

Elza Maria Castilho

Correlação entre Diferentes Tipos de Hemoglobinas
(A_{1c}, A₂, Fetal e H), HDL, VLDL, LDL,
Colesterol Total, Triglicerídeos e Proteínas
Plasmáticas em Diabéticos



CORRELAÇÃO ENTRE DIFERENTES TIPOS DE HEMOGLOBINAS (A_{1c},
A₂, FETAL E H), HDL, VLDL, LDL, COLESTEROL TOTAL,
TRIGLICERIDEOS E PROTEINAS PLASMATICAS EM DIABETICOS.

Elza Maria Castilho

Dissertação apresentada
para a obtenção do grau de Mestre
em Genética no Curso de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas,
Area de Concentração em Genética,
do Instituto de Biociências, Letras
e Ciências Exatas da Universidade
Estadual Paulista "Julio de
Mesquita Filho" - Campus de São
José do Rio Preto - S.P.



625/93

612.111
C278c

São José do Rio Preto

1993



Errata

- 1) p.46, item 4, leia-se: níveis plasmáticos dos lipídeos (colesterol, triglicerídeos, HDL, LDL e VLDL).

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum
Professor Titular do Departamento
de Biologia, da Universidade
Estadual Paulista, "Júlio de
Mesquita Filho" - Campus de
São José do Rio Preto - S.P.

Dedico este trabalho aos meus pais pelo
amor, dedicação e carinho com que
me envolvem.

Ao meu orientador a minha
incondicional admiração.

Agradeço especialmente aos amigos
Efigênia, Cleuzenir, Júlio César e
Adriana Santos, sem os quais este
trabalho não seria possível.



Agradecimentos Gerais

- Aos professores Antonio Carlos Pires e Marco Antonio Dias que permitiram o desenvolvimento deste trabalho junto ao Ambulatório de Diabetes do Hospital de Base.
- À Profª . Drª. Eloiza Helena Tajara da Silva e ao Prof. Dr. José Eduardo N. Silveira pelas valiosas observações que ajudaram a arrematar este trabalho.
- Ao Prof. Dr. James R. Coleman, ao Prof. Dr. Carlos Daghljan e ao Prof. Nicolau E. Heluy Neto pelo auxílio na redação do "Summary".
- Ao Prof. Dr. Ely Nazareth Bechara pela revisão gramatical deste trabalho.
- À bibliotecária Olinda V. T. Luchezi pela amizade e atenção dispensadas.
- Às bibliotecárias Maria Helena Lima, Maria do Carmo Junqueira e Wilse T. B. A. Soares pelo excelente atendimento prestado.
- Aos amigos Luiz O. Bizzuti e Joaquim Coelho Duarte pelo auxílio na execução técnica.
- Às amigas Ana Cláudia P. Lopes e Margareth T. G. Almeida pelo incentivo em todos os momentos.
- Aos amigos do "C.E. Fé, Amor e Caridade" que não me desampararam em momento algum.
- E a todos que de uma forma ou de outra auxiliaram na execução deste trabalho.

INDICE

I. Introdução.....	1
I.1. Hemoglobinas.....	1
I.1.1. Estrutura, função, ontogenia e genética das hemoglobinas.....	1
I.1.2. Hemoglobinas anormais.....	4
I.1.2.1. Hemoglobinas variantes...	6
I.1.2.2. Talassemias.....	9
I.1.3. Hemoglobinas anormais e doen- ças eritrocitárias	15
I.2. <i>Diabetes Mellitus</i>	16
I.2.1. Diagnóstico.....	17
I.2.2. Classificação.....	18
I.2.3. Aspectos genéticos do diabetes....	20
I.2.3.1. <i>Diabetes Mellitus</i> insu- lino- dependente	20
I.2.3.2. <i>Diabetes Mellitus</i> não insulino-dependente	22
I.2.4. Prevalência.....	24
I.2.5. Homeostasia da glicose, dos lipídeos e proteínas	26
I.2.6. Fisiopatologia e complicações do <i>Diabetes Mellitus</i>	30
I.2.6.1. Metabolismo dos carboi-	

dratos em diabéticos	31
I.2.6.2. Metabolismo lipídico em diabéticos	37
I.2.7. Terapia para o diabetes.....	40
I.2.7.1. Tratamento dietético.....	40
I.2.7.2. Tratamento com hipoglice- miantes orais	42
I.2.7.3. Tratamento com insulina..	42
 I.3. Hemoglobinopatias e <i>Diabetes Mellitus</i> .	44
 II. Objetivos	46
 III. Material e Métodos.....	47
III.1. População.....	47
III.2. Métodos laboratoriais.....	47
III.2.1. Coleta do material.....	47
III.2.2. Glicose.....	48
III.2.3. Hemoglobina glicosilada.....	48
III.2.4. Fragilidade osmótica.....	51
III.2.5. Eletroforese de hemoglobi- nas pH 8,4	53
III.2.6. Dosagem de HbA ₂	55
III.2.7. Eletroforese de diferen- ciação em ágar fosfato	56

III.2.8. Dosagem de Hb Fetal.....	57
III.2.9. Pesquisa de corpos de Heinz e agregados de HbH.....	60
III.2.10. Triglicerídeos	61
III.2.11. Colesterol total.....	64
III.2.12. Frações do Colesterol.....	67
III.2.13. Proteínas totais.....	70
III.2.14. Eletroforese de proteínas..	72
III.3. Métodos Estatísticos.....	75
IV. Resultados.....	79
IV.1. Análise das variáveis isoladamente	79
IV.2. Testes de associação entre duas variáveis	135
V. Discussão.....	160
VI. Resumo.....	172
VII. Conclusões.....	174
VIII. Summary.....	177
IX. Referências Bibliográficas.....	179

I- INTRODUÇÃO

I.1. Hemoglobinas

I.1.1. Estrutura, função, ontogenia e genética das hemoglobinas

No homem, como em todos os vertebrados, o transporte de oxigênio para os tecidos é feito por intermédio de pigmento respiratório localizado no interior dos glóbulos vermelhos. O pigmento respiratório no homem é conhecido como hemoglobina (Hb) e transporta o oxigênio de forma muito mais eficiente do que as proteínas encarregadas dessa função em alguns invertebrados. A hemoglobina é uma proteína globular oligomérica, quimicamente composta pela conjunção de um pigmento, o heme, e uma proteína, a globina. O heme é um complexo formado por um átomo de ferro, situado no interior de uma estrutura porfirínica que o mantém no estado ferroso e lhe dá a cor vermelha característica. A globina é composta por dois pares de cadeias polipeptídicas, com um total de 574 aminoácidos. Na formação do tetrâmero, duas cadeias possuem 141 aminoácidos cada e são denominados por tipo alfa - alfa (α) e zeta (ζ) - e as outras duas com 146 aminoácidos cada, são conhecidas por tipo beta - beta (β), delta (δ), gama-glicina (γ^G), gama alanina (γ^A) e épsilon (ϵ) (Honig, 1986, Maniatis, 1980).

Cada molécula de hemoglobina apresenta contatos físico-químicos realizados por aminoácidos, que promovem a estabilização de sua configuração tetramerizada. Além desses contatos, existem outros fatores que participam



da movimentação da molécula durante a oxigenação. Mutações envolvendo o grupamento heme ou regiões mais internas da molécula podem permitir a entrada de água e, conseqüentemente, a oxigenação do ferro, ou ainda, essas mutações podem causar desestabilização da molécula alterando a sua afinidade pelo oxigênio (Bellinghan, 1976).

A combinação de cadeias do tipo alfa com as do tipo beta resulta em moléculas distintas de hemoglobinas, características das diversas fases do desenvolvimento humano, a saber: embrionária, fetal e adulta (Tabela 1). A primeira hemoglobina embrionária é a Hb Gower 1, que predomina nas quatro semanas iniciais de gestação. Os outros tipos de hemoglobinas presentes até a décima segunda semana são a Hb Portland e Hb Gower 2, e depois desse período não ocorre mais síntese de hemoglobinas embrionárias. Substituindo gradativamente essas hemoglobinas, a Hb Fetal começa a ser sintetizada ainda no período embrionário. A HbA é sintetizada a partir da décima semana de gestação, mantendo-se em níveis não superiores a 10% a partir da trigéssima semana, e ao nascimento as Hb Fetal e HbA atingem concentrações máximas de 80% e 20%, respectivamente. A HbA₂ começa a ser sintetizada no final do período fetal e se estabiliza no sexto mês de vida (Honig, 1986, Maniatis, 1980).

O complexo gênico que codifica as várias cadeias polipeptídicas foi mapeado no cromossomo 16 (Deisseroth, 1977). Esses genes estão fisicamente próximos e interligados, conforme ilustração gráfica representada na figura 1 (Lauer, 1980). O gene embriônico e o gene adulto codificam as cadeias alfa das hemoglobinas embriônicas,



PERÍODO	HEMOGLOBINA	SUBUNIDADE α	SUBUNIDADE β	COMPOSIÇÃO TETRAMÉRICA	CONCENTRAÇÃO
EMBRIONÁRIO	GOWER 1	ζ	ϵ	$\zeta_2\epsilon_2$	20-40%
	GOWER 2	α	ϵ	$\alpha_2\epsilon_2$	10-20%
	PORTLAND	ζ	γ	$\zeta_2\gamma_2$	5-20%
	FETAL	α	γ	$\alpha_2\gamma_2$	5-40%
FETAL	FETAL	α	γ	$\alpha_2\gamma_2$	90-100%
	A	α	β	$\alpha_2\beta_2$	0-10%
	A ₂	α	δ	$\alpha_2\delta_2$	0-1%
PÓS-NATAL	A	α	β	$\alpha_2\beta_2$	96-98%
	A ₂	α	δ	$\alpha_2\delta_2$	2,5-3,7%
	FETAL	α	γ	$\alpha_2\gamma_2$	0-1%

Tabela 1 Composição das diferentes hemoglobinas humanas.

enquanto a Hb Fetal é sintetizada pelos genes do complexo alfa e do complexo beta, que sintetizam as cadeias alfa e gama, respectivamente. Os genes alfa estão duplicados e codificam polipeptídeos idênticos, porém as porções 3' não traduzidas desses genes alfa são totalmente diferentes (Orkin, 1981). Evidências sugerem que a expressão desses dois genes pode não ser igual e uma sequência adicional no DNA, estruturalmente semelhante à dos genes alfa, foi identificada dentro do complexo do gene alfa e simbolizada por $\psi \alpha_2$. Análises da sequência de nucleotídeos indicam que essa sequência representa um "pseudogene", que não codifica um polipeptídeo globínico funcional (Lauer, 1980).

No complexo humano do gene beta, os genes estão fisicamente ligados (Sanders-Haigh, 1980). A região do complexo do gene beta envolve cerca de 60.000 nucleotídeos (60 Kb) e inclui os genes ϵ , γ , δ , β , que codificam as cadeias beta das hemoglobinas embrionárias e adultas (Figura 1). Os genes γ estão duplicados e codificam duas cadeias gama de formas diferentes: gama-glicina (γ^G) e gama-alanina (γ^A). A existência de "pseudogenes" foi apresentada, tendo sido demonstrado que esses não codificam polipeptídeos funcionais (Fritsch, 1980).

I.1.2 Hemoglobinas anormais

Hemoglobinas anormais são aquelas que apresentam estrutura diferente da HbA; podem também apresentar diferenças em relação à HbA₂ e Hb Fetal. Atualmente, existem mais de 500 tipos diferentes de



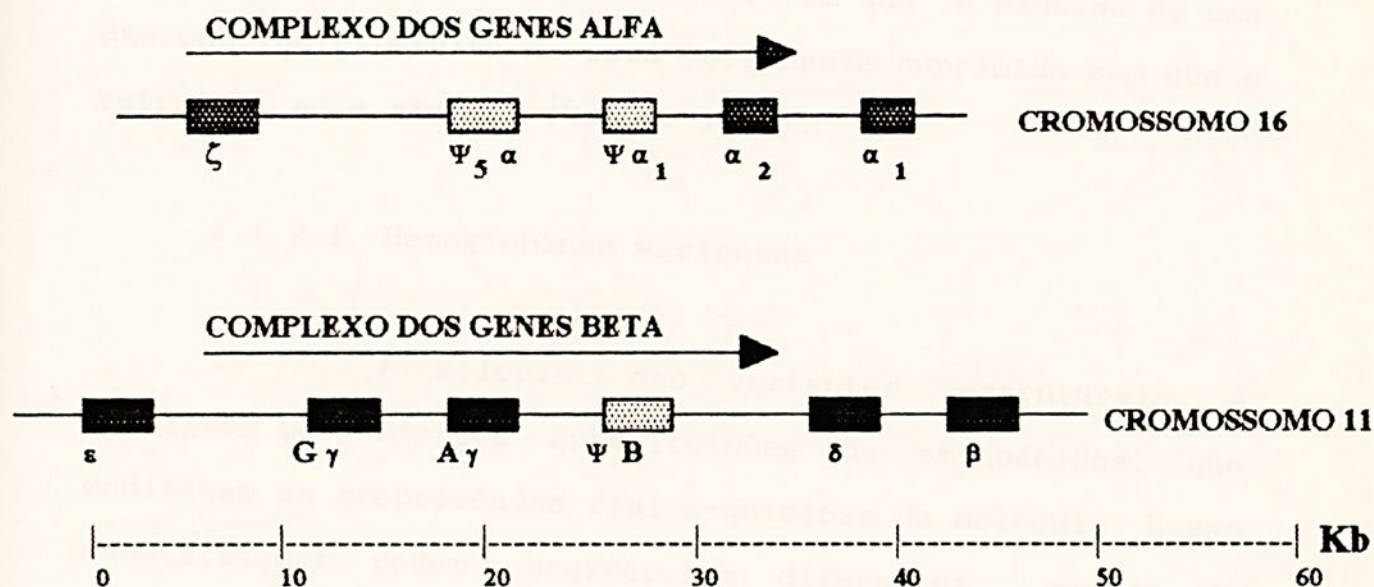


Figura 1 Organização dos genes que sintetizam as cadeias globínicas nos cromossomos 11 e 16. Os retângulos negros indicam os genes funcionantes e os cinzas os "pseudogenes" (WHO, 1982 - modificado).

hemoglobinas anormais descritas em todo o mundo. A alteração genética da estrutura ou função das cadeias alfa e beta podem causar doenças com fisiopatologias relevantes, que são diferenciadas em duas categorias: as hemoglobinas **variantes**, onde proteínas anormais são produzidas pela substituição de um ou mais aminoácidos nas cadeias polipeptídicas; e as **talassemias**, em que a síntese de uma das cadeias é parcial ou está totalmente suprimida sem que a estrutura seja afetada (Honig, 1986).

I.1.2.1. Hemoglobinas variantes

A maioria das variantes estruturais é originada por simples substituições de aminoácidos, que modificam as propriedades físico-químicas da molécula. Essas substituições podem ocorrer em diferentes pontos da molécula, a saber: na superfície externa, na superfície interna, nos contatos entre as cadeias beta (β_1 β_2), entre as cadeias alfa (α_1 α_2), entre as cadeias alfa e beta (α_1 β_1 e α_1 β_2) e nos contatos realizados entre histidinas distal e proximal com o grupo heme. Adições de aminoácidos terminais nas cadeias alfa e beta, e fusão delas também podem originar as hemoglobinas variantes (Honig, 1986, Naoum, 1984).

Essas alterações moleculares são transmitidas e herdadas de acordo com as leis mendelianas. Os indivíduos homozigotos apresentam o gene alterado em ambos os cromossomos e os heterozigotos, em apenas um dos cromossomos. Os portadores heterozigotos, geralmente, não



apresentam os sintomas da doença e são detectados por testes laboratoriais específicos (Maniatis, 1980).

- Hemoglobina S (HbS)

A variante estrutural hereditária mais conhecida no homem é a doença das células falciformes e sua distribuição é ampla, abrangendo com alta prevalência a população negra da América do Norte, do Caribe, da América Latina e da África, além de estar presente em determinadas populações da Ásia (Honig, 1986, Kan, 1989). Estima-se que no Brasil cerca de quatro milhões de pessoas sejam portadoras do traço falciforme (HbAS) e perto de quinze mil sejam portadoras da anemia falciforme - a forma homozigota da doença (HbSS) - que se manifesta por anemia grave. Inclui-se no grupo da doença das células falciformes as associações entre as hemoglobinas S e C (HbSC), a HbSD e HbS com talassemias (HbS/tal) (Naoum, 1986).

Essa variante origina-se a partir de uma mutação que ocorre no sexto aminoácido da globina beta. O aminoácido normal nessa posição é o ácido glutâmico, que na HbS é trocado por valina devido a uma permuta de bases no códon 6 do gene correspondente. Essa mudança de um único aminoácido modifica a propriedade da molécula da hemoglobina e causa sérias consequências fisiológicas. Quando essa molécula anormal encontra-se em condições de baixa tensão de oxigênio, forma-se fibrilas que fazem com que a célula se torne mais rígida, alterando a sua conformação biconcava para a forma falcizada. A rigidez e a distorção da célula falciforme constituem o principal motivo da sua destruição prematura e da anemia, porém, mais grave que isso, é o



aumento da viscosidade do sangue desoxigenado que dificulta seu fluxo através dos capilares. Essas células podem bloquear completamente os vasos, provocando dores cruciais nas crises falcizantes e lesões teciduais típicas dessa patologia. Quando a hemoglobina é reoxigenada, os polímeros dissolvem-se e a célula, geralmente, volta à sua forma normal (Alair, 1984).

- Hemoglobina C (HbC)

Essa variante é originada da substituição do resíduo número 6 da cadeia beta, o ácido glutâmico, pela lisina. A troca de um aminoácido de carga negativa (Glu) por outro de carga positiva (Lis) altera completamente a mobilidade da hemoglobina mutante, sendo facilmente diferenciável da HbA, em eletroforese de pH ácido e alcalino. A HbC é frequente entre os povos da África, especialmente na África Ocidental, onde a sua prevalência alcança valores entre 15 e 30% (Honig, 1986). No Brasil, sua prevalência média é de 0,5% (Naoum, 1986).

Os portadores heterozigotos são assintomáticos, não têm anemia e não apresentam evidências de aumento da destruição de eritrócitos. A concentração da fração C, em eletroforese de pH alcalino, é variável de 25 a 45%. O portador homozigoto (HbCC) caracteriza-se por apresentar anemia hemolítica crônica moderada e alguns sintomas clínicos; entretanto, muitos pacientes são assintomáticos. A taxa de hemoglobina permanece entre 9 e 12g%, sendo a HbC menos solúvel do que a HbA dentro dos eritrócitos e também em tampão fosfato diluído. Essa



característica físico-química da HbC permite, sob condições especiais, a visualização de cristais dentro dos eritrócitos, que são mais rígidos que os normais e consideravelmente menos deformáveis, fato esse que aumenta a viscosidade sanguínea. No entanto, o diâmetro desses eritrócitos é menor, compensando o aumento da viscosidade sanguínea e mantendo a microcirculação dentro da normalidade (Fabry, 1981, Kraus, 1956).

I.1.2.2. Talassemias

As talassemias são caracterizadas pela redução da síntese de uma ou mais cadeias globínicas provocando o desequilíbrio das globinas, com consequente precipitação intraeritrocitária da cadeia não afetada. Essas precipitações são responsáveis pelos defeitos característicos da maturação e sobrevivência das células (Honig, 1986).

As talassemias são classificadas de acordo com a cadeia globínica afetada. Os tipos mais bem definidos são α^- , β^- , $\delta\beta^-$, δ^- e $\delta\epsilon\beta$ talassemias. Ainda existe um grupo de alterações não muito bem definidas que são caracterizadas no adulto pela persistência hereditária de hemoglobina Fetal (PHHF) (Karazian, 1976, Weatherall, 1981).

- Talassemia alfa

As talassemias alfa são caracterizadas pelas deficiências parcial ou completa da síntese de cadeias globínicas alfa nos eritrócitos dos indivíduos afetados.



Essas cadeias são normalmente sintetizadas por quatro genes alfa por genoma e as talassemias alfa apresentam-se como evidências contínuas de alterações clínicas e hematológicas resultantes da deleção ou da disfunção de um a quatro desses genes. Todas essas alterações envolvem algum grau de desequilíbrio entre a síntese de cadeias alfa e beta, sendo os portadores classificados de acordo com critérios clínicos, hematológicos, bioquímicos e moleculares (Spritz, 1983, WHO, 1987).

A talassemia alfa assintomática que caracteriza o "portador silencioso" é causada pela redução da síntese de globina devido a alteração de um dos quatro genes. Uma outra forma, que também não resulta em alterações hematológicas e clínicas evidenciáveis, é causada pela alteração de dois genes alfa. Nesses casos os genes alterados podem estar localizados num mesmo cromossomo ou em cromossomos 16 diferentes. O terceiro tipo de talassemia alfa ocorre por evidentes alterações clínicas e hematológicas, manifestadas por anemia moderada, e esses casos são diagnosticados como "Doença de HbH". A relação entre a síntese de globina alfa e beta está muito reduzida, e o excesso de cadeia beta acumula-se originado tetrameros β_4 , com formação de HbH, que é facilmente evidenciável como agregado intraeritrocitário ou por eletroforese. A ausência total de síntese de cadeia alfa resulta na forma mais grave de talassemia alfa, a "Hidropsia Fetal", pois os quatros genes deixam de sintetizar globina alfa. Em consequência, por se tratar de feto ou recém nascido, a concentração de cadeia gama promove a tetramerização (γ_4) com formação de Hb Bart's. Essa



hemoglobina tem alta afinidade pelo oxigênio, liberando-o muito pouco para os tecidos. Essa condição resulta em severa hipóxia tecidual, que causa a hidropsia fetal e, conseqüentemente, a morte do feto ou recém-nato (Embury, 1980, Sophocleous, 1981, Spritz, 1983, Weatherall, 1981).

Devido à distribuição geográfica da HbH, parece que certos genótipos conferem resistência à malária. A hemoglobina é instável e tende a precipitar-se, formando inclusões intracelulares que impedem o crescimento do parasita. Dessa forma, genótipos hetero e homozigotos constituem vantagem em ambientes de malária (Bannerman, 1972, Ramsay, 1984).

A distribuição da talassemia alfa é baseada em dados obtidos pela presença de Hb Bart's em sangue de cordão umbilical, confirmados pela técnica de DNA recombinante. Na Nigéria estima-se que 5 a 11% dos indivíduos apresentem talassemia alfa (Ramsay, 1984). Na Itália e na Grécia a prevalência é de 0,1% e 0,3%, respectivamente (Fessas, 1961, Silvestroni, 1961). No Brasil, a prevalência no Estado de São Paulo é de 3,9%, dados esses obtidos por pesquisas citológicas de HbH e por meio da presença de Hb Bart's em diferentes regiões do país (Castilho, 1987, Pedrollo, 1987, Ruiz, 1986).

- Talassemia beta

As talassemias beta são bem mais heterogêneas que as talassemias alfa, caracterizando-se por alterações no gene beta, cuja consequência se resume na diminuição total ou parcial da produção de cadeias beta. Assim, as



talassemias beta são divididas em talassemia β^0 quando as cadeias não são sintetizadas e talassemia β^+ quando há redução variável na taxa de síntese. Consequentemente, as cadeias alfa, que são sintetizadas normalmente, acumulam-se nos eritrócitos causando sua agregação e precipitação, que danificam a membrana e destroem prematuramente a célula provocando a anemia (Honig, 1986).

Atualmente, dados laboratoriais, genéticos e moleculares são utilizados na classificação das talassemias beta. Especificamente, para a talassemia β^+ existem dois tipos: o mediterrâneo, com cerca de 10% de cadeia sintetizada e o negro, com produção de pelo menos 50% de cadeia beta. O tipo mediterrâneo é mais grave, enquanto que o negro apresenta manifestações clínicas e hematológicas moderadas, e essa forma tem sido detectada em africanos e em negros americanos. Além dessas duas formas existem subgrupos de talassemias β^0 e β^+ , bem definidas através de análises moleculares. Usualmente, os portadores homozigotos para talassemias β^0 e para a forma β^+ (mediterrâneo) necessitam de transfusões sanguíneas desde os primeiros anos de vida, mas alguns pacientes apresentam um curso de vida com manifestações clínicas e hematológicas entre as formas heterozigotas e homozigotas. Esses pacientes são classificados como portadores de talassemia intermédia, mostrando que nem toda talassemia beta homozigota é originada por um bloqueio total dos dois genes beta. Esse bloqueio pode ser parcial afetando os dois genes beta e suprimindo em 40 a 80% a sua capacidade de expressão (WHO, 1987).



A clássica talassemia beta maior (talassemia beta homozigota) mostra, geralmente, um quadro de anemia grave desde os primeiros anos de vida, tornando os portadores dependentes de transfusões. Nesses, a concentração de hemoglobina, quando a anemia não é tratada, é menor que 7,0g/dl, o que é acompanhado de anorexia, urina escura, febre, vômitos, desenvolvimento retardado e hepatoesplenomegalia progressiva. Em determinadas épocas ocorrem graves alterações ósseas, fraturas e sobrecarga de ferro de origem gastrointestinal. Episódios fatais ocorrem entre 1 a 6 anos de idade, sendo desencadeados por infecções e moléstias cardíacas (WHO, 1982). A hemosiderose miocárdica leva ao óbito entre 15 e 20 anos por insuficiência congestiva, especialmente em pacientes que recebem transfusões frequentes; entretanto, graças ao uso de terapia quelante - que remove o ferro e possibilita sua excreção na urina - a expectativa de vida tem melhorado atualmente (Modell, 1979).

O portador da forma heterozigota da talassemia beta não é considerado doente, sendo, portanto, um "portador assintomático". A anemia é discreta podendo se manifestar somente na gravidez, em situações de estresse e em associação com processos patológicos adicionais (Pignatti, 1983). A heterozigose é muito heterogênea e a sua caracterização por um único método deve ser excluída. Com raras exceções, todos apresentam algumas características em comum: anemia microcítica e hipocrômica que varia com o tipo talassêmico, alterações morfológicas, diminuição da fragilidade osmótica em solução salina 0,36%, aumento de concentração de HbA₂, podendo estar acompanhada por um



pequeno aumento de Hb Fetal e alterações na taxa de síntese das cadeias globínicas (Naoum, 1990, Silvestroni, 1975, WHO, 1982). Os estudos familiares são importantes para a complementação do diagnóstico laboratorial e, em alguns casos, são fundamentais para a sua conclusão.

- Hemoglobina Fetal (Hb Fetal)

A cadeia gama (γ) que participa da construção da hemoglobina Fetal ($\alpha_2 \gamma_2$), começa a ser sintetizada antes do segundo mês de gestação. Assim sendo, a Hb Fetal pode ser observada no início da fase embrionária, e seu desenvolvimento produtivo incrementa a partir do terceiro mês de gestação.

Como são sintetizados dois tipos de cadeia γ , que diferem entre si por um aminoácido, há a produção de dois tipos de Hb Fetal que não são distinguidas por técnicas rotineiras. As cadeias que contêm a glicina na posição 136 são denominadas cadeias γ^G e aquelas que contêm a alanina, nessa mesma posição, são conhecidas por cadeias γ^A . Ao nascimento, a proporção de moléculas de Hb Fetal contendo γ^G em relação às que contêm cadeias γ^A é de 3:1, passando à proporção 2:3 após o nascimento (Schroeder, 1963, Weatherall, 1984).

A Hb Fetal representa o principal componente hemoglobínico da vida intrauterina e na ocasião do nascimento ainda constitui cerca de 80% da hemoglobina total, mas nos meses seguintes diminui rapidamente, havendo substituição progressiva da Hb Fetal pela hemoglobinas do adulto normal. Depois dos seis meses de idade, os loci são



desativados podendo manter, em algumas pessoas normais, baixos níveis dessa hemoglobina ($< 1\%$). Aproximadamente 0,2 a 7% das células contém a Hb Fetal e são chamadas de células F. Entretanto, em algumas condições, os loci não são totalmente desativados e há uma produção persistente de Hb Fetal (após o período neonatal) sem anormalidades hematológicas importantes. Nessas condições diz-se que o indivíduo tem a persistência hereditária da hemoglobina Fetal (PHHF) (Honig, 1986, Nienhuis, 1977).

Essa persistência pode ocorrer também em casos de talassemia beta homozigota, HbSS e na interação HbS/ talassemia beta. Há evidências de que a PHHF seja uma forma muito discreta de talassemia, onde ocorre um desequilíbrio mínimo entre as globinas sintetizadas e uma compensação quase completa da cadeia beta deficiente pela produção da cadeia gama, originando o aumento da Hb Fetal (Tuan, 1980).

I.1.3. Hemoglobinas anormais e doenças não eritrocitárias

Embora as hemoglobinas anormais sejam caracteres herdáveis, tem sido verificada a associação dessas alterações com determinadas patologias. Em doenças linfo e mieloproliferativas a presença de precipitados intraeritocitários é frequente. Cerca de 46,6% dos portadores de doenças linfo e mieloproliferativas têm esse tipo de precipitação. Entretanto, as informações obtidas na literatura não permitem concluir qual é a causa do aparecimento da doença de HbH nesses pacientes.



Provalvemente, isso deve-se à deficiência produtiva de um ou dois genes alfa, que podem estar bloqueados (Anagnou, 1983, Schroeder, 1963, Weatherall, 1981). Na doença de Chagas, também foi observada a presença de doença de HbH adquirida, numa frequência 5,6 vezes maior do que em indivíduos não portadores de tal doença (Domingos, 1990).

Da mesma forma, a variação da concentração da HbA₂ ocorre em: anemia ferropriva aplástica, leucemia, linfossarcoma de medula óssea e doença de chagas (Domingos, 1990, Karlsson, 1985).

Alterações no nível da Hb Fetal foram verificados em várias patologias que incluem as leucemias, certos tipos de tumores malignos, desordens hemolíticas crônicas, anemia hipoplástica, trissomia dos cromossomos do grupo D, mielofibrose e estresse eritropoético (Honig, 1986). Além dessas doenças, outros fatores externos ao organismo são capazes de alterar a produção de Hb Fetal. Várias drogas são potencialmente capazes de induzir o aumento da concentração de Hb Fetal, dentre elas merecem destaque a hidroxiuréia, a 5-azacitidina, a arabinosilcitosina e outras. A hidroxiuréia e a 5-azacitidina são drogas utilizadas no tratamento da anemia falciforme, pois induzem à produção de Hb Fetal e essa hemoglobina resiste ao fenômeno de falcização (Constantoulakis, 1988, Karlsson, 1985).

1.2. Diabetes Melitus

O ***Diabetes Melitus*** compreende um grupo etiológico e clinicamente heterogêneo de distúrbios



hiperglicêmicos consequentes de uma deficiência relativa ou absoluta de insulina. Essa doença é tão antiga que o papiro de Erbes, documento médico egípcio escrito cerca de 1500 anos antes de Cristo, faz referência a uma doença caracterizada por emissão abundante de urina. Os hindus, no século XI, descreveram minuciosamente alguns sintomas da doença, assinalando, pela primeira vez, o gosto adocicado da urina dos diabéticos. O médico romano Araetaeus - ano 30 a 90 da era Cristã - criou o termo "dia-betes", que significa "passar através", pelo fato do excesso de urina, sintoma típico da doença, se assemelhar à drenagem de água através de um sifão. No século XVIII, Cullen acrescentou ao termo diabetes o adjetivo "Mellitus", a fim de distinguir a doença do "Diabetes Insípido" que se caracteriza pela ausência do hormônio antidiurético, produzido no hipotálamo (Arduino, 1980).

1.2.1. Diagnóstico

O diagnóstico do *Diabetes Mellitus* tem evoluído nos últimos anos em função do advento de técnicas modernas e maior conhecimento das fases dinâmicas dessa metabolopatia. Exame físico e história médica, quando acompanhados por testes laboratoriais de rotina ou específicos, permitem o diagnóstico e o monitoramento adequado do diabetes.

Os testes de rotina que podem ser realizados em qualquer laboratório de análises clínicas são representados pela glicosúria, pesquisa de corpos cetônicos na urina, glicemia de jejum, glicemia pós prandial, pesquisa



de hemoglobina glicosilada e pelo teste oral de tolerância à glicose no sangue. Os testes especializados devem ser praticados em unidades endócrinas especializadas ou hospitalares e são os seguintes: teste intra-venoso de tolerância à glicose, teste de tolerância à insulina, teste de tolbutamida, teste de Conn e Fajans, determinação do glucagon, determinação do hormônio de crescimento, determinação de anticorpos anti-insulina e determinação do sistema HLA (Service, 1987, Watts, 1982),

I.2.2. Classificação

A intolerância à glicose é manifestação comum ao diabetes, e três critérios básicos são considerados para a configuração da patologia: a) elevação do nível de glicose sanguínea; b) sintomas clássicos da doença: polidipsia, cetonúria e perda rápida de peso; c) concentração de glicose plasmática, em jejum de 120 mg/dl, em mais de uma ocasião (National Diabetes Data Group, 1979).

Dois tipos de *Diabetes Mellitus* estão claramente definidos:

a) Tipo I, *Diabetes Mellitus* insulino-dependente (IDDM), caracterizado clinicamente pela manifestação abrupta dos sintomas, insulinopenia, dependência de insulina exógena para a manutenção da sobrevivência imediata e para prevenir o aparecimento da cetoacidose. Ocorre principalmente em jovens e o termo "diabetes juvenil" é empregado como sinônimo. No entanto, essa síndrome pode manifestar-se em qualquer idade do indivíduo. Parece ser geneticamente heterogênea e fatores



ambientais podem precipitar a doença (Rotter, 1978). Determinantes genéticos estão associados ao aumento ou diminuição de certo antígeno de histocompatibilidade (HLA) no cromossomo 6 (Cudworth, 1976). Respostas imunes anormais e a autoimunidade têm um papel etiológico, e anticorpos contra as ilhotas pancreáticas estão frequentemente presentes no diagnóstico desse tipo de diabetes.

b) Tipo II, *Diabetes Mellitus* não insulino-dependente (NIDDM), que não depende da administração de insulina para a sobrevivência imediata. Entretanto, pode requerer insulina somente para a correção de quadros hiperglicêmicos resistentes à ação da dieta e dos hipoglicemiantes orais, que constituem os elementos básicos para o controle do diabetes tipo II. Situações especiais, como estresse infeccioso ou traumático, podem desencadear a cetoacidose e complicações. Os níveis de insulina podem estar normais, reduzidos ou aumentados e estar associados à resistência insulínica. Esses pacientes podem permanecer assintomáticos por anos e até décadas, com a doença progredindo lentamente. A manifestação culmina aos 40 anos de idade, embora possa manifestar-se em jovens. O diabetes tipo II tem base genética mais forte do que o tipo I e ocorre num padrão familiar mais frequente. Fatores ambientais podem associar-se a fatores genéticos e desencadear a patogênese. Em pessoa com esse tipo de diabetes não são detectadas anticorpos contra as ilhotas pancreáticas (National Diabetes Data Group, 1979).



I.2.3. Aspectos genéticos do diabetes

A tendência familiar para o diabetes é conhecida há muito tempo e o papel dos fatores ambientais precipitando o diabetes está bem definido. Os membros de uma família apresentam padrão de obesidade semelhante, caracterizado pelo mesmo tipo de dieta e pela vida sedentária, aspectos que parecem contribuir para o diabetes (Zimmet, 1982).

Nos últimos anos, as evidências acumuladas mostram que o aparecimento familiar do diabetes é devido a um defeito gênico herdável. Embora a obesidade seja o maior fator de risco para o desenvolvimento da doença na população, parece que um risco relativo pode ser característico da susceptibilidade genética do indivíduo, onde genes conferem susceptibilidade ou resistência ao diabetes e muitas genes diferentes parecem estar envolvidos (Permutt, 1990b).

I.2.3.1. *Diabetes Melitus* insulino-dependente

O diabetes tipo I parece estar associado ao HLA, que é o mais importante complexo de histocompatibilidade em humanos, localizados no braço curto do cromossomo 6. Os produtos gênicos dessa região incluem os antígenos leucocitários humanos (HLA) - moléculas de glicoproteínas que estão localizadas nas membranas plasmáticas das células - e alguns componentes da via clássica do complemento. Certos número de loci foi



estabelecido, sendo designados por letras - A, B, DR e outras. Uma série de alelos estão presentes em cada sítio e são identificados por números arábicos, por exemplo, HLA B8. Cada indivíduo herda um haplótipo HLA materno e um paterno. Os genes são codominantes e o fenótipo de cada indivíduo pode expressar duas especificidades para o locus A, duas para o B, e assim por diante. Os antígenos HLA são encontrados em todas as células nucleadas e plaquetas (Nerup, 1978).

Fortes evidências têm sido encontradas entre a presença dos antígenos HLA B8, B15, B18, B22, DR3, DR4, e o diabetes tipo I. Nos japoneses, o HLA B15 predomina; nos franceses e ingleses o predomínio é do HLA B18, em detrimento do HLA B15. As diferenças dos alelos B persistem nas populações que migram do continente europeu para o americano (Cudworth, 1976, De Moerloose, 1978, Mirouze, 1976). Ultimamente, os tipos HLA DR3 e DR4 têm mostrado melhor associação com o diabetes tipo I (Robert, 1991).

Os estudos demonstram que o risco para os fatores HLA B8 e B15, isoladamente, que causam o diabetes em heterozigotos e homozigotos, é baixo. Entretanto, quando os dois "genes diabetogênicos" HLA B8 e B15 se associam, o risco aumenta muito. Observações semelhantes foram feitas para as associações HLA B8/B18 e HLA DR3/DR4. A ausência dos HLA B7 e DR2 em diabéticos tipo I parece indicar que esses conferem certa proteção contra o desenvolvimento desse tipo de diabetes (Nerup, 1978, Robert, 1991).

Os fatores genéticos podem estar envolvidos nas complicações diabéticas. No soro dos pacientes com HLA B15 encontra-se elevado título de anticorpos contra a



insulina e a presença do HLA B7 protege contra a formação desses anticorpos. As células das ilhotas pancreáticas são destruídas por anticorpos presentes em alguns diabéticos, cuja etiologia é incerta. A frequência de pacientes com esses anticorpos varia com o estágio da doença, com valores de 60 a 85% nas fases iniciais, declinando para 50% a partir de alguns meses e aos três anos, menos de 20% (Nerup, 1978, Robert, 1991). Doenças vasculares têm sido associadas à presença do HLA B15, desencadeando maiores complicações (Bodansky, 1982).

I.2.3.2. *Diabetes Mellitus* não insulino-dependente

A forma de transmissão do diabetes tipo II é desconhecida. Sabe-se que não há associação entre o HLA e essa patologia. Cerca de 11% da população adulta apresenta certa intolerância à glicose, situação que aumenta em seis vezes o risco de desenvolvimento do diabetes tipo II. Coletivamente, 8 a 10% dos adultos têm ou estão destinados a desenvolver o diabetes tipo II (Permutt, 1990b).

A prevenção e o tratamento racional da doença requer a compreensão de sua etiologia. A suspeita de hereditariedade, como forma de transmissão, foi estabelecida e fortalecida por estudos realizados em gêmeos monozigóticos. A taxa de concordância para o diabetes tipo II, em tais gêmeos, é de 100%, indicando uma predisposição determinada por fatores genéticos. A concordância observada em diabéticos tipo I é de 25 a 50% (Barnett, 1981, Newman, 1987).



Embora a hereditariedade influencie, o diabetes tipo II, provavelmente, não é causado por defeito de um único locus. Observações sugerem etiologia complexa, baseadas em fatores genéticos e não genéticos, a saber: a) os pacientes que desenvolvem diabetes tipo II são obesos; b) a doença prossegue até que severa restrição calórica se estabeleça; c) a prevalência aumenta com a idade; d) fatores ambientais podem destruir a célula beta (Granner, 1992).

Várias pesquisas epidemiológicas têm sido feitas visando a definição do número de genes envolvidos no diabetes tipo II. Acredita-se que essa doença é uma desordem multigênica, onde a contribuição dos fatores genéticos individuais somam-se, podendo alguns ter importância maior que outros. Fatores ambientais atuam ativando essas variáveis genéticas, caracterizando uma doença cuja etiologia é multifatorial (Granner, 1992, Permutt, 1990b).

Os indivíduos que manifestam o diabetes tipo II na juventude apresentam polimorfismos no DNA do cromossomo 20. Se esse polimorfismo ocorre no diabetes tipo II que aparece na maturidade ou se facilitará a localização de um gene específico marcador da doença, ainda é obscuro (Bell, 1991). Além disso, por meio da recombinação do DNA, estuda-se clones do gene da insulina verificando o seu papel no desenvolvimento do diabetes, visto que quase todos os portadores apresentam deficiência relativa ou absoluta de insulina. Os resultados mostram que não há qualquer associação entre os polimorfismos do gene da insulina e o desenvolvimento desse tipo de diabetes (Permutt, 1990a, Takeda, 1986). Por outro lado, análise envolvendo os



polimorfismos do gene que codifica o receptor da insulina, não revelam qualquer relação com este tipo de diabetes (Permutt, 1990b). Sugere-se, ainda, que o gene codificador do transportador de glicose seja diferente entre as populações de diabéticos e não diabéticos, embora nenhuma diferença tenha sido encontrada entre negros americanos e orientais (Cox, 1988). Diversos genes que codificam o transportador de glicose têm sido identificados em cromossomos diferentes (Mueckler, 1990).

I.2.4. Prevalência

O *Diabetes Mellitus* é doença universal, mas sua distribuição é variável nas diversas áreas geográficas e nos diferentes povos, dependendo de fatores genéticos e ambientais. Não é de estranhar que a sua frequência varie não só com a composição genética, mas também com os hábitos de vida e o "status" sócio-econômico das populações. O diabetes tem estreita relação com a obesidade, cuja prevalência, por sua vez, está ligada a hábitos alimentares e ao grau de atividade física (Zimmet, 1979). A obesidade aumenta a resistência à insulina que, a menos que seja adequadamente compensada, pode converter os indivíduos normoglicêmicos em pacientes hiperglicêmicos (Bagdade, 1967, Knowler, 1981).

A revolução agrícola do século XVIII e o desenvolvimento industrial permitiram maior abundância de alimentos e redução de atividade física do homem. Admite-se, assim, esses fatores como responsáveis pelo aumento da prevalência da obesidade e do diabetes. Essa relação entre o



diabetes e a ingesta calórica foi claramente demonstrada durante a segunda Guerra Mundial: nas áreas que sofreram bloqueio alimentar, houve redução da prevalência da obesidade e do diabetes (Arduíno, 1980).

A diferença da prevalência do diabetes entre povos desenvolvidos e subdesenvolvidos, e entre as populações urbanas e rurais tende a diminuir com a mecanização crescente e a melhoria das condições alimentares (Arduíno, 1980). Além disso, a extensão progressiva da assistência médica às populações economicamente menos favorecidas reduz cada vez mais o número de casos não diagnosticados, o que contribui para diminuir a diferença da prevalência da doença entre essas populações e a dos países desenvolvidos (Zimmet, 1979).

Considerando que os dados referentes a distribuição da doença numa população são baseados na amostragem de indivíduos adultos, na Argentina a prevalência da doença, incluindo o tipo I e II, foi de 6,1 e 7,0%, apresentando variação regional (Cardonnet, 1976). No Uruguai e na Venezuela, em indivíduos acima de 30 anos, a prevalência, em geral, foi de 6,9 e 7,3%, respectivamente (West, K., 1966). Em Porto Rico, a prevalência total do diabetes tipo II, na população entre 45 a 64 anos, foi de 7,4% (Cruz-Vidal, 1979). Nos Estados Unidos da América, a prevalência do diabetes tipo I e II foi de 0,26% e 5%, respectivamente. No entanto, essas percentagens têm aumentado nos últimos anos (Wadsworth, 1974).

Na Dinamarca e Inglaterra a prevalência do diabetes tipo I é semelhante, ou seja, 0,23% (Grenn, 1983, Wadsworth, 1974). A prevalência da doença varia conforme a



população considerada: a população rural de polinésios apresenta uma prevalência de diabetes tipo II de 3,6%, enquanto a população urbana de 10% (Zimmet, 1981). No Japão, a prevalência atinge a 1% da população, considerando-se o diabetes tipo I e II. Entre os esquimós, numa pesquisa realizada no Alasca, a prevalência era de 0,8% (Schraer, 1988).

Estudos realizados no Brasil estabeleceram uma prevalência populacional de 7,6%. Nas cidades de São Paulo, Rio de Janeiro e Porto Alegre as prevalências obtidas foram 9,6%, 7,4% e 8,8%, respectivamente (Franco, 1992). Análises da glicemia de jejum em índios Caripuna e Palikur, no Amapá, mostraram-se anormais em 10,8% dos casos. Esses índios já haviam sofrido aculturação alimentar manifestada pelo grande consumo de farinha de mandioca e pela introdução da cana-de-açúcar, de forma que neles a obesidade tornou-se ocorrência comum (Viera Filho, 1977).

I.2.5. Homeostasia da glicose, dos lipídeos e proteínas

A manutenção da concentração plasmática de glicose é crítica para a sobrevivência, pois esse substrato energético é utilizado pelo sistema nervoso central (SNC) como seu principal combustível metabólico, visto esse não possuir a capacidade de sintetizar ou armazenar a glicose. Portanto, os sistemas reguladores de glicose se desenvolveram para prevenir ou corrigir variações do nível da glicemia, mantendo-a dentro de uma faixa relativamente estreita, aproximadamente entre 60 e 130mg/dl (Owen, 1967).



A ausência de insulina determina falha na regulação da glicose, o que resulta em hiperglicemia e no *Diabetes Mellitus* (Harper, 1982).

A manutenção da normoglicemia exige uma precisa combinação entre a utilização e a produção de glicose. Vários fatores são responsáveis por isso: hormonais, nervosos e autoreguladores. Os principais hormônios envolvidos no processo são a insulina e o glucagon. A insulina interrompe a produção de glicose e estimula a sua utilização, sendo produzida pelas células beta das ilhotas pancreáticas e lançada na circulação porta hepática, indo agir no fígado e tecidos periféricos. Induz a transcrição de genes que codificam enzimas facilitando o armazenamento de glicose sob a forma de glicogênio. Deprime os genes que codificam as enzimas envolvidas na produção da glicose (gliconeogênese) e facilita a sua utilização pelas células (glicólise) (Granner, 1992). O glucagon é liberado pelas células alfa das ilhotas pancreáticas e é potente ativador da glicogenólise e gliconeogênese, causando hiperglicemia transitória (Friedman, 1984, Guyton, 1992).

O fator neural responsável pela normoglicemia envolve o sistema nervoso simpático. A noradrenalina causa o aumento do conteúdo do glicogênio e a liberação de glicose com hiperglicemia em animais e seres humanos (Gerih, 1976, Hers, 1976).

A glicose por si troca o metabolismo hepático em favor do armazenamento do glicogênio. Como resultado de estudos em humanos, surgiu o conceito de auto-regulação da glicose, ou seja, o nível de produção de glicose hepática é inversamente proporcional à concentração de glicose



plasmática independentemente de fatores reguladores hormonais ou neurais (Hers, 1976, Liljenquist, 1979, Sacca, 1979).

Quaisquer que sejam os mecanismos envolvidos, a secreção coordenada de insulina e glucagon defende vigorosamente as flutuações glicêmicas abaixo ou acima da faixa de normalidade. A manutenção da constância da glicemia pode ser considerada uma função vital das ilhotas pancreáticas, visto que a ausência de glicose causa morte dos tecidos cerebrais, que são consumidores de 70% da glicose sem o auxílio da insulina (Aguillar-Parada, 1969, Owen, 1967).

As principais fontes de glicose são: a absorção intestinal, a glicogenólise, a gliconeogênese e a reabsorção renal. Após a ingestão do alimento, a insulina funciona como principal hormônio anabólico, facilitando a distribuição de carboidratos, lipídeos e proteínas. Cerca de 60% dos carboidratos ingeridos terminam como glicogênio hepático através da ativação da glicogênese e inibição da glicogenólise. A captação hepática de glicose dispensa a ação direta da insulina (Taylor, 1988, West J., 1989).

No músculo, após a ingestão alimentar, a insulina estimula a captação de glicose e a síntese de glicogênio e inibe a glicogenólise. Nos períodos interdigestivos o músculo adquire a capacidade de metabolizar a glicose, com o auxílio da insulina. Em situações de jejum, a capacidade glicolítica fica deprimida e o combustível energético passa a ser os ácidos graxos; o músculo libera aminoácidos que serão convertidos em glicose no fígado (Guyton, 1992).



Além do metabolismo da glicose, o metabolismo dos lipídeos é responsável por grande parte da produção de energia no organismo e também recebe a influência da insulina. O grande problema é o transporte dos lipídeos pela circulação, visto que são insolúveis. Isso é solucionado pela associação dos lipídeos mais insolúveis com proteínas, para formar um complexo lipoprotéico hidrofílico. É dessa forma que os triglicerídeos são transportados nas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). Duas outras lipoproteínas também levam os triglicerídios, embora em proporção menor. São as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que transportam predominantemente os ésteres de colesterol e as lipoproteínas de alta densidade (HDL), que transportam o colesterol (Mattock, 1979).

Após a absorção dos lipídeos sob a forma de quilomicrons, a insulina afeta a assimilação desses de várias maneiras. A lipoproteína lipase, uma enzima sintetizada pelo tecido adiposo e muscular, é secretada no espaço extra-celular e incorporada à superfície das células endoteliais adjacentes, hidrolisando os ácidos graxos da lipoproteínas ricas em triglicerídeos (quilomicrons e VLDL). A insulina estimula a síntese e secreção da lipoproteína lipase e também inibe fortemente a lipólise dos triglicerídeos armazenados no tecido adiposo, aumentando o suprimento de glicerol nos adipócitos, para a esterificação dos ácidos graxos (West, 1989). É ainda considerada um hormônio lipogênico, pois estimula a síntese de ácidos graxos a partir da glicose ou de outros substratos que formam o piruvato (Taylor, 1988).



A digestão e a absorção de proteínas levam ao aumento pós-prandial dos níveis de aminoácidos circulantes. A insulina exerce papel dominante na conversão dos aminoácidos pelo músculos e fígado em proteínas, ativando toda a maquinaria celular envolvida nesse processo. Além disso, a insulina inibe a proteólise, que indiretamente deprime a gliconeogênese, pois o substrato empregado é representado pelos aminoácidos (Guyton, 1992).

I.2.6. Fisiopatologia e complicações do *Diabetes Mellitus*

O diabetes tipo I pode ser definido como um estado onde a secreção de insulina é insuficiente para suprimir a ação do glucagon ou contrabalançar o aumento da produção de glicose, mediada por esse hormônio. A falta de insulina associa-se à hiperglicemia e o aumento da secreção basal do glucagon é acompanhado por distúrbios nos mecanismos reguladores da glicemia. As células diabéticas das ilhotas tornam-se incapazes de detectar alterações na concentração de glicose (Guyton, 1992, Muller, 1970, Unger, 1981).

Os indivíduos portadores do diabetes tipo II, principalmente os obesos, apresentam resposta insulínica diminuída à sobrecarga de glicose, embora os níveis de insulina possam exceder os dos indivíduos normais não obesos (Perley, 1967). Qualquer que seja o nível de insulina, em estado de hiperglicemia, sua concentração é baixa no sentido relativo, uma vez que ação funcional das células beta é secretar insulina suficiente para manter a



normoglicemia (Guyton, 1992). A resistência aos efeitos glicorregulatórios da insulina parece ser o responsável por esse fato, especificamente na obesidade, e parece associar-se à hiperinsulinemia (Klimes, 1984, Olefsky, 1981a). Geralmente, observa-se diminuição de receptores de membrana para a insulina em vários tecidos, especialmente nos adipócitos; no entanto, ainda não foi convenientemente esclarecido o mecanismo pelo qual o número desses receptores diminui (Klimes, 1984, Olefsky, 1981b).

Independentemente do tipo de diabetes, alterações metabólicas e complicações são claramente observadas e envolvem, principalmente, o metabolismo dos carboidratos e lipídeos.

I.2.6.1. Metabolismo dos carboidratos em diabéticos

A hiperglicemia é a anormalidade metabólica do diabetes desencadeada por alguns fatores básicos, a saber: a) menor utilização metabólica de glicose pelos tecidos dependentes de insulina; b) aumento da degradação do glicogênio hepático; c) aumento da produção de glicose através da gliconeogênese (Guyton, 1992). Potanto, é razoável suspeitar que os níveis elevados de glicose participem das complicações diabéticas. Compatível com isso, existem evidências retrospectivas mostrando que o melhor controle da glicemia, geralmente, está associado a menores complicações diabéticas (Kroc Collaborative Study Group, 1984).



Diminuindo a utilização de glicose e aumentando sua produção eleva-se a glicemia, podendo essa atingir a concentração plasmática de 300 a 1200 mg/dl (83). A perda de glicose urinária é observada quando a glicemia ultrapassa 180 mg/dl, fato conhecido como limiar sanguíneo para o aparecimento da glicose na urina. No diabetes extremo, a elevação da glicemia causa desidratação celular e diurese osmótica, que pode reduzir o volume sanguíneo, causando choque circulatório (Guyton, 1992).

Um mecanismo bioquímico proposto para ligar a hiperglicemia às complicações diabéticas é o acoplamento de moléculas de glicose às proteínas, num processo conhecido como glicosilação. O grau de glicosilação está diretamente relacionado com o de hiperglicemia (Brownlee, 1984, Bunn, 1981).

- Glicosilação das hemoglobinas

As funções de muitas proteínas dependem de modificações após a biossíntese, sendo que as hemoglobinas humanas servem como excelente material de estudo. Nos diabéticos, a glicosilação das hemoglobinas está aumentada devido ao maior fornecimento de glicose.

Cerca de 95% das hemoglobinas do adulto e crianças a partir dos seis meses de idade é composta por HbA ($\alpha_2\beta_2$); a HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) e a Hb Fetal ($\alpha_2\gamma_2$) correspondem a 2,5 e 0,5%, respectivamente. Outros componentes menores, encontrados em adultos normais, são devidos a modificações após a biossíntese da HbA. Esses componentes, podem ser separados por cromatografia e são



representados pelas HbA_{1a}, HbA_{1b}, HbA_{1c}, com concentrações respectivas de 1,6, 0,8 e 4% do total de hemoglobina nos eritrócitos (Bunn, 1976).

O conhecimento da fase de maturação do glóbulo vermelho em que ocorre o acoplamento com a glicose é importante para compreensão do fenômeno, bem como se a mesma mediação é realizada por processos de natureza enzimática ou não (Bunn, 1978). A conversão da HbA em HbA_{1b} e, posteriormente, em HbA_{1c} é um evento lento, cujo início ocorre após a síntese da hemoglobina e permanece durante a sobrevivência do eritrócito. O conteúdo da HbA_{1c} é tanto maior quanto maior for a permanência do eritrócito na circulação. Essa lentidão é justificada pelo fato das reações envolvidas não serem mediadas por enzimas (Shapiro, 1980). A taxa de formação da HbA_{1c} é diretamente proporcional à concentração de glicose no eritrócito e o grau de especificidade da reação da glicose com a hemoglobina é significativo, sendo o grupamento amino-N-terminal da cadeia beta mais reativo (Bunn, 1976, Garner, 1975). A HbA_{1c} é, portanto, um produto de condensação química da hemoglobina e glicose.

O açúcar da HbA_{1c} em indivíduos normais e diabéticos é composto de 70% de glicose e 30% de manose. Nenhuma frutose ou galactose foi identificada nos ensaios enzimáticos, mas as análises usando cromatografia gasosa revelaram uma pequena quantia de galactose ligada à HbA_{1c} (Bunn, 1975).

Para formar a HbA_{1c}, a glicose combina-se com a valina-N-terminal da cadeia beta, formando uma base de Schiff ou aldimina, originando um composto relativamente reversível. Esta aldimina sofre a aceitação de um hidrogênio



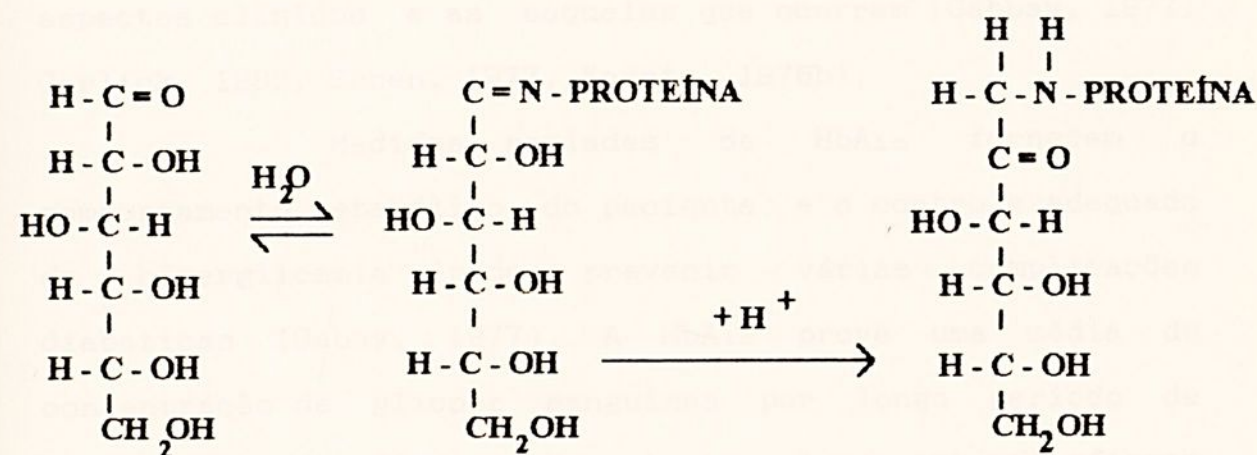
e forma cetoamina mais estável, ou HbA_{1c} (figura 2) (Holmquist, 1966). Essa reação ocorre na cadeia beta onde encontra-se a região normalmente envolvida na ligação dos fosfatos orgânicos - 2,3 difosfoglicerato ou 2,3 DPG-, os quais reduzem a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, modulando a atividade hemoglobínica. A glicosilação reduz a atividade de 2,3 DPG, e a HbA_{1c} passa a ter uma afinidade aumentada pelo oxigênio (Bunn, 1978, Ditzel, 1973). A HbA também pode sofrer a glicosilação através da mesma reação química do grupo amino-N-terminal da cadeia alfa e nos grupos amino épsilon das lisinas (Bunn, 1979).

Além da HbA, outras hemoglobinas variantes também podem sofrer glicosilação fato que é observado entre as HbA, HbC e HbD (Abdella, 1977, Aleyassine, 1979, Sosenko, 1980a, Spicer, 1979). Ainda é duvidoso se ocorre a glicosilação na Hb Fetal, pois a maior afinidade pelo oxigênio dificultaria a oxigenação tecidual das crianças de mães diabéticas. Se isso realmente ocorre, provavelmente, teremos a explicação para as complicações que costumam acometer crianças de mães diabéticas, durante a gestação.

-Importância clínica da glicosilação das proteínas

A descoberta da insulina em 1922 ofereceu a terapia ideal para o tratamento do diabetes, controlando os efeitos da hiperglicemia e evitando a morte por cetoacidose (Banting, 1922). Entretanto, o uso contínuo da insulina não evita muitas patologias secundárias que se estabelecem - retinopataia, angiopatia, nefropatia, neuropatia - causando





D-Glicose

Aldimina
(Base de Schiff)

Cetoamina

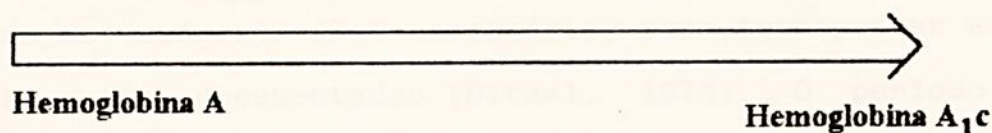


Figura 2 Glicosilação não enzimática de Hb A para formar a Hb A_{1c}.

maior morbidade e mortalidade associadas à doença. Uma das maiores contravérsias dos diabetologistas tem sido a relação do grau de controle da glicemia e o desenvolvimento de sequelas secundárias. O estudo da biossíntese e o comportamento da HbA_{1c}, em indivíduos diabéticos, tem sido usado como modelo para avaliar o controle glicêmico, aspectos clínicos e as sequelas que ocorrem (Gabbay, 1977, Garlick, 1983, Gonen, 1977, Koenig, 1976b).

Medidas seriadas da HbA_{1c} fornecem o comportamento metabólico do paciente e o controle adequado da hiperglicemia pode prevenir várias complicações diabéticas (Gabay, 1977). A HbA_{1c} provê uma média da concentração de glicose sanguínea por longo período de tempo, cerca de 120 dias. No entanto, alguns autores afirmam que o valor dessa hemoglobina está mais fortemente relacionado com a glicemia no período de oito semanas (Dunn, 1971). Outros dados demonstram que o nível de HbA_{1c} diminui rapidamente com a instituição do tratamento com insulina, mas as concentrações necessárias para interpretar esse fato não estão documentadas (Ditzel, 1978). O período mínimo necessário para produzir a resposta da HbA_{1c}, desencadeada por mudanças na glicemia, ainda não está definido, mas pode ser estimado em uma semana ou menos (Karamanos, 1977). Os mecanismos pelos quais essas mudanças rápidas da HbA_{1c} ocorrem não são conhecidos, e, provalvelmente, envolvem a HbA_{1c} na sua forma lábil (aldimina) e não na forma irreversível (cetomina) (Compagnucci, 1981).

Pacientes com *Diabetes Mellitus* manifestam tendências cardíacas associadas coronariopatias (Reagan, 1977). Uma moderada hiperglicemia em diabéticos jovens está



associada com o aumento da fração de ejeção ventricular esquerda, quando comparada a de indivíduos normoglicêmicos. Os mecanismos envolvidos no processo são ainda obscuros. Em diabéticos, as mudanças no metabolismo da glicose e no nível de insulina exercem complexos efeitos sobre a utilização da glicose, o consumo de ATP e a oxidação dos ácidos graxos livres, que podem resultar em alterações do processo contrátil do miocárdio (Opie, 1979). Tentativas de correlacionar o nível da HbA_{1c}, ou o grau de controle glicêmico, com essas alterações cardíacas têm fracassado. No entanto, observa-se que pacientes diabéticos jovens, com a HbA_{1c} normal, não apresentam alterações da função ventricular (Goldweit, 1985).

Se as hemoglobinas podem ser glicosiladas, outras proteínas do corpo poderiam sofrer mudanças estruturais e funcionais pela glicosilação. Esse desarranjo das funções poderia explicar algumas complicações do diabetes (Koenig, 1976a, Mayer, 1983, Peterson, 1977a). A glicosilação da membrana glomerular renal e dos capilares sanguíneos desencadeia sequelas renais (Trieb, 1980). Por outro lado, a glicosilação das proteínas do cristalino do olho contribui para o desenvolvimento da catarata e a glicosilação da membrana dos eritrócitos acarreta aumento de sua rigidez. Assim, essa glicosilação de proteínas, originada a partir de um distúrbio do metabolismo de carboidratos, torna-se um fator agravante das complicações diabéticas (Pande, 1985, Watala, 1985).



I.2.6.2 Metabolismo lipídico em diabéticos

Todos os aspectos da degradação de gorduras e sua utilização no suprimento de energia estão acentuadamente aumentados na ausência de insulina (Gibbons, 1986). Um dos principais efeitos observados é a ativação da lipase hormônio sensível, que é uma enzima lipolítica, normalmente reprimida na presença de insulina. Nessa situação, os triglicerídeos são hidrolisados nos tecidos, e grande quantidade de ácidos graxos e glicerol são liberados na circulação sanguínea. A oxidação hepática desses ácidos graxos produz os corpos cetônicos. Em situação de jejum, esse mecanismo serve com propósito homeostático, visto que pode ser utilizado para a produção de energia. Nos diabéticos, esse processo apresenta complicações, pois todas as atividades metabólicas ficam fora de controle, levando à acentuada hiperglicemia e hipercetonemia. A hiperglicemia é devida a maior produção e menor utilização de glicose, enquanto que a hipercetonemia é gerada pelo aumento da lipidemia, que acarreta oxidação excessiva dos ácidos graxos livres, nas mitocôndrias.

A insulina normalmente estimula a captação dos cetoácidos pelos tecidos periféricos e, na sua ausência, este evento está inibido. Os níveis de cetonas aumentam e saturam os mecanismos de captação, limitando ainda mais a sua utilização. Esses corpos cetônicos em excesso produzem um quadro de acidose onde a hiperglicemia e hipercetonemia causam diurese osmótica, com depleção do volume intra e extracelular, desidratação e perda de eletrólitos pela



urina. Se a condição não for corrigida pode instalar-se um quadro fatal (Guyton, 1992, West, 1989, Wyngaarden, 1990).

O excesso de ácidos graxos do plasma também promove a conversão de alguns deles em fosfolípidios que, associados aos triglicerídeos, são liberados sob a forma de lipoproteínas. Essas, geralmente, encontram-se alteradas no diabetes.

Com relação à VLDL, têm sido observado aumentos extremos no diabetes tipo I com cetoacidose, onde a concentração de insulina é mínima. No entanto, essa alteração é corrigida com terapia adequada. Ainda não está bem esclarecido se o aumento de VLDL está correlacionado ou não ao grau de controle diabético (Glasgow, 1981, Howard, 1987b, Mattock, 1979). Em diabéticos tipo I não tratados, o catabolismo dos triglicerídeos e o depuração plasmática encontram-se diminuídos. Observa-se superprodução de VLDL, pois há maior fornecimento de ácidos graxos livres e baixa atividade da enzima lipoproteína lipase. Em indivíduos cuja glicemia é controlada a superprodução diminui, a atividade da enzima lipoproteína lipase e a depuração plasmática voltam à normalidade e, conseqüentemente, os níveis de VLDL diminuem (Ginsberg, 1991, Glasgow, 1981, Howard, 1987b, Pykalisto, 1975).

Em diabéticos tipo II, nota-se o aumento da concentração de VLDL, e supõe-se que a baixa atividade da enzima lipoproteína lipase e o maior fornecimento de substratos para o fígado também seriam os responsáveis por essa superprodução. Além disso, alguns autores acham que a hiperinsulinemia, comum ao diabetes tipo II, poderia exercer papel permissivo sobre a produção de VLDL (Howard, 1983,



Reaven, 1981, Taskinen, 1987). Outros acreditam que a deficiência relativa de insulina, ou pela sua resistência, poderia ser a responsável pelas alterações de VLDL no diabetes tipo II (Howard, 1987a, Howard, 1987b).

Poucos estudos têm sido feitos no sentido de esclarecer o metabolismo de LDL no diabetes tipo I e II. Sua concentração parece variar com a extensão da hiperglicemia: está aumentada quando o controle glicêmico é deficiente. Análises recentes sugerem que a concentração de LDL é influenciada por alguns fatores: a) a alteração de VLDL diminui a sua conversão a LDL e, esse fato, tende a diminuir a sua concentração plasmática; b) paralelamente, a glicosilação não enzimática de LDL, no diabetes tipo II, altera a sua composição e sua depuração plasmática está diminuída; c) no diabetes tipo I, a deficiência de insulina dificulta a ligação de LDL ao seu receptor, prejudicando a sua metabolização e diminuindo a depuração plasmática. A extensão em que ocorre esses fenômenos é que determina a concentração de LDL em diabéticos. Essas alterações de VLDL e LDL, possivelmente, aumentam a deposição dessas lipoproteínas nos vasos sanguíneos desencadeando complicações aterogênicas (Barret-Connor, 1982, Ginsberg, 1991, Howard, 1987b, Rosenstock, 1985).

A concentração de HDL é baixa no diabetes tipo I e II. No diabetes tipo I acredita-se que a diminuição da atividade da lipoproteína lipase prejudique a lipólise de VLDL e reduza a formação do HDL (Ginsberg, 1991, Howard, 1987b, Taskinen, 1986). Para o tipo II, os dados mostram redução na taxa de síntese e aumento da sua depuração plasmática. Também foi observado que a glicosilação não



enzimática acelera o catabolismo de HDL em animais (Witztum, 1982). Alguns autores correlacionam a atividade da enzima lipase hepática com a regulação da concentração de HDL. É possível que a diminuição do nível de HDL possa ser atribuída à mais alta atividade dessa enzima, que diminui com a normalização da glicemia. Os níveis de HDL também retornam à sua normalidade (Abrams, 1982, Ginsberg, 1991).

I.2.7. Terapia para o diabetes

O tratamento do *Diabetes Mellitus* visa: a) eliminação do estado catabólico e seus sintomas; b) eliminação da glicosúria; c) normalização da glicemia e do nível da HbA_{1c}, na esperança de manter a saúde e prolongar a vida (American Diabetes Association, 1979).

Para a obtenção desses resultados, três tipos de tratamento podem ser empregados, a saber: a) tratamento dietético exclusivamente ou em associação; b) tratamento com hipoglicemiantes orais; c) tratamento com insulina.

I.2.7.1. Tratamento dietético

O tratamento dietético é parte essencial do plano terapêutico global de todos os pacientes diabéticos. No diabetes tipo II esse tratamento pode ser o método predominante. Controla-se o número total, a distribuição diária, as fontes alimentares individuais das calorias ingeridas e a manutenção da nutrição adequada (American Diabetes Association, 1979).



Como a maioria dos diabéticos tipo II está acima do peso, a restrição calórica é aconselhável e pode ser muito benéfica. Existem várias condutas para obter-se o emagrecimento que variam o grau de restrição calórica, a velocidade de emagrecimento e os constituintes da dieta, sendo acompanhadas por medidas de suporte psicológicos e de comportamento. Os mecanismos pelos quais a redução do peso diminui a hiperglicemia no diabetes tipo II não estão completamente claros. O emagrecimento diminui a velocidade acelerada de produção de glicose hepática, melhora o grau de resistência à insulina, através do aumento do número de receptores de insulina e, possivelmente, melhora a secreção das células beta (Savage, 1979). Os diabéticos tipo I raramente são obesos e o principal objetivo da dieta é a manutenção da nutrição adequada, principalmente para garantir o crescimento e desenvolvimento normais de crianças e gestantes (American Diabetes Association, 1979).

A distribuição das calorias diárias deve levar em conta dois princípios: a) a uniformidade entre as principais refeições, respeitando a capacidade metabólica do paciente; b) nos pacientes tipo I, que recebem insulina exógena, a ingesta calórica deve ser temporariamente ajustada para coincidir com o tempo de ação da insulina administrada. Esse ponto realça uma grande diferença na consideração diabética entre pacientes tipo I e II. No diabetes tipo II, ainda há secreção de insulina e a célula beta pode responder à ingesta de alimentos, independentemente de quando essa ocorre durante o dia (American Diabetes Association, 1979, Bantle, 1983).



I.2.7.2. Tratamento com hipoglicemiantes orais

Nos pacientes que não respondem de maneira satisfatória à dietoterapia e apresentam quadro hiperglicêmico de jejum maior que 230mg/dl, com sintomas clínicos pronunciados, são utilizados hipoglicemiantes orais (Owens, 1985). A prática usual no diabetes tipo II é iniciada com uma dose baixa de hipoglicemiante oral, aumentando-se a dose até que a resposta terapêutica seja satisfatória (Wyngaarden, 1990).

Os principais representantes dos hipoglicemiantes orais são as sulfonilúreias, comumente representados comercialmente, no Brasil, pelos seguintes compostos: Daonil [®] (glibenclamida); Diamicron [®] (gliclazida); Diabinese [®] (clorpropamida) e Minidiab [®] (glipizida) (Jornal Brasileiro de Medicina, 1987/88).

As sulfoniluréis estimulam de forma aguda os tecidos pancreáticos a secretarem a insulina, causando a degranulação das células beta. Ações extrapancreáticas são observadas, tornando os tecidos mais sensíveis à ação desse hormônio, através do aumento do número de receptores ou da alteração nos eventos subsequentes à ligação da insulina. Cerca de 4% dos pacientes apresentam afeitos colaterais: náuseas, vômitos, agranulocitose, hipoglicemia, anemia aplástica e reações dermatológicas (Paice, 1985).

I.2.7.3. Tratamento com insulina

A insulina é a forma primária de tratamento de todos os pacientes com diabetes tipo I e pacientes com diabetes tipo II, quando a terapia com os hipoglicemiantes

orais falha. Os objetivos desse tratamento visam o crescimento e desenvolvimento normal das crianças, o controle glicêmico aceitável e a prevenção de complicações.

Existem disponíveis no mercado várias formas de insulina, as quais incluem as preparações de ação rápida, com duração de oito a quatorze horas; as preparações de ação intermediária, com duração de quatorze a vinte e quatro horas, e as preparações de ação prolongada perdurando até trinta e seis horas (Gilman, 1990). Essas preparações são derivadas das insulinas porcinas, bovinas ou "humanas", que são sintetizadas por técnica de recombinação de DNA (Skyler, 1981).

O esquema de tratamento pode ser mais ou menos intensivo, dependendo do número de injeções ao dia, do tipo de insulina usada, da prevalência e dos métodos de controle. Esses métodos são baseados no nível da glicosúria, monitorizado pelo paciente, juntamente com a dosagem da glicemia de jejum (Morris, 1981). Os níveis da glicemia são determinados diversas vezes ao dia e doses apropriadas são fornecidas através de injeções subcutâneas ou com o uso da bomba de infusão contínua (Kitabchi, 1983).

A insulina reverte as alterações metabólicas mantendo a glicemia dentro da normalidade, quando as doses são ajustadas adequadamente. No entanto, alguns efeitos colaterais podem ser observados, tais como: hipoglicemia, alergia e resistência à insulina (Kahn, 1979, Wilson, 1983).



I.3. Hemoglobinopatias e *Diabetes Mellitus*

As hemoglobinopatias e o *Diabetes Mellitus* são doenças geneticamente independentes, mas a presença do diabetes em portadores de hemoglobinas anormais interfere no comportamento dessas hemoglobinas (Sosenko, 1980b). Na anemia falciforme, a glicosilação da HbS pode alterar as suas propriedades falcêmicas, o que minimiza as crises falcêmicas nos indivíduos homozigotos para o gene S. Pode-se arguir a hipótese de que as manifestações falcêmicas seriam ou não frequentes nesses pacientes. Com relação a prevalência do diabetes em pacientes portadores de anemia falciforme, há relatos que mostram baixa prevalência nessa população (Abdella, 1977, Morrison, 1979).

Autores sugerem que a intolerância à glicose e o diabetes aparecem, frequentemente, em portadores de talassemia beta homozigota, após dez anos de início da doença ou em adultos jovens submetidos à transfusões frequentes (Lassman, 1974, Necheles, 1974). E incerto se as anormalidades no metabolismo de carboidratos estão relacionadas com o período de duração da doença ou são devidos ao número de transfusões. Quando o diabetes surge em talassêmicos que apresentam história familiar, provavelmente, fatores genéticos são os responsáveis pelo achado. Entretanto, quando o diabetes aparece em talassêmicos sem história familiar surge-se outros fatores responsáveis. Levanta-se a hipótese de que a hemosiderose, causada por transfusões constantes, seja responsável pelo desenvolvimento da intolerância à glicose e o diabetes em

talassêmicos (Balcerzak, 1968). Em alguns indivíduos são observadas fibrose progressiva e atrofia pancreática, reduzindo a capacidade da célula beta em produzir insulina para manter o metabolismo dos carboidratos dentro da normalidade (Costin, 1977, Dymock, 1972).

Com relação à Hb Fetal, quando o nível ultrapassar de 4% nas talassemias, na persistência hereditária de hemoglobina Fetal e na anemia falciforme, verifica-se aumento da concentração da HbA_{1c}, quando dosada por cromatografia. Esse fato é explicado pela eluição da Hb Fetal junto com a HbA_{1c} (Krause, 1982, Lesely, 1987, Paisey, 1984).

Análises do sangue de crianças de mães diabéticas mostram que durante a gestação essas crianças estão expostas à hiperglicemia materna, o que gera um quadro de hiperinsulinemia fetal. Nessas condições, o decréscimo do nível da Hb Fetal, que ocorreria entre 28 a 34 semanas de gestação nas crianças normais, não ocorre em crianças de mães diabéticas. Provavelmente, em algumas situações, a insulina pode induzir uma expressão renovada de genes ou impedir o desligamento dos genes no período adequado (Meisler, 1989, Perrini, 1985).



II- OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos analisar alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos em pessoas portadoras de *Diabetes Mellitus*, classificadas em:

a) diabéticos que fazem dieta - grupo DI;
b) diabéticos que usam drogas hipoglicemiantes orais - grupo DR;

c) diabéticos que usam insulina - grupo ID.

O protocolo experimental previu o estudo de:

1) frequência de distribuição de hemoglobinas anormais em todos os grupos de diabéticos;

2) concentração de HbA₂, Hb Fetal e HbH (agregados intraeritrocitários);

3) concentração da HbA_{1c};

4) níveis plasmáticos dos lipídeos (colesterol, triglicerídeos, HDL e VLDL);

5) comparação dos resultados da HbA_{1c} com os da Hb Fetal, HbH e lipídeos;

6) concentração das proteínas plasmáticas.



III- MATERIAL E METODOS

III.1. POPULAÇÃO

Foram estudados 199 pacientes do ambulatório de diabetes do Hospital de Base, de São José do Rio Preto, e a pesquisa foi dividida em três grupos assim distribuídos: 1) grupo dos diabéticos que controlam a doença através de dieta (DI), sem o uso de qualquer substância hipoglicemiante; 2) grupo dos diabéticos que fazem o controle da doença com drogas hipoglicemiantes orais (DR); 3) grupo dos diabéticos que controlam a doença com insulina (ID).

O diagnóstico do diabetes para estes pacientes baseou-se em: (1) inequívoca elevação da concentração de glicose plasmática; (2) concentração de glicose da plasmática acima de 120mg/dl, em mais de uma ocasião (3) manifestação dos sintomas clássicos do diabetes (National Diabetes Data Group, 1979).

O grupo DI constitui-se por 30 pacientes, o grupo DR por 121 e o grupo ID por 48. Esses pacientes vêm sendo acompanhados pelo Serviço de Endocrinologia do Hospital de Base há mais de um ano.

III.2. MÉTODOS LABORATORIAIS

III.2.1. Coleta de Material

O material biológico utilizado nas análises foi o sangue. Todo sangue destinado às dosagens



hemoglobínicas foi coletado com anticoagulante EDTA, na proporção de 20 μ l para 3 ml de sangue, utilizando-se de seringas e evitando-se a hemólise.

O material destinado às análises dos lipídeos e proteínas plasmáticas foi coletado sem anticoagulante e incubado por 30 minutos em banho-maria a 37°C, para a extração do soro necessário às dosagens. As amostras foram processadas no prazo máximo de 48 horas após a coleta.

III.2.2. Glicose

As dosagens de glicose plasmática foram realizadas automaticamente pelo aparelho GLUCOMETER, da Ames. Uma gota de sangue foi retirada do paciente e colocada numa fita própria para a leitura; aguardou-se um minuto e lavou-se em água corrente, até que o excesso fosse retirado. A secagem foi feita com papel absorvente, após a qual procedeu-se a leitura. O aparelho tem capacidade dosar amostras com concentrações até 400mg/dl.

III.2.3. Hemoglobina Glicosilada (Trivelli, 1971)

A hemoglobina glicosilada foi determinada através do conjunto diagnóstico da marca Labtest, que se utiliza do método de Trivelli modificado. Trata-se de uma técnica de microcromatografia, que tem a vantagem de permitir a obtenção de resultados em um tempo máximo de 40 minutos e um tempo operacional de 10 minutos (Chou, 1978, Trivelli, 1971)



O volume de tampão diluído e a quantidade de resina estão acima do necessário para se obter separações cromatográficas as mais exatas possíveis, possibilitando grande margem de segurança ao sistema.

A- Reagentes

A.1 Tampão de hemoglobina rápida, rotulado como nº 1

A.2 Hemolisante, rotulado como nº 2

A.3 Microcoluna de cromatografia com resina catiônica de fraca acidez (Bio Rex 70) em tampão pH 6,7

Todos os reagentes foram conservados entre 15 e 25°C

B- Amostra

O sangue foi colhido com EDTA, sendo conservado entre 2 e 8°C até o momento da utilização visto a amostra permanecer estável por até 5 dias nessa temperatura.

C- Procedimento técnico

C.1 Preparo da coluna

As colunas foram preparadas à temperatura ambiente de 23°C. Foram fortemente agitadas antes do início da cromatografia, alternando-se esta agitação com leves batidas. Esta etapa visou a ressuspensão homogênea da resina no tampão. A seguir foram removidas as tampas superior e inferior e as bolhas de ar formadas retiradas com o auxílio de um bastonete. Colocaram-se as colunas em tubos de ensaio



visando a drenagem do tampão. Assim, as colunas estavam prontas para o uso.

C.2 Preparo do Hemolisado

Adicionaram-se num tubo de ensaio de 12x75, 0,4ml do reagente hemolisante (nº 2) e 0,02 ml de sangue total. Seguiu-se forte agitação por 20 segundos e repouso de 5 minutos para que a hemólise se processasse.

C.3 Cromatografia

A todas as colunas acrescentou-se 0,1 ml de hemolisado sobre a resina, de modo que não houvesse ressuspensão da mesma, evitando-se também a formação de bolhas de ar. Esperou-se até que o hemolizado penetrasse totalmente na resina.

As colunas foram colocadas sobre tubos de ensaios limpos e secos, marcados com o número "1". Adicionou-se lentamente, com a ponta da pipeta tocando a parede das colunas e próximo da extremidade superior da resina, 1,5 ml do tampão da hemoglobina rápida (nº 1). Esperou-se que todo o tampão drenasse para o tubo. Esta operação teve por finalidade a eluição da hemoglobina glicosilada para o tubo "1". A este tubo adicionou-se 1,5 ml de água destilada e, em seguida, o conteúdo foi misturado.

Em outro tubo limpo e seco, marcado com o número "2" - tubo da hemoglobina total -, foram pipetados 3,0 ml de água destilada e 0,02 ml do hemolisado, e a mistura foi submetida à homogeneização.



C.4 Leitura

Determinaram-se as absorbâncias dos eluatos dos tubos números "1" e "2" em 415 nm, ajustando-se o zero com água destilada.

C.5 Cálculo

$$\begin{array}{l} \text{Hemoglobina glicosilada} \\ \text{em \% da Hb total} \end{array} = \frac{A_1}{5 \times A_2} \times 100$$

onde: A_1 = absorbância do tubo "1"

A_2 = absorbância do tubo "2"

5 = fator

Os valores de referência adotados foram de 5,3 a 8%.

Observações importantes: (1) evitou-se a mistura de reagentes de diferentes conjuntos diagnósticos; (2) nenhuma resina foi reusada.

III.2.4. Fragilidade osmótica (Silvestrone, 1975)

A resistência osmótica dos eritrócitos dos diabéticos e portadores de anemias hereditárias foi avaliada através da utilização de uma solução de NaCl 0,36%. Esse teste foi utilizado como triagem em busca de anemias hereditárias, visto que 97% dos pacientes portadores de



talassemia beta apresentam maior resistência globular em solução de NaCl 0,36%.

A- Reagentes

A.1 Solução estoque de NaCl 10% em pH 7,4

NaCl	90,00 gr
Na ₂ HPO ₄	13,63 gr
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	2,82 gr
H ₂ O q.s.p.	1000 ml

A.2 Preparo da solução de NaCl 0,36%

Foram tomados 36 ml da solução mãe e completou-se o volume com água destilada até 1000 ml. Essa solução foi mantida em geladeira e renovada a cada 15 dias.

B- Procedimento

Retirou-se uma pequena alíquota de sangue - 3 a 5 μ l - do paciente, colocando-a em um tubo de ensaio 12x75 contendo 1 ml de NaCl 0,36%. Após a homogeneização, a solução permaneceu em repouso por 15 minutos.

C- Interpretação

A leitura foi realizada verificando se a solução estava transparente (eritrócitos hemolisados) ou opaca (eritrócitos resistentes). Para melhor constatação

foi colocada atrás do tubo, distante 2 cm, uma folha riscada com três linhas pretas bem visíveis. O resultado foi considerado positivo quando as linhas mencionadas não foram vistas. As amostras positivas foram submetidas à análises do eritrograma e à dosagem da hemoglobina A₂.

III.2.5. Eletroforese de hemoglobina pH 8,4 - 8,6 (Marengo-Rowe, 1965)

Todas as amostras, com fragilidade osmótica positiva ou negativa, foram submetidas à eletroforese de hemoglobina a fim de verificar qualitativamente e quantitativamente o comportamento hemoglobínico.

A- Reagentes

A.1 Solução tampão Tris-EDTA-borato (0,025 M) pH 8,4 (TEB pH 8,4)

Tris (hidroximetil) aminometano	10,2 gr
Acido etileno-diamino-tetracético	0,6 gr
Acido bórico	3,2 gr
Agua destilada q.s.p.	1000 ml

A.2 Solução de saponina (hemolisante)

Saponina	1 gr
KCN	10 gr
Agua destilada	100 ml



B- Procedimento técnico

As seguintes etapas foram obedecidas sequencialmente:

1- Colocou-se a solução tampão, em igual quantidade, em cada compartimento eletrolítico da cuba de eletroforese.

2- O acetato de celulose ficou embebido na solução tampão por 15 minutos.

3- Decorrido esse tempo, as fitas de acetato foram enxugadas em folhas de papel absorvente, removendo-se o excesso de tampão.

4- Essas fitas foram ajustadas na cuba e suas extremidades mergulhadas no tampão.

5- As amostras foram hemolisadas com a solução de saponina (50 μ l sangue total e 100 μ l saponina) por cinco minutos e a partir daí foram aplicadas no acetato a 2 cm do polo negativo (cátodo).

6- A voltagem de 300 volts foi aplicada por 30 minutos.

7- Após a separação das frações, a análise foi feita tomando-se por base a eletroforese do sangue controle e os mapas de referências.

8- O tampão da cuba eletroforética foi substituído a cada oito corridas eletroforéticas, ou quando apresentava deteriorização.



III.2.6. Dosagem da hemoglobina A₂ (Marengo-Rowe, 1965)

Para a quantificação da HbA₂ foram utilizados os mesmos equipamentos, reagentes e procedimentos da técnica anterior.

A- Procedimento específico

Aplicaram-se 20 μ l da solução de hemoglobina, obtida por hemólise com saponina, por meio de pipeta de Shalli, numa única tira de acetato, com 4,5 cm de largura. Em seguida, estabeleceu-se diferença de potencial de 300 volts durante 30 minutos, até a separação das frações hemoglobínicas.

Após esse fracionamento, as hemoglobinas A e A₂ foram recortadas com tesouras e eluídas em tubos contendo água destilada, no volume de 3 ml para a HbA₂ e 15 ml para a Hb A. A eluição foi efetuada em 2 horas, com a agitação dos tubos a cada 15 minutos à temperatura ambiente.

B- Leitura

A leitura foi realizada em fotocolorímetro marca TECNOW 7000, no comprimento de onda de 415 nm, tomando-se o cuidado de zerar o aparelho com a solução branco (água destilada).



C- Cálculos

$$\text{Hb A}_2 \% = \frac{\text{Absorbância da HbA}_2}{\text{Absorbância da Hb A } 5 + \text{Absorbância da HbA}_2} \times 100$$

O valor de referência adotado foi 2,5 a 3,7%, segundo a padronização do Centro de Referência de Hemoglobinas (Naoum, 1984).

III.2.7. Eletroforese de diferenciação em ágar-fosfato pH 6,2 (Vella, 1968)

A eletroforese de ágar-fosfato pH 6,2 é específica para diferenciar alguns tipos de hemoglobinas mais lentas que a hemoglobina A, como por exemplo: HbS e HbD, HbC e HbE que, em eletroforese alcalina, migram em posições semelhantes, dificultando a caracterização. Por esse método, as hemoglobinas S e C separam-se da hemoglobina A, enquanto que as hemoglobinas D e E migram na mesma posição que a hemoglobina A. Esse método permite também a caracterização semi-quantitativa da hemoglobina fetal.

A- Reagentes

A.1 Tampão fosfato pH 6,2

Para o uso nos comportamentos eletrolíticos e confecção do gel.

Na ₂ HPO	2,02 gr
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	7,66 gr
Agua destilada q.s.p.	1000 ml

A.2 Gel de ágar - fosfato

Ágar (Difco)	200 mg
Tampão fosfato pH 6,2	20 ml

B- Procedimento

Num erlenmeyer de 250 ml, colocaram-se os componentes do gel e aqueceram-se até a dissolução completa. Foram pipetados 3,5 ml do gel em lâminas de microscópio, deixando gelificar à temperatura ambiente. A aplicação das amostras ocorreu próximo à porção média da lâmina. Dupla folha de papel de filtro foi utilizada como conexão do gel com os compartimentos eletrolíticos. Aplicaram-se 100 volts por 20 minutos. Mapas de migração eletroforética foram tomadas como base para a identificação das frações (Naoum, 1984).

III.2.8. Dosagem de Hb Fetal (Betke, 1959)

O método utilizado para a avaliação quantitativa da Hb Fetal foi o método de Betke devido a sua sensibilidade às pequenas variações dessa hemoglobina.

A- Reagentes**A.1 Cloreto de Sódio 0,9%****A.2 Clorofórmio****A.3 Solução de Drabkin**

$K_3Fe(CN)_6$	200 mg
---------------	--------

KCN	200 mg
-----	--------

Água destilada q.s.p.	1000 ml
-----------------------	---------

A.4 NaOH 1,2N

NaOH 48 gr

Água destilada q.s.p. 1000 ml

A.5 Solução saturada de sulfato de amônio

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 500 mg

Água destilada 500 ml

B- Procedimento**B.1 Preparação da solução de hemoglobina**

Foram centrifugados 2 ml de sangue total a 1500 rpm, durante 5 minutos. O plasma foi removido e as hemácias lavadas por duas a três vezes com solução salina 0,9%. O sobrenadante foi desprezado a cada lavagem.

Ao volume de hemácias lavadas, foi adicionado outro de água destilada, homogeneizando-se. Em seguida, adicionou-se um volume de clorofórmio, idêntico ao do hemolisado formado, agitando-se vigorosamente e centrifugando-se a 2000 rpm por 15 minutos.

A solução de hemoglobina formada foi retirada por meio pipeta Pasteur e transferida para um frasco limpo. A concentração da hemoglobina obtida variou entre 10 e 15 g/dl.

B.2 Dosagem

A seguir as etapas foram sequencialmente e rigorosamente obedecidas:



1- Diluíram-se 0,6 ml da solução de hemoglobina em tubo contendo 10 ml da solução de Drabkin. A homogeneização deu-se por inversão.

2- Colocaram-se 5,6 ml da solução de hemoglobina diluída em tubo rotulado "Hb Fetal". Adicionaram-se 0,4 ml da solução de NaOH 1,2 N e agitou-se o tubo por 10 segundos.

3- Ao final de 2 minutos exatos, foram adicionados 4 ml da solução saturada de sulfato de amônio. Novamente, a homogeneização deu-se por inversão e foi seguida de repouso por 5 minutos. Decorrido o tempo, o conteúdo desse tubo foi filtrado em duplo papel de filtro. A solução obtida continha somente a Hb Fetal.

4- A solução foi obtida pela mistura, em tubo de ensaio, de 1,4 ml da solução de hemoglobina diluída, 0,6 ml de água destilada e 2 ml da solução saturada de sulfato de amônio. Transferiu-se 1 ml dessa solução para um tubo contendo 9 ml da solução de Drabkin. Dessa forma foi obtida a hemoglobina total ou a hemoglobina padrão.

B.3 Leitura

A densidade óptica (D.O.) do tubo contendo a hemoglobina fetal (Hb Fetal) e o padrão foi lida no comprimento de onda de 540nm, em fotocolorímetro marca TECNOW 7000.

B.4 Cálculos

$$\text{Hb F \%} = \frac{\text{D.O. HbF}}{\text{D. O. padrão} \times 10} \times 100$$



O valor de referência adotado e padronizado pelo Centro de Referência de Hemoglobinas foi 0 a 2% para os adultos normais (Betke, 1959, Naoum, 1984).

III.2.9. Pesquisa de corpos de Heinz e agregados de HbH (Papayannopolous, 1974)

Os corpos de Heinz são oriundos da desnaturação de hemoglobinas e fixam-se junto à membrana dos eritrócitos. Os corpos de inclusões de HbH (agregados de HbH) são formados por cadeias polipeptídicas beta, oriundas da desnaturação do tetrâmero β_4 . Ambos os corpúsculos são visualizados após coloração vital, visto que corantes alcoólicos os dissolvem.

A- Reagentes

Solução de azul-crezil brilhante

Azul-crezil brilhante	1,0 g
Nitrato de Sódio	0,4 g
Cloreto de Sódio	0,8 g
Água destilada q.s.p.	100 ml

B- Procedimento

Foram colocados 0,04 ml de sangue em tubo de ensaio esterilizado e adicionados 0,06 ml de azul-crezil brilhante. Após a mistura, o material ficou incubado por 30 minutos a 37°C. Esfregaços finos foram realizados e a análise microscópica deu-se com objetiva de imersão.

Observações importantes:

1- A cada experimento, duas amostras controle, sabidamente normais, foram observadas.

2- O teste foi realizado em cada paciente num dia e repetido em outro, para confirmação dos resultados.

3- Duas lâminas foram analisadas de cada amostra.

4- A pesquisa microscópica foi de 20 minutos para cada lâmina.

5- Os resultados foram considerados positivos somente após o encontro de 10 células com precipitação característica, em cada lâmina.

III.2.10. Triglicerídeos (Soloni, 1971)

Os triglicerídeos foram determinados através do conjunto diagnóstico marca Labtest, que se utiliza do método de Soloni modificado. São extraídos com uma mistura de varsol, isopropanol e ácido sulfúrico, havendo separação das fases, com recuperação total dos triglicérides na fase superior não polar. Essa técnica é simples e rápida permitindo a análise em 7 minutos com uma mínima quantidade de soro.



A- Reagentes**A.1 Extrator**

Isopropanol 60% v/v

Varsol 33% v/v

Ácido sulfúrico 70 m mol/l

A.2 Etilato

Etilato de potássio 0,5 mol/l

A.3 Oxidante.

Metaperiodato de sódio 4 m mol/l

Ácido sulfúrico 0.35 mol/l

A.4 Tampão

Acetato de amônia 5,78 mol/l

M-arsenito de sódio 0,22 mol/l

A.5 Acetilacetona

Acetilacetona em isopropanol 4,33 mol/l

A.6 Padrão

Glicerol em solução equivalendo a 200 mg/dl.

Todos os reagentes foram conservados entre 15 e 25°C.

B- Preparo dos Reagentes**B.1 Reagente de cor**

Para um frasco âmbar, limpo e seco, foram transferidos 50 ml do tampão e 3 ml da acetilacetona. Ao volume formado, misturaram-se 240 ml de água destilada. Foi armazenando entre 2 e 8°C.



C- Amostra

A amostra foi colhida após jejum de pelo menos 12 horas e o soro obtido foi processado no mesmo dia. Antes de efetuar a pipetagem, as amostras foram agitadas.

D- Procedimento Técnico

O extrator foi agitado vigorosamente e quando apresentava turvação era aquecido a 37°C ligeiramente.

Em um tubo 12x120 adicionaram-se 0,25 ml de soro e 2,0 ml do extrator. Agitou-se vigorosamente e centrifugou-se por 30 segundos.

Foram tomados três tubos de ensaios 12x75. O tubo contendo o branco foi marcado como tubo "1", o tubo com a amostra a ser testada foi marcado como tubo "2" e o tubo contendo o padrão foi marcado como tubo "3".

Ao tubo "1" adicionou-se duas gotas de etilato; ao tubo "2", duas gotas de etilato e 0,1 ml de soro teste; ao tubo "3", duas gotas de etilato e 0,1 ml do padrão. Após agitação, colocaram-se os tubos em banho-maria entre 56 a 60°C, por 30 segundos.

Retirados os tubos do banho-maria foram acrescentados em cada um deles 0,25 ml de oxidante e, após a mistura, os tubos voltaram ao banho-maria entre 56 e 60°C, por 30 segundos.

Decorrido esse tempo, 2,5 ml do reagente de cor foram colocados em cada um dos tubos e, através da agitação suave com movimentos circulares, o reagente de cor



incorporou-se ao conteúdo dos tubos. Novamente, os tubos voltaram ao banho-maria entre 56 e 60°C por 5 minutos, sendo que o nível da água no banho cobriu o nível dos reagentes nos tubos de ensaio durante todo o experimento.

Cada tubo foi colocado em banho de água fria durante 3 minutos, após deixar o banho-maria.

E- Leitura

Foram determinadas as absorbâncias do tubo "2" e do tubo "3", em 410 nm, acertando-se o zero com o conteúdo do tubo "1".

F- Cálculo

$$\text{Triglicerídeos (mg/dl)} = \frac{\text{A teste}}{\text{A padrão}} \times 200$$

onde: A teste = absorbância obtida pela leitura do conteúdo do tubo "2".

A padrão = absorbância obtida pela leitura do conteúdo do tubo "3".

Os valores de referência adotados foram de 10 a 170 mg/dl.

III.2.11. Colesterol total (Allain , 1974, Trinder, 1969)

A determinação do colesterol plasmático foi feita utilizando o conjunto diagnóstico de determinação enzimática do colesterol - Colesterol COD-ANA, da marca



Labtest. A metodologia baseia-se na modificação das técnicas de Allain e Trinder. Nesta metodologia, ésteres do colesterol são hidrolizados a colesterol livre pela colesterol esterase. Esse colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase a colesterol-4-en-3-ona, com produção simultânea de peróxido de hidrogênio. A associação do peróxido de hidrogênio com fenol e 4-aminoantipirina, sob a ação da peroxidase, produz um cromógeno - antipirilquinonimina - que dá a coloração vermelha à solução. A intensidade da coloração é proporcional à concentração de colesterol na amostra. Este cromógeno permite a leitura espectrofotométrica num comprimento de onda de 500 nm.

A- Reagentes

- Enzimas
- Tampão
- Padrão, com concentração estabelecida em 200 mg/dl.

A mistura das enzimas com o tampão, em frasco âmbar, por inversão até a dissolução completa, forneceu o reagente de cor. Esse reagente tem a seguinte composição, segundo a indicação da Labtest: tampão biológico 50 m mol/l; pH 7,0; Colesterol esterase > 250 U/l; Colesterol oxidase > 250 U/l; Peroxidase > 1000 U/l; 4 aminoantipirina 0,5 m ml/l; Fenol 2,4 m mol/l, preservativos, estabilizadores e ativadores. Ficou armazenado em geladeira, sendo retirado somente durante o uso. Esse reagente tem estabilidade de 30 dias quando guardado à temperatura entre 2 - 8°C.



B- Amostra

Uma vez coletado o sangue sem anticoagulante, o soro foi extraído, ficando em banho-maria a 37°C por 30 minutos. O soro obtido mantém estabilidade por 7 dias na geladeira; no entanto, foi analisado 24 horas após a coleta. As amostras hemolisadas foram descartadas e as lipêmicas foram bem misturadas antes das dosagens.

C- Procedimento

Foram tomados tubos de ensaio 12X75, limpos e secos, numerados de um a três. No tubo "1", preparou-se a solução branco, colocando-se 2,0 ml do reagente de cor. O tubo "2" funcionou como tubo teste, onde 0,02 ml do soro foram misturados a 2,0 ml do reagente de cor. Ao tubo "3" adicionaram-se 2,0 ml do reagente de cor e 0,02 ml da solução padrão. Após a mistura das soluções, nos seus respectivos tubos, os mesmos foram colocados em banho-maria a 37°C por minutos. O nível de água no banho-maria foi mantido em altura superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio.

D- Leitura

As absorbâncias do teste e do padrão foram lidas em 500 nm, no fotocolorímetro TECNOW 7000.



E- Cálculo

$$\text{Colesterol total} \frac{\text{absorbância do teste}}{\text{absorbância do padrão}} \times 200$$

mg/dl

onde: absorbância do teste = absorbância do tubo "2"

absorbância do padrão = absorbância do tubo "3"

Os valores de referência considerados foram de 150 a 220 mg%.

III.2.12. Frações do colesterol (Bernstein, 1963)

As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são quantitativamente precipitadas pelo ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. Essa precipitação é seletiva e permite que as lipoproteínas de alta densidade (HDL) permaneçam no sobrenadante, após a centrifugação. Os conjuntos diagnósticos da Labtest (Colesterol HDL e Colesterol COD-ANA) permitem a obtenção de resultados confiáveis, por isso foram utilizados para a dosagem do HDL.

A- Reagentes

A.1 Conjunto diagnóstico colesterol HDL

- Solução precipitante, armazenada entre 2-8°C.

A.2 Conjunto diagnóstico colesterol COD-ANA

- Solução padrão, cuja concentração era 200 mg/dl.



- Reagente de cor.

Esse reagente de cor é obtido pela mistura, em frasco âmbar, de todo o tampão biológico e de todos os frascos de enzimas, fornecidas pelo conjunto, até a dissolução completa. O armazenamento foi feito em geladeira, mantendo a estabilidade, por 30 dias.

B- Amostra

O soro foi obtido pela coleta do sangue sem anticoagulante e extraído após a incubação em banho-maria, a 37°C por 30 minutos. As amostras fortemente hemolisadas foram eliminadas do experimento. O soro permaneceu estável por três dias, quando armazenado na geladeira, porém o processamento da amostra ocorreu 24 horas após a coleta.

C- Procedimento

C.1 Preparação das VLDL e LDL

Foram colocados em um tubo de ensaio 12X75 0,5 ml de soro e 0,5 ml da solução precipitante. Após mistura rigorosa, centrifugou-se a amostra a 3 500 rpm durante 15 minutos, para a obtenção de um sobrenadante límpido.

Esse sobrenadante foi pipetado imediatamente, tomando-se o cuidado de não ressuspender o precipitado, a fim de se evitar a obtenção de resultados falsamente elevados.



C.2 Colorimetria

Três tubos de ensaio limpos e secos foram tomados e numerados. A esses tubos foram adicionados 2,0 ml do reagente de cor. O tubo "2" recebeu ainda 0,2 ml do sobrenadante contendo o HDL. Além do reagente de cor, o tubo "3" recebeu 0,02 ml da solução padrão. Assim, após a mistura por inversão, os respectivos tubos foram colocados em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Durante este tempo, o nível da água no banho foi mantido em altura superior ao nível reagente nos tubos de ensaios.

D- Leitura

O conteúdo do tubo "1" foi tomado como branco e as absorbâncias do teste e do padrão foram lidas em 500 nm. A estabilidade da cor atingiu até 60 minutos.

E- Cálculos

E.1 Da concentração da HDL

$$\text{HDL mg/dl} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 0,21$$

onde: Absorbância do teste = Absorbância do tubo "2"

Absorbância do padrão = Absorbância do tubo "3"

0,21 = fator de multiplicação

E.2 Da concentração da VLDL

$$\text{VLDL mg/dl} = \frac{\text{valor do triglicerídeos}}{5}$$



E.3 Da concentração da LDL

$$\text{LDL mg/dl} = \text{Colesterol total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

Os valores de referência considerados foram:

$$\text{VLDL} < 30 \text{ mg/dl}$$

$$\text{LDL} < 150 \text{ mg/dl}$$

$$\text{HDL} > 65 \text{ mg/dl}$$

III.2.13. Proteínas totais (Henry, 1974)

As proteínas do soro foram dosadas utilizando-se o conjunto diagnóstico específico da marca Labtest. Esse sistema é rápido, direto e de grande simplicidade, requerendo um tempo operacional de 1 minuto e liberando o resultado em 20 minutos.

A- Amostra

O material utilizado para as dosagens foi o soro e o processamento ocorreu dentro de 24 horas após a coleta, sendo mantido sob refrigeração (2 - 8°C) até o momento de uso. As amostras hemolisadas foram descartadas a fim de se evitar resultados falsamente elevados.

B- Reagentes

B.1 Biureto estoque

Hidróxido de sódio	1,860 mol/l
Tartrato de sódio-potássio	0,320 mol/l
Sulfato de cobre	0,188 mol/l
Iodeto de potássio	0,300 mol/l



B.2 Padrão: 4,0 g/dl de albumina bovina

Ambos os reagentes foram conservados a 15 - 25°C. Após a utilização do soro padrão, esse passou a ser conservado entre 2 - 8°C.

B.3 Preparo do reagente: Biureto de uso

Em recipiente plástico foram misturados 50 ml de biureto e 450 ml de água destilada. Esse reagente tem a coloração azulada e manteve a sua estabilidade por 6 meses, quando conservado entre 15 - 25°C.

C- Processamento

Três tubos de ensaio numerados limpos e secos, foram tomados. Ao tubo "1" foram adicionados 0,1 ml de água destilada e 5,0 ml de biureto de uso; o conteúdo desse tubo foi utilizando como branco. Ao tubo "2", acrescentaram-se 0,1 ml do soro teste e 5,0 ml do biureto de uso. No tubo "3", misturaram-se 0,1 ml do padrão e 5,0 ml do biureto de uso. O conteúdo de cada tubo foi misturado por inversão.

Decorridos 15 minutos de repouso, a leitura foi realizada no comprimento de onda de 545 nm, tomando-se o cuidado de zerar o aparelho com o branco.

D- Cálculo

$$\text{Proteínas totais} \frac{\text{g/dl}}{\text{g/dl}} = \frac{\text{absorbância do teste}}{\text{absorbância do padrão}} \times 4$$



onde: absorvância do teste = absorvância do tubo "2"

absorvância do padrão = absorvância do tubo "3"

fator de multiplicação = 4.

Os valores de referência indicados foram: 4 a 8 g/dl.

Observação:

A dosagem isolada da proteína total tem pouco valor porque a alteração em uma das frações pode ser compensada por alteração oposta de outra fração, como pode ocorrer em doença crônicas, em que há diminuição da albumina com aumento da gamaglobulina. Por esse motivo, cada amostra foi submetida a uma eletroforese de proteínas e dosagem isolada das frações.

III.2.14. Eletroforese de proteínas (Naoum, 1990)

Para o fracionamento das proteínas plasmáticas foram utilizadas tiras de acetato de celulose com 2,5 cm de largura, conservadas em solução de metanol 40%.

A- Reagentes

A.1 Solução tampão veronal 0,05 m pH 8,6

Dietil-barbiturato sódico

(barbital sódico) 10,40 g

Acido dietil-barbitúrico ou

barbital 1,84 g

Agua destilada q.s.p. 1000 ml



A.2 Solução corante: Ponceau - S

Ponceau vermelho S	1,0 g
Ácido tricloroacético	37,5 g
Ácido sulfosalicílico	37,5 g
Água destilada q.s.q.	500 ml

A.3 Solução descorante de ácido acético 5%

Ácido acético glacial	50 ml
Água destilada q.s.q.	1000 ml

A.4 Solução eluente para quantificação espectrofotométrica.

Ácido acético glacial	80 ml
Água destilada q.s.q.	100 ml

B- Procedimento

Foi colocado igual volume de solução tampão em cada compartimento eletrolítico da cuba de eletroforese. O acetado de celulose ficou embebido por 20 minutos na solução tampão. Decorrido o tempo, a fita foi enxugada com papel absorvente, retirando-se o excesso de tampão.

Cada fita foi cuidadosamente ajustada na cuba a fim de que ficasse reta e com as extremidades mergulhadas no tampão.

O soro do paciente foi aplicado na concentração de 5 l, a 2 cm do extremo catódico. A voltagem estabelecida foi de 150 volts, durante 40 minutos. Só então, as fitas foram removidas e coradas com a solução Ponceau S, por 10 minutos. As fitas foram transferidas para uma vasilha contendo a solução descorante de ácido acético 5%,

agitando-se cuidadosamente por 5 minutos. O descorante foi trocado até que as fitas estivessem totalmente claras e as frações bem evidentes.

C- Quantificação das proteínas fracionadas

A quantificação processou-se por eluição em cinco tubos de ensaios. Para o tubo no qual foi eluída a albumina, colocaram-se 10 ml de solução eluente, e para os outros, onde eluíram alfa-1, alfa-2, beta e gama, colocaram-se 5 ml do eluente. Os tubos foram agitados até a eluição completa das frações.

A leitura foi feita em fotocolorímetro TECNOW 7000, no comprimento de onda de 415 nm. Após realizou-se o cálculo.

Leituras da densidade óptica (D.O.) corrigida:

Tubo de albumina D.O. X 10 = D.O. corrigida

Tubo de alfa-1 D.O. X 5 = D.O. corrigida

Tubo de alfa-2 D.O. X 5 = D.O. corrigida

Tubo de beta D.O. X 5 = D.O. corrigida

Tubo de gama D.O. X 5 = D.O. corrigida

A somatória das D.O. corrigidas (D.O. corrigida) forneceu a somatória total. Desta forma, a percentagem de cada fração foi obtida de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ fração} = \frac{\text{D.O. corrigida da fração} \times 100}{\text{D.O. corrigida}}$$

Para obter-se o valor absoluto de cada fração foi empregada a fórmula;



$$\frac{\text{valor absoluto da fração (g/dl)} \times \% \text{ da fração X PT}}{100}$$

onde: PT = valor da proteína total obtida pelo método do biureto.

Valores de referência adotados:

albumina: 3,2 a 5,0 g/dl

alfa-1: 0,2 a 0,9 g/dl

alfa-2: 0,5 a 0,9 g/dl

beta: 0,6 a 1,1 g/dl

gama: 0,7 a 1,5 d/dl

III.3. Métodos Estatísticos (Bussab, 1986)

As principais ferramentas estatísticas para análise dos dados foram as seguintes:

- a) cálculo de estatísticas descritivas;
- b) testes de independência entre as variáveis

qualitativas.

Descrição das ferramentas aplicadas:

a) O cálculo dos parâmetros (média, desvio padrão, mínimo, máximo, mediana e coeficiente de variação) foi introduzido a fim de fornecer um resumo dos dados, além de permitir uma exploração inicial dos dados observados, induzindo a possíveis comparações.

Considerando que $x_1, \dots, x_n$ é uma amostra de n indivíduos nos quais foi observada a variável x ;

média:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

(medida de posição)

desvio padrão:

(medida de variabilidade

ou dispersão)

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

variância: S^2

mínimo: o menor valor observado na amostra

máximo: o maior valor observado na amostra

mediana: o valor central da amostra ordenada (mediana de posição).

1º Quartil: o valor da amostra que deixa 25% dos valores abaixo dele, considerando a amostra ordenada.

3º Quartil: o valor da amostra que deixa 75% dos valores abaixo dele, considerando a amostra ordenada.

Coeficiente de variação: $cv = \frac{\bar{X}}{S}$

box-plot (desenho esquemático): dá idéia da posição, dispersão, assimetrias, caudas e dados discrepantes.

máximo

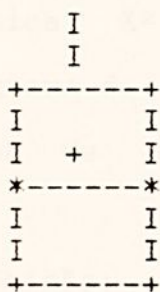
3º quartil

média

mediana

1º quartil

mínimo



I
I

b) O teste de independência é apropriado para avaliar associações entre variáveis qualitativas, ou seja, aquelas cuja resposta é um atributo. Assim, os elementos observados correspondem ao número de ocorrências dos atributos de cada variável (frequência do atributo).

A estatística X^2 é aplicada no teste das seguintes hipóteses;

H_0 = há independência entre as duas variáveis

H_1 = há associação entre duas variáveis.

A finalidade no cálculo de X^2 é quantificar descritivamente o grau de dependência entre as duas variáveis confrontadas.

$$X^2 = \sum \frac{(o_i - e_i)^2}{e_i}$$

onde, sob hipótese de independência:

o_i = frequência observada

e_i = frequência esperada

Quanto maior for o valor de X^2 mais o observado se distancia do esperado e maior é a dependência entre as variáveis.

A estatística X^2 tem distribuição qui-quadrado com $(l-1).(c-1)$ graus de liberdade, nos quais l e c correspondem aos números de atributos das variáveis confrontadas.

Regra de decisão:

Para um valor fixado de 5%, a rejeição da hipótese de independência se verifica à medida que aumenta o



valor de X^2 e, conseqüentemente, diminui a probabilidade de significância, sendo inferior ao nível de 5%.



IV- RESULTADOS

Foram analisadas 199 amostras de sangue coletadas de portadores de diabetes que há mais de um ano fazem o controle da doença no ambulatório de diabetes do Hospital de Base de São José do Rio Preto, SP. Dentre esses pacientes, 30 fazem dieta para o controle da doença, compondo o grupo DI (dieta); 121 utilizam-se das drogas hipoglicemiantes orais com a mesma finalidade, formando o grupo DR (drogas); 48 usam insulina exógena, participando do grupo ID (insulino-dependentes).

A análise estatística inicialmente avaliou o conjunto de dados isoladamente e, posteriormente, essas análises foram acompanhadas de testes de associação entre os fatores, dois a dois, para os diversos grupos estudados.

IV.1. Análise das variáveis isoladamente

- Hemoglobinas normais e anormais

Os resultados globais da análise de prevalência das hemoglobinas normais e anormais, obtidos por técnicas eletroforéticas, estão inseridos na tabela 2. Nota-se que a prevalência total de hemoglobinas normais (AA) é de 94,24%, enquanto que a prevalência de hemoglobinas anormais é pequena e distribui-se entre as hemoglobinas variantes (AS=3,13% e AC=1,57%), AH=0,52% e HbA₂ aumentada = 0,52%.



Tabela 2 Prevalência de hemoglobinas anormais e normais nos três grupos de diabéticos.

Tipos de Hemoglobinas	DI(%)	Grupos DR(%)	ID(%)	Frequência %
AA	(14,14)	(56,54)	(23,56)	94,24
AC	-	(1,57)	-	1,57
AH	-	(0,52)	-	0,52
AS	(0,52)	(2,09)	(0,52)	3,13
HbA ₂ aum.	-	-	(0,52)	0,52
Total	(14,66)	(60,73)	(24,61)	100,00

Entre as hemoglobinas variantes, a HbAS apresenta frequência maior. Comparando-se a distribuição das hemoglobinas entre os grupos, observa-se que o grupo DR concentra maior prevalência dessas alterações. O gráfico 1 exibe a distribuição das hemoglobinas normais e anormais na população de diabéticos, em geral.

- HbA₂

A análise específica das hemoglobinas revela que os valores médios da HbA₂, nos diferentes grupos não apresentaram diferenças significativas entre eles, conforme demonstra a tabela 3, ilustrada no gráfico 2. Nota-se que os valores encontram-se distribuídos basicamente dentro da faixa de normalidade (2,0 a 3,6%).

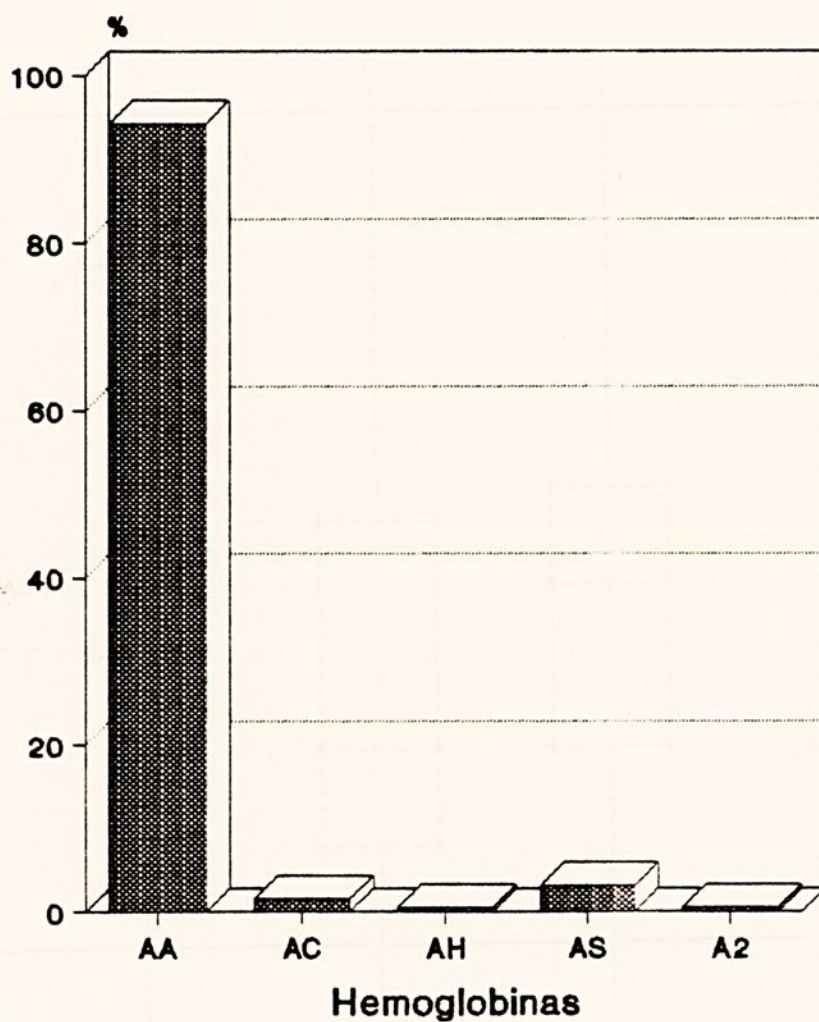


Gráfico 1 Frequência de distribuição das hemoglobinas na população de diabéticos.

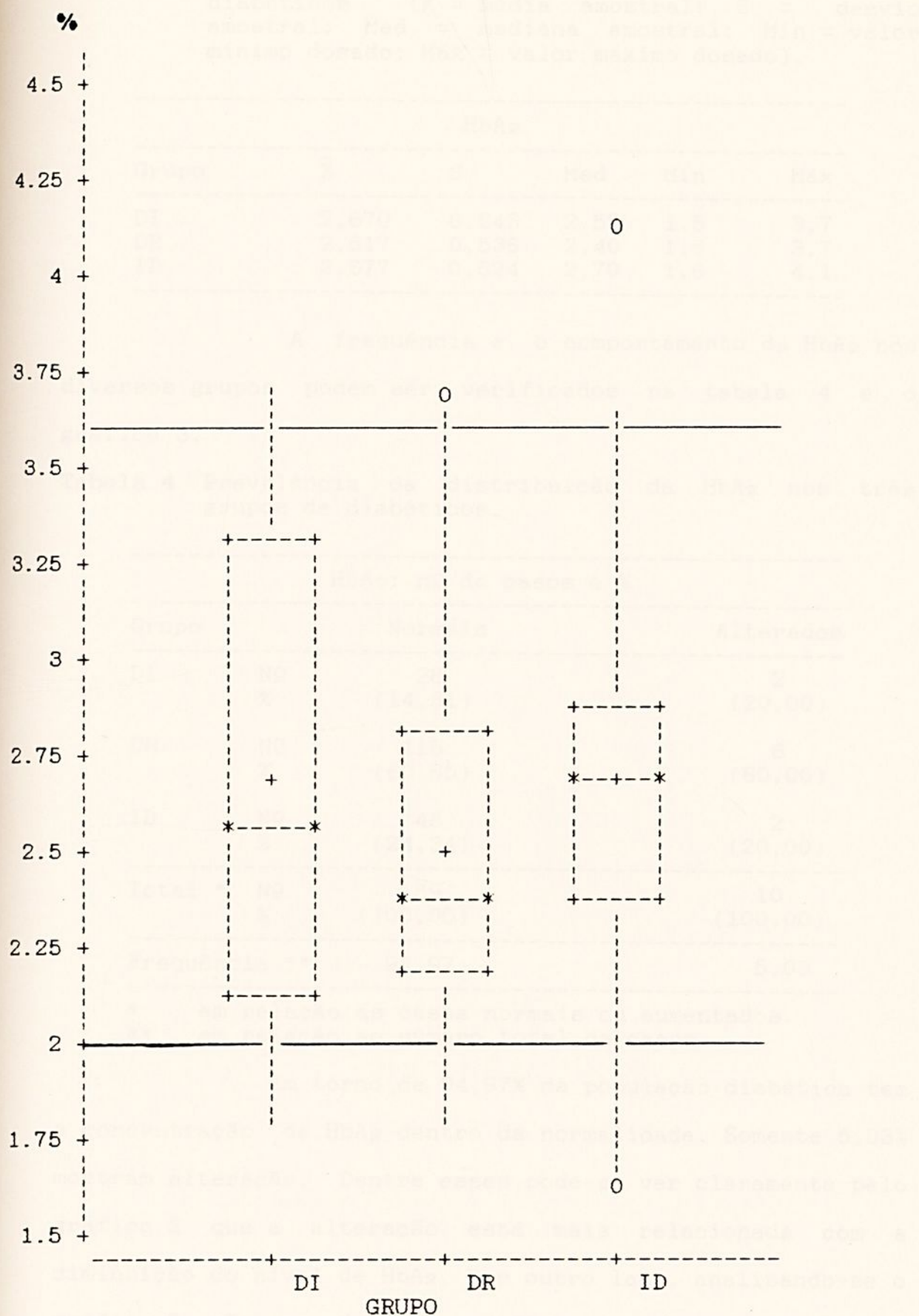
Valores de Hb A₂

Gráfico 2 Distribuição dos valores de Hb A₂ nos diferentes grupos de diabéticos. A faixa de normalidade considerada é de 2,0 a 3,6%.

Tabela 3 Comparação entre os valores médios de HbA₂ em diabéticos ($\bar{X}$ = média amostral; S = desvio amostral; Med = mediana amostral; Mín = valor mínimo dosado; Máx = valor máximo dosado).

HbA ₂					
Grupo	$\bar{X}$	S	Med	Mín	Máx
DI	2,670	0,643	2,55	1,8	3,7
DR	2,517	0,536	2,40	1,8	3,7
ID	2,677	0,524	2,70	1,6	4,1

A frequência e o comportamento da HbA₂ nos diversos grupos podem ser verificados na tabela 4 e o gráfico 3.

Tabela 4 Prevalência da distribuição da HbA₂ nos três grupos de diabéticos.

HbA ₂ : nº de casos e %			
Grupo		Normais	Alterados
DI	Nº	28	2
	%	(14,81)	(20,00)
DR	Nº	115	6
	%	(60,85)	(60,00)
ID	Nº	46	2
	%	(24,34)	(20,00)
Total *	Nº	189	10
	%	(100,00)	(100,00)
Frequência **		94,97	5,03

* em relação as casos normais ou aumentados.

** em relação ao número total de casos.

Em torno de 94,97% da população diabética tem a concentração da HbA₂ dentro da normalidade. Somente 5,03% mostram alteração. Dentre esses pode-se ver claramente pelo gráfico 2 que a alteração está mais relacionada com a diminuição do nível de HbA₂. Por outro lado, analisando-se o gráfico 3, não se detecta diferença comportamental dos

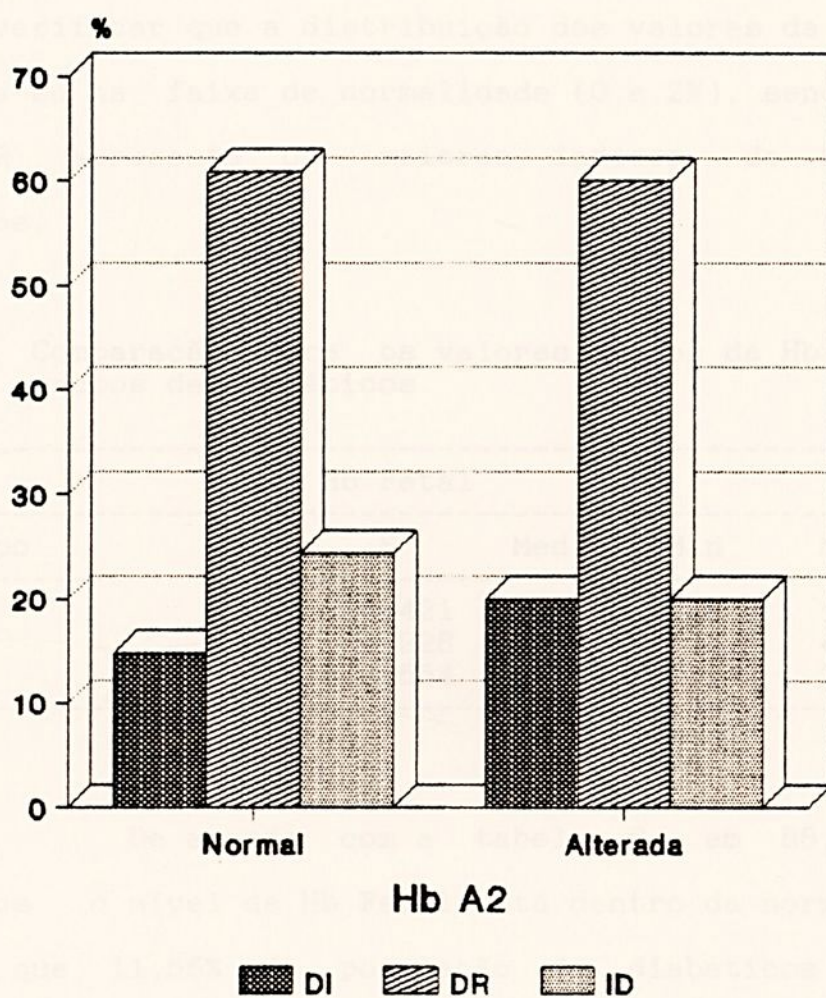


Gráfico 3 Frequência de distribuição da Hb A₂ por grupo de diabéticos.

grupos em relação à normalidade e alteração dessa hemoglobina.

- Hb Fetal

A média, a mediana, o desvio padrão e os valores mínimos e máximos estão representados na tabela 5 e o comportamento da Hb Fetal pode ser avaliado no gráfico 4. Pode-se verificar que a distribuição dos valores da Hb Fetal concentra-se na faixa de normalidade (0 a 2%), sendo que, o grupo DR apresenta os maiores índices de Hb Fetal observados.

Tabela 5 Comparação entre os valores médios da Hb Fetal em grupos de diabéticos.

----- Hb Fetal -----					
Grupo	$\bar{X}$	S	Med	Mín	Máx
DI	0,985	0,421	1,00	0,1	1,7
DR	1,806	0,928	1,60	0,3	4,1
ID	1,712	0,554	1,55	0,9	2,8

De acordo com a tabela 6, em 88,44% dos indivíduos o nível de Hb Fetal está dentro da normalidade, enquanto que 11,56% da população de diabéticos mostram aumento da concentração dessa hemoglobina. Considerando a representação esquemática do gráfico 5, nota-se que o índice alterado da Hb Fetal destaca-se nos indivíduos do grupo DR, visto que da totalidade de indivíduos alterados, 82,61% fazem parte desse grupo, enquanto que 17,39% encontra-se no grupo ID. Nenhum caso de Hb Fetal aumentada é observado entre os indivíduos do grupo DI.

Valores de Hb Fetal

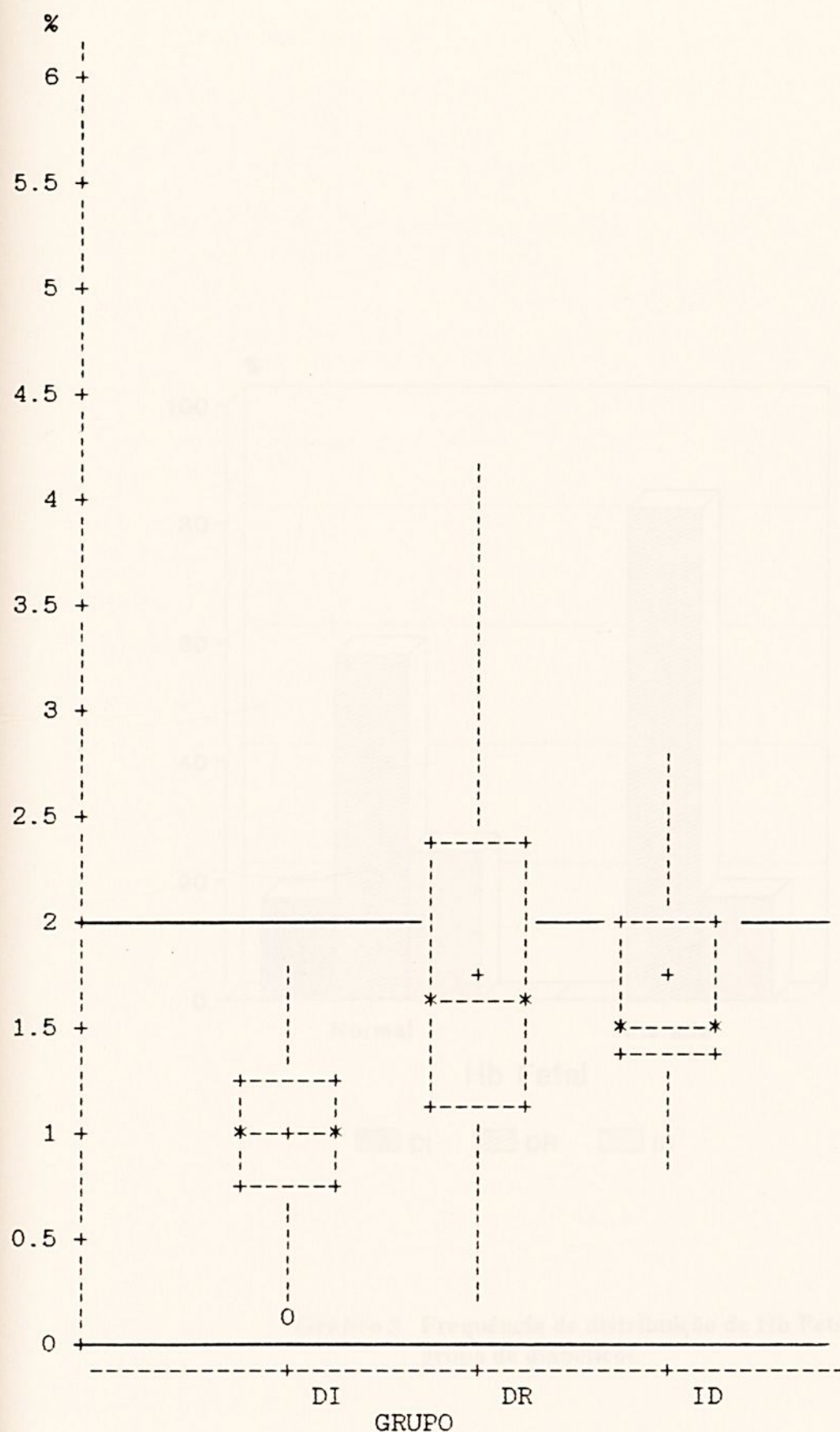


Gráfico 4 Distribuição dos valores de Hb Fetal nos diferentes grupos de diabéticos. A faixa de normalidade considerada é de 0 a 2%.

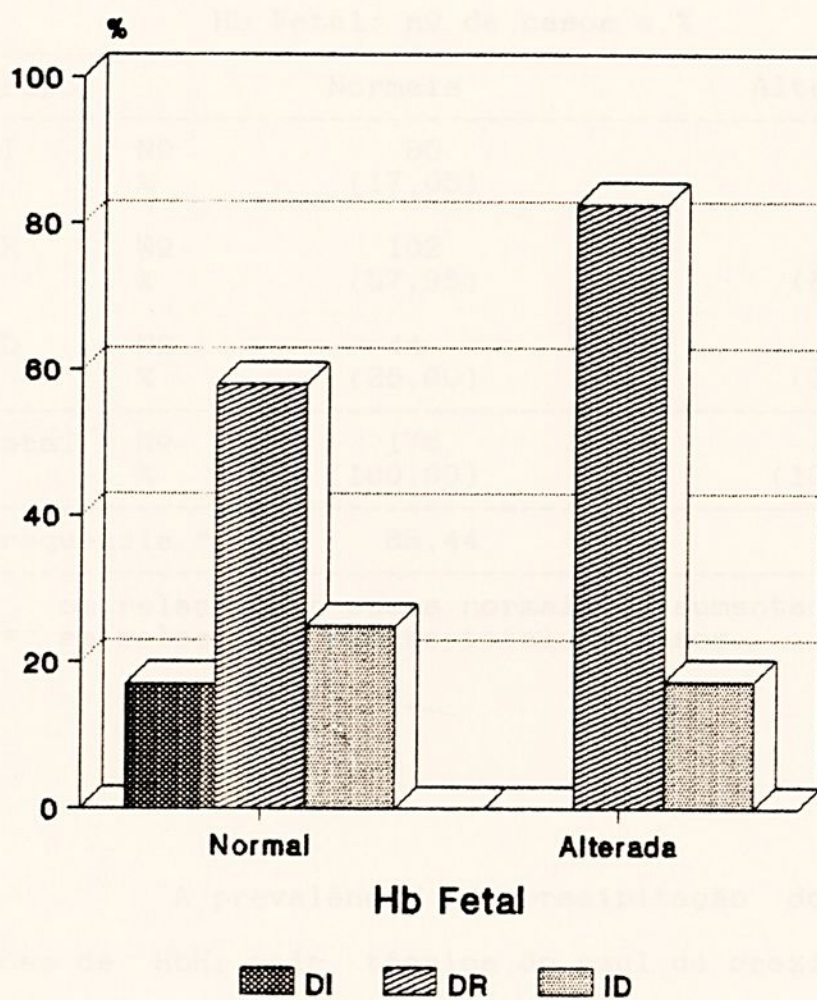


Gráfico 5 Frequência de distribuição de Hb Fetal por grupo de diabéticos.

Pela análise da tabela 6 e do gráfico 5 verifica-se que a incidência do aumento da Hb Fetal não é a mesma nos três grupos, sendo a diferença estatisticamente significativa ($X^2 = 6,442$; $p = 0,040$).

Tabela 6 Frequência de distribuição de Hb Fetal nos três grupos de diabéticos.

Hb Fetal: nº de casos e %			
Grupo		Normais	Alterados
DI	Nº	30	-
	%	(17,05)	-
DR	Nº	102	19
	%	(57,95)	(82,61)
ID	Nº	44	4
	%	(25,00)	(17,39)
Total *	Nº	176	23
	%	(100,00)	(100,00)
Frequência **		88,44	11,56

* em relação aos casos normais ou aumentados

** em relação ao número total de casos.

- HbH

A prevalência de precipitação dos corpos de inclusões de HbH, pela técnica do azul de crezil brilhante (ACB), está representada na tabela 7.

Tabela 7 Frequência de distribuição da precipitação dos corpos de inclusões de HbH nos grupos estudados.

----- ACB: nº de casos e % -----			
Grupo		Negativos	Positivos

DI	Nº	17	13
	%	(14,41)	(16,05)
DR	Nº	70	51
	%	(59,32)	(62,96)
ID	Nº	31	17
	%	(26,27)	(20,99)

Total *	Nº	118	81
	%	(100,00)	(100,00)

Frequência ** %		59,30	40,70

* em relação aos casos normais ou aumentados

** em relação ao número total de casos.

A positividade do ACB na população diabética atinge a frequência de 40,70%. Dentre esses, os usuários de hipoglicemiantes orais (grupo DR) mostram maior frequência (62,96%), fato que se repete entre os portadores de negatividade (59,32%). Pela análise da distribuição das frequências, nos diversos grupos de diabéticos, representada no gráfico 6, pode-se observar que os padrões de positividade e negatividade são semelhantes nos três grupos. A análise estatística revela a não existência de diferença significativa ($X^2 = 0,747$; $p = 0,68$) entre eles.

- HbA_{1c}

A representação da distribuição da HbA_{1c} é mostrada no gráfico 7. Observa-se que o nível da HbA_{1c} encontra-se elevado nos três grupos, sendo que o grupo DI apresenta os valores mais próximos da faixa de normalidade (5,3 a 8,0%). De acordo com a tabela 8 e o gráfico 7

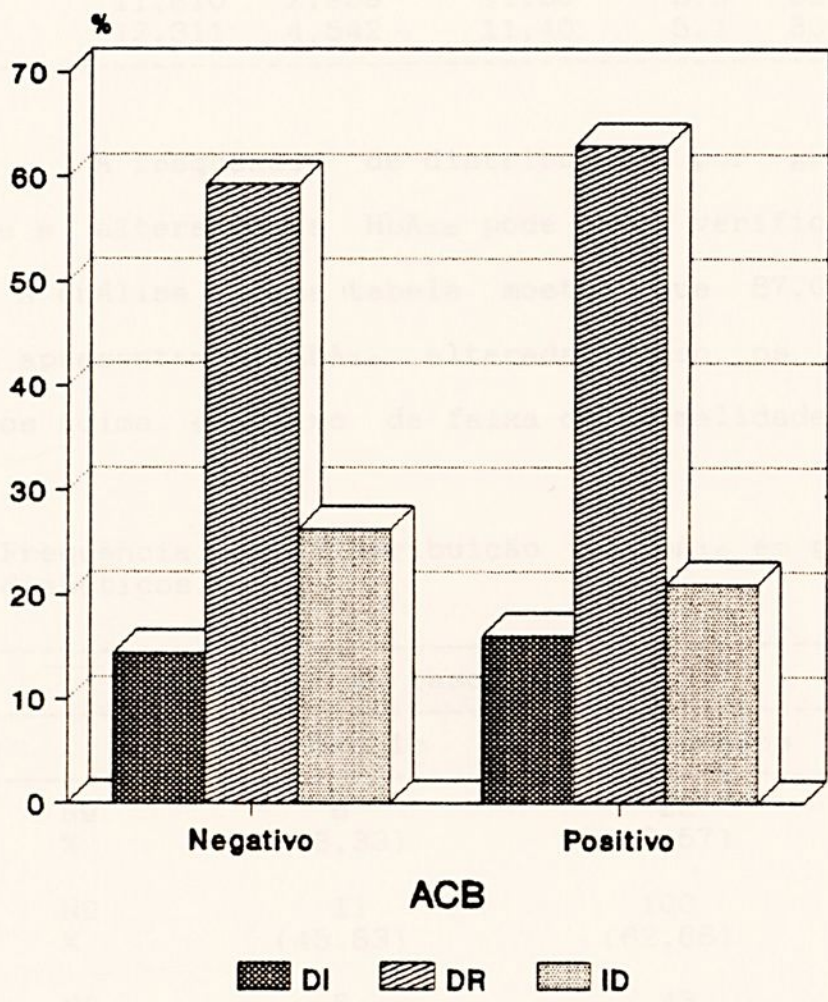


Gráfico 6 Frequência de distribuição do ACB por grupo de diabéticos.

verifica-se que o grupo ID mostra maior variação dos valores de HbA_{1c}, visto que os valores mínimos e máximos dosados são 5,1 e 30,2, respectivamente.

Tabela 8 Comparação entre os valores médios da HbA_{1c} em grupos de diabéticos.

----- HbA _{1c} -----					
Grupo	$\bar{X}$	S	Med	Mín	Máx
DI	9,564	2,603	9,85	5,0	14,8
DR	11,810	2,939	11,60	5,3	22,0
ID	12,311	4,542	11,40	5,1	30,2

A frequência de distribuição por grupo da normalidade e alteração da HbA_{1c} pode ser verificada na tabela 9. A análise dessa tabela mostra que 87,09% dos diabéticos apresentam a HbA_{1c} alterada, sendo os valores distribuídos acima e abaixo da faixa de normalidade (5,3 a 8,0%).

Tabela 9 Frequência de distribuição da HbA_{1c} em grupo de diabéticos.

----- HbA _{1c} : nº de casos e % -----			
Grupo		Normais	Alterados
DI	Nº	8	22
	%	(33,33)	(12,57)
DR	Nº	11	100
	%	(45,83)	(62,86)
ID	Nº	5	43
	%	(20,83)	(24,57)

Total *	Nº	24	175
	%	(100,00)	(100,00)

Frequência ** %		12,10	87,09

* em relação aos casos normais ou alterados.

** em relação ao número total de casos.

Consultando o gráfico 7 percebe-se que esta alteração dá-se mais por aumento do nível de HbA_{1c} do que por diminuição. Considerando os indivíduos alterados como um todo, verifica-se que o grupo DR contribui com 62,86% desta alteração, enquanto que o grupo DI com 12,57% e o grupo ID com 24,57%. Essa diferença estatisticamente significativa ($p = 0,028$), pode ser observada no gráfico 8.

- Glicemia de jejum

A glicemia estava elevada nos três grupos (faixa de normalidade: 70 a 110mg/dl), conforme ilustra o gráfico 9. A tabela 10 fornece os valores médios e a mediana encontrados nos três grupos.

Tabela 10 Comparação entre os valores médios obtidos da glicemia de jejum em indivíduos diabéticos.

----- Glicemia -----					
Grupo	$\bar{X}$	S	Med	Mín	Máx
DI	163,16	74,36	139,0	79	400
DR	252,60	97,60	250,5	62	400
ID	263,43	100,15	237,5	52	400

As maiores variações glicêmicas são encontradas nos grupos DR e ID.

A percentagem de alteração da glicemia em cada grupo é mostrada na tabela 11. Pode-se verificar que o grupo DI é o que apresenta maior percentagem de normalidade (53,85%), enquanto que o grupo DR apresenta o maior índice de alteração (62,37%). Com a visualização do gráfico 10 pode-se concluir que existe diferença comportamental entre os grupos com relação à normalidade ou alteração.

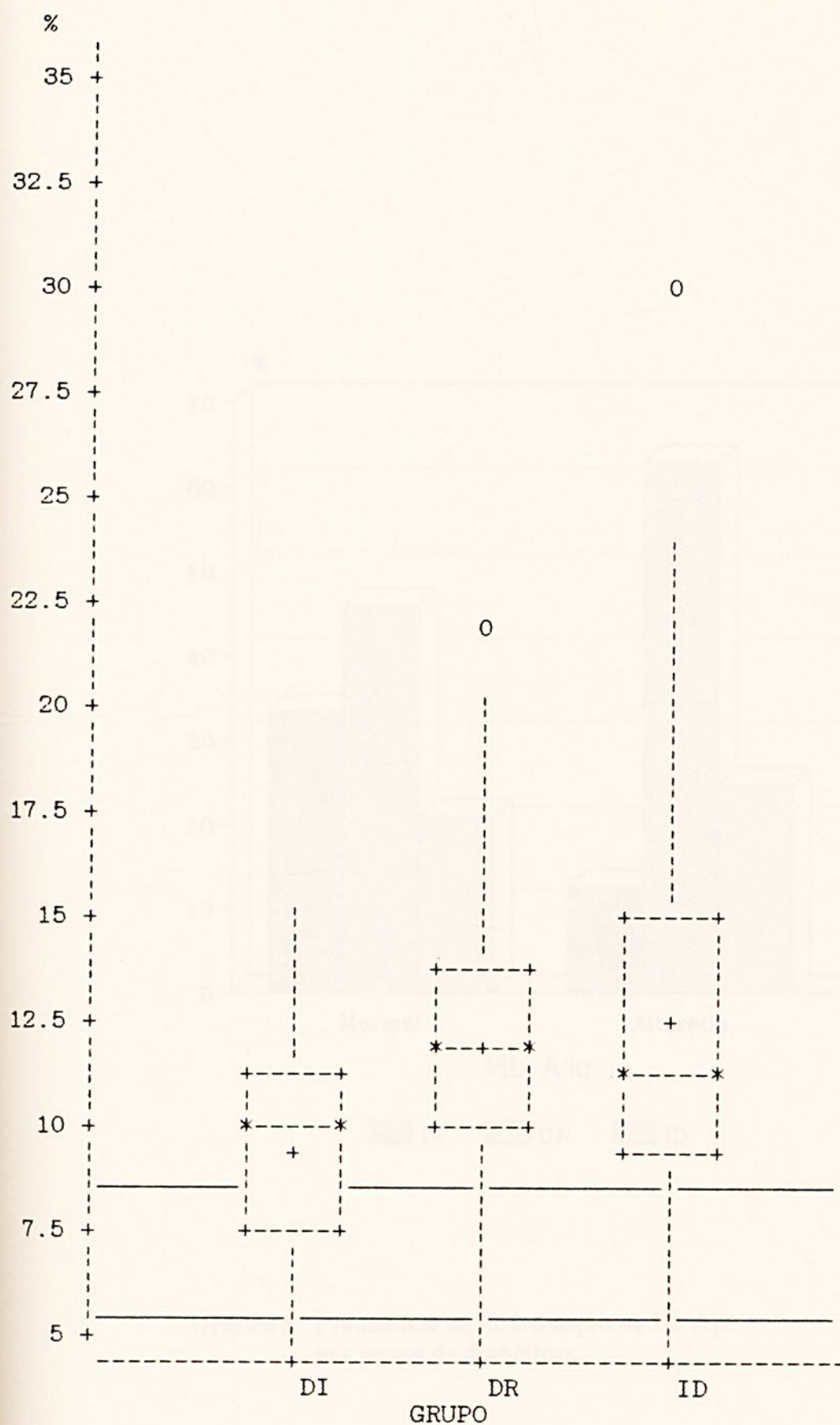
Valores de Hb A_{1c}

Gráfico 7 Distribuição dos valores de Hb A_{1c} nos diferentes grupos de diabéticos. A faixa de normalidade considerada é de 5,3 a 8,0%.

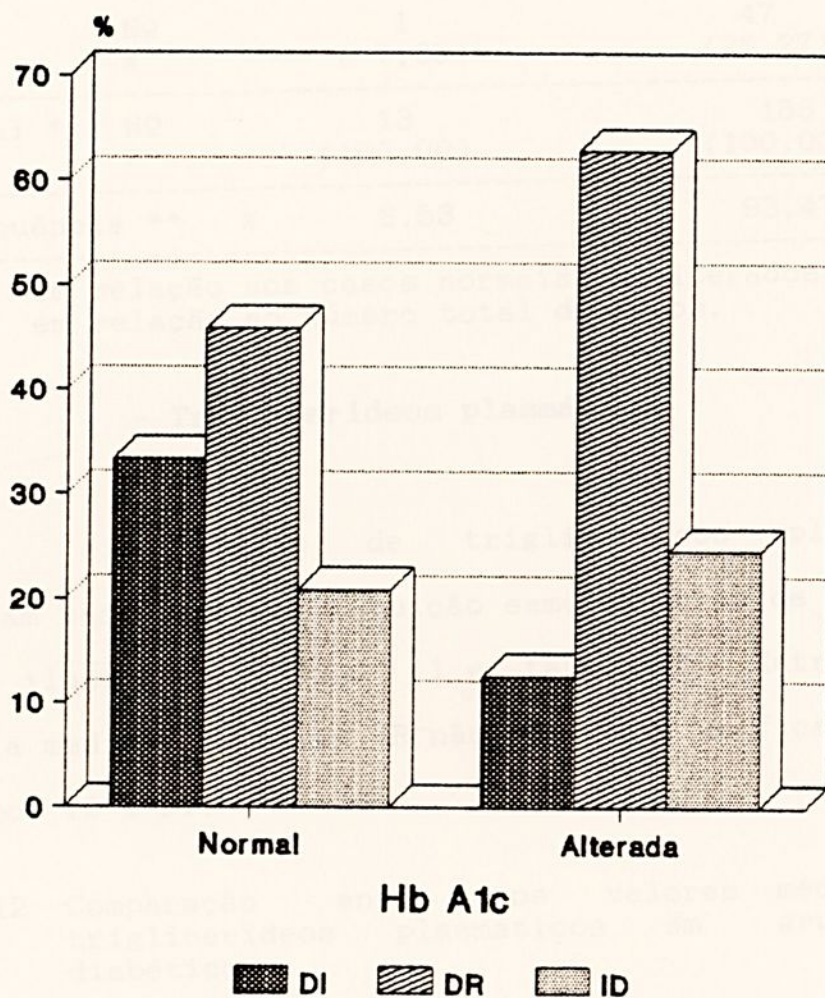


Gráfico 8 Frequência de distribuição de Hb A_{1c} por grupo de diabéticos.

Tabela 11 Frequência de distribuição da glicemia nos grupos de diabéticos.

		Glicemia: nº de casos e %	
Grupo		Normais	Alterados
DI	Nº	7	23
	%	(53,85)	(12,37)
DR	Nº	5	116
	%	(38,46)	(62,37)
ID	Nº	1	47
	%	(7,69)	(25,27)
Total *	Nº	13	186
	%	(100,00)	(100,00)
Frequência **	%	6,53	93,47

* em relação aos casos normais ou alterados.

** em relação ao número total de casos.

- Triglicerídeos plasmáticos

As taxas de triglicerídeos plasmáticos apresentam padrão de distribuição semelhante às de glicemia, conforme ilustra o gráfico 11 e tabela 12. Entretanto, a média e a mediana do grupo DR não diferem significativamente dos grupos ID e DI.

Tabela 12 Comparação entre os valores médios dos triglicerídeos plasmáticos em grupos de diabéticos.

Triglicerídeos					
Grupo	$\bar{X}$	S	Med	Mín	Máx
DI	160,36	74,36	139	79	400
DR	210,81	163,46	173	36	960
ID	159,06	105,51	131	10	430

Valores de Glicemia

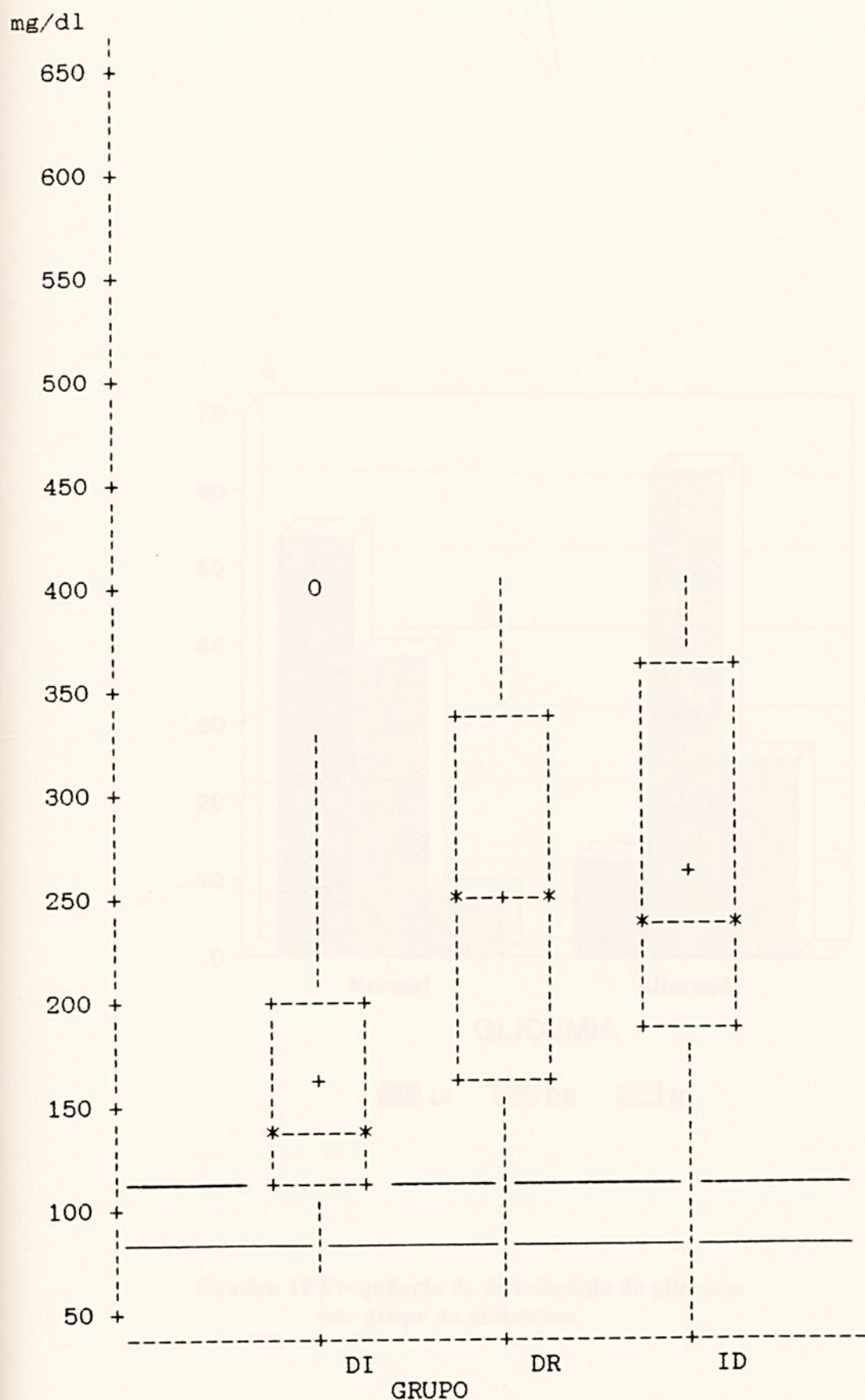


Gráfico 9 Distribuição dos valores de glicemia nos grupos de diabéticos. A faixa de normalidade considerada é 70 a 110 mg/dl.

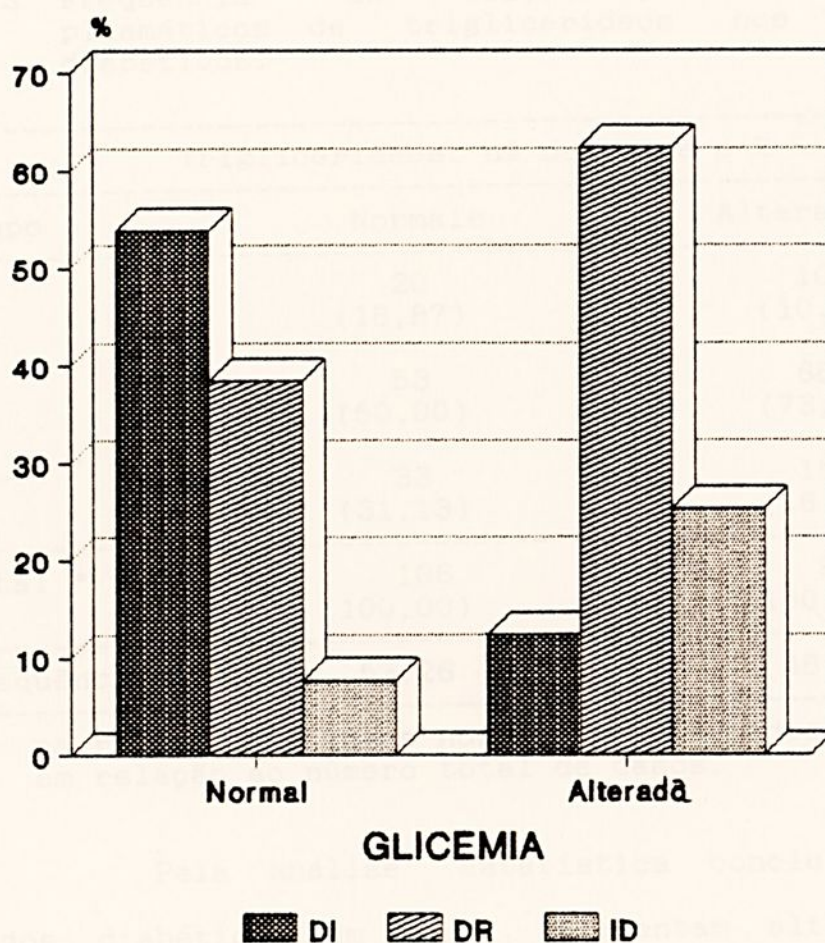


Gráfico 10 Frequência de distribuição de glicemia por grupo de diabéticos.

Observando-se o gráfico 11, pode-se verificar que, embora ocorra maior variação do valor médio e da mediana no grupo DR, o comportamento das taxas plasmáticas dos triglicerídeos nos três grupos é semelhante. A tabela 13 e o gráfico 12 fornecem as percentagens de alteração (aumento e diminuição) e normalidade (10 a 170mg/dl) dos valores nos grupos avaliados.

Tabela 13 Frequência de distribuição dos valores plasmáticos de triglicerídeos nos grupos de diabéticos.

Triglicerídeos: nº de casos e %			
Grupo		Normais	Alterados
DI	Nº	20	10
	%	(18,87)	(10,75)
DR	Nº	53	68
	%	(50,00)	(73,12)
ID	Nº	33	15
	%	(31,13)	(16,13)
Total *	Nº	106	93
	%	(100,00)	(100,00)
Frequência **		53,26	46,74

* em relação aos casos normais ou alterados

** em relação ao número total de casos.

Pela análise estatística conclui-se que 46,74% dos diabéticos, em geral, apresentam alterações no nível dos triglicerídeos plasmáticos. Verificando-se o gráfico 11, observa-se que a maior parte destas alterações refere-se a aumentos dos níveis desses lipídeos. O grupo DR é o responsável por 73,12% das alterações, sendo estatisticamente significativa ($p = 0,004$) essa diferença de comportamento entre os grupos.

Valores de Triglicerídeos

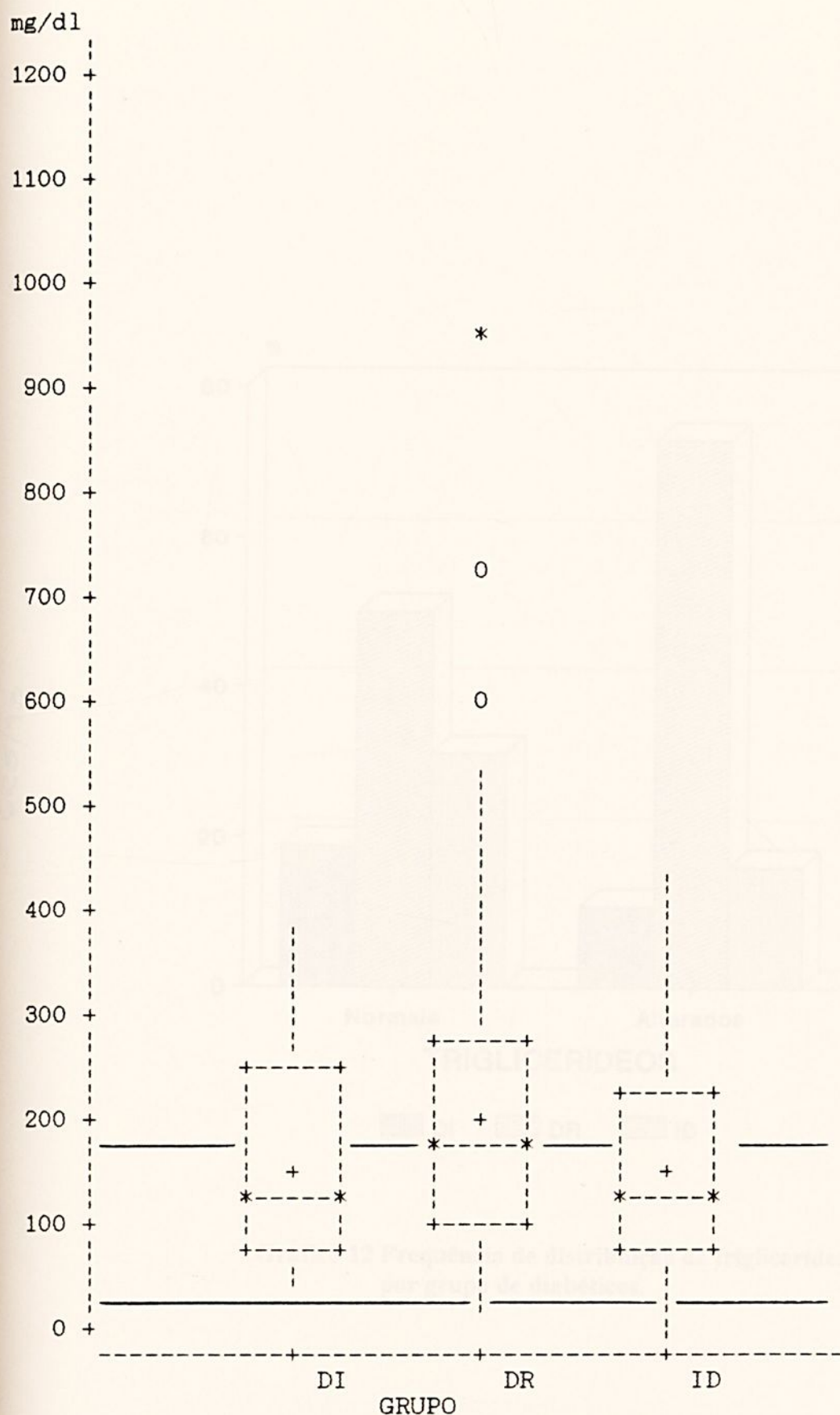


Gráfico 11 Distribuição dos valores de triglicerídeos nos grupos de diabéticos. A faixa de normalidade considerada é de 10 a 170 mg/dl.

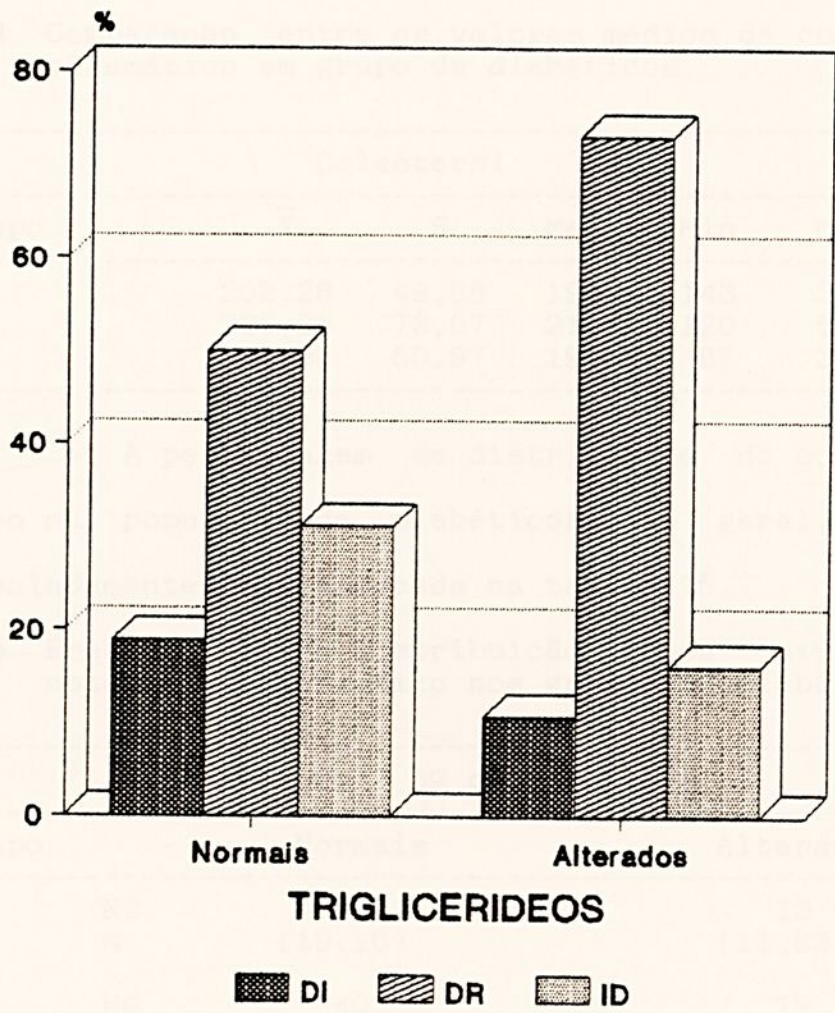


Gráfico 12 Frequência de distribuição de triglicerídeos por grupo de diabéticos.

- Colesterol plasmático

Os valores plasmáticos do colesterol nos grupos DI, DR e ID estão representados no gráfico 13. Percebe-se que a normalidade predomina nos grupos DI e ID, que comportam-se semelhantemente. No grupo DR os níveis de colesterol encontram-se elevados em grande parte dos indivíduos. A média e a mediana estão ilustradas na tabela 14.

Tabela 14 Comparação entre os valores médios de colesterol plasmático em grupo de diabéticos.

----- Colesterol -----					
Grupo	$\bar{X}$	S	Med	Min	Máx
DI	202,28	49,88	190	148	363
DR	226,25	73,07	212	120	598
ID	203,39	59,97	192	87	356

A percentagem de distribuição do colesterol plasmático na população de diabéticos, em geral, e nos grupos isoladamente está indicada na tabela 15.

Tabela 15 Frequência de distribuição dos níveis de colesterol plasmático nos grupos de diabéticos.

----- Colesterol: nº de casos e % -----			
Grupo		Normais	Alterados
DI	Nº	17	13
	%	(19,10)	(11,82)
DR	Nº	49	72
	%	(55,06)	(65,45)
ID	Nº	23	25
	%	(25,84)	(22,73)

Total *		89	110
		(100,00)	(100,00)

Frequência **		% 44,72	55,28

* em relação aos casos normais ou alterados.

** em relação ao número total de casos.

Valores de Colesterol

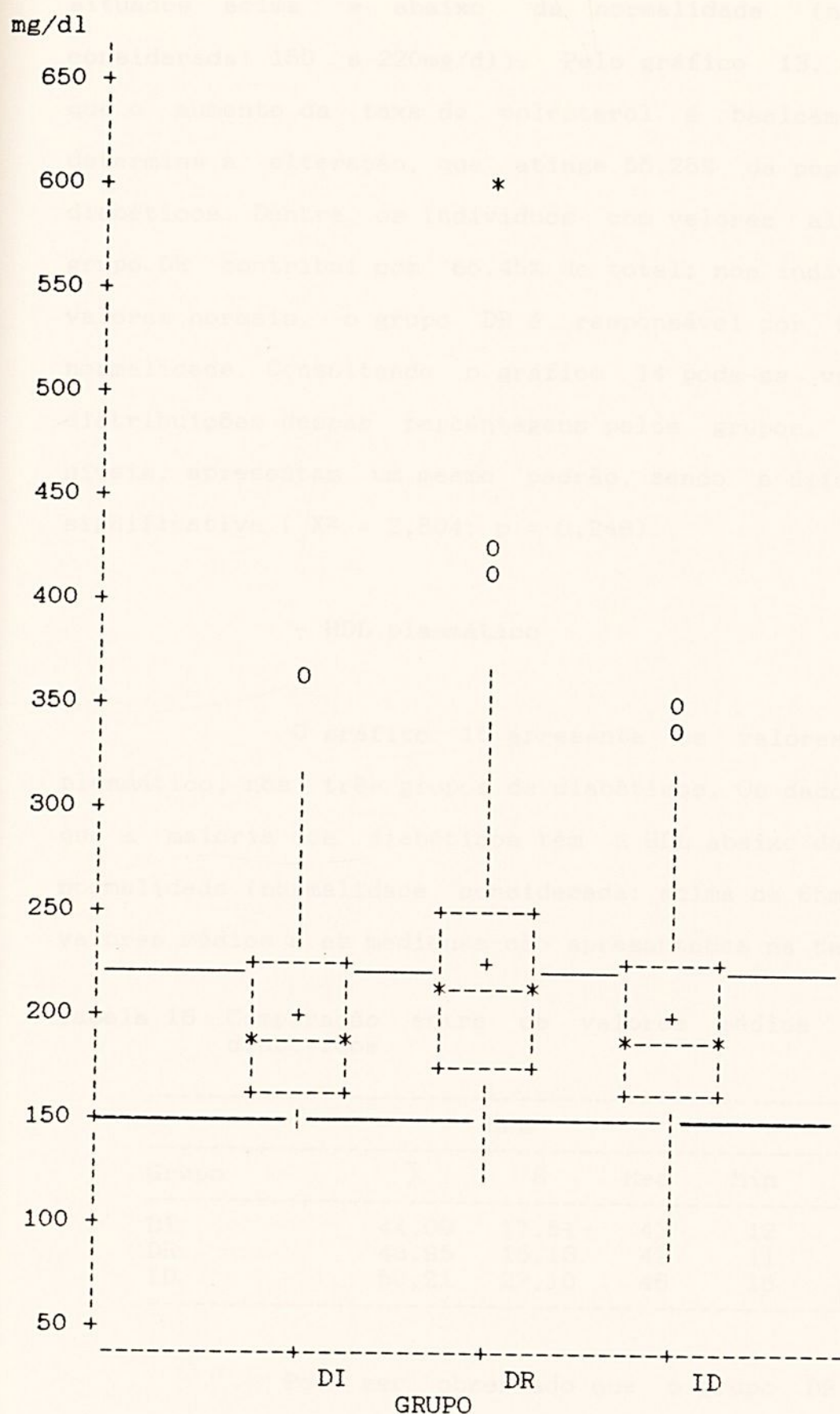


Gráfico 13 Distribuição dos valores de colesterol nos grupos de diabéticos. A faixa de normalidade considerada é de 150 a 220 mg/dl.

Os casos alterados compreendem os valores situados acima e abaixo da normalidade (normalidade considerada: 150 a 220mg/dl). Pelo gráfico 13, observa-se que o aumento da taxa de colesterol é basicamente quem determina a alteração, que atinge 55,28% da população de diabéticos. Dentre os indivíduos com valores alterados, o grupo DR contribui com 65,45% do total; nos indivíduos com valores normais, o grupo DR é responsável por 55,06% da normalidade. Consultando o gráfico 14 pode-se ver que as distribuições dessas percentagens pelos grupos, nos dois níveis, apresentam um mesmo padrão, sendo a diferença não significativa ($X^2 = 2,804$; $p = 0,246$).

- HDL plasmático

O gráfico 15 apresenta os valores de HDL plasmático, nos três grupos de diabéticos. Os dados revelam que a maioria dos diabéticos têm a HDL abaixo da faixa de normalidade (normalidade considerada: acima de 65mg/dl). Os valores médios e as medianas são apresentados na tabela 16.

Tabela 16 Comparação entre os valores médios de HDL em diabéticos.

Grupo	HDL				
	$\bar{X}$	S	Med	Mín	Máx
DI	44,09	17,51	43	12	88
DR	43,95	15,13	42	11	96
ID	50,21	22,10	46	15	98

Pode ser observado que o grupo DR é o que apresenta menores valores para a HDL plasmática. A percentagem de distribuição de HDL na população de

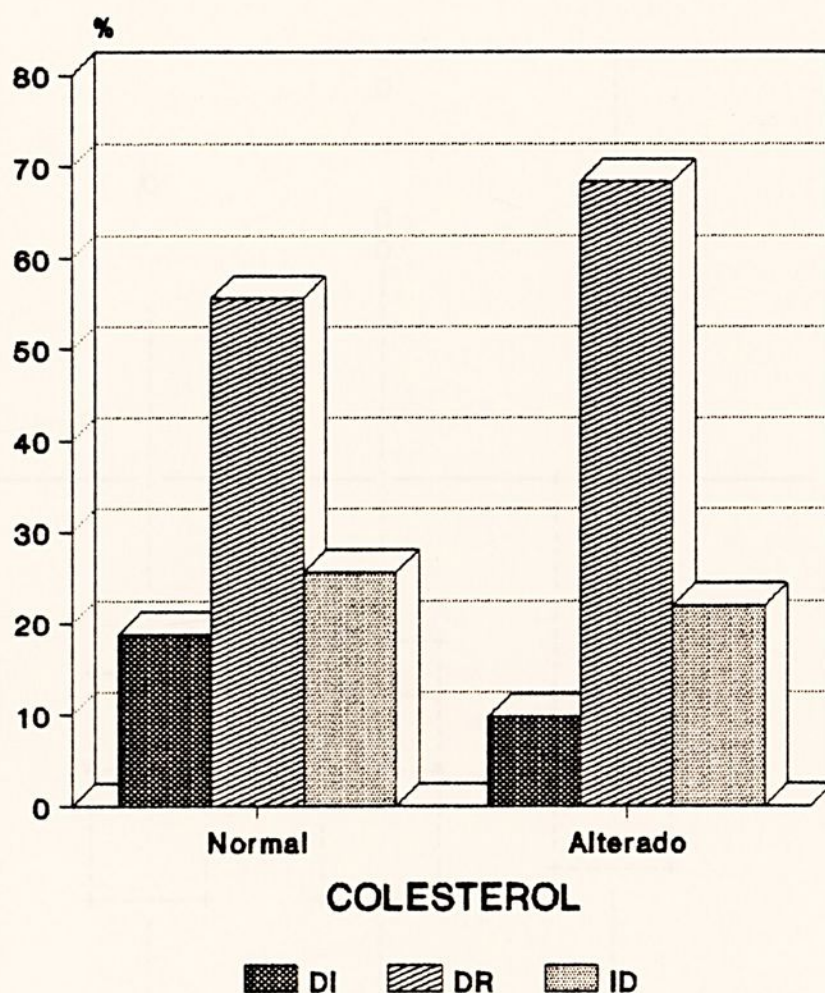


Gráfico 14 Frequência de distribuição de colesterol por grupo de diabéticos.

Valores de HDL

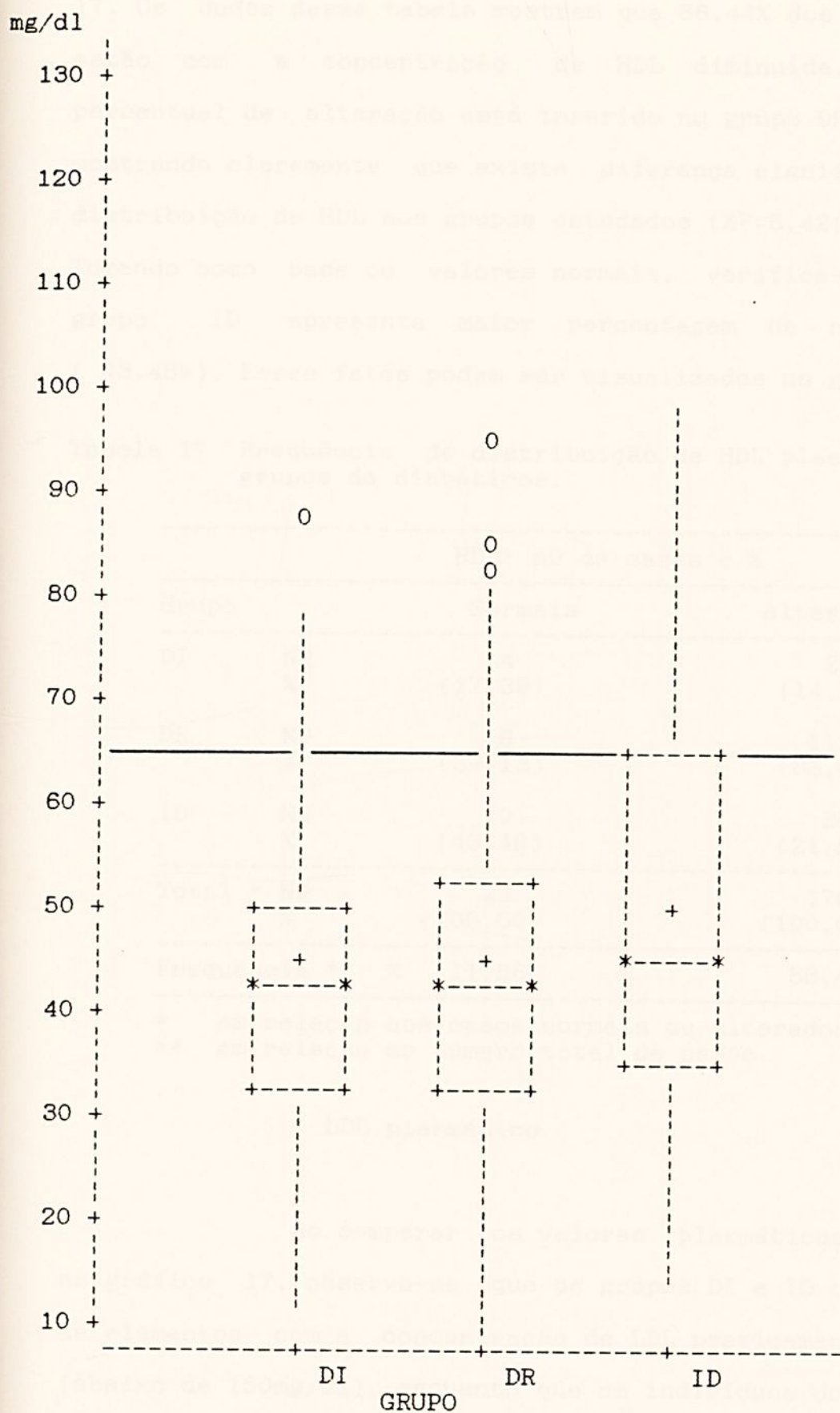


Gráfico 15 Distribuição dos valores de HDL nos grupos de diabéticos. A faixa de normalidade considerada está acima de 65 mg/dl.

diabéticos e nos grupos isoladamente é fornecida pela tabela 17. Os dados dessa tabela mostram que 88,44% dos diabéticos estão com a concentração de HDL diminuída. O maior percentual de alteração está inserido no grupo DR (63,64%), mostrando claramente que existe diferença significativa na distribuição de HDL nos grupos estudados ($X^2=6,42$; $p= 0,046$). Tomando como base os valores normais, verifica-se que o grupo ID apresenta maior percentagem de normalidade (43,48%). Esses fatos podem ser visualizados no gráfico 16.

Tabela 17 Frequência de distribuição de HDL plasmático nos grupos de diabéticos.

		HDL: nº de casos e %	
Grupo		Normais	Alterados
DI	Nº	4	26
	%	(17,39)	(14,77)
DR	Nº	9	112
	%	(39,13)	(63,64)
ID	Nº	10	38
	%	(43,48)	(21,59)
Total *	Nº	23	176
	%	(100,00)	(100,00)
Frequência **		11,56	88,44

* em relação aos casos normais ou alterados

** em relação ao número total de casos.

- LDL plasmático

Ao comparar os valores plasmáticos de LDL, no gráfico 17, observa-se que os grupos DI e ID compõem-se de elementos com a concentração de LDL praticamente normal (abaixo de 150mg/dl), enquanto que os indivíduos do grupo DR apresentam maior índice de alteração. A média do grupo DR mostra certa discrepância em relação aos demais grupos. Isto

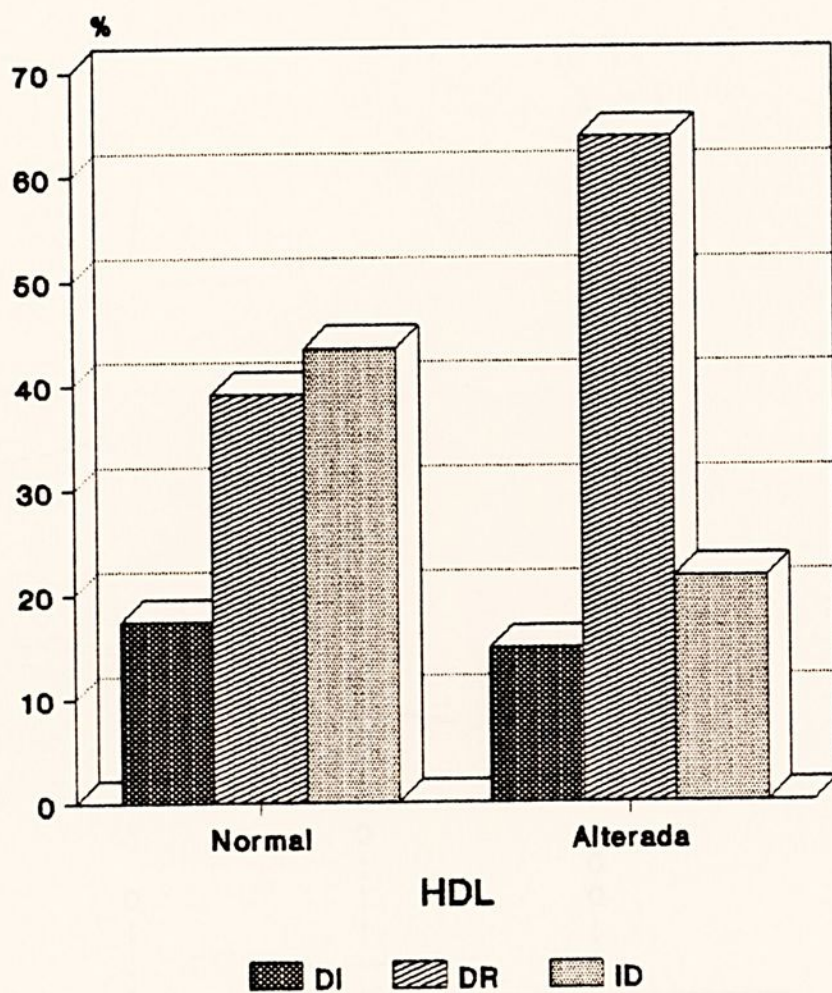


Gráfico 16 Frequência de distribuição de HDL por grupo de diabéticos.

Valores de LDL

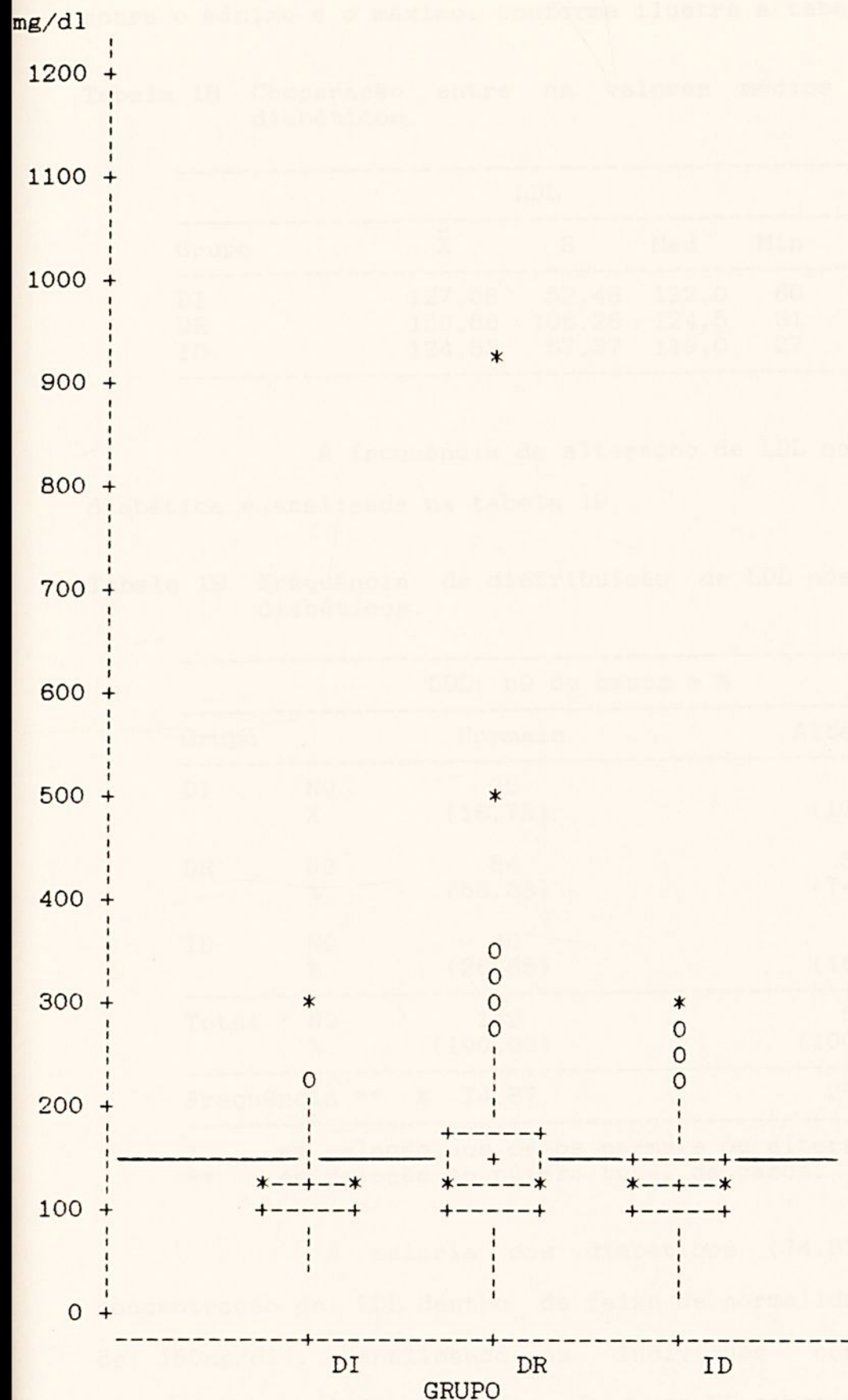


Gráfico 17 Distribuição dos valores de LDL nos grupos de diabéticos. A faixa de normalidade considerada está abaixo de 150 mg/dl.

é justificado pela maior variação de valores, observada entre o mínimo e o máximo, conforme ilustra a tabela 18.

Tabela 18 Comparação entre os valores médios de LDL em diabéticos.

Grupo	LDL				
	$\bar{X}$	S	Med	Mín	Máx
DI	127,08	52,48	122,0	60	300
DR	150,88	106,26	124,5	31	928
ID	124,83	57,37	119,0	27	288

A frequência de alteração de LDL na população diabética é analisada na tabela 19.

Tabela 19 Frequência de distribuição de LDL nos grupos de diabéticos.

LDL: nº de casos e %		
Grupo	Normais	Alterados
DI	Nº 25	5
	% (16,78)	(10,00)
DR	Nº 84	37
	% (56,38)	(74,00)
ID	Nº 40	8
	% (26,85)	(16,00)
Total *	Nº 149	50
	% (100,00)	(100,00)
Frequência **	% 74,87	25,13

* em relação aos casos normais ou alterados.

** em relação ao número total de casos.

A maioria dos diabéticos (74,87%) tem a concentração de LDL dentro da faixa de normalidade (abaixo de 150mg/dl). Analisando os indivíduos com valores alterados, conclui-se que os do grupo DR constituem-se nos principais representantes desse conjunto de diabéticos

(74,00%). Não obstante, esse grupo também é responsável por 56,38% dos indivíduos com valores normais. Através da análise estatística ($X^2=4,879$; $p=0,087$) e da visualização do gráfico 18, nota-se que os grupos de diabéticos comportam-se semelhantemente em relação à normalidade e à alteração.

- VLDL plasmático

O gráfico 19 e a tabela 20 consideram a distribuição dos valores de VLDL nos diversos grupos de diabéticos. As médias e as medianas dos grupos DI e ID são próximas, enquanto que as maiores alterações são observadas no grupo DR.

Tabela 20 Comparação entre valores médios de VLDL em diabéticos.

----- VLDL -----					
Grupo	$\bar{X}$	S	Med	Mín	Máx
DI	32,14	19,57	25,0	9,0	74
DR	42,93	33,42	33,5	7,2	192
ID	31,84	21,24	25,5	2,0	86

As percentagens de diabéticos com VLDL alterada ou normal são fornecidas pela tabela 21. A faixa de normalidade considerada está abaixo de 30mg/dl.

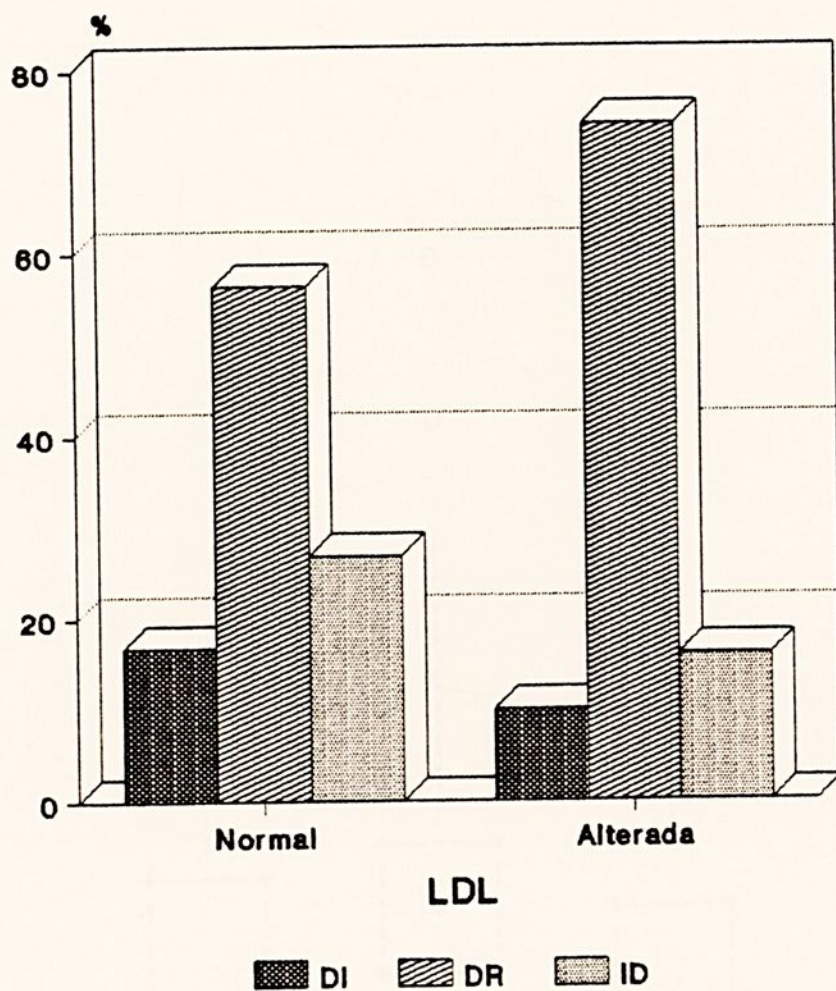


Gráfico 18 Frequência de distribuição de LDL por grupo de diabéticos.

Valores de VLDL

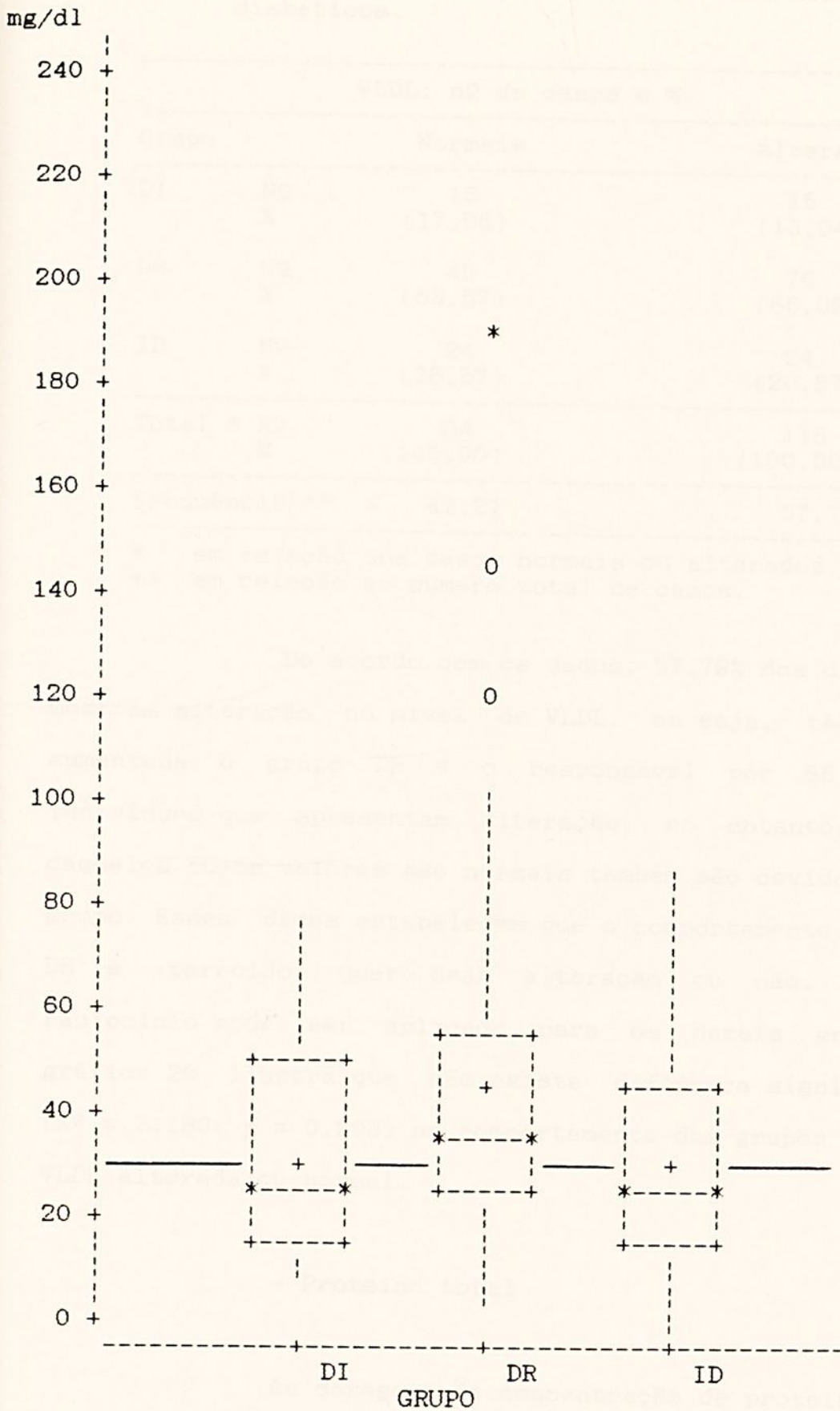


Gráfico 19 Distribuição dos valores de VLDL nos grupos de diabéticos. A faixa de normalidade considerada está abaixo de 30 mg/dl.

Tabela 21 Frequência de distribuição de VLDL nos grupos de diabéticos.

VLDL: nº de casos e %			
Grupo		Normais	Alterados
DI	Nº	15	15
	%	(17,86)	(13,04)
DR	Nº	45	76
	%	(53,57)	(66,09)
ID	Nº	24	24
	%	(28,57)	(20,87)
Total *	Nº	84	115
	%	(100,00)	(100,00)
Frequência **		% 42,21	57,79

* em relação aos casos normais ou alterados.

** em relação ao número total de casos.

De acordo com os dados, 57,79% dos diabéticos mostram alteração no nível de VLDL, ou seja, têm a VLDL aumentada. O grupo DR é o responsável por 66,09% dos indivíduos que apresentam alteração; no entanto, 53,57% daqueles cujos valores são normais também são devidos a esse grupo. Esses dados estabelecem que o comportamento do grupo DR é parecido, quer haja alteração ou não. O mesmo raciocínio pode ser aplicado para os demais grupos. O gráfico 20 ilustra que não existe diferença significativa ($X^2 = 3,190$; $p = 0,203$) no comportamento dos grupos frente à VLDL alterada ou normal.

- Proteína total

As dosagens da concentração de proteína total no diabéticos indica-nos que a média e a mediana estão

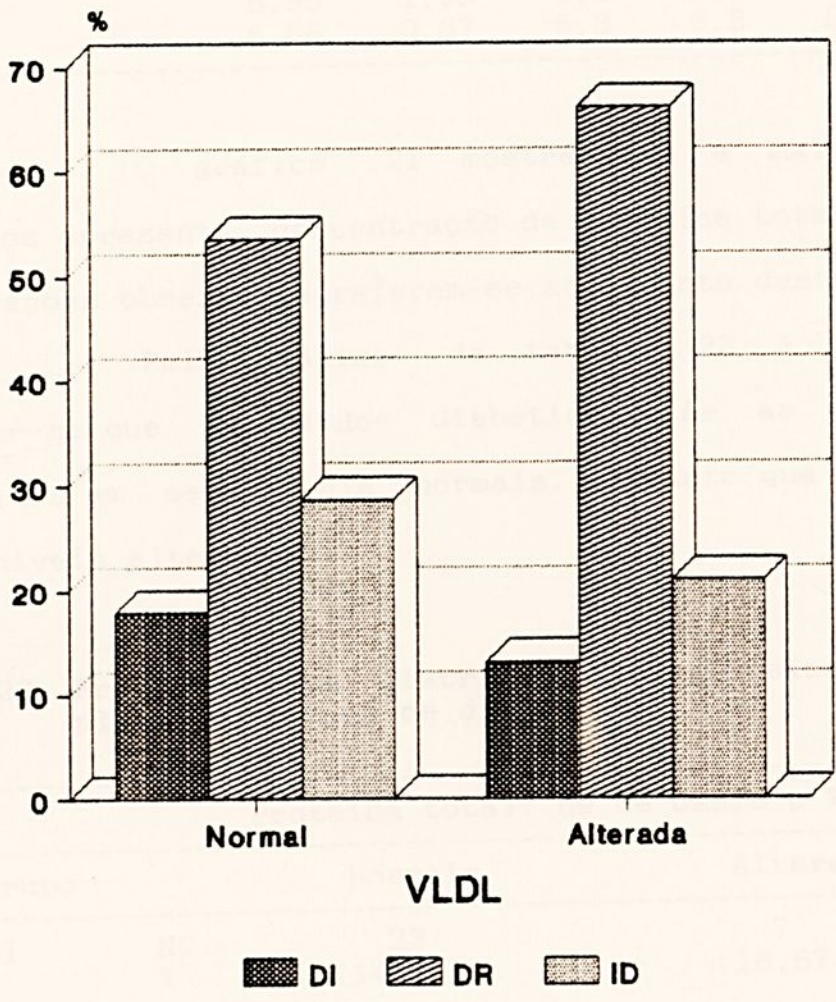


Gráfico 20 Frequência de distribuição de VLDL por grupo de diabéticos.

dentro da faixa de normalidade (4 a 8g/dl), conforme identifica a tabela 22.

Tabela 22 Comparação entre valores médios de proteína total em grupos de diabéticos.

Proteína total					
Grupo	X	S	Med	Mín	Máx
DI	7,13	1,01	6,9	5,1	8,8
DR	6,95	1,05	6,6	3,8	10,7
ID	6,86	0,87	5,3	5,3	9,0

O gráfico 21 mostra que a maioria dos diabéticos apresenta concentração de proteína total normal. As alterações observadas referem-se ao aumento desta.

Pela análise da tabela 23 é possível verificar-se que 78,89% dos diabéticos têm as proteínas plasmáticas em seus níveis normais, enquanto que 21,11% as têm em níveis alterados.

Tabela 23 Frequência de distribuição de proteína total no plasma de grupos de diabéticos.

Proteína total: nº de casos e %				
Grupo		Normais	Alterados	
DI	Nº	23	7	
	%	(14,65)	(16,67)	
DR	Nº	94	27	
	%	(59,87)	(64,29)	
ID	Nº	40	8	
	%	(25,48)	(19,05)	
Total *	Nº	157	42	
	%	(100,00)	(100,00)	
Frequência **	%	78,89	21,11	

* em relação aos casos normais ou alterados.

** em relação ao número total de casos.

Valores de Proteína Total

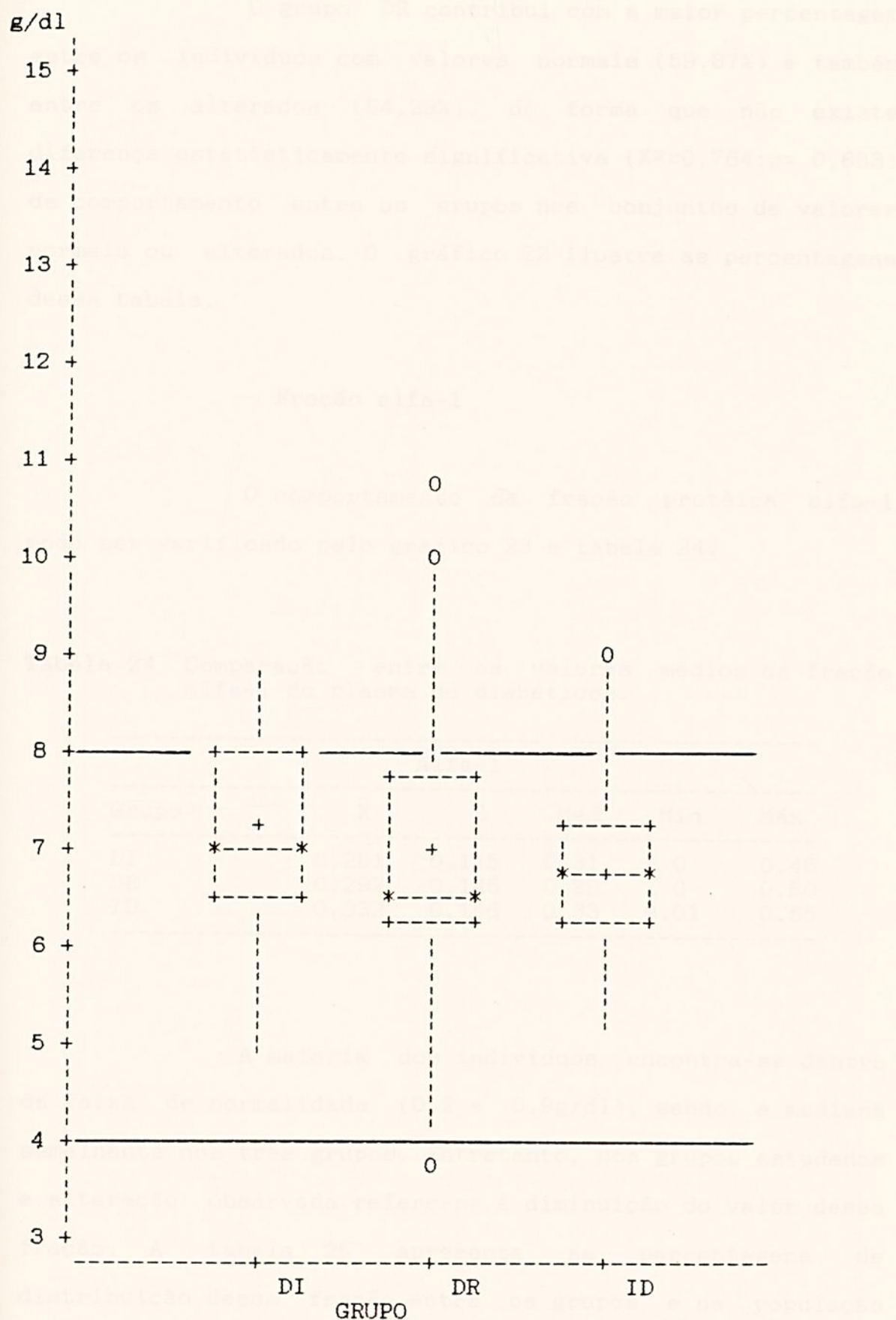


Gráfico 21 Distribuição dos valores das proteínas totais nos grupos de diabéticos. A faixa de normalidade considerada é de 4 a 8 g/dl.

O grupo DR contribui com a maior percentagem entre os indivíduos com valores normais (59,87%) e também entre os alterados (64,29%), de forma que não existe diferença estatisticamente significativa ($X^2=0,764$; $p=0,683$) de comportamento entre os grupos nos conjuntos de valores normais ou alterados. O gráfico 22 ilustra as percentagens dessa tabela.

- Fração alfa-1

O comportamento da fração protéica alfa-1 pode ser verificado pelo gráfico 23 e tabela 24.

Tabela 24 Comparação entre os valores médios da fração alfa-1 do plasma de diabéticos.

Alfa-1					
Grupo	$\bar{X}$	S	Med	Mín	Máx
DI	0,281	0,115	0,31	0	0,48
DR	0,292	0,145	0,29	0	0,80
ID	0,332	0,156	0,33	0,01	0,65

A maioria dos indivíduos encontra-se dentro da faixa de normalidade (0,2 a 0,9g/dl), sendo a mediana semelhante nos três grupos. Entretanto, nos grupos estudados a alteração observada refere-se à diminuição do valor dessa fração. A tabela 25 apresenta as percentagens de distribuição dessa fração entre os grupos e na população estudada.

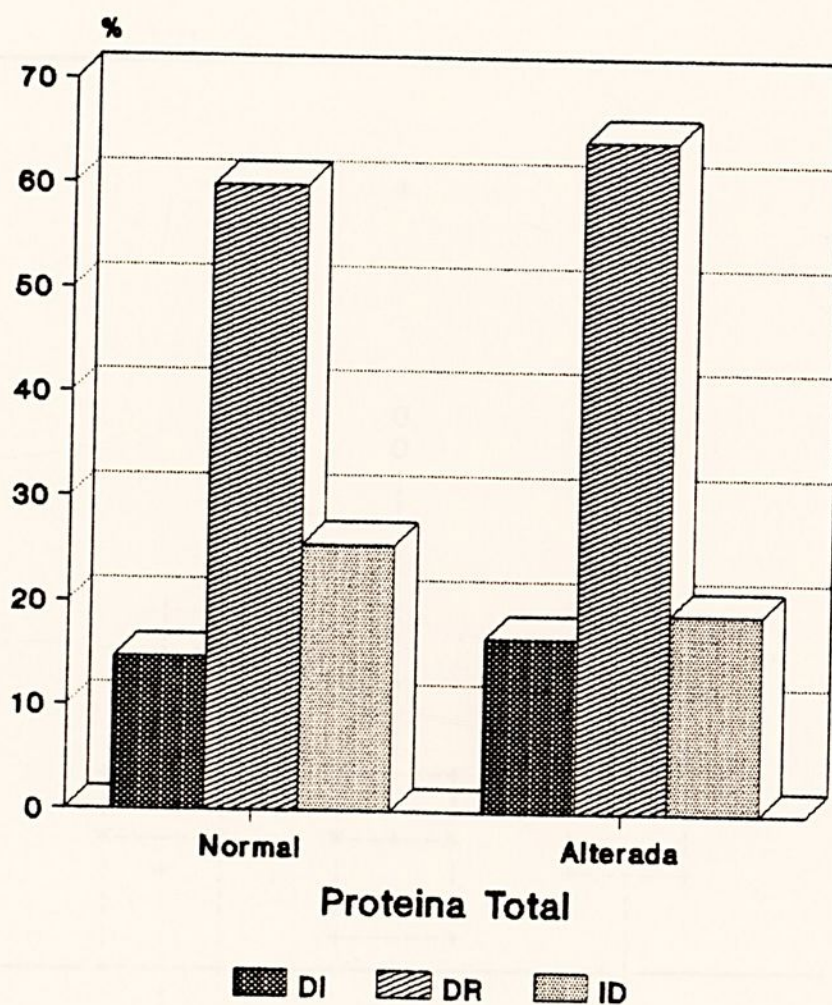


Gráfico 22 Frequência de distribuição de proteína total por grupo de diabéticos.

Valores da fração Alfa 1

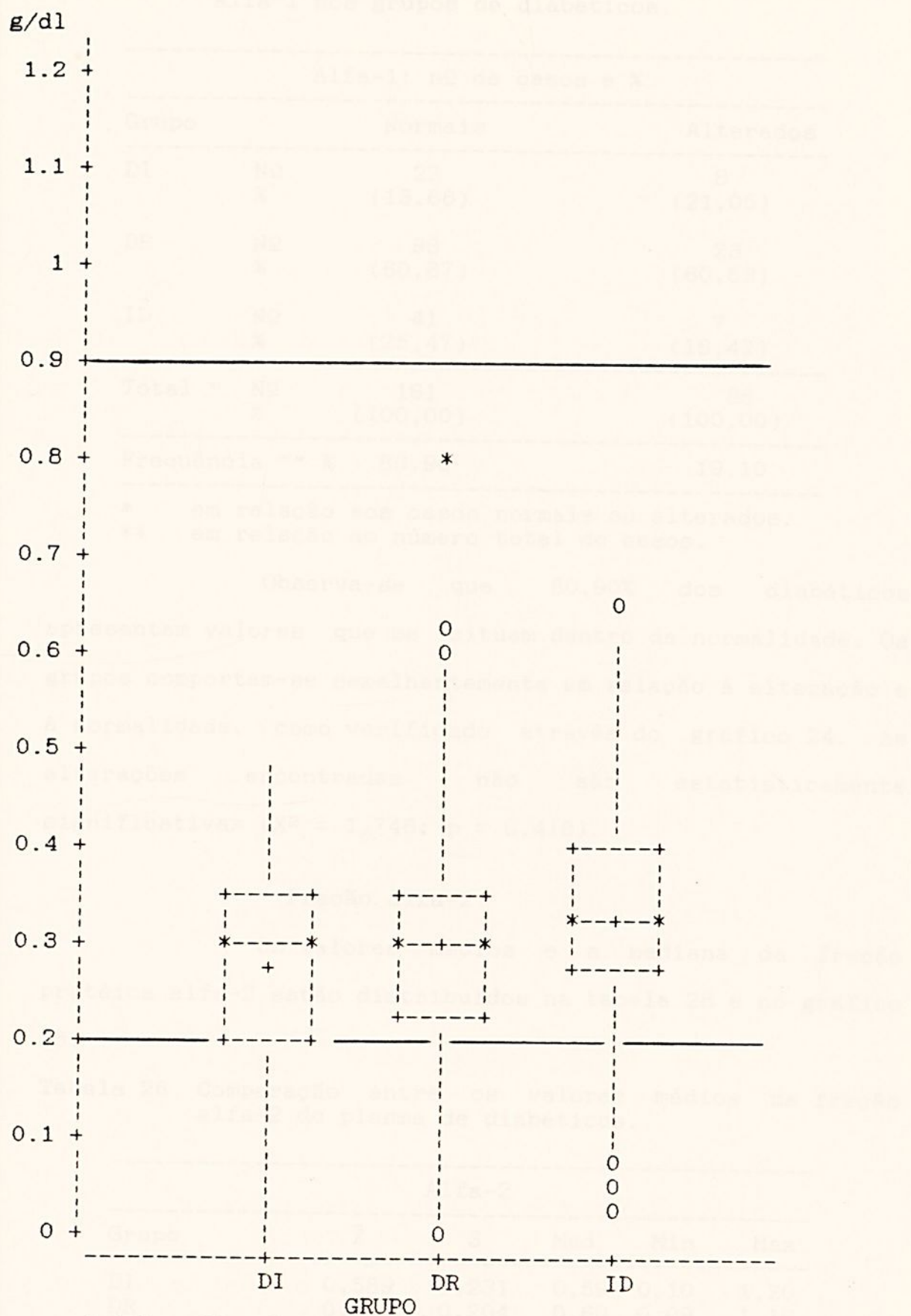


Gráfico 23 Distribuição dos valores da fração Alfa 1 nos grupos de diabéticos. A faixa de normalidade considerada é de 0,2 a 0,9 g/dl.

Tabela 25 Frequência de distribuição da fração protéica alfa-1 nos grupos de diabeticos.

Alfa-1: nº de casos e %			
Grupo		Normais	Alterados
DI	Nº	22	8
	%	(13,66)	(21,05)
DR	Nº	98	23
	%	(60,87)	(60,53)
ID	Nº	41	7
	%	(25,47)	(18,42)
Total *	Nº	161	38
	%	(100,00)	(100,00)
Frequência ** %		80,90	19,10

* em relação aos casos normais ou alterados.

** em relação ao número total de casos.

Observa-se que 80,90% dos diabéticos apresentam valores que se situam dentro da normalidade. Os grupos comportam-se semelhantemente em relação à alteração e à normalidade, como verificado através do gráfico 24. As alterações encontradas não são estatisticamente significativas ($X^2 = 1,746$; $p = 0,418$).

- Fração alfa-2

Os valores médios e a mediana da fração protéica alfa-2 estão distribuídos na tabela 26 e no gráfico 25.

Tabela 26 Comparação entre os valores médios da fração alfa-2 do plasma de diabeticos.

Alfa-2					

Grupo	$\bar{X}$	S	Med	Min	Max

DI	0,589	0,231	0,59	0,10	1,20
DR	0,600	0,204	0,60	0,09	1,12
ID	0,657	0,225	0,66	0,09	1,22

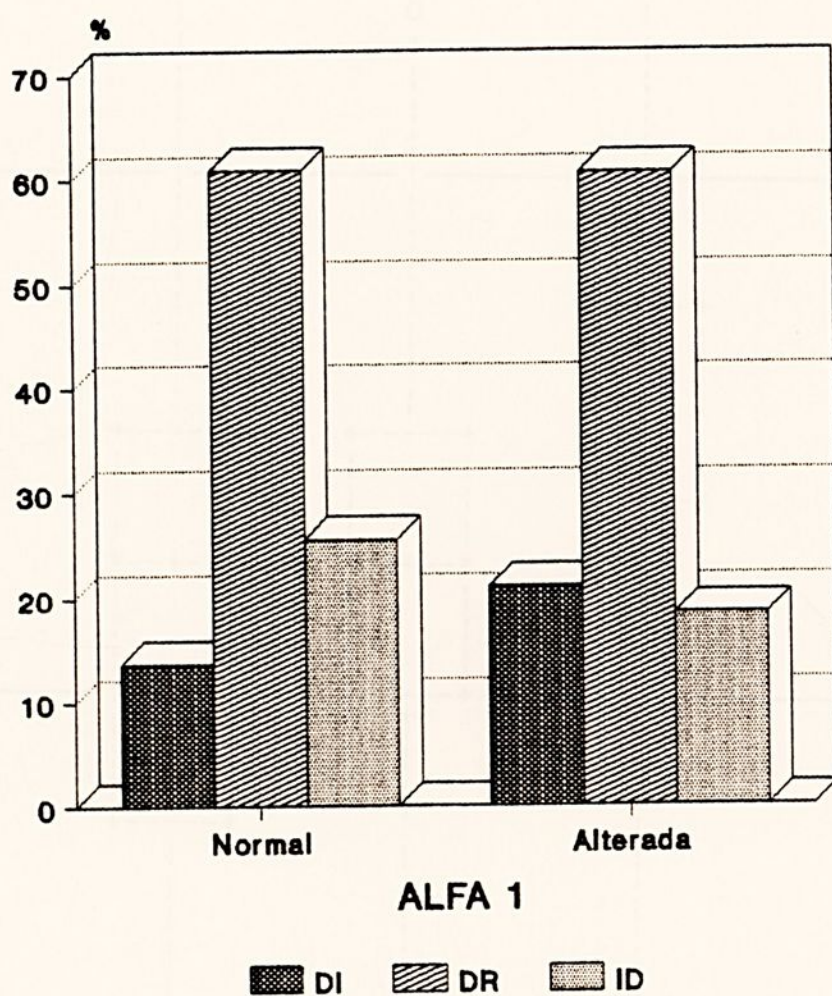


Gráfico 24 Frequência de distribuição da fração alfa 1 por grupo de diabéticos.

Valores da fração Alfa 2

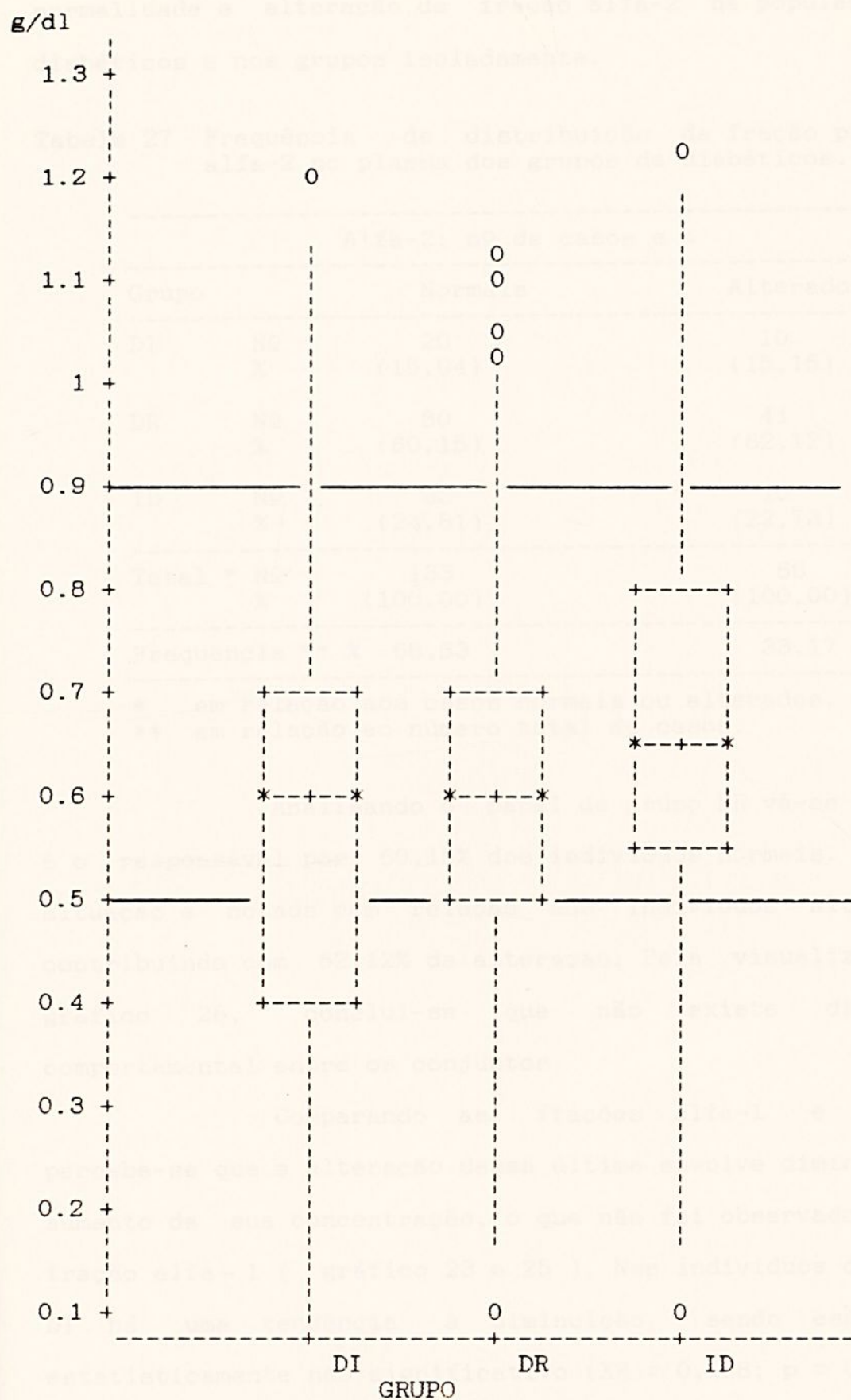


Gráfico 25 Distribuição dos valores da fração Alfa 2 nos grupos de diabéticos. A faixa de normalidade considerada é de 0,5 a 0,9 g/dl.

A tabela 27 consiste nas percentagens de normalidade e alteração de fração alfa-2 na população de diabéticos e nos grupos isoladamente.

Tabela 27 Frequência de distribuição da fração protéica alfa-2 no plasma dos grupos de diabéticos.

----- Alfa-2: nº de casos e % -----			
Grupo		Normais	Alterados
DI	Nº	20	10
	%	(15,04)	(15,15)
DR	Nº	80	41
	%	(60,15)	(62,12)
ID	Nº	33	15
	%	(24,81)	(22,73)

Total *	Nº	133	66
	%	(100,00)	(100,00)

Frequência ** %		68,83	33,17

* em relação aos casos normais ou alterados.

** em relação ao número total de casos.

Analisando o papel do grupo DR vê-se que ele é o responsável por 60,15% dos indivíduos normais. A mesma situação é notada com relação aos indivíduos alterados, contribuindo com 62,12% da alteração. Pela visualização do gráfico 26, conclui-se que não existe diferença comportamental entre os conjuntos.

Comparando as frações alfa-1 e alfa-2 percebe-se que a alteração dessa última envolve diminuição e aumento de sua concentração, o que não foi observado para a fração alfa-1 (gráfico 23 e 25). Nos indivíduos do grupo DI há uma tendência à diminuição, sendo esse fato estatisticamente não significativo ($X^2 = 0,108$; $p = 0,947$).

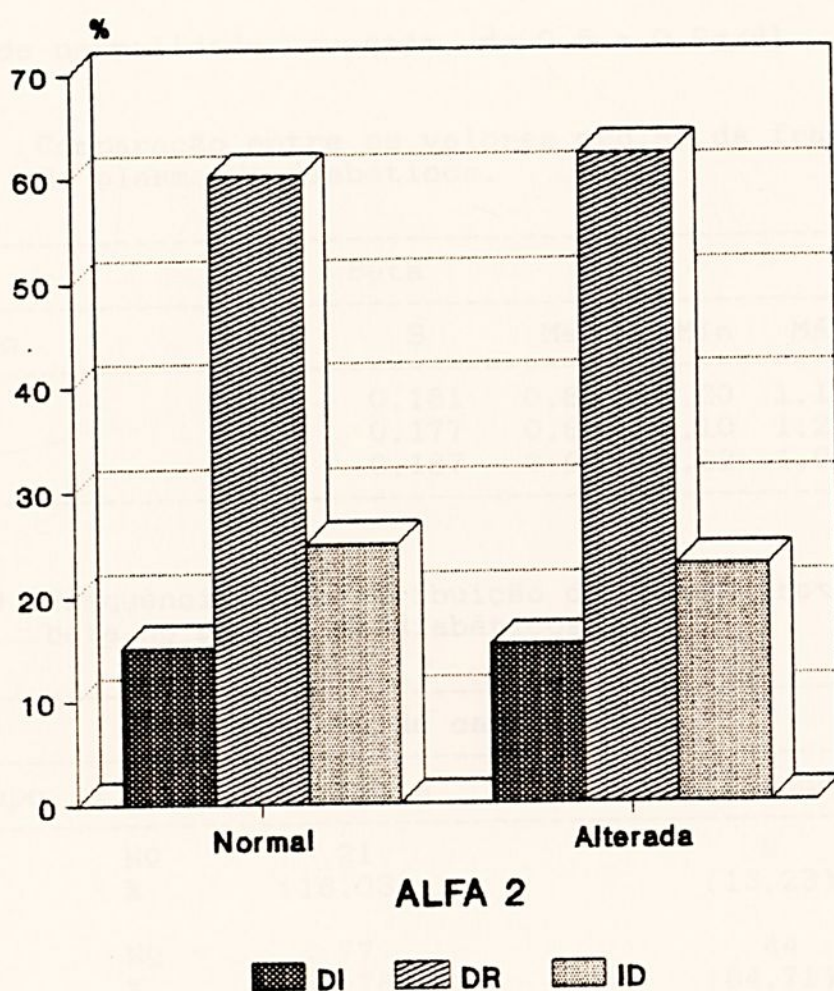


Gráfico 26 Frequência de distribuição da fração alfa 2 por grupo de diabéticos.

- Fração beta

Com relação à fração beta, a tabela 28 mostra que as médias e as medianas apresentam valores semelhantes e a distribuição dos valores segue o mesmo padrão, ilustrado no gráfico 27, nos três grupos considerados. Nota-se que nesses grupos, alguns pacientes têm a concentração da fração beta diminuída. Porém, de acordo com a tabela 29, verifica-se que 65,82% da população de diabéticos encontram-se dentro da faixa de normalidade, ou seja, de 0,5 a 0,9g/dl.

Tabela 28 Comparação entre os valores médios da fração beta do plasma de diabéticos.

Beta					
Grupo	$\bar{X}$	S	Med	Min	Máx
DI	0,657	0,181	0,66	0,20	1,13
DR	0,637	0,177	0,64	0,10	1,26
ID	0,631	0,187	0,63	0,22	1,05

Tabela 29 Frequência de distribuição da fração protéica beta no plasma de diabéticos.

Beta: nº de casos e %			
Grupo		Normais	Alterados
DI	Nº	21	9
	%	(16,03)	(13,23)
DR	Nº	77	44
	%	(58,78)	(64,71)
ID	Nº	33	15
	%	(25,19)	(22,06)
Total *	Nº	131	68
	%	(100,00)	(100,00)
Frequência ** %		65,82	34,18

* em relação aos casos normais ou alterados.

** em relação ao número total de casos.

Valores da fração Beta

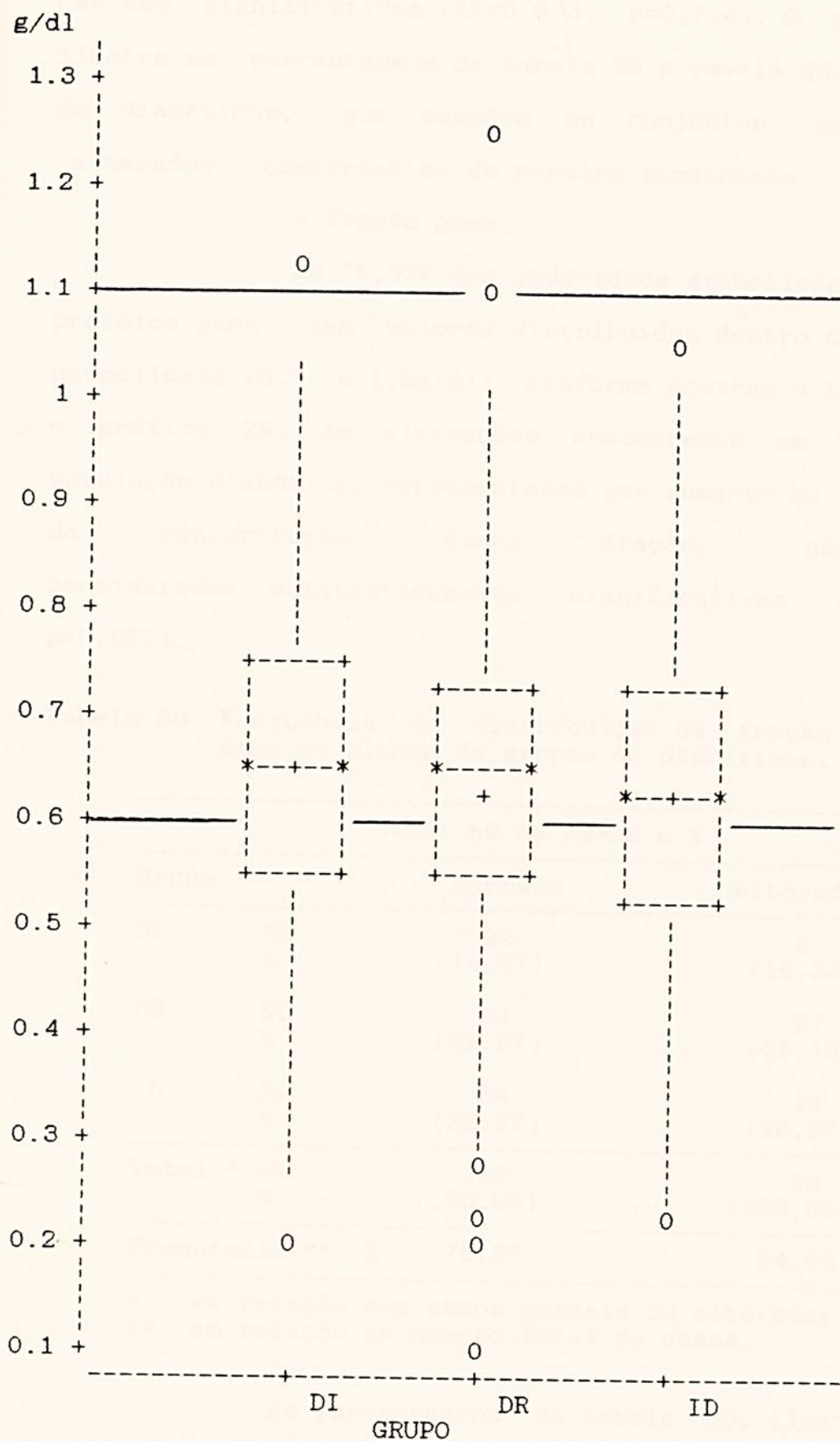


Gráfico 27 Distribuição dos valores da fração Beta nos grupos de diabéticos. A faixa de normalidade considerada é de 0,6a 1,1 g/dl.

Estatisticamente, as alterações encontradas não são significativas ($X^2=0,673$; $p=0,714$). O gráfico 28 ilustra as percentagens da tabela 29 e revela que os grupos de diabéticos, que compõem os conjuntos "normais" ou "alterados", comportam-se de maneira semelhante.

- Fração gama

Em 75,37% dos indivíduos diabéticos, a fração protéica gama tem valores distribuídos dentro da faixa de normalidade (0,7 a 1,5g/dl), conforme mostram a tabela 30 e o gráfico 29. As alterações encontradas em 24,63% da população diabética, representadas por aumento ou diminuição da concentração dessa fração, não são consideradas estatisticamente significativas ($X^2=0,949$; $p=0,622$).

Tabela 30 Frequência de distribuição da fração protéica gama no plasma de grupos de diabéticos.

Gama: nº de casos e %			
-----		Normais	Alterados
Grupo			
DI	Nº	22	8
	%	(14,67)	(16,33)
DR	Nº	94	27
	%	(62,67)	(55,10)
ID	Nº	34	14
	%	(22,67)	(28,57)

Total *	Nº	150	49
	%	(100,00)	(100,00)

Frequência **	%	75,37	24,63

* em relação aos casos normais ou alterados

** em relação ao número total de casos.

As percentagens da tabela 30, ilustradas no gráfico 30 permitem a conclusão de que não existe mudança de

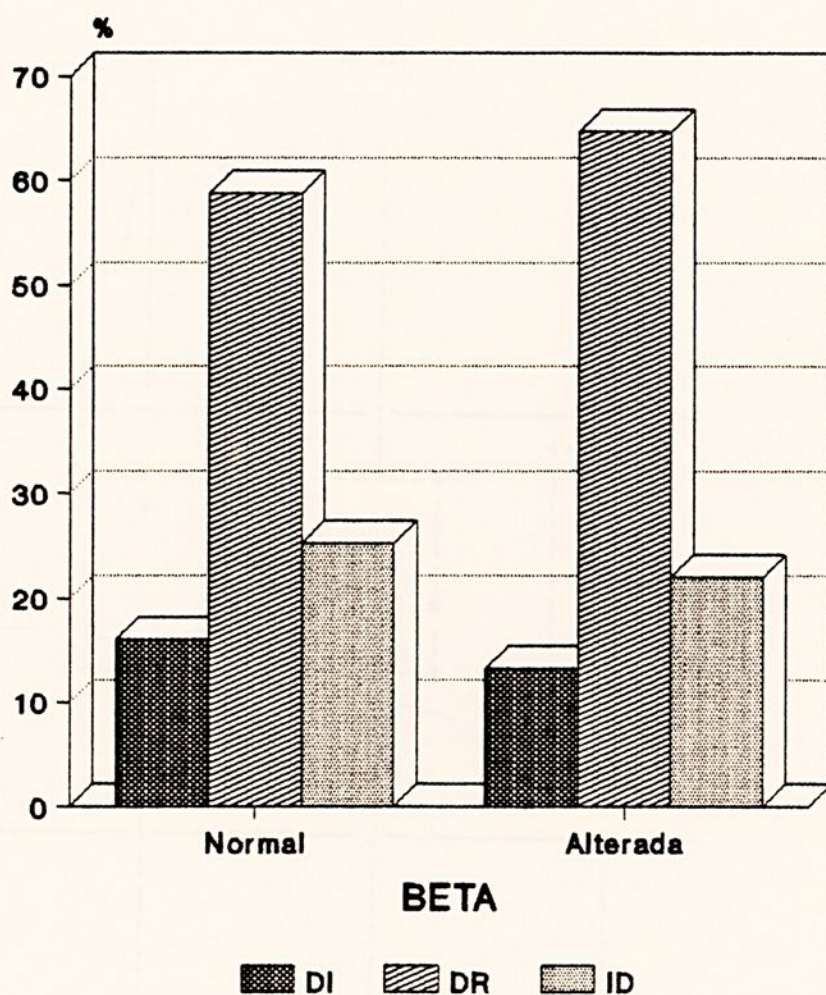


Gráfico 28 Frequência de distribuição da fração beta por grupo de diabéticos.

Valores da fração Gama

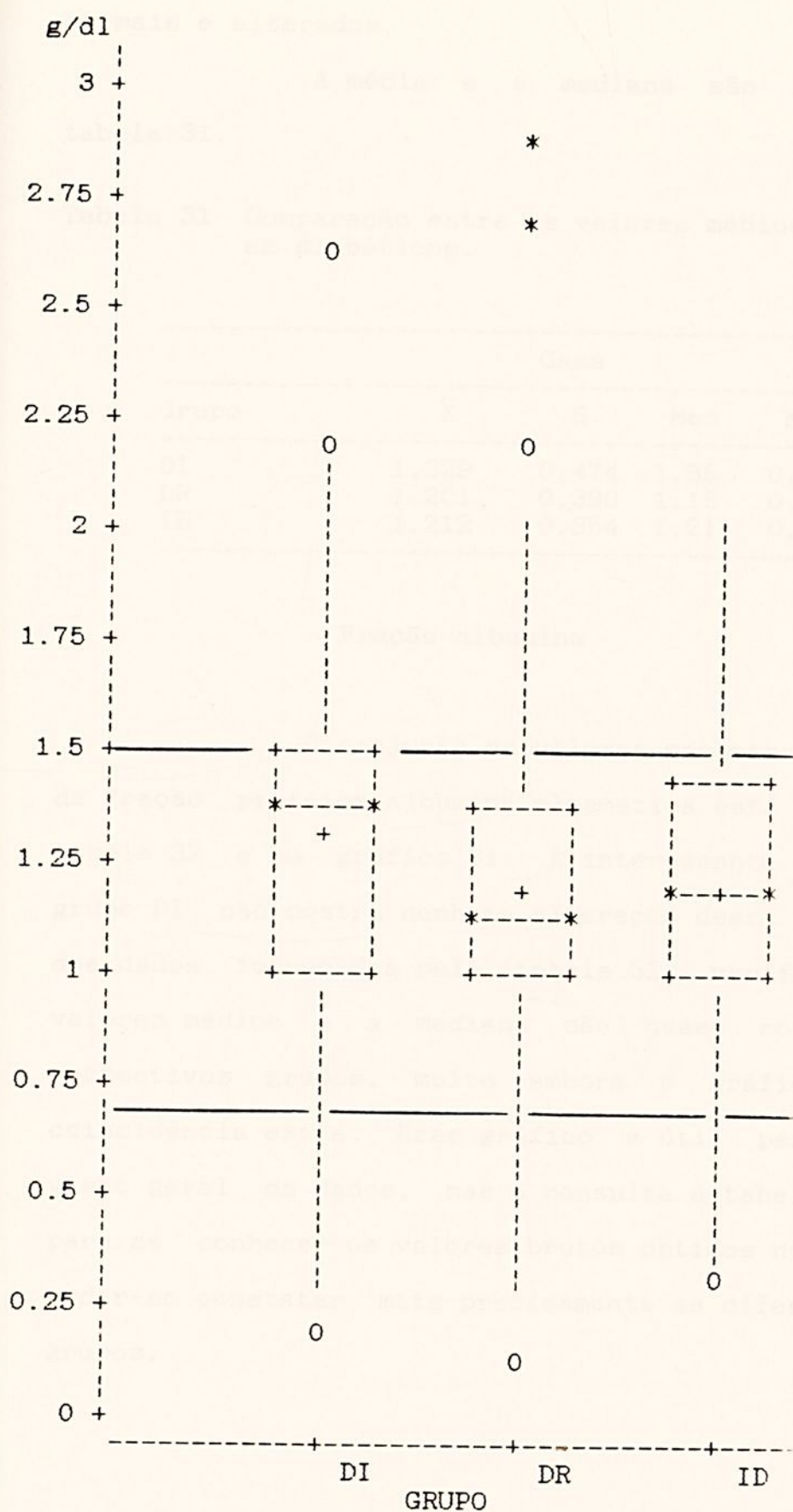


Gráfico 29 Distribuição dos valores da fração Gama nos grupos de diabéticos. A faixa de normalidade considerada é de 0,7 a 1,5 g/dl.

comportamento dos grupos que compõem os conjuntos de valores normais e alterados.

A média e a mediana são fornecidas pela tabela 31.

Tabela 31 Comparação entre os valores médios da fração gama em diabéticos.

Gama					
Grupo	$\bar{X}$	S	Med	Mín	Máx
DI	1,329	0,474	1,35	0,21	2,65
DR	1,201	0,390	1,15	0,15	2,90
ID	1,212	0,354	1,21	0,33	2,00

- Fração albumina

O conjunto de valores encontrados na dosagem da fração protéica albumina plasmática está representado na tabela 32 e no gráfico 31. É interessante destacar que o grupo DI não mostra nenhuma alteração desta fração. Através dos dados fornecidos pela tabela 32, verifica-se que os valores médios e a mediana são quase coincidentes nos respectivos grupos, muito embora o gráfico 31 ilustre coincidência exata. Esse gráfico é útil para fornecer uma visão geral do dados, mas a consulta à tabela é importante para se conhecer os valores brutos obtidos no experimento e poder-se constatar mais precisamente as diferenças entre os grupos.

Gráfico 31 Frequência de distribuição da fração gama por grupo de diabéticos.

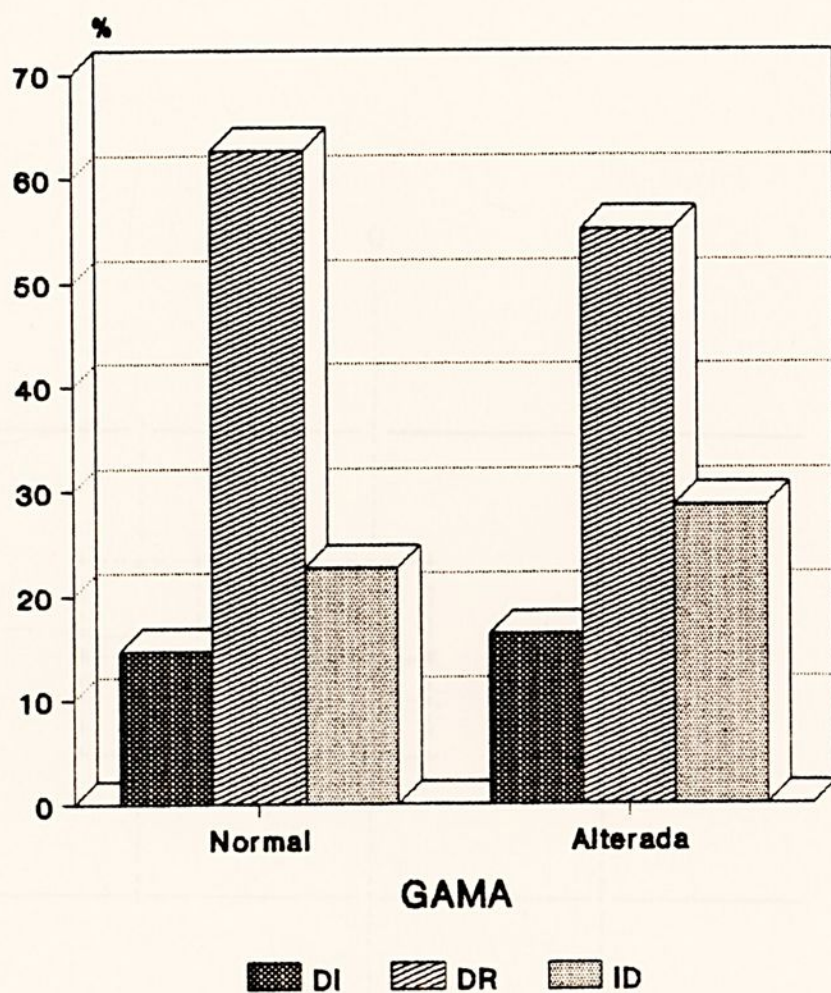


Gráfico 30 Frequência de distribuição da fração gama por grupo de diabéticos.

Valores da fração Albumina

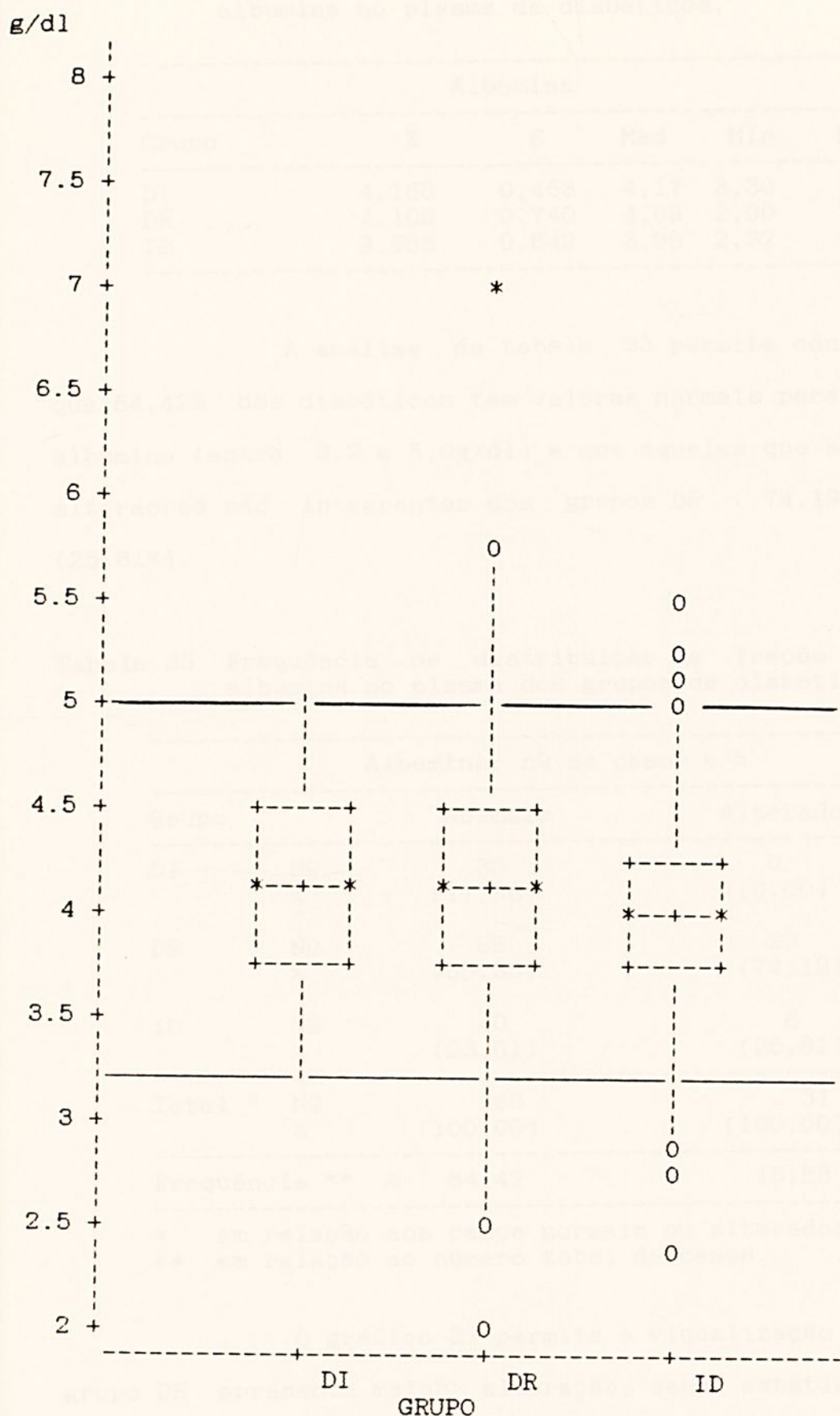


Gráfico 31 Distribuição dos valores da fração Albumina nos grupos de diabéticos. A faixa de normalidade considerada é de 3,2 a 5,0 g/dl.

Tabela 32 Comparação entre os valores médios da fração albumina no plasma de diabéticos.

Albumina					
Grupo	$\bar{X}$	S	Med	Mín	Máx
DI	4,168	0,463	4,17	3,30	5,00
DR	4,108	0,740	4,09	2,00	7,00
ID	3,985	0,649	3,98	2,32	5,52

A análise da tabela 33 permite constatar-se que 84,42% dos diabéticos têm valores normais para a fração albumina (entre 3,2 e 5,0g/dl) e que aqueles que apresentam alterações são integrantes dos grupos DR (74,19%) e ID (25,81%).

Tabela 33 Frequência de distribuição da fração protéica albumina no plasma dos grupos de diabéticos.

Albumina: nº de casos e %			
Grupo		Normais	Alterados
DI	Nº	30	0
	%	(17,86)	(0,00)
DR	Nº	98	23
	%	(58,33)	(74,19)
ID	Nº	40	8
	%	(23,81)	(25,81)
Total *	Nº	168	31
	%	(100,00)	(100,00)
Frequência **		% 84,42	15,58

* em relação aos casos normais ou alterados.

** em relação ao número total de casos.

O gráfico 32 permite a visualização de que o grupo DR apresenta maior alteração, sendo estatisticamente significativa ($X^2=6,662$; $p=0,036$) a diferença de comportamento entre os grupos.

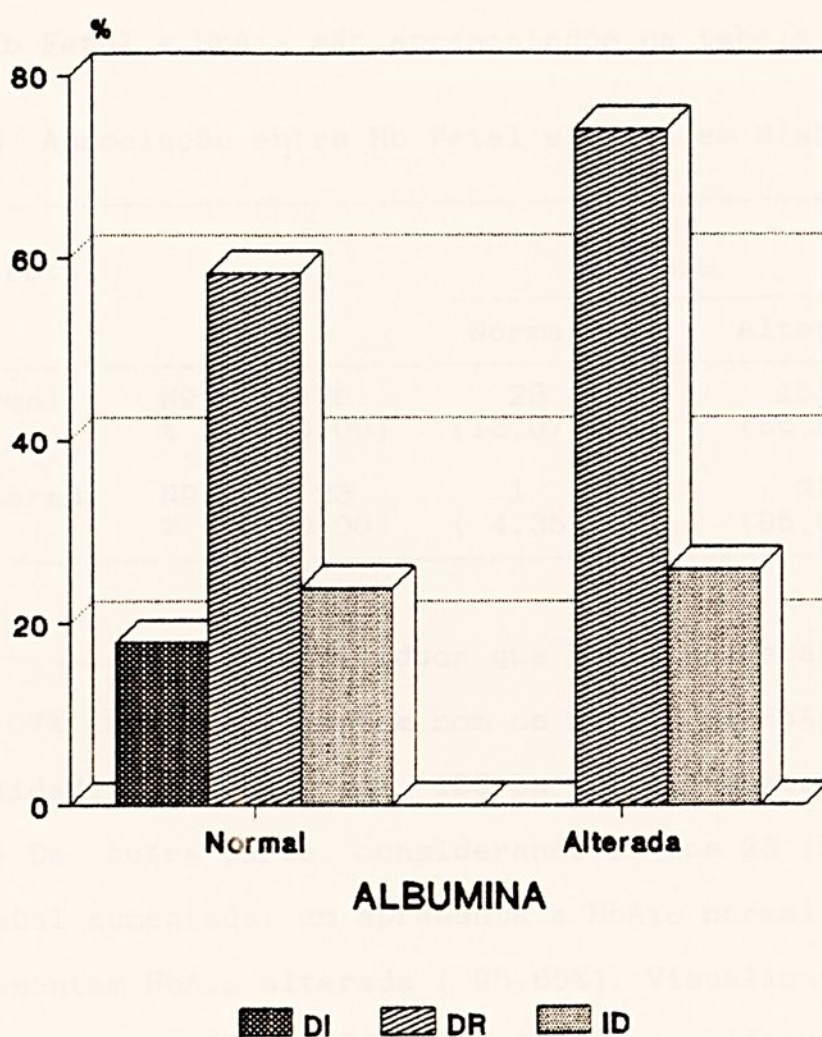


Gráfico 32 Frequência de distribuição da fração albumina por grupo de diabéticos.

IV.2. Testes de associação entre duas variáveis

Os testes de associação envolvendo duas variáveis foram realizadas com o intuito de verificar a independência ou associação destas.

- Hb Fetal e HbA_{1c}

Os resultados obtidos a partir da correlação entre a Hb Fetal e HbA_{1c} são apresentados na tabela 34.

Tabela 34 Associação entre Hb Fetal e HbA_{1c} em diabéticos.

Hb Fetal			HbA _{1c}	
			Normal	Alterada
Normal	Nº	176	23	153
	%	(100,00)	(13,07)	(86,93)
Alterada	Nº	23	1	22
	%	(100,00)	(4,35)	(95,65)

Dos 176 indivíduos que têm a Hb Fetal normal, 23 ou 13,07% também apresentam com os níveis da HbA_{1c} dentro da normalidade, enquanto que 153 ou 86,93% mostram HbA_{1c} alterada. De outra parte, considerando-se aos 23 indivíduos com Hb Fetal aumentada, um apresenta a HbA_{1c} normal (4,35%) e 22 apresentam HbA_{1c} alterada (95,65%). Visualizando essas percentagens no gráfico 33 conclui-se que, o comportamento normal ou alterado da HbA_{1c} é semelhante, independentemente do fato da Hb Fetal apresentar-se normal ou alterada. Portanto, essas variáveis são independentes.

- HbA_{1c} e triglicerídeos

A associação da HbA_{1c} com os triglicerídeos fornece os resultados que estão ilustrados na tabela 35.

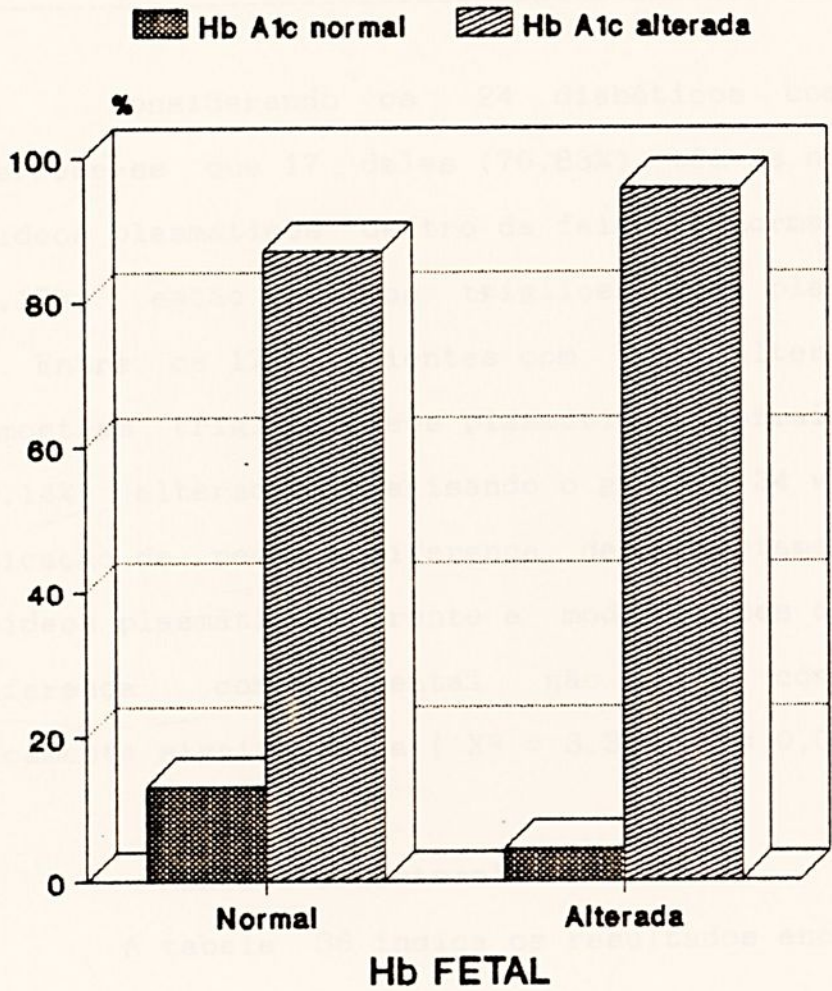


Gráfico 33 Frequência de distribuição de Hb A₁c normal e alterada em diabéticos que apresentam taxa normal ou alterada de Hb Fetal.

Tabela 35 Associação entre HbA_{1c} e os triglicerídeos.

HbA _{1c}		Triglicerídeos	
		Normais	Alterados
Normal	Nº 24 % (100,00)	17 (70,83)	7 (29,17)
Alterada	Nº 175 % (100,00)	89 (50,86)	86 (49,14)

Considerando os 24 diabéticos com HbA_{1c} normal, percebe-se que 17 deles (70,83%) têm os níveis de triglicerídeos plasmáticos dentro da faixa de normalidade e sete (29,17%) estão com os triglicerídeos plasmáticos alterados. Entre os 175 pacientes com HbA_{1c} alterada, 89 (50,86%) mostram triglicerídeos plasmáticos normais e 86 deles (49,14%) alterados. Analisando o gráfico 34 verifica-se a indicação de pequena diferença de comportamento dos triglicerídeos plasmáticos frente a modificações da HbA_{1c}, essa diferença comportamental não é considerada estatisticamente significativa ($X^2 = 3,383$; $p = 0,066$).

- HbA_{1c} e colesterol

A tabela 36 indica os resultados encontrados na associação da HbA_{1c} com o colesterol.

Tabela 36 Associação entre HbA_{1c} e Colesterol.

HbA _{1c}		Colesterol	
		Normal	Alterado
Normal	Nº 24 % (100,00)	20 (83,33)	4 (16,67)
Alterada	Nº 175 % (100,00)	97 (55,43)	78 (44,57)

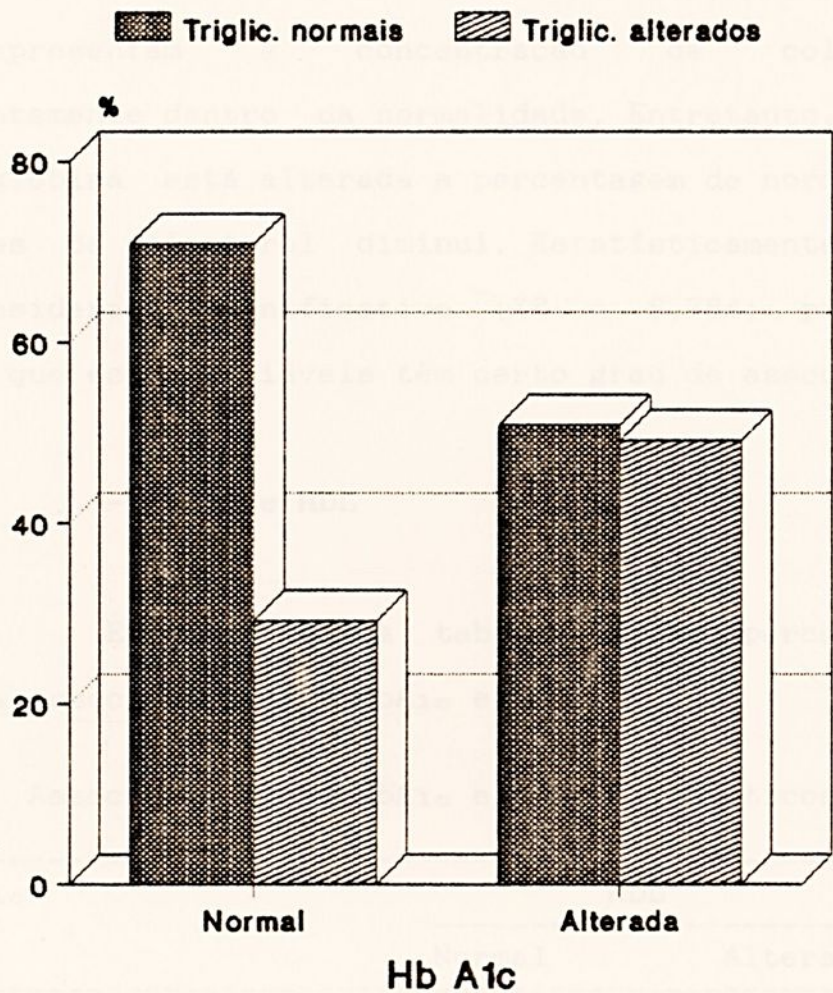


Gráfico 34 Frequência de distribuição de triglicerídeos normais e alterados em diabéticos que apresentam taxa normal ou alterada de Hb A_{1c}.

Nos 24 pacientes com HbA_{1c} normal, 83,33% apresentam colesterol plasmático normal e o restante (16,67%) alterado. Dos 175 diabéticos que apresentam a HbA_{1c} alterada, 55,43% estão com o colesterol plasmático normal, enquanto que 44,57% o apresentam alterado (gráfico 35). Observa-se que os indivíduos com a concentração da HbA_{1c} normal apresentam a concentração de colesterol predominantemente dentro da normalidade. Entretanto, quando essa hemoglobina está alterada a percentagem de normalidade dos valores de colesterol diminui. Estatisticamente, esse fato é considerado significativo ($X^2 = 6,784$; $p=0,009$), indicando que essas variáveis têm certo grau de associação.

- HbA_{1c} e HDL

Encontra-se na tabela 37 as percentagens obtidas da associação entre HbA_{1c} e HDL.

Tabela 37 Associação entre HbA_{1c} e HDL em diabéticos.

HbA _{1c}		HDL	
		Normal	Alterada
Normal	Nº	24	4
	% (100,00)	(16,67)	(83,33)
Alterada	Nº	175	19
	% (100,00)	(10,86)	(89,14)

Através das percentagens da tabela 37 e do gráfico 36, observa-se que o controle glicêmico não interfere no comportamento da HDL, pois a alteração verificada no nível de HDL (83,33%) quando a HbA_{1c} está

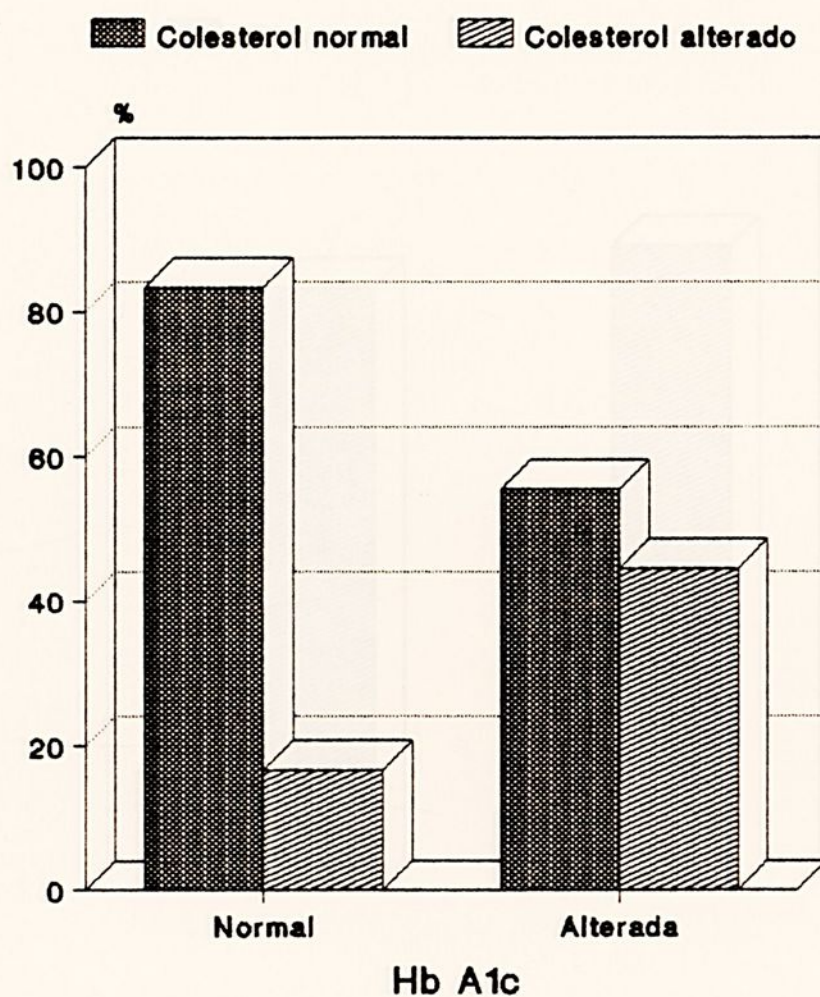


Gráfico 35 Frequência de distribuição de colesterol normal e alterado em diabéticos que apresentam taxa normal ou alterada de Hb A_{1c}.

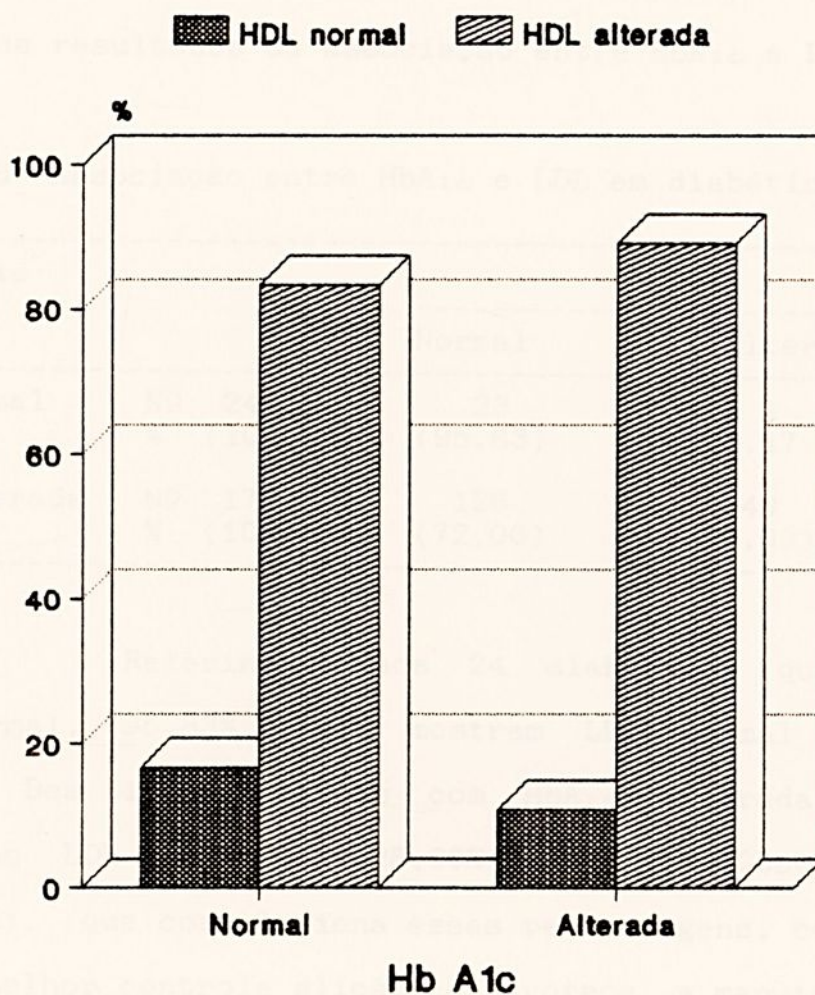


Gráfico 36 Frequência de distribuição de HDL normal ou alterada em diabéticos que apresentam taxa normal ou alterada de Hb A_{1c}.

normal é semelhante a encontrada quando a HbA_{1c} está alterada (89,14%). Esse fato indica que não há associação entre essas duas variáveis.

- HbA_{1c} e LDL

As percentagens expressas na tabela 38 indicam os resultados da associação entre HbA_{1c} e LDL.

Tabela 38 Associação entre HbA_{1c} e LDL em diabéticos.

HbA _{1c}		LDL	
		Normal	Alterada
Normal	Nº	24	1
	%	(100,00)	(95,83)
Alterada	Nº	126	49
	%	(72,00)	(28,00)

Referindo-se aos 24 diabéticos que têm a HbA_{1c} normal, 95,83% desses mostram LDL normal e 4,17% alterada. Dos 175 pacientes com HbA_{1c} alterada, 72,00% apresentam LDL normal e 28,00% alterada. Observando o gráfico 37, que correlaciona essas percentagens, conclui-se que um melhor controle glicêmico favorece a manutenção das taxas de LDL dentro da faixa de normalidade. Esse comportamento é estatisticamente significativo ($X^2 = 6,373$; $p = 0,012$), indicando que existe dependência entre essas variáveis.

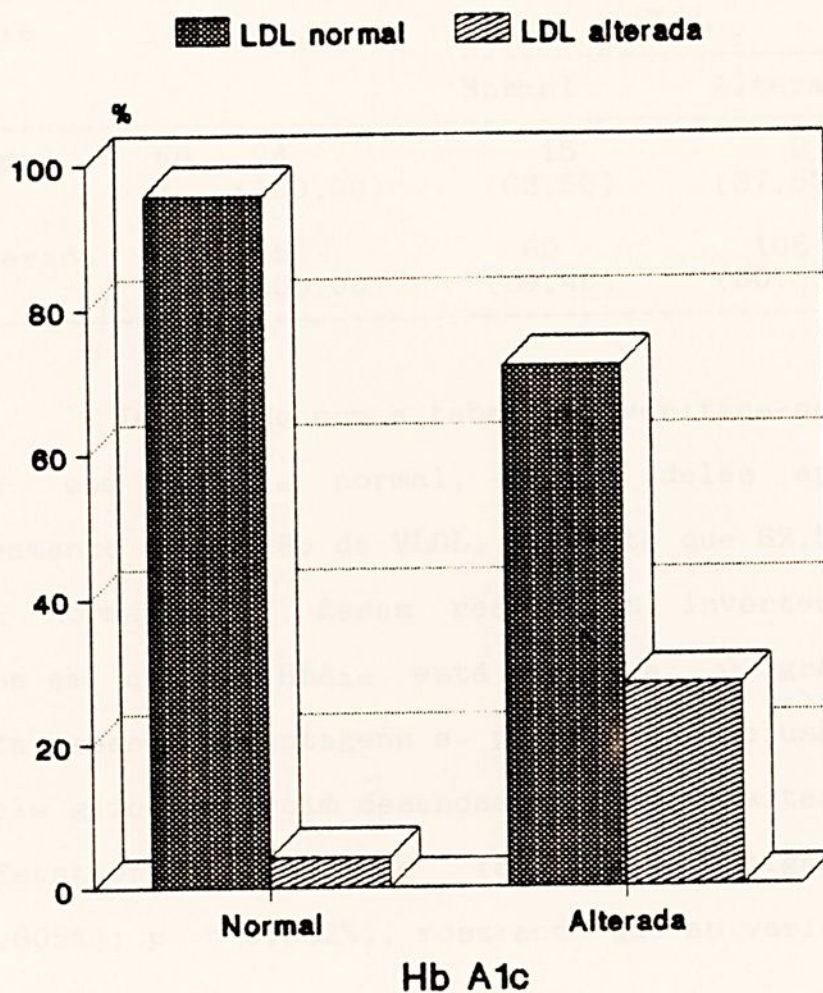


Gráfico 37 Frequência de distribuição de LDL normal ou alterada em diabéticos que apresentam taxa normal ou alterada de Hb A_{1c}.

- HbA_{1c} e VLDL

São indicados na tabela 39 os resultados da associação entre HbA_{1c} e VLDL.

Tabela 39 Associação entre HbA_{1c} e VLDL em diabéticos.

HbA _{1c}		VLDL	
		Normal	Alterada
Normal	Nº	24	15
	%	(100,00)	(62,50)
Alterada	Nº	175	69
	%	(100,00)	(39,46)

De acordo com a tabela 39 verifica-se que dos pacientes com a HbA_{1c} normal, 37,50% deles apresentam simultaneamente alteração da VLDL, enquanto que 62,50% estão dentro da normalidade. Esses resultados invertem-se nos diabéticos em que a HbA_{1c} está alterada. O gráfico 38 representa essas percentagens e permite a conclusão de que um controle glicêmico ruim desencadeia maiores alterações na VLDL. Estatisticamente este fato é significativo ($X^2 = 4,605\%$; $p = 0,032\%$), mostrando que as variáveis são dependentes entre si.

- Triglicerídeos e HDL

Os testes de associação entre os triglicerídeos e a HDL fornecem os resultados expressos na tabela 40.



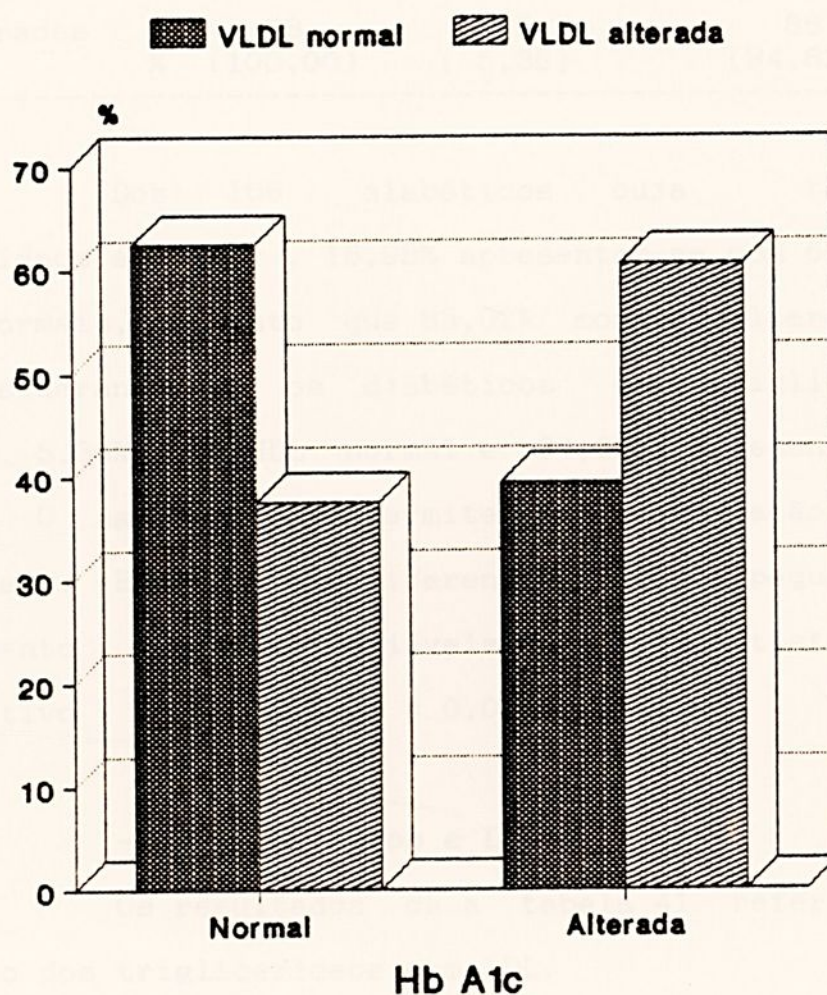


Gráfico 38 Frequência de distribuição de VLDL normal ou alterada em diabéticos que apresentam taxa normal ou alterada de Hb A_{1c}.

Tabela 40 Associação entre triglicerídeos e HDL em diabéticos.

Triglicerídeos			HDL	
			Normal	Alterada
Normais	Nº 106		18	88
	% (100,00)		(16,98)	(83,02)
Alterados	Nº 93		5	88
	% (100,00)		(5,38)	(94,62)

Dos 106 diabéticos cuja taxa de triglicerídeos é normal, 16,98% apresentam-se com os níveis de HDL normais, enquanto que 83,02% mostram alteração de HDL. Considerando-se os diabéticos com triglicerídeos alterados, 5,38% têm HDL normal e 94,62% apresentam HDL alterado. O gráfico 39 permite a visualização dessas percentagens. Embora as diferenças sejam pequenas, o comportamento dessas variáveis é estatisticamente significativo ($X^2 = 6,526$; $p = 0,011$).

- Triglicerídeos e LDL

Os resultados da a tabela 41 referem-se à associação dos triglicerídeos com LDL.

Tabela 41 Associação entre triglicerídeos e LDL em diabéticos.

Triglicerídeos			LDL	
			Normal	Alterada
Normais	Nº 106		76	30
	% (100,00)		(71,70)	(28,30)
Alterados	Nº 93		73	20
	% (100,00)		(78,49)	(21,51)

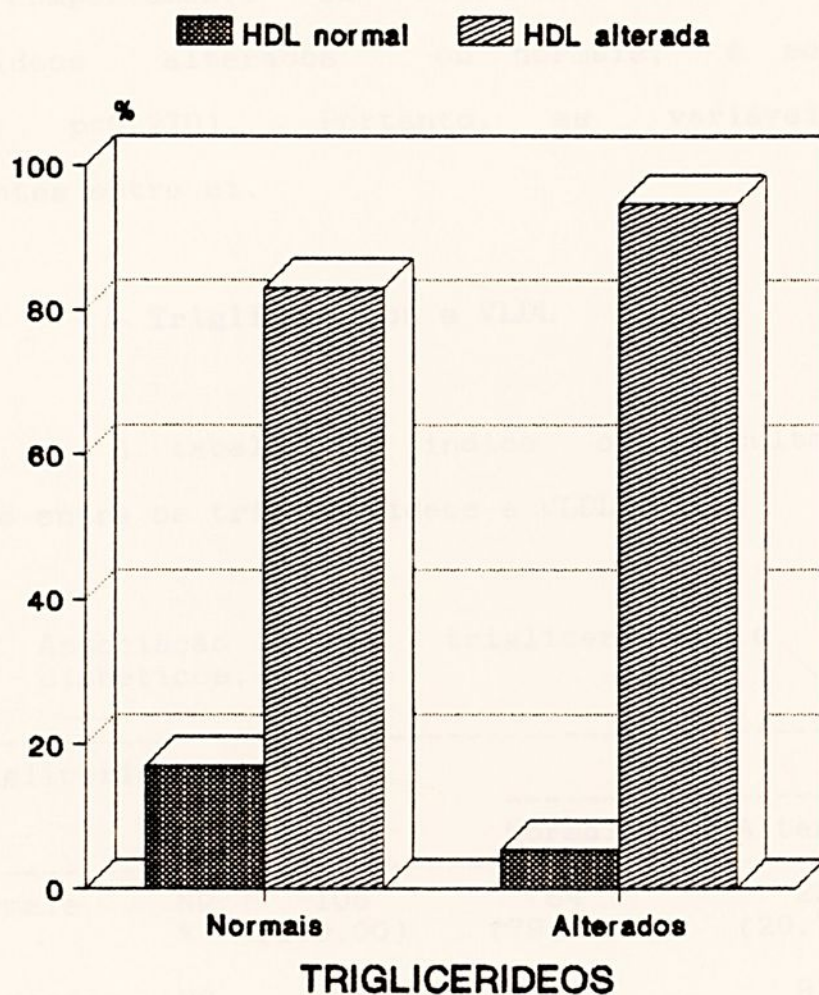


Gráfico 39 Frequência de distribuição de HDL normal ou alterada em diabéticos que apresentam taxa normal ou alterada de triglicérides.

Considerando-se os 106 diabéticos com triglicerídeos normais, 71,10% têm os níveis de LDL dentro da normalidade e o restante alterados. Entre os 93 pacientes com triglicerídeos alterados, 78,49% mostram LDL normal e 21,51% alterado. Tomando como base essa tabela e o gráfico 40 conclui-se que não existe associação entre as variáveis, pois o comportamento da LDL, nos indivíduos com triglicerídeos alterados ou normais, é semelhante ($X^2=1,216$; $p=0,270$). Portanto, as variáveis são independentes entre si.

- Triglicerídeos e VLDL

A tabela 42 indica os resultados da associação entre os triglicerídeos e VLDL.

Tabela 42 Associação entre triglicerídeos e VLDL em diabéticos.

Triglicerídeos			VLDL	
			Normal	Alterada
Normais	Nº	106	84	22
	%	(100,00)	(79,25)	(20,75)
Alterados	Nº	93	0	93
	%	(100,00)	(0,00)	(100,00)

Por esta tabela, todos os indivíduos portadores de triglicerídeos alterados manifestam simultaneamente alteração no nível de VLDL. Essas duas variáveis, ilustradas no gráfico 41, estão fortemente associadas ($X^2=127,5$; $p=0,000$).

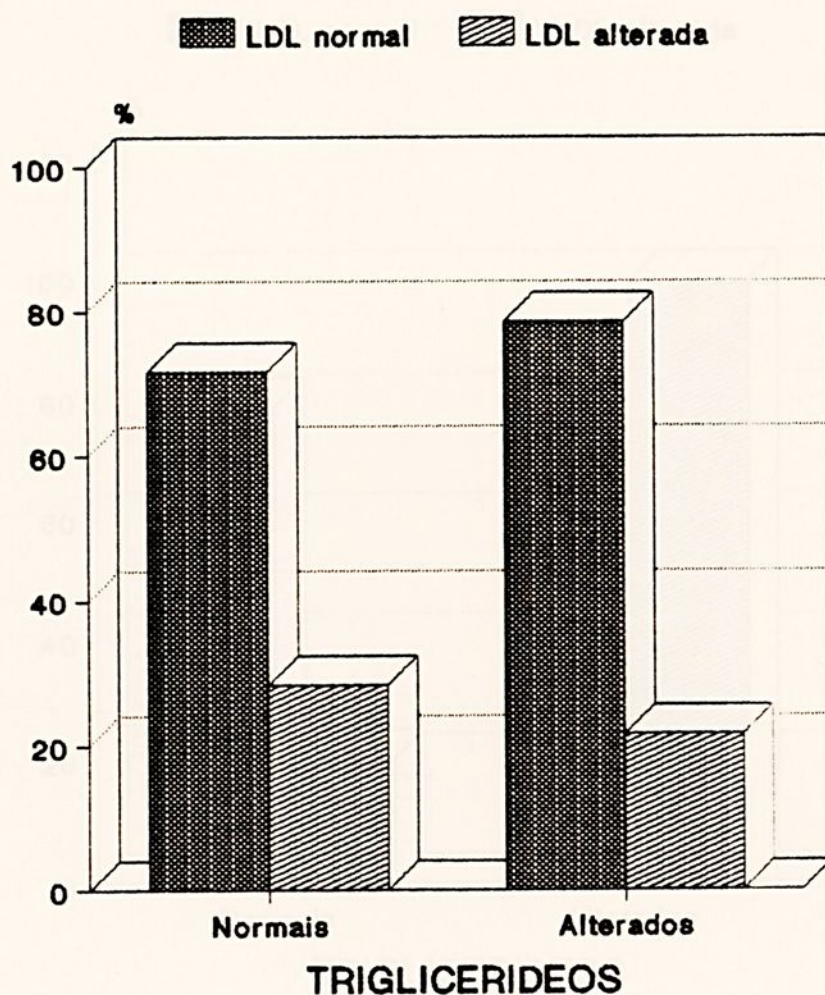


Gráfico 40 Frequência de distribuição de LDL normal ou alterada em diabéticos que apresentam taxa normal ou alterada de triglicérides.

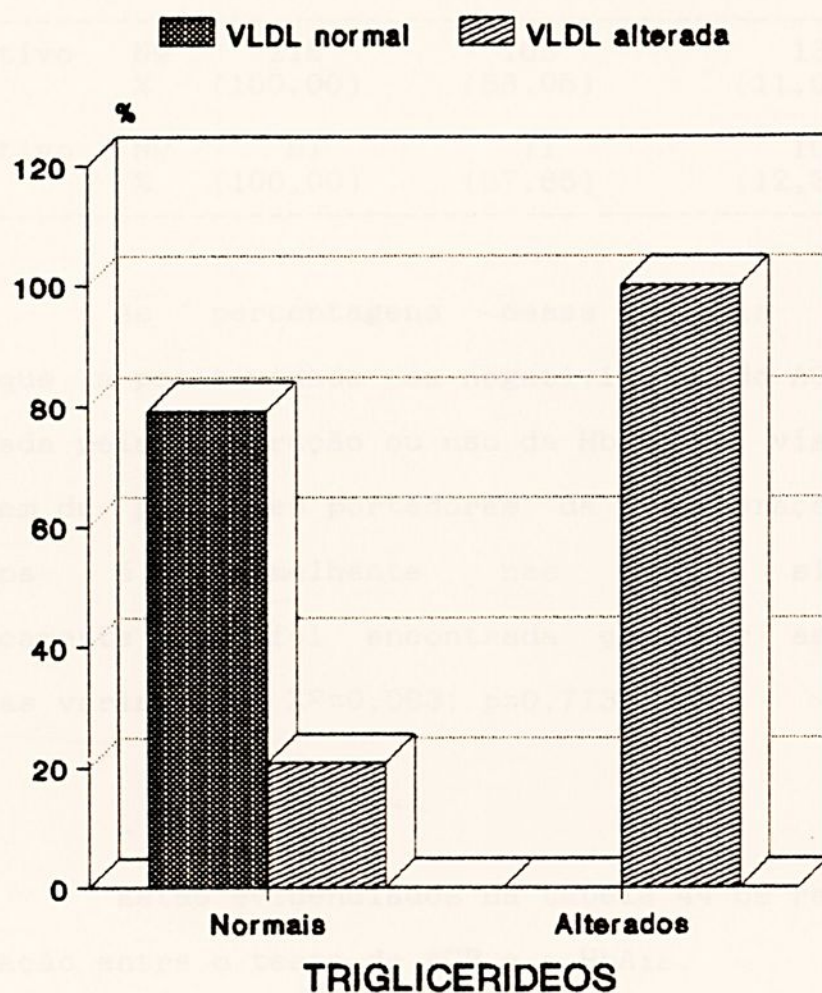


Gráfico 41 Frequência de distribuição de VLDL normal ou alterada em diabéticos que apresentam taxa normal ou alterada de triglicérides.

- ACB e Hb Fetal

Os dados referentes à associação do teste ACB com Hb Fetal são representados pela tabela 43 e o gráfico 42.

Tabela 43 Associação entre ACB e Hb Fetal em diabéticos.

ACB			Hb Fetal	
			Normal	Alterada
Negativo	Nº	118	105	13
	%	(100,00)	(88,98)	(11,02)
Positivo	Nº	81	71	10
	%	(100,00)	(87,65)	(12,35)

As percentagens dessa tabela permitem concluir que a positividade ou negatividade do ACB não é influenciada pela alteração ou não da Hb Fetal, visto que a percentagem de pacientes portadores de alteração dessa hemoglobina é semelhante nas duas situações. Estatisticamente não foi encontrada qualquer associação entre essas variáveis ($X^2=0,083$; $p=0,773$).

- ACB e HbA_{1c}

Estão evidenciados na tabela 44 os resultados de associação entre o teste de ACB e a HbA_{1c}.

Tabela 44 Associação entre ACB e HbA_{1c} em diabéticos.

ACB			HbA _{1c}	
			Normal	Alterada
Negativo	Nº	118	12	106
	%	(100,00)	(10,17)	(89,83)
Positivo	Nº	81	12	69
	%	(100,00)	(14,81)	(85,19)

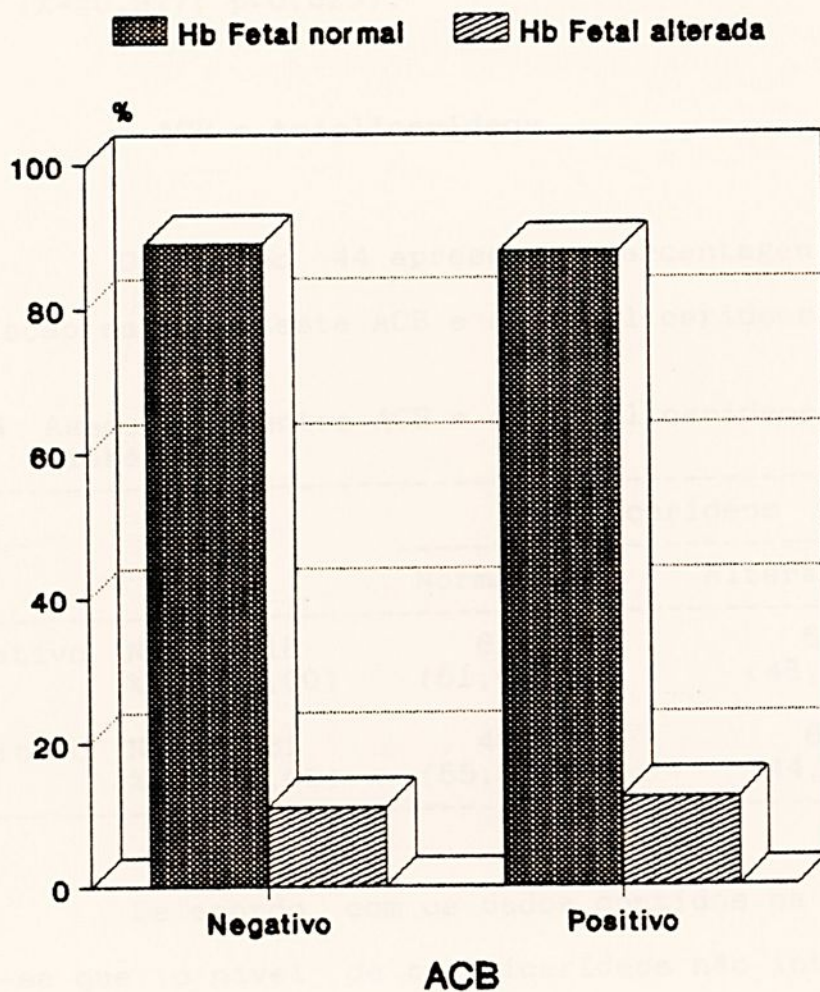


Gráfico 42 Frequência de distribuição da Hb Fetal normal ou alterada em diabéticos que apresentam o teste ACB positivo ou negativo.

Analisando a tabela 44 e o gráfico 43 conclui-se que o nível do controle glicêmico não interfere na positividade ou negatividade do teste ACB. A HbA_{1c} está alterada em 89,83% dos pacientes com ACB negativo e em 85,19% dos diabéticos com ACB com positivos. Nenhuma associação foi estatisticamente comprovada entre essas variáveis ($X^2=0,977$; $p=0,323$).

- ACB e triglicerídeos

O gráfico 44 apresenta percentagens obtidas da associação entre o teste ACB e os triglicerídeos.

Tabela 45 Associação entre ACB e os triglicerídeos em diabéticos.

ACB		Triglicerídeos	
		Normais	Alterados
Negativo	Nº	118	61
	%	(100,00)	(51,69)
Positivo	Nº	81	45
	%	(100,00)	(55,56)

De acordo com os dados contidos na tabela 45 verifica-se que o nível de triglicerídeos não interfere na positividade ou negatividade do teste ACB. Estatisticamente não há qualquer associação entre as variáveis ($X^2 = 0,208$; $p = 0,592$).

- ACB e colesterol

As percentagens de distribuição do teste ACB relativas ao colesterol são consideradas pela tabela 46 e o gráfico 45.

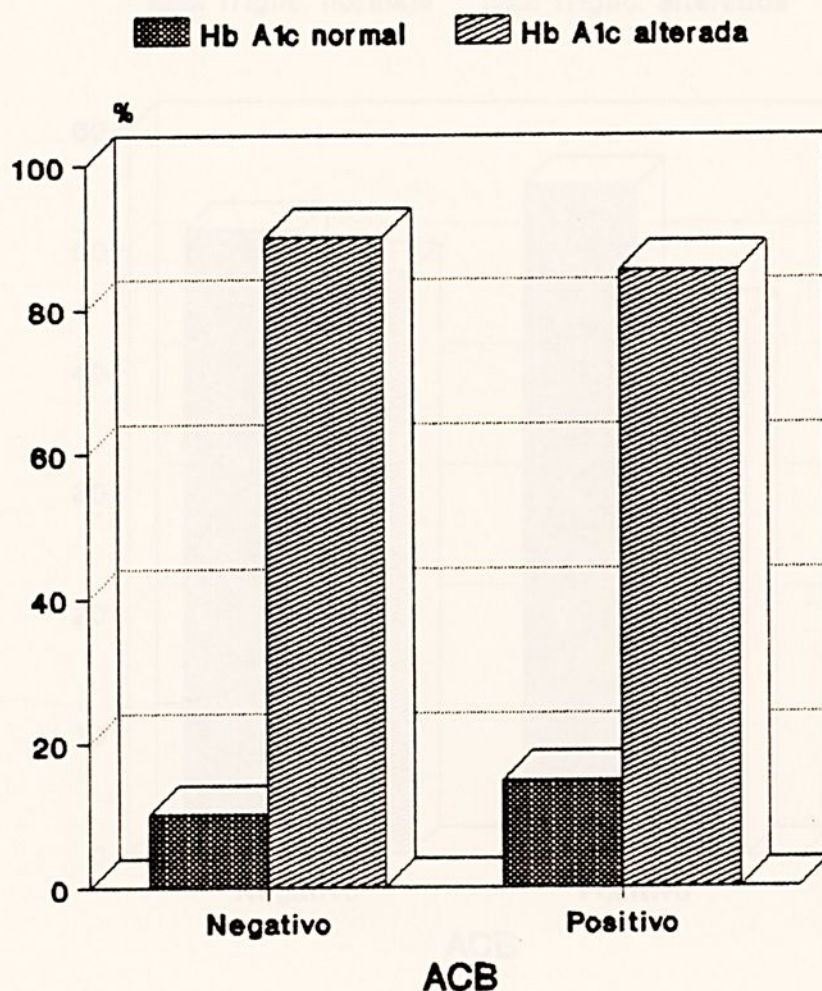


Gráfico 43 Frequência de distribuição de Hb A_{1c} normal ou alterada em diabéticos que apresentam o teste ACB positivo ou negativo.

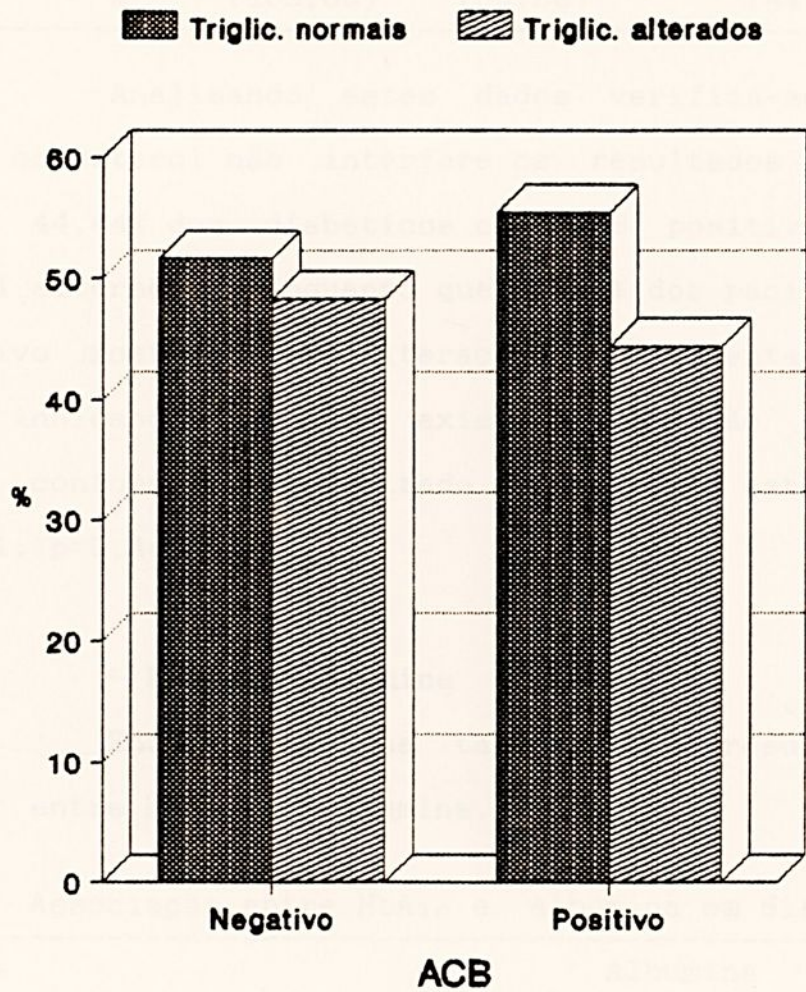


Gráfico 44 Frequência de distribuição dos triglicerídeos normais ou alterados em diabéticos que apresentam o teste ACB positivo ou negativo.

Tabela 46 Associação entre ACB e colesterol em diabéticos.

ACB		Colesterol		
		Normal	Alterado	
Negativo	Nº	118	72	46
	%	(100,00)	(61,02)	(38,98)
Positivo	Nº	81	45	36
	%	(100,00)	(55,56)	(44,44)

Analisando estes dados verifica-se que o nível de colesterol não interfere os resultados do teste ACB, pois 44,44% dos diabéticos com ACB positivo têm o colesterol alterado, enquanto que 38,98% dos pacientes com ACB negativo mostram essa alteração. As percentagens são próximas, indicando que não existe associação entre as variáveis, conforme o resultado dos testes estatísticos ($X^2=0,591$; $p=0,442$).

- HbA_{1c} e albumina

Encontraremos na tabela 47 os resultados da associação entre HbA_{1c} e albumina.

Tabela 47 Associação entre HbA_{1c} e albumina em diabéticos.

HbA _{1c}		Albumina		
		Normal	Alterada	
Normal	Nº	24	24	0
	%	(100,00)	(100,00)	(0,00)
Alterada	Nº	175	144	31
	%	(100,00)	(82,29)	(17,71)

Entre os indivíduos que têm a HbA_{1c} normal, todos (100,00%) mostram a albumina normal. Considerando-se os indivíduos com HbA_{1c} alterada, observa-se que 82,29% têm

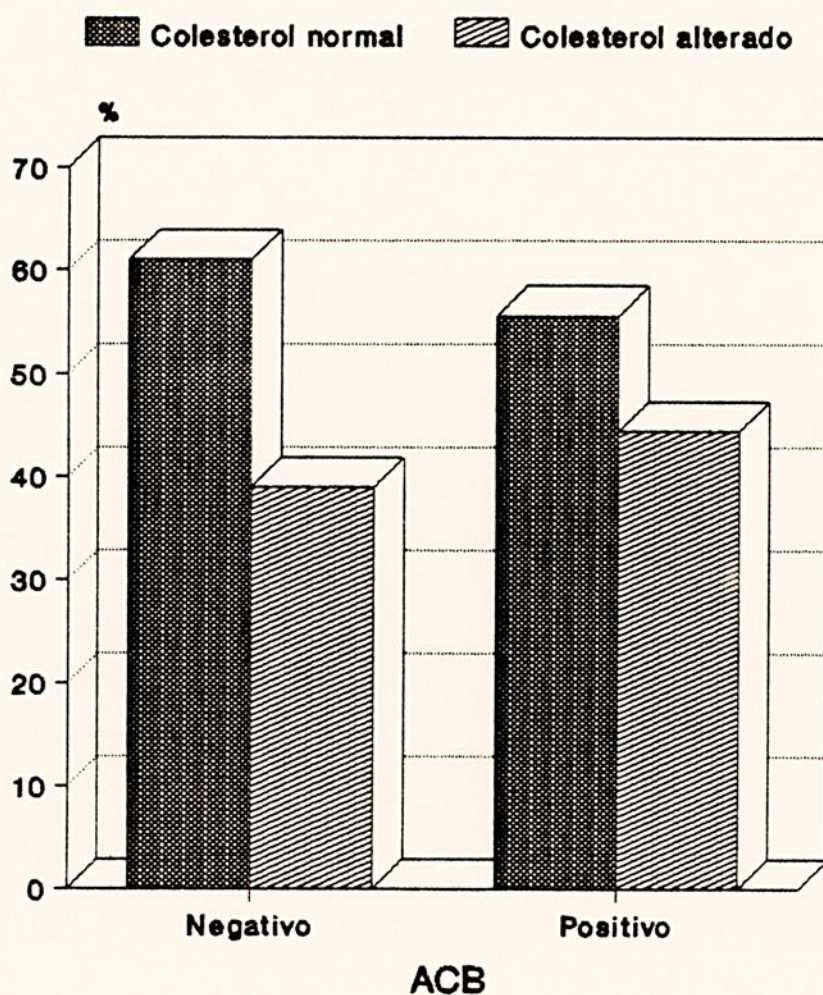


Gráfico 45 Frequência de distribuição de colesterol normal ou alterado em diabéticos que apresentam o teste ACB positivo ou negativo.

a albumina normal e 17,71% têm a albumina alterada. Essas percentagens podem ser visualizadas no gráfico 46. A análise desse gráfico permite sugerir que a medida que o controle glicêmico torna-se deficiente, a percentagem da alteração da albumina aumenta.

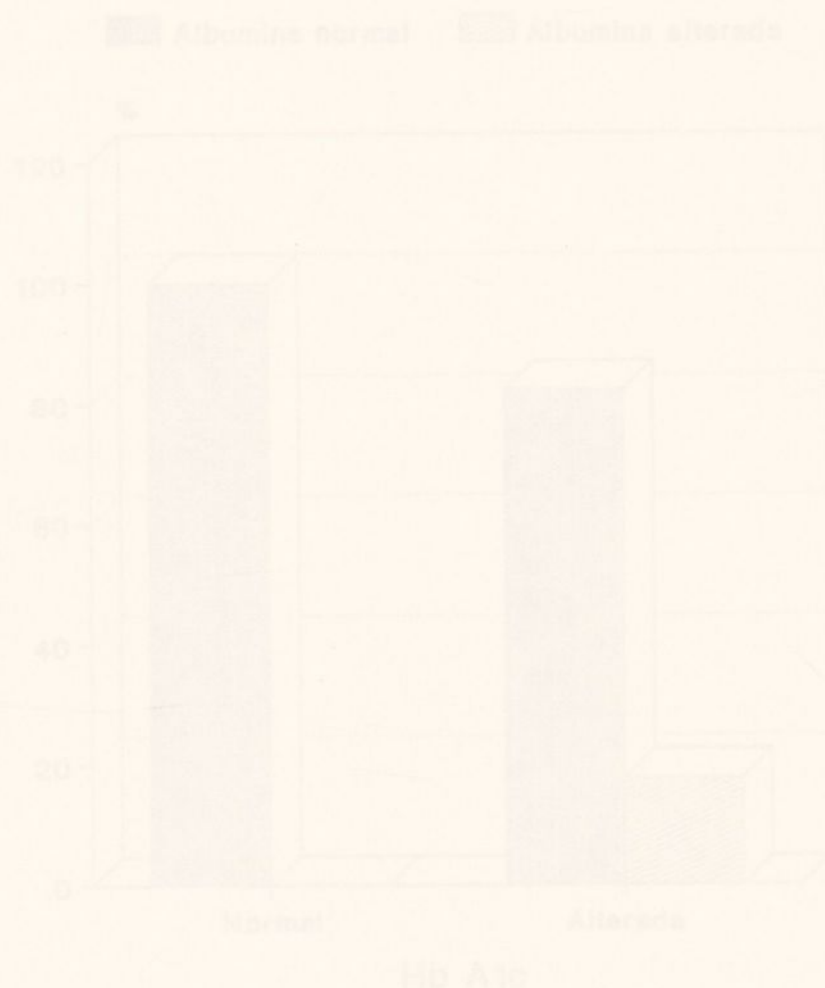


Gráfico 46: Frequência de distribuição da fração albumina normal e alterada em diabéticos que apresentam Hb A1c normal ou alterada.

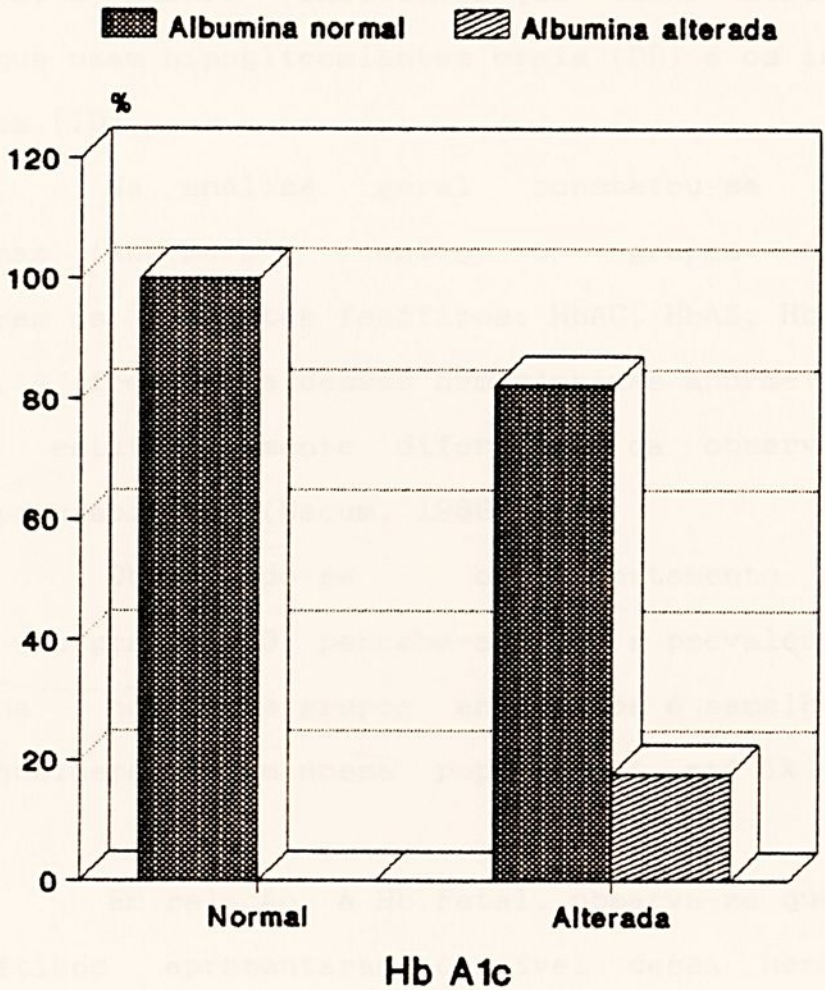


Gráfico 46 **Frequência de distribuição da fração Albumina normal ou alterada em diabéticos que apresentam taxa normal ou alterada de Hb A_{1c}.**

V- DISCUSSÃO

O presente trabalho consistiu na análise do comportamento de diferentes tipos de hemoglobinas, proteínas plasmáticas e lipídeos em portadores de *Diabetes Mellitus*, classificados em três grupos de acordo com a orientação terapêutica, a saber: indivíduos que fazem dieta (DI), aqueles que usam hipoglicemiantes orais (DR) e os insulino-dependentes (ID).

Na análise geral constatou-se que as hemoglobinas anormais entre os grupos estudados apresentaram os seguintes fenótipos: HbAC, HbAS, HbH e HbA₂ aumentada. A frequência dessas hemoglobinas anormais não se mostrou estatisticamente diferente da observada em análises populacionais (Naoum, 1986).

Observando-se o comportamento da HbA₂ (através do gráfico 3) percebe-se que a prevalência dessa hemoglobina nos três grupos analisados é semelhante aos padrões considerados em nossa população (até 1%) (Naoum, 1986).

Em relação à Hb Fetal, observa-se que 11,56% dos diabéticos apresentaram o nível dessa hemoglobina aumentado. Nota-se que os indivíduos que utilizaram a dieta para o controle da doença não manifestaram qualquer alteração dessa hemoglobina. Entretanto, verifica-se que o grupo DR contribuiu com 82,61%, das alterações, enquanto que o grupo ID com 17,39%, sendo a diferença estatisticamente significativa ($p=0,040$). Assim, acredita-se que esse aumento da Hb Fetal não é inerente ao diabetes, mas adquirido pela utilização de substâncias químicas.



Clinicamente considera-se que a elevação da hemoglobina Fetal durante a vida consiste em condição adquirida, especialmente nas discrasias sanguíneas, linfomas, esferocitose hereditária, anemia aplástica e certos tipos de carcinomas (De Simone, 1982, Fujimori, 1990, Wood, 1983). Um período transitório de eritropoese fetal é observado em 15 a 20% das gestantes (Nienhuis, 1977).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a elevação da concentração de Hb Fetal na forma adquirida, a saber: 1- desencadeamento provocado pelo aumento do número de células F; 2- aumento da concentração de Hb Fetal por célula F; 3- reversão do processo de diferenciação do eritrócito, que adquire características fetais (De Simone, 1982, Nienhuis, 1977, Shimizu, 1988, Zago, 1979).

Muitos hormônios, incluindo os andrógenos, AMPc, epinefrina, tireoxina e hormônio de crescimento, são capazes de modular a diferenciação da célula progenitora tornando-a mais sensível a níveis subótimos de eritropoetina, fazendo com que entrem em maturação terminal (Nienhuis, 1977). No estresse hematopoético, e em animais anêmicos, observa-se elevação do nível de eritropoetina, o que parece ser responsável pela maior produção de Hb Fetal, pois a eritropoetina aumenta o número de unidades formadoras de colônias eritróides (CFU-E) (Bard, 1988, De Simone, 1982, Nienhuis, 1977). Desde que se admita ser a eritropoetina responsável pela maior produção de Hb Fetal, os hormônios ou substâncias químicas que sensibilizam as células tronco a níveis baixos de eritropoetina, poderiam induzir indiretamente o aumento da concentração da Hb Fetal.



Alguns pesquisadores encontraram a concentração de Hb Fetal elevada em pacientes portadores de diabetes tipo I, onde o controle glicêmico e a dosagem de insulina foram considerados para avaliar o aparecimento dessa hemoglobina. Nenhuma correlação foi relatada entre o controle glicêmico e o aparecimento de Hb Fetal, ou a dosagem de insulina e o surgimento dessa hemoglobina. Entretanto, esses pesquisadores verificaram que o tempo de aparecimento da doença e, conseqüentemente, de insulino-terapia, parecem modificar a transição da Hb Fetal para a HbA ou reativar a síntese de Hb Fetal, como tem sido descrito na gravidez e em neonatos com hiperinsulinemia (Mullis, 1989, Nienhuis, 1977, Perrini, 1985).

Em nosso trabalho quando consideramos os pacientes diabéticos observamos que o controle glicêmico (gráfico 33) e a formação dos agregados de HbH (gráfico 42) não interferiram nos níveis elevados de Hb Fetal. Um fato comum a todos os pacientes diabéticos tipo I, que mostraram alteração de Hb Fetal, é que eles estavam submetidos à insulino-terapia há mais de 12 anos. Diante disso, sugere-se que as alterações dessa hemoglobina encontradas nos diabéticos insulino-dependentes foram, provavelmente, devidas à ação da insulino-terapia.

Além dos hormônios, muitas drogas são capazes de induzir a produção da Hb Fetal. A 5-azacitidina e a hidroxauréia, usadas no tratamento da anemia falciforme (Holmquist, 1966, Karlsson, 1985, Opie, 1977), e a 5, 6 dihidro- 5- azacitidina, utilizada no carcinoma brônquico, têm a propriedade de induzir atividade gênica aumentando a síntese da Hb Fetal (Carr, 1987, Wise, 1987). O ácido α -



amino - N - butírico estimula, em animais, o crescimento dos progenitores eritróides e induz a formação das células F (Constantoulakis, 1988). O ácido butírico, em aves e mamíferos, pode reativar vários genes fetais silenciosos (Constantoulakis, 1989).

Considerando os hipoglicemiantes orais utilizados pelos portadores de diabetes no grupo DR, verifica-se que as seguintes drogas foram adotadas: 77% dos indivíduos empregaram o Daonil® (glibenclamida), 11,5% o Diabinese® (clorpropamida) e 11,5% o Minidiab® (glipizida). Essas drogas são classificadas como sulfoniluréias, cujos efeitos hematológicos adversos considerados até o presente são clinicamente representados pelos moléstias que deprimem a medula óssea - anemia plástica, agranulocitose, pancitopenia, leucopenia e trombocitopenia - e as que causam anemia hemolítica, que é corrigida com a suspensão do tratamento (Paice, 1985).

Caracteriza-se, então, que as sulfoniluréias desencadeiam um estresse hematopoético e isso poderia causar um aumento no índice de Hb Fetal. Entretanto, foi afastada essa possibilidade, pois todos os pacientes que apresentaram alterações nos índices hematimétricos foram desconsiderados em nossa pesquisa, porque a dosagem de HbA_{1c} sofre interferência nessas condições. Além disso, a droga mais utilizada pelos pacientes (clorpropamida) induz a menores efeitos colaterais.

Geralmente, os diabéticos tipo II manifestam as patologias secundárias tardiamente e, por essa razão, outras medicações devem ser associadas no controle dessas complicações. Entretanto, observamos que as mesmas



medicações usadas nessas condições foram as mesmas empregadas nos três grupos e, mesmo assim, o grupo DI não mostrou qualquer alteração do nível de Hb Fetal. Isso nos leva a considerar que a sulfoniluréias induzem ao aumento da concentração de Hb Fetal causando, provavelmente, alterações no processo de diferenciação celular dos eritrócitos ou reativando alguns genes silenciosos.

A presença de agregados de HbH nos eritrócitos é indicativo de talassemia alfa que, em nossa população, apresenta frequência de 3,9% (Castilho, 1987). As análises efetuadas nesse trabalho revelaram que 40,70% dos diabéticos apresentaram esse tipo de agregado, sendo essa precipitação comum a todos os grupos estudados.

É provável que no diabetes a talassemia alfa se deva à forma adquirida. Vários relatos descrevem a associação da forma adquirida em várias patologias: eritroleucemia (Pagnier, 1972), leucemia mielóide crônica (Beaven, 1963, Hamilton, 1971), leucemia linfocítica crônica (Kueh, 1982), pré-leucemia (Anagnou, 1983), anemia sideroblástica (Yoo, 1980), mielofibrose (Higgs, 1983), doença de Chagas (Domingos, 1990) e retardo mental (Weatherall, 1984). Admite-se que a forma adquirida de agregados de HbH nas leucemias esteja relacionada à quimioterapia (Gomes, 1988). Entretanto, no presente estudo, supõe-se que a alta prevalência de agregados de HbH seja devido a outros fatores, uma vez que os pacientes que receberam terapia - hipoglicemiantes orais e insulina - e os que fizeram dieta mostraram o mesmo tipo de precipitação.

Com a finalidade de observar a influência do controle glicêmico sobre a formação e precipitação dos



agregados de HbH foi realizado teste de associação entre essas duas variáveis. No entanto, nenhuma dependência foi constatada entre elas, indicando que o grau de controle glicêmico não interferiu nas precipitações encontradas. Para verificar se o metabolismo lipídico influenciou a formação dos precipitados, o mesmo teste de associação foi empregado, envolvendo os triglicerídeos e o colesterol, e constatamos que nenhuma dessas variáveis determinou a formação dos agregados de HbH.

A avaliação do comportamento glicídico foi realizada por meio das dosagens de glicemia e da HbA_{1c}. Pela dosagem da glicemia de jejum, 93,46% dos diabéticos mostraram alterações dos níveis glicêmicos, enquanto que através da dosagem da HbA_{1c}, 87,90% apresentaram a mesma alteração. A literatura confirma esses dados mostrando que há forte correlação entre os níveis da HbA_{1c} e os níveis da glicemia (Koenig, 1976b, Odetti, 1983, Peterson, 1977b, Sannazzaro, 1984).

Analisando o comportamento dos grupos isoladamente, frente ao perfil glicídico, nota-se que o grupo DR foi responsável por 62,37% das alterações, quando considerada a glicemia de jejum e por 62,86% quando considerada a dosagem da HbA_{1c}, sendo a diferença significativa ($p = 0,028$), tomando-se por base a dosagem da HbA_{1c}. Os dados permitem a suposição de que o grupo DR apresentou um controle glicêmico menos eficiente.

Isso é explicado ao observar-se o tipo de paciente que utiliza os hipoglicemiantes orais. Verifica-se que a grande maioria dos pacientes estudados não faz a dieta adequadamente e, então, utiliza-se dos hipoglicemiantes

orais para o controle da glicemia. A dieta quase sempre não é considerada fator essencial, pois o diabetes tipo II não se caracteriza por complicação imediata, por exemplo a cetoacidose, que força o diabético tipo I a controlar melhor sua dieta. Supomos, assim, que a dieta inadequada é fator que coíbe a manutenção de um controle glicêmico adequado.

Com o intuito de verificar a influência do controle glicêmico sobre os diferentes parâmetros analisados, testes que associam variáveis foram aplicados. Estatisticamente, não foi demonstrada qualquer dependência entre HbA_{1c} e os triglicerídeos ($p=0,066$). Entretanto, vários trabalhos têm demonstrado essa associação, indicando que um bom controle glicêmico melhora os níveis dos triglicerídeos (Glasgow, 1981, Hermann, 1991, Hollenbeck, 1986, Hollenbeck, 1991, Lopes-Virella, 1981, Odetti, 1983, Ostlund, 1989, Peterson, 1977b, Sjoberg, 1987, Sosenko, 1978, Sosenko, 1980, Uusitupa, 1986). Acreditamos que as relações entre os triglicerídeos e a HbA_{1c} encontradas não devam ser consideradas definitivas, pois outros fatores não avaliados poderiam ter contribuído para esses resultados. Entretanto, o controle glicêmico, representado pelo nível da HbA_{1c} , mostrou-se associado a outras variáveis.

Considerando os resultados de associação entre o colesterol e a HbA_{1c} , expostos no gráfico 36, percebe-se que o nível do controle glicêmico interferiu no comportamento dos níveis de colesterol. Quanto maior foi a alteração da HbA_{1c} , maior a alteração dos níveis do colesterol ($p=0,009$). A mesma associação foi encontrada com relação ao LDL ($p=0,012$) e ao VLDL ($p=0,032$), ilustrada pelos gráficos 37 e 38, respectivamente. Esses dados



confirmam os resultados de vários laboratórios (Glasgow, 1981, Hermann, 1991, Hollenbeck, 1986, Hollenbeck, 1991, Lopes-Virella, 1981, Odetti, 1983, Ostlund, 1989, Peterson, 1977b, Sjoberg, 1987, Sosenko, 1978, Sosenko, 1980, Uusitupa, 1986). Provavelmente, a melhora do perfil glicêmico, através de dieta e terapia adequada, facilita a ação da insulina diminuindo o fornecimento de substratos para a superprodução de VLDL, conseqüentemente os níveis de VLDL, LDL e colesterol diminuem (Dunn, 1984, Hollenbeck, 1991).

Estatisticamente, nenhuma associação foi observada entre os níveis da HbA_{1c} e os de HDL (gráfico 36). São divulgados resultados controversos: autores relatam diminuição do nível de HDL, quando um bom controle glicêmico é estabelecido (Chase, 1976); para alguns, os níveis de HDL são normais independentemente do grau de controle glicêmico (Sosenko, 1980); há quem afirma que a melhora do quadro glicêmico origina um bom perfil de HDL nos diabéticos tipo I e II (Biesbroeck, 1982); outros ainda observam correlação negativa entre HbA_{1c} e a HDL (Erasmus, 1987). Analisando os sexos separadamente, há relatos de que existe correlação positiva entre a HDL e a HbA_{1c} nos homens diabéticos tipo I, enquanto que nas mulheres isso não foi observado (Yudkin, 1979).

Divergências em relação à associação da HbA_{1c} com a HDL podem ser atribuídas a variáveis que nem sempre foram consideradas nas pesquisas. O grau de atividade física é fator que, por mecanismos desconhecidos, estimula a produção de HDL que, associada a um bom controle glicêmico, reduz a obesidade normalizando essa lipoproteína (Sjoberg,

1987).As diferenças raciais (Erasmus,1987), o estado nutricional, o fato de se considerar a amostra populacional como um todo e a interferência dos fatores hormonais masculinos ou femininos trazem resultados conflitantes (Erasmus, 1987, Lopes-Virella, 1983).

O metabolismo dos lipídeos em geral encontra-se alterado nos diabéticos (Greenfield, 1982, Howard, 1987b, Laakso, 1985, Moore, 1979). Em nosso trabalho, 46,74% dos pacientes mostraram alterações nos triglicerídeos e 55,28% no colesterol. Essas frequências elevadas podem ser explicadas pelos desarranjos metabólicos desencadeados pelo diabetes, onde a ausência da ação da insulina causa lipólise e aumenta o fornecimento de substratos energéticos.

A análise comparativa dos grupos estudados, com relação ao triglicerídeos, mostrou que o grupo DR (gráfico 12), foi o responsável pelo maior índice de alteração (73,12%), sendo a diferença estatisticamente significativa ($p=0,004$).Essa situação é semelhante à observada no tocante ao controle glicêmico. Tais fatos permitem a conclusão de que um controle glicêmico deficiente mantém o fornecimento de substratos para a superprodução dos triglicerídeos (Ginsberg. 1991, Hollenbeck, 1986, Uusitupa, 1986).

As frações do colesterol evidenciaram alterações consideráveis, caracterizadas pelo fato de 88,44% dos diabéticos mostraram a HDL alterada, 25,13% a LDL e 57,79% a VLDL. A alteração da HDL, representada pela diminuição dos seus valores, foi estatisticamente significativa no grupo DR ($p=0,046$). O grupo ID contribuiu com a maior percentagem de normalidade, conforme ilustra o

gráfico 16. Esses resultados vêm confirmar os dados da literatura: os indivíduos insulino-dependentes, tratados adequadamente, manifestam um perfil de HDL melhor, pois acredita-se que a normalização do metabolismo do VLDL, pela insulina, tráz os níveis de HDL à normalidade (Dzien, 1991, Hollenbeck, 1991).

Existe forte polêmica em relação ao metabolismo do HDL nos diabéticos tipo II. Após o tratamento com as sulfoniluréias são encontrados relatos sobre a normalização dos níveis de HDL; enquanto que outros afirmam não haver interferência das drogas ingeridas sobre os níveis dessa lipoproteína, e ainda alguns aceitam que elas têm um efeito adverso sobre os níveis de HDL (Elkeles, 1991, Grunberger, 1982, Hollenbeck, 1986, Koltermann, 1984, Lisch, 1981, Odetti, 1983). É difícil avaliar a influência dos hipoglicemiantes orais sobre as lipoproteínas porque muitos fatores podem afetar essas variáveis nos diabéticos tipo II e os mecanismos envolvidos na ausência de resposta ao tratamento dessa lipoproteína ainda são obscuros.

A lipoproteína HDL é uma variável que se mostrou dependente dos triglicerídeos ($p=0,011$) (gráfico 39). Isso pode ser explicado, provavelmente, pelo fato do nível de HDL depender de uma boa remoção do VLDL da circulação e esse, por sua vez, depender do nível dos triglicerídeos. Assim, alterações dos triglicerídeos afetam o VLDL e, conseqüentemente, o HDL. Os dados da literatura vêm ao encontro desse achado e aventam a possibilidade de uma correlação negativa entre essas variáveis (Dzien, 1991, Odetti, 1983).



As alterações da VLDL encontradas foram no sentido do aumento de sua concentração, o que resultou, provavelmente, da elevação de sua produção endógena e da diminuição da sua metabolização (Hollenbeck, 1986). Os grupos comportaram-se semelhantemente em relação a essa lipoproteína. A associação entre VLDL e os triglicerídeos (gráfico 41) mostrou-se estatisticamente significativa ($p < 0,001$), indicando que essas variáveis são correlacionadas entre si (todos os pacientes com triglicerídeos alterados apresentaram modificações nos níveis de VLDL). Essa situação é explicada em virtude da VLDL ser a principal lipoproteína transportadora dos triglicerídeos e, portanto, qualquer aumento no nível dos triglicerídeos desencadeia elevação da VLDL (Ginsberg, 1991, Hollenbeck, 1986, Rivellesse, 1988).

Analisando o perfil da LDL verificamos que o comportamento dos grupos diante das alterações foi semelhante (gráfico 18), concordando com a literatura, a qual sugere comportamento semelhante da LDL frente aos diabéticos tipo I e II (Hollenbeck, 1986). Entre as lipoproteínas nota-se que a LDL mostrou menor percentual de alteração na população diabética (25,13%), porém os dados literários sobre essa lipoproteína são poucos e contraditórios. Autores afirmam que a via metabólica da LDL não é influenciada pelo diabetes ou terapia adequada; outros acreditam que a superprodução do VLDL reflete-se na concentração de LDL, desencadeando aumento na sua concentração (Hollenbeck, 1986, Rivellesse, 1988, Uusitupa, 1986). Essa hipótese é consistente com os dados encontrados por este trabalho, visto que a alteração observada na LDL



caracterizou-se pelo aumento dessa lipoproteína (gráfico 17).

Analisando o perfil das proteínas plasmáticas constatamos que a frequência de alteração nos diabéticos foi baixa. Estatisticamente significativa ($p=0,036$) foi a diferença de comportamento dos grupos frente às modificações dos valores da fração albumina. Observamos que os diabéticos que fizeram dieta não manifestaram qualquer alteração dos valores dessa fração. A associação desses valores aos valores da HbA_{1c} (gráfico 46) permitiu-se sugerir que a normalidade da fração protéica albumina estava, provavelmente, relacionada ao nível do controle glicêmico, pois a medida que esse controle tornou-se deficiente (grupos DR e ID), as alterações dos valores de albumina surgiram. Entretanto, a avaliação das proteínas plasmáticas nos diabéticos é complicada pela variações do estado metabólico de cada indivíduo em diferentes fases do dia e da doença, pelas flutuações da concentração de insulina, pela instalação de complicações secundárias e por fatores nutricionais, geralmente, não considerados (Kemp, 1991, Medhim, 1985).



VI- RESUMO

O *Diabetes Mellitus* é condição clínica marcada por profundas alterações metabólicas envolvendo os carboidratos, lipídeos e proteínas. Visando avaliar a frequência de distribuição das hemoglobinas anormais e o comportamento da HbA₂, Hb Fetal, HbH, dos lipídeos e proteínas foram analisadas 199 amostras de sangue divididas em três grupos: 30 amostras no grupo de diabéticos que fazem dieta (DI), 121 no grupo de diabéticos que usam drogas hipoglicemiantes orais (DR) e 48 amostras de insulino-dependentes (ID).

A presença de hemoglobinas anormais não mostrou diferença significativa entre os portadores de diabetes e a população normal.

Na análise geral das hemoglobinas observou-se que a Hb Fetal mostrou-se aumentada nos diabéticos, não estando esse fato associado a alterações hereditárias, mas a condições adquiridas, provavelmente, pelo uso de hipoglicemiantes orais ou insulina.

Outra alteração verificada foi a notável presença de agregados intraeritrocitários de HbH, característicos de talassemia alfa, em 40,70% dos diabéticos analisados. Esse tipo de precipitação ocorreu independentemente do grupo considerado e, provavelmente, seja devido à forma adquirida, como ocorre nos portadores de doenças linfo e mieloproliferativas.

O controle glicêmico apresentou-se alterado na maioria dos diabéticos; no entanto, o grupo DR foi o principal responsável por essa anormalidade. Nenhuma



associação entre a presença de agregados de HbH ou o aumento da Hb Fetal e o nível de controle glicêmico foi observada, evidenciando que essas variáveis são independentes.

Profundas alterações no metabolismo dos lipídeos foram observadas, sendo refletidas por modificações nos níveis de colesterol e triglicerídeos. O grupo DR manifestou maior percentagem de alteração dos triglicerídeos. Os níveis de HDL apresentaram tendência à diminuição nos três grupos, entretanto, somente no grupo DR é que a diferença foi estatisticamente significativa. A concentração de VLDL e LDL estava aumentada em todos os grupos analisados.

As concentrações de colesterol, LDL e VLDL associaram-se estatisticamente à HbA_{1c}, indicando que um bom controle glicêmico melhora o perfil dessas variáveis lipídicas. Dependência entre HbA_{1c} e os triglicerídeos ou entre HbA_{1c} e HDL não foi demonstrada nesse trabalho, situação que não deve ser considerada definitiva, pois uma série de fatores não avaliados podem ter interferido nos resultados.

A análise das proteínas plasmáticas revelou que os diabéticos do grupo DI não manifestaram qualquer alteração na fração albumina; as demais frações mostraram pequena e não significativa alteração nos três grupos considerados.

VII.2. Controle glicêmico

Foram observadas alterações no glicemia de jejum em todos os grupos. Os níveis de HbA_{1c} foram maiores no grupo DI, o que indica



VII- CONCLUSÕES

VII.1. Hemoglobinas anormais

1- A presença de hemoglobinas anormais, cujos fenótipos encontrados foram HbAS HbAC, HbH e HbA₂ aumentada, não é prerrogativa dos diabéticos, sendo os resultados compatíveis com os da população em geral.

2- Os valores atingidos pela concentração de HbA₂ nos diabéticos não ultrapassaram os normalmente encontrados, demonstrando que o diabetes na sua diferentes formas não interfere na síntese dessa hemoglobina.

3- Verificou-se alta prevalência de Hb Fetal com concentração aumentada em diabéticos, pertencentes aos grupos DR e ID, provavelmente desencadeada por fatores terapêuticos sulfoniluréias e insulina.

4- Constatou-se alta prevalência de agregados intraeritrocitários de HbH na população estudada (40,70%). Esse fato, provavelmente, ocorreu devido à forma adquirida e não hereditária como na talassemia alfa. As concentrações de colesterol, de triglicerídeos e da glicemia não interferiram na formação desses agregados. É necessário o esclarecimento das causas envolvidas na formação desses agregados, pois os pacientes que fazem dieta (DI) ou utilizam substâncias químicas para o controle da doença (DR e ID) manifestaram precipitação semelhante. Outros fatores não considerados poderiam influenciar o aparecimento desses agregados.

VII.2. Controle glicêmico

1- Foram observadas alterações na glicemia de jejum que se refletiram na HbA_{1c}. Isso ocorreu devido ao maior



fornecimento de glicose para combinar-se com a hemoglobina e formar a HbA_{1c}.

2- O grupo DR foi o principal responsável pelas alterações da HbA_{1c}, demonstrando que os pacientes desse grupo não fazem o controle adequado da dieta.

VII.3. Triglicerídeos, colesterol e lipoproteínas

1- A alta prevalência de anormalidade nos triglicerídeos e colesterol ocorreu, provavelmente, devido aos distúrbios metabólicos do diabetes.

2- Considerando os triglicerídeos o grupo DR foi o principal responsável pela alteração, sendo esse fato estatisticamente significativo. Essa situação, provavelmente, manifestou-se em virtude do maior fornecimento de substratos para produção de triglicerídeos quando a concentração de HbA_{1c} estava alterada - fato observado nesse mesmo grupo.

3- As concentrações de HDL estavam diminuídas nos três grupos, sendo estatisticamente significativa no grupo DR. O grupo ID foi o responsável pela maior percentagem de normalidade. O diabetes tipo II, geralmente, apresenta resistência periférica à ação da insulina, causando modificações nas atividades das enzimas envolvidas na metabolização do VLDL e HDL, conseqüentemente, os níveis de HDL diminuem. O diabetes tipo I manifesta insuficiência pancreática e a reposição hormonal, provavelmente, faz com que as funções metabólicas retornem à normalidade, explicando assim a baixa percentagem de alteração do HDL em diabéticos tipo I.



4- As concentrações de VLDL estavam elevadas nos diabéticos em geral, estando estatisticamente associadas às concentrações de triglicerídeos. Isso vem confirmar a associação biológica que existe entre essas substâncias, sendo a lipoproteína VLDL transportadora dos triglicerídeos.

5- Entre as lipoproteínas verificou-se que a LDL apresentou menor percentual de alteração, porém essa normalidade pode não ser real, pois a superprodução de VLDL observada desencadearia modificações na LDL. Provavelmente, alterações metabólicas contrárias (produção e metabolização) podem ter influenciado esse achado.

6- Associações entre a HbA_{1c} e colesterol, HbA_{1c} e LDL, HbA_{1c} e VLDL foram observadas, demonstrando que modificações no controle glicêmico, desencadeadas pela deficiência da ação insulínica, podem influenciar vias metabólicas envolvidas na produção e metabolização desses lipídeos.

VII.4. Proteínas plasmáticas

1- A análise das proteínas plasmáticas, evidenciou que a fração albumina estava alterada nos grupos DR e ID, mantendo-se normal no grupo DI. Esse fato indica que, por mecanismos não analisados nesse trabalho, o controle glicêmico adequado, provavelmente, possibilita a normalidade da fração protéica albumina.



VIII- SUMMARY

Diabetes mellitus is a clinic condition marked by deep metabolic changes involving carbohydrates, lipids and proteins. With the aim of evaluating the distribution frequency of abnormal hemoglobins and the behavior of HbA₂, Fetal hemoglobin, HbA_{1c}, HbAH, of lipids and proteins, 199 blood samples divided in three groups of diabetics were analyzed: 30 samples from the group of diabetics who went on diet (DI), 121 from the group of which used oral hypoglycemic agents (DR), and 48 samples from insulin dependents (ID).

The presence of abnormal hemoglobins did not show any significant difference between the diabetics group and the normal population.

The general analysis of hemoglobins showed that Fetal hemoglobin increased in diabetics, although this fact has no connection with hereditary changes, but with the conditions acquired probably by the use of oral hypoglycemic agents and/or of insulin.

Another change verified was the notable presence of intraerythrocytic aggregates of HbH, characteristic of alpha thalassemia, in 40,70% of the evaluated diabetics. This type of precipitation did not depend on the group under consideration and is probably due to the acquired form of the disease, as in the carriers of lympho and myeloproliferative diseases.

The glycemic control alteration presented in most diabetics; DR group, however, was the principal responsible for such abnormality. No connection between the



presence of aggregates of HbH or the increase of Fetal hemoglobin and the level of glycemic control was observed, showing that such variables are independent.

Profound changes in the metabolism of lipids was observed, being followed by changes in the cholesterol and triglycerides levels. The DR group presented a higher percentage of triglycerides changes, a fact considered statistically significant. The HDL levels were reduced in the three groups. In the DR group, however, it was mathematically confirmed. The concentration of VLDL and LDL increased in all analyzed groups.

Cholesterol, LDL and VLDL concentrations were statistically associated with HbA_{1c}, showing that a good glycemic control improves the profile of these lipidic variables. Dependence between HbA_{1c} and triglycerides or HbA_{1c} and HDL was not demonstrated in this work. This result should not be considered as definitive, since a series of nonevaluated factors may have influenced the results.

The analysis of plasmatic proteins demonstrated that the diabetics of DI group did not present any change in the albumin fraction; the remaining fractions presented little change in the three groups.



IX- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS *

- ABDELLA, P. M., RITCHEY, J. M., TAM, J. W. O., KLOTZ, I. M. Glycosylation of hemoglobin S by reducing sugars and its effect on gelation. *Biochem. Biophys. Acta*, n.490, p.462-490, 1977.
- ABRAMS, J., GINSBERG, H., GRUNDY, S. Metabolism of cholesterol and plasma triglycerides in nonketotic *Diabetes Mellitus*. *Diabetes*, v.31, p.903-910, 1982.
- AGUILLAR-PARADA, E., EISENTRAUT, A. M., UNGER, R. H. Effects of starvation on plasma pancreatic glucagon in normal man. *Diabetes*, v.18, p.717-723, 1969.
- ALAIR, J. Sick cell anaemia. Pathophysiology and treatment. *Med. Clin. N. Am.*, v.68, p.545-556, 1984.
- ALEYASSINE, H. Low proportions of glycosylated hemoglobin associated with hemoglobin S and hemoglobin C. *Clin. Chem.*, v.25, n.8, p.1484-1486, 1979.
- ALLAIN, C. C., POON, L. S., CHAN, C. S. G., RICHMOND, W., FU, P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.*, v.20, n.4, p.470-475, 1974.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Principles of nutrition and dietary recommendations for individuals with *Diabetes Mellitus*. *Diabetes*, v.28, p.1027-1030, 1979.
- ANAGNOU, N. P., LEY, J., CHESCRO, B., WRIGTH, G., KITCHENS, C., LIEBHABER, S., NIENHUIS, W., DIESSEROTH, A. P. Acquired alfa thalassemia in preleukemia is due to decreased expression of all four-alfa globin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.80, p.6051-6055, 1983.
- ARDUINO, F. *Diabetes Mellitus*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980. 413p.

- BAGDADE, J. D., BIERMAN, E. L., PORTE, D. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J. Clin. Invest.*, v.45, p.1549-1557, 1967.
- BALCERZAK, S. P., MINTZ, D. H., WESTERMAN, M. P., *Diabetes Mellitus* and idiopathic hemochromatosis. *Am. J. Med. Sci.*, n.255, p.53-62, 1968.
- BANNERMAN, R. R. The Thalassemias: recent advances in study and management. *Haematol. Rev.*, v.3, p.297-385, 1972.
- BANTLE, J. P., LAINE, D. C., CASTLE, G. W. Post prandial glucose and insulin responses to meals containing different carbohydrates in normal and diabetic subjects. *N. Engl. J. Med.*, v.309, p.7-12, 1983.
- BARD, H., FOURON, J. C. The increase in fetal hemoglobin synthesis in the fetal lamb during hyperglycemic hypoxemia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.159, n.5, p.1269-1272, 1988.
- BARNETT, A. H., EFF, C., LESLIE, R. D. G., PYKE D. A. Diabetes in identical twins. *Diabetologia*, v.20, p.87-93, 1981.
- BARRET-CONNOR, E. GRUNDY, S. M., HOLDBROOK, M. J. Plasma lipids and *Diabetes Mellitus* in an adult community. *Am. J. Epidemiol.*, v.115, n.5, p.657-663, 1982.
- BANTING, F. G., BEST, C. H., COLLIP, J. B. Pancreatic extracts in the treatment of *Diabetes Mellitus*. *Can. Med. Assoc. J.*, v.12, p.141-146, 1922.
- BEAVEN, G. H., STEVENS, B. L., DANCE, N., WHITE, C. Occurrence of haemoglobin H in leucemia. *Nature*, v.199, p.1297-1298, 1963.

- BELL, G. I., XIANG K.S., NEWMAN, M. V., WU S. H., WRIGTH, L. G., FAJANS, S.S., SPIELMAN, R. S., COX, N. J. Gene for non-insulin- dependent *Diabetes Mellitus* (maturity-onset diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on human chromossome 20q. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.88, p.1484-1488, 1991.
- BELLINGHAN, A. J., Hemoglobins with altered oxygen affinity. *Br. Med. Bull.*, v.32, p.234-238, 1976.
- BERNSTEIN, M. Isolement des lipoproteins seriques de faible densite apres floculation par le phosphotungstate de soude a pH neutre en presence de chlorute de magnesium. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, v. 3, p.139-148, 1963.
- BETKE, K., MARTI, N. R., SCHLICHT, I. Estimation of small percentagens of foetal hemoglobin. *Nature*, v.184, p.1877, 1959.
- BIESBROECK, R. C., ALBERTS, J. J., WAHL, P. W., WEINBERG, D. R., BASSETT, M. L., BITERMAN, E. L. Abnormal composition of high density lipoproteins in non-insulin-dependent diabetics. *Diabetes*, v.31. p.126-131, 1982.
- BODANSKY, H. J, WOLF, E, CUDWORTH, A. G., DEAN B. M., NINEHAM, L. J., BOTTAZZO, G. F. Genetic and immunologic factors in microvascular disease in type I insulin-dependent diabetes. *Diabetes*, v.31, p.70-73, 1982.
- BROWNLEE, M., VLASSARA, H., CERAMI, A. Nonenzimatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann. Inter. Med.*, v.101, p.527-537, 1984.
- BUNN, H. F., HANEY, D. N., GABBAY, K. H., GALLOP, P. M. Futher identification of the nature and linkage of the



- carbohydrate in hemoglobin A_{1c}. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.67, p.103-109, 1975.
- BUNN, H. F., HANEY, D. N., KANUM, S., GABBAY K. H., GALLOP, P. M. The biosynthesis of human hemoglobin A_{1c}. **J. Clin. Invest.**, v.57, p.1652-1669, 1976.
- BUNN, H. F., GABBAY, K. H., GALLOP, P. M. The glycosylation of hemoglobin relevance to **Diabetes Mellitus**. **Science**, v.200, p.21-27, 1978.
- BUNN, H. F., SHAPIRO, R., Mc. MANUS, M., GARRICK, L., Mc. DONALD, M. J., GALLOP, P. M., GABBAY, K. H. Structural heterogeneity of human hemoglobin A due to nonenzymatic glycosylation. **J. Biol. Chem.**, v.254, n.10, p.3892-3898, 1979.
- BUNN, H. F. Evaluation of glycosylated hemoglobin in diabetics patients. **Diabetes**, v. 30, p. 613-615, 1981.
- BUSSAB, W. O., MORETTIN, P. A. **Estatística Básica: Métodos Quantitativos**. São Paulo: Atual, 1986. 321p.
- CARDONNET, L. J., **Epidemiologia de la diabetes**. In: Reunion interdisciplinaria auspiciada por el plan Latinoamericano de diabetes, 1976, Buenos Aires. p.21
- CARR, B. I., RAHLAR, S, DOROSHOW, J. H., BLAYNEY, D., GLODLURG, D., LEONG, L., ASMERON, Y. Fetal hemoglobin gene activation in a phase II study of 5, 6 dihydro-5-azacytidine for bronchogenic carcinoma. **Cancer Research**, v. 47, p. 4199-4201, 1987.
- CASTILHO, E. M., NAOUM, P. C., Prevalência de talassemia alfa em pacientes com anemia e em pessoas sem anemia. **Rev. Bras. Pat. Clin.**, v.23, n.5, p.131-134, 1987.



- CHASE, P. H., GLASGOW, A. M. Juvenile diabetes and serum lipids and lipoprotein levels *Am. J. Dis. Child*, v.130, p.1113-1117, 1976.
- CHOU, J., ROBINSON, C. A., SIEGEL, A. L. Simple method for estimating glycosylated hemoglobins and its application to evaluation of diabetic patients. *Clin. Chem.*, v.24, p.1708-1710, 1978.
- COMPAGNUCCI, P., CARTECHINI, M. G., BOLLI, G., FEO, P., SANTEUSANIO, F., BRUNETTI, P. The importance of determining irreversibly glycosylated hemoglobin in diabetics. *Diabetes*, v. 30, p.607-612, 1981.
- CONSTANTOULAKIS, P., PAPAYANNOPOULOS, T., STAMATOYANNOPOULOS, G. α -amino-N - butiric acid stimulate fetal hemoglobin in the adult. *Blood*, v.72, n.6, p.1961-1964, 1988.
- CONSTANTOULAKIS, P., STAMATOYANNOPOULOS, G. On the induction of fetal hemoglobin by butyrates: In vivo and in vitro studies with sodiun butyrate, and comparison of combination treatments with 5-aza C and ara C. *Blood*, v.74, n.6., p. 1963-1971, 1989.
- COSTIN, G., KOUGUT, M. D., HYMAN, C., ORTEGA, J. A. Carbohydrate metabolism and pancreatic islet-cell function in thalassemia major. *Diabetes*, v.26,, n.3, p.230-240, 1977.
- COX, N. J., XIANG, K. S., BELL, G. I., KARAM, J. H. Glucose transporter gene and non-insulin dependent diabetes, *Lancet*, v.10, p.793-194, 1988
- CRUZ-VIDAL, M., COSTAS, R. Factors related to Diabetes Mellitus in Puerto Rican men. *Diabetes*, v.28, p.300, 1979.



- CUDWORTH, A. G., WOODROW, J. C. Genetic susceptibility in *Diabetes Mellitus* analysis of the HLA association. *Br. Med. J.*, v.2, p.846, 1976.
- DEISSEROTH, A. Localization of the human alpha globin gene to chromosome 16 in cell hybrids by molecular hybridization. *Cell*, v.12, p.205-218, 1977.
- DE MOERLOOSE, P., JEANET, M., BALLY, C., RAFFOUX, C. POINTEL, J. P., SIZONENKO, P. HLA and DRw antigens in insulin-dependent diabetes. *Br. J. Med.*, v.2, p.823-824, 1978.
- DE SIMONE, J., BIEL, M., HELLER, P. Maintenance of fetal hemoglobin (HbF) elevations in the baboon by prolonged erythropoietic stress. *Blood*, v.60, n.2, p.519-523, 1982.
- DITZEL, J., ANDERSON, H., DANGAARD, P. N. Increase hemoglobin A1c and 2,3 diphosphoglycerate in diabetes and their effects on red-cell oxygenreleasing capacity. *Lancet*, v.2, p.1034, 1973
- DITZEL, J., KJAERGAARD, J. J. Hemoglobin A1c concentrations after inicial insulin treatment for newly discovered diabetes. *Med. J.*, v.1. p. 741-742. 1978.
- DOMINGOS, C. R. B. Prevalência de hemoglobinas anormais, fenótipos de haptoglobinas e quantificação de hemoglobinas A2 e Fetal em portadores de doenças de Chagas- S.J.R.Preto: IBILCE/UNESP, 1990.143p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. UNESP, 1990.
- DUNN, F. L., RASKIN, P., BILHEIMER, D. W., GRUNDY, S. M. The effect of diabetic control on very low density lipoprotein triglyceride metabolism in patients with type



II *Diabetes Mellitus* and marked hypertriglyceridemia. *Metabolism*, v.33, p.117-123, 1984.

DUNN, P. J., COLE, R. A., SOELDNER, J. S., GLEASON, R. E., KWA, E., FIROZABADI, H., YOUNGER, D., GRAHAM, C. A. Temporal relationship of glycosylated haemoglobin concentrations to glucose control in diabetes. *Diabetologia*, v.17, p.213-220, 1971.

DYMOCK, I. W., CASSAR, J., PIKE, D. A., OARLEY, W. G., WILLIAMS, R. Observations and treatment of diabetes in 115 cases of hemochromatosis. *Am. J. Med.*, v.52, p.203-210, 1972.

DZIEN, A., LECHLEITNER, M., HOPFERWIESER, T., DREXEL, H., PATSCH, J. R., BRAUNSTEINER, H. Long-term effect of intensified insulin treatment on lipid parameters in *Diabetes Mellitus* type I. *Klin. Wochenschr.*, v.69, p.483-485, 1991.

ELKELES, R. S. The effects of oral hypoglycaemic drugs on serum lipids and lipoproteins in noninsulin dependent diabetes (NIDDM). *Diabetes & Metabolisme*, v.17. p.197-200, 1991.

EMBURY, S. H. Two different molecular organizations account for the single - globin gene of the - thalassemia 2 genotype. *J. Clin. Invest.*, v.66, p.1319-1325, 1980.

ERASMUS, R. T., OLEIKOGA, O., ADEWOYE, H. O. Correlation studies between concentrations of glycosylated haemoglobins and lipids in non insulin dependent Nigerian diabetic. *The Central Afr. J. Med.*, v.32, n.10, p.231-236, 1987.

FABRY, M. E., KAUL, D. K., RAVENTOS, C., BAEZ, S., RIDER, R., NAGEL, R. L. Some aspects of the pathophysiology of

- homozygotes Hb CC erythrocytes. *J. Clin. Invest.*, v.67, p.1284-1291, 1981.
- FESSAS, P. Hemoglobin H and Bart's. In: LEMANN, H., BETKE, K. *Haemoglobin colloquium*. Vienna: Georg. Verlag, 1961, p.74.
- FRANCO, L. J. Estudo multicêntrico sobre a prevalência do *Diabetes Mellitus* no Brasil. Ministério da Saude: Censo de diabetes, 32p., 1992.
- FREIDMANN, N. K. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Physiol. Rev.*, v.64, p.170-259, 1984.
- FRITSCH, E. F., LAWN, R. M., MANIATIS, T. Molecular cloning and characterization of the human like globin gene cluster. *Cell* v.19, p.959-972, 1980.
- FUJIMORI, Y., OGAWA, M., CLARK, S. C., DOVER, G., J. Serum free culture of enriched hematopoietic progenitors reflects physiologic levels of fetal hemoglobin biosynthesis. *Blood*, v. 75, n.8, p.1718-1722, 1990.
- GABBAY, K. H., HASTY, K., BRESLOW, J. L., ELLISON, R. C., BUNN, F. H., GALLOP, P. M., Glycosylated hemoglobins and long-term blood glucose control in *Diabetes Mellitus*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.44, p.859-864, 1977.
- GARLICK, R. L., MAZER, J. S., HIGGINS, P. J., BUNN, H. F. Characterization of glycosylated hemoglobins. *J. Clin. Invest.*, v.71, p.1062-1072, 1983.
- GARNER, M. H., BOGARDT, R. A., GURD, F. R. N. Determination of the pK values for the α - amino groups of human hemoglobins. *J. Biol. Chem.*, v.250, p.4398-4404, 1975.
- GERIH, J. E., LORENZI, M., TSALIKIAN, E. Studies on the mechanisms of epinephrine induced hyperglycemia in man. *Diabetes*, v.25, p.65-71, 1976.



- GIBBONS, G. Hiperlipidaemia of diabetes. *Clinical Science*, v.71, p.477-486, 1986.
- GILMAN, A. G., GOODMAN, L. S., RALL, T. W., MURAD, F. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. 1195p.
- GINSBERG, H. N. Lipoprotein physiology in non-diabetic and diabetic states. *Diabetes Care*, v.14, n.9, p.839-855, 1991.
- GLASGOW, A. M., AUGUST, G. P., HUNG, W. Relationship between control and serum lipids in juvenile - onset diabetes. *Diabetes Care*, v.4, n.1, p.76-80, 1981.
- GOLDWEIT, R. S., BORER, J. S., JOVANOVIC, L. G., DEXLER, A. J., HOCHREITER, V. A., DEVEREUX, R. B., PETERSON, C. M. Relation of hemoglobin A_{1c} and blood glucose to cardiac function in *Diabetes Mellitus*. *Am. J. Card.*, v.56, p.642-646, 1985.
- GOMES, C. T., NAOUM, P. C., ANGULO, I. Talassemia alfa adquirida nas doenças linfo e mieloproliferativas. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, v.24, n.3, p.98-101, 1988.
- GONEN, G., RUBNSTEIN, A. H., ROCHMAN, H., TANEGA, S. P., HORWITZ, D. L. Haemoglobin A_{1c}: An indicator of the metabolic control of diabetic patients. *Lancet*, v.8, p.734-737, 1977.
- GRANNER, D. K., O'BRIEN, R. M. Molecular physiology and genetics of NIDDM. *Diabetes Care*. v. 15, n.3, p.365-369, 1992.
- GREENFIELD, M. S., DOBERNE, L. ROSENTHAL, M., VERNAN, H., REAVEN, G. M. Lipid metabolism is non-insulin-depedent *Diabetes Mellitus*. *Arch. Intern. Med.*, v.142, p. 1498-1500, 1982.



- GRENN, A., ANDERSEN, P. K. Epidemiological studies of *Diabetes Mellitus* in Denmark. *Diabetologia*, v. 25, p. 226-230, 1983.
- GRUNBERGER, G., RAYAN, J. GORDEN, P. Sulfonylureas do not affect insulin binding or glicemic control in insulin dependents diabetics. *Diabetes*, v.31, p.890-896, 1982.
- GUYTON, A. C. *Tratado de Fisiologia Médica*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 864p.
- HAMILTON, R. W., SCHWARTZ, E., ATWATER, J. B. S. ERSELEV, A. Acquired hemoglobin H disease. *N. Engl. J. Med.*, v.285, n.2, p.1217-1222, 1971.
- HARPER, H. A., RODWELL, V. W., MAYES, P. A. *Manual de química fisiológica*. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 1982. 735p.
- HENRY, J. R. *Clinical Chemistry: principle and technics*. 2 ed. New York: Harper and Row Publishers, 1974. p.413-416.
- HERMANN, L. S., KJELLSTRONI, T., EHLE, P. N., Effects of metformin and glibenclamide alone and in combination on serum lipids and lipoproteins in patients with non-insulin-dependent *Diabetes Mellitus*. *Diabete & Metabolisme*, v.17, p.174-179, 1991.
- HERS, H. G. The control of glycogen metabolism in the liver. *Ann. Rev. Biochem.*, v.45, p.167-189, 1976.
- HIGGS, D. R., WOOD, W. G., BARTON, C., WEATHERALL, D. J. Clinical features and molecular analysis of acquired hemoglobin H disease. *Am. J. Med.*, v.75, p.181-191, 1983.
- HOLLENBECK, C. B., CHEN, I., GREENFIELD, M. S., LARDINOIS, C. K., REAVEN, G. M. Reduced plasma high density lipoprotein cholesterol concentrations need not increase when hiperglycemia is controlled with insulin in non



- insulin dependent *Diabetes Mellitus*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 62, n.3, p.605-608, 1986.
- HOLLENBECK, C. B., COULSTON, A. M., Effects of dietary carbohydrate and fat intake on glucose and lipoprotein in individuals with *Diabetes Mellitus*. *Diabetes Care*, v.14, n.9, p.774-785, 1991.
- HOLMQUIST, W. R., SCHROEDER, W. A. A new-N-terminal blocking group involving a Schiff base in hemoglobin A_{1c}. *Biochemistry*, v.5. n.8, p.2489-2503, 1966.
- HONIG, G. R., ADAMS III, J. G. *Human hemoglobin genetics*. Wien: Springer , 1986. 452p.
- HOWARD, B. V., REITMAN, J. S., VASQUEZ, B., ZECH, L. Very-low-density lipoprotein triglyceride metabolism in non-insulin-dependent *Diabetes Mellitus*. Relationship to plasma insulin and free fatty acids. *Diabetes*, v.32, p. 271-276, 1983.
- HOWARD, B. V., ABBOTT, W. G. H., BELTZ, W. F., HARPER, I. T., FIELDS, R. M., GRUNDY, S. M., TASKINEN, M. R. Integrated study of low density lipoprotein metabolism in non-insulin-dependent diabetes. *Metabolism*. v.36, n.39, p.877-889, 1987a.
- HOWARD, B. V., Lipoprotein metabolism in *Diabetes Mellitus*. *J. Lipid. Res.*, v.28, p.613-628, 1987b.
- JORNAL BRASILEIRO DE MEDICINA. *Dicionário de Especialidades Farmacêuticas*. Rio de Janeiro: Editora Publicações, 1987/88, 521 p.
- KAHN, C. R., ROSENTHAL, A. S. Immunologic reactions to insulin: insulin allergy, insulin resistance and autoimmune insulin syndrome. *Diabetes Care*, v.2, p.283-295, 1979.

- KAN, Y, N. New methods for the diagnosis of genetic disorders. In: MARX, J. L. **A revolution in biotechnology**. New York: Cambridge University, 1989. p.172-173.
- KARAMANOS, B., CHRISTACOPOULOS, P., ZACHARIOU, N. KORKOLIS, S. Rapid changes of the hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) fraction following alterations of diabetic control. **Diabetologia**, v.13, p.406-410, 1977.
- KARAZIAN, H. H. the hereditary persistence of fetal hemoglobin syndromes, variations on the thalassemia theme. **The Johns Hopkins Medical Journal**, v.139, p. 215-219, 1976.
- KARLSSON, S., NIENHUIS, A. W. Developmental regulation of human globin genes. **Ann. Rev. Biochem.**, v.54, p.1071-1108, 1985.
- KEMP, S. F., FRINDIK, J. P. Effect of metabolic control on serum protein concentrations in Diabetes. **Acta Paediatr. Scand.**, v.80, p.938-943, 1991.
- KLIMES, I., NAGULESPARAN, M., WASQUES, B. Normal insulin sensitivity of the islets of Langerhans in obese subjects with resistance to its glucoregulatory actions. **Diabetes**, v.33, p.305-310, 1984.
- KITABACHI, A. E., FISHER, J. N., MATTERI, R. The use of continuous insulin delivery systems in treatment of **Diabetes Mellitus**. **Adv. Intern. Med.**, v.28, p.449-490, 1983.
- KNOWLER, W, C., PETTIT, D. J., SAVAGE, P. J. Diabetes incidence in Pima Indians: contributions of obesity and parental diabetes. **Am. J. Epidemiol.**, v.113, p.144-156, 1981.



- KOENIG, R. J., PETERSON, C. M., KILO, C., CERAMI, A., WILLIAMSON, J. R. Hemoglobin A_{1c} as an indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes. *Diabetes*, v.25, n.3, p.230-232, 1976a.
- KOENIG, R. J., PETERSON, C. M., JONES, R. L., SAUDEK, C., LEHRMAN, M., CERAMI, A. Correlation of glucose regulation and hemoglobin A_{1c} in *Diabetes Mellitus*. *N. Engl. J. Med.*, v.295, p.417-420, 1976b.
- KOLTERMAN, O. G., GRAY, R. S., SHAPIRO, G., SCARLETT, J., GRIFFIN, J., OLEFSKY, J. M. The acute and chronic effects of sulfonylurea therapy in type II diabetic subjects. *Diabetes*, v. 33, p. 346-354, 1984.
- KRAUS, A. P., DIGGS, L. W. In vitro crystallization of hemoglobin occurring in citrated blood from patients with hemoglobin C. *J. Lab. Clin. Med.*, v.47, p.700-105, 1956.
- KRAUSE, J. R., STOLC, V., CAMPBELL, E. The effect of hemoglobin F upon glycosylated hemoglobin determinations. *Am. J. Clin. Path.* v.78, n.5, p.767-769, 1982.
- KROC COLLABORATIVE STUDY GROUP. Blood glucose control and the evolution of diabetic retinopathy and albuminuria. *N. Engl. J. Med.*, v. 311, p.365-372, 1984.
- KUEH, Y. K. Acute lymphoblastic leukemia with brilliant cresyl blue erythrocytic inclusions - acquired hemoglobin H? *N. Engl. J. Med.*, v.307, p.193-194, 1982
- LAAKSO, M., VOUTILAINEN, E., SALUND, H., ARO, A., PYORALA, K., PENTTILA, I. Serum lipids and lipoproteins in middle-aged non-insulin-dependent diabetics. *Atherosclerosis*, v. 56, p.271-281, 1985.
- LASSMAN, M. N., O'BRIEN, R. T., PEARSON, H. A., WISE, J. K., DONABEDIAN, R. K., FELIG, P., GENEL, M. Endocrine



- evaluation in the thalassemia major. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.323, p.226-237, 1974.
- LAUER, J., SHEN, C. K., MANIATIS, T. The chromosomal arrangement of human α - like globin genes: sequence homology and - globin gene deletions. *Cell*, v.20, p. 119-130, 1980.
- LESELY, D., SANDERS., L.L. False elevation of hemoglobin A_{1c} by hereditary persistence of fetal hemoglobin. *J. Med.*, v.18, n.2, p.81-92, 1987.
- LILJENQUIST, J. E., MUELLER, G. L., CHERRINGTON, A. D. Hyperglycemia per se (insulin and glucagon withdrawn) can inhibit hepatic glucose production in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.48, p.171-174, 1979.
- LISCH, H. J., SAILLER, S. Lipoprotein patterns in diet, sulphonylurea and insulin treated diabetics. *Diabetologia*, v.20, p.118-122, 1981.
- LOPES-VIRELLA, M. F., WOHLTMANN, H. J., LOADHOLT, C. B., BUSE, M. G. Plasma lipids and lipoproteins in young insulin dependent diabetic patients: relationship with control. *Diabetologia*, v.21, p.216-223, 1981.
- LOPES-VIRELLA, M. F., WOHLTMANN, H. J., MAYFIELD, R. K., LOADHOLT, C. B., COLWELL, J. A. Effect of metabolic control on lipid, lipoprotein, and apolipoprotein levels in 55 insulin dependent diabetic patients. *Diabetes*, v. 32, p.20-25, 1983.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E. F., LAUER, J., LAWN, R. M., The molecular genetics of human hemoglobins. *Ann. Rev. Genet.*, v.14, p.145-178, 1980.

- MARENGO-ROWE, A. J. Rapid eletrophoresis and quantitation of hemoglobin on cellulose acetate. *J. Clin. Pathol.*, v.18, p.790-792, 1965.
- MATTOCK, M. B., FULLER, J. H., MAUDE, P. S., KEEN, H. Lipoproteins and plasma cholesterol esterification in normal and diabetic subjects. *Atherosclerosis*, v.34, p.439-449, 1979.
- MAYER, T. K., FREEDMAN, Z. R. Protein glycosylation in *Diabetes Mellitus*: a review of laboratory measurements and of their clinical utility. *Clin. Chim. Acta*, v.127, p.147-184, 1983.
- MEDHIN, M. G., EWALD, V., TUVEMO, T. Reduced serum proteins in diabetic children on a twice-daily insulin schedule. *Acta Paediatr. Scand.*, v.74, p.961-965, 1985.
- MEISLER, M. H., HOWARD, G. Effects of insulin on gene transcription. *Ann. Rev. Physiol.*, v.51, p.701-718, 1989.
- MIROUZE, J., SEIGNALET, J., SELAM, J. L., LAPINSHI, H., JAFFIOL, C. Antigenes HLA chez les diabétiques insulino-dependents. *Nouv. Press. Méd.*, v.5 p.1628-1639, 1976.
- MODELL, B. Advances in the use of iron - chelating agents for the treatment of iron overload. *Prog. Hemat.*, v.1, p.267-312, 1979.
- MOORE, W., KNAPP, J., KAUFFMAN, R., PERKINS, W. Plasma lipid levels in insulin - dependent *Diabetes Mellitus*. *Diabetes Care*, v.2, p.31-34, 1979.
- MORRIS, L. R., Mc GEE, J. A., KITABCHI, A. E. Correlation between plasma and urine glicose in diabetes. *Ann. Intern. Med.*, v.94, n.469-471, 1981.
- MORRISON, J. C., SCHNEIDER, J. M., KRAUS, A. P., KITABCHI, A. E. The prevalence of *Diabetes Mellitus* in sickle cell

- hemoglobinopathies. *J. Clin. Endol. Metab.*, v.48, n.2, p. 192-195, 1979.
- MUECKLER, M. Family of glucose - transporter genes: implications for glucose hemeostasis and diabetes. *Diabetes*, v.39, p.6-11, 1990.
- MULLER, W. A., FALOONA, G. R., AGUILAR-PARADA, E. Abnormal alpha-cell function in diabetes. Response to carbohydrate and protein ingestion. *N. Engl. J. Med.*, v.283, p.109-115, 1970.
- MULLIS, P., SCHULER, J., ZUPPINGER, K. Increased prevalence of fetal hemoglobin in type 1 (insulin dependent) *Diabetes Mellitus*. *Diabetologia*, v.32, p.227-230, 1989.
- NAOUM, P. C., DOMINGOS, C. R. B., MAZZIERO, P. A., CASTILHO, E. M., GOMES, C. T. Hemoglobinopatias no Brasil. *Boletim da SBHH*, v.8, n.141, p.180, 1986.
- NAOUM, P. C. *Diagnóstico das hemoglobinopatias*. São Paulo : Sarvier, 1984. 241 p.
- NAOUM, P. C. *Eletroforese: Técnicas e diagnósticos*. São Paulo: Livraria e editora Santos, 1990. 174p.
- NATIONAL DIABETES DATA GROUP. Classification and diagnosis od *Diabetes Mellitus* and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*, v.28, p.1039-1057, 1979.
- NECHELES, T. F., CHUNG, S., SABBBAH, R., WHITTEN, D. Intensive transfusion therapy in thalassemia major: an eighth-year fallow-up. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.232, p. 179-185, 1974.
- NERUP, J., PLATZ, P. RYDER, L. P., THOMSEN, M., SVEJGAARD, A. HLA, islet cell antibodies, and types of *Diabetes Mellitus*. *Diabetes*, suppl. 1, p.244-250, 1978.

- NEWMAN, B., SELBY, J. V., KING, M. C., SLEMENDA, C.,
FRIEDMAN, G. D. Concordance for type 2 (non-insulin-
dependent) *Diabetes Mellitus* in male twins. *Diabetologia*,
v.30, p.763-768, 1987.
- NIENHUIS, A. W., BENS, E. J. Regulation of hemoglobin
synthesis during development of the red cell. *N. Eng. J.
Med.*, v.297, n.26, p.1430-1436, 1977.
- ODETTI, D., ANSALDI, E., DIARA, C., CHELI, V., ANDRAGHETTI,
G., BUZZO, P., PRANDO, R. Correlations between
glycosylated haemoglobin and other metabolic parameters
in insulin-dependent diabetics. *Diabete & Metabolisme*,
v.9, p.26-31, 1983.
- OLEFESKY, J. M. Insulin resistance and insulin action. An
in vitro and in vivo perspective. *Diabetes*, v.30, p. 148-
162, 1981a.
- OLEFESKY, J. M., KOLTERMAN, O. G. Mechanisms of insulin
reistance in obesity and non insulin dependent (type II)
diabetes. *Am. J. Med.*, v.70, p.151-168, 1981b.
- OPIE, L. H., TANSEY, M. J., KENNELLY, B. M. The heart in
Diabetes Mellitus. Part. I. Biochemical bases for
myocardial disfunction. *Afr. Med. J.*, v.56, p.107-211,
1979.
- ORKIN, S. H., GOFF, S. C. The duplicate human - globin
genes: their relative expression as measured by RNA
synthesis. *Cell*, v.24, p.345-351, 1981.
- OSTLUND, R. E., SEMENKOVICH, C. F., SCHECHTMAN, K. B.
Quantitative relationship between plasma lipids and
glycohemoglobin in type patientes. *Diabetes Care*, v.12,
p.332-336, 1989.

- OWEN, O. E., MORGAN, A. P., KEMP, H. G. Brain metabolism during fasting. *J. Clin. Invest.*, v.46, p.1589-1595, 1967.
- OWENS, D. R. Effects of oral sulfonylureas on the spectrum of defects in non-insulin-dependent *Diabetes Mellitus*. *Am. J. Med.*, v.29, n.2B, p.27-32, 1985.
- PAGNIER, J., LABIE, D., KAPLAN, J. C., JUNIEN, C., NAJMAN, A., LEROUX, J. P. Etude biochimique d'un cas d'érythroleucémie. *Nouv. Rev. Fr. Hemat.*, v.12, p.317-332, 1972.
- PAICE, B. J., PATTERSON, K. R., LAWSON, D. H. Undesired effects of sulfonylurea drugs. *Adverse Drug React. Acute Poisoning Rev.*, v. 1, p.23-36, 1985.
- PAISEY, R. B., READ, R., PALMER, R., HARTOG, M. Persistent fetal haemoglobin and falsely high glycosylated haemoglobin levels. *Br. Med. J.*, v.289, p.279-280, 1984.
- PANDE, A., GARNER, W. H., SPECTOR, A. Glycosylation of human lens protein and cataractogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.89, p.1260-1266, 1985.
- PAPAYANNOPOULOS, R., STOMATAYANNOPOULOS, G. Stains for inclusion bodies. In: **STANDARDIZATION of laboratory reagentes and methods for detection of haemoglobinopathies**. Atlanta: Hew Publications, 1974.
- PEDROLLO, E. Detecção de hemoglobina Bart's e frequência de talassemia alfa em uma população de neonato em Porto Alegre. Porto Alegre: UFRGS, 1987. Dissertação (mestrado).
- PERLEY, J., KIPNIS, D. M. Plasma insulin reponses to oral and introyenous glucose: studies in normal and diabetic subjets. *J. Clin. Invest.*, v.46, p. 1954-1962, 1967.



- PERMUTT, M. A., ELBEIN, S. C. Insulin in diabetes: analysis through RFLP. *Diabetes Care*, v.13, p.364-374, 1990a.
- PERMUTT, M. A. Genetics of NIDDM. *Diabetes Care*, v.13, n.11, p.1150-1153, 1990b.
- PERRINI, S. P. Delay in the fetal globin switch in infants of diabetic mothers. *N. Eng. J. Med.*, v.312, p.334-338, 1985.
- PETERSON, C. M., JONES, R. L. Minor hemoglobins, diabetic control, and diseases of post synthetic protein modification. *Ann. Intern. Med.*, v. 87, n.4., p.489-491, 1977a.
- PETERSON, C. M., KOENIG, R. J., JONES, R. L., SAUDEK, C. D., CERAMI, A. Correlations of serum triglyceride levels and hemoglobin A_{1c} concentrations in *Diabetes Mellitus*. *Diabetes*, v.26, p.507-509, 1977b.
- PIGNATTI, C. B., ZONTA, L., BONGO, I., STEFANO, P. Red blood cell indices in adults and children with heterozygous beta-thalassemia. *Haematologia*, v.68, n.2, p.149-152, 1983.
- PYKALISTO, O. J., SMITH, P. H., BRUNZELL, J. D. Determinants of human adipose tissue lipoprotein lipase: effect of diabetes and obesity on basal - and diet - inducibility activity. *J. Clin. Invest.*, v.56, p.1108-1117, 1975.
- RAMSAY, M. Alpha-thalassemia in Africa: the oldest malaria protective trait? *Lancet*, v.2, p.240, 1984.
- REAVEN, G., GREENFIELD, B. S. Diabetic hypertriglyceridemia. Evidence for there clinical syndrome. *Diabetes*, v.30, n.2, p.66-75, 1981.



- REGAN, T. J., LYONS, M. M., AHNRED, S. S., LEVINSON, G. E., OLDEWURTER, H. A., AHMAD, M. R., HAIDER, B. H. Evidence for cardiomyopathy in familial *Diabetes Mellitus*. *J. Clin. Invest.*, v.60, p.885-899, 1977.
- RIVELLESE, A., RICCARDI, G., ROMANO, G., GRACCO, R., PATTI, L., MAROTTA, G., ANNUZZI, G., MANCINI, N. Presence of very low density lipoprotein compositional abnormalities effects of blood glucose optimisation. *Diabetologia*, v. 31, p.884-888, 1988.
- ROBERT, J. J., DESCHAMPS, I., CHEVENNE, D., ROGER, M., MOGENET, A., BOITARD, C. Relationship between first-phase insulin secretion and age, HLA, inslet cell antibody status, and development of type I diabetes in 200 juvenile first-degree relatives of diabetic patients. *Diabetes Care*, v.14, n.8, p.718-723, 1991.
- ROSENSTOCK, J., VEGA, G. L., RASKIN, P. Improved diabetic control decreases LDL apo B synthesis in type I *Diabetes Mellitus*. *Arteriosclerosis*, v.5, p.513A, 1985.
- ROTTER, J. I., RIMOIN, D. L. Heterogeneity in *Diabetes Mellitus* - uptake 1978. *Diabetes*, v.27, p.599-603, 1978.
- RUIZ, M. Detecção de hemoglobinas anormais em sangue de cordão de recém-nascidos na cidade de Santos SP., através de eletroforese em gel de agar amido. *Boletim da SBHH*, v. 8, p.8-13, 1986.
- SACCA, L., MENDLER, R., SHERWIN, R. S. Hyperglycemia inhibits glucose production in man independent of changes in glucoregulatory hormones. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.47, p.1160-1163, 1979.



- SANDERS-HAIGH, L., ANDERSON, W. F., FRANCKE, U. The globin gene is on the short arm of human chromosome 11. *Nature*, v.282, p.683-686, 1980.
- SANNAZZARO, C. A., C. Hemoglobina glicosilada no *Diabetes Mellitus*. São Paulo: F.C.F./USP, 1984. 72p. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, 1984.
- SAVAGE, P. J., BENMON. L. J., FLOCK, E. V. Diet induced improvement of abnormalities in insulin and glucagon secretion and in insulin receptor binding in *Diabetes Mellitus*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.48, p.999-1007, 1979.
- SCHRAER, C. D., LANIER, A. P., BOYKO, E. J., GOHDES, D., MURPHY, N. J. Prevalence of *Diabetes Mellitus* in Alaskan esquimos, indians and aleuts. *Diabetes Care*, v. 11, n. 9, p.693-700, 1988.
- SCHROEDER, W. A., SHELTON, J. B., CORMACK, J., JONES, R. T. The amino acid sequence of the gamma chain of human hemoglobin. *Biochemistry*, v.2, p.992-996, 1963.
- SERVICE, F. J., O'BRIEN, P. C., RIZZA, R. A. Measurements of glucose control. *Diabetes Care*. v. 10, n.2, p.225-237, 1987.
- SHAPIRO, R., Mc. MANUS, M. J., ZALUT, C., BUNN, H. F. Sites of nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin A. *J. Biol. Chem.*, v.255, n.7, p.3120-3127, 1980.
- SHIMIZU, K., KEINO, H., TERASAWA, T., SHICHISHUNA, T. IKUTA, K., HAYASHI, Y. Elevated haemoglobin F in juvenile and adult chronic myelogenous leukaemia. *Acta Haemat.*, v.80, p.28-33, 1988.

SILVESTRONI, E. Abnormal foetal haemoglobins. *Nature*, v.191, p.397-401, 1961.

SILVESTRONI, E., BIANCO, I. Screening for microcytemia in Italy: analyses of data collected in the past 30 year. *Am. J. Hum. Gent.*, v.27, p.198-203, 1975.

SJOBERG, S., GUNNARSSON, R., ROSSNER, S., OSTMAN, J. Serum lipid and lipoprotein levels in long term insulin dependent *Diabetes Mellitus*. *Acta Med. Scand.*, v.222, p.445-451, 1987.

SKYLER, J. S., PFEIFFER, E. F., RAPTIS, S. Biosynthetic human insulin progress and prospects. *Diabetes Care*, v.4, p.140-143, 1981.

SOLONI, F. G. Simplified manual micromethod for determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.*, v.17, n.6., p.529-534, 1971.

SOPHOCLEOUS, T. The molecular basis for the hemoglobin Bart's hydrops fetalis syndrome in Cyprus. *Br. J. Haematol.*, v.47, p.153-156, 1981.

SOSENKO, J. SPACK, N., BRESLOW, J. L., MIETTINEN, O., GABBAY, K. H. Relationship of glycosylated HGB with cholesterol and LDL cholesterol in insulin-dependent diabetics. *Diabetes*, v.27, n.2, p.505-509, 1978.

SOSENKO, J. M., BRESLOW, J. L., MIETTINEN, D. S., GABBAY, K. H. Hiperglycemia and plasma lipid levels. *N. Engl. J. Med.*, v.302, n.12, p.650-654, 1980a.

SOSENKO, J. M., FLUCKIGER, R., PLATT, O. S., GABBAY, K. H. Glycosilation of variant hemoglobins in normal and diabetic subjects. *Diabetes Care*, v.3, n.5, p.590-593, 1980b.



- SPICER, K. M., ALLEN, R. C., HALLETT, D., BRUSE, M. G.
Synthesis of hemoglobin A_{1c} and related minor hemoglobins
by erythrocytes. *J. Clin. Invest.*, v.64, p.40-48, 1979.
- SPRITZ, R. A. The thalassemias: molecular mechanisms of
human genetic disease. *Am. J. Hum. Genet.*, v.35, p.333-
361, 1983.
- TAKEDA, J., SEINO, Y., FUKUMOTO, H., KOH, G. The
polymorphysm linked to the human insulin gene: its lack
of association with either IDDM or NIDDM in japanese.
Acta Endocrinol., v.113, p.268-271, 1986.
- TASKINEN, M. R., BELTZ, W. F., HARPER, I., FIELDS, G.,
SCHONFELD, S. M., GRUNDY, S. M., HOWARD, B. V. The
effects of non-insulin-dependent *Diabetes Mellitus* on
VLDL triglyceride and VLDL apo B metabolism: estudies
before and after sulfonylurea therapy. *Diabetes*, v.35,
p.1268-1277, 1986.
- TASKINEN, M. R. Lipoprotein lipase in *Diabetes Mellitus*,
Diabetes Metab. Rev., v.3, p.551-570, 1987.
- TAYLOR, R., AGIUS, L. The biochemistry of diabetes.
Biochem. J., v.250, p.625-640, 1988.
- TRIEB, B., HOLENSTEIN, C. C., FISHER, R. W., WINTERHALTER,
K. H. Nonenzimatic glycosylations of proteins. *J. Biol.*
Chem., v.225, p.6717-6720, 1980.
- TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose
oxidase with an alternative oxygene acceptor. *Ann. Clin.*
Biochem., v.6, p.24-27, 1969.
- TRIVELLI, L. A., RANNEY, H. A., LAI, H. T. Hemoglobin
components in patients with *Diabetes Mellitus*. *N. Engl.*
J. Med., v.284, p.353-357, 1971.



- TUAN, D., MURMANE, M. J., RIEL, J. K., FORGET, B. G. Heterogeneity in the molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nature*, v.285, p.335-340, 1980.
- UNGER, R. H. The milieu interieur and the islets of Langerhans. *Diabetologia*, v.20, p.1-11, 1981.
- UUSITUPA, M., SUTONEN, O., VOUTILAINEN, E., ARO, A., HERSIO, K., PYORALLA, ILKKA, P., EHNHOLM, C. Serum lipids and lipoproteins in newly diagnosed non-insulin-dependent in (type II) diabetics patients, with especial reference to factors influencing HDL cholesterol and triglyceride levels. *Diabetes Care*, v.9, n.1, p.17-22, 1986.
- VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobins. *Am. J. Clin. Path.*, v.49, p.440-443, 1968.
- VIEIRA FILHO, J. P. B. O *Diabetes Mellitus* e as glicemias de jejum dos índios Caripuna e Palikur. *Rev. Ass. Med. Brasil*, v.23, p.175-179, 1977.
- WADSWORTH, M. E. J., JARRETT, R. J. Incidence of diabetics in the first 26 years of life. *Lancet*, v.2, p.1172-1174, 1974.
- WATALA, C., ZAWODMAK, M., BRYSZEWSKA, M. NOWAK, S. Nonenzymatic protein glycosylation lowered erythrocyte membrane fluidity in juvenile diabetes. *Ann. Clin. Res.*, v.17. p.327-330, 1985.
- WATTS, N.B. *Diabetes Mellitus* diagnostic and monitoring technics. In: *LABORATORY Management*, 1982. p.43-45.
- WEATHERALL, D. J., CLEGG, J. B. *The thalassemia syndromes*. 3. ed. Oxford: Blackwell Scientiic Plublications, 1981. 859p.

- WEATHERALL, D. J., HIGGS, D. H., WOOD, W. G., CGLEGG, J. B.
Genetic disorders of human haemoglobin as models for
analysing gene regulation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*,
v.307, p.247-259, 1984.
- WEST, J. B. *As bases fisiológicas da prática médica*. 11.
ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989. 1079p.
- WEST, K. M., KABFLEISH, J. M. Glucose tolerance, nutrition
and diabetes in Uruguay, Venezuela, Malaya and East
Pakistan. *Diabetes*, v.15, p.9-18, 1966.
- WILSON, D. E. Excessive insulin therapy: biochemical
effects and clinical repercussions. Currents concepts of
counterregulation in type I diabetes. *Ann. Intern. Med.*,
v.98, p.219-227, 1983.
- WISE, J. E., SAUDER, S. E., WEISS, A. E. Increased fetal
hemoglobin production in a child with congenital
hyperinsulinism. *J. Pediatrics*, v.110, n.6, p.912-914,
1987.
- WITZTUM, J. L., FISCHER, M., PIETRO, I., STEINBRECHER, U.
P., ELAM, R. I. Nonenzymatic glycosylation of high
density lipoprotein accelerates its catabolism in guinea
pigs. *Diabetes*. v.31, p.1029-1032, 1982.
- WOOD, W. G., WEATHERALL, D. J. Developmental genetics of
the human haemoglobins. *Biochem. J.*, v.215, p.1-10, 1983.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WORKING GROUP. Hereditary
anemias: genetic bases, clinical features, diagnosis and
treatment. *O.M.S. Bull (WHO)*, v.5, p.643-660, 1982.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the Vth anual meeting
of the WHO working group on the feasibility study on
hereditary disease community control programmes.
(Hereditary anaemias: alpha thalassemia). Hereditary



diseases programe division of non communicable diseases.

Herakleion (CRETE), p.5-6, 1987.

WYNGAARDEN, J. B., SMITH, L. H. **CECIL-Tratado de Medicina Interna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. 2141p.

YOO, D., SCHECHTER, G. P., AMIGABLE, A. D., NIENHUIS, A. W. Myeloproliferative syndrome with sideroblastic anemia and acquired hemoglobin H disease. **Cancer**, v.45, p.78-83, 1980.

YUDKIN, J. S., ROUCHER, B. J., FRANCE. M. W., WESCH, S. G., SWINOLEHURST, C. The relationship between concentrations of glycosylated haemoglobins and of serum high - density lipoprotein cholesterol in diabetic patients. **Clin. Sci.**, v.56, p.269-172, 1979.

ZAGO, M. A., WOOD, W. G., CLEGG, J. B., WEATHERALL. D. J., SULLIVAM, M. O., GUNSON, H. Genetic control of F cells in human adults. **Blood**, v.53, n.5., p.977-986, 1979.

ZIMMET, P. Epidemiology of diabetes and its macrovascular manifestations in Pacific populations: the medical effects of social progress. **Diabetes Care**, v.2, p.144-153, 1979.

ZIMMET, P., WHITEHOUSE, B. M. The prevalence of diabetes in the rural and urban Polynesian population of Western Samoa. **Diabetes**, v.30, p.45-51, 1981.

ZIMMET, P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes an epidemiological overview. **Diabetologia**, v.22. p.399-441, 1982.

* De acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) - NBR, 6023, outubro de 1989.



