas etárias de 40 a 50 anos e de 52 a 78 anos também apresentaram valores significativamente maiores de sd-LDL-C em relação às mulheres mais jovens (18 a 28 anos) (Fig. 31).

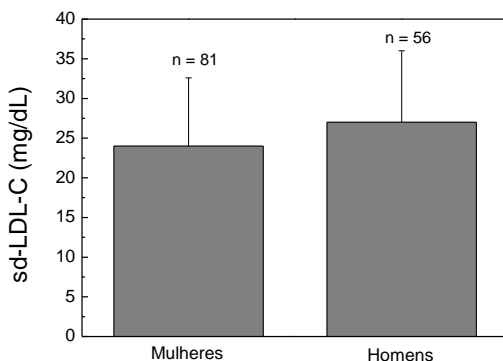


Figura 30. Concentração do sd-LDL-C em mulheres e homens normolipidêmicos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n = 137). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$; Teste *t* para amostras independentes, após transformação logarítmica).

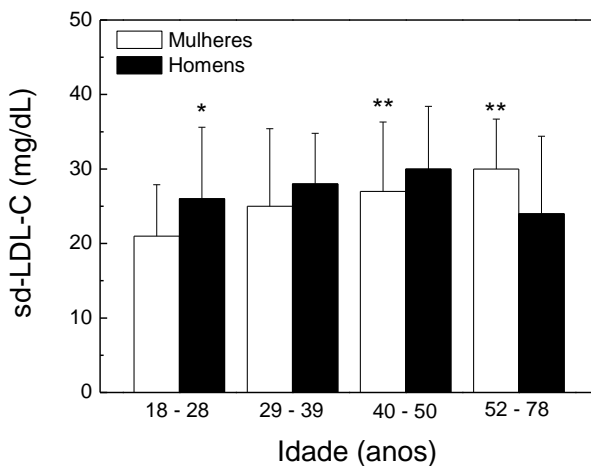


Figura 31. Concentração de sd-LDL-C em mulheres e homens normolipidêmicos estratificados por faixa etária. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n = 137). * $p < 0,05$ comparado às mulheres da respectiva faixa etária (teste *t* para amostras independentes, após transformação logarítmica); ** $p < 0,05$ comparado às mulheres de 18 a 28 anos (teste *t* para amostras independentes).

Considerando-se a distribuição percentual de sd-LDL-C em relação ao LDL-C total, observamos que a maioria dos indivíduos normolipidêmicos avaliados possui concentração de sd-LDL-C inferior a 40% da LDL total e, portanto, pode ser classificada como pertencente ao Padrão A (Fig. 32). Treze indivíduos (ou 9,5%) apresentaram concentração de sd-LDL-C entre 40 e 50% da total e são classificados como Padrão Intermediário (I), enquanto três indivíduos (ou 2,2%) foram classificados como Padrão B, possuindo mais de 50% de sd-LDL-C em relação ao LDL-C total (Fig. 32).

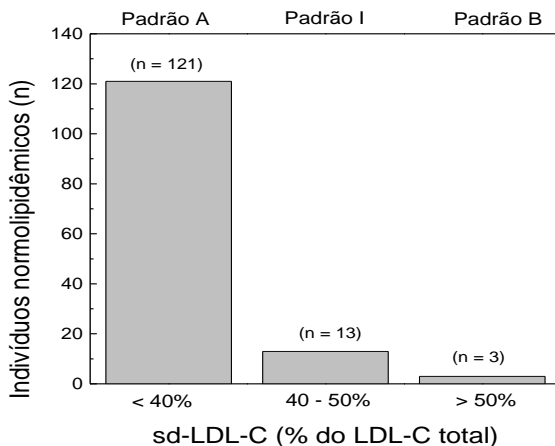


Figura 32. Distribuição percentual do sd-LDL-C em relação ao LDL-C total. Os resultados estão expressos como número absoluto.

Os indivíduos normolipidêmicos apresentaram concentrações de sd-LDL-C variando entre 5 e 48 mg/dL. Fazendo-se a separação por quartis, observamos que os indivíduos do 1º quartil apresentaram concentrações de sd-LDL-C entre 5 e 18 mg/dL; aqueles do 2º quartil tinham sd-LDL-C entre 19 e 23 mg/dL; do 3º quartil entre 24 e 31 mg/dL; e do 4º quartil entre 32 e 48 mg/dL (Fig. 33A). Em relação ao primeiro quartil, as concentrações de sd-LDL nos quartis subsequentes apresentaram aumento de 44, 83 e 149%, respectivamente, com diferença significativa entre todos eles ($p < 0,001$). A percentagem de sd-LDL em relação à LDL total foi de 10 a 21% para o 1º quartil; de 22

a 26 para o 2º quartil; de 27 a 33 para o 3º e de 34 a 57% para o 4º e último quartil (Fig. 33B).

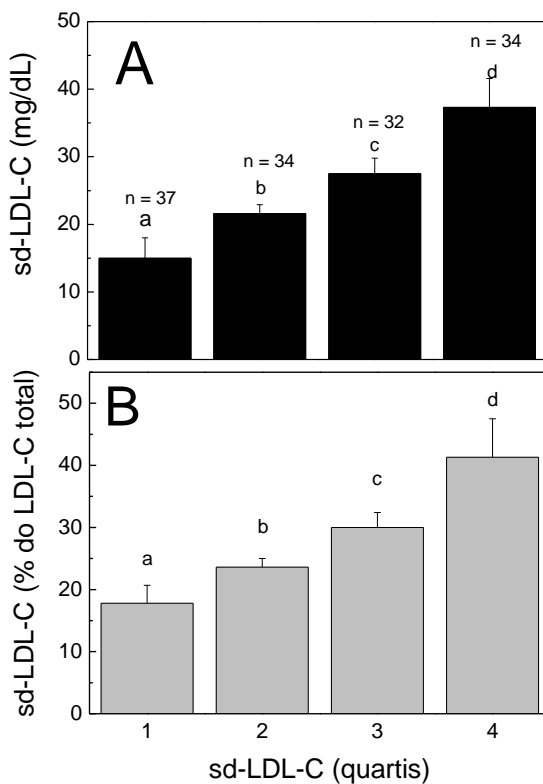


Figura 33. Distribuição do sd-LDL-C em indivíduos normolipidêmicos. (A) Concentração absoluta de sd-LDL-C e (B) porcentagem do LDL-C total. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n = 137). Letras diferentes expressam diferenças significativas (p < 0,001; Kruskal-Wallis e teste complementar de Dunn).

5.6.4 Concentração de sd-LDL-C em indivíduos dislipidêmicos com e sem tratamento hipolipemiante

Dentre os indivíduos dislipidêmicos em tratamento com hipolipemiantes, 59 utilizavam estatinas de primeira geração (sinvastatina ou pravastatina), seis utilizavam estatina de segunda geração (atorvastatina) e três faziam uso de fibratos (Fig. 34). Devido ao pequeno número de participantes utilizando estatinas de segunda geração e fibratos, não foi possível fazer análise comparativa do efeito dos diferentes medicamentos hipolipemiantes na concentração de sd-LDL.

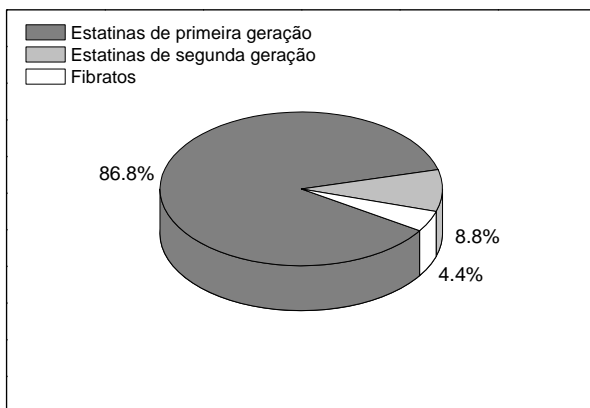


Figura 34. Medicamentos hipolipemiantes, em porcentagem, utilizados pelos indivíduos dislipidêmicos.

Os indivíduos dislipidêmicos sob tratamento medicamentoso apresentaram concentração significativamente menor de sd-LDL-C, quando comparados aos indivíduos sem tratamento (Fig. 35).

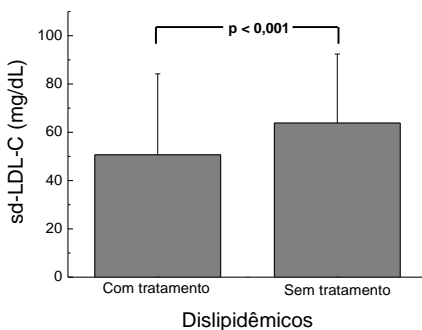


Figura 35. Concentração de sd-LDL-C em indivíduos dislipidêmicos com (n = 68) e sem tratamento hipolipemiante (n = 123). Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão. (Teste de Mann-Whitney).

Dentre os 123 indivíduos dislipidêmicos sem uso de medicação hipolipemiante, 49 apresentavam hipercolesterolemia isolada, 28 tinham hipertrigliceridemia isolada, 36 com hiperlipidemia mista e 10 indivíduos possuíam HDL-C baixo isoladamente. Comparando-se apenas os diferentes tipos de hiperlipidemias, observou-se que os indivíduos com hiperlipidemia mista apresentaram concentração de sd-LDL-C superior aos participantes portadores de hipercolesterolemia isolada (Fig. 36).

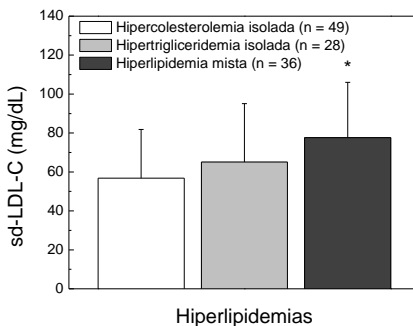


Figura 36. Concentração de sd-LDL-C em indivíduos com diferentes tipos de dislipidemias. Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão (n = 28-49). * p < 0,001 quando comparado aos indivíduos com hipercolesterolemia isolada (Kruskal-Wallis e teste complementar de Dunn).

Os indivíduos com HDL-C baixo foram avaliados separadamente comparando-se aqueles com HDL-C baixo isoladamente, HDL-C baixo combinado ao aumento de triglicerídeos e HDL-C baixo combinado ao aumento de LDL-C. Apesar de os indivíduos com HDL-C baixo isoladamente apresentarem menor concentração de sd-LDL-C, a diferença observada não foi significativa ($p = 0,160$) (Fig. 37). Quando comparados aos indivíduos normolipidêmicos todos os grupos com hipolipoproteinemia apresentaram concentração significativamente maior de sd-LDL-C ($p < 0,001$).

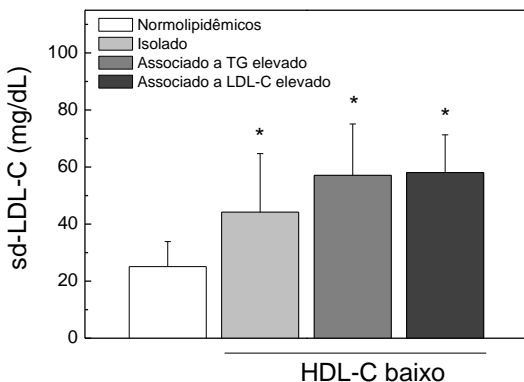


Figura 37. Concentração de sd-LDL-C em indivíduos com HDL-C baixo isolado ($n = 10$), associado a TG elevado ($n = 18$) ou associado a LDL-C elevado ($n = 7$). Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,001$ quando comparado aos indivíduos normolipidêmicos ($n = 137$) (Krukall-Walis e teste complementar de Dunn).

5.6.5 Concentração de sd-LDL-C em pacientes diabéticos tipo 2

Dos 106 pacientes diabéticos tipo 2, 67 (63,2%) faziam tratamento com hipolipemiantes. Os pacientes em uso de medicamentos hipolipemiantes apresentaram concentração de sd-LDL-C significativamente menor que os pacientes sem tratamento (Fig. 38).

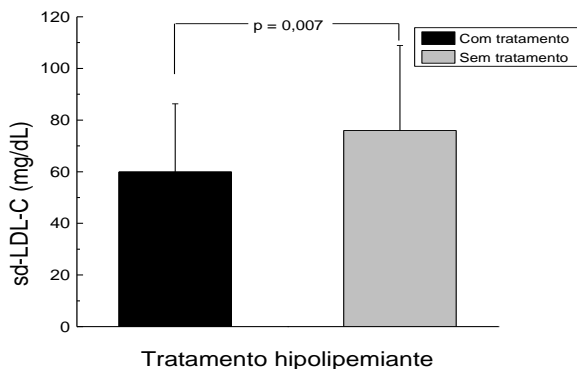


Figura 38. Concentração de sd-LDL-C em indivíduos diabéticos tipo 2 com ($n = 67$) ou sem ($n = 39$) tratamento hipolipemiante. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. (Teste t para amostras independentes).

A concentração de sd-LDL-C nos pacientes diabéticos apresentou correlação positiva com a concentração de hemoglobina glicada ($r = 0,305$; $p = 0,001$), sugerindo que o controle glicêmico adequado pode influenciar na redução da concentração de sd-LDL-C (Fig. 39).

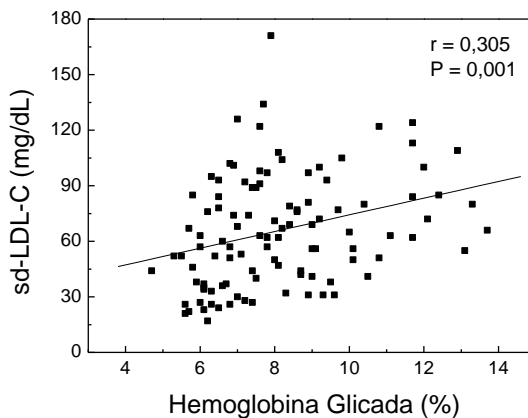


Figura 39. Correlação de Pearson entre a concentração de sd-LDL-C e hemoglobina glicada em pacientes diabéticos tipo 2 ($n = 106$).

5.6.6 Associação entre o sd-LDL-C e o índice de aterogenicidade

O índice de aterogenicidade ($IAP = \log [TG/HDL-C]$) foi calculado para os indivíduos dos diferentes grupos de estudo e, em seguida foi feita a análise de correlação com a concentração de sd-LDL-C. Pode-se observar que pela análise conjunta de todos os participantes houve correlação positiva entre o sd-LDL-C e o IAP ($r = 0,503$, $p = 0,0001$; Fig. 40). A análise de correlação em cada grupo mostrou que os indivíduos normolipidêmicos apresentaram correlação fraca ($r = 0,256$, $p = 0,002$), enquanto os indivíduos dislipidêmicos sob tratamento hipolipemiante e os diabéticos tipo 2 apresentaram correlação moderada ($r = 0,467$, $p < 0,0001$; $r = 0,383$, $p < 0,0001$). Curiosamente, nos indivíduos dislipidêmicos sem tratamento não foi possível observar associação entre o sd-LDL-C e o IAP ($r = 0,154$, $p = 0,088$).

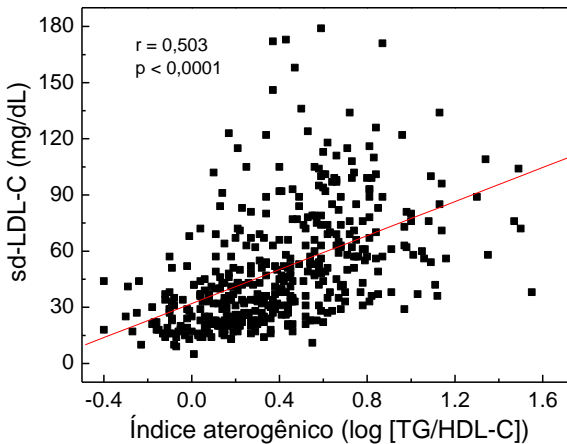


Figura 40. Associação entre a concentração de sd-LDL-C e o índice de aterogenicidade ($IAP = \log [TG/HDL-C]$) em todos os indivíduos participantes do estudo (Correlação e Pearson).

5.6.7 Intervalos de concentração e frequência de distribuição de sd-LDL-C no soro dos participantes

A concentração e a frequência de sd-LDL-C no soro dos indivíduos dos diferentes grupos encontra-se representada na Figura 41. Para o estabelecimento de intervalos de concentração de sd-LDL-C em cada grupo de estudo, foram utilizados os percentis 5 e 95, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Intervalos de concentração da sd-LDL-C (mg/dL) no soro dos participantes do estudo.

Grupos	Percentil 5 e 95	Percentil 50	Média (2DP)
Normolipidêmicos (n = 137)	13 - 41	23	25,1 (7,5 - 42,7)
Dislipidêmicos sob tratamento (n = 68)	17 - 125	44	50,7 (0 - 117,7)
Dislipidêmicos sem tratamento (n = 123)	31 - 118	57	63,8 (6,6 - 121,0)
Diabéticos tipo 2 (n = 106)	25 - 122	63	65,9 (6,9 - 125,7)

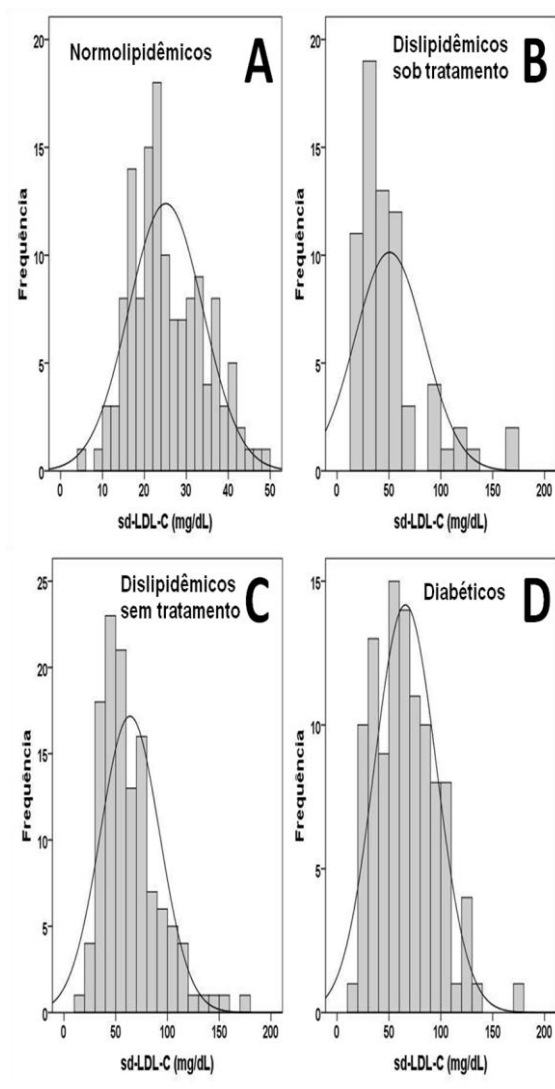


Figura 41. Distribuição de sd-LDL-C no soro dos indivíduos participantes do estudo. (A) Normolipidêmicos; (B) Dislipidêmicos sob tratamento hipolipemiante; (C) Dislipidêmicos sem tratamento hipolipemiante e; (D) Diabéticos.

6 DISCUSSÃO

A quantificação dos lipídeos evoluiu de ensaios químicos e de extração relativamente difíceis – realizadas apenas em laboratórios de pesquisa – para a quantificação de lipoproteínas complexas e subfrações destas, muitas das quais podem ser realizadas com rapidez e precisão em laboratórios de análises clínicas. Os ensaios laboratoriais são agora utilizados para auxiliar o diagnóstico da DAC, com vistas, inclusive, à prevenção da doença, bem como monitorar o efeito dos tratamentos. À medida que novas metodologias são inseridas na rotina laboratorial, continuará a ser igualmente importante que elas sejam precisas e que agreguem valor à prevenção e ao tratamento das dislipidemias e da DAC (McNAMARA; WARNICK & COOPER, 2006). Neste estudo apresentamos a otimização do método de precipitação com heparina e magnésio para a quantificação da sd-LDL, originalmente descrito por Hirano et al. (2003), bem como avaliamos a distribuição desta subfração de LDL no soro de indivíduos normolipidêmicos, dislipidêmicos e pacientes diabéticos atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da UFSC.

As informações referentes à estabilidade do reagente precipitante e das amostras não estavam muito bem estabelecidos. De acordo com os achados obtidos no presente estudo, o reagente contendo cloreto de magnésio (90 mmol/L) e heparina (150 U/mL) permaneceu estável por até sete meses, armazenado a 4 °C (Fig. 6). Apesar desta boa estabilidade, considerando-se, inclusive, que o reagente não contém conservante, não foi preparado de maneira estéril e que, dessa forma, poderia apresentar crescimento fúngico ainda que em geladeira, recomenda-se a preparação de um novo reagente a cada dois meses, ou diante do surgimento de quaisquer partículas em suspensão, presença de turbidez ou alteração de cor.

As amostras de soro armazenadas a 4 °C apresentaram variações significativas na concentração de sd-LDL-C após o quarto dia (Fig. 7A e 7B). Curiosamente, amostras de soro contendo valores elevados de sd-LDL-C se mantiveram constantes durante todo o período de tempo avaliado de 10 dias (Fig. 7C). Estudos adicionais deverão ser realizados para esclarecer o efeito da concentração de sd-LDL-C na estabilidade das amostras para a quantificação pelo método de precipitação seletiva.

A análise do sobrenadante, obtido após a precipitação das lipoproteínas do soro, também revelou estabilidade satisfatória durante quatro dias de armazenamento a 4 °C (Fig.8). Alternativamente, o armazenamento do soro à temperatura de -20 °C foi efetivo para a estabilidade da amostra pelo período avaliado de 15 dias, enquanto o sobrenadante não se mostrou estável nesta temperatura, sugerindo diferenças na sensibilidade dos constituintes envolvidos na reação de precipitação frente a distintas temperaturas (Fig. 9). Contrário aos nossos resultados, Hirano et al. (2003) relataram que as amostras de soro se mantiveram estáveis por até sete dias, a 4 °C, mas não a -20 °C. Porém, corroborando os nossos achados, nas instruções de uso do conjunto diagnóstico, desenvolvido pelos autores e lançado no mercado pela *Denka Seiken Co.*, consta a informação de que o sobrenadante é estável por 5 dias a 4 °C (sd-LDL-C Denka Seiken Co., 2006). Assim, diferentemente do que foi descrito pelos autores (HIRANO et al., 2003), é possível a utilização de amostras de soro armazenadas a -20 °C para a quantificação do sd-LDL-C pelo ensaio de precipitação.

De acordo com os autores proponentes do método de precipitação para a sd-LDL, não ocorre interferência de triglicerídeos na reação, tendo sido, inclusive, citada a participação no estudo de indivíduos com quilomicronemia (TG > 1000 mg/dL) (HIRANO et al. 2003). Em nosso laboratório, porém, não houve a reprodução destes resultados e observou-se que em determinadas amostras (especialmente aquelas com TG > 300 mg/dL) não há formação do *pellet*. É interessante notar, entretanto, que em publicações subsequentes, os autores relataram o refinamento da metodologia através da utilização de tubo tipo *Eppendorf* contendo membrana filtrante, com o objetivo de eliminar detritos frequentemente presentes exatamente no sobrenadante de amostras hipertrigliceridêmicas após mistura com o reagente precipitante (ITO, 2004 *apud* HIRANO, 2005). Diante do custo elevado desses acessórios, buscamos alternativas igualmente práticas, porém, com custo reduzido para eliminar as interferências observadas e tornar o método aplicável à rotina laboratorial.

A interferência observada em amostras lipêmicas é referente à ausência de sedimentação do agregado de lipoproteínas contendo apo B após a mistura com a heparina e o cloreto de magnésio (Fig. 10A). Entretanto, por meio da adição de partículas de VLDL em amostras de soro normolipêmico e hipertrigliceridêmico pôde-se observar que a não sedimentação do agregado de lipoproteínas não interferiu na quantificação do sd-LDL-C (Fig. 11). Ou seja, as lipoproteínas

agregadas, mesmo que suspensas na solução, a qual convencionamos chamar de “infranadante”, não participam da reação de quantificação da sd-LDL pelo método homogêneo de LDL-C, ou do HDL-C e colesterol total por quaisquer métodos. Dessa forma, foi possível estabelecer como “controle” a concentração de sd-LDL-C medida no infranadante para todos os ensaios subsequentes de otimização. Vale comentar que, devido ao descrito acima, os ensaios de otimização continuaram a ter como objetivo a promoção da sedimentação do agregado de lipoproteínas no sentido de facilitar o processo de pipetagem da amostra, principalmente em sistemas automatizados cujos tubos capilares poderiam sofrer obstruções. Da mesma forma, continuamos a usar o termo “interferência da lipemia”, embora não tenham sido constatadas interferências analíticas.

Conforme já descrito por Ito et al. (2004), o processo de filtração da mistura soro-reagente precipitante após o tempo de reação mostrou-se efetiva para a eliminação da interferência da lipemia (Fig. 12). Todavia, o procedimento aqui utilizado (seringa e membrana filtrante) não se mostrou prático o suficiente para ser aplicado na rotina laboratorial, além de requerer volume maior de amostra.

Na sequência dos ensaios de otimização, verificamos o efeito de detergentes para eliminar a interferência da lipemia. Dentre os detergentes mais comumente empregados para aplicações bioquímicas estão o Triton X-100, o octaetilenoglicol dodecil éter ($C_{12}E_8$), o deoxicolato de sódio e o dodecil sulfato de sódio (SDS) (SUDBRACK, 2011). Desta maneira, optou-se pela utilização do SDS para tentar solubilizar o excesso de lipoproteínas presentes em amostras hipertrigliceridêmicas, e com isto promover melhor sedimentação do agregado formando o *pellet*. Entretanto, a adição de SDS 2,5, 5 e 10% promoveu aumento significativo na concentração de sd-LDL-C de 37, 122 e 92% respectivamente, decorrente de interferências na etapa de precipitação por interação com os poliânions, na etapa de quantificação pelo método homogêneo para LDL-C, ou em ambas (Fig 13A). Apesar de a solução de SDS 1% não ter provocado aumento significativo na concentração do sd-LDL-C (12,3%), a mesma diminuiu em 39,2% a concentração do HDL-C (Fig. 13B).

A precipitação seletiva de lipoproteínas por diferentes misturas de poliânions e cátions divalentes vem sendo descrita na literatura há mais

de 40 anos. Lamplugh et al. (1978) mostraram que a concentração de poliânions necessária para a precipitação completa da VLDL é diretamente proporcional à quantidade de VLDL presente na amostra. Com base nesta informação, a estratégia seguinte foi primeiramente aumentar a concentração, do cátion divalente Mg^{2+} e, em seguida, a solução com resultados mais satisfatórios foi combinada à concentração maior de poliânions. A solução de $MgCl_2$ 130 mmol/L aumentou visivelmente a sedimentação quando comparada às soluções de 90 e 110 mmol/L, enquanto as concentrações mais altas de Mg^{2+} (150 e 170 mmol/L) não foram superiores àquela de 130 mmol/L (Fig. 14). Assim, optou-se por avaliar o efeito do $MgCl_2$ 130 mmol/L combinado à heparina 250 U/mL. Este reagente modificado aumentou substancialmente a sedimentação de algumas amostras hiperlipêmicas. Porém, a melhora não foi suficiente para promover a total sedimentação em todas as amostras hipertrigliceridêmicas. Além disso, o reagente modificado diminuiu significativamente a quantificação do sd-LDL-C em 37%, em média, não se mostrando, desta forma, viável para o nosso propósito (Fig. 15).

A diluição do soro é uma prática bastante utilizada na rotina laboratorial, seja para diminuir a quantidade do analito, quando este extrapola a linearidade do método, seja para diminuir as interferências causadas por algumas substâncias, como lipídeos, glicose e hemoglobina. O diluente a ser utilizado pode variar de acordo com o analito a ser quantificado e os mais comuns são água deionizada, solução fisiológica (salina) e PBS pH 7,4. A diluição das amostras lipêmicas foi avaliada primeiramente com água (1:2, v/v), onde se observou a total sedimentação das partículas lipoprotéicas. Porém, ao analisar o sobrenadante não foi possível detectar qualquer quantidade de sd-LDL-C, indicando que o uso da água resultou na precipitação de todas as lipoproteínas, inclusive da sd-LDL (Fig. 16A). A utilização de salina e PBS pH 7,4 igualmente não produziram resultados satisfatórios, apresentando diminuição significativa de 24 e 20%, respectivamente, na concentração de sd-LDL-C (Fig. 16A). Apesar da diferença estatística, o resultado mais promissor foi obtido com a utilização de solução PBS e, assim, decidiu-se avaliar o efeito de tampão de fácil preparação, com menos sais na composição, como o tampão fosfato.

As concentrações de fosfato normalmente usadas em outros sistemas de ensaios analíticos variam de 50 a 200 mmol/L. Assim, optamos por usar a concentração 100 mmol/L. Além disso, segundo relatos de Grove (1979), no método de precipitação para o HDL-C, o pH

do reagente precipitante foi crítico para a boa acurácia do método. Assim sendo, formulamos a hipótese de que o pH seria responsável pelas interferências observadas com os diluentes anteriores e, portanto, o novo tampão a ser avaliado foi preparado com diferentes concentrações hidrogeniônicas, como pH ácido (6,1), neutro (7,4) e alcalino (8,0 e 8,5). Com base nos resultados, verificamos que, independente do pH do tampão, todas as amostras hipertrigliceridêmicas estudadas apresentaram sedimentação com o tampão fosfato 100 mmol/L. Em seguida, fazendo-se a quantificação do sd-LDL-C no sobrenadante, foi observado que em pH ácido ocorreu a precipitação de todas as lipoproteínas, incluindo a sd-LDL; em pH neutro ainda houve co-precipitação de grande parte da sd-LDL resultando em diminuição de 72%; e em pH alcalino (8,0 e 8,5) os resultados foram satisfatórios em relação ao controle, com variação de 12,8 e 1,3%, respectivamente (Fig. 16B). Estudos anteriores confirmam nossas observações, uma vez que mostraram que a LDL foi precipitada com heparina em pH ácido (EISENHAUER et al, 1987; WIELAND & SEIDEL, 1983) e em pH neutro (BURSTEIN, SCHOLNICK & MORFIN, 1970). Considerando-se o forte poder de sedimentação demonstrado pelo diluente tampão fosfato pH 8,5 (1:2, v/v) – capaz de promover a sedimentação completa, inclusive de amostra com TG > 1000 mg/dL, e formação de *pellets* altamente estáveis – foi verificado se diluições menores poderiam ser utilizadas. Em amostras com concentrações de triglicérides de até 460 mg/dL, diluição de apenas 1,2 vezes foi suficiente para promover a sedimentação das lipoproteínas, enquanto nas amostras com concentrações de até 1150 mg/dL foi necessária diluição de 1,5 vezes (Tabela 1). Dessa forma, conclui-se que o volume de tampão fosfato 100 mmol/L pH 8,5 a ser usado pode ser reduzido, porém é dependente da concentração de triglicérides na amostra.

Verificamos também que o colesterol elevado, isoladamente, até a concentração máxima avaliada de 350 mg/dL não interferiu na sedimentação. Por outro lado, a concentração mínima de triglicérides que afetou a sedimentação das lipoproteínas foi bastante variável, entre 200 e 300 mg/dL, dando indícios de que além da concentração de TG algum outro fator relacionado à amostra estaria igualmente interferindo na sedimentação (Fig. 18). Dentre as inúmeras hipóteses avaliadas, como presença de medicamentos hipolipemiantes e concentração de

glicemia ou imunoglobinas elevadas, somente a heterogeneidade das partículas lipoprotéicas parece plausível interferir na sedimentação pelos cátions divalentes e poliânions. A descoberta da heterogeneidade dentro das principais classes de lipoproteínas fez com que as subfrações fossem reconhecidas como tendo significância individual em termos de associação com doenças (PACKARD & SHEPHERD, 1997). Estudos demonstraram a predominância de subclasse de VLDL maior e menos densa em pacientes diabéticos e com hiperlipidemia familiar combinada (ADIELS et al., 2005; GEORGIEVA et al., 2004). Considerando-se que em nosso estudo, grande parte das amostras lipêmicas era proveniente de indivíduos com um dos quadros clínicos citados anteriormente, talvez a predominância de determinadas subfrações, explique o fato de amostras com concentrações idênticas de triglicerídeos se comportarem de maneira tão distinta quanto à sedimentação.

Considerando algumas divergências encontradas em nossos resultados dos ensaios de precipitação com aqueles descritos originalmente por Hirano et al. (2003), resolvemos confirmar a concentração de sd-LDL obtida pela precipitação com aquela encontrada no método por ultracentrifugação, considerado padrão ouro. Nos ensaios de comparação de métodos, obtivemos boa correlação para os valores de sd-LDL-C ($y = -2,22 + 0,99x$; $r = 0,791$, $p < 0,0001$; $n = 100$) (Fig. 21). O coeficiente de correlação diferiu ligeiramente daquele relatado por Hirano et al. (2003) ($r = 0,884$). De acordo com Westgard e Hunt (1973), o valor de r é diretamente dependente do intervalo de dados, ou seja, intervalos mais amplos resultam em valores de r mais altos e intervalos menores, em valores mais baixos. Portanto, a diferença nos coeficientes de correlação dos dois estudos pode ser justificada pela amplitude no intervalo de abrangência dos valores de sd-LDL-C: 10 - 87 mg/dL no presente estudo e 13 - 133 mg/dL no estudo de Hirano et al. (2003). Análises complementares foram realizadas utilizando-se o gráfico de Bland-Altman e revelaram que o método de ultracentrifugação forneceu resultados de sd-LDL-C 2,7 mg/dL mais altos, em média, que o método de precipitação (Fig. 22) (BLAND & ALTMAN, 1983). No entanto, esta diferença entre os métodos pode ser considerada de pouca relevância clínica.

Após a precipitação das lipoproteínas que contêm apo B, inclusive da lb-LDL, as únicas lipoproteínas a permanecer no sobrenadante são a HDL e a sd-LDL, sendo que esta última é quantificada diretamente pelo método homogêneo de LDL-C. Dessa forma, foi proposto que a concentração de sd-LDL-C poderia ser obtida

por cálculo por meio da diferença de colesterol total e de HDL-C no sobrenadante. Realmente, o uso da equação matemática é factível; porém depende do sistema/equipamento de medida. No analisador Dimension® utilizando sistema de reagente fechado, a diferença da equação para o método homogêneo foi de 9,9% (ou 2,4 mg/dL; $p = 0,03$; Fig. 23). Apesar de estatisticamente significativa, esta diferença pode ser considerada clinicamente irrelevante. Por outro lado, no analisador Cobas Mira *Plus* com sistema de reagente aberto, a diferença chegou a 108,5% mostrando que a aplicação da fórmula só é possível com a utilização de sistemas de reagentes fechados, onde a variação analítica dos ensaios de colesterol total e HDL-C são menores. Embora tenhamos feito a correção para adaptação dos resultados ao sistema fechado ($sd\text{-LDL} = (CT/1,068) - (HDL\text{-}C/0,898)$), esta não pode ser estendida a outros analisadores.

A possibilidade de redução nos custos da metodologia foi também avaliada com a substituição do método homogêneo para o HDL-C pelo método de precipitação seletiva. Após diversos testes chegou-se à conclusão de que é possível quantificar o HDL-C no sobrenadante, desde que o reagente precipitante comercial para HDL-C seja diluído 2,8 vezes com água, eliminando desta maneira, a interferência causada pelo excesso de cátions divalentes.

Para finalizar, os métodos homogêneos para LDL-C podem apresentar reatividade distinta para determinadas subfrações de LDL (USUI et al., 2002; YAMASHITA et al., 2009). Com base nestes relatos decidimos avaliar a quantificação do sd-LDL-C por três conjuntos diagnósticos de marcas distintas. Os reagentes fornecidos pelas companhias nacionais, Labtest e Gold Analisa (sistemas abertos), apresentaram resultados 21,5 e 15,5%, respectivamente, menores que aqueles obtidos com o reagente da Siemens (sistema fechado) (Fig. 27). Os três conjuntos de reagentes usam o mesmo princípio de reação e os mesmos constituintes químicos. No entanto, a leitura de absorbância com o reagente da Siemens em sistema automatizado é feita em dois comprimentos de onda (bicromática) para minimizar variações, enquanto nos ensaios com reagentes no sistema aberto as leituras de absorbância são feitas em apenas um único comprimento de onda. Assim, é possível que isto possa contribuir para as diferenças de resultados de sd-LDL-C quantificado pelos diferentes sistemas

analíticos. Dessa forma, fatores de correção devem ser aplicados para as análises feitas por ambas as marcas (Labtest: sd-LDL-C x 1,3 e Gold Analisa: sd-LDL-C x 1,2), ou o estabelecimento de valores de “referência” para sd-LDL-C especificamente com estes reagentes.

Tendo em vista que os problemas metodológicos com a determinação da sd-LDL pelo ensaio de precipitação foram resolvidos, examinamos a aplicabilidade do método na rotina laboratorial em nossa população, no sentido de verificar a concentração de sd-LDL-C no soro de indivíduos normolipidêmicos saudáveis, indivíduos dislipidêmicos e pacientes diabéticos atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da UFSC. De acordo com os resultados aqui apresentados, os valores de sd-LDL-C encontrados no soro dos indivíduos dos diferentes grupos de estudo são semelhantes àqueles relatados para outras populações.

Em nosso estudo, observamos aumento significativo de sd-LDL-C em indivíduos dislipidêmicos e diabéticos quando comparados aos normolipidêmicos, tanto na concentração, quanto na percentagem de sd-LDL-C em relação ao LDL-C total. Os dislipidêmicos sob tratamento hipolipemiante apresentaram concentração de sd-LDL-C, em média, 2 vezes mais alta, enquanto nos indivíduos dislipidêmicos sem tratamento e nos diabéticos os valores de sd-LDL-C foram 2,5 vezes maiores do que nos normolipidêmicos (Fig. 28A). Estes resultados estão condizentes com aqueles reportados por Menys et al. (2003), que observaram aumento de 2 vezes no sd-LDL-C em dislipidêmicos sob medicação hipolipemiante comparados a indivíduos saudáveis. Hirano et al. (2004) também relataram aumento de 1,8 vezes em diabéticos e em indivíduos dislipidêmicos.

A estratificação por faixa etária no grupo normolipidêmico, revelou que existe aumento médio no sd-LDL-C de 8,3% (2 mg/dL) a cada 10 anos de idade e que este aumento torna-se significativo na comparação das faixas etárias 18 a 28 anos e 52 a 78 anos, quando a diferença chega a 25% (Fig. 29). Na comparação entre as faixas etárias de indivíduos do mesmo sexo, também foi possível observar aumento na concentração de sd-LDL-C com o aumento da idade, sendo que nas mulheres de 40 a 78 anos este aumento foi significativo quando comparado às mulheres de 18 a 28 anos (Fig. 31). Resultados semelhantes foram relatados no *Framingham Offspring Study*, onde se evidenciou a correlação entre a sd-LDL e o aumento da idade (McNAMARA et al., 1987). Maki et al. (2000) também observaram que a predominância do padrão B em mulheres no período pós-menopausa foi

32% maior do que naquelas pré-menopausa. Ainda, as mulheres com o padrão B pertenciam à faixa etária maior do que aquelas com o padrão A (MAKI et al., 2000).

No presente estudo, a comparação entre homens e mulheres, independente da idade, não resultou em diferença estatisticamente significativa ainda que os homens tenham apresentado concentração de sd-LDL-C em média 12,5% maior (Fig. 30). No entanto, quando estratificados por faixa etária os homens de 18 a 28 anos apresentaram concentração significativamente maior de sd-LDL-C do que as mulheres da mesma idade (Fig. 31). Embora a diferença entre as outras faixas etárias não tenha sido significativa, pode-se observar que os homens tiveram tendência a apresentar valores mais elevados de sd-LDL-C, exceto na faixa etária entre 52 e 78 anos. Segundo Freedman et al. (2004), este fato pode ser atribuído às concentrações mais elevadas de triglicerídeos normalmente observadas em indivíduos do sexo masculino (FREEDMAN et al., 2004) e que se correlacionam positivamente com a sd-LDL (KAZUMI et al., 1999; GRIFFIN et al., 1994; CAMPOS et al., 1992). No entanto, em nosso estudo somente os homens da faixa etária entre 29 e 39 anos apresentaram valores de triglicerídeos maiores do que as mulheres de mesma idade (105,5 vs. 73,1 mg/dL; $p = 0,023$). Além dos triglicerídeos, a lipase hepática também está envolvida na formação da sd-LDL e, neste contexto, foi demonstrado que a atividade da lipase hepática é duas vezes maior nos homens do que nas mulheres e está diretamente relacionada à diminuição no tamanho das partículas de LDL (TAN et al., 1995; WATSON et al., 1994).

Campos et al. (1992) mostraram que a prevalência de partículas pequenas e densas de LDL foi de 33% nos homens, 14% nas mulheres no período pós-menopausa e 5% nas mulheres no período pré-menopausa. As observações de Watson et al. (1994) de que as mulheres apresentavam partículas de LDL maiores comparadas às dos homens também concordam com o nosso achado. Freedman et al. (2004) relataram que após os 55 anos de idade, a concentração média de LDL-C foi maior entre as mulheres, mas a quantidade de partículas de LDL permaneceu maior entre os homens até a idade de 70 anos. As análises indicaram também que esta inversão na concentração de LDL-C entre o sexo masculino e feminino foi atribuída às partículas grandes e intermediárias. Com o aumento da idade, a quantidade excedente de

partículas grandes de LDL nas mulheres aumentou de cerca de 0 para 200 nmol/L, enquanto nos homens a quantidade excedente de partículas intermediárias diminuiu. Em contrapartida, nos homens a quantidade excedente de partículas pequenas de LDL aumentou entre as idades de 25 e 50 anos (FREEDMAN et al., 2004).

Com base nos dados do *Women's Health Study*, que avaliou mulheres de meia idade por período médio de três anos, Blake et al. (2002) mostraram que a concentração basal de LDL foi maior e o tamanho da partícula de LDL foi menor entre as mulheres que posteriormente tiveram eventos cardiovasculares. De maneira similar, St-Pierre et al. (2005) relataram que dentre os participantes do *Québec Cardiovascular Study* (2072 homens, com idade entre 35 e 64 anos, acompanhados durante 13 anos) que tiveram o primeiro evento de doença cardíaca isquêmica apresentavam maior proporção de partículas pequenas de LDL bem como concentração elevada de sd-LDL-C, quando comparados aos indivíduos sem a doença.

Tendo em vista que a predominância de sd-LDL foi aceita como fator de risco cardiovascular pelo *National Cholesterol Education Program* (2002) e que os estudos populacionais cada vez mais evidenciam a associação entre sd-LDL e episódios cardiovasculares, se faz necessário identificar na população os indivíduos com o fenótipo B de distribuição da LDL, ainda que estes sejam normolipidêmicos, para que se possa dar início ao processo preventivo, uma vez que estes indivíduos apresentam alto risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. No presente estudo, observamos que dos 137 indivíduos normolipidêmicos avaliados, 121 apresentaram padrão de distribuição A, 13 (9,5%) padrão I e três (2,2%) padrão B (Fig. 32), de acordo com os padrões de distribuição da LDL previamente estabelecidos, padrão A (< 40% de sd-LDL em relação à LDL total), padrão I (40-50%) e padrão B (> 50%) (GRIFFIN et al., 1999). Os resultados da prevalência de padrão I e padrão B são semelhantes, ou inferiores, aos reportados em vários outros estudos (AMBROSCH et al., 1998; AUSTIN et al., 1990; CAMPOS et al., 1992; SELBY et al., 1993). Assim, apesar da baixa frequência de padrão B na população de indivíduos normolipidêmicos atendida no ambulatório do HU-UFSC, o percentual de 9,5 de indivíduos com padrão I poderia ser passível de intervenções terapêuticas, eventualmente pelo uso de hipolipemiantes, visando à reversão ao padrão A.

De fato, os indivíduos dislipidêmicos sob tratamento hipolipemiante apresentaram concentração significativamente menor de

sd-LDL-C, quando comparados aos indivíduos dislipidêmicos sem tratamento (Fig. 35). Estes indivíduos utilizavam, em grande parte, estatinas de primeira geração (86,8%) e, em menor proporção, estatinas de segunda geração e fibratos (8,8 e 4,4%, respectivamente) (Fig. 34). Os resultados corroboram as informações descritas anteriormente sobre o efeito das estatinas em reduzir a sd-LDL (BAHADIR et al., 2009; BALDASSARRE et al., 2005) e sobre o efeito indireto dos fibratos em diminuir o sd-LDL-C ao reduzir a concentração de triglicerídeos (TOKUNO et al., 2007).

Os indivíduos dislipidêmicos sem tratamento hipolipemiante também foram classificados por tipo de dislipidemia. No total foram 123 indivíduos, dos quais 39,8% apresentavam hipercolesterolemia isolada, 22,8% hipertrigliceridemia isolada, 29,3% hiperlipidemia mista e 8,1% apresentavam HDL-C baixo isoladamente. As hiperlipidemias foram analisadas separadamente e observou-se que os indivíduos com hiperlipidemia mista apresentaram concentração média de sd-LDL-C maior que os indivíduos com hiperlipidemias isoladas, com diferença estatisticamente significativa em relação aos indivíduos com hipercolesterolemia (Fig. 36). Resultados semelhantes foram encontrados por vários autores (HIRANO et al., 2004; HIRANO et al., 2009; HOKANSON et al., 1995; HOKANSON et al., 1993; GRUNDY et al., 1987).

Os indivíduos com HDL-C baixo também apresentaram concentração significativamente maior de sd-LDL-C em relação aos indivíduos normolipidêmicos (Fig. 37). No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes tipos de hipoalfalipoproteinemia, isolada ou combinada a TG ou LDL-C elevados. O HDL-C baixo também é um componente bem conhecido de uma variedade de estados dislipidêmicos. Estes incluem doenças genéticas, tais como hipertrigliceridemia familiar, hiperlipidemia familiar combinada e doenças metabólicas, como diabetes *mellitus* não insulino-dependente e síndrome metabólica (BARTER et al., 2003). Genest et al. (1993) estudaram 102 famílias com hipoalfaproteinemia isolada ou em associação com hiperlipidemia e observaram que todos os grupos apresentavam concentração elevada de partículas pequenas de LDL.

O padrão mais comum de dislipidemia em pacientes diabéticos tipo 2 são os valores elevados de triglicerídeos e a diminuição do HDL-

C. A concentração de LDL-C não é, normalmente, significativamente diferente daquela de indivíduos não diabéticos de mesma faixa etária. Entretanto, pacientes diabéticos normalmente têm preponderância de partículas menores e mais densas de LDL, o que possivelmente aumenta a aterogenicidade mesmo que a concentração absoluta de LDL-C não esteja aumentada (American Diabetes Association, 2003). Dentre os pacientes diabéticos aqui avaliados, 63,2% faziam tratamento com hipolipemiantes e apresentaram concentração de sd-LDL-C significativamente menor que os pacientes sem tratamento (Fig. 38). Estes resultados são condizentes com os relatos sobre o efeito dos hipolipemiantes em reduzir o sd-LDL-C (TOKUNO et al., 2007; YOSHINO, HIRANO & KAZUMI, 2002) ou aumentar o tamanho das partículas de LDL (WÄGNER et al., 2003; LAHDENPERÄ et al., 1993), em pacientes diabéticos.

A concentração de sd-LDL-C nos pacientes diabéticos apresentou correlação positiva pequena, porém significativa, com a concentração de hemoglobina glicada (Fig. 39), indicando que, pelo menos em parte, o sd-LDL-C está associado ao controle glicêmico. Em mulheres no período pós-menopausa, a concentração da glicemia de jejum, da insulina e da hemoglobina glicada também foi significativamente maior entre aquelas com o padrão B de distribuição de LDL (MAKI et al., 2000). Ogita et al. (2008) demonstraram que os valores de sd-LDL foram inversamente associados à concentração de insulina após o teste de sobrecarga de glicose em indivíduos saudáveis, corroborando, assim, os achados sobre a diminuição da sd-LDL em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2, após tratamento intensivo com insulina (HAYASHI et al., 2006).

Para finalizar, os valores de sd-LDL-C nos indivíduos aqui avaliados apresentaram correlação positiva com o índice aterogênico ($r = 0,503$, $p < 0,0001$) (Fig. 40), em concordância com resultados descritos anteriormente sobre a relação inversa entre o índice aterogênico e o tamanho da partícula de LDL (DOBIÁŠOVÁ & FROHLICH, 2001).

Concluindo, pesquisas sobre a sd-LDL ao longo dos últimos vinte anos conseguiram demonstrar a associação entre esta subfração e os eventos cardiovasculares em diversos grupos da população, fazendo com que a mesma fosse aceita como fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Acreditamos que, brevemente, este parâmetro poderá fazer parte da avaliação do perfil lipídico devido ao surgimento de metodologias rápidas, eficientes e de

custo acessível, para que a quantificação da sd-LDL seja feita rotineiramente nos laboratórios de análises clínicas. Em nosso estudo, aperfeiçoamos um método que atende às exigências citadas acima e demonstramos que além do acompanhamento de grupos de risco para DAC como, dislipidêmicos e diabéticos, é possível indentificar entre os indivíduos normolipidêmicos aqueles que têm maior propensão ao desenvolvimento de doenças cardíacas, propiciando, assim, o início de medidas preventivas.

7 CONCLUSÕES

Foi desenvolvido um método simples, prático e de baixo custo para a determinação do colesterol na fração pequena e densa da lipoproteína de baixa densidade (sd-LDL-C) com potencial aplicação no laboratório clínico. O método apresenta as características de imprecisão de 8,2 e 7,0% (CV intra- e inter-dia, respectivamente) e, quando comparado ao método de referência, por ultracentrifugação, apresentou correlação aceitável ($y = -2,22 + 0,99x$; $r = 0,791$, $p < 0,0001$; $n = 100$), com diferença média entre os métodos de 2,7 mg/dL.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, J.M.K.; CHAKRABORTY, J.; AKANJI, A.O.; DOI, S.A.R. Hypothyroidism results in small dense LDL independent of IRS traits and hypertriglyceridemia. **Endocrine Journal**, v. 55, p. 381- 389, 2008.
- ADIELS, M.; BORÉN, J.; CASLAKE, M.J.; STEWART, P.; SORO, A.; WESTERBACKA, J.; WENNERBERG, B.; OLOFSSON, S.O.; PACKARD, C.; TASKINEN, M.R. Overproduction of VLDL1 driven by hyperglycemia is a dominant feature of diabetic dyslipidemia. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 25, p. 1697-1703, 2005.
- ALTMAN, D.G; BLAND, J.M; Measurement in Medicine: the Analysis of Method Comparison Studies. **The Statistician**, v. 32, p. 307-317, 1983.
- AMBROSCH, A.; MÜHLEN, I.; KOPF, D.; AUGUSTIN, W.; DIERKES, J.; KÖNIG, W.; LULEY, C.; LEHNERT, H. LDL size distribution in relation to insulin sensitivity and lipoprotein pattern in young and healthy subjects. **Diabetes Care**, v. 21, p. 2077-2084, 1998.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Management of dyslipidemia in adults with diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, suplem. 1, p. 83-86, 2003.
- AUSTIN, M.A.; KING, M.C.; VRANIZAN, K.M.; KRAUSS, R.M. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. **Circulation**, v. 82, p. 495-506, 1990.
- AUSTIN, M.A. Genetic epidemiology of low-density lipoprotein subclass phenotypes. **Annals of Medicine**, v. 24, p. 477-81, 1992.

AUSTIN, M.A. Triglyceride, small, dense low-density lipoprotein, and the atherogenic lipoprotein phenotype. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 2, p. 200-207, 2000.

AUWERX, J.H.; MARZETTA, C.A.; HOKANSON, J.E.; BRUNZELL, J.D. Large buoyant LDL-like particles in hepatic lipase deficiency. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 9, p. 319-325, 1989.

BAHADIR, M.A.; OGUZ, A.; UZUNLULU, M.; BAHADIR, O. Effects of different statin treatments on small dense low-density lipoprotein in patients with metabolic syndrome. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 16, p. 684-690, 2009.

BALDASSARRE, S.; SCRUEL, O.; DECKELBAUM, R.J.; DUPONT, I.E.; DUCOBU, J.; CARPENTIER, Y.A. Beneficial effects of atorvastatin on sd LDL and LDL phenotype B in statin-naive patients and patients previously treated with simvastatin or pravastatin. **International Journal of Cardiology**, v. 104, p. 338-345, 2005.

BARTER, P.; KASTELEIN, J.; NUNN, A.; HOBBS, R. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. **Atherosclerosis**, v. 168, p. 195-211, 2003.

BETTERIDGE, D. J. Lipids and atherogenesis in diabetes mellitus. **Atherosclerosis**, v. 124, suplem.1, p. 43-47, 1996.

BETTERIDGE, D.J. LDL heterogeneity: implications for atherogenicity in insulin resistance and NIDDM. **Diabetologia**, v. 40, p. 149-151, 1997.

BISHOP, M.L.; ENGELKIRK, J.L.D.; FODY, E.P. **Clinical Chemistry – Principles, Procedures, Correlations**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott, 1996. p. 316-318.

BLAKE, G.J.; OTVOS, J.D.; RIFAI, N.; RIDKER, P.M. Low-density lipoprotein particle concentration and size as determined by nuclear

magnetic resonance spectroscopy as predictors of cardiovascular disease in women. **Circulation**, v. 106, p. 1930-1937, 2002.

BURSTEIN, M.; SCHOLNICK, H.R.; MORFIN, R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. **Journal of Lipid Research**, v. 11, p. 583-595, 1970.

CAMPOS, H., BLIJLEVENS, E., MCNAMARA, Jr., ORDOVAS, J.M., POSNER, B.M., WILSON, P.W., et al. LDL particle size distribution. Results from the Framingham Offspring Study. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, v. 12, p.1410-9, 1992.

CAPELL, W.H.; ZAMBON, A.; AUSTIN, M.A.; BRUNZELL, J.D.; HOKANSON, J.E. Compositional differences of LDL particles in normal subjects with LDL subclass phenotype A and LDL subclass phenotype B. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 16, p. 1040-1046, 1996.

CARMO, E. H.; BARRETO, M. L.; DA SILVA, J. B. Jr. Mudanças nos padrões de morbimortalidade da população brasileira: os desafios para um novo século. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 12, p. 63-75, 2003.

CHAPMAN, M.J.; LAPLAUD, P.M.; LUC, G.; FORGEZ, P.; BRUCKERT, E.; GOULINET, S.; LAGRANGE, D. Further resolution of the low density lipoprotein spectrum in normal human plasma: physicochemical characteristics of discrete subspecies separated by density gradient ultracentrifugation. **Journal of Lipid Research**, v. 29, p. 442-458, 1988.

CHUNG, B.H.; WILKINSON, T.; GEER, J.C.; SEGREST, J.P. Preparative and quantitative isolation of plasma lipoproteins: rapid, single discontinuous density gradient ultracentrifugation in a vertical rotor. **Journal of Lipid Research**, v. 21, p. 284-291, 1980.

COHN, R. M.; ROTH, K. S. **Biochemistry and Disease – Bridging Basic Science and Clinical Practice**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1996. p. 505-506.

DAVIES, I.G.; GRAHAM, J.M.; GRIFFIN, B.A. Rapid separation of LDL subclasses by iodixanol gradient ultracentrifugation. **Clinical Chemistry**, v. 49 (11), p. 1865-1872, 2003.

DE GRAAF, J.; SWINKELS, D.W.; DEMACKER, P.N.; de HAAN, A.F.; STALENHOF, A.F. Differences in the low density lipoprotein subfraction profile between oral contraceptive users and controls. **Journal of Clinical and Endocrinology Metabolism**, v. 76, p. 197–202, 1993.

IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, supl. 1, p. 2-19, 2007.

DOBIÁŠOVÁ, M.; FROHLICH, J. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER_{HDL}). **Clinical Biochemistry**, v. 34, p. 583-588, 2001.

DOI, S.A.R.; ABBAS, J.M.K.; PARKINSON, L.; CHAKRABORTY, J.; AKANJI, A.O. LDL Species Heterogeneity in the Atherogenic Dyslipidemia of Polycystic Ovary Syndrome. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 129, p. 802-810, 2008.

DREON, D.M.; FERNSTROM, H.A.; WILLIAMS, P.T.; KRAUSS, R.M. LDL subclass patterns and lipoprotein response to a low-fat, highcarbohydrate diet in women. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 17, p. 707–714, 1997.

EISENHAUER, T.; ARMSTRONG, V.W.; WIELAND, H.; FUCHS, C.; SCHELER, F.; SEIDEL, D. Selective removal of low-density lipoproteins (LDL) by precipitation at low pH: First clinical application

of the HELP system. **Klinische Wochenschrift**, v. 65, p. 161-168, 1987.

FAUCI, A.S.; KASPER, D.L.; BRAUNWALD, E.; HAUSER, S.L.; LONGO, D.L.; JAMESON, J.L.; LOSCALZO, J. **Harrison Medicina Interna**, 17^a Ed., McGraw-Hill Interamericana do Brasil, Rio de Janeiro-RJ, 2009.

FREEDMAN, D.S.; OTVOS, J.D.; JEYARAJAH, E.J.; SHALAUROVA, I.; CUPPLES, L.A.; PARISE, H.; D'AGOSTINO, R.B.; WILSON, P.W.F.; SCHAEFER, E.J. Sex and age differences in lipoprotein subclasses measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy: The Framingham Study. **Clinical Chemistry**, v. 50, p. 1189- 1200, 2004.

GENEST, J. Jr.; BARD, J.M.; FRUCHART, J.C.; ORDOVAS, J.M.; SCHAEFER, E.J. Familial hypoalphalipoproteinemia in premature coronary artery disease. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, v. 13, p. 1728-1737, 1993.

GENTILE, M.; PANICO, S.; JOSSA, F.; MATTIELLO, A.; UBALDI, S.; MAROTTA, G.; PAUCIULLO, P.; RUBBA, P. Small dense LDL particles and metabolic syndrome in a sample of middle-aged women. Findings from Progetto Atena. **Clinica Chimica Acta**, v. 388, p. 179 - 183, 2008.

GEORGIEVA, A.M.; VAN GREENVENBROEK, M.M.J.; KRAUSS, R.M.; BROUWERS, M.C.G.J.; VERMEULEN, V.M.M.J.; TEUNISSEN, M.G.R.; VAN DER KALLEN, C.J.H.; DE BRUIN, T.W.A. Subclasses of low-density lipoprotein and very low-density lipoprotein in familial combined hyperlipidemia: Relationship to multiple lipoprotein phenotype. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 24, p. 744-749, 2004.

GRIFFIN, B.A.; CASLAKE, M.J.; YIP, B.; TAIT, G.W.; PACKARD, C.J.; SHEPHERD, J. Rapid isolation of low-density lipoprotein (LDL) subfractions from plasma by gradient ultracentrifugation. **Atherosclerosis**, v. 83, p. 59-67, 1990.

GRIFFIN, B.A.; FREEMAN, D.J.; TAIT, G.W.; THOMSON, J.; CASLAKE, M.J.; PACKARD, C.J.; SHEPHERD, J. Role of plasma triglyceride in the regulation of plasma low-density lipoprotein (LDL) subfractions: relative contribution of small, dense LDL to coronary heart disease risk. **Atherosclerosis**, v. 106, p. 241-253, 1994.

GRIFFIN, B.A.; MINIHANE, A.M.; FURLONGER, N.; CHAPMAN, C.; MURPHY, M.; WILLIAMS, D.; WRIGHT, J.J.; WILLIAMS, C.M. Inter-relationships between small, dense lowdensity lipoprotein (LDL), plasma triacylglycerol and LDL apoprotein B in an atherogenic lipoprotein phenotype in free-living subjects. **Clinical Science**, v. 97, p. 269-276, 1999.

GROVE, T.H. Effect of reagent pH on determination of high-density lipoprotein cholesterol by precipitation with sodium phosphotungstate-magnesium. **Clinical Chemistry**, v. 25, p. 560-564, 1979.

GRUNDY, S.M.; CHAIT, A.; BRUNZELL, J.D. Familial combined hyperlipidemia workshop. **Arteriosclerosis**, v. 7, p. 203-207, 1987.

HAVEL, R.J.; EDER, H.A.; BRAGDON, J.H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. **Journal of Clinical Investigation**, v. 34(9), p. 1345-1353, 1955.

HAYASHI, T.; HIRANO, T.; YAMAMOTO, T.; ITO, Y.; ADACHI, M. Intensive insulin therapy reduces small dense low-density lipoprotein particles in patients with type 2 diabetes mellitus: relationship to triglyceride-rich lipoprotein subspecies. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 55, p. 879-884, 2006.

HIRANO, T.; ITO, Y.; SAEGUSA, H.; YOSHINO, G. A novel and simple method for quantification of small, dense LDL. **Journal of Lipid Research**, v. 44, p. 2193-2201, 2003.

HIRANO, T.; ITO, Y.; KOBAYASHI, S.; TOYODA, M.; IKEJIRI, A.; SAEGUSA, H.; YAMAZAKI, J.; YOSHINO, G. Clinical significance of small dense low-density lipoprotein cholesterol levels determined by the simple precipitation method. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 24, p. 558-563, 2004.

HIRANO, T.; ITO, Y.; YOSHINO, G. Measurement of small dense low-density lipoprotein particles. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 12, p. 67-72, 2005.

HIRANO, T.; NOHTOMI, K.; SATO, Y.; KAMATA, K.; ITO, Y. Small dense LDL-cholesterol determined by a simple precipitation assay for screening familial combined hyperlipidemia. **Atherosclerosis**, v. 205, p. 603-607, 2009.

HOKANSON, J.E.; AUSTIN, M.A.; ZAMBON, A.; BRUNZELL, J.D. Plasma triglyceride and LDL heterogeneity in familial combined hyperlipidemia. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, v. 13, p. 427-434, 1993.

HOKANSON, J.E.; KRAUSS, R.M.; ALBERS, J.J.; AUSTIN, M.A.; BRUNZELL, J.D. LDL physical and chemical properties in familial combined hyperlipidemia. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 15, p.452-459, 1995.

ITO, Y.; HIRANO, T.; YAMAZAKI, J.; YOSHINO, G. New simple method for small, dense LDL: development of a new quantification method and clinical significance. **Rinsho Byori**, v. 52, p. 406-413, 2004 (em japonês).

ITO, Y.; FUJIMURA, M.; OHTA, M.; HIRANO, T. Development of a homogeneous assay for measurement of small dense LDL cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 57, p. 57-65, 2011.

KAZUMI, T.; KAWAGUCHI, A.; HOZUMI, T.; NAGAO, M.; IWAHASHI, M.; HAYAKAWA, M.; ISHIHARA, K.; YOSHINO, G. Low density lipoprotein particle diameter in young, non-obese, normolipidemic Japanese men. **Atherosclerosis**, v. 142, p. 113-119, 1999.

KOBA, S.; HIRANO, T.; KONDO, T.; SHIBATA, M.; SUZUKI, H.; MURAKAMI, M.; GESCHI, E.; KATAGIRI, T. Significance of small dense low-density lipoproteins and other risk factors in patients with various types of coronary heart disease. **American Heart Journal**, v. 144, p. 1026-1035, 2002.

KOBA, S.; HIRANO, T.; ITO, Y.; TSUNODA, F.; YOKOTA, Y.; BAN, Y.; ISO, Y.; SUZUKI, H.; KATAGIRI, T. Significance of small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentration in relation to the severity of coronary heart diseases. **Atherosclerosis**, v. 189, p. 206-214, 2006.

KOBA, S.; YOKOTA, Y.; HIRANO, T.; ITO, Y.; BAN, Y.; TSUNODA, F.; SATO, T.; SHOJI, M.; SUZUKI, H.; GESHI, E.; KOBAYASHI, Y.; KATAGIRI, T. Small LDL-cholesterol is superior to LDL-cholesterol for determining severe coronary atherosclerosis. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 15, p. 250-260, 2008.

KONTUSH, A.; CHANPETIE, S.; CHAPMAN, M. J. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 23, p. 1881-1888, 2003.

KRAUSS, R.M.; BURKE, D.J. Identification of multiple subclasses of plasma low-density lipoproteins in normal humans. **Journal of Lipid Research**, v. 23, p. 97-104, 1982.

KRAUSS, R.M. Atherogenic lipoprotein phenotype and diet-gene interactions. **Journal of Nutrition**, v. 131, p.340-343, 2001.

LAHDENPERÄ, S.; TILLY-KIESI, M.; VUORINEN-MARKKOLA, H.; KUUSI, T.; TASKINEN, M.R. Effects of gemfibrozil on low-density lipoprotein particle size, density distribution, and composition in patients with type II diabetes. **Diabetes Care**, v. 16, p. 584-592, 1993.

LAMPLUGH, S.M.; MUIRHEAD, R.A.; DEEGAN, T. Selective precipitation of very low density lipoproteins from fasting sera by heparin and manganese ions. **Clinica Chimica Acta**, v. 86, p. 31-36, 1978.

LEE, D.M.; DOWNS, D. A quick and large-scale density gradient subfractionation method for low density lipoproteins. **Journal of Lipid Research**, v. 23, p. 14-27, 1982.

LESSA, I. Assistência médica e óbitos por doença arterial coronariana no Brasil, 1980-1999. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 81, p. 329-335, 2003.

MAKI, K.C.; DAVIDSON, M.H.; CYROWSKI, M.S.; MAKI, A.N.; MARX, P. Low-density lipoprotein subclass distribution pattern and adiposity-associated dyslipidemia in postmenopausal women. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 19, p. 23-30, 2000.

MARSHALL, W. J. **Clinical Chemistry**. 3. ed. London: Mosby, 1995. p. 213.

MARSHALL, W. J.; BANGERT, S. K. **Clinical Biochemistry-Metabolic and Clinical Aspects**. New York: Churchill Livingstone, 1995. p. 624.

McNAMARA, J.R.; CAMPOS, H.; ORDOVAS, J.M.; PETERSON, J.; WILSON, P.W.F.; SCHAEFER, E.J. Effect of gender, age, and lipid

status on low density lipoprotein subfraction distribution. Results from the Framingham Offspring Study. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 7, p. 483-490, 1987.

McNAMARA, J.R.; WARNICK, G.R.; COOPER, G.R. A brief history of lipid and lipoprotein measurements and their contribution to clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 369, p. 158-167, 2006.

MENYS, V.C.; LIU, Y.; MACKNESS, M.I.; CASLAKE, M.J.; KWOK, S.; DURRINGTON, P.N. Measurement of plasma small-dense LDL concentration by a simplified ultracentrifugation procedure and immunoassay of apolipoprotein B. **Clinica Chimica Acta**, v. 334, p. 95-106, 2003.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. **Circulation**, v. 106, p. 3143-3421, 2002.

NOZUE, T.; MICHISHITA, I.; ISHIBASHI, Y.; ITO, S.; IWAKI, T.; MIZUGUSHI, I.; MIURA, M.; ITO, Y.; HIRANO, T. Small dense low-density lipoprotein cholesterol is a useful marker of metabolic syndrome in patients with coronary artery disease. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 14, p. 202-207, 2007.

NUTALL, S.L.; HEATON, S.; PIPER, M.K.; MARTIN, U.; GORDON, C. Cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus—evidence of increased oxidative stress and dyslipidaemia. **Rheumatology**, v. 42, p. 758-762, 2003.

OGITA, K.; AI, M.; TANAKA, A.; ITO, Y.; HIRANO, T.; YOSHINO, G.; SHIMOKADO, K. Circadian rhythm of serum concentration of small dense low-density lipoprotein cholesterol. **Clinica Chimica Acta**, v. 376, p. 96-100, 2007.

OGITA, K.; AI, M.; TANAKA, A.; ITO, Y.; HIRANO, T.; YOSHINO, G.; SHIMOKADO, K. Serum concentration of small dense low-density lipoprotein-cholesterol during oral glucose tolerance test and oral fat tolerance test. **Clinica Chimica Acta**, v. 387, p.36-41, 2008.

OTVOS, J.D.; JEYARAJAH, E.J.; CROMWELL, W.C. Measurement issues related to lipoprotein heterogeneity. **American Journal of Cardiology**, v. 90, suplement. I, p. 22-29, 2002.

PACKARD, C.J.; SHEPHERD, J. Lipoprotein Heterogeneity and Apolipoprotein B Metabolism. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 17, p. 3542-3556, 1997.

RIZZO, M.; BARBAGALLO, C.M.; SEVERINO, M.; POLIZZI, F.; ONORATO, F.; NOTO, D., et al. Low-density-lipoprotein peak particle size in a Mediterranean population. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 33, p. 126–33, 2003.

RIZZO, M.; BERNEIS, K. Who needs to care about small, dense low-density lipoproteins? **International Journal of Clinical Practice**, v. 61, p. 1949-1956, 2007.

RIZZO, M.; KOTUR-STEVLJEVIC, J.; BERNEIS, K.; SPINAS, G.; RINNI, G. B.; JELIC-IVANOVIC, Z.; SPASOJEVIC-KALIMANOVSKA, V.; VEKIC, J. Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look. **Translational Research**, v. 153, p. 217-223, 2009.

RIZZO, M.; SPINAS, G.A.; CESUR, M.; OZBALKAN, Z.; RINI, G.B.; BERNEIS, K. Atherogenic lipoprotein phenotype and LDL size and subclasses in drug-naïve patients with early rheumatoid arthritis. **Atherosclerosis**, v. 207, p. 502-506, 2009.

ROSS, R. Cell biology of atherosclerosis. **Annual Review of Physiology**, v. 57, p. 791-804, 1995.

ROSS, R. Cellular and molecular studies of atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 131, p. 3-4, 1997.

ROSS, R. Interactions among the inflammatory and artery wall cells and the connective tissue. **Journal of Vascular and Interventional Radiology**, v.9, p. 672-674, 1998.

ROSS, R. Mechanisms of disease: atherosclerosis – an inflammatory disease. **New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 115-126, 1999.

SATTAR, N.; PETRIE, J. R.; JAAP, A. J. The atherogenic lipoprotein phenotype and vascular endothelial dysfunction. **Atherosclerosis**, v. 138, p. 229-235, 1998.

SCHEFFER, P.G.; BAKKER, S.J.L.; HEINE, R.J.; TEERLINK, T. Measurement of low-density lipoprotein particle size by high-performance gel-filtration chromatography. **Clinical Chemistry**, v. 43, p. 1904-1912, 1997.

Sd-LDL-C “SEIKEN”: Reagent kit for the quantitative determination of small, dense LDL. United Kingdom/Japan: Randox Laboratories LTD. and Denka Seiken Co., LTD. **sd-LDL-C Kit Instructions**, 2006.

SELBY, J.V.; AUSTIN, M.A.; NEWMAN, B.; ZHANG, D.; QUESENBERRY, C.P. Jr.; MAYER, E.J.; KRAUSS, R.M. LDL subclass phenotypes and the insulin resistance syndrome in women. **Circulation**, v. 88, p. 381–387, 1993.

SHEN, M.M.S.; KRAUSS, R.M.; LINDGREN, F.T.; FORTE, T.M. Heterogeneity of serum low density lipoproteins in normal human subjects. **Journal of Lipid Research**, v. 22, p. 236-244, 1981.

ST-PIERRE, A.C.; CANTIN, B.; DAGENAIS, G.R.; MAURIÈGE, P.; BERNARD, P.M.; DESPRÉS, J.P.; LAMARCHE, B. Low-density lipoprotein subfractions and the long-term risk of ischemic heart disease

in men: 13-Year follow-up data From the Québec Cardiovascular Study. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, p. 553-559, 2005.

SUDBRACK, T.P.; ARCHILHA, N.L.; ITRI, R.; RISKE, K.A. Observing the solubilization of lipid bilayers by detergents with optical microscopy of GUVs. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, p. 269-277, 2011.

SWINKLES, D.W.; HAK-LEMMERS, H.L.M.; DEMACKER, P.N.M. Single spin density gradient ultracentrifugation method for the detection and isolation of light and heavy low-density lipoprotein subfractions. **Journal of Lipid Research**, v. 28, p. 1233-1239, 1987.

TAN, C.E.; FORSTER, L.; CASLAKE, M.J.; BEDFORD, D.; WATSON, T.D.G.; McCONNELL, M.; PACKARD, C.J.; SHEPHERD, J. Relations between plasma lipids and postheparin plasma lipases and VLDL and LDL subfraction patterns in normolipemic men and women. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biolog**, v. 15, p. 1839-1848, 1995.

TENG, B.; THOMPSON, G.R.; SNIDERMAN, A.D.; FORTE, T.M.; KRAUSS, R.M.; KWITEROVICH, P.O. Jr. Composition and distribution of low density lipoprotein fractions in hyperapobetalipoproteinemia, normolipidemia, and familial hypercholesterolemia. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 80, p. 6662-6666, 1983.

TERRY, R.B.; WOOD, P.D.; HASKELL, W.L.; STEFANICK, M.L.; KRAUSS, R.M. Regional adiposity patterns in relation to lipids, lipoprotein cholesterol, and lipoprotein subfraction mass in men. **Journal of Clinical and Endocrinology Metabolism**, v. 68, p. 191-99, 1989.

TOKUNO, A.; HIRANO, T.; HAYASHI, T.; MORI, Y.; YAMAMOTO, T.; NAGASHIMA, M.; SHIRAIISHI, Y.; ITO, Y.; ADACHI, M. The effects of statin and fibrate on lowering small dense LDL-cholesterol in hyperlipidemic patients with type 2 diabetes. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 14, p. 128-132, 2007.

TRIBBLE, D. L.; RIZZO, M.; CHAIT, A.; LEWIS, D. M.; BLANCHE, P. J.; KRAUSS, R. M. Enhanced oxidative susceptibility and reduced antioxidant content of metabolic precursors of small, dense low-density lipoproteins. **The American Journal of Medicine**, v. 110, p. 103-110, 2001.

TSIMIHODIMOS, V.; GAZI, I.; KOSTARA, C.; TSELEPIS, A.D.; ELISAF, M. Plasma lipoproteins and triacylglycerol are predictors of small, dense LDL particles. **Lipids**, v. 42, p. 403-409, 2007.

TSUZAKI, K.; KOTANI, K.; YAMADA, K.; SANO, Y.; MATSUOKA, Y.; OKAZAKI, K.; YAMADA, T.; SHIMATSU, A.; SAKANE, N. The parameters related to small dense low-density lipoprotein evaluated by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis method in dyslipidemic subjects: with reference to the Japanese guideline for prevention of atherosclerotic cardiovascular diseases. **Journal of Electrophoresis**, v. 53, p. 39-43, 2009.

USUI, S.; KAKUUCHI, H.; OKAMOTO, M.; MIZUKAMI, Y.; OKAZAKI, M. Differential reactivity of two homogeneous LDL-cholesterol methods to LDL and VLDL subfractions, as demonstrated by ultracentrifugation and HPLC. **Clinical Chemistry**, v. 48 (11), p. 1946-1954, 2002.

VANDERMEERSCH, A.; AMEYE, S.; PUYPE, D.; PETITJEAN, D.; DE BUYZERE, M.; LANGLOIS, M.R. Estimation of the low-density lipoprotein (LDL) subclass phenotype using a direct, automated assay of small dense LDL-cholesterol without sample pretreatment. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, p. 1361-1366, 2010.

WÄGNER, A.M.; JORBA, O.; BONET, R.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J.; PÉREZ, A. Efficacy of atorvastatin and gemfibrozil, alone and in low dose combination, in the treatment of diabetic dyslipidemia. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, p. 3212-3217, 2003.

WATSON, T.D.; CASLAKE, M.J.; FREEMAN, D.J.; GRIFFIN, B.A.; PACKARD, C.J.; SHEPHERD, J. Determinants of LDL subfraction distribution and concentrations in Young normolipidemic subjects. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 14, p. 902-910, 1994.

WESTGARD, J.O.; HUNT, M.R. Use and interpretation of common statistical tests in method-comparison studies. **Clinical Chemistry**, v. 19, p. 49-57, 1973.

WIELAND, H.; SEIDEL, D. A simple specific method for precipitation of low density lipoproteins. **Journal of Lipid Research**, v. 24, p. 904-909, 1983.

WIERZBICKI, A. S. Diabetic dyslipidaemia: the triad. **European Heart Journal**, suplem. F, p. 30-33, 2006.

WILD, R.A.; RIZZO, M.; CLIFTON, S.; CARMINA, E. Lipid levels in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. **Fertility and Sterility**, 2011, *in press*.

YAMASHITA, S.; KAWASE, R.; NAKAOKA, H.; NAKATANI, K., INAGAKI, I.; YUASA-KAWASE, M.; TSUBAKIO-YAMAMOTO, K.; SANDOVAL, J.C.; MASUDA, D.; OHAMA, T.; NAKAGAWA-TOYAMA, Y.; MATSUYAMA, A.; NISHIDA, M.; ISHIGAMI, M. Differential reactivities of four homogeneous assays for LDL-cholesterol in serum to intermediate-density lipoproteins and small dense LDL: Comparisons with the Friedewald equation. **Clinica Chimica Acta**, v. 410, p. 31-38, 2009.

YOSHINO, G.; HIRANO, T.; KAZUMI, T. Treatment of small dense LDL. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 9, p. 266-275, 2002.

ZAMBON, A.; HOKANSON, J.E.; BROWN, B.G.; BRUNZELL, J.D. Evidence for a New Pathophysiological Mechanism for Coronary Artery Disease Regression : Hepatic Lipase-Mediated Changes in LDL Density. **Circulation**, v. 99, p. 1959-1964, 1999.

ZHAO, C. X.; CUI, Y. H.; FAN, Q.; WANG, P. H.; HUI, R.; CIANFLONE, K.; WANG, A. W. Small dense low-density lipoproteins and associated risk factors in patients with stroke. **Cerebrovascular Diseases**, v. 27, p. 99-104, 2009.

APÊNDICE A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CEP: 88040-970 - FLORIANÓPOLIS - SANTA
CATARINA

Participante N°

□□□□

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O(A) Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa intitulada “**Quantificação da LDL pequena e densa em soro de indivíduos normolipidêmicos e hiperlipidêmicos**”, de responsabilidade do pesquisador **Prof. Dr. Edson Luiz da Silva**. Neste estudo, pretende-se estabelecer valores de referência da LDL pequena e densa para a população saudável e avaliar a quantidade da mesma em pacientes com dislipidemias e diabetes mellitus. Este estudo é necessário porque evidências crescentes vêm demonstrando que a sub-classe pequena e densa da LDL é mais aterogênica do que a LDL de maior tamanho e menor densidade. Além disso, a LDL pequena e densa está aumentada no plasma de indivíduos com dislipidemias e de pacientes com *diabetes mellitus*, o que faz com estes pacientes apresentem maior risco para a doença cardíaca coronariana.

O(A) senhor(a) deve manter os seus hábitos de vida regulares durante o período de tempo do estudo, como por exemplo, consumir o mesmo tipo de alimentação, praticar ou não exercícios físicos. Precisamos, também, da sua autorização para a realização de uma coleta de 5 mL de sangue (1 tubo), em jejum de 12-14 horas.

Esse protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (n° xxxxxx) e trará apenas o desconforto das coletas de sangue. Esperamos, entretanto, que esse estudo traga benefícios, tais como a melhor prevenção e o monitoramento da doença arterial coronariana. Esta pesquisa não oferece riscos maiores do que os citados acima, não tem fins lucrativos, é confidencial e o seu nome será usado apenas no primeiro momento de

coleta das amostras de sangue. Em seguida, as amostras serão identificadas pelo número do seu cadastro. Os resultados do estudo poderão ser publicados em revistas científicas, apresentados em congressos ou eventos científicos ou às autoridades sanitárias, sem que seu nome seja mencionado em parte alguma.

O(A) senhor(a) poderá se beneficiar diretamente dos resultados obtidos no final do estudo, caso estes sejam de interesse clínico. Sua participação é voluntária, podendo desistir desta pesquisa em qualquer de suas fases. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelos telefones 3721-8053; 8832-8872. Se você estiver de acordo em participar, garantimos que as informações obtidas e o material coletado serão confidenciais e só serão utilizados neste trabalho.

Eu, abaixo assinado, concordo em participar deste estudo.

Nome do(a) participante

Assinatura

Data

Edson Luiz da Silva

Luciana da Silveira Cavalcante

Coordenador
Fone:3721-8053;
edson@ccs.ufsc.br

Pesquisador
Fone:8832-8872;
lucavalcante@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA
CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CEP: 88040-970 - FLORIANÓPOLIS - SANTA
CATARINA
FONE: (48) 3721-8053; 3721-9712 - FAX: (48)
3721-9542

Participante
Nº | | | |

Consentimento Para Participar Deste Estudo

Eu, _____ declaro que li e compreendi as informações contidas nesse documento. Fui devidamente informado(a) pelos pesquisadores – Prof. Dr. Edson Luiz da Silva e Luciana da Silveira Cavalcante - dos procedimentos que serão utilizados e da conduta deste estudo intitulado “**Quantificação da LDL pequena e densa em soro de indivíduos normolipidêmicos e hiperlipidêmicos.**”, e concordo em participar da pesquisa como voluntário. Foi-me garantido que posso retirar o consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade. Declaro ainda que recebi uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Florianópolis, ____ de _____ de _____.

Assinatura do (a) participante
Voluntário

R.G

Prof. Dr. Edson Luiz da Silva
Professor Coordenador

Luciana da Silveira Cavalcante
Mestranda

APÊNDICE B

Projeto de Pesquisa – LDL pequena e densa

Questionário – Avaliação Clínica

Participante Nº |__|__|__|

Identificação:

Nome: _____

Sexo: masculino feminino Estado civil:

Peso: _____ Altura: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____

Raça: branco pardo amarelo negro

Escolaridade: analfabeto 1º grau incompleto 1º grau completo 2º grau incompleto 2º grau completo superior incompleto superior completo pós-graduação

Fatores de Risco:

- | | | |
|-----------------------------------|------------------------------|--|
| 1. Hipertensão arterial | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
| 2. Diabetes | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
| 3. Histórico Familiar de Diabetes | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não Parentesco: |
| 4. Colesterol alto | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |

Último LDL:

- | | | |
|-----------------------|------------------------------|------------------------------|
| 5. Triglicérides alto | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
|-----------------------|------------------------------|------------------------------|

Último Triglicérides:

- | | | |
|--------------|------------------------------|------------------------------|
| 6. Tabagista | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
|--------------|------------------------------|------------------------------|

Nº cigarros/dia:

Eventualmente Ex-fumante Parou há:

7. Antecedentes Familiares de Doença Arterial Coronariana:

sim não

8. Problema respiratório: sim não Quais:

9. Problema hepático: sim não Quais:

10. Problema renal: sim não Quais:

11. Hipertireoidismo: sim não

12. Hipotireoidismo: sim não

Antecedentes de Morbidades (não cardiovasculares)

1. Cirurgias: _____

2. Internações: _____

3. Doenças: _____

4. Processo infeccioso ou inflamatório recente: não sim

Qual? _____

Hábitos:

1. Atividade Física sim não

Quantas horas na semana: _____ Quantos meses por ano: _____

2. Seu grau de atividade física no lazer é: _____

(1)-principalmente sedentária; (2)-exercício leve (sentado: leitura, TV); (3)-exercício moderado (esforço mínimo: pescar, caminhada, pintura); (4)-exercício extremo (batimentos cardíacos rápidos: correr, jogar futebol, natação).

Seu grau de atividade física no trabalho é: _____

(1) predominantemente caminha no mesmo nível; (2) principalmente caminha em níveis diferentes; (3) atividade física pesada; (4) principalmente sedentário; (5) exercício leve.

3. Bebida Alcoólica sim não Freqüente sim não Raramente
sim não

4. Estresse sim não

5. Medicação em uso

Nenhum Diurético Estatinas Fibratos

Anti-Hipertensivo Vit. E suplemento Vit. C suplemento

Vit. A suplemento Multivitaminas Extratos Vegetais

Óleo de peixe Antiinflamatórios não esteroidais

Anticoncepcional Oral Injetável Intradérmico

Outras medicações regulares Qual (is): _____

6. Tratamentos Alternativos

Nenhum Acupuntura Hipnose Homeopatia

Outras:

7. Doença Arterial em outro local

Nenhuma Cérebro Periférico Aorta Renal Intestino

8. Angina pectoris Presente sim não

Início: ___/___/_____

9. Infarto do Miocárdio sim não

Data ___/___/_____

ANEXO A

CEPSH -

http://www.reitoria.ufsc.br/~hpcpe/projeto_cep/relatorios/ver_parec...**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA COM SERES HUMANOS**Logado como: **Pesquisador**, Olá Edson Luiz da Silva (Alterar dados pessoais)

Início Cadastrar Nova pesquisa Minhas Pesquisas Sair

IMPRIMIR PARECER | VOLTAR

Parecer Consubstanciado Nº: 608/11

Data de Entrada no CEP: 19/02/2010

Título do Projeto: Implementação de metodologia para a determinação laboratorial da sub-fração de LDL pequena e densa na rotina laboratorial. b) Verificar a concentração sérica da sub-fração de LDL pequena e densa em indivíduos normolipidêmicos e diabéticos.**Pesquisador Responsável:** Edson Luiz da Silva**Pesquisador Principal:** Luciana da Silveira Cavalcante**Propósito:** Mestrado**Instituição onde se realizará:** Outras**Objetivos (Preenchido pelo pesquisador)**

a) Padronizar a metodologia para isolamento e quantificação da sub-fração de LDL pequena e densa na rotina laboratorial. b) Verificar a concentração sérica da sub-fração de LDL pequena e densa em indivíduos normolipidêmicos, hiperlipidêmicos e diabéticos. c) Dar início ao estabelecimento de valores de referência para a população saudável.

Sumário do Projeto (Preenchido pelo pesquisador)

Breve introdução/Justificativa: Estudos de caso-control e estudos epidemiológicos prospectivos demonstraram que a concentração sérica de LDL (lipoproteína de baixa densidade) é um fator de risco independente e modificável para doenças cardiovasculares. Todavia, existe um grande número de pacientes com DAC que possuem valores desejáveis de LDL-colesterol, indicando, assim, a presença de outros fatores envolvidos na gênese e progressão dessa doença. De fato, a LDL não é uma entidade única, mas, um grupo heterogêneo de partículas lipoprotéicas variando em tamanho e densidade, com predominância de partículas menores que são mais aterogênicas. O aumento da aterogenicidade da sub-classe de LDL pequenas e densas (sd-LDL) é devido à redução da afinidade pelo receptor da LDL, resultando em atraso na captação da lipoproteína pelo fígado; maior infiltração na camada subendotelial; mudanças na conformação da apolipoproteína B e maior susceptibilidade à oxidação devido à redução no seu conteúdo antioxidante. Considerando que o t

Tamanho da Amostra: (indique como foi estabelecido): A utilização do número de indivíduos ou pacientes estipulado está baseada em dados da literatura e em método estatístico. O método, chamado de teste de hipótese, baseia-se no cálculo do menor número de indivíduos necessário para que a diferença entre as populações em exame seja estatisticamente significativa. Este cálculo depende da precisão (que é a menor diferença a ser detectada como estatisticamente significante), da variabilidade esperada (quanto maior a dispersão dos dados, maior terá que ser a amostra), do parâmetro β (P, ou probabilidade de se estar cometendo um erro do Tipo I) que é a probabilidade aceitável de achar uma diferença quando na verdade ela não existe (falso verdadeiro); quanto menor for o alfa (II) que é o risco aceitável de estar perdendo uma diferença que realmente existe. Assim sendo, partimos de alguns pressupostos para o cálculo do número de partícip

Participantes / Sujeitos: (quem será o objeto da pesquisa): Participarão do estudo os voluntários que concordarem com o protocolo experimental e preencherem o termo de consentimento. Serão incluídos voluntários de ambos os sexos, entre 30 e 60 anos de idade, que apresentarem perfil lipídico normal (grupo controle), que apresentarem valores séricos de colesterol total > 200 mg/dL; LDL-colesterol > 130 mg/dL; LDL-c/HDL-c > 2,5 e triglicérides < 400 mg/dL (grupo hipercolesterolêmico) ou que forem portadores de diabetes mellitus tipo 2 (grupo diabetes). Serão excluídos do estudo indivíduos que apresentarem outras doenças, como câncer, doenças hepáticas, gástricas, renais, obesidade mórbida e hiper ou hipotireoidismo.

Infraestrutura, do local onde será realizada a Pesquisa: Os ensaios de análise do perfil lipídico serão realizados no Laboratório de Pesquisa em Lipídios, Antioxidantes e Aterosclerose - Departamento de Análises Clínicas - UFSC, equipado com a infraestrutura básica, sob a orientação do coordenador do projeto.

Procedimentos / intervenções: (de natureza ambiental, educacional, nutricional, farmacológica): As amostras de sangue serão coletadas utilizando sistema a vácuo, em tubos sem anticoagulante, para a obtenção do soro, após jejum de 12 a 14 h para a determinação do perfil lipídico, segundo a recomendação da IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose.

Parâmetros avaliados: Análises laboratoriais: Medidas de colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, triglicérides e glicose – Instrumentos: conjunto de reagentes químicos, centrífuga e espectrofotômetro.

"Outcomes": Inicialmente, esperamos otimizar a metodologia para isolamento e quantificação da sub-fração da LDL pequena e densa de forma a possibilitar a sua aplicabilidade na rotina laboratorial. Em segundo lugar e igualmente importante, esperamos demonstrar na população local os resultados já descritos em artigos científicos internacionais. Ou seja: Hipótese 0: Valores de LDL pequena e densa significativamente maiores em indivíduos dislipidêmicos e com diabetes mellitus quando comparados aos indivíduos normolipidêmicos. Hipótese 1: Valores de LDL pequena e densa de indivíduos dislipidêmicos e pacientes com diabetes mellitus iguais aos dos indivíduos normolipidêmicos. Por último, esperamos dar início ao estabelecimento dos valores de referência da LDL pequena e densa para a população de Santa Catarina.

Comente sobre os riscos para os participantes deste estudo: O estudo não apresenta riscos aos participantes, com exceção da dor e possível formação de hematoma provocadas pelas coletas de sangue.

Descreva como os participantes serão recrutados incluindo modos de divulgação e quem irá obter o consentimento: Os participantes, indivíduos com suspeita de dislipidemias, pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e voluntários saudáveis, serão recrutados por convites orais, ou por meio de cartazes convocatórios distribuídos no Hospital Universitário e clínicas especializadas na cidade de Florianópolis. Em um segundo momento, será esclarecido oralmente aos participantes o delineamento do estudo e a importância do mesmo em relação à contribuição para a prevenção e o monitoramento da doença arterial coronariana em indivíduos dislipidêmicos e com diabetes mellitus.

Estão os participantes legalmente capacitados para assinar o consentimento? Sim

Quais os procedimentos que deverão ser seguidos pelos participantes/sujeitos se eles quiserem desistir em qualquer fase do estudo? Consta na cópia do termo de consentimento informado o telefone de todos os pesquisadores envolvidos, os quais poderão ser utilizados para dirimir quaisquer dúvidas ou mesmo para informar o cancelamento da participação no estudo, não havendo, para tanto, necessidade de apresentar justificativa.

Último Parecer enviado	
Enviado em:	29/05/2010
Comentários	
O TCLE está elaborado de maneira a permitir que o sujeito da pesquisa seja esclarecido. A pendência foi resolvida!	
Parecer	
Aprovado	
Data da Reunião	
	31/05/2010

Enviado em:	27/03/2010
Comentários:	A pesquisa proposta segue os princípios éticos que norteiam a boa prática de pesquisa com seres humanos, mas o TCLE carece de alguns reparos para atender o disposto no capítulo IV.1 da resolução 196/96 do CNS: "...Exige-se que o esclarecimento dos sujeitos se faça em linguagem acessível...". Isso é necessário para que a autonomia do sujeito da pesquisa seja preservada, bastando esclarecer e não apenas informar a respeito da pesquisa em que ele participa. Assim, será preciso reformular o TCLE, elaborando-o com uma linguagem mais simples sem contudo deixar de informar.
Parecer:	Pendente
Data da Reunião:	29/03/2010