



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

EMERSON SAMPAIO

**DIMINUIÇÃO DA AÇÃO ANTIOXIDANTE DA  
LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE DE HOMENS COM  
*DIABETES MELLITUS* TIPO 1 NORMOALBUMINÚRICOS E  
MICROALBUMINÚRICOS**

---

Londrina  
2012

EMERSON SAMPAIO

**DIMINUIÇÃO DA AÇÃO ANTIOXIDANTE DA  
LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE DE HOMENS COM  
*DIABETES MELLITUS* TIPO 1 NORMOALBUMINÚRICOS E  
MICROALBUMINÚRICOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

Orientador: Professor Dr. Alexandre José Faria Carrilho.

Londrina  
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

S192d Sampaio, Emerson.  
Diminuição da ação antioxidantes da lipoproteína de alta densidade de homens com *Diabetes Mellitus* Tipo 1 normoalbuminúricos e microalbuminúricos / Emerson Sampaio. – Londrina, 2012.  
45 f. : il.

Orientador: Alexandre José Faria Carrilho  
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2012.  
Inclui bibliografia.

1. Albuminúria. – Teses. 2. Colesterol. – Teses. 3. *Diabetes mellitus* tipo 1 – Teses. 4. Lipoproteínas HDL. – Teses. 5. Oxidação. - Teses. 6. Peroxidação de lipídeos. – Teses. I. Carrilho, Alexandre José Faria. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde III. Título.

CDU 616.379-00864

EMERSON SAMPAIO

**DIMINUIÇÃO DA AÇÃO ANTIOXIDANTE DA LIPOPROTEÍNA DE  
ALTA DENSIDADE DE HOMENS COM *DIABETES MELLITUS* TIPO 1  
NORMOALBUMINÚRICOS E MICROALBUMINÚRICOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Alexandre José Faria Carrilho  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Vinicius Daher Alvares Delfino  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Rúbia Casagrande  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Helenir Medri de Souza  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 15 de agosto de 2012.

Dedico este trabalho às professoras Henriqueta Guidio Galvanin de Almeida e Ana Maria Kelmer Bracht, exemplos admiráveis, que plantaram em mim as sementes da ciência e da medicina, regadas com muito amor e carinho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores Dr. Alexandre José Faria Carrilho e Dra. Tânia Longo Mazzuco pela orientação e co-orientação desta tese, assim como a todos os participantes que doaram material biológico para sua realização.

Ao professor Dr. Décio Sabbatini Barbosa, que, carinhosamente, muito me ensinou, incentivou e contribuiu para que pudesse conseguir executar este projeto.

Aos professores Dr. Eder Quintão, Dra. Edna Regina Nakandakare, Dra. Marisa Passarelli e Dra. Valéria Sutti Nunes, que me ensinaram às técnicas para isolamento de lipoproteínas, contribuindo materialmente e intelectualmente para o desenvolvimento de todas as etapas desse projeto.

À professora Maria Emilia Fávero e aos amigos do laboratório de pós-graduação: Denise Duarte Santiago, Chiara Cristina Bortolasci, Paula Godeny, Luciana Higachi, Carine Coneglian de Farias, Karine Maria Boll, Deborah Vittori, Marlene Rosa dos Santos e Antônio Carlos Mariano dos Santos, que muito me ensinaram, ajudaram, incentivaram, compartilharam e alegraram os longos dias de trabalho.

Aos queridos amigos do Ambulatório Multiprofissional de *Diabetes Mellitus* tipo 1: Ilidia Terezinha Martelli Takahashi, Carmen Lúcia Lázaro Garcia, Íria Roberta Staut Freitas, Maria Helena Dantes de Menezes Guariente e Vânia Maria Vargas, que tanto me ensinaram sobre o cuidar das pessoas.

Aos grandes e eternos amigos irmãos professores Dr. Claudemir Zucareli e Dr. Otávio Goes de Andrade, companheiros desta e tantas outras batalhas na vida.

A todos os meus amigos do Hospital Universitário de Londrina, que me incentivaram e auxiliaram durante toda essa jornada.

SAMPAIO, Emerson. **Diminuição da ação antioxidante da lipoproteína de alta densidade de homens com *diabetes mellitus* tipo 1 normoalbuminúricos e microalbuminúricos.** 2012. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## RESUMO

**Introdução:** Os pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1, sem complicações crônicas, apresentam concentrações séricas de colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-C) semelhantes às da população geral. No entanto, apesar de quantitativamente normal, suas partículas de HDL podem ser disfuncionais.

**Objetivo:** Avaliar a ação antioxidante da HDL2 e HDL3 de homens caucasianos com *diabetes mellitus* tipo 1 normoalbuminúricos e microalbuminúricos.

**Método:** Participaram do estudo 20 homens caucasianos com *diabetes mellitus* tipo 1 (10 normoalbuminúricos e 10 microalbuminúricos) e 10 homens caucasianos saudáveis. HDL2 e HDL3 dos pacientes e controles, e *pool* de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) dos controles foram obtidos por ultracentrifugação em gradiente de densidade descontínua. Avaliou-se a ação antioxidante da HDL pela diferença de concentração de lipídios hidroperoxidados (LOOH) após três horas de oxidação, catalisada com  $\text{CuSO}_4$  5  $\mu\text{M}$ , de LDL *pool*, na ausência ou presença de HDL2 ou HDL3.

**Resultados e conclusões:** Baseado nesta tese produziu-se de dois artigos. Devido à transferência dos direitos desses para os periódicos aos quais foram submetidos, as informações deverão ser acessadas diretamente nos periódicos indexados. A busca dos mesmos pode ser realizada através dos títulos:

- Impaired antioxidant action of high density lipoprotein from male type 1 diabetic patients with normoalbuminuria and microalbuminuria.
- Adaptações e padronização da técnica de separação de lipoproteínas plasmáticas por ultracentrifugação em gradiente descontínuo.

**Palavras-chave:** Albuminúria. Colesterol. *Diabetes mellitus* tipo 1. Lipoproteínas HDL. Oxidação. Peroxidação de lipídeos.

SAMPAIO, Emerson. **Impaired antioxidant action of high density lipoprotein from male type 1 diabetic patients with normoalbuminuria and microalbuminuria**. 2012. 45p. Dissertations (Master's degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## ABSTRACT

**Background:** Patients with type 1 diabetes, in the absence of chronic complication, have serum concentration of high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) similar to the general population. However, despite quantitatively normal, their HDL particles may be dysfunctional.

**Objective:** To evaluate the antioxidant effect of HDL2 and HDL3 obtained from normoalbuminuric and microalbuminuric Caucasian male type 1 diabetic patients.

**Methods:** Twenty Caucasian type 1 diabetic men (10 normoalbuminurics and 10 microalbuminurics) and 10 healthy Caucasian men participated of the study. HDL2 and HDL3 from patients and controls, and a pool of low density lipoproteins (LDL) from healthy donors, were obtained by density-gradient ultracentrifugation. Antioxidant effect of HDL was assessed by measuring lipid hydroperoxide (LOOH) concentration after 3 hours of pooled LDL oxidation catalyzed by 5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> in the absence or presence of HDL2 or HDL3.

**Results and conclusions:** Baseado nesta tese produziu-se de dois artigos. Devido à transferência dos direitos desses para os periódicos aos quais foram submetidos, as informações deverão ser acessadas diretamente nos periódicos indexados. A busca dos mesmos pode ser realizada através dos títulos:

- Impaired antioxidant action of high density lipoprotein from male type 1 diabetic patients with normoalbuminuria and microalbuminuria.
- Adaptações e padronização da técnica de separação de lipoproteínas plasmáticas por ultracentrifugação em gradiente descontínuo.

**Keywords:** Albuminuria. Cholesterol. HDL lipoproteins. Lipid peroxidation. Oxidation. Type 1 *diabetes mellitus*.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

ANOVA	análise de variância
Apo	apolipoproteína
BMI	ndice de massa corpórea
DM	<i>diabetes mellitus</i>
eGDR	estimativa da taxa de disponibilizao de glicose
eGFR	estimativa da taxa de filtrao glomerular
HbA1c	Hemoglobina glicada A1c
HDL	lipoproteína de alta densidade
HDL-C	colesterol da lipoproteína de alta densidade
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	colesterol da lipoproteína de baixa densidade
LOOH	lipídio hidroperoxidado
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
PON	paraoxonase
TSH	hormônio tireotrófico
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1	DIABETES MELLITUS E ATEROSCLEROSE .....	11
1.2	LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE .....	13
1.3	LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE E ATEROSCLEROSE.....	14
1.4	LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE E DIABETES MELLITUS .....	15
1.5	IMPORTÂNCIA DE ESTUDOS ESPECÍFICOS DA LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1.....	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	18
<b>3</b>	<b>PACIENTES E MÉTODOS</b> .....	19
3.1	PACIENTES.....	19
3.1.1	Ética.....	19
3.1.2	População e Amostragem .....	19
3.1.3	CrITÉRIOS de Inclusão.....	19
3.1.4	CrITÉRIOS de Exclusão.....	20
3.1.5	Tamanho e Poder da Amostra.....	20
3.2	PROTOCOLO DO ESTUDO .....	21
3.2.1	Recrutamento.....	21
3.2.2	Avaliação Clínica.....	21
3.2.3	Coleta de Sangue e Urina de 24 Horas.....	22
3.2.4	Exames Laboratoriais Basais.....	23
3.2.5	Isolamento de Lipoproteínas .....	23
3.2.6	Avaliação da Separação de Lipoproteínas.....	24
3.2.7	Avaliação da Atividade Antioxidante da Lipoproteína de Alta Densidade .....	25
3.2.8	Dosagem de Lipídios Hidroperoxidados.....	26
3.2.9	Análise Estatística .....	26
<b>4</b>	<b>ARTIGOS</b> .....	28
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	29

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	30
<b>APÊNDICES</b> .....	38
APÊNDICE A - Hospital Universitário Universidade Estadual de Londrina .....	39
APÊNDICE B - Orientação para coleta laboratorial .....	41
<b>ANEXOS</b> .....	44
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos .....	45

## 1 INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica caracterizada por respostas celulares e moleculares específicas a fatores de risco que geram alterações vasculares, como a deposição de lipídios na parede de artérias de grandes e médios calibres, comprometendo o fluxo sanguíneo cardíaco, cerebral e/ou de extremidades (Ross, 1999).

As doenças associadas à aterosclerose, como a isquemia do miocárdio e o acidente vascular cerebral, são as principais causas de mortalidade nos países desenvolvidos e nos em desenvolvimento, e estão dentro das cinco principais causas de morte em países subdesenvolvidos (Mathers *et al.*, 2009).

A aterogênese é um processo complexo. Assumem-se como fatores de risco clássicos idade, sexo masculino, história familiar, dislipidemia, tabagismo, hipertensão arterial, *diabetes mellitus* (DM) e sedentarismo; os quais podem apresentar-se isolados ou em combinação com fatores ambientais (Ross, 1999).

Os primeiros estudos evidenciaram a participação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) associada à formação do ateroma. Hoje, sabe-se que não só essa partícula, mas as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas remanescentes também participam da aterogênese; enquanto as lipoproteínas de alta densidade (HDL) realizam ações antiaterogênicas (Stocker e Keaney, 2004).

Três hipóteses correntes descrevem os possíveis mecanismos da aterogênese (Stocker e Keaney, 2004); estas não são mutuamente excludentes, porém apresentam diferentes conceitos sobre a patogênese das lesões ateroscleróticas, a saber:

- *Hipótese da resposta à injúria* aponta como evento inicial a disfunção endotelial. Células do endotélio, agredidas pelos fatores de risco para aterosclerose, recrutam células inflamatórias, apresentam alteração de permeabilidade às lipoproteínas e modificações vasomotoras. Parte das células inflamatórias recrutadas transforma-se em macrófagos, que túrgidos com lipídios internalizados, passam a ser denominados de células espumosas, iniciando a placa de ateroma.

- *Hipótese da resposta à retenção* menciona o depósito de lipoproteínas como possível evento inicial da aterogênese. Componentes da matriz extracelular, proteoglicanos, apresentam ávida interação com as lipoproteínas, formando agregados que sofrem ação de enzimas lipolíticas e lisossomais. Esses agregados são internalizados por macrófagos, desencadeando a formação de células espumosas.

- *Hipótese da modificação oxidativa* enfoca o conceito de que a

modificação da LDL por oxidação é o evento inicial da aterosclerose.

Estudos laboratoriais, em cultura de macrófagos derivados de monócitos humanos e de animais de laboratório, identificaram que mesmo uma concentração elevada de LDL nativa é incapaz de produzir acúmulos celulares de colesterol esterificado nessas células, devido à baixa expressão de receptores tipo B-E e *downregulation* destes (Goldstein e Brown, 1977). No entanto, partículas de LDL, modificadas por processos de acetilação ou oxidação com íons metálicos, apresentam capacidade *in vitro* de desencadear a formação de células espumosas nesses mesmos ensaios (Goldstein *et al.*, 1979; Fogelman *et al.*, 1980; Camejo *et al.*, 1991).

Em 1981, o estudo realizado por Henriksen e colaboradores evidenciou que culturas de células endoteliais incubadas com LDL nativas têm a capacidade de modificar essa lipoproteína. A LDL modificada apresenta a característica de ser reconhecida por receptores *scavenger*<sup>1</sup>, capazes de gerar células espumosas. Observou-se, também, que esta modificação da LDL pode ser inibida pelo uso de antioxidantes. Esses estudos embasaram Steinberg, em 1989, a publicar a *hipótese da modificação oxidativa*, que descreve as alterações biológicas da LDL, causadas por processos oxidativos, como uma fase precoce da aterogênese. A LDL oxidada atuaria como fator quimiotático para monócitos que, transformados em células espumosas, exercem efeitos citotóxicos sobre as células endoteliais, aumentando a ativação de plaquetas, estimulando a migração e proliferação de células musculares lisas e antagonizando os efeitos vasodilatadores do óxido nítrico (Steinberg *et al.*, 1989; Chisolm e Steinberg, 2000).

## 1.1 DIABETES MELLITUS E ATEROSCLEROSE

O DM é um distúrbio metabólico de alta relevância, que assume proporções epidêmicas em todo mundo. O número de pessoas com DM está aumentando devido ao crescimento e ao envelhecimento populacional, à maior urbanização, à crescente prevalência de obesidade, má alimentação e sedentarismo; bem como à maior sobrevida do paciente com DM (Wagner e Brath, 2011).

A denominação DM engloba um grupo de doenças metabólicas

---

<sup>1</sup> Receptores *scavenger* são um grupo de receptores que reconhecem partículas de LDL modificada por oxidação ou acetilação. Foram identificados inicialmente em macrófagos e hoje são representados por diversas classes de moléculas, como SR-A1, SR-A2, SR-B1, CD68, CD36 e LOX-1, algumas exclusivas dos macrófagos, outras também podem estar presentes em células endoteliais e células musculares lisas (Greaves e Gordon, 2009).

heterogêneas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção insulínica, ação da insulina ou ambos. O DM tipo 2 é a forma mais prevalente (90 a 95%), caracteriza-se por resistência à insulina e defeitos na secreção da insulina. O DM tipo 1 caracteriza-se pela destruição prematura das células beta pancreáticas, mediada por auto-imunidade (American Diabetes Association, 2012).

O desenvolvimento de aterosclerose prematura é uma característica de todos os pacientes com DM. A doença cardiovascular é a principal causa de morte desses pacientes (Fisher, 2004). Contudo, devido aos pacientes com DM tipo 1 apresentarem no passado altas taxas de mortalidade associadas a complicações agudas e microvasculares, como a nefropatia diabética, o desenvolvimento de aterosclerose foi negligenciado neste grupo. Hoje, sabe-se que os riscos de morbidade e mortalidade cardiovascular dos pacientes com DM tipo 1 são dramaticamente maiores que da população geral, sendo que, mesmo pacientes jovens, principalmente as mulheres, apresentam maior número de eventos (Soedamah-Muthu *et al.*, 2006).

A associação resistência insulínica e coronariopatia é conhecida há muitas décadas, assim como sua participação na gênese do DM tipo 2. Todavia, a resistência insulínica nos pacientes com DM tipo 1 recebeu atenção especial apenas na última década. Nos pacientes com DM tipo 1, classicamente a hiperglicemia decorre da deficiência insulínica e, quando na ausência de obesidade e mau controle metabólico, apresentam sensibilidade à insulina normal inicialmente (American Diabetes Association, 2012). No entanto, durante a evolução da doença, esses pacientes podem desenvolver resistência à insulina (Kilpatrick *et al.*, 2007).

A nefropatia diabética ocorre em 20 a 40% dos pacientes com DM tipo 1, sendo a principal causa de insuficiência renal crônica neste grupo. A presença de albuminúria entre 30 e 299mg/24h, persistente, também chamada de microalbuminúria, é um clássico marcador laboratorial da nefropatia diabética incipiente (American Diabetes Association, 2012). Apesar de apenas 30 a 45% dos pacientes com microalbuminúria progredirem para estágios mais avançados da doença renal, e cerca de 24% dos pacientes com DM tipo 1 com taxa de filtração glomerular menor que  $60 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1,73 \text{ m}^{-2}$  não apresentam microalbuminúria, a microalbuminúria persiste como uma importante ferramenta diagnóstica para nefropatia diabética e um marcador independente de lesão endotelial (Ruggenti e Remuzzi, 2006; Molitch *et al.*, 2010).

O desenvolvimento da microalbuminúria é associado com componentes da síndrome metabólica, além disso, a microalbuminúria, mesmo isoladamente, é um fator de

risco para doenças cardiovasculares (MacIsaac *et al.*, 2004). Lekakis e colaboradores (1997) observaram comprometimento da função endotelial em pacientes com DM tipo 1 normoalbuminúricos e com controle glicêmico adequado, sugerindo que a disfunção endotelial no DM tipo 1 possa ser um evento mais precoce do que a microalbuminúria ao longo da história natural do DM tipo 1. Dogra e colaboradores (2001) avaliaram pacientes com DM tipo 1 normoalbuminúricos e microalbuminúricos e observaram que, em relação a não diabéticos, a vasodilatação mediada pelo endotélio estava prejudicada nos diabéticos, ademais o comprometimento foi maior nos microalbuminúricos.

## 1.2 LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE

As determinações das concentrações séricas de colesterol tiveram início na década de 1930. Nos anos seguintes, vários pesquisadores agregaram novos conhecimentos sobre o transporte de lipídios plasmáticos, como Blix e colaboradores (1941), que observaram que os lipídios plasmáticos migravam num campo elétrico com mobilidade idêntica às das  $\alpha$  e  $\beta$  globulinas. O pesquisador Pedersen (1947) iniciou as primeiras separações de lipoproteínas por ultracentrifugação; técnica que permitiu a Gofman e colaboradores (1949) descreverem a distribuição das lipoproteínas em zonas de concentração ao longo de um gradiente de densidade de 0,99 g/mL a 1,21 g/mL, diferenciando LDL e HDL.

A fração HDL é composta por um grupo de lipoproteínas originalmente identificadas por ultracentrifugação do plasma com densidade entre 1,063 e 1,21 g/mL. São partículas predominantemente esféricas, diâmetro de 5 a 17 nm, compostas por 20% de colesterol, que se concentra num núcleo hidrofóbico, circundado por uma camada monofásica de fosfolipídios que correspondem a 30% da partícula, associado à apolipoproteínas (apo), maior componente desta, que correspondem a 50% da HDL. A principal apo da HDL é a apoAI, seguida pela apoAII, embora outras como apoAIV, apoAV, apoCI, apoCII, apoCIII, apoD e apoE possam estar presentes. A fração HDL, quando isolada por ultracentrifugação, pode ser subdividida quanto à densidade em duas subfrações: HDL2, com partículas maiores, densidade de 1,063 a 1,125 g/mL, com predomínio de apoAI; e HDL3, que são menores, densidade de 1,125 a 1,21 g/mL, ricas em proteínas apoAI e apoAII, e apresentam maior potencial antioxidante (Sakuma *et al.*, 2002; Kontush *et al.*, 2003; Assmann e Gotto, 2004).

O proteoma das HDL é composto por cerca de 56 proteínas. Parte destas tem ação direta no metabolismo lipídico, como as apolipoproteínas, proteína transportadora de

éster de colesterol e lipoproteína lipase; enquanto outras estão envolvidas com funções hemostáticas e imunológicas. É importante também relatar a presença de enzimas com atividade antioxidante associadas à HDL, como a paraoxonase (PON) (Rezaee *et al.*, 2006).

### 1.3 LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE E ATEROSCLEROSE

A correlação entre baixa concentração sérica de colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C) e aterosclerose já foi demonstrada por diversos autores. Em 1951, Barr e colaboradores descreveram concentrações séricas reduzidas de HDL-C no plasma de pacientes com doença coronariana. No entanto, a magnitude dessa associação tornou-se conhecida em 1977, quando Gordon e colaboradores descreveram, no estudo de Framingham, a associação inversa entre concentração sérica de HDL-C e doença coronariana. Em 1989, Gordon e colaboradores publicaram uma análise de quatro estudos populacionais, na qual estimaram que a cada 1 mg/dL de aumento na concentração de HDL-C sérico há uma redução no risco de doença coronariana de 1,9 a 2,3% para homens e 3,2% para mulheres. Uma recente publicação, que avaliou 68 estudos prospectivos com mais de 300 mil participantes, também detectou uma forte associação protetora, evidenciando menor risco de doença coronariana nos participantes com maiores concentrações séricas de HDL-C (Di Angelantonio *et al.*, 2009).

Apesar da associação epidemiológica entre o risco de morte por doença aterosclerótica e as concentrações séricas de HDL-C ser conclusiva, isto não evidencia prova de causalidade entre eles (Vergeer *et al.*, 2010). Desta forma, diversos estudos em modelos humanos, animais e *in vitro* foram propostos, pesquisando as atividades fisiológicas da HDL. Há evidências de que a HDL tenha ações no transporte reverso de colesterol, inibição da expressão de moléculas de adesão endotelial, assim como na agregação plaquetária e crescimento de células musculares lisas, intensificando a produção de óxido nítrico e a vasodilatação (Young *et al.*, 2004). Hipotetizou-se que a ação da HDL via transporte reverso de colesterol é proporcional à concentração plasmática da HDL; contudo, há evidências que as atividades da HDL – anti-inflamatória, antioxidante, antitrombótica – são independentes da sua concentração plasmática. Logo, a relação entre HDL e risco cardiovascular é complexa (Sviridov *et al.*, 2008).

A HDL apresenta capacidade de proteger a LDL de danos oxidativos induzidos por agentes oxidantes, como os radicais livres. Isso decorre, principalmente, da presença e tipo das apolipoproteínas, enzimas associadas e antioxidantes ( $\alpha$ -tocoferol,

licopeno e estrógenos) da HDL (Mackness e Durrington, 1995).

Estudos experimentais *in vitro* evidenciaram que a prévia adição de HDL em ensaios oxidativos de LDL, catalisados com  $\text{Cu}^{2+}$ , reduz a concentração final de lipídios hidroperoxidados (LOOH), evidenciando que a HDL interfere na formação desses peróxidos ou catalisa sua conversão para outras substâncias (Ohta *et al.*, 1989; Kunitake *et al.*, 1992; Mackness *et al.*, 1993a; Mackness e Durrington, 1995; Tribble *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1998; Kontush *et al.*, 2003). A atividade da HDL não está envolvida com a diminuição do  $\text{Cu}^{2+}$  livre no meio de incubação, mas é dependente da concentração da HDL, e é saturável, sugerindo que pelo menos parte deste mecanismo de ação seja enzimático (Mackness *et al.*, 1993a). A apoAI (Ohta *et al.*, 1989; Kunitake *et al.*, 1992), PON (Durrington *et al.*, 2001), fator ativador de plaquetas acetil hidrolase (Assmann e Gotto, 2004) e a glutathiona peroxidase (Assmann e Gotto, 2004) são proteínas associadas à ação antioxidante da HDL em ensaios *in vitro*.

A PON é apontada como a principal enzima envolvida na atividade antioxidante da HDL (Durrington *et al.*, 2001). Tal enzima catalisa a quebra de fosfolipídios oxidados na LDL, os quais, se não neutralizados, poderiam estimular a produção de citocinas e induzir a adesão de monócitos na superfície de células endoteliais (Watson *et al.*, 1995). Ademais, a PON diminui o conteúdo de peróxidos lipídicos em artérias coronárias humanas e lesões de carótida (Durrington *et al.*, 2001). Existem estudos reportando aumento do risco de doença coronariana em indivíduos com baixa atividade da PON (Mackness *et al.*, 1999; Durrington *et al.*, 2001); do mesmo modo, sua atividade é reduzida em populações com alto risco aterosclerótico, como hipercolesterolêmicos (Mackness *et al.*, 1991). A atividade da PON também é diminuída em pacientes com DM tipo 1 e 2. Os mecanismos que levam a essa menor atividade não estão totalmente elucidados, mas associa-se a glicação dessa enzima à redução de sua função (Abbott *et al.*, 1995; Boemi *et al.*, 2001).

#### 1.4 LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE E DIABETES MELLITUS

Anormalidades lipídicas ocorrem frequentemente em pacientes com DM, que têm as lipoproteínas plasmáticas influenciadas pelo grau de controle metabólico, e contribuem para o aumento de mortalidade cardiovascular (Fisher, 2004). As anormalidades refletem-se nas concentrações plasmáticas dos lipídios, estrutura e função das lipoproteínas (Dullaart, 1995).

A dislipidemia em pacientes com DM tipo 2 caracteriza-se por baixas

concentrações séricas de HDL-C, hipertrigliceridemia e LDL pequenas e densas. Por sua vez, pessoas sem DM com baixas concentrações séricas de HDL-C tendem a apresentar maior resistência insulínica e aumento do risco de desenvolver DM tipo 2. Corroborando essa associação, intervenções contra a resistência insulínica, como redução de peso e aumento da atividade física, potencialmente podem elevar as concentrações séricas de HDL-C (Rohrer *et al.*, 2004).

No início da doença, pacientes com DM tipo 1, com bom controle glicêmico e sem complicações crônicas, têm concentrações séricas lipídicas semelhantes ou mesmo mais favoráveis que as da população geral (Tolonen *et al.*, 2008). No entanto, durante a evolução da enfermidade, pacientes com DM tipo 1 e redução da função renal (taxa de filtração glomerular menor que  $60 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1,73\text{m}^{-2}$ ) apresentam maiores concentrações séricas de colesterol total, triglicérides e apoB, e menor concentração sérica de HDL-C (Tolonen *et al.*, 2008). Concomitantemente, pacientes com DM tipo 1, que se submetem à insulinoterapia intensiva, podem apresentar aumento de gordura abdominal pelo uso de doses supra-fisiológicas de insulina. Essa gordura abdominal, associada à herança genética, pode promover elevação da resistência insulínica (Kilpatrick *et al.*, 2007). Também estão relacionados ao aumento da resistência insulínica o descontrole glicêmico crônico, que via glicotoxicidade eleva a resistência em tecidos periféricos (Thorn *et al.*, 2005), e as complicações crônicas, principalmente a nefropatia diabética (Thorn *et al.*, 2005).

Nos pacientes com DM tipo 1 há evidências que a concentração sérica elevada de HDL-C é um marcador de proteção contra o desenvolvimento de nefropatia diabética (Molitch *et al.*, 2006). Por sua vez, pacientes com nefropatia diabética e queda da função renal apresentam redução da concentração sérica de HDL-C (Tolonen *et al.*, 2008).

#### 1.5 IMPORTÂNCIA DE ESTUDOS ESPECÍFICOS DA LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE EM PACIENTES COM *DIABETES MELLITUS* TIPO 1

Enquanto a associação epidemiológica entre a concentração plasmática de HDL-C e a mortalidade por infarto agudo do miocárdio é muito clara, estudos que avaliem a funcionalidade da HDL em pacientes com DM tipo 1 são escassos. Pesquisas envolvendo pacientes com DM são predominantemente realizadas com DM tipo 2. No entanto, os resultados sobre funcionalidade da HDL dos pacientes com DM tipo 2 não podem ser generalizados para os pacientes com DM tipo 1, pois essas duas doenças têm fisiopatogênias

distintas. Deste modo, necessita-se de estudos que avaliem especificamente as propriedades funcionais da HDL em pacientes com DM tipo 1.

Um dos modelos existentes é a avaliação da atividade antioxidante da HDL na proteção de oxidação da LDL catalisada por íons metálicos. Tal modelo busca informações *in vitro*, associando-as à hipótese da modificação oxidativa. Uma vez que a microalbuminúria é um reconhecido marcador de lesão endotelial, avaliar a funcionalidade da HDL de pacientes com DM tipo 1 e nefropatia incipiente permitirá estudar o impacto desta complicação microvascular na atividade da HDL.

## 2 OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi avaliar a ação antioxidante da HDL2 e HDL3 oriundas de homens caucasianos com DM tipo 1 normoalbuminúricos e microalbuminúricos em ensaios de oxidação de LDL catalisada por cobre *in vitro*.

### 3 PACIENTES E MÉTODOS

#### 3.1 PACIENTES

##### 3.1.1 Ética

O estudo está de acordo com as normas internacionais propostas para investigação clínica da Declaração de Helsinki. O presente protocolo e o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1) foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil, parecer número CEP 025/09 (Anexo 1).

##### 3.1.2 População e Amostragem

Avaliaram-se lipoproteínas procedentes de pacientes com DM tipo 1 residentes no município de Londrina, Paraná, em tratamento no Ambulatório Multiprofissional de Diabetes tipo 1 do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Londrina e de indivíduos controles saudáveis. O processo de amostragem foi por conveniência e ocorreu no primeiro semestre de 2011. Alocaram-se 30 participantes em 3 grupos com as seguintes características: controles, DM tipo 1 normoalbuminúricos (albuminúria menor que 30 mg em 24 horas) e DM tipo 1 microalbuminúricos (albuminúria entre 30 e 300 mg em 24 horas). Os pacientes normoalbuminúricos nunca apresentaram albuminúria maior que 30 mg em 24 horas nas avaliações laboratoriais progressas, e os pacientes microalbuminúricos apresentavam albuminúria persistente entre 30 e 300 mg em 24 horas há pelo menos um ano.

##### 3.1.3 Critérios de Inclusão

Apenas homens caucasianos com idade entre 18 e 40 anos foram incluídos. Definiu-se neste estudo como DM tipo 1 a doença caracterizada por hiperglicemia com início antes dos 40 anos, tornando-se insulino dependente no primeiro ano de diagnóstico. Para caracterização diagnóstica avaliaram-se variáveis como antecedente de cetoacidose diabética, ausência de *acanthosis nigricans* e achados bioquímicos (peptídeo C plasmático, anticorpos contra insulina, descarboxilase do ácido glutâmico e tirosina fosfatase). Apenas pessoas

hígidas, sem antecedente prévio de doença metabólica, participaram do grupo controle.

#### 3.1.4 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os participantes que apresentaram:

- Hemoglobina A1c (HbA1c) maior que 10%. Apesar do objetivo terapêutico, internacionalmente divulgado, ser a concentração de HbA1c menor que 7% (American Diabetes Association, 2012), optamos por excluir apenas pacientes com concentrações acima de 10%, porque estudo pregresso evidenciou que a média da concentração de HbA1c dos pacientes com DM tipo 1, na instituição estudada, era de 8,9% (Sampaio e Delfino, 2008).
- Albuminúria maior que 300 mg em 24 horas ou proteinúria positiva em urinálise. O objetivo deste critério foi excluir os pacientes classificados como macroalbuminúricos (American Diabetes Association, 2012).
- Antecedente de doença cardiovascular que caracterize potencial manifestação clínica de aterosclerose, como angina, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral ou claudicação intermitente.
- Dislipidemia com LDL maior que 160 mg/dL, triglicérides maior que 400 mg/dL ou estar em uso de hipolipemiante (estatina, fibratos, ácido nicotínico, sequestrante de ácido biliar ou ezetimibe). Objetivou-se com este critério excluir pacientes fontes de amostras lipêmicas e viés por uso de medicamento hipolipemiante.
- Tabagismo atual ou pregresso.
- Índice de massa corporal menor que 18 ou maior que 30 kg/m<sup>2</sup>.
- Participante controle com glicemia de jejum maior ou igual a 100 mg/dL. A escolha desta concentração baseou-se no ponto de corte para o diagnóstico de glicemia de jejum alterada (American Diabetes Association, 2012).

#### 3.1.5 Tamanho e Poder da Amostra

O estudo foi planejado considerando-se hipoteticamente uma distribuição normal da concentração de LOOH, variável de desfecho do estudo, e homogeneidade da

variância dos grupos, com desvio padrão de 3 mmol/mg de LDL, obtido em ensaio piloto. Estimou-se que a participação de 10 pessoas em cada um dos três grupos fosse capaz de discriminar uma diferença entre os grupos de 4,4 mmol/mg de LDL com significância de 5% e poder de 80%, segundo programa Minitab 16 para plataforma Windows, versão 16.2.0, Estados Unidos.

## 3.2 PROTOCOLO DO ESTUDO

### 3.2.1 Recrutamento

Os pacientes foram abordados ao término de suas consultas médicas periódicas no período de janeiro a junho de 2011. Após apresentação da pesquisa e firmado o termo de consentimento livre e esclarecido, aqueles que aceitaram o convite foram entrevistados. Estes receberam orientação oral, desenhada e escrita de como e quando realizar a coleta de urina de 24 horas e a data para coleta de sangue (Apêndice 2).

### 3.2.2 Avaliação Clínica

Variáveis clínicas como idade, tempo de diagnóstico, insulinoterapia e medicações orais foram coletadas. Peso e altura foram medidos em posição ortostática com balança digital Filizola e antropômetro, respectivamente. O índice de massa corpórea foi calculado como peso em kilogramas dividido pelo quadrado da altura em metros.

A medida da circunferência da cintura e do quadril foi realizada com auxílio de fita métrica flexível inelástica de 0,5 cm de largura e 1,5 m de comprimento, com precisão de 1 mm. Realizou-se o procedimento com paciente em posição ortostática com abdômen relaxado e braços descontraídos ao lado do corpo. A circunferência da cintura foi medida com a fita sobre a pele, todavia sem compressão dos tecidos, no ponto médio entre a crista ilíaca superior e o bordo inferior da última costela palpável. O quadril foi medido na circunferência da maior saliência das nádegas. A relação cintura quadril foi calculada pela razão entre a medida da circunferência da cintura e do quadril (World Health Organization, 2008).

A avaliação da resistência insulínica foi realizada pelo cálculo da estimativa da taxa de disponibilização de glicose (eGDR), segundo equação adaptada para uso com HbA1c por Thorn e colaboradores (2005), que é oriunda da estimativa originalmente descrita por Williams e colaboradores (2000).

**Quadro 1.** Estimativa da taxa de disponibilização de glicose (eGDR).

$$eGDR = 24,4 - 12,97 \cdot RCQ - 3,39 \cdot HAS - 0,60 \cdot HbA1c$$

Sendo: RCQ: relação cintura quadril

HAS: pressão arterial  $\geq 140/90$ mmHg e/ou

uso de anti-hipertensivo (sim = 1, não = 0)

HbA1c: hemoglobina glicada A1c

A mensuração da pressão arterial foi realizada por método auscultatório, estando o paciente sentado, com auxílio de coluna de mercúrio de acordo com as orientações das Sociedades Brasileiras de Cardiologia, Hipertensão e Nefrologia (2010). Os pacientes em uso de medicação anti-hipertensiva foram considerados como hipertensos, independente dos níveis pressóricos apresentados na avaliação clínica.

### 3.2.3 Coleta de Sangue e Urina de 24 Horas

Amostras de sangue foram coletadas com agendamento prévio, entre sete e oito horas da manhã, após jejum de oito horas e antes da administração matinal de insulina dos pacientes com DM tipo 1. A coleta foi executada com tubos de sistema a vácuo BD Vacutainer (Estados Unidos). Para isolamento de lipoproteínas e mensuração de HbA1c o sangue foi coletado em tubos contendo 4,5 mM K<sub>2</sub>EDTA. Imediatamente após a coleta, os tubos foram suavemente homogeneizados por inversão e armazenados em caixa isolante térmica com gelo, encaminhados prontamente para processamento.

Não se realizou recomendações específicas sobre ingestão hídrica ou alimentar durante a coleta da urina de 24 horas, mas foi solicitado evitar exercícios físicos durante o procedimento. Após descartar a urina da primeira micção matinal, o paciente deveria armazenar toda a diurese por 24 horas, incluindo a urina da micção ao término do período. A coleta urinária deveria ser postergada na presença de febre (temperatura maior que 38 °C), sintomas irritativos urinários (disúria, polaciúria ou urgência miccional), anormalidades urinárias macroscópicas (turbacão urinária) ou descontrole da pressão arterial (sistólica maior que 160 mmHg ou diastólica maior que 100 mmHg). As coletas de urina de 24 horas nas quais a creatinúria foi menor que 20 mg/kg/dia foram consideradas incompletas e solicitou-se nova coleta (Pollack, 1970; Sampaio e Delfino, 2008).

### 3.2.4 Exames Laboratoriais Basais

A glicemia e as concentrações de colesterol total, HDL-C, triglicérides e creatinina foram quantificados no plasma por ensaios colorimétricos, método também empregado para mensuração da creatinúria. A concentração de HbA1c foi avaliada por imunoturbidimetria. Os ensaios foram realizados no analisador automático Dimension RXL (Estados Unidos), com reagentes procedentes de Siemens Healthcare Diagnostics Incorporation (Estados Unidos). A albuminúria foi determinada por imunoturbidimetria, autoanalisador Cobas Mira Plus (Alemanha), reagente procedente de Aptec Diagnóstics (Bélgica). A concentração de colesterol não HDL foi calculada pela diferença entre as concentrações de colesterol total e de HDL-C. O cálculo da concentração de colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) foi realizado pela equação de Friedewald (Friedewald *et al.*, 1972). A taxa de filtração glomerular foi estimada de acordo com a equação do estudo MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*) simplificada (Levey *et al.*, 2000).

#### **Quadro 2.** Equação do estudo MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*) simplificada.

$$186,3 \cdot (\text{creatinina sérica em mg/dl})^{-1,154} \cdot (\text{idade em anos})^{-0,203} \cdot 1,212 (\text{se negro}) \cdot 0,742 (\text{se sexo feminino})$$

### 3.2.5 Isolamento de Lipoproteínas

As lipoproteínas foram isoladas por separação via diferença de densidade com gradiente salino descontínuo de brometo de potássio (KBr) por ultracentrifugação, adaptado a partir da descrição de Redgrave e colaboradores (1975). Para obtenção do plasma o sangue total com 4,5mM EDTA foi submetido à centrifugação, sob refrigeração (4°C), rotação 2.600 RPM, 20 minutos, resultando em uma força centrífuga relativa de 1.000 g (centrífuga Excelsa 4 modelo 280R Fanem, Brasil). Após a separação do plasma, o mesmo foi transferido para tubos cônicos. Ainda sob refrigeração com gelo, adicionaram-se os seguintes conservantes: 300 µM de cloranfenicol (Ariston, Brasil), 100 µM de gentamicina (Novafarma Indústria Farmacêutica, Brasil), 10 µM de benzamidina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), 7,7 µM de aprotinina de pulmão bovino (Sigma-Aldrich) e 0,25 µM de fluoreto de fenil metila sulfonila (Sigma-Aldrich).

A densidade do plasma foi ajustada com adição de KBr (Nuclear, Brasil)

325 mg por mL de plasma, atingindo 1,21 g/mL. Soluções de KBr com densidades de 1,063 g/mL, 1,019 g/mL e 1,006 g/mL foram previamente preparadas, com pH ajustado para 7,4 com auxílio do pHmetro Tecnal (Brasil). A densidade das soluções e do gradiente foram avaliadas com o densímetro digital Density Meter DE40 Mettler (Suíça), célula leitora com temperatura de 4 °C. O gradiente foi montado diretamente em tubos de polipropileno (Kendro laboratory, Estados Unidos), capacidade de 12 mL, dimensões 14 x 89 mm, próprios para o rotor tipo caçamba móvel modelo TH 641 Sorvall. O gradiente foi montado com auxílio de seringas (capacidade de 3 mL) e cânulas, ambas de polipropileno, e uma estante móvel, com sobreposição cuidadosa para minimizar a mistura das fases. Inicialmente, depositou-se 4 mL de plasma com densidade 1,21 g/mL no fundo do tubo, seguido por fases salinas: 3 mL de KBr densidade 1,063 g/mL, 3 mL de KBr densidade 1,019 g/mL e 1,5 mL de KBr densidade 1,006 g/mL.

As amostras foram submetidas à ultracentrifugação em centrífuga Sorvall Ultra Pro 80 (Estados Unidos) com rotor tipo caçamba móvel modelo TH 641 Sorvall (Kendro laboratory, Estados Unidos), 38.000 RPM, temperatura de 4 °C, por 27 horas, força centrífuga relativa de 280.000 g. Ao término da ultracentrifugação, as fases foram submetidas à aspiração sequencial, com uma fina cânula conectada a um tubo cônico graduado, ligado a um sistema de aspiração com pressão negativa de 2 kPa. Isolaram-se as seguintes lipoproteínas, partindo da região superior (menor densidade) do gradiente, para os respectivos volumes aspirados: 2mL iniciais VLDL, 3,5 mL LDL, 2mL HDL2 e 1 mL HDL3.

A composição das frações isoladas foi realizada pela dosagem de colesterol e triglicérides, em analisador automático Dimension RXL, e a dosagem de proteína seguiu a técnica descrita por Lowry e colaboradores (1951). Para prevenir interferências por contaminação de amostras de HDL3 com albumina do infranadante, foram refeitos os isolamentos das amostras de HDL3 que apresentaram concentrações protéicas maiores que 5 mg/mL. As amostras foram armazenadas em freezer (Indrel 70 R, Brasil) a -70 °C, por período máximo de 90 dias. As LDL utilizadas nos experimentos de oxidação não foram submetidas a congelamento, sendo conservadas a 4 °C.

### 3.2.6 Avaliação da Separação de Lipoproteínas

A avaliação da separação foi realizada por cromatografia (cromatógrafo FPLC system, Suíça) em coluna superose 6 10/300 GL, sendo a fase móvel tampão Tris pH 7,0. Utilizou-se como padrão lipoproteínas VLDL, LDL e HDL separadas por

ultracentrifugação sequencial na ultracentrífuga L-8 Beckman (Estados Unidos) com rotor de ângulo fixo 50 ti conforme a técnica descrita por Havel e colaboradores (1955). Alíquotas de 100 µL de plasma total ou lipoproteína isolada foram impelidas pela fase móvel sob fluxo contínuo de 0,5 mL/min. Realizou-se leitura da densidade óptica em 280 nm do eluído pós coluna, que foi fracionado por coletor automático em alíquotas de 0,5 mL. As quantificações das concentrações de colesterol e triglicérides foram realizadas por métodos enzimáticos com leitura colorimétrica no aparelho Cobas Mira plus.

### 3.2.7 Avaliação da Atividade Antioxidante da Lipoproteína de Alta Densidade

LDL frescas isoladas de homens saudáveis e alíquotas de HDL2 e HDL3 foram dialisadas contra tampão fosfato salino (NaCl 120 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 14 mM, pH 7,4), por 24 horas, temperatura de 4 °C, na ausência de luz, numa proporção de 1 volume de amostra para 1000 volumes de tampão.

Os ensaios de oxidação foram realizados imediatamente ao término da diálise. Estes foram projetados, em ensaios pilotos, para que a concentração *in vitro* apresentasse uma proporcionalidade com a concentração plasmática de LDL-C e HDL-C dos pacientes participantes do estudo. A referência para alíquotagem das amostras foi a concentração de proteína das mesmas. Nos tubos controles foram incubadas apenas 250 µg/mL de LDL *pool* fresca e nos tubos para avaliação de proteção oxidativa foram incubadas 250 µg/mL de LDL *pool* fresca mais 500 µg/mL de HDL de pacientes, adicionando-se em todos 5 µM de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) e tampão fosfato salino para completar um volume final de 500 µL. Os tubos foram acondicionados na temperatura de 37 °C, na ausência de luz, por três horas. Ao término desse período uma amostra do conteúdo de cada tubo foi alíquotada para dosagem de LOOH. A concentração média de colesterol presente nessas reações foi 44,6 mg/dL de LDL-C, 21,6 mg/dL de HDL2-C e 11,3 mg/dL de HDL3-C, o que gera uma proporção de LDL-C:HDL-C de 100 mg:48 mg nas incubações com HDL2 e 100 mg:25 mg naquelas com HDL3.

Neste trabalho, denominou-se como percentual de proteção antioxidante a diferença percentual entre a dosagem de LOOH após três horas da incubação somente de LDL (controle) e da coincubação LDL (controle) mais HDL (paciente).

### 3.2.8 Dosagem de Lipídios Hidroperoxidados

As dosagens de LOOH foram realizadas de acordo com a técnica de Jiang e colaboradores (1992). Em resumo, alíquotas de 100  $\mu$ L da mistura oxidada representavam a amostra a ser avaliada, a esta se adicionou 900  $\mu$ L do reagente de FOX, composto por 100  $\mu$ M de *o*-cresolsulfoneftaleína-3'-3'-bis-(ácido metil iminodiacético sódico) também denominado *xylenol orange* (Acros Organics, Bélgica), 250  $\mu$ M de sulfato ferroso de amônio hexahidratado ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Labsynth Produtos para laboratórios Ltda, Brasil), 25 mM de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (Nuclear, Brasil), 4 mM de di-terc-butil metil fenol (BHT) (Vetec Química Fina Ltda, Brasil) em 90% (volume/volume) de metanol (Nuclear, Brasil). A reação foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e, ao término desse período, centrifugada a 3.000 RPM, força centrífuga relativa de 1.600g, por 10 minutos (centrífuga Evlab Macro Ev04, Brasil). Realizamos a leitura do sobrenadante em um espectrofotômetro (Thermo Spectronic Helios Alfa, Estados Unidos) com comprimento de luz de 560 nm.

### 3.2.9 Análise Estatística

As variáveis contínuas foram expressas como média  $\pm$  desvio padrão. A normalidade da distribuição das variáveis clínicas e laboratoriais estudadas foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A diferença entre as médias dos grupos que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, segundo o teste de Barlett, foi pesquisada pela análise de variância (*one way* ANOVA). Nos casos em que os pressupostos não foram preenchidos (relação cintura quadril, glicemia de jejum, HbA1c, albuminúria, LOOH e percentual de proteção antioxidante), optou-se por avaliação não paramétrica com o teste de Kruskal-Wallis e, quando significativo, o pós-teste de Dunn.

A comparação da atividade entre HDL2 e HDL3 foi realizada por teste *t* para amostras pareadas e, nas demais pesquisas de diferenças entre médias, teste *t* para amostras independentes. A associação entre os grupos normoalbuminúrico, microalbuminúrico e o uso de análogo de insulina foi avaliada pelo teste exato de Fisher. A correlação entre eGDR e LOOH foi avaliada pelo coeficiente de Spearman. Utilizou-se análise de regressão para pesquisar a função que descreve a distribuição da densidade no gradiente após a centrifugação, empregou-se a análise de variância e o coeficiente de determinação para estudar a aderência da função calculada aos dados experimentais.

Determinou-se como ponto de corte de significância para o erro tipo I ( $\alpha$ ) o

valor de 5% bicaudal. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism versão 4.02, Estados Unidos.

#### 4 ARTIGOS

Baseado nesta tese produziu-se de dois artigos. Devido à transferência dos direitos desses para os periódicos aos quais foram submetidos, as informações deverão ser acessadas diretamente nos periódicos indexados. A busca dos mesmos pode ser realizada através dos títulos:

- Impaired antioxidant action of high density lipoprotein from male type 1 diabetic patients with normoalbuminuria and microalbuminuria.
- Adaptações e padronização da técnica de separação de lipoproteínas plasmáticas por ultracentrifugação em gradiente descontínuo.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nesta tese produziu-se de dois artigos. Devido à transferência dos direitos desses para os periódicos aos quais foram submetidos, as informações deverão ser acessadas diretamente nos periódicos indexados. A busca dos mesmos pode ser realizada através dos títulos:

- Impaired antioxidant action of high density lipoprotein from male type 1 diabetic patients with normoalbuminuria and microalbuminuria.
- Adaptações e padronização da técnica de separação de lipoproteínas plasmáticas por ultracentrifugação em gradiente descontínuo.

Uma vez que a atividade antioxidante é apenas uma das funções associadas a HDL, há necessidade de novos estudos complementares que avaliem se as funções anti-inflamatória e antitrombótica estão prejudicadas nos pacientes com DM tipo 1. Também permanece incógnita a importância da avaliação da atividade da HDL *in vitro* como critério para introdução precoce de intervenções antiaterogênicas nessa população.

## REFERÊNCIAS

- Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJ, Durrington PN. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(11):1812-8.
- American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes - 2012. *Diabetes Care* 2012;35 Suppl 1:S11-63.
- Assmann G, Gotto AM, Jr. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109(23 Suppl 1):III8-14.
- Barr DP, Russ EM, Eder HA. Protein-lipid relationships in human plasma. II. In atherosclerosis and related conditions. *Am J Med* 1951;11(4):480-93.
- Blix G, Tiselius A, Svensson H. Lipids and polysaccharides in electrophoretically separated blood serum proteins. *J Biol Chem* 1941;137:485-94.
- Boemi M, Leviev I, Sirolla C, Pieri C, Marra M, James RW. Serum paraoxonase is reduced in type 1 diabetic patients compared to non-diabetic, first degree relatives; influence on the ability of HDL to protect LDL from oxidation. *Atherosclerosis* 2001;155(1):229-35.
- Camejo G, Hurt-Camejo E, Rosengren B, Wiklund O, Lopez F, Bondjers G. Modification of copper-catalyzed oxidation of low density lipoprotein by proteoglycans and glycosaminoglycans. *J Lipid Res* 1991;32(12):1983-91.
- Castro GR, Fielding CJ. Evidence for the distribution of apolipoprotein E between lipoprotein classes in human normocholesterolemic plasma and for the origin of unassociated apolipoprotein E (Lp-E). *J Lipid Res* 1984;25(1):58-67.
- Cheung MC, Albers JJ. Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography. Particles containing A-I and A-II and particles containing A-I but no A-II. *J Biol Chem* 1984;259(19):12201-9.
- Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 2000;28(12):1815-26.

Davidson WS, Silva RA, Chantepie S, Lagor WR, Chapman MJ, Kontush A. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29(6):870-6.

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. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 1993;329(14):977-86.

Dengel DR, Goldberg AP, Mayuga RS, Kairis GM, Weir MR. Insulin resistance, elevated glomerular filtration fraction, and renal injury. *Hypertension* 1996;28(1):127-32.

Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, Thompson A, *et al.* Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA* 2009;302(18):1993-2000.

Dogra G, Rich L, Stanton K, Watts GF. Endothelium-dependent and independent vasodilation studies at normoglycaemia in type I diabetes mellitus with and without microalbuminuria. *Diabetologia* 2001;44(5):593-601.

Dullaart RP. Plasma lipoprotein abnormalities in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Neth J Med* 1995;46(1):44-54.

Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(4):473-80.

Fisher M. Diabetes and atherogenesis. *Heart* 2004;90(3):336-40.

Fogelman AM, Shechter I, Seager J, Hokom M, Child JS, Edwards PA. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77(4):2214-8.

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.

Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, Zinman B, Dinneen SF, Hoogwerf B, *et al.* Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA* 2001;286(4):421-6.

- Gofman JW, Lindgren FT, Elliott H. Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J Biol Chem* 1949;179(2):973-9.
- Goldstein JL, Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1977;46:897-930.
- Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76(1):333-7.
- Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, *et al.* High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989;79(1):8-15.
- Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977;62(5):707-14.
- Greaves DR, Gordon S. The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S282-6.
- Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955;34(9):1345-53.
- Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78(10):6499-503.
- Hirowatari Y, Yoshida H, Kurosawa H, Doumitu KI, Tada N. Measurement of cholesterol of major serum lipoprotein classes by anion-exchange HPLC with perchlorate ion-containing eluent. *J Lipid Res* 2003;44(7):1404-12.
- Homma Y. Separation of plasma lipoproteins. *J Atheroscler Thromb* 2006;13(6):336.
- Huang JM, Huang ZX, Zhu W. Mechanism of high-density lipoprotein subfractions inhibiting copper-catalyzed oxidation of low-density lipoprotein. *Clin Biochem* 1998;31(7):537-43.

Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem* 1992;202(2):384-9.

Kilpatrick ES, Rigby AS, Atkin SL. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and complication risk in type 1 diabetes: "double diabetes" in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* 2007;30(3):707-12.

Klimov AN, Gurevich VS, Nikiforova AA, Shatilina LV, Kuzmin AA, Plavinsky SL, *et al.* Antioxidative activity of high density lipoproteins in vivo. *Atherosclerosis* 1993;100(1):13-8.

Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(10):1881-8.

Kunitake ST, Jarvis MR, Hamilton RL, Kane JP. Binding of transition metals by apolipoprotein A-I-containing plasma lipoproteins: inhibition of oxidation of low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(15):6993-7.

Kunitake ST, Kane JP. Factors affecting the integrity of high density lipoproteins in the ultracentrifuge. *J Lipid Res* 1982;23(6):936-40.

Lekakis J, Papamichael C, Anastasiou H, Alevizaki M, Desses N, Souvatzoglou A, *et al.* Endothelial dysfunction of conduit arteries in insulin-dependent diabetes mellitus without microalbuminuria. *Cardiovasc Res* 1997;34(1):164-8.

Levey AS, Greene T, Kusek JW, Beck GJ, MDRD Study Group. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine [abstract]. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:155A.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.

Lydakis C, Lip GY. Microalbuminuria and cardiovascular risk. *QJM* 1998;91(6):381-91.

MacIsaac RJ, Jerums G, Cooper ME. New insights into the significance of microalbuminuria. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004;13(1):83-91.

Mackness MI, Abbott C, Arrol S, Durrington PN. The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem J* 1993a;294 ( Pt 3):829-34.

Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 1993b;104(1-2):129-35.

Mackness MI, Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 1995;115(2):243-53.

Mackness MI, Durrington PN, Ayub A, Mackness B. Low serum paraoxonase: a risk factor for atherosclerotic disease? *Chem Biol Interact* 1999;119-120:389-97.

Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, *et al.* Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1991;86(2-3):193-9.

Mathers CD, Boerma T, Ma Fat D. Global and regional causes of death. *Br Med Bull* 2009;92:7-32.

Mattock MB, Cronin N, Cavallo-Perin P, Idzior-Walus B, Penno G, Bandinelli S, *et al.* Plasma lipids and urinary albumin excretion rate in Type 1 diabetes mellitus: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabet Med* 2001;18(1):59-67.

McFarlane C, Young IS, Hare L, Mahon G, McEneny J. A rapid methodology for the isolation of intermediate-density lipoprotein: characterization of lipid composition and apoprotein content. *Clin Chim Acta* 2005;353(1-2):117-25.

Molitch ME, Rupp D, Carnethon M. Higher levels of HDL cholesterol are associated with a decreased likelihood of albuminuria in patients with long-standing type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29(1):78-82.

Molitch ME, Steffes M, Sun W, Rutledge B, Cleary P, de Boer IH, *et al.* Development and progression of renal insufficiency with and without albuminuria in adults with type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial and the epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Diabetes Care* 2010;33(7):1536-43.

- Nagata Y, Yamamoto Y, Niki E. Reaction of phosphatidylcholine hydroperoxide in human plasma: the role of peroxidase and lecithin:cholesterol acyltransferase. *Arch Biochem Biophys* 1996;329(1):24-30.
- Ohta T, Takata K, Horiuchi S, Morino Y, Matsuda I. Protective effect of lipoproteins containing apoprotein A-I on Cu<sup>2+</sup>-catalyzed oxidation of human low density lipoprotein. *FEBS Lett* 1989;257(2):435-8.
- Orchard TJ, Chang YF, Ferrell RE, Petro N, Ellis DE. Nephropathy in type 1 diabetes: a manifestation of insulin resistance and multiple genetic susceptibilities? Further evidence from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complication Study. *Kidney Int* 2002;62(3):963-70.
- Pedersen KO. On a low-density lipoprotein appearing in normal human plasma. *J Phys Colloid Chem* 1947;51(1):156-63.
- Pollack H. Creatinine excretion as index for estimating urinary excretion of micronutrients or their metabolic end products. *Am J Clin Nutr* 1970;23(7):865-7.
- Redgrave TG, Roberts DC, West CE. Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation. *Anal Biochem* 1975;65(1-2):42-9.
- Rezaee F, Casetta B, Levels JH, Speijer D, Meijers JC. Proteomic analysis of high-density lipoprotein. *Proteomics* 2006;6(2):721-30.
- Rohrer L, Hersberger M, von Eckardstein A. High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2004;15(3):269-78.
- Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-26.
- Rudel LL, Lee JA, Morris MD, Felts JM. Characterization of plasma lipoproteins separated and purified by agarose-column chromatography. *Biochem J* 1974;139(1):89-95.
- Ruggenenti P, Remuzzi G. Time to abandon microalbuminuria? *Kidney Int* 2006;70(7):1214-22.

Sakuma N, Yoshikawa M, Hibino T, Ohte N, Kamiya T, Kunimatsu M, *et al.* HDL3 exerts a more powerful antiperoxidative and protective effect against peroxidative modification of LDL than HDL2 does. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2002;48(4):278-82.

Sampaio E, Delfino VD. Assessing albuminuria in spot morning samples from diabetic patients. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2008;52(9):1482-8.

Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Brazilian Guidelines on Hypertension. *Arq Bras Cardiol* 2010;95(1 Suppl):1-51.

Soedamah-Muthu SS, Fuller JH, Mulnier HE, Raleigh VS, Lawrenson RA, Colhoun HM. High risk of cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes in the U.K.: a cohort study using the general practice research database. *Diabetes Care* 2006;29(4):798-804.

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(14):915-24.

Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;84(4):1381-478.

Sviridov D, Mukhamedova N, Remaley AT, Chin-Dusting J, Nestel P. Antiatherogenic functionality of high density lipoprotein: how much versus how good. *J Atheroscler Thromb* 2008;15(2):52-62.

Thorn LM, Forsblom C, Fagerudd J, Thomas MC, Pettersson-Fernholm K, Saraheimo M, *et al.* Metabolic syndrome in type 1 diabetes: association with diabetic nephropathy and glycemic control (the FinnDiane study). *Diabetes Care* 2005;28(8):2019-24.

Tolonen N, Forsblom C, Thorn L, Waden J, Rosengard-Barlund M, Saraheimo M, *et al.* Relationship between lipid profiles and kidney function in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 2008;51(1):12-20.

Tribble DL, Chu BM, Gong EL, van Venrooij F, Nichols AV. HDL antioxidant effects as assessed using a nonexchangeable probe to monitor particle-specific peroxidative stress in LDL-HDL mixtures. *J Lipid Res* 1995;36(12):2580-9.

Verdery RB, Benham DF, Baldwin HL, Goldberg AP, Nichols AV. Measurement of normative HDL subfraction cholesterol levels by Gaussian summation analysis of gradient gels. *J Lipid Res* 1989;30(7):1085-95.

Vergeer M, Holleboom AG, Kastelein JJ, Kuivenhoven JA. The HDL hypothesis: does high-density lipoprotein protect from atherosclerosis? *J Lipid Res* 2010;51(8):2058-73.

Wagner KH, Brath H. A global view on the development of non communicable diseases. *Prev Med* 2011.

Watson AD, Navab M, Hama SY, Sevanian A, Prescott SM, Stafforini DM, *et al.* Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995;95(2):774-82.

Williams KV, Erbey JR, Becker D, Arslanian S, Orchard TJ. Can clinical factors estimate insulin resistance in type 1 diabetes? *Diabetes* 2000;49(4):626-32.

World Health Organization. Methods for measuring waist and hip circumference. In: *Waist circumference and waist-hip ratio: report of a WHO expert consultation*. Geneva; 2008. p. 39.

Young CE, Karas RH, Kuvin JT. High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease. *Cardiol Rev* 2004;12(2):107-19.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

Hospital Universitário Universidade Estadual de Londrina

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****I – DADOS SOBRE A PESQUISA CLÍNICA**

1. Título do Protocolo de Pesquisa:

**AÇÃO ANTIOXIDANTE DA HDL EM PACIENTES COM *DIABETES MELLITUS* TIPO 1**

2. Pesquisadores:

=&gt; Coordenador responsável: professor Dr Alexandre José Faria Carrilho

=&gt; Auxiliares: Emerson Sampaio

3. Duração da Pesquisa: 36 meses

**II – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE E/OU SEU RESPONSÁVEL LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNADO:**

1. Justificativa e Objetivos da Pesquisa:

O objetivo deste estudo é avaliar se a ação antioxidante da HDL (conhecida popularmente como colesterol bom) do paciente com *diabetes mellitus* tipo 1 é semelhante a de pessoas sem diabetes.

2. Procedimentos que Serão Realizados e Propósitos:

Preenchimento de um questionário onde serão avaliados informações sobre o tipo do *diabetes mellitus*, sexo, cor, raça, tempo de doença, medicações em uso e presença de outras complicações como o comprometimento ocular, pelo *diabetes mellitus*.

Será realizada a coleta de exames laboratoriais de sangue e urina. Nas amostras de sangue serão realizadas dosagens de concentração de colesterol e suas frações, glicemia (açúcar no sangue), hemoglobina glicada e na urina será avaliada a presença de albumina (um marcador de comprometimento renal pelo diabetes). Após processamento inicial (ultracentrifugação), que será realizada no Laboratório de Pós-Graduação do Hospital Universitário de Londrina, serão realizados os ensaios de funcionalidade das lipoproteínas.

O material biológico coletado será utilizado com a finalidade específica desta pesquisa e nenhum uso adicional ocorrerá sem anuência prévia do paciente e do Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. Ao término da pesquisa, os resíduos biológicos que possam estar armazenados irão ser encaminhados ao lixo biológico hospitalar.

3. Desconfortos e Riscos Esperados:

Riscos mínimos.

Desconforto da coleta de sangue por punção venosa periférica, semelhante às coletas de sangue de rotina realizadas por pacientes com diabetes.

4. Benefícios que Poderão ser Obtidos, e Procedimentos Alternativos que Possam ser Vantajosos para o Indivíduo:

O estudo permitirá avaliar se a HDL do paciente com diabetes tem ação antioxidante igual ou diferente de pessoas sem diabetes. Este conhecimento é necessário porque a HDL tem um papel de proteção conhecido nas pessoas não diabéticas e sua capacidade de proteção em pessoas com diabetes é duvidoso, principalmente no *diabetes mellitus* tipo 1.

### **III – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:**

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Salvaguarda de confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. Assistência no HU, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

### **IV – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS:**

=> Coordenador responsável: médico professor Dr Alexandre José Faria Carrilho  
Endereço Av Robert Koch 60, Departamento de Clínica Médica, Londrina PR.  
Telefone (43) 3371 2000.

=> Emerson Sampaio. Endereço Hospital das Clínicas,. Campus Universitário,  
Rodovia Celso Garcia Cid PR 445 – Km 380. Londrina PR. Fone: (43) 3371 5772  
(HC), (43) 3371 2234 (HU), (43) 9103 2876 (celular).

### **V – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**

Este projeto de pesquisa foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, localizado no Hospital Universitário na Rua Robert Kock 60, Londrina PR, telefone (43) 3371 2490, onde poderão ser obtidos esclarecimentos que se fizerem necessários.

### **VI – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIMENTO:**

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendimento do que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

Londrina, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do sujeito ou do responsável legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

## APÊNDICE B

### Orientação para coleta laboratorial

É importante para o paciente com *diabetes mellitus* realizar avaliações periódicas da função dos rins, assim como a pesquisa de perda de proteína na urina, que é um marcador para lesão dos rins. Abaixo estão as instruções de como você deverá realizar a coleta do exame para avaliação dos rins.

- O exame deverá ser colhido o mais rápido possível, por exemplo, dentro da próxima semana.
- Não realizar exercícios físicos, como correr, nadar, ou fazer academia, um dia antes de começar a coleta do exame de urina.
- Você deverá tomar todos os seus remédios normalmente durante a coleta, como de costume.
- Caso você apresente diabetes descompensado (HGT-glicemias mais altas) ou pressão arterial mais alta do que de costume, adie a coleta em pelo menos uma semana, até que a situação volte ao normal.
- O frasco de urina deverá ser armazenado dentro da geladeira, de preferência na região inferior. O frasco poderá permanecer fora da geladeira durante curtos intervalos para a coleta de urina, ou quando for levado para o laboratório.

A coleta deverá ser realizada da seguinte forma:

- Na manhã do dia inicial da coleta, logo após acordar você irá fazer xixi normalmente no vaso sanitário, não guarde essa urina.
- Veja que horas são e a partir desse horário que você anotou irá começar a coleta da urina de 24 horas. Toda urina nas próximas 24 horas deve ser coletada e guardada no frasco de urina. Ou seja, toda a urina da manhã deste dia (exceto a primeira que foi direto no vaso sanitário), toda urina da tarde, toda urina da noite e da madrugada. Quando acordar no dia seguinte guarde a primeira urina deste novo dia no frasco também. Se o relógio mostrar que se completaram 24 horas acabou a coleta, mas se você acordou mais cedo do que de costume, fique atento, porque você só pára de coletar a urina quando der o horário anotado no dia anterior.
- Guarde o frasco de urina na geladeira no intervalo das coletas.
- Caso você perca urina diretamente no vaso, ou enquanto toma banho, a coleta não deve continuar e deverá ser recomeçada em outro dia.
- Você não pode deixar de coletar a urina mesmo que vá para o trabalho, escola ou outro local nesse dia.
- Assim, para evitar perda de urina sugerimos que você realize essa coleta numa data na qual vai permanecer mais tempo em casa, por exemplo, iniciando a coleta num dia de domingo quando não vai ter escola ou trabalhar fora.

#### **EXAME DE SANGUE E ENTREGA DO FRASCO DE URINA**

- Você deve se dirigir ao Hospital Universitário ou ao Hospital das Clínicas, onde você irá realizar a coleta de sangue. Lembre-se de levar o frasco com urina.
- O funcionário recolherá os pedidos dos exames, o frasco com urina e irá colher o seu sangue.

### PROBLEMAS DE COLETA E DE REALIZAÇÃO DOS EXAMES





- Caso não consiga coletar toda a urina, você deve desprezar a urina do frasco, lavar o frasco somente com água (não use sabão ou produtos de limpeza) e recomece a coleta em outro dia.
- Se durante a avaliação da amostra se conclua que ela é insuficiente iremos solicitar nova coleta para que a pesquisa de problemas renais seja a mais correta possível.

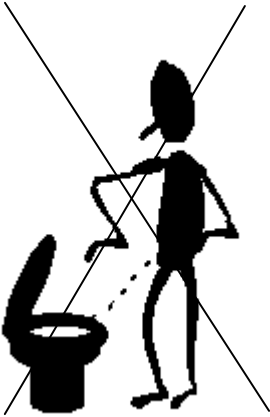
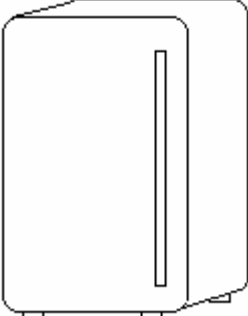
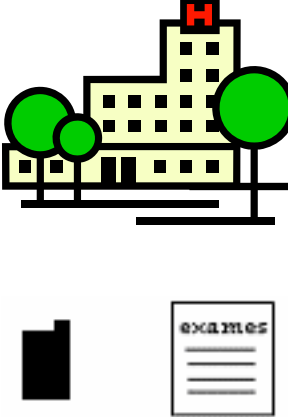

### EXEMPLO PARA A COLETA

O senhor João escolheu colher a urina no domingo.

Desde sábado e também durante o domingo, ele procurou não fazer exercício físicos intensos.

No domingo de manhã começou a coleta: jogou fora a primeira urina da manhã; anotou o horário – 7 horas – e após isso, passou a coletar toda urina durante todo o dia e toda a noite, incluindo também as vezes que levantou da cama para urinar. Na segunda-feira, levantou as 7h00 como de costume, e dessa vez guardou a primeira urina no frasco, completando a coleta da urina de 24 horas.

			
<p>Acordou às 7h00 do domingo e fez xixi no vaso sanitário. Tomou os seus remédios normalmente.</p>	<p>Após isso, passou a guardar toda a urina no frasco durante manhã, tarde e noite.</p>	<p>À noite, acordou para fazer xixi, e também guardou toda a urina no frasco.</p>	<p>Acordou às 7h00 da segunda-feira e guardou a primeira urina no frasco. Parou a coleta, pois completou 24 horas de coleta.</p>

			
<p>Só a primeira urina vai pro vaso, depois tem que guardar todas. Não faça xixi enquanto toma banho.</p>	<p>Guardar o frasco sempre dentro da geladeira.</p>	<p>No final da coleta levar o pedido dos exames e o frasco de urina para o laboratório.</p>	<p>Entregar tudo no laboratório e colher o sangue. Tomar os seus remédios normalmente.</p>

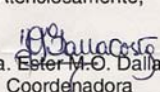
**ANEXOS**

## ANEXO A

## Parecer do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**  
 Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná  
 Registro CONEP 268

Parecer PF Nº 025/09 CAAE Nº 0036.0.268.015-09 FOLHA DE ROSTO Nº 247656	Londrina, 22 de maio de 2009.
PESQUISADOR: <b>ALEXANDRE J. F. CARRILHO</b> Depto. de Clínica Médica/CCS	
Prezado Senhor:  O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" (Registro CONEP 268)– de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:  <b>"AÇÃO ANTIOXIDANTE DA HDL EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1"</b>  Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UJEL relatório final da pesquisa.	
Situação do Projeto: <b>APROVADO</b>	
<p align="center">Atenciosamente,</p> <p align="center">           Profª. Dra. Ester M.O. Dalla Costa          Coordenadora          Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UJEL       </p>	