



# Análise de correlação do perfil lipídico e dano oxidativo em pacientes diabéticos

Michele Maria Giacomini<sup>1</sup>; Siomara Hahn<sup>2</sup>; Luciano de Oliveira Siqueira<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>Farmacêutica, Pesquisadora do Hospital da Cidade de Passo Fundo.

<sup>2</sup>Mestre, Farmacêutica Professora do curso de Farmácia da Universidade de Passo Fundo, UPF.

<sup>3</sup>Doutor, Professor do curso de Farmácia da Universidade de Passo Fundo, UPF.

## RESUMO

**O diabetes mellitus (DM) é uma doença multifatorial que acomete diversos sistemas corporais com complicações teciduais e vasculares. Diversas hipóteses bioquímicas estão implicadas na indução das complicações tardias da diabetes, como: radicais livres, rota dos polióis e glicação não enzimática de proteínas. O objetivo do presente estudo foi correlacionar o perfil lipídico e lipoperoxidação em indivíduos diabéticos. Realizou-se uma análise do perfil lipídico de 30 pacientes diabéticos do tipo 2, com uma média de 4 anos da evolução da doença. Analisou-se a concentração sanguínea de glicose, colesterol total, HDLc, LDLc, VLDLc, triglicerídeos, hemoglobina glicada e peroxidação lipídica (TBARS). Encontrou-se uma forte correlação entre a concentração de triglicerídeos, colesterol total e VLDLc com o dano oxidativo e uma fraca correlação com colesterol LDLc e HDLc. A análise dos resultados mostra uma forte correlação da lipoperoxidação lipídica com o perfil lipídico dos pacientes que pode reafirmar a necessidade de monitoramento dos lipídios plasmáticos como forma de prevenir complicações tardias inerentes ao diabetes.**

**Palavras-chave:** Colesterol. Radicais livres. Hemoglobina glicada. Peróxidos lipídicos. Lipídeos. Diabetes mellitus.

## INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* (DM) é um distúrbio metabólico que, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), atinge doze milhões de brasileiros, o que coloca o país em sexto lugar no mundo em casos da doença e a sétima causa de morte no país. Destes cinco milhões de pacientes, quase metade das pessoas não sabem que são portadoras. No ano de 1998, aproximadamente 27.000 pessoas morreram no Brasil devido a complicações do diabetes, (WHO, 1999).

O *diabetes mellitus* é uma doença crônica, envolvendo o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Definido como uma síndrome multifatorial,

decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos, causando hiperglicemia crônica tanto no jejum quanto no período pós-prandial, normalmente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial (SBD, 2003). A evolução clínica do diabetes é caracterizada, em indivíduos mal controlados, por complicações tardias sendo as mais características: retinopatia, nefropatia e neuropatia (Silva et al., 2011).

A hiperglicemia ativa a via dos polióis, a qual eleva a produção do sorbitol. Esse aumento ocasiona um desequilíbrio da homeostase celular que leva à diminuição das defesas antioxidantes intracelulares. Além da hiperatividade da rota dos polióis, a hiperglicemia pode ocasionar um aumento na concentração dos produtos da glicação avançada (AGEs), alterando assim a função celular (Calles-Escandon & Cippola, 2001). A glicação de proteínas culmina com liberação de vários fatores de inflamação (citocinas), culminando no estresse oxidativo (radicais oxidantes) e diminuição do metabolismo de substratos, com redução de Adenosina Trifosfato (ATP), causando degenerações e disfunções vasculares (Sartori, 2006).

Radical livre é qualquer espécie química capaz de existir independentemente, que contém um ou mais elétrons não pareados ocupando orbitais atômicos ou moleculares. Em geral são instáveis e reagem com diversos compostos e estruturas celulares (Mafrá et al., 1999). Os radicais livres são produzidos naturalmente em nosso organismo, através de processos metabólicos oxidativos (Sheneider, 2002).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. No entanto, seu excesso apresenta efeitos nocivos, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNAs (Barreiros & Davi, 2006).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. ERO e ERN têm importante função biológica, como controle da pressão sanguínea, na sinalização celular, na apoptose e na fagocitose de agentes patogênicos (fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor). Por outro lado,

quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio (Vasconcelos et al., 2007).

Pode-se dizer que um organismo encontra-se sob estresse oxidativo quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, de maneira que, os primeiros sejam predominantes. Um dos principais mecanismos de lesão é a lipoperoxidação, ou seja, a oxidação da camada lipídica da membrana (Shneider, 2002).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da lipoperoxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (Mello Filho et al., 1984). O malondialdeído (MDA) é um produto final da peroxidação lipídica, o qual reage com o ácido tiobarbitúrico (Ayoub & Yousuf, 2000; Esterbauer & Cheesman, 1991). O aumento de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico é uma evidência indireta da intensa produção de radicais livres (Silva et al., 2011).

Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças degenerativas tais como a cardiopatia isquêmica. (ADA, 2000; ADA, 2004).

As complicações crônicas do diabete e os radicais livres podem estar envolvidos na patogênese desta alteração metabólica. Durante a hiperglicemia, ocorre um aumento da produção de radicais livres de oxigênio através da auto-oxidação da glicose, esses radicais exercem seus efeitos citotóxicos nos fosfolípidios de membrana, resultando na formação de MDA (Kakkar et al., 1999; Mafra et al., 1999, Silva et al., 2011).

Partindo destes achados, propusemos avaliar a eventual correlação entre o perfil lipídico e o dano oxidativo em pacientes diabéticos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Delineamento

O presente trabalho é um estudo transversal do perfil lipídico de pacientes diabéticos do tipo II e sua correlação com a lipoperoxidação induzida por radicais livres.

### Casuística

Foram incluídos, aleatoriamente, 30 indivíduos diabéticos do tipo 2 de ambos os sexos, com no mínimo 4 anos de evolução da doença, participantes do clube dos diabéticos e cadastrados no ambulatório da Faculdade de Medicina da UPF, com média de idade de  $61 \pm 7$  anos (média  $\pm$  desvio padrão). Todos os voluntários no estudo estavam em jejum de 12 horas para a coleta de sangue.

### Logística

A primeira etapa incluiu o preenchimento de um formulário contendo identificação dos pacientes. Foi reservada uma sala de coleta no ambulatório da Faculdade de Medicina onde foram coletadas assepticamente, entre 7h e 9h da manhã, amostras de 10mL de sangue venoso

mediante punção na fossa antecubital, após um período de 12h em jejum. Uma alíquota de 2ml de sangue foi obtida com EDTA 2mg/dL para determinação de hemoglobina glicada e o restante do sangue centrifugado a 2000 RPM por 10 minutos. O soro foi extraído e acondicionado em frascos tipo Eppendorff para posteriores análises bioquímicas. A análise bioquímica constituiu da determinação de triglicerídeos (método Trinder - Labtest<sup>®</sup>), Colesterol total (método colesterol esterase - Labtest<sup>®</sup>), Colesterol HDLc (método de precipitação - Labtest<sup>®</sup>), VLDLc e LDLc (mediante equação de Friedwald), Glicose (método glicose-oxidase - Labtest<sup>®</sup>), Hemoglobina glicada (resina de troca iônica - KATAL<sup>®</sup>), conforme recomendações do fabricante do kit com a utilização de soro controle de qualidade. Após a execução técnica, as concentrações dos analitos foram determinadas em analisador bioquímico semi-automático TP Analyzer Plus – Thermoplate<sup>®</sup>.

A peroxidação lipídica foi aferida através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Esterbauer & Cheesman (1991). Foram misturados 300 $\mu$ L de soro com 600  $\mu$ L de ácido tricloroacético 15% e 500  $\mu$ L de ácido tiobarbitúrico 0,67% (Sigma, St. Louis, MO), e, em seguida, incubados em banho de água fervente por 20 minutos. As absorbâncias foram determinadas em 535nm no analisador bioquímico semi-automático TP Analyzer Plus – Thermoplate<sup>®</sup>, usando 1, 1, 3,3-tetrametoxipropano (Sigma, St. Louis, MO) como padrão externo. Os resultados foram expressos em equivalentes de malondialdeído (nmol) por miligrama de proteína.

### Aspectos éticos

Em atendimento aos aspectos éticos legais de pesquisa envolvendo seres humanos, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em pesquisa (CEP) da Universidade de Passo Fundo sendo aprovado sob n° de registro: 0099.0.398.000-11.

### Análise Estatística

Os dados foram testados quanto sua normalidade, mediante análise de Kolmogorof-Smirnoff. A seguir, os resultados foram compilados pela análise estatística descritiva. Para análise de correlação entre os parâmetros foi utilizado o teste de correlação de Spearman para dados não-paramétricos ou de Pearson para os paramétricos, no pacote estatístico do SPSS 13.0 considerando  $p < 0,05$  como nível mínimo de significância. Foi considerada correlação positiva forte valores entre 0,70 a 1, moderada 0,3 a 0,7 e fraca 0 a 0,3, e correlação negativa forte valores entre - 0,70 a - 1, moderada - 0,3 a - 0,7 e fraca 0 a - 0,3.

## RESULTADOS

Os pacientes fazem parte de um grupo de apoio da Universidade de Passo Fundo que são acompanhados sistematicamente. O reflexo da assistência multiprofissional se refletiu num perfil lipídico e glicêmico satisfatório (Figura 1) para um grupo de diabéticos, caracterizando a eficácia da atenção primária.

A amostra de diabéticos analisada não apresentou hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia que, habitualmente, caracteriza as complicações inerentes à dislipidemia diabética apresentando valores médios de  $141 \pm 48 \text{ mg/dL}$  para colesterol e  $137 \pm 63 \text{ mg/dL}$  para triglicerídeos. Em adição, foi demonstrado uma concentração de LDLc média inferior a  $100 \text{ mg/dL}$  ( $79 \pm 47$ ), sendo considerado baixo risco de doença cardiovascular. No entanto, os resultados também apontam uma baixa concentração de colesterol HDLc  $37 \pm 9 \text{ mg/dL}$ , uma característica típica de pacientes diabéticos crônicos, que pode ser considerado risco moderado para doença cardiovascular.

O termo “hemoglobina glicada” corresponde a uma reação entre a hemoglobina A (HbA) e alguns açúcares. O termo “hemoglobina glicosilada” tem sido erroneamente utilizado como sinônimo de A1C. O processo de “glicação” de proteínas envolve uma ligação não enzimática e permanente com açúcares redutores como a glicose e como descrito por Louis-Camille Maillard (Reação de Maillard) em 1912, por outro lado, o processo de “glicosilação”, envolve uma ligação enzimática e instável (Netto et al., 2009)

A análise da hemoglobina glicada mostrou uma concentração média de aproximadamente  $8,1 \pm 1,8\%$ , o que reflete com controle glicêmico de médio/longo prazo razoável conforme o *guidelines* da *American Diabete Association* que recomenda um valor inferior a 7%.

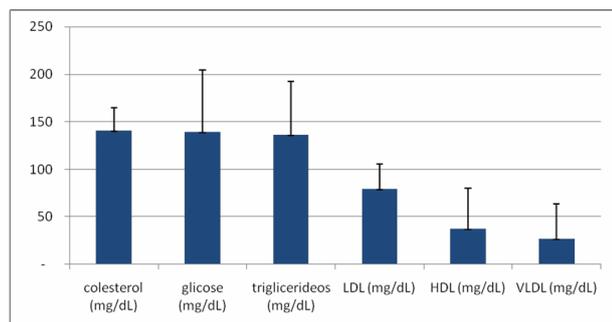


FIGURA 1: Análise do perfil lipídico e glicêmico dos 30 pacientes diabéticos em jejum de 12 horas. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão.

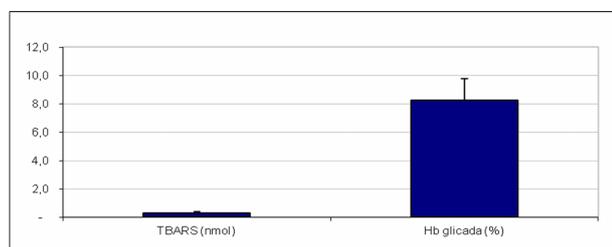


FIGURA 2: Análise da concentração de hemoglobina glicada e da concentração de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico como medida de lipoperoxidação (TBARS). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão.

A análise de Spearman para dados não-paramétricos ou de Pearson para os paramétricos, aponta uma correlação positiva entre a colesterolemia, trigliceridemia, glicemia e hemoglobina glicada com a indução da lipoperoxidação.

Justifica-se pelo fato de que um perfil lipídico desfavorável aumenta a predisposição de dano oxidativo, via radicais livre promovida pelo metabolismo dos carboidratos, condição típica dos diabéticos provocada pelo desequilíbrio redox e rota dos polióis. Por outro lado, a concentração de HDLc e LDLc apresenta uma fraca correlação com a indução de peroxidação lipídica destacada anteriormente.

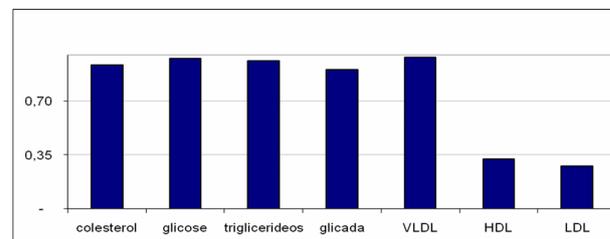


FIGURA 3: Análise de correlação do perfil lipídico com a lipoperoxidação mediada por TBARS. 0,70 para mais indica forte relação, 0,35 a 0,70 indica relação moderada, 0 a 0,35 fraca correlação.

#### 4 DISCUSSÃO

Na figura 1, a análise dos resultados dos pacientes diabéticos mostra uma hiperglicemia leve, relativamente adequada para a primeira amostra da manhã. As concentrações de triglicerídeos, colesterol total, LDLc, VLDLc mantiveram-se dentro de limites satisfatórios. Considerando que o grupo avaliado faz parte de um projeto assistencial de acompanhamento permanente de uma equipe multiprofissional, os resultados aqui elencados permitem afirmar que o acompanhamento sistemático associado a uma dieta balanceada e terapêutica apropriada, permitiu o controle da dislipidemia, que é uma condição clínica que geralmente acompanha o portador de diabete (ADA, 2004; SBC, 2007; SBD, 2009).

O HDLc contribui para a proteção do leito vascular contra a aterogênese, além de remover lipídios oxidados da LDLc, inibir a fixação de moléculas de adesão e monócitos ao endotélio e estimular a liberação de óxido nítrico. Funções estas que podem estar comprometidas quando os valores de HDLc estão baixos (SBC, 2007). A hiperglicemia está associada a uma maior incidência nas taxas de morbidade e mortalidade (Sinzato et al., 2009). O grande número de óbitos decorrentes desta patologia estão associadas com as suas complicações, principalmente as cardiovasculares e e cerebrovasculares. Estas seqüelas tardias do diabete estão relacionadas ao estresse oxidativo (SBD, 2006).

Na figura 2, os valores de hemoglobina glicada também estão acima do esperado para paciente diabéticos com glicemia controlada. O nível de hemoglobina glicada reflete a glicemia média de um indivíduo durante os dois ou três meses que antecipam a realização do teste e tem grande eficácia na avaliação do nível do controle glicêmico. Níveis de hemoglobina glicada acima de 7% estão associadas ao risco maior de complicações crônicas. Acima de 7% o risco de retinopatia, nefropatia, neuropatia e microalbuminúria começa efetivamente a apresentar progressão significativa (SBD, 2006).

Todas as modificações oxidativas podem causar mudanças nas propriedades físicas e químicas das

membranas das células e das organelas, com consequente dano celular. Reações envolvendo os vários intermediários levam a novos produtos, como por exemplo o malondialdeído (MDA) que, entre outras reações, reagem com o ácido tiobarbitúrico e por essa razão pode ser utilizado como indicador de dano lipídico via radicais livres no organismo. O MDA possui ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo (Vasconcelos et al., 2007; Ayoub & Yousif, 2000; Antunes et al., 2008).

A figura 3 mostra a correlação do perfil lipídico com lipoperoxidação medida por TBARS. A análise de correlação de Spearman para dados não-paramétricos evidenciou forte correlação ( $>0,70$ ) entre colesterol, glicose, triglicerídeos, hemoglobina glicada, VLDLc e lipoperoxidação. Por outro lado, evidenciou uma fraca correlação ( $<0,35$ ) entre a lipoperoxidação quando relacionada com HDLc e LDLc. Dados na literatura descrevem que há um aumento da peroxidação lipídica em macrófagos e em lipoproteínas na presença de hiperglicemia e hipertriglicemia (Griendling & Alexander, 1997), corroborando os dados encontrados no presente estudo.

A concentração de TBARS da amostra analisada encontra-se dentro dos limites de referência preconizados na literatura [1 a 3  $\mu\text{M}$  conforme Vasconcelos et al. (2007) ou de 3 a 12  $\text{nmol/L}$  conforme Montano Et al. (2003)]. No entanto, o conceito de valores de referência para lipoperoxidação deve ser analisado com cautela, pois humanos estão sujeitos a diferentes níveis de exposição oxidativa e da metodologia aplicada (colorimetria, fluorimetria, cromatografia, ELISA e outros). Além disso, tratado de um dano, parte-se do princípio que a lipoperoxidação é um processo inexorável, mas ao mesmo tempo indesejável para o organismo. Desta forma, quanto menor for sua concentração, menor é o risco de suas complicações, similarmente ao que acontece com a gordura trans nos alimentos (WHO, 2003).

Ainda assim, a análise de correlação de Spearman entre a lipoperoxidação e o perfil lipídico aponta uma forte correlação entre um perfil lipídico desfavorável e uma maior indução de dano lipídico, mesmo com os valores de referência dentro dos limites de normalidade.

A análise dos resultados permite concluir que há uma forte correlação entre a concentração de colesterol, glicose, triglicerídeos, hemoglobina glicada e VLDLc com os níveis de radicais livres, combinada a uma baixa correlação dos resultados de HDLc e LDLc com a medida de TBARS. Esta correlação positiva permite supor que a hiperglicemia e a hiperlipidemia estão diretamente relacionadas com a produção de radicais livres e o consequente estresse oxidativo. Possivelmente, o estresse oxidativo que está correlacionado com os níveis de glicose e uma parte dos lipídeos possa contribuir para o aumento do risco de doenças cardiovasculares encontradas nos pacientes diabéticos do tipo 2.

## ABSTRACT

*Correlation analysis of the lipid profile and oxidative damage in diabetic patients*

**Diabete mellitus (DM) is a multifactorial disease that affects several body systems, with vascular**

**complications and tissue damage. Several biochemical mechanisms are hypothetically implicated in the induction of the late complications of diabete, such as the action of free radicals, glucose metabolism by the polyol pathway and non-enzymatic glycation of proteins. The aim of this study was to correlate the lipid profile and lipid peroxidation in diabetic subjects. An analysis of the lipid profile of 30 diabetic patients, with an average of 4 years since diagnosis. We analyzed the concentration of glucose, total cholesterol, HDLc, LDLc, VLDLc, triglycerides, glycated hemoglobin and lipid peroxidation (TBARS). Oxidative damage (TBARS) showed a strong correlation with the concentration of triglycerides, total cholesterol and VLDLc, and a weak correlation with LDLc cholesterol and HDLc. The strong correlation found between lipid peroxidation and the lipid profile of these patients reinforces the need to monitor plasma lipids in order to prevent late complications associated with diabete.**

*Keywords:* Cholesterol. Free radicals. Glycosylated hemoglobin A. Lipid peroxides. Lipids. Diabete mellitus

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Diabete Association - ADA. Type 2 diabete in children and adolescents. *Diab Care*. 2000;23(3):381-89.

American Diabete Association - ADA. Dyslipidemia management in adults with diabete. *Diab Care*. 2004;27(1):s68-s71.

Antunes M V, Lazzaretti CA, Gamargo GD, Linden RL. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4 dinitrofenilhidrazina. *Rev Bras Cienc Farm*. 2008;44(2):279-87.

Ayoub RS, Yousif WH. Serum glucose, cholesterol and total lipids level and tissue peroxidation in aloxan-diabetic rats treated with aqueous extract of nigella sativa seed. *Iraqi J Vet Sci*. 2000;13(1):43-9.

Barreiros ALBS, Davi JM. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Bahia, Quím Nova*. 2006;29(1):113-23.

Calles-Escandon J, Cippolla M. Diabete and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr Rev*. 2001;22(1):36-52.

Esterbauer H, Cheesman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: MDA and hydroxymononal. 1991. Vol. 186. pp. 407-21. In: Parcker L, Glazer A (editors). *Methods of Enzymology*. New York: Academic Press; 1991.

Griendling KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation*. 1997;96(10):3264-5.

Kakkar R, Karl J, Mantha SV, Prasad K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetics rats. *Molec cell biochem*. 1999;151(10):1300-304.

- Mafrá D, Abdalla DSP, Cozzolino SMF. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. *Rev Nutr.* 1999;12(3):205-12.
- Mello Filho AC, Hoffmann EM, Meneghini R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem.* 1984;218(1):273-75.
- Montano MAE, Soares DG, Salvado M. Avaliação do estresse oxidativo e contaminação por chumbo em praticantes de tiro esportivo. *Acta Sci Health Sci.* 2003;25(1):63-73.
- Netto A, Andriolo A, Filho FF, Tambascia M, Gomes MB, Melo M, Sumita NM, Lyra R, Cavalcanti S. Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA1C) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabete: aspectos clínicos e laboratoriais. *J Bras Patol Med Lab.* 2009;45(1):31-48.
- Sartori MS. Contribuição da glicemia pós-dejejum para o controle glicêmico do paciente com diabete mellito tipo 2. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;5(2):53-9.
- Shneider CD. Avaliação do estresse oxidativo em indivíduos submetidos a diferentes intensidades de exercício em esteira rolante. [Dissertação]. Porto Alegre: Escola de Educação Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2002.
- Silva M, De Lima WG, Silva ME, Pedrosa ML. Efeitos da estreptozotocina sobre os perfis glicêmicos e lipídico e o estresse oxidativo em hamster. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2011;55(1):46-51.
- Sinzato YK, Lima PHO, Campos KE, Kiss ACI, Rudge MC, Damasceno DC. Neonatally-induced: Lipid profile putcomes ad oxidative stress status in adult rats. *Rev Assoc Med Bras.* 2009;55(4):384-8.
- Sociedade Brasileira de Cardiologia – SBC. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Arteriosclerose Departamento de Arteriosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Card.* 2007;88(Supl. 1):2-19.
- Sociedade Brasileira de Diabete. Consenso Brasileiro sobre diabete. Diagnóstico e classificação do diabete *mellito* e tratamento do diabete *mellito* tipo 2. Rio de Janeiro: Ed Diagraphic; 2003.
- Sociedade Brasileira de Diabete – SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabete 2009 [Internet]. 3ª ed. São Paulo: Sociedade brasileira de diabete; 2009 [citado 2012]. Disponível em: [http://www.diabete.org.br/attachments/diretrizes09\\_final.pdf](http://www.diabete.org.br/attachments/diretrizes09_final.pdf)
- Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Benfato MS, Manfredini V, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. *Quím nova.* 2007;33(5):1323-38.
- World Health Organization - WHO. Definition, Diagnosis and Classification of Diabete Mellitus and its Complications. Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabete Mellitus. Geneva: WHO; 1999.
- World Health Organization – WHO. Diet, Nutrition and Prevention of Chronic Diseases. WHO technical Report Series 916. Geneva: WHO; 2003.

Recebido em 02 de maio de 2012

Aceito para publicação em 27 de junho de 2012

