

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

**Associação dos Níveis de HbA1c com Colesterol LDL e Colesterol LDL
Oxidado em Indivíduos Não-diabéticos**

Dissertação de Mestrado

Débora Spessatto

Porto Alegre, dezembro de 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

**Associação dos Níveis de HbA1c com Colesterol LDL e Colesterol LDL
Oxidado em Indivíduos Não-diabéticos**

Dissertação de Mestrado

Débora Spessatto

Orientadora: Prof^a Dr^a Joíza Lins Camargo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Endocrinologia.

Porto Alegre, dezembro de 2011.

SUMÁRIO

	Página
Agradecimento.....	05
Capítulo 1: Artigo de Revisão.....	06
Objetivo.....	33
Capítulo 2: Artigo Original.....	34

O formato da dissertação segue o modelo recomendado pelo PPG em Ciências Médica: Endocrinologia – UFRGS, sendo apresentada na forma de um artigo de revisão sobre o tema, seguido de um artigo original contendo os resultados finais.

Agradecimentos

Àqueles que nos ensinaram muito mais que teorias, que nos preparam também para vida, todo o meu carinho e gratidão.

A Deus por sempre me iluminar e me guiar...

Agradeço a minha orientadora, Professora Dra. Joíza Lins Camargo, pela oportunidade de participar deste curso de Pós-Graduação, pela valorosa orientação neste projeto, principalmente pelas suas qualidades como excelente profissional, competente e acima de tudo, humana, que nos engrandece como aluno e pessoa, aqui fica minha admiração.

A minha família, pelo apoio e paciência que tiveram.

Ao meu noivo querido, pelo seu amor, compreensão, incentivo e força para superar meus desafios.

As minhas amigas e colegas Liz Marina Bueno dos Passos Brum e Gabriela Cavagnolli, sem palavras para expressar a vital colaboração e ajuda prestada neste trabalho.

Ao bioquímico Ricardo Bruch, que de maneira tão solícita, cedeu o equipamento para realização das dosagens.

Ao bioquímico Carlos Alberto Ribeiro do setor de Bioquímica do Laboratório de Patologia Clínica do HCPA.

Aos colegas de serviço e Coordenação da Secretária da Saúde de Novo Hamburgo, pelo apoio prestado.

Aos estatísticos Vânia Hirakatae e Luciano Santos Pinto Guimarães; ao funcionário Elton Ferlin, pela colaboração imprescindível que deram a este trabalho.

Enfim, a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização e sucesso deste Trabalho.

Muito Obrigada!

HbA1c, LDL Oxidado e Risco de Doença Cardiovascular

Débora Spessatto¹

Joíza Lins Camargo^{2*}

¹ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

² Professora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Chefe da Unidade de Bioquímica e Imunoensaio do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

* Autor para Correspondência:

Joíza Lins Camargo
Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Rua Ramiro Barcellos, 2350; 2º andar, Porto Alegre, RS 90035-903, Brasil.
Fax: 51-33598310.
E-mail address: jcamargo@hcpu.ufrgs.br

Artigo de Revisão

INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma das principais síndromes de evolução crônica que acomete a população nos dias atuais. A sua prevalência vem crescendo significativamente com o processo de industrialização e urbanização populacional dos últimos anos. Atualmente cerca de 5% da população mundial é afetada por DM, e sua prevalência está aumentando rapidamente. O DM tipo 2 (DM2) afeta mais de 80% de todos os pacientes diabéticos. Uma das complicações crônicas do DM é a doença cardiovascular (DCV), a qual é responsável por até 50% das causas de morte nestes pacientes. Estima-se que mais de 200 milhões de pessoas sejam afetadas pela doença em todo mundo (ADA, 2011; Mokdad AH, 2000; WHO, 2006).

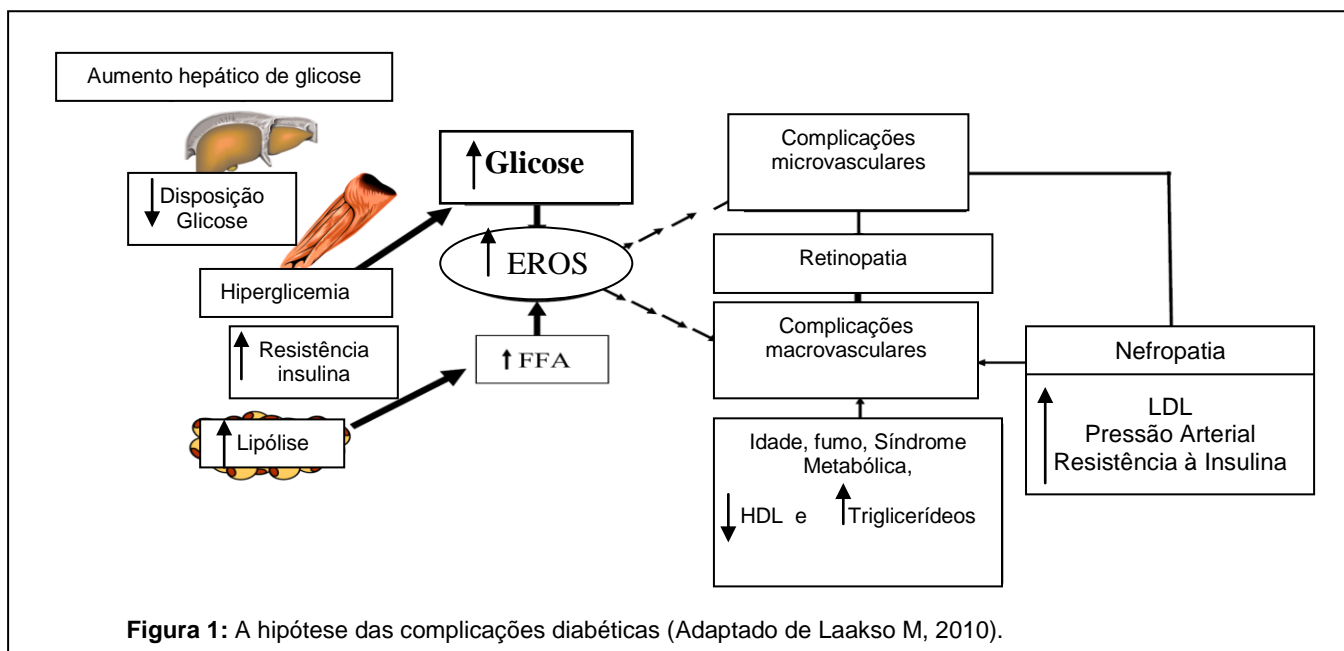
O DM é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia, resultante de defeitos de secreção e/ou ação da insulina. Esta hiperglicemia crônica é associada às complicações que incluem retinopatia, nefropatia, neuropatia e sintomas cardiovasculares (DCCT, 1993; Pistrosch F, 2011; UKPDS, 1998). Por causa da natureza crônica da doença e suas múltiplas complicações, tornou-se uma grande ameaça para a saúde pública.

Recentemente, a Associação Americana de Diabetes (ADA) mudou os critérios diagnósticos para o DM, adotando o uso da hemoglobina glicada (HbA1c), um marcador de glicemia crônica, como teste de escolha para o diagnóstico. Esta mudança baseou-se no relatório do Comitê Internacional de Especialistas que recomendou o ponto de corte de HbA1c $\geq 6,5\%$ como critério diagnóstico de DM. Os níveis de HbA1c estão intimamente relacionados ao desenvolvimento das complicações em pacientes diabéticos e também podem prever o desenvolvimento da doença e/ou suas complicações em indivíduos ainda sem a doença. Novos critérios diagnósticos acrescentaram uma nova categoria de indivíduos, os quais estariam em alto risco de desenvolver DM e/ou suas complicações, denominada pré-diabetes com valores de HbA1c entre 5,7 a 6,4%. Estas recomendações salientam o risco contínuo para DM em todas as medidas da glicemia. Pacientes classificados como pré-diabéticos devem ser informados do risco aumentado para o DM, bem como para DCV, e devem ser orientados sobre estratégias eficazes para reduzir estes riscos, tais como perda de peso e aumento da atividade física (The International Expert Committee, 2009; ADA, 2011; WHO, 2011).

Diabetes, HbA1c e Complicações

Os pacientes com DM apresentam aumento do risco cardiovascular quando comparados a pacientes não-diabéticos. Estudos prospectivos demonstraram relação direta entre hiperglicemia crônica e as complicações micro e macrovasculares (DCCT, 1993; Selvin E, 2005; UKPDS, 1998). Estudo recente relata que o controle glicêmico, medido pela

HbA1c, é positivamente associado com DCV, mesmo após ajuste para outros fatores de risco cardiovascular, em indivíduos com e sem diagnóstico de DM. Salientando que a HbA1c está correlacionada com os fatores de risco para DCV, incluindo lipídios, pressão arterial e adiposidade (Laakso M, 2010) (Figura 1).



Há grande interesse em saber se os marcadores circulantes do metabolismo da glicose estão associados com risco de DCV em pessoas sem diabetes. Várias medidas de disglucemia como glicemia de jejum (GJ), teste oral de tolerância a glicose (TOTG) e HbA1c foram avaliadas em estudos a longo prazo, para DCV (Goldstein, 2003; Beckman, 2002). Permanece incerto se a HbA1c reflete os processos relevantes ao dano vascular em resposta a glicação, ou alguma combinação dessas possibilidades. Em pessoas sem DM a HbA1c foi fortemente associada com o risco cardiovascular, enquanto que os níveis de GJ e TOTG foram modestamente associados (Khaw, 2006).

Outro estudo recente observa que a HbA1c é um marcador de risco cardiovascular em pacientes sem diabetes e sugere a reclassificação de risco para doença coronariana, com a inclusão da HbA1c em modelos ajustados. A HbA1c parece ser superior a GJ na estratificação de risco macrovascular, especialmente em valores acima de 6,0% (Selvin E, 2010). Um estudo anterior já havia demonstrado associações da HbA1c com DCV e acidente vascular cerebral em um subgrupo da população *Atherosclerosis Risk in Communities* (ARIC), com DM e níveis baixos de GJ e HbA1c (Selvin E, 2004).

A hiperglicemia crônica ou intermitente tem sido identificada na patogênese da lesão endotelial do DM (Thomas, 2002) e, em particular, no DM tipo 1, a disfunção endotelial tem

sido demonstrada mesmo quando a normoglicemia é alcançada (Huvers, 1999). Em adição, foi relatado que o estresse oxidativo também tem papel na patogênese das complicações do DM (Brownlee M, 2001).

Vários mecanismos podem mediar estes efeitos deletérios da hiperglicemia nos tecidos, incluindo ativação de fatores de transcrição e formação de produtos da glicação avançados (AGEs) (Brownlee M, 2005). O processo de glicação não-enzimática de proteínas tem um importante papel na patogênese das complicações crônicas no DM. Tradicionalmente, os fatores envolvidos na modulação da glicação precoce de proteínas, são a concentração prevalente de glicose e o tempo de meia vida da proteína. No entanto, há evidências de aumento de proteínas glicada em alguns estados não-diabéticos, como em doença renal crônica, síndrome nefrótica e anemia (Cechim, 1987; Chowdhury TA, 1998; Coban, 2004).

A hiperglicemia e/ou a resistência à insulina podem levar ao estresse oxidativo e a superprodução de superóxido, ativando vias bioquímicas que levam às complicações micro e macrovasculares do DM (Brownlee, 2001; Barbosa, 2008). O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade antioxidante endógena (Yoshihiro, 2003; Ceriello, 2000; Maritim AC, 2003). O seu papel como determinante principal do início e da progressão das complicações cardiovasculares associadas ao DM tem sido alvo de grande interesse. O DM é usualmente acompanhado pelo aumento da produção de radicais livres ou diminuição das defesas antioxidantes (Halliwell, 1989).

Os mecanismos pelos quais o aumento do estresse oxidativo está envolvido nas complicações diabéticas não são totalmente elucidados. Alguns mecanismos bioquímicos têm sido propostos para explicar as anormalidades estruturais e funcionais, associadas com a exposição prolongada dos tecidos vasculares à hiperglicemia, com indícios de que a capacidade antioxidante endógena esteja prejudicada nos indivíduos diabéticos, dificultando a remoção dos radicais livres (Halliwell, 1989).

As modificações não enzimáticas de proteínas são normalmente relatadas em tecidos com baixo "turnover" e são consideradas como possível mecanismo comum envolvendo a progressão de muitas doenças. Entre os processos não-enzimáticos, o estresse oxidativo e glicação de proteínas tem causado um particular interesse (Selvaraj N, 2006; Lapolla, 2004).

HbA1c e Doença cardiovascular

Historicamente, a medida da HbA1c era recomendada apenas para a determinação do controle da glicose em indivíduos que já haviam recebido o diagnóstico de diabetes. Recentemente, novas recomendações clínicas defendem o uso de HbA1c no diagnóstico de

diabetes, em grande parte com base na sua associação com a doença micro e macrovascular (ADA, 2011; Kuller, 1995).

Estudos relacionaram os níveis de HbA1c e risco cardiovascular tanto em pacientes com DM, como em indivíduos normoglicêmicos. A coorte de Norfolk apresentou um aumento do risco de doença macrovascular com o aumento dos níveis de HbA1c em pacientes normoglicêmicos (Khaw KT, 2001; Khaw KT, 2004). O impacto da HbA1c na DCV em indivíduos diabéticos foi também avaliado em uma meta-análise, descrita anteriormente (Selvin E, 2004).

O estudo prospectivo de *Reykjavik* analisou dados de pacientes sem DM, seguidos por 24 anos, e encontrou que para cada 18mg/dL de aumento na glicose pós prandial havia 3% a mais de chance de desenvolver um evento coronariano. A relação entre glicose de jejum normal e evento cardiovascular foi fraca. Este estudo concluiu que a cada aumento de 1 ponto na HbA1c, a chance de apresentar um evento coronariano aumentou em 20% (Sarwar N, 2010).

Recentemente, no estudo *Atherosclerosis Risk in Communities* (ARIC) os níveis elevados de HbA1c foram associados com o risco aumentado de DCV e morte, por qualquer causa, em uma população de adultos não diabéticos. A hipótese de que a HbA1c é superior a GJ, como indicador de risco para o desenvolvimento de DM, DCV e morte, foi confirmada, com possíveis diferenças entre raça ou grupo étnico. Neste estudo, analisando pacientes sem história prévia de DM, o nível de HbA1c também se correlacionou com o risco de DCV. A partir de um ponto basal, onde a HbA1c se situava entre 5,0% e 5,4% e o risco era de 1, valores de HbA1c entre 5,5% -5,9% aumentaram o risco em 23%, níveis de HbA1c entre 6,0%-6,4% aumentaram em 78% e HbA1c >6,5% aumentou o risco de DCV em 95% (Selvin E, 2010).

O estudo caso-controle *INTERHEART* comparou os resultados de HbA1c de indivíduos com e sem infarto do miocárdio recente e, em concordância com outros estudos, para cada 1 ponto de aumento na HbA1c, a chance de ocorrer um infarto aumentou em 19% (Gerstein HC, 2010).

Outro estudo recente *LURIC*, relata que a associação da HbA1c com a mortalidade é independente da GJ. Sugerindo que a HbA1c é superior a GJ na predição de mortalidade (Selvin E, 2010). Além disso, foi relatado que a HbA1c, de forma significativa e independentemente da GJ, prevê todas as causas de mortalidade cardiovascular em indivíduos submetidos à angiografia coronariana (Silbernagel, 2011).

Uma recente meta-análise relata que a HbA1c, mesmo em pessoas sem diabetes, pode ser um indicador de alterações metabólicas que podem evoluir para eventos cardiovasculares (Santos, 2011).

HbA1c e Dislipidemia

Estudos mostraram que a HbA1C reflete o processo aterosclerótico e está fortemente relacionada à lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a outros fatores de risco cardiovascular (Harris, 1998; Saydah, 2001). As melhorias no controle glicêmico podem retardar a progressão da aterosclerose em indivíduos com DM tipo 1 (Klein R, 1995) e DM tipo 2 (Laakso M, 1999).

Têm sido proposto que a glicação e oxidação de lipídios e proteínas, podem contribuir para o desenvolvimento da aterosclerose em indivíduos com DM, através da formação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) (Quimones, 2004). Estudos em indivíduos não-diabéticos também mostraram correlações semelhantes entre lipídios e HbA1c (Garg A & Grundy SM, 1990).

A glicação das lipoproteínas, prolonga a meia-vida do LDL, facilitando sua oxidação e aumentando seu poder de agressão ao endotélio, além de aumentar a formação dos AGEs, que promovem a disfunção endotelial generalizada (Laakso M, 1999).

In vivo, a formação dos produtos de Amadori podem ocorrer em um período de dias e, uma vez formados, são praticamente irreversíveis. Os produtos de Amadori gerados dão origem aos produtos de glicação avançada (AGEs, do inglês, *Advanced Glycation End-products*) (Bierhaus A, 1998).

Peroxidação lipídica

Há associação entre os níveis plasmáticos elevados de LDL oxidado (LDL (oxi)) e DCV, clinicamente expressa ou estável, e síndrome coronariana aguda (Holvoet, 1998).

O aumento da tendência do LDL submeter à peroxidação lipídica, em pacientes diabéticos, contribui para aumento dos níveis de HbA1c no sangue, principalmente naqueles com HbA1c <7,3 (Hussein, 2007).

Evidências na literatura sugerem que os produtos da peroxidação lipídica podem promover a glicação (Jain & Palmer, 1997; Selvaraj N, 2006). Entretanto, tem sido demonstrado um aumento da glicação não enzimática de proteínas em muitos estados não diabéticos (Cechim, 1987; Chowdhury TA, 1998).

A peroxidação lipídica pode contribuir para a glicação da hemoglobina em pacientes não-diabéticos e portadores de insuficiência renal crônica. Além disso, há uma diminuição dos níveis de HbA1c em eritrócitos quando incubados na presença de glicose com ácido lipolítico e o aminoácido taurino, de reconhecida capacidade antioxidante (Selvaraj N, 2006). O mesmo efeito, foi observado em outro estudo utilizando ácido lipolítico na prevenção da glicação da albumina sérica bovina (Kawabata T, 1994).

Tem sido proposto, que a peroxidação lipídica, com conseqüente aumento nos níveis de malondialdeído (MDA), é um dos prováveis mecanismos para o aumento da glicação da

hemoglobina em pacientes normoglicêmicos (Sathiyapriya V, 2006; Selvaraj N, 2006; Babu NP, 2006; Kawabata T, 1994; Jain & Palmer, 1997).

O MDA é gerado tanto pela oxidação lipídica como por produtos da síntese da prostaglandina e tromboxano. A sua concentração plasmática está aumentada no DM e é encontrado depositado em placas ateroscleróticas. A oxidação dos complexos lipídicos, *in vivo*, é largamente causada por radicais livres derivados do oxigênio (ERO). O maior alvo destas espécies são as longas cadeias de ácidos graxos polissaturados dos fosfolípidos celulares. O produto resultante desta peroxidação, frequentemente se decompõe em um radical que reage com a maioria das moléculas biológicas, incluindo proteínas e lipídios. O MDA é eliminado da circulação pelo fígado, através das enzimas aldeído desidrogenase e tioquinase. Em condições normais, a oxidação lipídica é controlada pela concentração adequada de antioxidantes (Slatter, 2000).

Em adição, o MDA também pode modificar a Apo B do LDL, o qual deixa de reagir com seus receptores nas células hepáticas, sendo reconhecido pelos receptores *scavenger* nos macrófagos. A reação entre MDA e LDL é altamente importante na aterosclerose (Slatter, 2000; Jain & Palmer, 1997; Viigimaa M, 2010).

Além disso, foi demonstrada uma significativa associação entre HbA1c e diferentes marcadores da peroxidação lipídica (Inouye 1999). O N-carboximetil lisina (CML) foi identificado como o maior epítipo dos AGEs, que é formado a partir de ácidos graxos polinsaturados durante a reação de peroxidação (Fu MX, 1996).

Os CMLs encontrados em placas ateroscleróticas de pacientes normoglicêmicos, provavelmente devem ser derivados da peroxidação de lipoproteínas e não da glicose. Um estudo demonstrou que os níveis de CML correspondem aos níveis de MDA no LDL, sugerindo que os produtos da glicoxidação e da lipoxidação podem ser formados, tanto a partir de proteínas como de lipídios (Requena JR, 1996).

O mecanismo pelo qual o MDA aumenta a formação da HbA1c ainda não foi bem estabelecido. O MDA reagiria com a lisina (Figura 2), formando N-β-lisilamino-acrolina (β-LAA). O produto resultante reagiria com o grupo aldeído das moléculas de açúcar, formando uma ponte entre a hemoglobina e glicose, o que aceleraria o processo de glicação (Jain & Palmer, 1997).

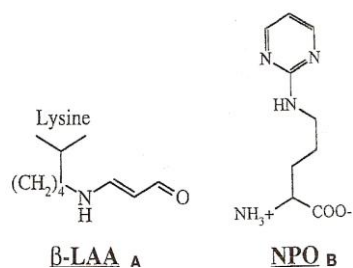


Figura 2: Produtos de reação do MDA com lisina (A) e arginina (B).

Peroxidação Lipídica e Aterosclerose

A DCV é a principal causa de morbidade e mortalidade nos países ocidentais, do mesmo modo, no Brasil, é responsável por 25% dos óbitos, vitimando 250.000 pessoas por ano. Números dos Estados Unidos da América demonstram que a aterosclerose é o principal fator de risco para acidente vascular cerebral e, esta, é a terceira maior causa de morte no país. Por ser uma doença de grande importância e prevalência mundial, a aterosclerose tem sido exaustivamente investigada e tem sua patogênese altamente ligada à condição de estresse oxidativo (Murray, 1997; Chambless, 2000; Nagai, 2001).

O processo da aterosclerose está relacionado a uma resposta inflamatória crônica da parede arterial, iniciada por uma lesão no endotélio, cuja progressão é mantida pela interação entre as lipoproteínas modificadas, macrófagos derivados de monócitos, linfócitos T e constituintes celulares normais da parede arterial (Esterbauer, 1992).

A hipótese da resposta à injúria considera que a lesão vascular é o evento inicial da aterosclerose. Em contrapartida, a teoria da resposta à retenção, afirma que a interação entre as lipoproteínas e a matriz é o ponto crítico da aterosclerose, enquanto que a hipótese da modificação oxidativa ressalta a importância da oxidação do LDL como o principal fator desencadeante da doença (Chang, 1997; Hevonoja, 2000).

No final de século XIX os efeitos tóxicos do oxigênio sobre os componentes biológicos já eram conhecidos, e nos últimos anos tem-se tornado objeto de intensa investigação científica (Halliwell, 2000). Estes efeitos são resultantes da oxidação de componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídios (ácidos graxos poliinsaturados (AGPI)), mediada por espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), conhecidas genericamente como radicais livres (RL) (Giller, 1995; Romero, 1998). A reação destas espécies com os AGPI, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), que pode ser avaliado e utilizado como um indicador celular de estresse oxidativo. A peroxidação de lipídios é definida como “a deterioração oxidativa de lipídios poliinsaturados”. AGPI são aqueles que contêm duas ou mais duplas ligações carbono-carbono, devido a isso, são excelentes alvos para o ataque de radicais livres (Halliwell, 1999).

A oxidação das lipoproteínas causa modificação da estrutura lipídica e protéica, levando à peroxidação lipídica e à oxidação de resíduos de aminoácidos, provocando alterações em suas propriedades físico-químicas (Chang, 1997; Hevonoja, 2000). A avaliação da oxidação das lipoproteínas pode ser realizada pela mensuração:

1) Produtos derivados da peroxidação lipídica:

Dentre os produtos derivados da peroxidação lipídica, os mais estudados são: isoprostanos, hidroperóxidos lipídicos, aldeídos (malondialdeído (MDA)), fosfolípidos oxidados e aqueles produzidos durante os processos bioquímicos de oxidação do colesterol. Esses produtos derivados da oxidação de ácidos graxos insaturados e do colesterol podem ser mensurados pela avaliação da lipoperoxidação que ocorre em tecidos, fluídos biológicos e lipoproteínas (Chang, 1997; Hevonoja, 2000; Lima, 2001).

2) Oxidabilidade das lipoproteínas *in vitro*:

A suscetibilidade das partículas de LDL à oxidação pode ser avaliada *in vitro*, após a indução da peroxidação lipídica pelos íons cobre. O cobre, na forma de CuSO₄, é amplamente utilizado e inicia as etapas de peroxidação lipídica por meio da redução dos hidroperóxidos lipídicos pré-formados nos ácidos graxos presentes na lipoproteína, gerando radical alcóxila (Miyazawa, 1994). Entretanto, é uma técnica espectrofotométrica que não reflete a extensão da oxidação do LDL que ocorre *in vivo* e requer o isolamento prévio do LDL do plasma por meio da técnica de ultracentrifugação (Miyazawa, 1994).

a) LDL minimamente oxidado ou LDL eletronegativo (LDL(-)): O LDL(-) surge das modificações do LDL via oxidação não enzimática (aldeídos, cobre, peroxinitrito) ou via lipoxigenases e peroxidases que aumentam a carga negativa das partículas de LDL. Devido às diferenças de carga, o LDL plasmático pode ser separado por cromatografia de troca iônica em duas frações (Toshima, 2000).

O LDL (-) é encontrado predominantemente nas frações mais densas do LDL e apresenta maior conteúdo de hidroperóxidos lipídicos, óxidos de colesterol, lisofosfatidilcolina, dienos conjugados, aldeídos e ácidos graxos não-esterificados em comparação ao LDL nativo (n-LDL), além da diminuição dos antioxidantes lipossolúveis. A superfície do LDL (-) é mais polar do que o n-LDL e apresenta alteração da camada lipídica e da estrutura secundária da apolipoproteína B-100 (ApoB) (Fralely, 2006; Toshima, 2000).

Diversos estudos demonstram o aumento da proporção da LDL (-) no plasma de indivíduos com elevado risco cardiovascular, como os portadores de DM, além daqueles em hemodiálise ou com doença coronariana estabelecida e portadores de aterosclerose independentemente da fase aguda ou crônica (Sanchez-Quesada, 2004; Berliner, 1990; Oliveira, 2006). Estes dados indicam que o LDL (-) pode ser considerado um importante biomarcador para DCV.

Mecanismos de formação do LDL oxidado (LDL (oxi))

Existem evidências do importante papel da lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL (oxi)) na etiologia da aterosclerose (Steinberg, 1989; Witztum, 1991). A teoria oxidativa diz que os lipídios circulantes, principalmente o LDL, podem penetrar no endotélio das artérias e sofrer modificações oxidativas por produtos metabólicos, EROs e enzimas produzidas pelas células vasculares, processo este catalisado pela presença de metais de transição, como ferro e cobre (Morel, 1984; Heineck, 1984). Essa modificação oxidativa do LDL parece ocorrer em duas fases e acontece na íntima do vaso.

Na primeira fase, ou fase inflamatória, os lipídios do LDL sofrem oxidação, sem que ocorram grandes modificações na apolipoproteína B, o que resulta na formação do LDL minimamente oxidado (LDL-ox min). Nesta fase, o LDL-ox min contribui para o estado inflamatório da parede vascular, pois pode recrutar monócitos circulantes através do aumento da expressão de glicoproteínas de adesão na superfície celular. Os monócitos aderem-se à superfície vascular, e outras moléculas específicas podem atraí-los para o espaço subendotelial, onde se diferenciam em macrófagos (Berliner, 1995; Goldman, 2005).

Na camada íntima do vaso, as partículas de LDL-ox min podem sofrer intensa oxidação por ERO e enzimas produzidas pelos macrófagos, como a mieloperoxidase e a lipoxigenase, transformando-as em LDL altamente oxidado (LDL(oxi)), caracterizando, assim, a segunda fase da modificação oxidativa do LDL (Lusis, 2000) (Figura 3). Nesta fase, surgem produtos de decomposição lipídica, os quais podem reagir com resíduos de lisina da Apo B, modificando e tornando o LDL mais eletronegativo. O LDL(oxi) passa a ser reconhecido pelos receptores do tipo *scavenger* dos macrófagos, que não são regulados pelo conteúdo celular de colesterol (Sparrow, 1989; Brown, 1990). Ocorre captação indiscriminada de LDL (oxi) e acúmulo maciço de colesterol nos macrófagos, formando assim, as chamadas células espumosas (Leake, 1991). Após essa fase inicial, são desenvolvidas as estrias gordurosas, que se caracterizam pelo acúmulo de células espumosas e lipídeos extracelulares, levando à inflamação e espessamento da parede arterial (Tsimikas, 2000).

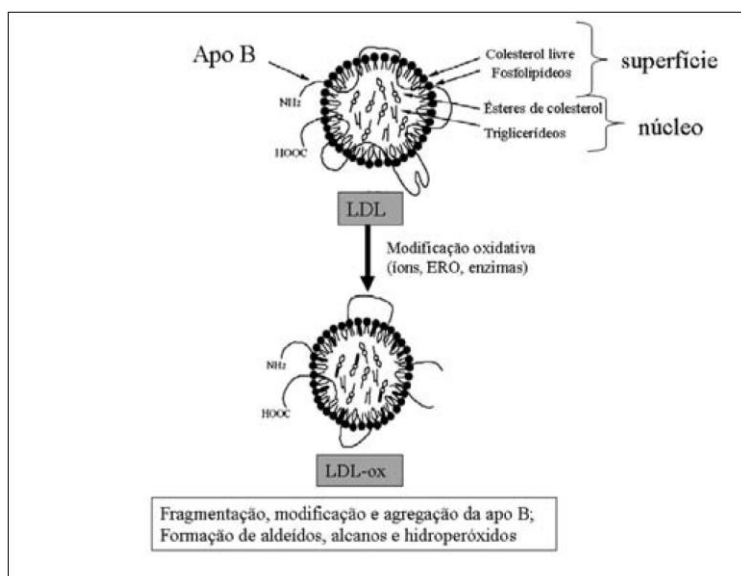


Figura 3: O dano oxidativo afeta os componentes lipídicos e protéicos da LDL. Adaptado por Yamaguchi 2002.

O receptor de LDL descoberto por Goldstein e Brown tem um papel central no metabolismo sistêmico e celular do colesterol (Goldstein & Brown, 1976). É importante o reconhecimento do LDL modificado por receptores específicos. Receptores *scavenger* são um conjunto de receptores que se ligam ao LDL(oxi), mas não as partículas de LDL nativa. Macrófagos e outras células, como células de Kupffer, expressam alguns dos receptores *scavenger*, como o SR-A, o primeiro a ser identificado e CD36. Hoje é evidenciado que outros tipos celulares, como as células endoteliais, também possuem receptores *scavenger* (Greaves, 2005; Steinbrecher, 1999; Terpstra, 2000). O LDL(oxi) é removido do meio por endocitose, processo que faz parte da auto-defesa, no entanto, acaba ocasionando acúmulo de enormes quantidades de lipídios no interior dos macrófagos.

O aumento no plasma de LDL(oxi) ocorre concomitante com a regressão de lesões ateroscleróticas (Tsimikas, 2007), sugerindo que LDL(oxi) pode ser transferido entre a parede do vaso e a circulação. Outros autores relatam que há possibilidades do LDL(oxi) ser gerado em tecidos extra-arteriais (Itabe & Ueda, 2007).

Estudos recentes têm sugerido que as concentrações plasmáticas de LDL(oxi) poderão mudar sob condições pré e pós-patológicas. LDL(oxi) pode ser transferido entre os tecidos e plasma e não se limita ao acúmulo nas lesões, sendo equilibrado entre os tecidos e circulação. LDL(oxi) pode ser formado em vários locais, além dos tecidos da parede do vaso. O fígado é o órgão principal para o *clearance* de LDL(oxi) da circulação (Tsimikas, 2007).

Além de contribuir significativamente para o surgimento das células espumosas, o LDL(oxi) possui várias outras atividades pró-aterogênicas, dentre elas: formação de intermediários e produtos finais da reação de oxidação que são citotóxicos para células da

parede vascular; induz e perpetua o estado inflamatório no local de seu acúmulo; favorece a secreção de interleucina-1 pelos monócitos, o que aumenta a proliferação de células musculares lisas na lesão. Somando-se a estes efeitos, há o aumento na disfunção endotelial, a indução da agregação plaquetária, a formação de trombos e a desestabilização das placas ateromatosas, por mecanismos que incluem a expressão de metaloproteínases, todos promovidos pelo LDL(oxi) (Quinn, 1987; Rajavashisth, 1990; Thomas, 1993; Xavier, 2004).

Valendo-se desta reação facilmente induzida pela presença de metais, é possível quantificar e qualificar a cinética da modificação oxidativa do LDL, bem como dosar os produtos formados no processo de lipoperoxidação, como o MDA e outros, os quais podem ser utilizados como marcadores do estado oxidativo do LDL. Deste modo, é possível sugerir o uso do LDL(oxi) como um dado adicional para a avaliação do risco de aterosclerose e DCV (Ku, 1992).

Foram encontrados níveis de LDL (oxi) aumentados no plasma de pacientes com diversas patologias, incluindo DCV (Naruko, 2006), infarto cerebral (Uno, 2003), hemodiálise e em casos de insuficiência renal crônica. Estas evidências sugerem fortemente o envolvimento do LDL (oxi) *in vivo*, na aterosclerose e indica que os níveis de LDL(oxi) podem aumentar em pacientes com sintomas de aterosclerose (Holvoet, 1996; Ando, 1999). Nas últimas três décadas vários estudos, estabeleceram que o LDL (oxi) é um marcador útil para DCV (Ishigaki, 2009; Witztum & Steinberg, 1991).

No estudo *MIRACL*, pacientes com angina instável ou infarto agudo do miocárdio foram tratados com atorvastatina. O tratamento diminuiu o colesterol total e ApoB, mas aumentou os níveis de LDL(oxi). Estas observações sugerem a possibilidade de que o LDL(oxi) pode translocar-se entre lesões ateroscleróticas e circulação (Tsimikas, 2004).

MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO DA LDL

Dosagem de produtos da peroxidação lipídica

Estes marcadores são amplamente usados na determinação do estresse oxidativo através da avaliação da peroxidação lipídica, baseando-se na determinação da concentração dos produtos mais estáveis resultantes desta reação (Dotan, 2004) (Figura 4).

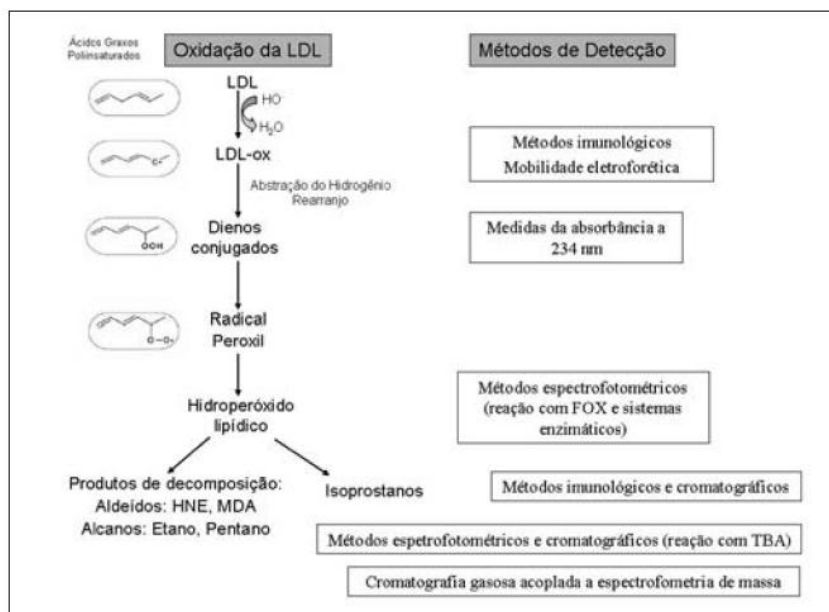


Figura 4: Modificação oxidativa dos componentes lipídicos do LDL e métodos para avaliação do dano oxidativo (Dotan, 2004).

1) Dosagem de hidroperóxidos lipídicos: Dentre os vários produtos de degradação e decomposição resultantes da reação de oxidação do LDL, os primeiros a se formarem são os hidroperóxidos lipídicos e sua dosagem, pode ser feita para aferir o estado oxidativo do LDL. (Dotan, 2004) pode ser aferido usando técnicas espectrofotométricas (Wolff, 1994).

2) Dosagem de malondialdeído (MDA): O MDA é o marcador mais amplamente utilizado atualmente para determinar peroxidação lipídica (Chauhan, 2004) e o método para sua dosagem geralmente baseia-se na reação clássica com o ácido tiobarbitúrico (TBA). A técnica espectrofotométrica é a mais empregada para determinar a concentração de MDA em amostras biológicas (Bird, 1994; Suttner 1997).

3) Dosagem de F₂-Isoprostanos: F₂-Isoprostanos são produtos da oxidação do ácido araquidônico, atualmente este método é considerado específico para determinar a peroxidação lipídica (Meagher, 2000). Os F₂-Isoprostanos podem ser quantificados utilizando extração de fase sólida e Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa (CG-EM) (Mori, 1999).

4) Métodos imunológicos para a determinação do LDL (oxi): Uma das propriedades que diferenciam o LDL nativo do LDL(oxi) é a sua capacidade imunogênica. O LDL(oxi) possui um papel imunogênico no processo da aterosclerose, pois é considerado um autoantígeno formado na lesão aterosclerótica (Hansson, 2002). A partir da constatação de que há

presença de anticorpos IgM e IgG específicos para LDL(oxi), tanto no sangue como em lesões ateroscleróticas, foi possível desenvolver métodos imunológicos para verificar a presença de LDL(oxi) e quantificá-lo (Palinski, 1989; Salonen, 1992). Estes métodos vêm sendo muito utilizados em estudos científicos que visam avaliar diretamente a oxidação do LDL *in vivo* (Belo, 2004; Shimada, 2004; Zaratini, 2002).

No presente momento, existem dois métodos básicos para a estimativa do LDL oxidado: imunoensaio monoclonal com anticorpos contra LDL carbonil-modificado e imunoensaios usando anticorpos monoclonais a fosfatidilcolina oxidada (Verhoye; 2009). O método de ELISA, do tipo sanduíche, utilizando anticorpos monoclonais para diferentes epítomos do LDL(oxi) humano são os mais empregados na prática laboratorial (Itabe, 1996; Kohno, 2000). Os imunoensaios são reprodutíveis, de fácil e rápida execução e podem ser automatizados facilitando a sua utilização para a análise de grande número de amostras. Existem *kits* comercialmente disponíveis de ELISA para a detecção de LDL (oxi). Entre as desvantagens está a diversidade dos anticorpos monoclonais e dos tipos de imunoensaios utilizados que torna difícil a comparação dos resultados entre os diferentes ensaios (Miyazawa, 1994, Kohno, 2000) (Figura 5).

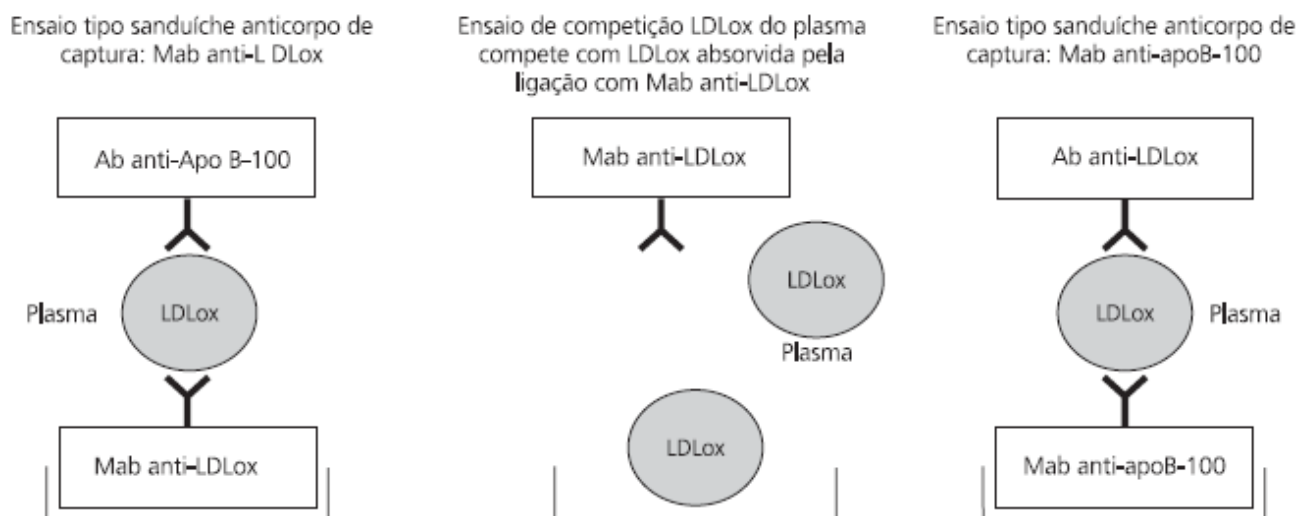


Figura 5: Principais tipos de ensaios ELISA para a determinação de LDL oxidada no plasma (Kohno, 2000).

5) Determinação de auto-anticorpos anti LDL(oxi): Os níveis de autoanticorpos fornecem uma evidência indireta da importância do LDL(oxi) na DCV e podem ser determinados por um procedimento de enzimaensaio (ELISA) (Abdalla, 2002; Yla-Herttuala, 1998).

Considerações Finais

Os pacientes com DM apresentam aumento do risco cardiovascular quando comparado a pacientes não-diabéticos. Estudos prospectivos demonstraram relação direta entre hiperglicemia crônica e as complicações micro e macrovasculares. Além da hiperglicemia, pacientes diabéticos apresentam quantidades e qualidades anormais de partículas lipoprotéicas. As alterações lipídicas mais frequentes na população diabética são a hipertrigliceridemia, baixas concentrações de lipoproteínas de alta densidade (HDL), formação de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) enriquecidas em colesterol e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) pequenas e densas. O LDL denso é mais freqüente na circulação, quanto mais elevados forem os níveis de triglicerídeos, sendo mais oxidado e aterogênico do que as demais partículas lipídicas.

Estudos recentes demonstram um novo fator que contribui para o aumento dos níveis sanguíneos de HbA1c, observado em pacientes diabéticos, que é a presença do LDL oxidado e o aumento da tendência do LDL à peroxidação lipídica.

Recentemente, nosso grupo estudou a associação dos marcadores bioquímicos do estresse oxidativo e níveis de HbA1c em indivíduos não-diabéticos e encontrou associação positiva entre um marcador da peroxidação lipídica (TBARS), indicando que pode existir uma relação entre LDL e HbA1c, independente da glicemia.

A elevação precoce dos níveis de HbA1c, em indivíduos normoglicêmicos, pode ser importante para o rastreamento de indivíduos com risco aumentado de desenvolver DCV e que poderiam se beneficiar de intervenções terapêuticas precoces, evitando efeitos deletérios. Embora estes indivíduos apresentem níveis glicêmicos adequados, possuem um aumento da glicação e da oxidação de proteínas e lipídios, o que poderia contribuir para a patogênese das complicações diabéticas e para a disfunção endotelial, estando associada à doença macrovascular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdalla DSP, Damasceno NRT, Apolinário E, Oliveira JM, Fernandes I. Biomarcador da modificação oxidativa da LDL in vivo. *Rev Bras Anal Clin* 2002; 3:115-120.

Ahmed N. Advanced glycation end-products: role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; 67(1):3-21.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011;32 (Suppl 1):S62–S67.

Babu N.P, Bobby Z. Selvaraj N. Harish BN. Increased fructosamine in non-diabetic rheumatoid arthritis patients: role of lipid peroxides and glutathione. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44:848 -852.

Barbosa JHP, Oliveira SL, Seara LT. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008;52(6);940-6.

Barlassina D, Sarzi-Puttini C, Turiel PM. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev* 2010; 9:830–834.

Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* 2002; 287: 2570–81.

Belo L, Caslake M, Santos-Silva A, Castro EMB, Pereira-Leite L, Quintanilha A, Rebelo I. LDL size, total antioxidant status and oxidized LDL in normal human pregnancy: a longitudinal study. *Atherosclerosis* 2004; 177:391-399.

Berliner JA, Navab M, Fogelman AM et al. Atherosclerosis: Basic Mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995; 91:2488-2496.

Bierhaus A, Hofman M.A, Ziegler R, Nauroth P.P. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiov Res* 1998; 37(3):586-600.

Bird RP, Draper HH. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods Enzymol* 1984; 105:299-305.

Brown MS, Goldstein JL. Scavenging for receptors. *Nature* 1990; 343: 508-509.

Brownlee M. The pathobiology of diabetes complications: a unifying Mechanism. *Diabetes* 2005; 54:1615-1625.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.

Camargo JL, Stiff J, et al. The effect of aspirin and vitamins C and E on HbA1c assays. *Clin Chim Acta* 2006; 372(1-2): 206-209.

Camargo JL, Felisberto M, Gross JL: Effect of pre-analytical variables on glycohemoglobin measurements in routine clinical care. *Clin Biochem*; 2004:37:836-839.

Cecchin E, De Marchi S, Panarello G, De Angelis V. Rheological abnormalities of erythrocyte deformability and increased glycosylation of hemoglobin in nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 1987; 7:18-21.

Chambless LE, Folsom AR, Clegg LX et al. Carotid wall thickness is predictive of incident clinical stroke: the Atherosclerotic Risk in Communities (ARIC) study. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 478-487.

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

Chauhan A, Chauhan V, Brown WT, Cohen, I. Oxidative stress in autism: Increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin-the antioxidant proteins. *Life Sciences* 2004; 75:2539-2549.

Chowdhury TA, Lasker SS. Elevated glycosylated hemoglobin in non diabetic patients is associated with an increased mortality in myocardial infarction. *Postgrad Med J* 1998; 74: 480-481.

Coban E, Ozdogan M, Timuragaoglu A. Effect of iron deficiency anemia on the levels of hemoglobin A1C in nondiabetic patients. *Acta Haematol* 2004; 112: 126-128

Colwell JA, Nesto RW. The platelet in diabetes: focus on prevention of ischemic events. *Diabetes Care* 2003; 26:2181–2188.

Colwell JA, Winocour PD, Lopes-Virella M, Halushka PV New concepts about the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Am J Med* 1983;75:67–80.

DCCT - The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-

dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329:977-86.

Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2004; 43: 200-227.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biol Med.* 1992; 13(4):341-90.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira* 1997; v. 43, p. 61-68.

Fraleay AE, Tsimikas S. Clinical applications of circulating oxidized low-density lipoprotein biomarkers in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 2006; 17(5):502-9.

Fu, M X, JR Requena, *et al.* The advanced glycation end product, N-(epsilon)(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271(17): 9982-9986.

Garg A, Grundy SM. Management of dyslipidemia in NIDDM. *Diabetes Care* 1990;13:153-69.

Giller G, Singler K. Oxidative stress and living cells. *Folia. Microbio* 1995;40:131-152.

Goldman L, Ausielo D. *Cecil Tratado de Medicina Interna.* 22 ed. Amsterdam: Elsevier, 2005.

Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, Malone JI, Nathan DM, *et al.* Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 2003;26 (Suppl 1): S106–8.

Greaves DR and Gordon S, Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. *Journal of Lipid Research* 2005; 46:11–20.

Gerstein HC, Islam S, Anand S *et al.* Dysglycemia and the risk of acute myocardial infarction in multiple ethnic groups: an analysis of 15,780 patients from the INTERHEART study. *Diabetologia.* 2010 Dec;53 (12):2509-17. Epub 2010 Aug 14.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radical in Biology and Medicine.* 3rd ed. New York: Oxford Science Publications; 2006.

Halliwell, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward ? *Cardiovas. Res* 2000; 47:410-418.

Halliwell, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 2001; 18(9): 685-716.

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

Harris MI, Flegal KM, Cowie CC, Eberhardt MS, Goldstein DE, Little RR, et al. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Diabetes Care* 1998;21:518-24.

Harrison D, Griending KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003; 91:7A–11A.

Heineck JW, Rosen H, Chait A. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* 1984; 74: 1890-1894.

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

Holvoet P. Endothelial dysfunction, oxidation of lowdensity lipoprotein, and cardiovascular disease. *Ther Apheresis* 1999; 3:287–293.

Holvoet P, Donck J, Landeloos M et al. Correlation between oxidized low density lipoproteins and von Willebrand factor renal failure. *Thrombosis and Haemostasis* 1996; 76(5):663–669.

Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JEB. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care* 2006; 29(6):1420-32.

Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JEB. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care* 2006; 29(6):1420-32.

Hussein OA., Gefen Y, Zidan JM, Karochero E.Y., Luder AS, Assy NN, Srour ES, Aviram MY. LDL oxidation is associated with increased blood hemoglobin A1c levels in diabetic patients. *Clin Chim Acta* 2007;377:114-118.

Huvers FC, De Leeuw PW, Houben AJ, De Haan CH, Hamulyak K, Schouten H, et al. Endothelium-dependent vasodilatation, plasma markers of endothelial function, and adrenergic vasoconstrictor responses in type 1 diabetes under near-normoglycemic conditions. *Diabetes*. 1999;48(6):1300-7.

Inouya M, Mio T, Sumino K. Glycated hemoglobin and lipid peroxidation in erythrocytes of diabetic patients. *Metabolism* 1999; 48:205 - 209.

Inoguchi T, Yu HY, Imamura M, Kakimoto M, Kuroki T, Maruyama T, Nawata H. Altered gap junction activity in cardiovascular tissues of diabetes. *Med Electron Microsc* 2001;34:86–91.

Itabe H. Oxidative modification of LDL: its pathological role in atherosclerosis. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2009;37:4–11.

Itabe H, Yamamoto H, Imanaka T, *et al.* Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody. *J Lipid Res* 1996; 37:3745-3753.

Ishigaki Y, Oka Y, and Katagiri H. Circulating oxidized LDL: a biomarker and a pathogenic factor. *Current Opinion in Lipidology* 2009;20(5): 363–369.

Jain SK, McVie R, *et al.* Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of type 1 diabetic children. *Diabetes Care* 2000; 23(9): 1389-1394.

Jain SK and Palmer M. The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins. *Free Radic Biol Med* 1997; 22(4): 593-596.

Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham Study. *Circulation* 1979; 59:8-13.

Kawabata T, Packer L. α -Lipoate can protect against glycation of serum albumin, but not low density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203:99-104.

Keynes RG, Garthwate J. Nitric oxide and its role in ischemic brain injury. *Curr Mol Med*. 2004; 4:179-91.

Khaw KT, Wareham N. Glycated haemoglobin as a marker of cardiovascular risk. *Curr Opin Lipidol* 2006; 17: 637–43.

Klein R. Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Care* 1995;18(2):258-68.

Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM. Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002; 346:393–403.

Kohno H. Simple and practical sandwich-type enzyme immunoassay for human oxidatively modified low density lipoprotein using antioxidized phosphatidylcholine monoclonal antibody and antihuman apolipoprotein-B antibody. *Clin Biochem* 2000; 33: 243-253.

Ku G, Thomas CE, Akeson AL, Jackson RL. Induction of interleukin 1 beta expression from human peripheral blood monocyte-derived macrophages by 9-hydroxyoctadecadienoic acid. *J Biol Chem* 1992; 267:14183-14188.

Kuller LH, National Diabetes Data Group. Stroke and diabetes. In: *Diabetes in America*. Bethesda: National Institutes of Health/National Institute of Diabetes/Digestive and Kidney Diseases, 1995. p. 449-56.

Laakso M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes* 1999; 48:937-42.

Laakso M. Cardiovascular disease in type 2 diabetes from population to man to mechanisms: the Kelly West Award Lecture 2008. *Diabetes Care* 2010; 33:442– 449.

Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 2002;288:2709-16.

Lankin VZ, Tikhaze AK, Kapel'ko VI, Shepel'kova GS, Shumaev KB, Panasenko OM, Konovalova GG, Belenkov YuN. Mechanisms of oxidative modification of low density lipoproteins under conditions of oxidative and carbonyl stress. *Biochemistry* 2007 (Moscow);72:1081–1090.

Lankin V, Tikhaze A, Kumskova E, Konovalova G, Kotkina T, Yanushevskaya E, Vlasik T. Cholesterol-rich low density lipoproteins are also more oxidized. *Mol Cell Biochem* 2011; Sep; 355(1-2):187-91.

Leake DS. Effects of mildly oxidised low density lipoprotein on endothelial cell function. *Curr Opin Lipidol* 1991; 2:301-305.

Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2001; 37(3):293-303.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407:233.

Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV, L'Italien GJ, Pio JR, et al. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation* 2004;110:1245-50.

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

Miyazawa T, Fujimoto K, Suzuki T, Yasuda K. Determination of phospholipid hydroperoxides using luminol chemiluminescence: highperformance liquid chromatography. *Methods Enzymol.* 1994; 233(1):324-32.

Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, et al. Diabetes trends in the U.S.: 1990-1998. *Diabetes Care* 2000;23:1278–1283

Monnier VM. Intervention against the Maillard reaction *in vivo*. *Arch Biochem Biophys* 2003; 419(1):1-15.

Morel DM, Di Corletto PE, Chisholm GW. Endothelial and smooth muscle cells alter low-density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Atherosclerosis* 1984; 4:357-364.

Mori TA, Croft KD, Puddey IB, Beilin LJ. An improved method for the measurement of urinary and plasma F2-isoprostanes using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1999; 268:117-125.

Murray C, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: global burden of disease study. *Lancet* 1997; 349:1436-1442.

Nagai Y, Kitagawa K, Sakaguchi M et al. Significance of earlier carotid atherosclerosis for stroke subtypes. *Stroke* 2001; 32:1780-1785.

Naruko T, Ueda M, Ehara S et al., "Persistent high levels of plasma oxidized low-density lipoprotein after acute myocardial infarction predict stent restenosis," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2006;26(4):877–883.

Oliveira JA, Sevanian A, Rodrigues RJ, Apolinário E, Abdalla DSP. Minimally modified electronegative LDL and its autoantibodies in acute and chronic coronary syndromes. *Clin Biochem.* 2006; 39(7): 708-14.

Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:1372-1376.

Pistrosch F, Natali A, Hanefeld M. Is hyperglycemia a cardiovascular risk factor? *Diabetes Care*, 2011; May;34 Suppl 2:S128-31.

Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/ macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2995-2998.

Quinones MJ, Hernandez-Pampaloni M, Schelbert H, Bulnes- Enriquez I, Jimenez X, Hernandez G, et al. Coronary vasomotor abnormalities in insulin-resistant individuals. *Ann Int Med* 2004;140:700-8.

Rafael Bitzur, MD Diabetes and cardiovascular disease: when it comes to lipids, statins are all you need. *Diabetes Care*. 2011; May;34 Suppl 2:S380-2.

Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990; 344:254-257.

Requena JR et al. Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11 (Suppl 5):48-53.

Reusch JEB, Low Wang CC. Cardiovascular Disease in Diabetes: Where Does Glucose Fit In? *J Clin Endocrinol Metab*, 2011; 96(8):2367–2376.

Romer FJ, Bosch M, Romero F, Romero MJ, Marin B, Roma N, J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ. Health. Perspect* 1998;106:1229-1234.

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

Sanchez-Quesada JL, Benítez S, Ordonez-Llanos J. Electronegative low-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 2004;15(3):329-35.

Santos OR, Purdy C, Pereira SM, Anjos CLAM, Machado M, Einarson TR. Haemoglobin A1c levels and subsequent cardiovascular disease in persons without diabetes: a meta-analysis of prospective cohorts, *Diabetologia* 2011;54:1327–1334

Sarwar N, Aspelund T, Eiriksdottir G *et al*. Markers of dysglycaemia and risk of coronary heart disease in people without diabetes: Reykjavik prospective study and systematic review. *PLoS Med* 2010; 7:e1000278

Sathiyapriya V, Bobby Z, Vinod Kumar S, Selvaraj N, Parthibane V, Gupta S. Evidence for the role of lipid peroxides on glycation of hemoglobin and plasma proteins in non-diabetic asthma patients. *Clinica Chimica Acta* 2006; 366: 299-303.

Saydah SH, Miret M, Sung J, Varas C, Gause D, Brancati FL. Postchallenge hyperglycemia and mortality in a national sample of U.S. adults. *Diabetes Care* 2001;24:1397-402.

Selvaraj N *et al.* Effect of lipid peroxides and antioxidants on glycation of hemoglobin: An in vitro study on human erythrocytes. *Clin Chim Acta* 2006; 366 (1-2): 190-5.

Selvin E, Coresh J, Golden SH, Brancati FL, Folsom AR, Steffes MW. Glycemic control and coronary heart disease risk in persons with and without diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Arch Intern Med* 2005;165:1910-6.

Selvin E, Coresh J, Shahar E, Zhang L, Steffes M, Sharrett AR. Glycaemia (haemoglobin A1c) and incident ischaemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Lancet Neurol* 2005;4: 821-6.

Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, et al. Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann Int Méd* 2004;141(6):421-31.

Selvin E, Steffes MW, Zhu H, Matsushita K, Wagenknecht L, Pankow J et al. Glycated Hemoglobin, Diabetes, and Cardiovascular Risk in Nondiabetic Adults. *N Engl J Med*. 2010; 362(9): 800-11.

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

Silaste ML, Rantala M, Alfthan G *et al.*, "Changes in dietary fat intake alter plasma levels of oxidized, low-density lipoprotein and lipoprotein(a)," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2004;24(3):498–503.

Silbernagel G, Grammer TB, Winkelmann BR, Boehm BO, Marz W. Glycated Hemoglobin Predicts All-Cause, Cardiovascular, and Cancer Mortality in People Without a History of Diabetes Undergoing Coronary Angiography. *Diabetes Care* 2011;34:1355-1361.

Siqueira AFA, Franco LJ, Gimeno SGA, Matsumura LK, Barros Jr N, Ferreira SR, JBDSG. Macrovascular disease in a Japanese-Brazilian population of high prevalence of metabolic syndrome:

Associations with classical and non-classical risk factors. *Atherosclerosis*. 2007; Nov;195(1):160-6. Epub 2006 Oct 24.

Slatter, D. A., C. H. Bolton, et al. The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia* 2000; 43(5): 550-557.

Slatter DA, M Murray, *et al.* Formation of a dihydropyridine derivative as a potential cross-link derived from malondialdehyde in physiological systems. *Febs Letters* 1998; 421(3): 180-184.

Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D. A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1989; 264: 2599-2604.

Steinbrecher UP, "Receptors for oxidized low density lipoprotein," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1436, no. 3, pp. 279–298, 1999.

Steinberg D, The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. *J Lipid Res* 2009;50:S376–S381.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320: 915-924.

Suttar J, Cermak J, Dyr E. Solid-phase extraction in malondialdehyde analysis. *Anal Biochem* 1997; 249:20-23.

Terpstra V, van Amersfoort E, van Velzen SAG, Kuiper J, and van Berkel TJC. Hepatic and extrahepatic scavenger receptors function in relation to disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2000;20(8):1860– 1872.

The DECODE Study Group. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. *Lancet* 1999;354:617-21.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (DCCT): The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993;329:977-86.

The International Expert Committee 2009 International Expert Committee Report on the Role of the A1C Assay in the Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 2009;32:1327–1334.

Thomas E, Lin YS, Dagher Z *et al.* Hyperglycemia and insulin resistance: possible mechanism. *NY Acad Sci* 2002;967:43-8.

Thomas JP, Geiger PG, Girotti AW. Lethal damage to endothelial cells by oxidized low density lipoprotein: role of selenoperoxidases in cytoprotection against lipid hydroperoxide and iron-mediated reactions. *J Lipid Res* 1993; 34:479-490.

Toshima S, Hasegawa A, Kurabayashi M, Itabe H, Takano T, Sugano J, et al. Circulating oxidized low density lipoprotein levels: a biochemical risk marker for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20(10):2243-7.

Tsimikas S, Beyer RW, Patel R *et al*. Prospective evaluation of the role of oxidized LDL in acute coronary syndromes treated with percutaneous intervention. *Circulation*. 2000; 102: II-13.

Tsimikas S, Witztum JL, Miller ER *et al*. High-dose atorvastatin reduces total plasma levels of oxidized phospholipids and immune complexes present on apolipoprotein B-100 in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL trial. *Circulation* 2004;110:1406–1412.

Tsimikas S, Aikawa M, Miller FJ Jr, Miller ER, Torzewski M, Lentz SR, Bergmark C, Heistad DD, Libby P, Witztum JL. Increased plasma oxidized phospholipid:apolipoprotein B-100 ratio with concomitant depletion of oxidized phospholipids from atherosclerotic lesions after dietary lipid-lowering: a potential biomarker of early atherosclerosis regression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; Jan;27(1):175-81.

Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämmäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M. Finnish Diabetes Prevention Study Group. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 2001;344:1343–1350.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352:837-53.

Uno M, Kitazato KT, Nishi K, Itabe H, and Nagahiro S. Raised plasma oxidised LDL in acute cerebral infarction. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 2003;74(3):312–316.

Vannucchi, Moreira EAM, *et al*. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. *Medicina, Ribeirão Preto* 1998; 31: 31-44.

Verhoye E, Langlois MR. Circulating oxidized low-density lipoprotein: a biomarker of atherosclerosis and cardiovascular risk. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:128–137

Viigimaa M, Abina J, Zemtsovskaya G, Tikhaze A, Konovalova G, Kumskova E, Lankin V. Malondialdehyde-modified low-density lipoproteins as biomarker for atherosclerosis. *Blood Pressure* 2010;19:164–168

Wang CC, Goalstone ML, Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes* 2004;53:2735–2740

Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88:1785-1792.

Wolff SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzimol* 1994; 233:182-189.

World Health Organization. Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia: Report of a WHO/ IDF Consultation. Geneva, World Health Organization, 2006.

Xavier HT, Parra Abdalla DS, Rocha Martinez TS, Franchini Ramires JA, Toledo Gagliardi AR. Efeitos da lipoproteína LDL-oxidada sobre a proliferação e a motilidade espontânea in vitro de células endoteliais de artérias coronárias humanas. *Arq Bras Cardiol* 2004; 83:488-492.

Yla-Herttuala S. Is oxidized low-density lipoprotein present in vivo? *Cur Opin Lipidol* 1998;9: 337-344.

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

Zaratin A, Gidlund M, Boschcov P, Castilho L, de Faria EC. Antibodies Against Oxidized Low-Density Lipoprotein in Normolipidemic Smokers. *Am J Cardiol* 2002; 90:651-652.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi verificar a associação dos níveis de HbA1c com o colesterol LDL e colesterol LDL oxidado em indivíduos não diabéticos.

**Associação dos Níveis de HbA1c com Colesterol LDL e Colesterol LDL
Oxidado em Indivíduos Não- diabéticos**

Débora Spessatto¹

Liz Marina Bueno dos Passos Brum²

Gabriela Cavagnoli³

Joíza Lins Camargo⁴

Jorge Luiz Gross⁵

¹ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

² Farmacêutica Bioquímica da Fundação Universitária de Cardiologia de Porto Alegre, Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

³ Biomédica e Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

⁴ Professora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Chefe da Unidade de Bioquímica e Imunoensaio do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

⁵ Professor Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Médico Endocrinologista.

* Autor para Correspondência:

Joíza Lins Camargo
Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Rua Ramiro Barcellos, 2350; 2º andar, Porto Alegre, RS 90035-903, Brasil.
Fax: 51-33598310.
E-mail address: jcamargo@hcpa.ufrgs.br

Artigo Original

ARTIGO ORIGINAL

Associação dos Níveis de HbA1c com o Colesterol LDL e Colesterol LDL Oxidado em Indivíduos Não-diabéticos**RESUMO**

Introdução: O Diabetes mellitus (DM) está associado a complicações crônicas micro e macrovasculares. A medida da hemoglobina glicada (HbA1c) avalia o grau do controle glicêmico em pacientes diabéticos e seus níveis são capazes de prognosticar o risco de desenvolvimento dessas complicações. Entre as origens das complicações causadas pela hiperglicemia, há a hipótese dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) e do estresse oxidativo. A reação de glicação não enzimática das proteínas também está relacionada com as complicações diabéticas e é responsável pela formação da HbA1c. Entretanto, tem sido demonstrado um aumento dessa glicação em pacientes não diabéticos. Um dos prováveis mecanismos para esse aumento é a peroxidação lipídica, com conseqüente aumento nos níveis de malondialdeído (MDA) que modifica a apolipoproteína B (APO B) do colesterol de baixa densidade (LDL). A modificação oxidativa do LDL confere propriedades específicas pró-aterogênicas. A presença do LDL oxidado e o aumento da tendência do LDL à peroxidação lipídica, podem contribuir para o aumento dos níveis de HbA1c.

Objetivo: Verificar a associação entre os níveis de HbA1c com o Colesterol LDL e LDL oxidado em Indivíduos não-diabéticos.

Métodos: Foi realizado um estudo transversal observacional, no qual um total de 196 indivíduos, classificados como não-diabéticos, foram analisados e divididos em três grupos, conforme os valores de HbA1c e glicemia de jejum (GJ): Grupo 1 (n =64) - HbA1c <5,7% e GJ <100 mg/dL; Grupo 2 (n =69) - HbA1c ≥5,7 e ≤6,4% e GJ <100 mg/dL; Grupo 3 (n =63) - HbA1c ≥5,7 e ≤6,4% e GJ ≥100 e <126mg/dL. Amostras de sangue total e soro foram coletadas. O LDL oxidado foi medido por método imunoensaio enzimático (Mercodia ®), ApoB dosada por imunoturbidimetria, a relação Colesterol LDL(oxi)/Colesterol-HDL foi estimada, além das outras dosagens bioquímicas do perfil lipídico. Esses testes foram comparados e analisados entre os três diferentes grupos.

Resultados: Houve diferença significativa nos níveis de LDL(oxi) ($p < 0,001$), Apo B ($p = 0,026$) e razão LDL(oxi)/HDL ($p < 0,001$) entre os três grupos. Os valores de HbA1c apresentaram correlação positiva com os valores de LDL (oxi) ($r = 0,431$; $p < 0,001$), LDL ($r = 0,148$; $p = 0,039$), Col Não-HDL ($r = 0,192$; $p = 0,007$) e Apo B ($r = 0,171$; $p < 0,001$). Estas associações positivas permaneceram significativas, mesmo após ajuste, por análise de regressão linear múltipla para as variáveis álcool, medicamentos, índice de massa corporal (IMC) e idade. Também apresentaram correlações positivas com os valores de HbA1c: razão LDL (oxi)/HDL ($r = 0,422$; $p < 0,001$), CT ($r = 0,142$; $p = 0,048$), triglicerídios ($r = 0,155$; $p = 0,030$) e IMC ($r = 0,263$; $p < 0,001$).

Conclusão: Nosso estudo demonstrou associação dos níveis de HbA1c com as partículas lipídicas aterogênicas LDL, Apo B, colesterol não HDL e LDL (oxi). Os níveis de LDL, principalmente LDL (oxi), estão significativamente associados com os níveis de HbA1c e glicose, mesmo em indivíduos não-diabéticos. Os indivíduos classificados com alto risco de desenvolver DM ou DCV apresentam valores mais elevados de partículas de LDL oxidadas. Nossos dados sugerem que a presença de LDL (oxi) está relacionada com a glicação e ao aumento dos níveis sanguíneos de HbA1c em indivíduos não diabéticos.

Unitermos: *Diabetes mellitus, Hemoglobina glicada, Colesterol LDL, LDLoxidado.*

ORIGINAL ARTICLE

Association Between HbA1c Levels and the LDL Cholesterol and Oxidized LDL in Non-diabetic Subjects**ABSTRACT**

Background: Diabetes mellitus (DM) is associated with chronic microvascular and macrovascular complications. The measurement of glycated hemoglobin (HbA1c) assesses the degree of glycemic control in diabetics patients and their levels are able to predict the risk of developing these complications. The formation of advanced glycation and products (AGEs) and oxidative stress are some of the hypothesis described to explain the diabetic complications. The reaction of nonenzymatic glycation of proteins is also related to these complications and is responsible for the formation of HbA1c. However, it has been shown an increase in glycation in nondiabetic patients, which is maybe due to lipid peroxidation, consequently, the levels of malondialdehyde (MDA) increase and there is modifications in the apolipoprotein B (apoB) of low-density cholesterol (LDL). The oxidative modification of LDL confers specific proatherogenic properties. The presence of oxidized LDL and an increased tendency to LDL peroxidation contribute to increased levels of HbA1c in diabetic patients.

Objective: To investigate the association between HbA1c levels and the levels of LDL cholesterol and oxidized LDL in subjects without diabetes.

Methods: We conducted an observational cross-sectional study in which a total of 196 individuals, classified as non-diabetics, were analyzed and divided into three groups according to the values of HbA1c and fasting plasma glucose (FPG): Group 1 (n = 64) - HbA1c <5.7% and FPG <100 mg / dL, Group 2 (n = 69) - HbA1c \geq 5.7 and \leq 6.4% and FPG <100 mg / dL, Group 3 (n = 63) - HbA1c \geq 5.7 and \leq 6.4% and FPG \geq 100 and <126mg/dL. Samples of whole blood and serum were collected. Oxidized LDL was measured by enzyme immunoassay method (MercoDIA®), ApoB was measured by immunoturbidimetry and the ratio LDL cholesterol (oxi) / HDL-cholesterol was estimated. Other biochemical measurements of lipid profile were also carried out.

Results: There were significant differences in LDL (oxi) ($p < 0.001$), Apo B ($p = 0.026$), and ratio LDL (oxi) / HDL ($p < 0.001$) between the three groups. HbA1c values showed positive association with LDL (oxi) ($r = 0.431$, $p < 0.001$), LDL ($r = 0.148$, $p = 0.039$), non-HDL Col ($r = 0.192$, $p = 0.007$) and Apo B ($r = 0.171$, $p < 0.001$). These positive associations remained significant even after adjustment for multiple linear regression analysis for variables such as alcohol, drugs, BMI and age. The ratio LDL (oxi) / HDL ($r = 0.422$, $p < 0.001$), CT ($r = 0.142$, $p = 0.048$), triglycerides ($r = 0.155$, $p = 0.030$) and BMI ($r = 0.263$, $p < 0.001$) also showed positive correlations with HbA1c values.

Conclusions: Our study demonstrated that there is association between HbA1c levels and the atherogenic lipid particles LDL, Apo B, non-HDL cholesterol and LDL (oxi). LDL levels, especially LDL (oxi), are significantly associated with HbA1c and glucose levels, even in non-diabetics. Individuals classified with high risk of developing diabetes or CVD have higher levels of oxidized LDL particles. Our data suggest that the presence of LDL (oxi) is related to glycation and increased blood levels of HbA1c in nondiabetic individuals.

Keywords: *Diabetes mellitus; glycated hemoglobin; oxidized cholesterol LDL*

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) está associado a complicações crônicas microvasculares e macrovasculares (Scheffel R, 2004; WHO, 2006), as quais estão basicamente relacionadas à glicação não enzimática das proteínas (Brownlee M, 2005). Os níveis glicêmicos, associados à pressão arterial, e possivelmente a fatores genéticos, são considerados os principais fatores determinantes para o desenvolvimento e progressão destas complicações (DCCT, 1993; UKPDS, 1998).

A medida da hemoglobina glicada (HbA1c) é o parâmetro de referência para avaliar o controle glicêmico em pacientes com DM. Os níveis de HbA1c são capazes de prognosticar o risco de desenvolvimento das complicações crônicas do DM e refletir o nível de glicação de outras proteínas que são livremente expostas à glicose circulante (DCCT, 1993; UKPDS, 1998; Bennett CM, 2007; Sacks DB, 2011). A formação da HbA1c ocorre através de uma reação de glicação não enzimática entre o grupo aldeído livre da glicose ou de outros açúcares, e um grupo amino livre na molécula da hemoglobina (Hb). Os níveis de HbA1c são proporcionais aos níveis glicêmicos (Camargo JL, 2004).

Recentemente, a Associação Americana de Diabetes (ADA) mudou os critérios diagnósticos para o DM, adotando o ponto de corte de HbA1c $\geq 6,5\%$ como valor diagnóstico (ADA, 2011). Esta recomendação também foi referenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2011 (WHO, 2011). A nova classificação acrescenta uma categoria de indivíduos de alto risco, denominada pré-diabetes, com valores de HbA1c entre 5,7 e 6,4%. Os pacientes classificados como pré-diabéticos possuem risco aumentado para o desenvolvimento de DM e doenças cardiovasculares (DCV) e devem ser informados sobre estratégias eficazes para prevenção destas complicações, tais como perda de peso e atividades físicas (ADA, 2011).

Em adição, estudos também relacionaram os níveis de HbA1c e o risco cardiovascular, tanto em pacientes com DM, como em indivíduos normoglicêmicos. Há evidências de que existe um aumento do risco de doença macrovascular com o aumento dos níveis de HbA1c em pacientes normoglicêmicos (Khaw KT, 2004; Selvin E, 2004; Selvin E, 2010).

Também tem sido demonstrado um aumento da glicação não enzimática das proteínas *in vivo* em muitos estados não diabéticos. O papel da concentração da glicose como único determinante da reação de glicação não está claro, pois outros fatores parecem estar envolvidos nessas reações, independente dos níveis glicêmicos, em estados patológicos não relacionados ao DM (Sathiyapriya V, 2006).

Entre as origens das complicações causadas pela hiperglicemia, sugerem a hipótese de formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) e do estresse oxidativo

(Baynes JW, 1999; Brownee MS, 2005). Estudos demonstram o importante papel do estresse oxidativo na patogênese das complicações diabéticas e a sua relação entre dano, controle glicêmico, desordens do metabolismo lipídico e desordens hemostáticas. Um dos prováveis mecanismos para o aumento da glicação da hemoglobina em pacientes normoglicêmicos é a peroxidação lipídica, com conseqüente aumento nos níveis de malondialdeído (MDA) (Sathiyapriya V, 2006; Selvaraj N, 2005). A relação entre peroxidação lipídica e complicações macrovasculares no DM tipo 2 já havia sido relatada anteriormente (Velásquez E, 1991). O mecanismo pelo qual o MDA aumenta a formação da HbA1c ainda não está bem estabelecido. O MDA reagiria com a lisina, formando N- β -lisilamino-acroline (β -LAA). O produto resultante reagiria com o grupo aldeído das moléculas de açúcar, formando uma ponte entre a hemoglobina e glicose, o que aceleraria o processo de glicação (Jain, S. K. and M. Palmer, 1997). A concentração plasmática do MDA está aumentada no DM e é encontrado depositado em placas ateroscleróticas. O MDA também pode modificar a apolipoproteína B (Apo B), que é a principal apolipoproteína constituinte do colesterol de baixa densidade (LDL), o qual deixa de reagir com seus receptores nas células hepáticas, sendo então somente reconhecido pelos receptores *scavenger* nos macrófagos. A reação entre MDA e LDL é altamente importante na aterosclerose, pois leva à suscetibilidade do LDL à oxidação (Slatter DA, 2000; Viigimaa M, 2010; Itabe H, 2009; Itabe H, 2010).

Os pacientes diabéticos apresentam quantidades e qualidades anormais de partículas lipoprotéicas. As alterações lipídicas mais freqüentes são a hipertrigliceridemia, baixas concentrações de lipoproteínas de alta densidade (HDL), formação de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) enriquecidas em colesterol e LDL pequenas e densas. O LDL denso é mais freqüente na circulação, quanto mais elevados forem os níveis de triglicédeos, sendo mais oxidado e aterogênico do que as demais partículas lipídicas (Khaw K-T, 2004; Lankin V, 2011; Brunzell JD, 2008).

O estresse oxidativo induz inflamação e trombose, oxida o LDL, e está presente na aterogênese (Jawahar L, 2006). O efeito da oxidação do LDL no sangue aumenta com os níveis de HbA1c em pacientes diabéticos, isso pode explicar como a glicação da hemoglobina contribui para a doença macrovascular nestes pacientes, sugerindo que há uma relação entre a presença de LDL oxidado (LDL (oxi)) e os níveis sanguíneos de HbA1c, em pacientes diabéticos (Hussein OA, 2006).

O LDL (oxi) tem sido caracterizado como um fator decisivo no processo aterosclerótico, tanto em modelos animais como em humanos. A modificação oxidativa do LDL confere propriedades específicas pró-aterogênicas a esta molécula, a qual tem ação na célula endotelial, nos macrófagos, células musculares lisas e na formação da placa aterosclerótica (Chisolm GM, 2000; Hussein O A, 2006; Viigimaa M, 2010). Existem ainda

estudos que sugerem que há uma capacidade individual de glicação e oxidação de proteínas e lipoproteínas (Hempe M, 2002; Lapolla A, 2004).

Tem sido proposto que a peroxidação lipídica, com conseqüente aumento nos níveis de MDA, medido através da sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), é um dos prováveis mecanismos para o aumento da glicação da hemoglobina em pacientes normoglicêmicos (Sathiyapriya V, 2006; Selvaraj N, 2005). Esta peroxidação lipídica leva a oxidação das lipoproteínas, ocasionando a formação do LDL (oxi).

Recentemente, nosso grupo estudou a associação dos marcadores bioquímicos do estresse oxidativo e níveis de HbA1c em indivíduos não-diabéticos e encontrou associação positiva entre a peroxidação lipídica (MDA), medido pelo TBARS, e HbA1c, indicando que existe uma relação entre oxidação lipídica e HbA1c, independente da glicemia (Brum LMBP, 2010).

O objetivo deste estudo foi analisar a associação dos níveis de HbA1c com o colesterol LDL e colesterol LDL oxidado em indivíduos não diabéticos.

MATERIAS E MÉTODOS

Delineamento do estudo: Estudo transversal observacional.

Participantes: Os participantes deste estudo foram recrutados entre amigos, parentes e funcionários do Laboratório do Instituto de Cardiologia do Rio Grande Sul e Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, saudáveis e sem história prévia de DM, segundo os critérios diagnósticos da OMS e ADA (WHO, 2006; ADA, 2011), no período de junho de 2008 a janeiro de 2010. Os indivíduos que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Esclarecido, responderam a um questionário padronizado e coletaram amostras de sangue. Dados como idade, história familiar de DM, de DCV e hipertensão, fumo, consumo de álcool e uso de medicamentos, foram registrados. Os indivíduos também foram aferidos para peso, altura e o índice de massa corporal (IMC [kg.m²]) foi calculado. Indivíduos com anemia (Astor BC, 2002), creatinina $\geq 1,5$ mg/dL (Rule AD, 2004) e/ou presença de hemoglobina anômala (Camargo JL, 2004) foram excluídos. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Projeto GPPG:10-0161). Os indivíduos foram divididos em 3 grupos, conforme valores de HbA1c e glicemia de jejum (GJ) (ADA, 2011):

- a) Grupo 1 (n =64) - HbA1c <5,7% e GJ <100 mg/dL;
- b) Grupo 2 (n =69) - HbA1c $\geq 5,7$ e $\leq 6,4\%$ e GJ <100 mg/dL;
- c) Grupo 3 (n =63) - HbA1c $\geq 5,7$ e $\leq 6,4\%$ e GJ ≥ 100 e <126mg/dL.

Dosagens laboratoriais: As amostras de sangue venoso foram coletadas após jejum de 12h. Foram coletadas amostras de sangue total com EDTA para dosagens de HbA1c e hemograma. Para as demais dosagens laboratoriais foram coletadas amostras de soro, submetidas à centrifugação e imediatamente separadas. Para as dosagens não realizadas no mesmo dia da coleta, as amostras foram armazenadas a -80°C.

Dosagens de Hemograma: Os hemogramas completos foram realizados no equipamento ABX Pentra DX 120, em amostras de sangue total com EDTA.

Dosagem de HbA1c: As medidas de HbA1c foram realizadas por imunoturbidimetria utilizando o método COBAS[®] INTEGRA (HbA1c) (Roche Diagnostica). O método é padronizado pelo IFCC e alinhado ao NGSP/ DCCT (Hanas R, 2010). O CV analítico inter-ensaio foi de 4,5%. Os valores de referência para esta metodologia são de 4,0 a 6,0%.

Dosagens Bioquímicas: A avaliação adicional foi realizada no laboratório do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, segundo as técnicas de rotina. No soro foram dosados creatinina (método de Jaffe cinético), colesterol total (CT), colesterol HDL (HDL), triglicerídeos e glicose jejum (GJ) (métodos enzimáticos colorimétricos) no equipamento COBAS® INTEGRA. O colesterol LDL (LDL) foi calculado usando a fórmula de Friedewald (Friedewald WT, 1972) para pacientes com triglicerídeos <400mg/dL e o colesterol não HDL (Col não-HDL), uma medida das partículas aterogênicas presentes na circulação, foi calculado diminuindo os valores de HDL do CT (NCEP, 2002).

Dosagem da Apolipoproteína B (Apo B): Foi utilizada a técnica imunoturbidimétrica, no equipamento COBAS® INTEGRA (Roche Diagnostica). Os valores de referência para esta metodologia são de 55 a 140 mg/dL.

Dosagem do LDL oxidado (LDL(oxi)): O colesterol LDL (oxi) foi medido por ensaio imunoenzimático comercialmente disponível (ELISA, Mercodia®, Uppsala, Suécia). É um ensaio de fase sólida de dois sítios. Emprega a técnica de captura ou “sanduíche” direto no qual dois anticorpos monoclonais, marcados na microplaca, dirigidos contra determinantes antigênicos da molécula de Apo B oxidada. Durante a incubação, o LDL (oxi) presente na amostra reage frente aos anticorpos anti-LDL (oxi) marcados no poço. Após lavagem, os componentes que não reagiram são removidos e adiciona-se o conjugado peroxidase ligado ao anticorpo anti-Apo B que reconhece o LDL (oxi) ligado à fase sólida presente na amostra. Finalmente há outra lavagem que retira os não ligados e adiciona-se o substrato que detecta o conjugado ligado. Segundo informações do fornecedor, os valores esperados de LDL (oxi) em indivíduos aparentemente normais são de 26 a 117 U/L (Bula kit LDL (oxi) Mercodia®).

Relação LDL(oxi) / HDL: Esta relação foi descrita como um potencial biomarcador para a discriminação entre indivíduos com e sem DCV do que tradicionalmente as medidas de CT ou LDL (Johnston N, 2006). A relação foi calculada dividindo-se o valor obtido de LDL(oxi) pelo valor de HDL de cada participante do estudo.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão expressos como média e desvio padrão (DP) quando normalmente distribuídos, e como mediana (intervalo interquartil) para variáveis assimétricas, realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os indivíduos estudados foram divididos em três grupos, conforme valores de HbA1c e GJ, para a sumarização dos dados. Para comparação entre os grupos foi utilizado ANOVA e teste de Kruskal-Wallis, para variáveis paramétricas e não-paramétricas, respectivamente. As variáveis qualitativas (apresentadas em percentual do total da amostra) foram analisadas pelo teste qui-quadrado. As variáveis quantitativas sem distribuição normal foram log transformadas, sendo que, aquelas que não resultaram em variáveis simétricas foram trabalhadas com variáveis originais. A relação entre as variáveis contínuas foi feita através de correlação de Pearson ou Spearman, conforme a distribuição dos dados. Análise de regressão linear múltipla, foi realizada para analisar a associação entre HbA1c com LDL(oxi), Colesterol não-HDL e Apo B, ajustando para as variáveis como: idade, uso de álcool, uso de medicamentos e IMC, que apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, e que poderiam ser fatores de interferência. O nível de significância de 5% foi adotado e o software SPSS (versão 18.0) foi utilizado.

RESULTADOS

No total 196 indivíduos foram avaliados e divididos em 3 grupos, conforme valores de HbA1c e GJ: Grupo 1 (n =64), Grupo 2 (n =69) e Grupo 3 (n =63).

As características clínicas dos indivíduos estudados estão descritas na Tabela 1. Houve diferença significativa para a idade ($p < 0,001$), IMC ($p < 0,001$), consumo de álcool ($p < 0,001$), uso de medicamentos ($p = 0,001$), história familiar de DM ($p = 0,029$) e história familiar de doença coronariana ($p = 0,003$) entre os três grupos. As demais características não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$). Foi observado que um total de 27% dos pacientes do grupo 3, estavam em uso de estatinas.

Na Tabela 2 estão sumarizadas as características laboratoriais dos indivíduos estudados. Como esperado, foi encontrada diferença significativa entre os valores de HbA1c e GJ nos três grupos ($p < 0,001$). Na análise do perfil lipídico, os níveis de LDL (oxi) apresentaram diferença significativa entre os três grupos ($p < 0,001$), o Col Não-HDL apresentou uma tendência a ser mais alto no grupo 3 ($p = 0,056$) e os níveis de LDL não apresentaram diferença entre os grupos ($p = 0,213$) (Figura 1). Não houve diferença significativa entre os valores de CT e triglicerídios entre os três grupos estudados. Houve diferença significativa entre a razão LDL (oxi)/HDL ($p < 0,001$), entre os três grupos e Apo B ($p = 0,026$) apenas, entre os grupos 1 e 2 (Figura 2).

Os valores de HbA1c apresentaram associação positiva com os valores de LDL (oxi) ($r = 0,431$; $p < 0,001$), LDL ($r = 0,148$; $p = 0,039$), Col Não-HDL ($r = 0,192$; $p = 0,007$) e Apo B ($r = 0,171$; $p < 0,001$) (Figura 3). A associação positiva entre LDL (oxi) e HbA1c permaneceu significativa, mesmo após ajuste, por análise de regressão linear múltipla para as variáveis álcool, medicamentos, IMC e idade ($\beta = 0,087$; IC (0,006-0,168); $p = 0,035$).

A razão LDL (oxi)/HDL ($r = 0,422$; $p < 0,001$), CT ($r = 0,142$; $p = 0,048$), triglicerídios ($r = 0,155$; $p = 0,030$) e IMC ($r = 0,263$; $p < 0,001$) também apresentaram correlações positivas com os valores de HbA1c. Observamos uma correlação negativa entre HbA1c e HDL ($r = -0,142$, $p = 0,048$).

Houve correlação positiva entre LDL (oxi) e LDL ($r = 0,367$; $p < 0,001$) e LDL (oxi) e glicose ($r = 0,602$, $p < 0,001$) (Figure 4). Observamos também uma correlação positiva entre LDL (oxi) e IMC ($r = 0,252$, $p < 0,001$).

Tabela 1: Características clínicas dos indivíduos selecionados para o estudo, nos diferentes grupos, conforme valores de HbA1c e Glicose de Jejum (GJ). N=196.

	HbA1c <5,7% GJ <100 (mg/dL) 1	HbA1c 5,7 - 6,4% GJ <100(mg/dL) 2	HbA1c 5,7 - 6,4% GJ 100 - 125(mg/dL) 3	p
N	64	69	63	-
Idade (anos)	36 ± 10,6	47 ± 13,0	57 ± 12,4	<0,001
Gênero (masculino/feminino)	18/46	19/50	22/41	0,598
Fumo (Fumante/Ex-fumante)	10/13	13/13	13/15	0,865
IMC (Kg/ m²)	24 ± 4,2	27± 5,5	28,9 ± 6,7	<0,001
Medicamentos	18 (28%)	29 (42%)	53 (84%)	<0,001
Álcool	32 (50%)	21 (30%)	5 (7%)	< 0,001
HF DC	18 (28%)	39 (56%)	30 (47%)	0,003
HF DM	17 (26%)	29 (42%)	30 (47%)	0,029
HF HT	35 (54%)	42 (60%)	44 (70%)	0,093

Dados apresentados como média ± desvio padrão ou mediana [intervalo]. IMC= índice de massa corporal; HF DC= história familiar de doença cardiovascular; HF DM= história familiar de Diabetes mellitus; HF HT= história familiar de hipertensão arterial.

Tabela 2: Características laboratoriais dos indivíduos selecionados para o estudo, nos diferentes grupos, conforme valores de HbA1c e Glicose Jejum (GJ). N=196.

	HbA1c <5,7% GJ <100 (mg/dL) 1	HbA1c 5,7 - 6,4% GJ <100 (mg/dL) 2	HbA1c 5,7 - 6,4% GJ 100 - 125(mg/dL) 3	p
N	64	69	63	-
HbA1c (%)	5,4 ± 0,18	5,8 ± 0,14	6,0 ± 0,24	< 0,001
Glicose jejum (mg/dL)	80,2 ± 6,9	92,8 ± 3,8	106,5 ± 5,5	<0,001
Triglicerídios (mg/dL)	104 (74 – 145)	111 (88 – 173)	129 (97 – 193)	0,122
CT (mg/dL)	194 ± 44	209 ± 51	201 ± 43	0,158
HDL (mg/dL)	54 ± 16	52 ± 17	45 ± 10	0,005
Col NÃO-HDL (mg/dL)	140 ± 41	157 ± 50	156 ± 75	0,056
LDL (mg/dL)	115 ± 36	126 ± 41	124 ± 39	0,213
LDL (oxi) (U/L)	33,5 (27 – 45,9)	44 (37 – 70)	85,7 (49 – 135,9)	<0,001
LDL(oxi) / HDL	0,66 (0,48 – 0,97)	1,06 (0,7 – 1,61)	2,09 (1,12 – 3,31)	<0,001
Apo B (mg/dL)	77,2 ± 25,4	86,7± 28,7	89 ± 25,2	0,026

Dados apresentados como média ± desvio padrão ou mediana [intervalo]. CT=Colesterol total; Col Não-HDL= colesterol Não HDL; HDL=Colesterol HDL; LDL= colesterol LDL; LDL (oxi)= colesterol LDL oxidado; Apo B= apolipoproteína B.

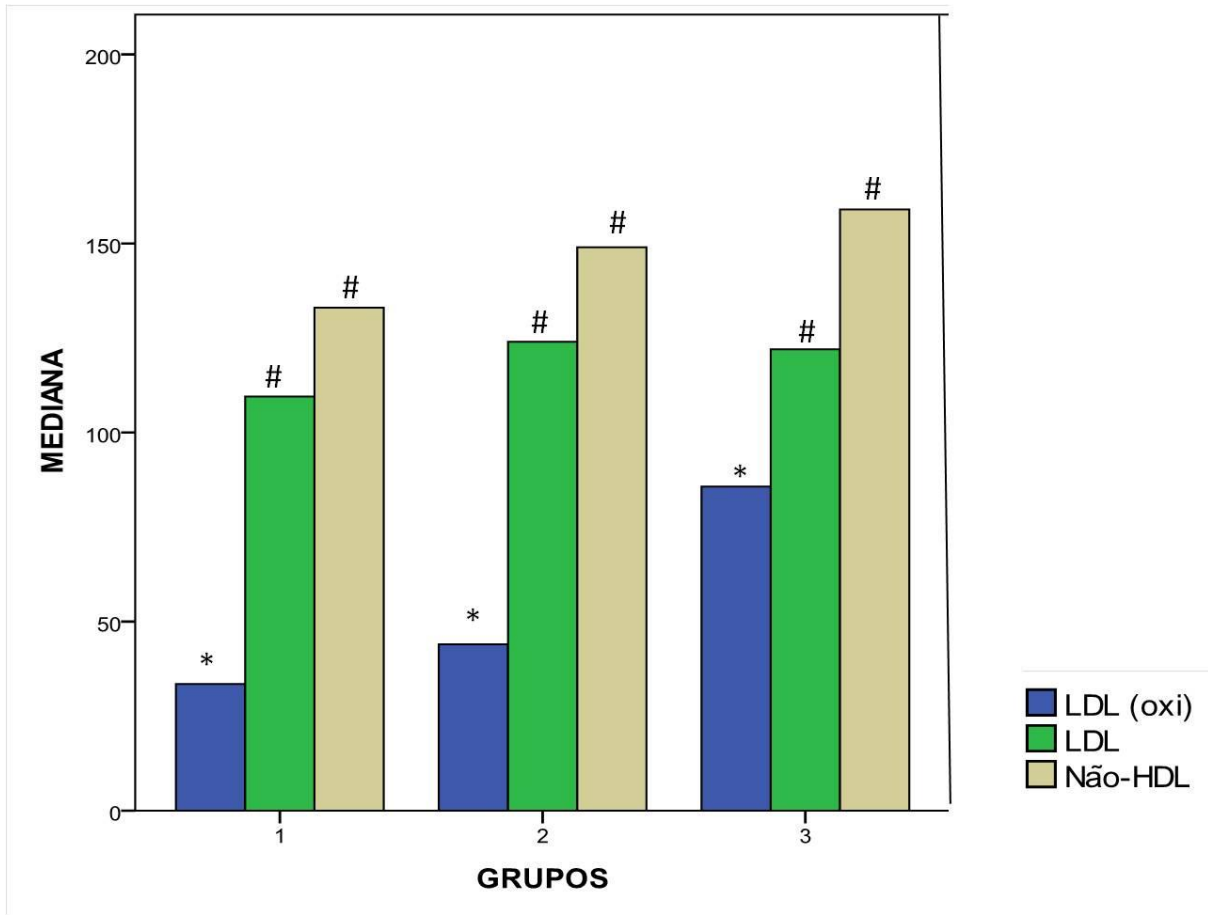
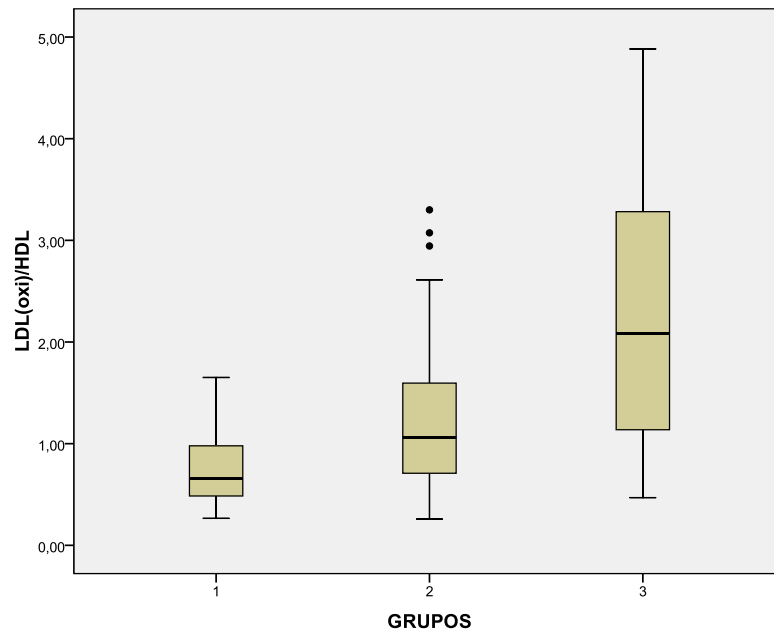


Figura 1: Valores de LDL (oxi) (U/L), LDL (mg/dL) e Colesterol Não-HDL(mg/dL) nos três diferentes grupos, * p <0,001 e # p >0,05. Valores apresentados em mediana.

A)



B)

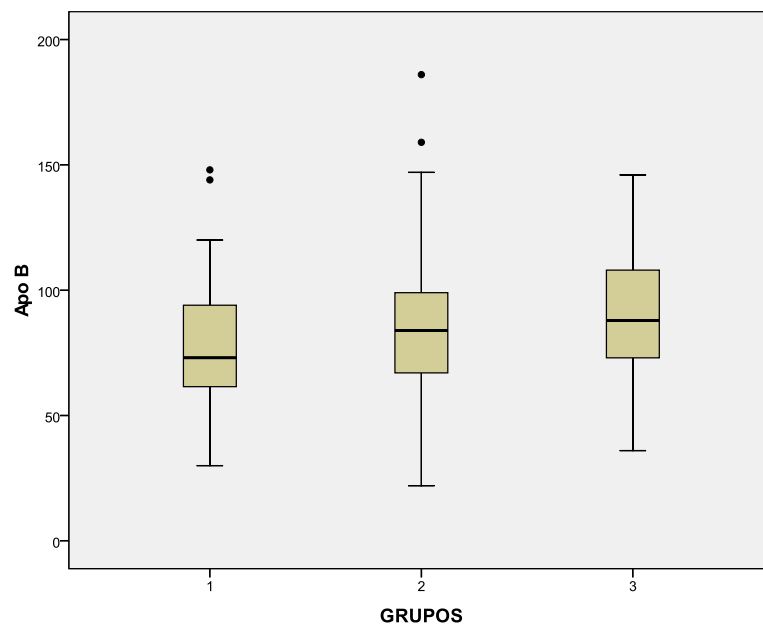


Figura 2: Box plot demonstrando os valores da relação LDL(oxi)/HDL ($p < 0,001$) (A) e APO B ($p = 0,026$), nos três diferentes grupos.

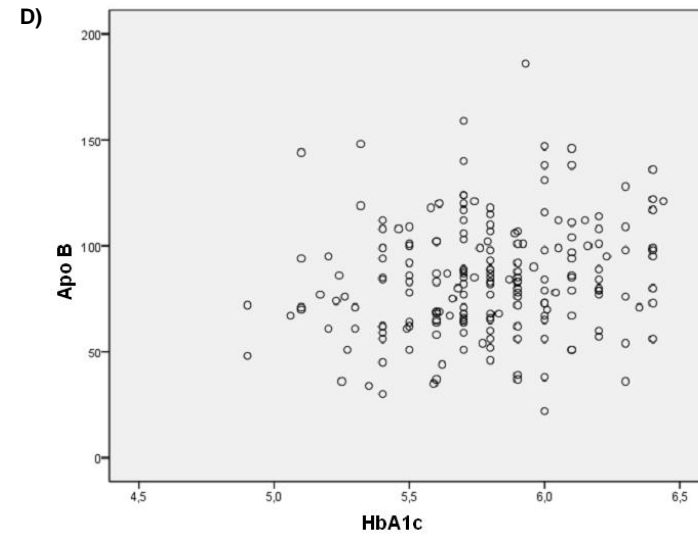
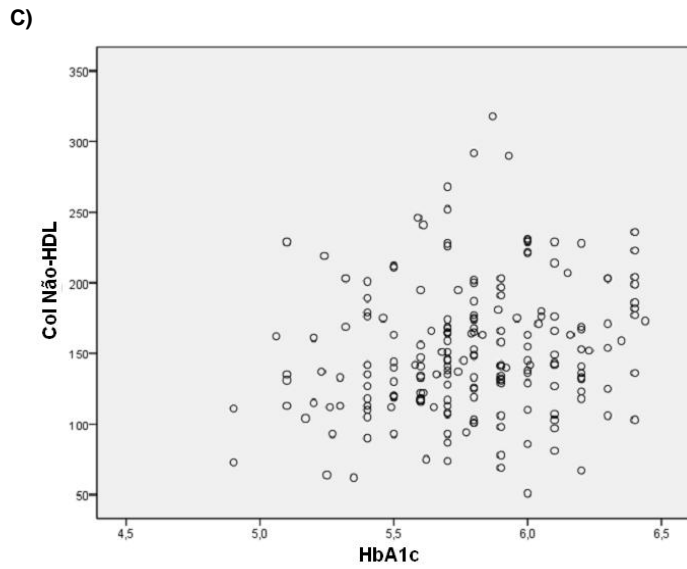
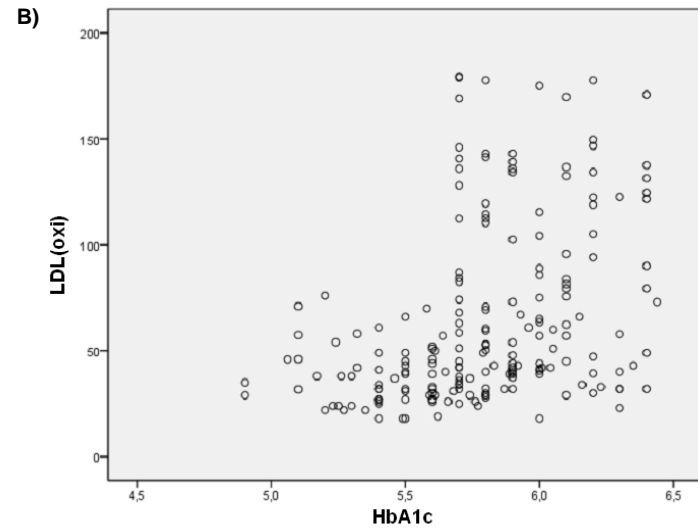
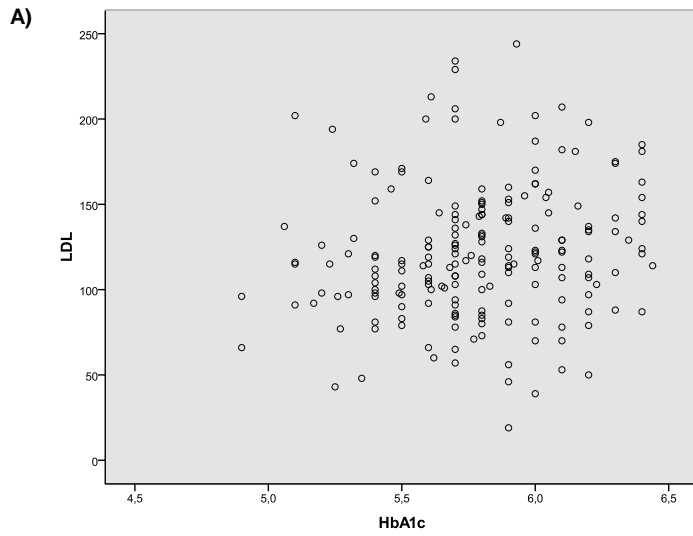
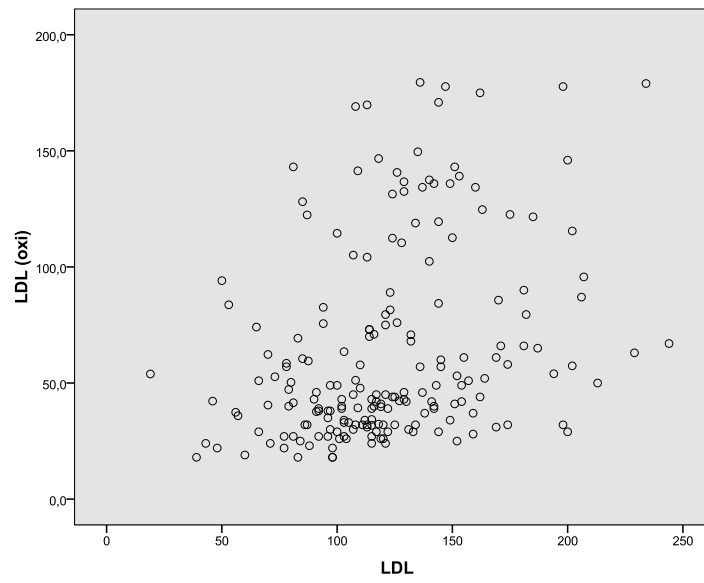


Figura 3: Correlação entre HbA1c e **A)** LDL ($r=0,148$) ($p=0,039$); **B)** LDL (oxi) ($r=0,431$; $p<0,001$); **C)** Colesterol Não-HDL ($r=0,192$; $p=0,007$) e **D)** Apo B ($r=0,171$; $p=0,016$).

A)



B)

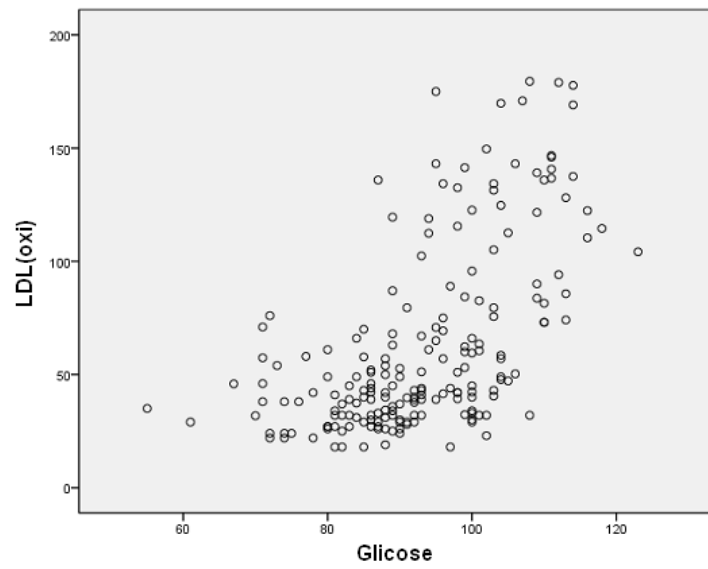


Figura 4: Correlações entre LDL (oxi) e **(A)** LDL ($r = 0,367$; $p < 0,001$) e **(B)** Glicose ($r = 0,602$; $p < 0,001$).

DISCUSSÃO

O DM está associado a diversas complicações micro e macrovasculares como consequência da hiperglicemia e glicação de proteínas. A HbA1c é o parâmetro recomendado para o controle glicêmico nestes pacientes e atualmente é considerada um teste diagnóstico para DM, além de servir como marcador de risco cardiovascular. Indivíduos com níveis elevados de HbA1c, mesmo que abaixo dos valores diagnóstico para DM, são considerados em alto risco de desenvolver DM e /ou DCV.

Em nosso estudo, examinamos 196 indivíduos não-diabéticos e aparentemente saudáveis, que foram divididos em três grupos, conforme os valores de HbA1c e GJ. Observamos um aumento nos níveis de LDL(oxi), partícula altamente aterogênica e indicadora da peroxidação lipídica, proporcional aos níveis de HbA1c e GJ.

Nossos dados mostraram que há uma correlação positiva entre HbA1c e os marcadores do perfil lipídico que são relacionados com a aterogênese, LDL, Apo B e colesterol não HDL, sugerindo que há associação da HbA1c com estas partículas. Em adição, a HbA1c mostrou-se positivamente associada com os níveis de LDL (oxi), partícula de LDL pequena, densa e oxidada que tem papel importante no processo aterosclerótico.

Um estudo anterior já havia relatado a tendência do LDL submeter-se a peroxidação lipídica, e que esta tendência estava associada ao aumento dos níveis de HbA1c no sangue de pacientes diabéticos (Letho S, 1997). Outro estudo relatou que a hiperglicemia desempenha um papel importante na oxidação do LDL (Hussein AO, 2006).

Já foi relatado, anteriormente, haver relação entre o aumento dos níveis circulantes de LDL (oxi) em indivíduos com tolerância à glicose diminuída, sugerindo que a peroxidação lipídica possa contribuir para a glicação da hemoglobina em pacientes não-diabéticos e portadores de insuficiência renal crônica (Kopprash S, 2002).

A associação entre glicemia e LDL (oxi) em nosso estudo está de acordo com a observação de que, mesmo em indivíduos saudáveis não-diabéticos, a glicemia está associada com o aumento da oxidação do LDL *in vivo*, refletida pela maior prevalência de LDL altamente oxidado. Podendo esta associação ser devido à redução da sinalização da insulina e redução da absorção de glicose por LDL (oxi) (Chen NG, 2000).

Estudos associaram os níveis de HbA1c com o aumento do risco de ocorrer eventos cardiovasculares, mesmo em indivíduos não-diabéticos e há evidências indicando que a peroxidação lipídica e a glicação de proteínas tem um papel vital na patogênese desta doença (Selvin E, 2010; Khaw K-T, 2004; Selvaraj N, 2005). Em nosso estudo, encontramos

associação significativa dos parâmetros do perfil lipídico, fatores tradicionais de risco cardiovascular, com os níveis de HbA1c.

O grupo 3 do nosso estudo, com HbA1c mais elevada e maiores níveis de glicemia, classificado segundo critérios da ADA como indivíduos em alto risco de desenvolver DM ou DCV (indivíduos pré-diabéticos), apresentou características laboratoriais mais aterogênicas, com níveis de LDL(oxi), Apo B e triglicerídeos mais elevados e com concentrações diminuídas de HDL. Nossos dados confirmam a associação entre LDL(oxi) e dislipidemia em humanos, que pode ser devido à não utilização do armazenamento de triglicerídeos e à secreção de LDL (oxi), como já relatado anteriormente (Velásquez E, 1991).

O colesterol não-HDL, constituído de lipoproteínas ricas em triglicerídeos remanescentes, é mais aterogênico. Estudos têm confirmado que o valor preditivo do colesterol não-HDL para o risco cardiovascular é tão bom, ou melhor, do que o LDL e é comparável à Apo B (NCEP 2002; Pischon, 2005). Há relatos que em uma população de homens saudáveis o colesterol não-HDL é mais fortemente relacionado à DCV do que o LDL. No entanto, estes estudos sugerem a Apo B como uma medida direta do número de lipoproteína aterogênica, sendo mais estreitamente relacionado ao risco de DCV do que a concentração de colesterol (Pischon, 2005). Em nosso estudo, não foi encontrada diferença significativa do colesterol não-HDL nos três grupos, apenas uma tendência em ser mais elevado no grupo 3. No entanto, encontramos diferença significativa entre os níveis de Apo B entre os três grupos, sendo que o grupo 3 apresentou os valores mais elevados.

Já foram relatados níveis elevados de LDL(oxi) em pacientes com síndrome metabólica (SM) (Holvoet P, 2008). No presente estudo, encontramos uma correlação positiva significativa entre os níveis de LDL(oxi) e o IMC, uma importante característica da SM.

Atualmente os níveis de CT e LDL são considerados os principais testes bioquímicos para avaliar a presença de aterosclerose (NCEP, 2002), mas há estudos que relatam haver baixa precisão diagnóstica destes testes na identificação de pacientes com DCV (Verhoye E, 2009). Por outro lado, a modificação oxidativa do LDL é postulada como sendo um dos primeiros eventos do início da aterogênese e o LDL (oxi) é proposto como um biomarcador independente para DCV (Verhoye E, 2009).

O LDL (oxi) é considerado um biomarcador mais potente para a discriminação entre indivíduos com e sem DCV do que tradicionalmente as medidas de CT ou LDL, e há sugestão do uso da relação LDL (oxi)/ HDL como um novo biomarcador de aterosclerose (Johnston N, 2006). A partir de nossos resultados, mostramos que há uma correlação

positiva entre LDL (oxi) e a relação LDL(oxi)/ HDL. E observamos também que há diferença significativa da relação de LDL(oxi)/ HDL nos três diferentes grupos estudados, estando esta relação associada com maiores níveis de HbA1c e GJ. Sugerindo assim, que esta relação apresenta-se elevada em grupos de alto risco e com possíveis manifestações de aterosclerose.

Conforme descrito anteriormente, o controle glicêmico deficiente está associado com um aumento da oxidação do LDL *in vivo*, independentemente da diminuição ou estabilidade do LDL. Também foi relatado que uma redução no colesterol LDL pode ocorrer juntamente com um nível de LDL (oxi) inalterado (Holvoet, 2008). Analisando nossos resultados, não encontramos diferença significativa entre os níveis de CT e LDL, isso pode ser explicado pelo tratamento com medicamentos, principalmente as estatinas. Um total de 27% dos pacientes do grupo 3 estava em uso de estatinas para otimização de seus níveis de LDL. Apesar disso, os valores de LDL (oxi), apresentaram-se significativamente aumentados no grupo 3 em relação aos grupos 1 e 2. Pode-se assim inferir através desse estudo, que apesar de os níveis de LDL manterem-se na faixa recomendada, possivelmente há outro mecanismo que aumente os níveis LDL (oxi) em indivíduos com alto risco e com possíveis manifestações de aterosclerose.

Apesar dos valores de CT e LDL não apresentarem diferença, os valores da relação LDL (oxi) / HDL no grupo 3 encontraram-se aumentados. Medicamentos como as estatinas causam diminuição dos níveis de CT e LDL, mas aumentam a peroxidação livre do radical LDL, *in vivo*. Por isso, esta relação LDL (oxi) / HDL aumentada pode ter significado diagnóstico de DCV (Rosenson RS, 2002).

Já foi descrito uma associação positiva entre HbA1c e os níveis de Apo B e LDL denso (Albers JJ, 2008). A análise transversal realizada pelo nosso estudo ratifica que, mesmo com os níveis glicêmicos dentro da normalidade, o aumento de HbA1c está associado ao aumento nos níveis de Apo B e LDL(oxi), o qual se constitui principalmente de partículas de LDL denso.

Nossos dados contribuem para o uso da HbA1c como marcador de risco para DCV, identificando indivíduos em risco de desenvolver complicações mesmo em níveis normoglicêmicos. Medidas corretivas das condições que aumentam a glicação, além do controle dos níveis glicêmicos, poderiam prevenir e/ou retardar o desenvolvimento de DM e DCV nesses indivíduos.

CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou associação dos níveis de HbA1c com as partículas lipídicas aterogênicas LDL, Apo B, colesterol não HDL e LDL (oxi). Os níveis de LDL, principalmente LDL (oxi), estão significativamente associados com os níveis de HbA1c e glicose, mesmo em indivíduos não-diabéticos. Os indivíduos classificados com alto risco de desenvolver DM ou DCV apresentam valores mais elevados de partículas LDL oxidadas. Nossos dados sugerem que a presença de LDL (oxi) e a tendência do LDL submeter-se a peroxidação lipídica esta relacionada com a glicação e aumento dos níveis sanguíneos de HbA1c em indivíduos não diabéticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albers JJ, Marcovina SM, Imperatore G, Snively BM, Stafford J, Fujimoto WY, Mayer-Davis EJ, Petitti DB, Pihoker C, Dolan L, Dabelea DM. Prevalence and Determinants of Elevated Apolipoprotein B and Dense Low-Density Lipoprotein in Youths with Type 1 and Type 2 Diabetes *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(3):735–742.

American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus – Position Statement. *Diabetes Care*. 2011;34:S62-S69.

Astor BC, Muntner P, Levin A. Association of kidney function with anemia: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994). *Arch Intern Med* 2002;162 (12) 1401-8.

Baynes JW, Thorpe RS. Role of Oxidative Stress in Diabetic Complications: A New Perspective on an Old Paradigm. *Diabetes* 1999; 48:1-7.

Bennett CM, Guo M, Dharmage SC. HbA1c as a screening tool for detection of Type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetic Medicine* 2007;24:333–43.

Brownlee M. The pathobiology of diabetes complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54:1615-1625.

Brum, LMBP. Associação da HbA1c e Marcadores Bioquímicos do Status Oxidativo em Pacientes Normoglicêmicos. Dissertação, UFRGS, 2010.

Brunzell JD, Davidson M, Furberg CD, Goldberg RB, Howard BV, Stein JH, Witztum JL. Lipoprotein management in patients with cardiometabolic risk: Consensus Statement from the American Diabetes Association and the American College of Cardiology Foundation. *Diabetes Care* 2008; 31: 811–22.

Camargo JL, Felisberto M, Gross JL: Effect of pre-analytical variables on glycohemoglobin measurements in routine clinical care. *Clinical Biochemistry* 2004; 37:836-839.

Camargo, J.L. and J.L. Gross, Glico-hemoglobina (HbA1c): aspectos clínicos e analíticos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 48(4): 451-463, 2004.

Chen NG, Azhar S, Abbasi F, Carantoni M, Reaven GM. The relationship between plasma glucose and insulin responses to oral glucose, LDL oxidation, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 2000; 152(1):203–208.

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

DCCT - The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329:977-86.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18(6):499-502.

Hanas R, John G. International HbA1c Consensus Committee. 2010 Consensus Statement on the Worldwide Standardization of the Hemoglobin A1c measurement. *Diabet Med* 2010; Jul;27(7):737-8.

Hempe JM, Gomez R, McCarter RJ Jr, Chalew SA. High and low hemoglobin glycation phenotypes in type 1 diabetes. A challenge for interpretation of glycemic control. *J Diabetes Complications* 2002; 16: 313-320.

Holvoet P, Lee DH, Steffes M, Gross M, Jacobs DR Jr Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and incidence of the metabolic syndrome. *JAMA* 2008; 299:2287–2293.

Hussein OA, Gefen Y, Zidan JM, Karochero EY, Luder AS, Assy NN, Srour ES, Aviram MY.. LDL oxidation is associated with increased blood hemoglobin A1c levels in diabetic patients. *Clin Chim Acta* 2006; 377:114-118.

Itabe H. Oxidative modification of LDL: its pathological role in atherosclerosis. *Clin Rev Allerg Immunol* 2009; 37:4-11.

Jain, S. K. and M. Palmer. The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins. *Free Radic Biol Med* 1997; 22(4): 593-596.

Jawahar L. Metha Oxidized or Native Low-Density Lipoprotein Cholesterol *Journal of the American College of Cardiology* 2006; 48(5), 980–2.

Johnston N, Jernberg T, Lagerqvist B, Siegbahn A, Wallentin L Improved identification of patients with coronary artery disease by the use of new lipid and lipoprotein biomarkers. *Am J Cardiol* 2006; 97:640–645.

Khaw KT, Wareham N, Bingham S, Luben R, Welch A, Day N. Association of Hemoglobin A1c with Cardiovascular Disease and Mortality in Adults: The European Prospective Investigation into Cancer in Norfolk. *Ann Intern Med* 2004; 141:413-420.

Koprash S, Pietzsch J, Kuhlisch E, Fuecker K, Temelkova-Kurktschiev T, Hanefeld M, Kuhne H, Julius U, Graessler J. In vivo evidence for increased oxidation of circulating LDL in impaired glucose tolerance. *Diabetes* 2002; 51:3102-3106.

Lankin V, Tikhaze A, Kumskova E, Konovalova G, Kotkina T, Yanushevskaya E, Vlasik T. Cholesterol-rich low density lipoproteins are also more oxidized. *Mol Cell Biochem* 2011; Sep;355(1-2):187-91.

Lapolla A, Tubaro M, Reitano R, Aricò NC, Ragazzi E, Seraglia R, Vogliardi S, Traldi P, Fedele D The complexity of non-enzymatic glycation product sets of human globins. *Diabetologia* 2004; 47: 1712-1715.

Letho S, Ronnema T, Haffner SM, Pyorala, Kallio V, Laakso M. Dyslipidemia and hyperglycemia predict coronary heart disease events in middle-aged patients with NIDDM. *Diabetes* 1997; 46:1354-1359.

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. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *Circulation* 2002;106(25):3143-421.

Pischon T, Girman CJ, Sacks FM, Rifai N, Stampfer MJ, Rimm EB. Non-high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B in the prediction of coronary heart disease in men. *Circulation* 2005;112: 3375–3383.

Rosenson RS, Otvos JD, Freedman DS. Relations of lipoprotein subclass levels and low-density lipoprotein size to progression of coronary artery disease in the Pravastatin Limitation of Atherosclerosis in the Coronary Arteries (PLAC-I) trial. *Am J Cardiol* 2002; 90:89–94.

Rule AD, Larson TS, Bergstralh EJ, Slevak JM, Jacobsen SJ. Using serum creatinine to estimate glomerular filtration rate: accuracy in good health and chronic disease. *Ann Intern Med* 2004; 141:929-37.

Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, Lernmark A, Metzger BE, Nathan DM. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus Clin Chem 2011;57(6):e1-e47.

Sathiyapriya V, Bobby Z, Vinod Kumar S, Selvaraj N, Parthibane V, Gupta S. Evidence for the role of lipid peroxides on glycation of hemoglobin and plasma proteins in non-diabetic asthma patients. Clinica Chimica Acta 2006; 366: 299-303.

Scheffel RS, Bortolanza D, Weber CS, Costa LA, Canani LH, Santos KGd, et al. Prevalência de complicações micro e macrovasculares e de seus fatores de risco em pacientes com diabetes melito do tipo 2 em atendimento ambulatorial Rev Assoc Med Bras 2004; 50:263-7.

Selvaraj N, Bobby Z, Koner BC, Das AK. Reassessing the increased glycation of hemoglobin in nondiabetic chronic renal failure patients: A hypothesis on the role of lipid peroxides. Clinica Chimica Acta 2005; 360: 108-113.

Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, Golden SH. Meta Analysis: Glycosylated Hemoglobin and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. Ann Intern Med 2004; 141:421-31.

Selvin E, Steffes MW, Zhu H, Matsushita K, Wagenknecht L, Pankow J et al. Glycated Hemoglobin, Diabetes, and Cardiovascular Risk in Nondiabetic Adults. N Engl J Med 2010; 362(9):800-11.

Slatter DA, Bolton CH, Bailey AJ: The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. Diabetologia 2000; 43:550-557.

The International Expert Committee. International Expert Committee Report on the Role of the A1C Assay in the Diagnosis of Diabetes. Diabetes Care 2009; 32:1327–1334.

U.K. Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). Lancet 1998; 352:837-51.

Velásquez E, Winocour PH, Kesteven P, Alberti KG, Laker MF. Relation of lipid peroxides to macrovascular disease in type 2 diabetes. Diabet Med 1991; 8:752-8.

Verhoye E, Langlois MR. Circulating oxidized low-density lipoprotein: a biomarker of atherosclerosis and cardiovascular risk. Clin Chem Lab Med 2009; 47:128–137.

Viigimaa M, Abina J, Zemtsovskaya G, Tikhaze A, KonovalovaG, Kumskova E, Lankin V. Malondialdehyde-modified low-density lipoproteins as biomarker for atherosclerosis. Blood Pressure 2010; 19:164–168.

World Health Organization. Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia: Report of a WHO/ IDF Consultation. Geneva, World Health Org., 2006.

World Health Organization. Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus. Geneva, World Health Organization, Jan 2011.

Disponível em <http://www.who.int/diabetes/en/>. Acessado em Novembro 2011.

CIP - Catalogação na Publicação

Spessatto, Débora

Associação dos Níveis de HbA1c com Colesterol LDL e
Colesterol LDL Oxidado em Indivíduos Não-diabéticos /
Débora Spessatto. -- 2011.

58 f.

Orientadora: Joíza Lins Camargo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia,
Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Colesterol LDL. 2. Colesterol LDL oxidado. 3.
Hemoglobina Glicada. 4. Indivíduos não-diabéticos. I.
Camargo, Joíza Lins, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).