

ASSOCIAÇÃO ENTRE ÍNDICE DE MASSA CORPORAL E PORCENTAGEM DE GORDURA COM ESPECTROS FT-IR DE SANGUE DE JEJUM DE PACIENTES ESTRATIFICADOS POR HEMOGLOBINA GLICADA E GLICOSE

VITOR ESTEVAM SEVERO

CYNTHIA CAETANO

MIRIAM BEATRIS RECKZIEGEL

HILDEGARD HEDWIG POHL

VALERIANO ANTONIO CORBELLINI

Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil

vitors@mx2.unisc.br

1. INTRODUÇÃO

Em muitos países do mundo, a prevalência do *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) tem se elevado vertiginosamente, e se espera um incremento ainda maior. Estima-se que para o ano de 2030 o número de pessoas com *diabetes mellitus* (DM) seja de 300 milhões (WILD 2004; SARTORELLI et al 2006).

O controle metabólico de indivíduos com a doença em evolução consiste em um dos maiores desafios dos serviços de saúde pública americanos e do Brasil. Por isso, o desenvolvimento de programas eficazes e viáveis aos serviços públicos de saúde para a prevenção primária de DM2 em população de risco é necessário tanto para o controle de incidência de DM2 como também para a prevenção secundária de suas complicações metabólicas (SARTORELLI et al 2006)

A obesidade e/ou sobrepeso estão presentes na maioria dos pacientes com (DM2), sendo que sua prevalência varia dependendo de fatores genéticos e ambientais (educacionais e culturais). A etnia desempenha um importante papel nas diferentes prevalências de obesidade existentes em países com mesmo grau de desenvolvimento econômico, entretanto um fato comum parece ser a maior prevalência de obesidade no sexo feminino (CORRÊA et al 2003).

O índice de massa corporal (IMC), obtido pela divisão da massa corporal em quilogramas pelo quadrado da estatura em metros, com o intuito de classificar os indivíduos em baixo peso, eutrofia, sobrepeso e obesidade. Apesar de não ser um parâmetro com total acurácia, devido a super ou subestimar valores para pacientes brevilíneos e longilíneos, o IMC se torna uma ferramenta por ser um método simples, prático, rápido, de fácil aplicabilidade e mensuração, além de requerer menos treinamento e equipamentos mais baratos. Dessa forma, o IMC apresenta grande vantagem em relação aos métodos de avaliação da composição corporal, sendo então o mais escolhido na rotina clínica e em estudo epidemiológico. Atualmente é o método utilizado pela OMS para classificar obesidade (COSTA, GUISELINI, FISBERG 2007; NUNES et al 2009).

A obesidade é uma doença metabólica crônica caracterizada pelo excesso de gordura corporal (GC). Existem vários métodos utilizados para a avaliação deste excesso, sendo mais usado o IMC. A obesidade é definida como IMC igual ou maior a 30 Kg.m^{-2} , e caracteriza-se pelo excesso de GC em relação à massa magra (CORRÊA et al 2003).

A obesidade visceral resulta em várias alterações fisiopatológicas como menor extração de insulina pelo fígado, com aumento da produção hepática de glicose e diminuição da captação de glicose pelo tecido muscular. Estes eventos podem resultar em diferentes graus de intolerância à glicose e, nos indivíduos com DM2, irão influenciar o controle glicêmico, refletido por maiores níveis de hemoglobina glicada (A1c). Este fato deve ser analisado no contexto dos recentes estudos que demonstraram que nestes pacientes o controle glicêmico é fundamental para a redução do risco de evolução para complicações microvasculares. Além

disso, alguns estudos sugerem ainda que o controle de outros parâmetros como pressão arterial e níveis séricos de lipídios, como aumento do colesterol total, triglicerídeos e apolipoproteína B, e redução do colesterol HDL, seriam de relevante importância para diminuir o risco de surgimento das complicações macrovasculares do diabetes, que representam 65% das causas de mortalidade nesta população (CORRÊA et al 2003).

Nesse contexto e especialmente em relação ao diagnóstico é onde emerge a espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) associada a programas de análise multivariada. Com esta metodologia, tem sido possível obter dados de quantificação simultânea, rápida, e de baixo custo e sem necessidade de reagentes específicos (LIQUN WANG 2008; MAHMOUD 2010).

Dessa forma o presente estudo busca através da espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) juntamente com a análise multivariada a associação entre parâmetros antropométricos de IMC e gordura corporal (%G) com espectro FT-IR de sangue de jejum, além de observar diferenças em relação aos espectros médios de pacientes euglicêmicos, pré-diabéticos e diabéticos.

2. METODOLOGIA

2.1 Delineamento do estudo

Foi conduzido um experimento com pacientes ambulatoriais do departamento de Clínica Médica do Hospital Santa Cruz e encaminhados das unidades básicas de saúde (UBS) do município de Santa Cruz do Sul, no período de março a outubro de 2011.

2.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 18 a 59 anos, que apresentassem glicemia de jejum entre 100-126 mg/dL e/ou teste oral de tolerância a glicose com 75 g (TTG 75) igual ou superior a 140 e inferior a 200 mg/dL, ou seja, em níveis pré-diabéticos.

2.1.2 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram: diagnóstico prévio de DM, uso de hipoglicemiantes orais ou insulina, doença renal clínica (creatinina >1,5 mg/dL), doença cardiovascular definida (acidente vascular cerebral, doença arterial coronariana ou doença aterosclerótica clínica) e diagnóstico de neoplasias nos últimos 12 meses.

2.1.3 Grupo controle

Além dos pacientes que preencheram os critérios de inclusão, também foram aceitos indivíduos que convidados tiveram adesão voluntária ao projeto e que não pertenciam ao grupo anterior.

2.1.4 Medidas antropométricas

Todas as medidas antropométricas foram realizadas no Laboratório de Atividade Física (LAFISA) da Universidade de Santa Cruz do Sul, por pessoal capacitado, de acordo com as técnicas recomendadas. Foram aferidas as seguintes variáveis: peso, altura e calculados o índice de massa corporal (IMC). Para a estimativa do percentual de gordura (%G) foram utilizadas medidas de sete dobras cutâneas diferenciadas para homens e mulheres, segundo protocolo de Jackson e Pollock (JACKSON, POLLOCK E WARD 1980), utilizando-se o

compasso de Langué. As medidas foram tomadas três vezes em ordem rotacional, estabelecendo-se uma média dos resultados.

2.1.5 Análises laboratoriais

Coletas sanguíneas foram realizadas através de punção venosa antecubital após 12 horas de jejum noturno. Todas as análises sanguíneas foram realizadas no mesmo laboratório e em triplicata. Foram feitas as seguintes análises: glicose, hemoglobina glicada (A1c), colesterol total, colesterol HDL (*high density lipoprotein*), triglicerídeos, creatinina. O colesterol LDL (*low density lipoprotein*) foi calculado pela equação de Friedewald (FRIEDEWALD 1972).

2.1.6 Análises por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

No momento da coleta venosa antecubital, foram separadas alíquotas de 5 µL em triplicata sem anticoagulante para análise por FT-IR. As coletas de sangue foram armazenadas a 2-8° C até o processamento. O material utilizado para coletas e armazenamento do sangue foi descartado conforme rotina de descarte de materiais biológicos do LAFISA. Triplicatas de 5 µL de sangue total (antecubital ou periférico) foram misturadas com 150 mg de brometo de potássio, liofilizadas por 2h 15 min a $1,10^{-4}$ torr e -50°C (Labcomco Lyofilyzer[®]), analisadas em espectrômetro Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR Spectrometer (Perkin Elmer[®]) laser HeNe de 633 nm com acessório para espectroscopia de reflectância difusa no infravermelho (Pike Technologies, Madison) com Transformada de Fourier na faixa de 4000 a 600 cm^{-1} , 4 cm^{-1} de resolução e 16 scans.

2.1.7 Análise estatística

Os espectros foram adquiridos em absorbância, normalizados, convertidos em extensão *.CSV, organizados em planilha Microsoft Office Excel 2010 e submetidos à análise de regressão multivariada via método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS) com transformação de correção de espalhamento de luz (MSC) e pré processamento auto-escalado em software Pirouette 4.0 (Infometrix). Os modelos de calibração foram validados por validação cruzada com mútua exclusão de 1 por vez. Os modelos de calibração foram otimizados utilizando como critério o valor de coeficiente de correlação R^2 acima de 0,99 e o menor valor da raiz quadrada do erro médio de validação cruzada (RMSECV).

2.1.8 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade de Santa Cruz do Sul, processo 2686/10. Os participantes foram devidamente orientados e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo foi composto de 46 pacientes. Sendo esses subdivididos em três grupos: controle, pré-diabéticos e diabéticos, segundo critérios do ADA (American Diabetes Association) 2011, os quais inclui A1c (hemoglobina glicada) como um parâmetro diagnóstico. Dessa forma pacientes com glicemia de jejum entre 70 e 99 mg/dL e A1c inferior a 5,7% foi incluídos no grupo controle, euglicêmicos. Pacientes com glicemia de jejum entre 100 e 125 mg/dL e A1C entre 5,7 e 6,5, diagnóstico de pré-diabetes e dessa forma incluído no respectivo grupo. Por fim, pacientes com glicemia de jejum acima de 126 mg/dL e A1C acima de 6,5%

incluídos no grupo diabéticos. Sendo importante lembrar que basta um parâmetro alterado para que o diagnóstico se confirme (ADA 2009).

A (tabela 1) caracteriza o grupo amostral, levando em conta parâmetros bioquímicos e antropométricos.

Tabela 1 – Características da amostra de sujeitos investigada.

	Controle (n=12)	Pré-diabéticos (n=26)	Diabéticos (n=8)	Total (n=46)
Idade	47,21	49,07	48,77	48,73
Sexo				
Masculino	6	5	5	16
Feminino	6	21	3	30
IMC	27,98	29,9	33,6	30,1
%G	27,6	30,5	31,5	30,0
Glicemia Jejum	82,4	87,5	111	90,4
A1C	5,5	6,0	6,7	6,0
Perfil Lipídico				
CT	190,6	212,8	222,6	209,3
TRI	109,5	149,1	248,1	155,0
HDL	53,1	52,8	52,9	53,1
LDL	115,7	130,2	125,4	125,3

Idade: média em anos, IMC: Índice de massa corporal média em (Kg/m²), %G: Porcentagem de gordura média em (%), Glicemia de jejum: média em (mg/dl), A1C: Hemoglobina glicada média em (%), CT=Colesterol total médio em (mg/dl), TRI: Triglicerídeos médio em (mg/dl), HDL: Colesterol HDL médio em (mg/dl), LDL: Colesterol LDL médio em (mg/dl).

Como pode se observar na (Tabela 1), trata-se de um grupo bastante heterogêneo, mas quando estratificado por A1c e glicemia de jejum os subgrupos mostram padrões característicos de seu diagnóstico tanto através de parâmetros bioquímicos como antropométricos. Parece claro a associação desses grupos de pacientes com a dislipidemia e obesidade, sendo essas as causas mais prováveis de resistência à insulina e consequentemente DM2. Estas diferenças também aparecem nos espectros médios de cada grupo (Figura 1).

A partir dos espectros médios de cada um dos grupos: controle, pré-diabéticos e diabéticos, foi possível encontrar diferenças, principalmente nas regiões espectrais de 3200-2800 cm⁻¹ e 1500-1200 cm⁻¹, regiões espectrais onde existe uma maior contribuição dos lipídios e dos carboidratos respectivamente. Em ambas as regiões, o grupo controle apresentou menor absorvância em relação ao grupo dos pré-diabéticos e diabéticos condizente com a média de colesterol total e triglicerídeos (Tabela 1). Dessa forma pode-se inferir que em relação aos lipídios, o espectro consegue diferenciar um dos principais fatores da diabetes, a dislipidemia, sendo esta, juntamente com a DM2, elementos da síndrome metabólica. Em relação aos carboidratos, essa diferença pode ser em virtude da relação direta da glicose sérica. Sendo assim, pacientes com maiores taxas de glicose sérica ou mais tempo expostos à hiperglicemia alteram a absorvância nessa faixa espectral.

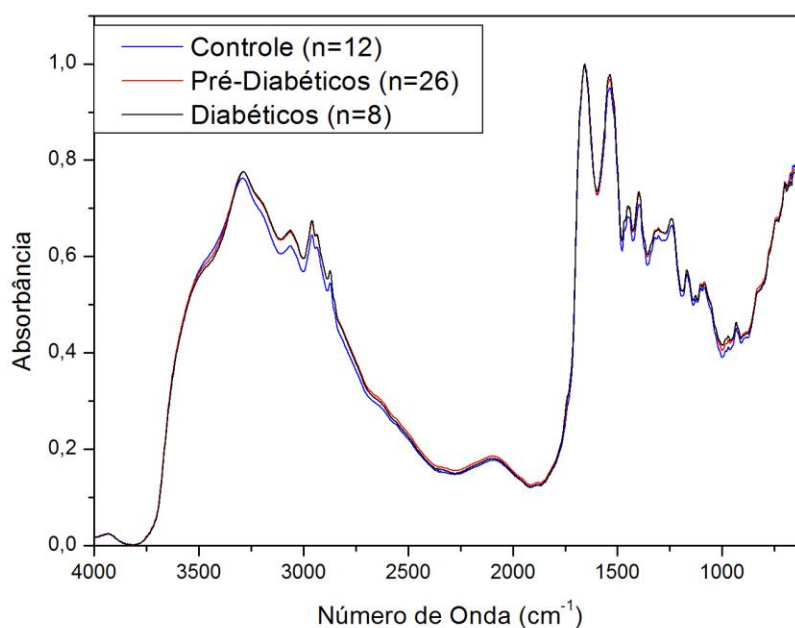


Figura 1 Espectros médios de reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier de sangue total de grupos controles, pré-diabéticos e diabéticos.

A diferença entre pré-diabéticos e diabéticos não foi clara, ou devido a comportamento semelhante em relação ao metabolismo de diabéticos e pré-diabéticos ou devido ao grupo amostral dos diabéticos ser muito pequeno, sendo que um n maior poderia apresentar diferenças mais perceptíveis.

A aplicação de análise de regressão entre o conjunto de espectros FT-IR de sangue total e os respectivos valores de IMC e %G encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Figuras de mérito da modelagem de PLS-DRIFTS entre amostras de sangue total e IMC e de %G.

Modelo	Região espectral (cm ⁻¹)	R ²	RMSECV	VRA	Nº Fatores
IMC	4000-2401, 2300-600	0,996*	0,39	30,4	3
%G	4000-2401, 2300-600	0,893*	1,96	46,8	15

RMSECV = erro quadrático médio padrão de validação cruzada; R² = coeficiente de correlação de validação cruzada; VRA = variância relativa acumulada (%); VL = variáveis latentes; IMC = Índice de massa corporal (Kg/m²); %G = Porcentagem de gordura (%);* = p < 0,001.

Os valores de R² encontrados mostram forte associação com IMC, podendo ser alvo de mais estudos a fim de prever esse parâmetro antropométrico a partir do espectro infravermelho. Já com a %G esta correlação diminui, mas ainda permanece forte. Isto se deve a dificuldade de precisão na aferição de dobras cutâneas em pacientes mais obesos comprometendo a estimativa de %G.

4. CONCLUSÃO

Diante do presente estudo foi possível concluir que espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) consegue caracterizar e diferenciar os três grupos: Controle, Pré-diabéticos e Diabéticos conforme os critérios diagnósticos do ADA 2009, a partir dos espectros médio de cada grupo. As diferenças mais nítidas estão em regiões de maior contribuição dos lipídios e de carboidratos e principalmente entre os pacientes euglicêmicos com relação aos pré-diabéticos e diabéticos, sendo, portanto, uma alternativa para triagem de pacientes. Além disso, a FT-IR em conjunto a análise multivariada se mostrou sensível na associação com os parâmetros antropométricos de IMC e %G. Dessa forma, além da já existente utilização para dosagem de parâmetros bioquímicos, que são de grande auxílio para pacientes com diversas comorbidades bem como no DM, surge a opção da utilização da FT-IR como uma ferramenta para monitoramento antropométrico, sendo um auxílio no combate do principal fator de risco da DM, a obesidade.

5. REFERÊNCIAS

AMERICAN DIABETES, A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 34, n. Suppl 1, p. S62-S69, 2011.

CORRÊA, F. H. S. et al. Body adiposity and its influence on clinical and metabolic parameters in patients with type 2 diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 47, n.1, p. 62-68, 2003.

COSTA, R. F.; GUISELINI, M.; FISBERG, M. Correlation between body fat percentage and body mass index of fitness center participant. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 15, n. 4, p. 39-46, 2007.

SARTORELLI, D.S.; FRANCO, L.J.; CARDOSO M.A. Nutritional intervention and primary prevention of type 2 diabetes mellitus: a systematic review. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n.1, p.7-18, 2006.

FRIEDEWALD, W.T., LEVY, R.I. and FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

JACKSON, A.S., M.L. POLLOCK, A. WARD. Generalized equations for predicting body density of women. **Medicine Sciences of Sports and Exercises**, v. 12, n. 3, p. 175-181, 1980.

LIQUN WANG, B.M. Application of multivariate data-analysis techniques to biomedical diagnostics based on mid-infrared spectroscopy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 5, p. 1641-1654, 2008.

MAHMOUD, S.S. The impact of elevated blood glycemic level of patients with type 2 diabetes mellitus on the erythrocyte membrane: FTIR study. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 58, n. 1, p. 45-51, 2010.

NUNES R.R.; CLEMENTE, E.L.S.; PANDINI, J.A.; COBAS, R.A.; DIAS, V.M.; SPERANDEI, S.; GOMES, M.B. Reliability of the classification of nutritional status obtained through the BMI and three different methods of body fat percentage in patients with type 1 *diabetes mellitus*. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 53, n. 3, p. 360-367, 2009.

WILD, S.; ROGLIC G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-53, 2004.

Valeriano Antonio Corbellini

Rua Gaspar Silveira Martins, 2533, Apto 203, CEP 96810-099, Bairro: Centro, Santa Cruz do Sul, RS.