

FABIO BERNARDI DALPINO

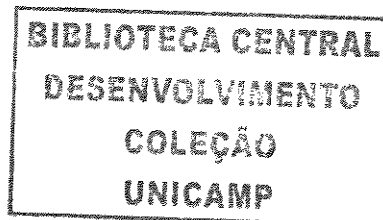
Este exemplar corresponde à versão final da
Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Ciências Médicas da
Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP,
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas, área de Patologia Clínica do(a)
aluno(a) **FABIO BERNARDI DALPINO**.
Campinas, 30 de novembro de 2005.

Prof(a). Dr(a). Eliana Cotta de Faria
Orientador(a) 

**CARACTERIZAÇÃO E RITMOS BIOLÓGICOS DE
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS EM UMA
POPULAÇÃO BRASILEIRA**

CAMPINAS

2005



FABIO BERNARDI DALPINO

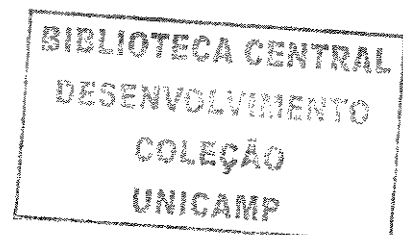
**CARACTERIZAÇÃO E RITMOS BIOLÓGICOS DE
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS EM UMA
POPULAÇÃO BRASILEIRA**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas, área de Patologia Clínica*

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria

CAMPINAS

2005



UNIDADE BC
 # UNIDADE UNICAMP
D169c

EX 67796
 OMBO BC/ 16.123.06
 ROC. 16.123.06
 C ☐ D ☒
 REÇO 11.00
 ATA 29.13/06

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

id. 376629

D169c

Dalpino, Fabio Bernardi

Caracterização e ritmos biológicos de parâmetros bioquímicos séricos em uma população brasileira. / Fabio Bernardi Dalpino. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : Eliana Cotta de Faria

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Variações sazonais 2. Lipídios. 3. Hiperlipidemia. 4. Lipoproteínas. 5. Cálcio. 6. Creatinina. I. Faria, Eliana Cotta de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(slp/fcm)

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Eliana Cotta de Faria

Membros:

- 1. Prof(a). Dr(a). Nelson Marques**
- 2. Prof(a). Dr(a). Adagmar Andriolo**
- 3. Prof(a). Dr(a). Hildete Prisco Pinheiro**
- 4. Prof(a). Dr(a). Gilberto Da Assunção Fernandes**
- 5. Prof(a). Dr(a). Eliana Cotta de Faria**

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/11/2005 ✓

A

Dirceu e Vera, meus queridos pais

Patrícia, minha grande irmã

Gisele, minha amada esposa

Gabriela, minha filha maravilhosa

muito obrigado pelo apoio e compreensão.

A vocês dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Especialmente à Professora Doutora Eliana Cotta de Faria, minha orientadora, pela oportunidade a mim oferecida e pela atenção e dedicação durante a elaboração deste trabalho, sendo de fundamental importância para a sua realização.

Ao Professor Doutor Luiz Menna-Barreto, um grande colaborador, pelo valioso auxílio desde o início dos trabalhos, contribuindo para esta tese com todo o seu conhecimento na área.

AGRADECIMENTOS

Dr. Fábio Sodré – Médico Patologista Clínico

Dra. Raquel T. Takata – Médica Pediatra

Dra. Vera S. Castanho - Universidade Estadual de Campinas

Helymar Machado - Universidade Estadual de Campinas

Lúcia Parentoni – Médica Patologista Clínica

Marcelo S. Soares – Biólogo – estagiário na Seção de Bioquímica Clínica

Márcia Santinon - Universidade Estadual de Campinas

Mirian Danelon - Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Helena C. F. Oliveira – Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Lúcia Castilho - Universidade Estadual de Campinas

“O próprio objetivo da vida é perseguir a felicidade”

DALAI LAMA

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>xxiii</i>
ABSTRACT	<i>xxvii</i>
1- INTRODUÇÃO	31
2- OBJETIVOS	45
3- MATERIAIS E MÉTODOS	49
4- RESULTADOS	57
5- DISCUSSÃO GERAL	133
6- CONCLUSÃO GERAL	145
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Amplitude
C	Colesterol
CAD	Coronary artery disease
IIIDBSD	III Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias
DAC	Doença arterial coronariana
HDL-C	Lipoproteína de alta densidade
IAM	Infarto agudo do miocárdio
LDL-C	Lipoproteína de baixa densidade
Lp(a)	Lipoproteína(a)
M	MESOR
mg/dL	miligrama/decilitro
NCEP	National Cholesterol Education Program
NSQs	Núcleos supraquiasmáticos
PHI (ϕ)	Acrofase
PTH	Paratormônio
SAS	Statistical Analysis System
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SUS	Sistema Único de Saúde
TAU	Período
TFG	Taxa de filtração glomerular
TG	Triglicérides
TRC	Transporte reverso do colesterol
TRH	Trato retino-hipotalâmico
VLDL-C	Lipoproteína de densidade muito baixa
V.R.	Valor de referência

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- Componentes da variação pré-analítica.....	34
Tabela 2- Período médio dos ritmos biológicos descritos.....	36
Tabela 3- Data de início e término das estações do ano, segundo o Departamento de Astronomia da Universidade de São Paulo – USP.....	54

	<i>PÁG.</i>
Figura 1- Desenho esquemático mostrando a posição dos NSQs no sistema nervoso central humano.....	37
Figura 2- Representação gráfica de uma série temporal hipotética de dados e da correspondente curva cosseno ajustada pelo método Cosinor.....	55

RESUMO

As análises laboratoriais estão sujeitas a diversos interferentes e, mesmo em indivíduos saudáveis, sofrem variações decorrentes de fatores biológicos e/ou laboratoriais, que podem gerar equívocos na interpretação dos resultados de exames. Com o aperfeiçoamento dos equipamentos e da implantação de rígidos sistemas de controle de qualidade, ocorreu uma sensível diminuição da variabilidade analítica e pós-analítica nos exames dos laboratórios clínicos. Conseqüentemente, o enfoque atual está na busca da origem das variações pré-analíticas. Um componente biológico muito estudado é o intra-individual, que é inerente ao próprio indivíduo e modifica-se ao longo do tempo.

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a ocorrência de ritmos biológicos em analitos bioquímicos séricos (correlacionando-os com a frequência de doenças) e analisar a prevalência de dislipidemias, assim como a regulação sérica da lipoproteína(a), numa população brasileira.

Para tal foram realizados quatro estudos retrospectivos e um prospectivo de avaliação dos resultados de diversos exames laboratoriais de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Unicamp, no período de 1996 a 2003. Os parâmetros analisados foram: ácido úrico, cálcio, colesterol, creatinina, fósforo, HDL-colesterol, LDL-colesterol, lipoproteína(a), triglicérides e uréia.

Análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SAS e SPSS para análises descritivas e comparativas. Para a análise temporal foi utilizado o método Cosinor.

Os valores encontrados para colesterol, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicérides e Lp(a) estão fora dos recomendados pelo NCEP e adotados pela IIIDBSD em uma grande parcela da população estudada.

Foram detectados ritmos sazonais nas determinações séricas de colesterol, HDL-colesterol, LDL-colesterol, cálcio e creatinina. Além disso, os ritmos encontrados para colesterol e LDL-colesterol se associaram a uma maior frequência de manifestações clínicas da aterosclerose na região estudada.

Conclui-se que os valores observados para colesterol, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicérides e Lp(a), tanto em adultos como crianças e adolescentes, indicam a alta prevalência de dislipidemias nesta região.

Os bioritmos de colesterol, HDL-colesterol, LDL-colesterol, cálcio e creatinina devem ser valorizados como uma importante causa de variação pré-analítica no laboratório clínico e pelo fato dos ritmos dos lípides e lipoproteínas se associarem ao ritmo de prevalência de aterosclerose na região. Estes resultados resgatam a importância dos “relógios biológicos” na prática médica.

ABSTRACT

Laboratory exams are subject to several interfering aspects and even healthy individuals may present variations, stemming from biological and/or laboratory factors, and generating problems in the outcome interpretation of exams. As a consequence of laboratory technological improvement, information technology and strict quality control systems, a marked decrease in analytical and post-analytical variability has taken place in clinical laboratories today. Accordingly, studies have preferably focused on the origin of pre-analytical errors. Among the biological components currently being investigated there is the intra-individual, which is inherent to the individual and changes over time.

The objective of this work was to evaluate the occurrence of biological rhythms in several biochemical serum parameters (correlating with atheroscleroses) and to measure the prevalence of dyslipidemia, as well as the modulation of serum lipoprotein(a), in a Brazilian population.

For such four retrospective studies and a prospective one the results of several biochemical serum parameters of individuals registered at a referral University Hospital in Campinas - Unicamp, during the years of 1996 to 2003 were evaluated. The analyzed parameters were: uric acid, calcium, cholesterol, creatinine, phosphorus, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, lipoprotein(a), triglycerides and urea.

Statistical analyses were carried out by the SAS or SPSS programs for descriptive and comparative analyses. Temporal analyses were carried out using the Cosinor method.

The values found for cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides and Lp(a) are out of the recommended ranges by NCEP and adopted by IIIDBSD in a great portion of the studied population.

Seasonal rhythms was observed in serum cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, calcium and creatinine. The correlation between the rhythms of cholesterol and LDL-cholesterol and the prevalence of manifestations of atherosclerosis strongly suggest their impact of seasonality on coronary artery disease.

In conclusion, the serum concentrations of cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides and Lp(a), so much in adults as children and adolescents, indicated the high

prevalence of dyslipidemia in this area. The sazoonality observed for cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, calcium and creatinine should be considered a significant cause of pre-analytical variation in these laboratory tests and also the rhythms of lipids and lipoproteins are associated with atherosclerosis rhythmicity in the studied area. These results emphasize the importance of “biological clocks” in medical practice.

1- INTRODUÇÃO

Ritmos biológicos

As análises laboratoriais estão sujeitas a diversos interferentes e, mesmo em indivíduos saudáveis, sofrem variações decorrentes de fatores biológicos e/ou laboratoriais, que podem gerar equívocos de interpretação dos resultados.

Convencionalmente, estes fatores têm sido divididos em pré-analíticos, os quais ocorrem antes e durante a coleta, analíticos, referentes à manipulação, processamento e análise das amostras, e pós-analíticos, que compreendem a transcrição e a liberação dos resultados³⁸.

Variáveis pré-analíticas de caráter biológico como intra-individuais (cronotipos), idade, sexo e raça são amplamente conhecidas e geram intervalos de referência próprios para diversos analitos, predeterminados em estudos populacionais onde se adotam como valores de referência o intervalo interpercentil de 2,5 e 97,5^{71,82}.

Porém outras fontes de variação pré-analítica são pouco lembradas, mas não menos importantes, como aquelas com componentes intra-individuais, ambientais (alimentação, tabagismo, atividade física, estresse), clínicos (uso de medicação) e relacionadas à coleta (jejum, postura, hemólise, demora no transporte e armazenamento)^{34,71}. Observamos abaixo os componentes desta variação (Tabela 1):

Tabela 1- Componentes da variação pré-analítica*

<u>Biológicos</u>	
Intra-individuais / Cronotipos	Sexo
Idade	Raça
<u>Comportamentais</u>	
Dieta	Obesidade
Etilismo	Tabagismo
Estresse	Exercícios físicos
<u>Clínicos</u>	
<i><u>Induzidos por doenças **</u></i>	
Diabetes Mellitus	Hipotireoidismo
Síndrome. Nefrótica	Infarto Agudo do Miocárdio
<i><u>Induzidos por drogas **</u></i>	
Antihipertensivos	Imunossupressores
<u>Laboratoriais</u>	
Coleta	Anticoagulantes
Transporte	Armazenamento

* Tabela extraída do Handbook of Lipoprotein Testing ⁷¹; ** Lista limitada.

A variabilidade analítica informa sobre a precisão e exatidão dos métodos utilizados e quanto mais preciso e exato o método, mais próximos da realidade encontram-se os resultados obtidos ⁴⁶. Ela também sofre influência da qualidade da água e dos reagentes utilizados, dos equipamentos que devem estar devidamente calibrados e das variações próprias de cada ensaio ^{34,82}.

Os problemas pós-analíticos ocorrem na transcrição, digitação, conferência e/ou liberação de um resultado e são mais frequentes quanto menor a informatização do laboratório ³⁴.

Com o aperfeiçoamento dos equipamentos e dos métodos utilizados, dos sistemas de coleta a vácuo, da informatização e interfaceamento do laboratório e da implantação de rígidos sistemas de controle de qualidade, ocorreu uma sensível diminuição da variabilidade analítica e pós-analítica nas análises em laboratórios clínicos ⁷¹.

Conseqüentemente, o enfoque atual está na busca da origem das variações pré-analíticas, as quais são responsáveis por uma porcentagem maior de variação se comparadas com as analíticas ^{33,86}. Um componente biológico muito estudado é o intra-individual, que é inerente ao próprio indivíduo e modifica-se ao longo do tempo.

Em 1950, RJ WILLIAMS já enfatizava a importância da variabilidade biológica influenciando a concentração de diferentes constituintes do sangue de indivíduos saudáveis e em 1960, GZ WILLIAM declarava que o ideal seria interpretar os resultados de um paciente comparando-os com os seus anteriores enquanto estava saudável ³⁸.

Uma exploração mais refinada da origem desta variação tem se tornado necessária. Isto só foi possível com o desenvolvimento de novas tecnologias e a diminuição relativa do custo para a realização destes estudos ³³.

Ao se estudar os efeitos dos fatores intra-individuais na variação pré-analítica utilizando-se procedimentos estatísticos, demonstrou-se a ritmicidade em alguns parâmetros*, com ciclos bem estabelecidos ⁵⁸.

Pode-se definir ritmo como sendo um processo que varia periodicamente no tempo, ou seja, a manifestação de um fenômeno que se repete com o mesmo período, sendo o período, então, o intervalo de tempo em que um ciclo se completa ⁵².

Em 1959, F HALBERG definiu os chamados ritmos circadianos (*circa*, próximo; *dies*, dia) referindo-se a todos os ritmos com correlatos geofísicos conhecidos, sendo o mais evidente o ciclo claro/escuro, cujo período varia de 20-28 horas ⁵².

* Segundo definição estatística, parâmetro é uma medida usada para descrever uma característica de determinada população, sendo via de regra, valor desconhecido que se deseja estimar, ou testar, a partir dos dados de uma amostra. Neste texto, foi utilizado como significado de exames laboratoriais.

Os ritmos não-circadianos podem ser divididos em ultradianos e infradianos ³². Observamos abaixo os ritmos descritos até então (Tabela 2):

Tabela 2- Período médio dos ritmos biológicos descritos*

Ritmo	Período
Ultradiano.....	≤ 20 horas
Circadiano.....	± 24 (20-28) horas
Infradiano.....	> 28 horas
Circaseptano.....	7 (4-10) dias
Circavigintano.....	21 (18-24) dias
Circatrigintano.....	30 (25-35) dias
Circanual (sazonal).....	12 (10-24) meses

* Tabela extraída do Clinical Aspects of Chronobiology ³².

A compreensão da importância da ritmicidade ocorreu com a demonstração desse fenômeno em praticamente todos os seres vivos e com as investigações sobre os prováveis mecanismos orgânicos responsáveis pelos processos de temporização, os chamados “relógios biológicos” ⁵².

Atualmente, acredita-se que os ritmos biológicos, pelo menos os circadianos, devam ter surgido ainda nos organismos procariotos e foram de fundamental importância na evolução das espécies, estando presentes do metabolismo celular até o comportamento de populações ⁴⁴.

O relógio biológico é a estrutura do sistema de temporização que tem a capacidade de gerar uma oscilação, ou seja, uma mudança de estado de uma variável, a qual é usada para medir a mudança no tempo ^{43,70}.

Nos mamíferos, os núcleos supraquiasmáticos (NSQs) do hipotálamo funcionam como osciladores circadianos, através dos quais o organismo é capaz de manter rítmicos os seus hábitos de vida e suas funções orgânicas, mesmo em condições ambientais constantes ^{35,50,52}. É o único núcleo identificado até o momento, porém provavelmente existem outros.

Através de vias eferentes dos NSQs, com conexões para a hipófise, tálamo e núcleos paraventriculares hipotalâmicos, os sistemas simpático e neurovegetativo são ativados; assim o sistema nervoso e endócrino adquirem um sinal rítmico que é distribuído para diferentes órgãos e sistemas, fazendo com que o organismo funcione de forma harmônica (Figura 1) ^{30,79}.

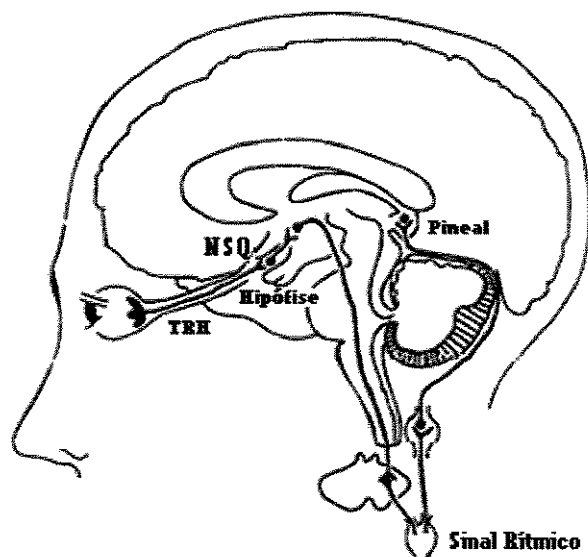


Figura 1- Desenho esquemático mostrando a posição dos NSQs no sistema nervoso central humano.

O trato retino-hipotalâmico (TRH) também auxilia no sistema de temporização, sincronizando, ou seja, ajustando os NSQs com o ciclo de luz ambiental ^{40,41}.

Muito estudada atualmente, a glândula pineal é também uma possível sincronizadora do sistema circadiano. Ela produz melatonina, liberada durante a noite e que parece atuar diretamente sobre os NSQs, funcionando como um sinalizador humoral para a avaliação do comprimento da noite ^{2,9,11}.

Com a variação do nível de melatonina, o sistema de temporização é capaz de determinar a duração do fotoperíodo, o qual indica a fase sazonal do ciclo ambiental já que existem períodos do ano com noites longas (inverno) e outros com noites curtas (verão) ^{1,65,88}.

O conceito da periodicidade anual em humanos não está tão claro como aqueles dos ritmos circadianos e a localização anatômica do seu oscilador ainda não foi identificada. Sabe-se, porém, que o ritmo circadiano é a base para a periodicidade anual ⁵².

Os NSQs influenciam a expressão do ritmo circanual modulando o seu período e a melatonina é o principal mediador da sua resposta fisiológica, mas ambos não constituem a origem de tal ciclo ^{48,89}.

Pode-se concluir com os estudos realizados até o momento, que o organismo tem ritmos, mantidos por uma ordem temporal interna geneticamente estabelecida, e sincronizados com variações periódicas ambientais ^{7,75}. Ou seja, existe uma expressão conjunta de fatores endógenos e exógenos, já que as flutuações de um sistema biológico expressam um processo de constante adaptação a um ambiente também essencialmente variável.

Poucos experimentos têm avaliado a variação sazonal de parâmetros bioquímicos analisados no laboratório clínico e que pode ter impacto numa decisão médica. É possível mudar os valores de referência (V.R.) atuais para os chamados *chronodesms*, que são V.R. cronobiologicamente qualificados ^{49,58}. Eles podem ser desenvolvidos para um indivíduo através de mensurações repetidas ao longo de um período, ou podem ser

determinados para grupos de sujeitos por mensurações de um parâmetro num período curto, porém de uma parcela representativa da população.

O estudo sistemático dos ritmos biológicos, como por exemplo as oscilações periódicas em variáveis mensuráveis, utiliza a cronobiologia, que promove os conceitos e as técnicas para a observação e quantificação desses eventos, considerando-se as atividades que precederam a determinação, como horas de sono, trabalho, alimentação e atividade física ³².

Para a análise de dados cronobiológicos é necessário ampliar o número de métodos utilizados, pois além dos mais comuns usados em estatística, passa-se a aplicar métodos de análise de séries temporais, que envolvem a análise descritiva e a detecção de periodicidade ⁵².

O conjunto de técnicas para a detecção de um ritmo biológico, que pode ser aplicado à análise temporais, difere quando o período é conhecido, teste “t” de Student, análise de variância, Cosinor e estatística circular, ou desconhecido, análise espectral e periodograma de Enright ⁵².

A título de exemplo, quando se supõe que os ritmos biológicos estão sincronizados com estações do ano (ciclos sazonais) pode-se utilizar o método Cosinor, que consiste em ajustar a uma série de n dados medidos ao longo do tempo, uma função estatística e assim analisar a presença ou não de ritmicidade ⁶³.

Utilizando-se essa metodologia foi possível observar que aproximadamente todos os parâmetros biológicos mensuráveis descritos na literatura são periódicos, incluindo dosagens bioquímicas séricas, entretanto diferindo quanto as características da variação 7,49,78,85.

A maioria das funções de interesse clínico, que tem um ritmo identificado, apresenta uma alta amplitude, o que facilita a sua identificação. Amplitude** é definida, segundo a cronobiologia, como a diferença entre o valor máximo (ou mínimo) e o médio da curva ajustada de um ritmo biológico ⁵².

** Segundo definição estatística, amplitude é a diferença entre o valor máximo e mínimo observado, também chamada de intervalo.

Porém, certos eletrólitos, metabólitos ou enzimas têm baixa amplitude, e apesar de representar mudanças rítmicas nas funções orgânicas e nos eventos metabólicos, dificilmente estas são identificadas ³².

Um outro problema no estudo dos analitos com baixa amplitude é a quantidade de dados requeridos para a obtenção de resultados quantitativos estatisticamente significantes, o que não ocorre com as variações rítmicas de grande amplitude, que podem ser detectadas em amostras individuais com determinações em tempo relativamente curto.

Lípides e lipoproteínas

A variação sazonal do perfil lipídico tem sido muito estudada, principalmente pelo fato das dislipidemias estarem associadas a um risco aumentado de doença arterial coronariana (DAC) ^{5,23,45,62,84}.

Estudos epidemiológicos vêm demonstrando uma redução nas taxas de morbimortalidade por DAC nos países desenvolvidos e também nos em desenvolvimento ^{10,51}. Apesar disso, a DAC ainda é a principal causa de morbimortalidade no Brasil ⁷⁶.

Em geral as suas manifestações clínicas iniciam-se na idade adulta, mas diversos estudos têm demonstrado que o processo aterosclerótico começa na camada íntima das artérias já na infância, de forma silenciosa, progredindo significativamente a partir da terceira década de vida ^{12,28,73}. Portanto, a análise do perfil lipídico sérico é indispensável no diagnóstico das dislipidemias e na prevenção de DAC ⁷⁷.

A principal função das lipoproteínas plasmáticas é a de transportar os triglicérides (TG) e colesterol (C) dos seus locais de origem no intestino e fígado para locais de armazenamento, estruturais e de utilização de energia ³⁴.

A lipoproteína de alta densidade (HDL-C) é cardioprotetora por suas ações antioxidante e antiinflamatória. Além disso, a HDL-C exerce propriedade antiaterogênica por meio do transporte reverso do colesterol (TRC), via metabólica que facilita o efluxo de

colesterol dos tecidos periféricos com subsequente excreção hepática ou excreção via lipoproteínas ricas em triglicérides^{34,36,82}.

A lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) está implicada diretamente no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas. A formação das células espumosas ocorre a partir de monócitos que penetram a camada íntima após lesão do endotélio e englobam lipoproteínas, predominantemente as LDL modificadas, iniciando assim um processo de caráter progressivo e imuno-inflamatório e que complica com a formação dos trombos e a sua ruptura^{36,82}.

A Lipoproteína(a) também está implicada neste processo devido ao seu depósito na camada sub-endotelial, sendo considerada um fator de risco independente para DAC^{13,66,82}.

Diversos trabalhos têm demonstrado uma elevação no colesterol e redução no HDL-C no período do inverno, não associados com mudança na dieta e atividade física, porém relacionados com aumento na morbidade/mortalidade por infarto do miocárdio^{5,16,84}. Alguns trabalhos não observaram esta ritmicidade^{22,60,75}.

Quanto ao LDL-C, nítidas elevações são observadas no inverno se comparado com o verão^{16,62,87}.

Os TG presentes principalmente nos quilomícrons e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL-C) e seus remanescentes são também de grande interesse na avaliação do metabolismo lipídico, pois estão implicados no risco de DAC^{34,82}. Sofrem grandes variações biológicas devido à dieta, atividade física e uso de bebidas alcoólicas²⁰.

Os TG séricos podem variar sazonalmente, sem relação com variações do colesterol, porém os estudos divergem sobre qual é a época do ano com níveis mais elevados^{16,22,62,87}.

Outros parâmetros bioquímicos

Além dos exames que compõem o perfil lipídico, outros parâmetros séricos bioquímicos são de fundamental importância na prática laboratorial diária e, portanto, devem ser considerados quando se estuda a causa de variação pré-analítica.

Os exames para avaliação da função renal como uréia e creatinina estão aumentados na medida em que diminui a taxa de filtração glomerular (TFG) ³⁴.

A uréia é um produto final do catabolismo de aminoácidos e proteínas, sendo gerada no fígado através do ciclo urêmico e excretada em sua maior parte pelos rins. Sofre influência da ingestão de proteínas na dieta e do grau de hidratação do organismo ³⁴.

A creatinina provém da conversão espontânea e irreversível de creatina livre presente nos músculos, sofrendo então mínima influência da dieta e mantendo níveis sanguíneos praticamente constantes. O seu clearance é usado como indicador da TFG ⁸².

Estes analitos são caracterizados por variações de baixa amplitude, que podem significar uma piora importante na função renal ^{20,34}.

Dá a importância de se levar em consideração uma possível variação sazonal na interpretação de um resultado aparentemente discordante com a clínica, como revelado por trabalhos na literatura ^{24,72}. Outros pesquisadores estudando estes mesmos parâmetros para avaliação da função renal não constataram sazonalidade ^{4,26,39,49,67,72}.

O ácido úrico, que é o principal produto do metabolismo final das purinas, as quais são derivadas do catabolismo dos ácidos nucleicos endógenos e da dieta, também tem a sua concentração sérica dependente da filtração glomerular e reabsorção/excreção tubulares ^{20,34,82}.

Encontra-se descrita na literatura a variação sazonal de ácido úrico com picos no verão e decréscimos no inverno, mas até o momento sem uma implicação clínica comprovada ^{49,67,69}. Outros trabalhos não conseguiram comprovar esta variação ^{4,72}.

O metabolismo ósseo pode ser analisado através das concentrações séricas de cálcio e fósforo, sendo especialmente importante na mulher menopausada para avaliação de osteoporose e em pacientes nefropatas e com neoplasias ósseas ²⁰.

O paratormônio (PTH) influencia a regulação desses analitos de diversas maneiras. Atua diretamente na matriz óssea alterando a atividade dos osteoblastos e indiretamente dos osteoclastos, aumentando a reabsorção óssea e conseqüentemente elevando as concentrações séricas de cálcio ⁸².

Nos rins, o PTH estimula a reabsorção de cálcio pelos túbulos distais, diminui a reabsorção de fósforo nos túbulos proximais e estimula a síntese de 1,25 diidroxivitamina D, hormônio que controla a absorção intestinal de cálcio e fósforo ⁸². A própria vitamina D, que adicionalmente às fontes dietéticas é sintetizada na pele por irradiação ultravioleta, também atua no metabolismo destes eletrólitos ³⁴.

Alguns trabalhos estudando essa vitamina, juntamente com cálcio e fósforo comprovaram a existência de um ciclo sazonal com provável origem endógena, tendo valores no verão significativamente maiores que no inverno ^{67,85}. Porém outros não demonstraram esta variação ^{17,31,49,67,72,75,87}.

A grande variabilidade nos trabalhos da literatura que mensuram ritmos nos parâmetros séricos bioquímicos pode ser em parte devido a diferenças populacionais e diferentes números de indivíduos entre os estudos.

2- OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram em amostra de população brasileira:

- Analisar a prevalência de dislipidemias em adultos, crianças e adolescentes;
- Caracterizar a modulação sérica da lipoproteína(a);
- Verificar a ocorrência de ritmos biológicos e de seus fatores reguladores em nove parâmetros séricos bioquímicos clínicos e associá-la à prevalência de doenças.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

Realizaram-se quatro estudos retrospectivos de avaliação dos resultados de diversos exames laboratoriais de pacientes atendidos num pólo de referência no atendimento médico-hospitalar no interior do Estado de São Paulo (Hospital das Clínicas – HC, Unicamp, Campinas, São Paulo), no período de 1996 a 2003. Realizou-se também um estudo prospectivo em 177 voluntários adultos, normolipidêmicos, no ano de 2004, atendidos no mesmo pólo de referência acima citado.

A população da cidade de Campinas é de aproximadamente 1 milhão de habitantes, composta por 62% de caucasianos, grande heterogeneidade sócio-cultural, com 4% de analfabetos e salário mensal médio de US\$ 408,00 ³⁷.

Os estudos compreenderam indivíduos de ambos os sexos, com idades variadas, cujos dados foram gerados no programa de base de dados do Sistema Informatizado do Hospital das Clínicas da Unicamp desenvolvido pelo Núcleo de Informática do HC. Posteriormente, estes dados foram transferidos para os programas estatísticos e para o Microsoft Excel 98. Informações sobre a identificação hospitalar, sexo, idade e data da coleta também constam deste banco.

Estudos realizados

Primeiramente realizou-se um estudo retrospectivo de resultados que compunham o perfil lipídico (C, HDL-C, LDL-C e TG) de indivíduos cadastrados no HC –UNICAMP, durante quatro anos, de 2000 a 2003.

A amostra estudada compreendeu indivíduos de ambos os sexos e idades divididas em adultos (20-39 e 40-59 anos) e idosos (60 anos ou mais).

Estes dados se constituem na sua totalidade de: 40.842 dosagens de C, 38.523 de HDL-C, 36.675 de LDL-C e 40.638 de TG, num total de 156.678 dosagens.

Os valores de corte estabelecidos pela III Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias (IIIDBSD) para os parâmetros bioquímicos analisados foram: colesterol ≤ 200 mg/dL, LDL-colesterol ≤ 130 mg/dL, HDL-colesterol ≥ 40 mg/dL e triglicérides ≤ 150 mg/dL ³⁶.

Juntamente com este levantamento elaborou-se um estudo retrospectivo de exames laboratoriais que compunham o perfil lipídico de crianças e adolescentes atendidos no mesmo hospital, durante o mesmo período de 2000 a 2003.

A amostra estudada compreendeu indivíduos de ambos os sexos e idades entre 0 a 19 anos, divididas em crianças (0-12 anos) e adolescentes (13-19 anos).

Os valores de corte recomendados por Kwiterovich ⁴⁷, nos parâmetros bioquímicos analisados são: C <170 mg/dL, LDL-C <110 mg/dL, HDL-C >45 mg/dL e TG <75 mg/dL até 10 anos e <90 mg/dL entre 10 e 19 anos.

Estes dados foram transferidos para o programa estatístico e se constituem na sua totalidade de: 3.059 dosagens de C, 2.699 de HDL-C, 2.572 de LDL-C e 2.975 de TG, num total de 11.305 dosagens.

No trabalho com 177 voluntários, 88 eram homens e 89 mulheres com idades entre 20 e 86 anos e normolipidêmicos segundo a IIIDBSD ³⁶. Avaliou-se os efeitos das determinações séricas de lípidos, lipoproteínas e apolipoproteínas na concentração plasmática de Lp(a).

Posteriormente realizou-se um estudo retrospectivo de exames laboratoriais que compunham o perfil lipídico de indivíduos de ambos os sexos e diferentes idades, de 1 mês a 124 anos, durante um período de 8 anos, de 1996 a 2003. Esta amostra populacional foi classificada em grupos de acordo com o sexo e idade e assim definidos: crianças (0-12 anos), adolescentes (13-19 anos), adultos jovens (20-39 anos), adultos (40-64 anos) e idosos (acima de 65 anos).

Este estudo totalizou 38.579 participantes e os parâmetros bioquímicos analisados com o número total de determinações foram: 88.587 dosagens de C, 66.265 de HDL-C, 61.828 de LDL-C e 85.254 de TG, num total de 301.934 dosagens. Realizou-se também um levantamento da prevalência de manifestações de doenças cardiovasculares como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, aterosclerose e outras doenças vasculares periféricas na região de Campinas durante o mesmo período, segundo dados do Sistema Único de Saúde ¹⁵.

Finalizando, realizou-se um estudo também retrospectivo de avaliação dos resultados de analitos bioquímicos de pacientes atendidos no HC da Unicamp, durante os anos de 1996 a 1998. A amostra populacional estudada compreendeu indivíduos de ambos os sexos, com idades entre 21 e 50 anos, cujos resultados dos exames estavam dentro dos intervalos de referência estabelecidos pelo serviço de Bioquímica Clínica do HC.

Os parâmetros bioquímicos analisados e o número total de exames foram: 53.641 dosagens de uréia, 58.315 de creatinina, 6.433 de ácido úrico, 15.036 de cálcio e 7.477 de fósforo, num total de 140.902 dosagens.

Coleta das amostras e determinações laboratoriais

As amostras sanguíneas foram obtidas por punção venosa no período da manhã (7-9h) em tubos secos de vidro estéreis sob vácuo (Vacutainer, Beckton&Dickinson), após 10-12 horas de jejum. O soro foi separado do sangue total por centrifugação refrigerada de baixa rotação e dentro de 2 horas após a coleta encaminhado às análises.

Os exames foram realizados em analisadores químicos automáticos (Mega, Merck, Germany - período de 1996-2000; Hitachi 917, Roche Diagnostics, Switzerland - período de 2000 a 2003), sob condições padronizadas e os métodos utilizados para as dosagens seguiram as instruções dos fabricantes. Para LDL-C equação de Fredewald e para HDL-C após precipitação de 1996 a 2000; após esta data foram utilizados métodos homogêneos diretos para ambos os parâmetros. Materiais controle (Qualitrol N® e Qualitrol P®, Merck, Germany - período de 1996-2000; Precinorm® e Precipath®, Roche Diagnostics, Switzerland - período de 2000 a 2003) foram sistematicamente utilizados para a determinação da variabilidade analítica e manutenção da acurácia.

Análises estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SAS (Statistical Analysis System, v.8.01, SAS Institute Inc, 1999-2000, Cary, NC, USA) e SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, USA) para análises descritivas e comparativas.

As estações do ano tiveram os seus períodos definidos segundo o U.S. Naval Observatory nos Estados Unidos da América, cujos dados foram obtidos no Departamento de Astronomia da Universidade de São Paulo – USP⁸³. A tabela a seguir demonstra a data de início e término de cada estação, ao longo dos anos analisados (Tabela 3).

Tabela 3- Data de início e término das estações do ano, segundo o Departamento de Astronomia da universidade de São Paulo – USP⁸³

	Início	Término
Primavera	22/09	20/12
Verão	21/12	19/03
Outono	20/03	19/06
Inverno	20/06	21/09

A análise temporal mensurou a presença de ritmos biológicos sazonais em cada analito ao longo dos anos. Posteriormente, os dados foram organizados em grupos separados por sexo e idade e reavaliados.

Para a obtenção dos dados ao longo do tempo, foi realizado o cálculo da concentração média de cada analito em todos os meses do ano, ao longo de todo o estudo e, posteriormente, adotou-se um período de 12 meses cujos pontos representam as médias mensais de todos os anos. Numa primeira instância foram analisadas as séries de dados sem distinção entre sexo e idade, o que ocorreu posteriormente seguindo a mesma metodologia descrita acima.

Para a análise temporal foi utilizado o método Cosinor, o qual consiste numa análise de regressão periódica que ajusta a função cosseno $Y = M + A \cos((2\pi/TAU)t + \phi)$ aos valores da série temporal. M é o MESOR, que é o valor médio da curva ajustada; A é a amplitude, que é a distância do MESOR ao pico da curva cosseno ajustada; TAU é o período ajustado; t é o instante em que a variável Y foi medida; e ϕ é a acrofase, ou seja, a medida do tempo transcorrido entre um instante de referência (31 de dezembro, 00:00h) e a fase na qual é maior a probabilidade de ser encontrado o valor mais elevado da variável, a

partir da curva senoidal (cosseno) ajustada dos dados ^{52,63}. A figura 2 é uma representação gráfica hipotética desta curva.

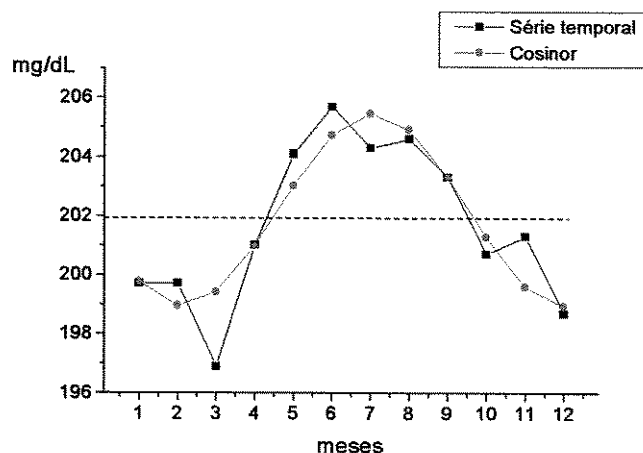


Figura 2- Representação gráfica de uma série temporal hipotética de dados e da correspondente curva cosseno ajustada pelo método cosinor.

O procedimento é hábil para estimar os parâmetros da equação, que representam por si as características ou propriedades dos ritmos minuciosamente analisados.

Este método é capaz de detectar se a curva ajustada tem ou não uma oscilação significativa testando a amplitude contra a hipótese de não-oscilação (assumindo amplitude zero). O nível de significância do teste é 5%. A hipótese nula da variação da amplitude zero é rejeitada quando a probabilidade p for menor que 5% ($p < 0,05$).

4- RESULTADOS

O trabalho intitulado **“THE USE OF A HOSPITAL LABORATORY COHORT TO ESTIMATE THE PREVALENCE OF DYSLIPIDEMIA IN ADULTS FROM THE STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL”** (MANUSCRITO 1 – Pg. 35), desenvolvido por **Fabio Dalpino**, Fabio Sodré, Eliana de Faria foi aceito para publicação em inglês, como Short Report, no periódico Clinica Chimica Acta e encontra-se em fase de impressão.

O trabalho intitulado **“PERFIL LIPÍDICO DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES: RESULTADOS DE 4 ANOS DE EXPERIÊNCIA DOS AMBULATÓRIOS DE UM HOSPITAL ESCOLA DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL”** (MANUSCRITO 2 – Pg. 45), desenvolvido por Raquel Takata, **Fabio Dalpino**, Vera Castanho e Eliana de Faria foi submetido à publicação, em português e como artigo completo no periódico Jornal de Pediatria e está sendo analisado pelos editores.

O trabalho intitulado **“DETERMINANTS OF LIPOPROTEIN(a) CONCENTRATION IN NORMOLIPIDEMIC INDIVIDUALS WITHOUT CLINICAL ATHEROSCLEROSIS”** (MANUSCRITO 3 – Pg. 62), desenvolvido por **Fabio Dalpino**, Fabio Sodré, Lúcia Castilho e Eliana de Faria foi publicado em inglês, como Short Report, no periódico Annals of Clinical Biochemistry (Ann Clin Biochem. 2005;42(Pt.5):398-9).

O trabalho intitulado **“BIOLOGICAL RHYTHMS IN SERUM LIPIDS AND LIPOPROTEINS OF A BRAZILIAN POPULATION CORRELATE WITH THE PREVALENCE OF CARDIOVASCULAR DISEASE”** (MANUSCRITO 4 – Pg. 68), desenvolvido por **Fabio Dalpino**, Luiz Menna-Barreto, Helena Oliveira, Eliana de Faria, versão preliminar que será desdobrada, sendo a primeira parte referente a ritmos na amostra populacional total e a sua relação com doença aterosclerótica submetida à publicação, em inglês e como artigo completo no periódico Clinical Chemistry; e a segunda parte envolvendo a ritmicidade biológica por sexo e idade submetida à publicação numa revista de cronobiologia.

O trabalho intitulado “**BIOLOGICAL RHYTHMS OF BIOCHEMICAL SERUM PARAMETERS IN A BRAZILIAN POPULATION: A THREE-YEAR STUDY**” (MANUSCRITO 5 – Pg. 94), desenvolvido por **Fabio Dalpino**, Luiz Menna-Barreto, Lúcia Castilho, Eliana de Faria foi publicado em inglês, como Short Report, no periódico Chronobiology International (Chronobiol Int. 2005;22(5):925-35).

THE USE OF A HOSPITAL LABORATORY COHORT TO ESTIMATE THE PREVALENCE OF DYSLIPIDEMIA IN AN ADULT BRAZILIAN POPULATION

Fabio B Dalpino, Fabio L Sodré, Eliana C de Faria

Department of Clinical Pathology, Nucleus of Experimental Medicine and Surgery, School of Medical Science, State University of Campinas, São Paulo, Brazil

Abstract

Background: Dyslipidemia is diagnosed through the determination of plasma lipid profiles. This study aimed at establishing the prevalence of dyslipidemia in a Brazilian out-patient population by using a hospital laboratory cohort. Methods: Lipid profiles of 22,542 individuals from both sexes, aged 20 to 124y, and registered at the University Hospital of the State University of Campinas, a standard of reference for hospital treatment in the state of São Paulo, Brazil, were retrospectively analyzed from 2000 to 2003. The cut-off values for cholesterol (C), triglycerides (TG), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) and high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) were determined as recommended by the National Cholesterol Education Program. Statistical analyses were carried out using the SPSS program. Results: Altered C, LDL-C and TG were found in 44%, 38% and 37% of adults and in 55%, 48% and 41% of the elderly respectively; 35% of adults and 32% of the elderly presented undesirable low HDL-C. Combined dyslipidemia was very prevalent. Conclusion: Dyslipidemia was a serious public health problem in the studied population, especially among women and the elderly. The mixed phenotype of hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia was the most prevalent. The results of this study were validated by their agreement with previously studied non-hospital Brazilian populations.

Background

Coronary heart disease (CHD) is the main cause of morbimortality in Brazil [1]. The measurement of the serum lipid profile is indispensable for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and for the prevention of CHD [2]. The National Cholesterol Education Program (NCEP) [3] was designed to establish cutoff values for lipids and lipoproteins, as well as prophylactic measures and adequate treatment to reduce CHD risk and clinical manifestations. The III Brazilian Dyslipidemia Panel [4] adopted the same values in Brazil.

A few studies similar to the present one were conducted in different areas of Brazil [5-8] and all have shown a high percentage of hypercholesterolemic individuals. However, these studies did not explore the prevalence of different types of dyslipidemia in Brazil.

This study aimed at identifying the prevalence of different types of dyslipidemia in a hospital out-patient adult population, along four consecutive years. Secondly it aimed at contrasting the results with the non-hospital prevalence of dyslipidemia from other studies in the same region.

Methods

A retrospective study was conducted during 4 consecutive years, from 2000 to 2003, to obtain lipid profiles of 22,542 individuals registered at a university hospital, Hospital das Clínicas, University of Campinas, a standard of reference for hospital treatment in the state of São Paulo, Brazil.

The study sample included individuals of both sexes, different ages [20 to 124 years (y)] and racial origins and with a very heterogeneous social-economic background. Only one lipid profile per year and per patient was randomly chosen to be analyzed, all of them from out-patients. The participants were classified into sub-groups according to age (20 to 59 y/60 y and above) and to sex (Males/Females, M/F).

The biochemical exams included cholesterol (C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and triglycerides (TG). The exams were carried out in an automatic chemical analyzer Hitachi-917 (Roche) under standardized conditions, following the manufacturer's instructions. Control materials were systematically used to determine analytic variability and to maintain accuracy.

The cutoff limits established by the NCEP [3] for the adult biochemical parameters are: cholesterol (below 200 mg/dL), LDL-cholesterol (below 130 mg/dL), HDL-cholesterol (above 40 mg/dL) and triglycerides (below 150 mg/dL).

The data included 37,783 measurements of total C, 35,824 of HDL-C, 34,103 of LDL-C and 37,663 of TG, a total of 145,373 determinations. The dyslipidemia percentage frequencies were calculated on the basis of the participant numbers in each sub-group such as: 22,542 for the total population, 9,468 for M, 13,074 for F, 17,443 for 20-59 y and 5,099 for 60 y or above.

The laboratory results were obtained from the data bank developed by the Computer Center at the University Hospital. Statistical analyses were used for the descriptive and comparative tests.

All procedures followed were in accordance with the Research Ethics Committee of the School of Medicine of the University of Campinas.

Results

During the studied period the laboratory inter-assay coefficients of variation (CV) were much below the total error allowed by NCEP [3]: for TC, 1.89 and 1.78%, respectively for normal and pathological controls. The performance of HDL-C and LDL-C was analyzed only with normal controls and the variation was 3.46 and 2.41%, respectively. TG presented CV equal to 1.89 and 3.02%, respectively for normal and pathological controls.

Although the number of subjects per studied year varied between 6,741, 5,949, 5,229 and 4,623, the mean age was kept constant at 48 years, and all the samples consisted of 42% males and 58% females.

The average values in total population for the parameters were: 201 mg/dL (± 53) for C, 48 mg/dL (± 15) for HDL-C, 125 mg/dL (± 42) for LDL-C and 161 mg/dL (± 145) for TG. When the data were analyzed with respect to sex over the period of four years, all the parameters presented higher values among females, with the exception of TG that was higher in males. The values of C, HDL-C, LDL-C and TG increased significantly with age, but TG presented a peak between ages 40 and 59 y (Table 1).

TABLE 1: PLASMA LIPIDS AND LIPOPROTEINS IN TOTAL POPULATION AND BY SEX AND AGE

Parameters	Total population	M ^a	F ^a	Age groups (y) ^b		
				20 – 39 y	40 – 59 y	≥ 60 y
C	201 ^c	192	207 [*]	186	206	209 [†]
HDL-C	48	43	51 [*]	47	48	49 [†]
LDL-C	125	119	129 [*]	113	129	132 [†]
TG	161	172 [†]	152	144	172 [§]	160

^a M = males or F = females; ^b y = years; ^c as mg/dL; P<0.001, “t” test between the sexes: ^{*} higher values in females; [†] higher values in males; P<0.050, ANOVA test among age groups with Duncan post-hoc test: [‡] higher with age in all groups; [§] significant differences among all groups with a peak in adults.

Table 2 presents the percentage frequencies of dyslipidemia throughout the four-year period in the total population, in adults, the elderly and by sex. The most frequent dyslipidemia was hypercholesterolemia, present in 10,478 individuals (46% of the total population), in 7,674 adults (34% of the total population and 44% of the adults), in 2,804 individuals with 60y or more (12% of the total population and 55% of the elderly) and in 6,868 females (30% of the total population and 53% of the female population). Hypoalphalipoproteinemia tended to have the lowest frequency, except for males with 4,562 individuals (21% of total population and 48% of the male population).

TABLE 2: FREQUENCIES OF LIPID PROFILES ABOVE OR BELOW THE NCEP'S CUTOFF LIMITS IN TOTAL POPULATION AND BY SEX AND AGE

Parameters	NCEP's recommended cutoff points (mg/dL)	Frequency of dyslipidemia									
		Total Population		M ^a		F ^a		Adults ^b		Elderly ^b	
		n ^c	% ^d	n	%	n	%	n	%	n	%
C	<200	10,478	46	3,610	38	6,868	53	7,674	44	2,804	55
HDL-C	>40	7,737	34	4,562	48	3,175	24	6,105	35	1,632	32
LDL-C	<130	9,076	40	3,205	34	5,871	45	6,628	38	2,448	48
TG	<150	8,545	38	3,747	40	4,798	37	6,454	37	2,091	41

^a M = males or F = females; ^b Adults = 20-59 y or the elderly = ≥ 60 y; ^c n = number of dyslipidemic individuals; ^d percentages based on 22,542 for total population or on 9,468 for M, 13,074 for F, 17,443 for adults and 5,099 for the elderly.

Table 3 presents the frequencies of combined dyslipidemia throughout the four-year period in the total population, in adults, the elderly and by sex: high C plus TG was found in 6,483 participants in the four-year period (29% of the total population); high C plus low HDL-C were found in 3,434 participants, 15% of the total population. The combined high TG plus low HDL-C was found in 4,695 participants, corresponding to 21% of the total population. The elderly had the highest frequency of combined dyslipidemia. Men had much higher frequencies of high C plus low HDL and high TG plus low HDL than women.

TABLE 3: FREQUENCIES OF MIXED DYSLIPIDEMIA IN TOTAL POPULATION AND BY SEX AND AGE

Mixed Dyslipidemias ^a	Total Population		M ^b		F ^b		Adults ^c		Elderly ^c	
	n ^d	% ^e	n	%	n	%	n	%	n	%
C plus TG	6,483	29	2,576	27	3,907	30	4,715	27	1,768	35
C plus HDL	3,434	15	1,814	19	1,620	12	2,536	15	898	18
TG plus HDL	4,695	21	2,643	28	2,052	16	3,550	20	1,145	22

^a combined increased values of C or TG with reduced HDL-c or increased C and TG; ^b M = males or F = females; ^c Adults = 20-59 y, the elderly = ≥ 60 y; ^d n = number of individuals with mixed dyslipidemia; ^e percentages based on 22,542 for total population or on 9,468 for M, 13,074 for F, 17,443 for adults and 5,099 for the elderly.

Discussion

Information on the lipid profile of a population is indispensable for the diagnosis of dyslipidemia and primary prevention of CHD, but unfortunately very few studies have been conducted on this subject in Brazil. The aim of this study was to establish the prevalence of dyslipidemia in a Brazilian out-patient population by using a hospital laboratory cohort. It involved 145,373 lipid and lipoprotein dosages from 22,542 adults of both sexes individuals performed over a period of four years.

The average lipid and lipoprotein concentrations revealed values below NCEP recommended cutoff points, except for triglycerides that were around 6% above the recommended limit. Forty-six percent of the population present hypercholesterolemia, 34% hypoalphalipoproteinemia, 40% hyperbetalipoproteinemia and 38% hypertriglyceridemia, indicating a very high prevalence of dyslipidemia.

Similar results were also obtained by other groups in non-hospital population studies, like that of Guimarães et al. [7], who compared cholesterol concentrations in several Brazilian populations and obtained a mean of 183.2 mg/dL. However, 32.2% of the individuals presented cholesterol higher than 200mg/dL and 8.8% higher than 240 mg/dL.

Nicolau et al. [8] conducted a study in the northern area of the State of São Paulo of 672 individuals whose mean age was 47 years old. The mean cholesterol was 192.5 mg/dL, significantly higher in females and in older individuals. In this population, 22% presented cholesterol values between 200-239 mg/dL and 16% equal to or above 240 mg/dL.

Martinez et al. [5] in a national study conducted in 81,262 individuals showed a mean cholesterol value within the range recommended by the NCEP. However, when analyzing individuals who had one risk factor for CHD, they found that 40% had C above 200mg/dL and 14% had C above 240mg/dL; if considering individuals without risk factors for CHD, these values fell to 30% and 8%, respectively.

Castanho et al. [9] in a Brazilian study revealed that 20-30% of the population was hypertensive, 44% obese, 49% sedentary and 31% smokers, showing that several risk factors for CHD are prevalent in a state of São Paulo population.

Our results were also comparable to those found in other Latin America countries. Like those of Ciruzzi et al. [10], whose multicenter case control study involving four countries showed elevated frequency of attributable risk for acute myocardial infarction due hypercholesterolemia in Venezuela, 27%, Mexico, 3%, Cuba, 30% and Argentina, 36%.

Lara et al. [11] studied an urban area in six Mexican states and the prevalence of hypercholesterolemia was 43.3% for total population, with greater values for females. Values were directly related to body mass index and blood hypertension.

Chiang-Salgado et al. [12] studying Chilean university students showed 29% of hypercholesterolemia, 16% of hyperbetalipoproteinemia and 5% of hypoalphalipoproteinemia. The authors observed an association of the lipid risk profile with obesity, cigarette smoking and family history of cardiovascular disease.

Blumel et al. [13], studying cardiovascular risk factors in middle-aged women in Chile, found 71.5% of dyslipidemia.

The present study revealed significantly higher lipid values in women, except triglycerides. Besides dietary factors, biological differences, such as estrogen production, interfere with these parameters [7].

There was also a tendency to increases in cholesterol and LDL-cholesterol according to age probably due to hormonal factors and reduction in physical activity. These results agree with others found in the literature, indicating that dyslipidemia is an even more important public health problem in old age [1, 5, 14].

In conclusion, this study revealed a high prevalence of hypercholesterolemia, hypoalphalipoproteinemia, hyperbetalipoproteinemia, hypertriglyceridemia as well as mixed dyslipidemia, primarily high cholesterol and triglycerides in an adult Brazilian population.

These findings are similar to those obtained by some other studies of non-hospital populations in Brazil and in Latin-American and suggest that this cost-effective method of studying laboratory data retrospectively was successfully used to determine the frequency of dyslipidemia in this population from the state of São Paulo, Brazil.

References

- 1- Santos RD, Sposito AC, Santos JE et al. PANDORA – Survey of Brazilian Cardiologists about Cholesterol Reduction. *Arq Bras Cardiol* 2000; 75: 289-302.
- 2- Seki M, Seki MO, Niyama FP et al. Determinação dos intervalos de referência para lipídeos e lipoproteínas em escolares de 10 a 19 anos de idade de Maracá (SP). *J Bras Patol Med Lab* 2003; 39: 309-316.
- 3- National Cholesterol Education Program: Third Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *Circulation* 2002; 24: 3144-3421.
- 4- Santos RD. III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol* 2001; Suppl III: 4-48.
- 5- Martinez TLR, Santos RD, Armaganijan D et al. National Alert Campaign about Increased Cholesterol. Determination of Cholesterol Concentrations in 81,262 Brazilians. *Arq Bras Cardiol* 2003; 80: 635-638.
- 6- Rabelo LM, Viana RM, Schimith MA et al. Risk Factors for Atherosclerosis in Students of a Private University in São Paulo – Brazil. *Arq Bras Cardiol* 1999; 72: 575-580.
- 7- Guimarães AC, Lima M, Mota E et al. The Cholesterol Level of a Selected Brazilian Salaried Population: Biological and Socioeconomic Influences. *CVD Prevention* 1998; 1: 306-317.
- 8- Nicolau JC, Bechara DL, Nascimento SD, Greco OT, Jacob JL, Lorga AM. The cholesterol profile in the city of São José do Rio Preto. *Arq Bras Cardiol* 1992; 59: 433-440.
- 9- Castanho VS, Oliveira LS, Pinheiro HP, Oliveira HCF, de Faria EC. Sex differences in risk factors for coronary heart disease: a study in a Brazilian population. *BMC Public Health* 2001;1:3.

- 10- Ciruzzi M, Schargrotsky H, Pramparo P et al. Attributable risk for acute myocardial infarction in four countries of Latin America. *Medicina (B Aires)* 2003; 63: 697-703.
- 11- Lara A, Rosas M, Pastelin G, Aguilar C, Attie F, Monroy OV. Hypercholesterolemia and hypertension in Mexico: urban conjunctive consolidation with obesity, diabetes and smoking. *Arch Cardiol Mex* 2004; 74: 231-245.
- 12- Chiang-Salgado MT, Casanueva-Escobar V, Cid-Cea X et al. Cardiovascular risk factors in Chilean university students. *Salud Publica Mex* 1999; 41: 444-451.
- 13- Blumel JE, Castelo-Branco C, Roncagliolo ME, Binfá L, Sarra S. Cardiovascular risk factors in a cohort of middle-aged women. *Rev Med Chile* 2003; 131: 381-389.
- 14- Mansur AP, Favarato D, Souza MFM et al. Trends in Death from Circulatory Diseases in Brazil between 1979 and 1996. *Arq Bras Cardiol* 2001; 76: 504-510.

MANUSCRITO 2

PERFIL LIPÍDICO DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES: RESULTADOS DE UMA EXPERIÊNCIA AMBULATORIAL DE 4 ANOS EM UM HOSPITAL ESCOLA DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

Raquel T Takata, Fabio B Dalpino, Vera S Castanho e Eliana C de Faria

Departamento de Patologia Clínica, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental e Ambulatório de Dislipidemias (HC), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas, São Paulo, Brasil

ABSTRACT

Objective: Atherogenesis begins in the childhood, progressing significantly from the third decade of life on. The aim of this study was to establish, the frequencies of different types of dyslipidemia in a Brazilian outpatient population (children and adolescents) over a period of 3 years. Methods: Lipid profiles of 2,031 individuals from both sexes, aged from 0 to 19 years and registered at the University Hospital, State University of Campinas, a reference pole in the medical-hospital attendance in the state of São Paulo, Brazil, were retrospectively analyzed from 2000 to 2003. The reference values adopted were the as recommended by Kwiterovich: Cholesterol (<170 mg/dL), LDL-Cholesterol (<110 mg/dL), HDL-Cholesterol (>45 mg/dL) and triglycerides (<75 mg/dL, below 10 years and <90 mg/dL, between 10 and 19 years). Statistical analyses were carried out using the SPSS program. Results: Altered Cholesterol, LDL-Cholesterol and triglycerides were found in 46%, 37% and 59% of the children (0-12y) and in 42%, 35% and 46% of adolescents (13-19y) respectively; 46% of children and 50% of adolescents presented undesirable low HDL-Cholesterol. In children and adolescents respectively combined hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia were present in 35% and 32% (most prevalent); combined hypercholesterolemia and hypoalphalipoproteinemia in 18% and 20% and combined hypertriglyceridemia and hypoalphalipoproteinemia in 34% and 29%. Conclusion: This study, using an economic retrospective approach, demonstrated that dyslipidemia in young age is a serious public health problem in Brazil and it also oriented surveys in other communities to prevent cardiovascular diseases.

INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos demonstram uma redução nas taxas de morbimortalidade por doença arterial coronariana (DAC) tanto em países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento (1,2). Apesar disso, a DAC ainda é a principal causa de morbimortalidade no Brasil (3).

Como a prevalência e o custo gerado por estas doenças são muito altos, a aterosclerose é intensamente estudada em todo o mundo com o intuito de se compreender seus mecanismos fisiopatológicos e desencadear medidas preventivas para o seu controle (4).

Em geral as manifestações clínicas da DAC iniciam-se na idade adulta. Entretanto diversos estudos têm demonstrado que o processo aterosclerótico na camada íntima arterial surge na infância de forma silenciosa, progredindo significativamente a partir da terceira década de vida (5-7). As dislipidemias, um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento da aterosclerose e de suas complicações, tem sido cada vez mais objeto de estudo em crianças e adolescentes. Isto se dá tanto pela alta prevalência encontrada nesta faixa etária quanto pela identificação de que a colesterolemia na infância é um preditor do perfil lipídico na idade adulta (6,8).

Estudos americanos apontam que 25% das crianças apresentam colesterolemia acima de 170 mg/dL e no Brasil alguns trabalhos também encontraram esta alta prevalência, como o de Gerber e Zielinsky com 28% de colesterol alto em crianças de 6 a 14 anos e Moura et al na cidade de Campinas com 35% dos escolares com algum nível de hipercolesterolemia (7,8).

Portanto a análise do perfil lipídico sérico é indispensável no diagnóstico das dislipidemias e para a prevenção primária de DAC (9). Para tanto, existem consensos internacionais, como o *National Cholesterol Education Program* (NCEP) (10), realizados com o intuito de se estabelecerem medidas profiláticas para a doença e formas de tratamento adequadas. As III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias (III DBSD) (11) adotam os valores recomendados pelo próprio NCEP.

São poucos os estudos realizados no nosso país (12-15) com o intuito de estabelecer o perfil lipídico de crianças e adolescentes, mas os que existem demonstraram uma grande proporção de indivíduos com concentração de colesterol acima do recomendado.

Com o objetivo de conhecer a prevalência de dislipidemias numa amostra populacional ambulatorial hospitalar de crianças e adolescentes no Estado de São Paulo, estabelecemos os intervalos de referência interpercentis para lipoproteínas e lípides plasmáticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo retrospectivo que durou 4 anos, de 2000 a 2003, e que envolveu crianças e adolescentes de ambos os sexos e com idades entre 0 a 19 anos.

Foram avaliados resultados de exames laboratoriais que compõem o perfil lipídico (Colesterol (C), HDL-Colesterol (HDL-C), LDL-Colesterol (LDL-C) e Triglicérides (TG)) de crianças e adolescentes atendidos ambulatorialmente em um pólo de referência no atendimento médico-hospitalar no interior do Estado de São Paulo, o Hospital das Clínicas (HC/UNICAMP), Campinas para onde também se dirigem indivíduos de estados vizinhos.

As amostras sanguíneas foram obtidas por punção venosa no período da manhã (7-9h) em tubos secos de vidro estéreis sob vácuo (Vacutainer, Beckton&Dickinson), após 10-12 horas de jejum. O soro foi separado do sangue total por centrifugação refrigerada de baixa rotação e dentro de 2 horas após a coleta encaminhado às análises.

Os exames foram realizados na Seção de Bioquímica Clínica do HC em analisadores químicos automáticos Hitachi-917 (Roche), sob condições padronizadas e os métodos utilizados para as dosagens seguiram as instruções do fabricante. Materiais controle (Precinorm e Precipath, Roche) foram sistematicamente utilizados para a determinação da variabilidade analítica e manutenção da acurácia.

Para a dosagem do colesterol foi utilizado método enzimático colorimétrico (CHOD-PAP-Roche); o LDL-Colesterol foi obtido por método direto (Roche) e para o HDL-Colesterol utilizamos um método homogêneo direto, sem precipitação (HDL-Col - Roche). Analisou-se triglicérides utilizando-se um método enzimático-colorimétrico (GPO-PAP – Roche).

Todos os procedimentos adotados estão em acordo com o comitê de ética da Faculdade de Medicina da Unicamp.

O conjunto de resultados de exames deste estudo foi gerado no programa de base de dados do Sistema Informatizado do Hospital das Clínicas da Unicamp, desenvolvido pelo Núcleo de Informática do HC. Posteriormente, estes dados foram transferidos para o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, Chicago, USA.) e para o Microsoft Excel 98 e se constituem na sua totalidade de: 3.059 dosagens de C, 2.699 de HDL-C, 2.572 de LDL-C e 2.975 de TG, num total de 11.305 dosagens. Informações sobre a identificação hospitalar, sexo, idade e data da coleta também constam deste banco de dados.

A frequência de dislipidemias foi calculada com base no número de participantes em cada grupo: 2.031 na amostra populacional total, 914 no sexo masculino, 1.117 no sexo feminino, 993 de 0 a 12 anos e 1.038 de 13 a 19 anos. Os valores de corte utilizados foram os recomendados por Kwiterovich (16) e para os parâmetros bioquímicos analisados são: C <170 mg/dL, HDL-C >45 mg/dL, LDL-C <110 mg/dL e TG <75 mg/dL até 10 anos e <90 mg/dL entre 10 e 19 anos. Estudaram-se apenas pacientes ambulatoriais e considerou-se um só resultado do exame por ano para cada paciente. Separaram-se grupos: crianças (0-12 anos), adolescentes (13-19 anos) e por sexo.

Análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SPSS.

RESULTADOS

Ao longo dos quatro anos estudados foram realizados 11.305 testes laboratoriais, sendo 3.059 referentes a C, 2.699 a HDL-C, 2.572 a LDL-C e 2.975 a TG, num total de 2.031 participantes. A idade média geral foi 12 (± 5) anos, sendo 45% do sexo masculino (M) e 55% do sexo feminino (F).

O coeficiente de variação (CV) inter-ensaios dos materiais controle utilizados no período foram: 1,89 e 1,78% para o C, respectivamente para controle não alterado e patológico; 3,46 e 2,41%, respectivamente para o HDL-C e LDL-C em que foi utilizado apenas o controle não alterado; e 1,89 e 3,02%, respectivamente para controles não alterado e patológico para o TG. Estas variações estão abaixo do erro total recomendado pelo NCEP (17,18), que é de no máximo 8.9% para C, 13% para HDL-C, 12% para LDL-C e 15% para TG.

As concentrações médias dos parâmetros analisados foram: 178 (± 74) mg/dL para C, 48 (± 15) mg/dL para HDL-C, 108 (± 55) mg/dL para LDL-C, e 120 (± 152) mg/dL para TG.

As concentrações séricas de C e LDL-C apresentaram redução significativa ao longo dos 4 anos (Figura 1). Para o C houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as concentrações séricas médias de 2003 e as dos demais anos e para o LDL-C a diferença ocorreu entre 2003 comparado a 2000 e 2001. Não houve redução significativa nas concentrações séricas do HDL-C e TG.

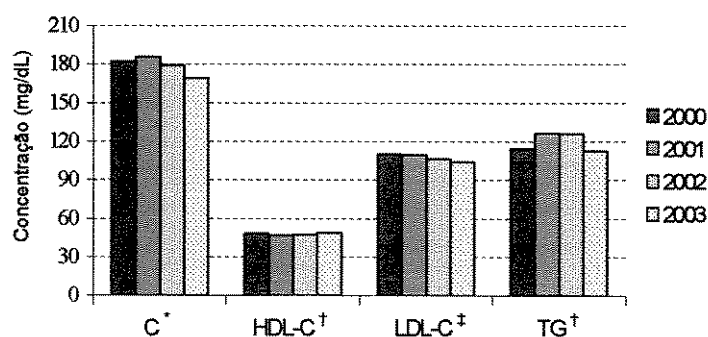


Figura 1- PERFIL LIPÍDICO MÉDIO DA POPULAÇÃO TOTAL AO LONGO DO ESTUDO

$P < 0.05$, teste ANOVA para diferença entre os anos: * redução significativa ao longo dos anos, comparando-se 2003 com os demais anos; † não houve redução significativa ao longo dos anos; ‡ redução significativa ao longo dos anos, comparando-se 2003 com 2000 e 2001.

Analisando os dados segundo o sexo, o HDL-C apresentou valores médios nos 4 anos mais elevados no sexo feminino e o TG no sexo masculino. C e LDL-C não variaram segundo o sexo (Figura 2).

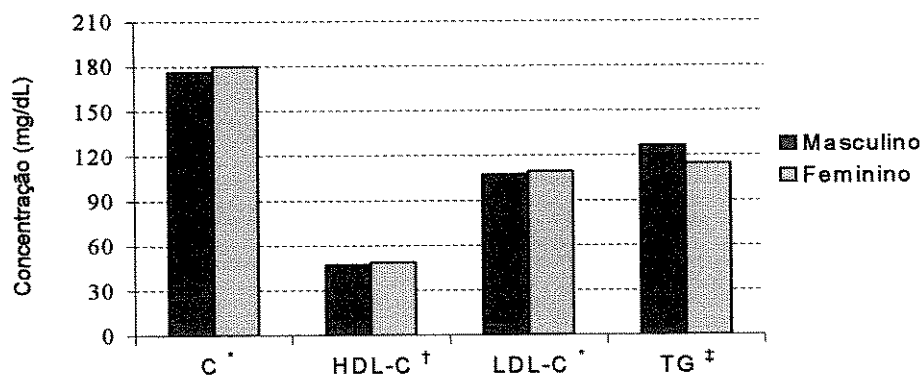


Figura 2- PERFIL LIPÍDICO MÉDIO DA POPULAÇÃO TOTAL DE ACORDO COM O SEXO

$P < 0.05$, teste “t” para diferença entre os sexos: * não houve diferença significativa entre os sexos; † valores mais elevados no sexo feminino; ‡ valores mais elevados no sexo masculino.

Com exceção do HDL-C que não sofreu variação com a idade, todos os outros analitos apresentaram uma redução significativa nos seus valores séricos médios comparando-se as faixas etárias (0-12 e 13-19 anos) (Figura 3).

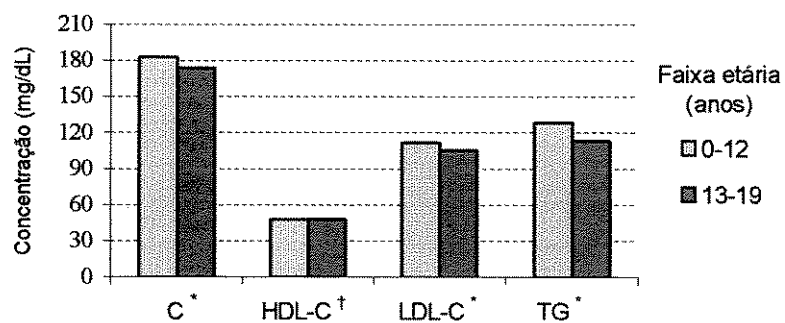


Figura 3- PERFIL LIPÍDICO MÉDIO DA POPULAÇÃO TOTAL DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA

$P < 0.05$, teste “t” para diferença entre as faixas etárias: * valores mais baixos na faixa etária de 13 a 19 anos; † não houve diferença significativa entre as idades.

A tabela 1 apresenta intervalos interpercentis para C, HDL-C, LDL-C e TG observados na amostra populacional total, assim como por sexo e faixa etária.

Tabela 1- PERCENTIS SELECIONADOS DO PERFIL LIPÍDICO NA POPULAÇÃO TOTAL E POR SEXO E IDADE

	n participantes *	n testes *	Percentis selecionados (mg/dL)						
			5°	10°	25°	50°	75°	90°	95°
C									
PT [†]	2029	3059	108	120	140	165	194	237	287
M [‡]	903	1401	105	116	133	161	191	232	291
F [‡]	1126	1658	114	125	144	168	197	239	279
0-12 [§]	948	1430	107	120	141	166	196	243	307
13-19	1081	1629	109	120	138	163	193	232	269
HDL-C									
PT [†]	1848	2699	28	32	38	46	56	67	74
M [‡]	800	1205	27	31	37	44	55	66	76
F [‡]	1048	1494	28	32	39	47	57	67	73
0-12 [§]	824	1217	25	31	38	47	57	68	75
13-19	1024	1482	29	33	38	46	56	66	73
LDL-C									
PT [†]	1796	2572	53	63	79	99	123	156	186
M [‡]	782	1160	47	56	74	95	119	155	198
F [‡]	1014	1412	53	65	81	101	125	156	179
0-12 [§]	798	1146	53	63	79	101	124	161	202
13-19	998	1426	54	64	79	98	122	153	180
TG									
PT [†]	1987	2975	39	46	59	85	131	206	289
M [‡]	885	1363	38	43	58	85	136	216	294
F [‡]	1102	1612	42	47	61	86	128	199	283
0-12 [§]	917	1366	38	44	58	86	135	229	315
13-19	1070	1609	41	47	61	85	130	193	257

* n= número de participantes ou testes; [†] PT= população total; [‡] M=masculino, F=feminino; [§] faixa etária.

Na tabela 2 são mostradas as frequências de dislipidemias ao longo dos 4 anos para a amostra populacional total, ambos os sexos e diferentes faixas etárias. A mais frequente na população total, no sexo feminino e na faixa entre 0 a 12 anos foi a hipertrigliceridemia. No sexo masculino e entre 13 a 19 anos predominou hipoalfalipoproteinemia.

Tabela 2- FREQUÊNCIA DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM VALORES LIPÍDICOS SÉRICOS ACIMA OU ABAIXO DOS RECOMENDADOS POR KWITEROVICH'S

Parâmetros	Valores recomendados por Kwiterovich's (mg/dL)		Frequência de dislipidemias									
	0 – 19 anos		PT [*]		M [†]		F [†]		0 – 12 anos		13 – 19 anos	
	0 – 10 a	10 – 19 a	n [‡]	% [§]	n	%	n	%	n	%	n	%
C	< 170		894	44.0	362	39.6	532	47.6	455	45.8	439	42.3
HDL-C	> 45		975	48.0	489	53.5	486	43.5	459	46.2	516	49.7
LDL-C	< 110		731	36.0	301	32.9	430	38.5	366	36.9	365	35.2
TG	< 75	< 90	1062	52.3	465	50.9	597	53.4	588	59.2	474	45.7

* PT= população total; † M=masculino, F=feminino; ‡ n= número de indivíduos dislipidêmicos em cada subgrupo; § porcentagem baseada em 2.031 indivíduos para a população total, 914 para sexo masculino, 1.117 para sexo feminino, 993 para 0 – 12 anos e 1.038 para 13 – 19 anos.

A tabela 3 mostra a frequência de dislipidemias mistas: C e TG aumentados foram encontrados em 685 indivíduos ao longo dos 4 anos, 33,7% da população total; C alto e HDL-C baixo ocorreu em 380 participantes, 18,7% da população total; TG alto e HDL-C baixo ocorreu em 643 participantes, 31,6% da população total. No sexo masculino predominaram as dislipidemias mistas TG alto e HDL-C baixo e no sexo feminino C e TG altos. Em ambas as faixas etárias a mais frequente foi C e TG altos.

Tabela 3- FREQUÊNCIA DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DISLIPIDEMIAS MISTA

Dislipidemias mistas [*]	População total		M [†]		F [†]		0 – 12 a		13 – 19 a	
	n [‡]	% [§]	n	%	n	%	n	%	n	%
C e TG	685	33.7	296	32.4	389	34.8	349	35.1	336	32.4
C e HDL	380	18.7	169	18.5	211	18.9	183	18.4	197	20.0
TG e HDL	643	31.6	311	34.0	332	29.7	338	34.0	305	29.4

* combinação de valores aumentados para C ou TG com redução de HDL-C ou valores aumentados para C e TG; † M=masculino, F=feminino; ‡ n= número de indivíduos com dislipidemias mista; § porcentagem baseada no número de indivíduos em cada subgrupo.

DISCUSSÃO

No Brasil, de acordo com dados do Sistema Único de Saúde (SUS) (19), as doenças do aparelho circulatório representam 27,4% de todas as causas de morte para todas as idades, sendo que 6,3% são por infarto agudo do miocárdio (IAM). Estes dados são muito semelhantes aos encontrados no Estado de São Paulo, onde 7,45% das pessoas morrem por IAM.

Nos EUA as mortes secundárias a DAC estão caindo aproximadamente 3% ao ano. No Brasil esta taxa está em torno de 2% ao ano (1). Apesar disso, que em parte se deve aos novos tratamentos disponíveis no mercado e às mudanças nos hábitos de vida, este problema está longe de ser solucionado.

Como diversos estudos têm demonstrado que o processo aterosclerótico inicia-se já na infância, é importante estabelecermos a prevalência de dislipidemias nesta faixa etária, pois este é um dos principais fatores de risco para o surgimento das estrias gordurosas na camada íntima das artérias no desenvolvimento da aterosclerose (6).

O objetivo deste trabalho foi o de se estudar uma população atendida ambulatorialmente num pólo de referência médico-hospitalar do interior do Estado de São Paulo - Brasil, composta por diferentes classes sócio-econômicas e culturais. Durante os 4 anos de estudo foram realizadas 11.305 dosagens de lípides e lipoproteínas em 2.031 crianças e adolescentes com idade média de 12 anos e um discreto predomínio do sexo feminino.

Com relação às características bioquímicas, a concentração média dos analitos para a população geral mostra valores de C e TG acima dos recomendados, sendo que o valor médio de HDL-C e LDL-C estão dentro dos valores estabelecidos.

Comparando-se os resultados encontrados neste estudo com os recomendados pelo NCEP (10) e IIIDBSD (11), para crianças e adolescentes observamos que 44,0% dos indivíduos apresentam hipercolesterolemia, 48,0% hipoalfalipoproteinemia, 36,0% hiperbetalipoproteinemia e 52,3% hipertrigliceridemia. Ou seja, os intervalos percentis revelam que uma alta porcentagem desta população apresenta dislipidemias. A tabela 3

também demonstra uma alta frequência de dislipidemias mistas nestas crianças e adolescentes.

Este fato poderia ser explicado em parte por se tratar de indivíduos que procuraram serviços médicos, porém como as amostras são de pacientes ambulatoriais e de todos os setores especializados do hospital esta hipótese se atenua.

A figura 1 demonstra uma redução significativa dos valores séricos de C e LDL-C, comparando-se o ano de 2000 com 2003, fato que não ocorreu com o HDL-C e TG. Isto pode ter ocorrido pelos mesmos motivos que estão levando à redução de DAC, como já comentado acima.

Quando analisamos os sexos separadamente, observamos valores significativamente mais altos no sexo feminino para o HDL-C e no sexo masculino para o TG. Com relação às diferentes faixas etárias, com exceção do HDL-C que não variou com a idade, notamos uma tendência para a redução das concentrações séricas dos lipídeos e lipoproteínas comparando-se a faixa etária de 0-12 anos com a de 13-19 anos.

Portanto, os resultados encontrados neste trabalho vão de encontro aos da literatura, que apontam para uma alta frequência de dislipidemias em crianças e adolescentes, o que a torna um grave problema de saúde pública no Brasil (1,3,9).

É difícil estabelecermos nas crianças e adolescentes uma relação entre DAC e as concentrações séricas do colesterol porque as manifestações clínicas não costumam ocorrer cedo, entretanto estudos feitos a partir de autópsias demonstram placas de gordura nas artérias coronárias a partir dos 10 anos de idade (5,20).

Acredita-se que exista uma associação de fatores ambientais e genéticos, sendo este último de maior importância. Gulati e Saxena (5) estudando crianças indianas de 5 a 14 anos cujos parentes tinham antecedentes de DAC prematura e confrontando os achados com um grupo controle sem história familiar de DAC encontraram diferença significativa entre os dois grupos com concentrações mais elevadas de C, LDL-C e TG e reduzidos de HDL-C no grupo com história pregressa comparado com o controle. Além disso, houve correlação positiva entre o nível lipídico do parente com DAC prematura e a sua criança.

Romaldini et al. (6) avaliando os fatores de risco para aterosclerose em crianças e adolescentes também com história familiar de DAC prematura identificaram 41% dos participantes com 1 a 4 fatores de risco. Neste estudo 27,5% apresentaram C >170 mg/dL, 19,3% LDL-C <110 mg/dL, 13,8% HDL-C <40mg/dL e 12,8% TG >130mg/dL. Moura et al. (8) estudando escolares de 7 a 14 anos também na cidade de Campinas, encontraram níveis percentuais elevados de hipercolesterolemia com 35,0% da população estudada apresentando C>170mg/dL.

Elias et al. (21) avaliaram 43 adolescentes filhos de hipertensos e encontrou as seguintes médias para o perfil lipídico: C=177mg/dL, LDL-C=119mg/dL, HDL-C=39mg/dL e TG=99mg/dL. Neste estudo maiores níveis de pressão arterial e perfil lipídico desfavorável ocorreram em filhos de hipertensos comparados aos de normotensos, comprovando mais uma vez a necessidade de se avaliar o perfil lipídico das crianças e adolescentes assintomáticos, quando se existe na família antecedente de algum fator de risco para DAC.

A obesidade, que também é um fator de risco cardiovascular secundário, em estudos americanos, mostrou elevação de 5% para 11% na sua prevalência se comparada a década de 1960 com a de 1990 (22).

Num estudo europeu, Reinehr et al. (23) observaram uma alta prevalência de fatores de risco cardiovasculares em crianças e adolescentes obesos, dos quais 11%, 9% e 29% apresentavam, respectivamente, C, LDL-C e TG elevados e 11% com redução no HDL-C.

Moura et al. (8) também associaram o índice de massa corpórea em escolares de 7 a 14 anos na cidade de Campinas à hipercolesterolemia e a prevalência de obesidade nesta população foi de 24,4%. Como uma das complicações da obesidade são as dislipidemias, a tendência é observar um aumento também no número de crianças dislipidêmicas e possivelmente uma antecipação na faixa etária de ocorrência de DAC.

Os intervalos interpercentis do perfil lipídico de crianças e adolescentes obtidos neste estudo indicam a alta prevalência de dislipidemias nesta região. Estudos em outras comunidades e em outras regiões do país devem ser realizados para a identificação das dislipidemias e de outros fatores de risco para a DAC, e atuação em seu tratamento e prevenção. Destaca-se neste estudo a característica retrospectiva econômica do modelo utilizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mansur AP, Favarato D, Souza MFM, Avakian SD, Aldrigui JM, César LAM, et al. Trends in Death from Circulatory Diseases in Brazil Between 1979 and 1996. *Arq Bras Cardiol.* 2001;76:504-10.
2. Castanho VS, Oliveira LS, Pinheiro HP, Oliveira HCF, de Faria EC. Sex differences in risk factors for coronary heart disease: a study in a Brazilian population. *BMC Public Health.* 2001;1:3.
3. Santos RD, Sposito AC, Santos JE, Fonseca FH, Moriguchi EH, Martinez TLR, et al. PANDORA – Survey of Brazilian Cardiologists about Cholesterol Reduction. *Arq Bras Cardiol.* 2000;75:289-302.
4. Castelli WP. Lipids, risk factors and ischaemic heart disease. *Atherosclerosis.* 1996;124:S1-9.
5. Gulati S, Saxena A. Study of Lipid Profile in Children of Patients with Premature Coronary Artery Disease. *Indian Pediatrics.* 2003;40:556-60.
6. Romaldini CC, Issler H, Cardoso AL, Diamant J, Forti N. Fatores de risco para aterosclerose em crianças e adolescentes com história familiar de doenças arterial coronariana prematura. *J Pediatr.* 2004;80:135-40.
7. Coronelli CLS, Moura EC. Hipercolesterolemia em escolares e seus fatores de risco. *Rev Saúde Pública.* 2003;37:24-31.

8. Moura EC, Castro CM, Mellin AS, Figueiredo DB. Perfil lipídico em escolares de Campinas, SP, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 2000;34:499-505.
9. Seki M, Seki MO, Niyama FP, Pereira PG Jr, Seki MO, Matsuo T, et al. Determinação dos intervalos de referência para lipídeos e lipoproteínas em escolares de 10 a 19 anos de idade de Maracá (SP). *J Bras Patol Med Lab*. 2003;39:309-16.
10. National Cholesterol Education Program (NCEP). Third Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *Circulation*. 2002;24:3144-421.
11. III Diretrizes Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol*. 2001;77:4-48.
12. Martinez TLR, Santos RD, Armaganijan D, Torres KP, Loures-Vale A, Magalhães ME, et al. National Alert Campaign about Increased Cholesterol. Determination of Cholesterol Levels in 81.262 Brazilians. *Arq Bras Cardiol*. 2003;80:635-8.
13. Rabelo LMR, Viana RM, Schimith MA, Patin RV, Valverde MA, Denadai RC, et al. Risk Factors for Atherosclerosis in Students of a Private University in São Paulo – Brazil. *Arq Bras Cardiol*. 1999;72:575-80.
14. Guimarães AC, Lima M, Mota E, Lima JC, Martinez T, Conti A, et al. The Cholesterol Level of a Selected Brazilian Salaried Population: Biological and Socioeconomic Influences. *CVD Prevention* 1998;1:306-17.
15. Nicolau JC, Bechara DL, Nascimento SD, Greco OT, Jacob JL, Lorga AM. The cholesterol profile in the city of São José do Rio Preto. *Arq Bras Cardiol*. 1992;59:433-40.
16. Kwiterovich PO. Plasma Lipid and Lipoprotein Levels in Childhood. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;623:90-107.

17. Medicare, Medicaid and CLIA programs; revision of the laboratory regulations for the Medicare, Medicaid, and Clinical Laboratories Improvement Act of 1967 programs-HCFA. Final rule with comment period. Fed Regist. 1990; 55:9538-610.
18. Medicare program; Medicare and laboratory certification program; enforcement procedures for laboratories-HCFA. Final rule. Fed Regist 1992;57:7218-43.
19. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde: DATASUS. c2004 – [citado 18 de maio de 2005]. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>.
20. Strong JP, McGill HC Jr. The pediatric aspect of atherosclerosis. J Atheroscler Res. 1969;9:251-65.
21. Elias MC, Bolívar MSM, Fonseca FAH, Martinez TLR, Angelini J, Ferreira C, et al. Comparação do Perfil Lipídico, Pressão Arterial e Aspectos Nutricionais em Adolescentes, Filhos de Hipertensos e de Normotensos. Arq Bras Cardiol. 2004;82:139-42.
22. Sorof J, Daniels S. Obesity Hypertension in Children: A Problem of Epidemic Proportions. Hypertension. 2002;40:441-7.
23. Reinehr T, Wabitsch M, Andler W, Beyer P, Bottner A, Chen-Stute A, et al. Medical care of obese children and adolescents. APV: a standardised multicentre documentation derived to study initial presentation and cardiovascular risk factors in patients transferred to specialised treatment institutions. Eur J Pediatr. 2004;163:308-12.

MANUSCRITO 3

DETERMINANTS OF LIPOPROTEIN(a) CONCENTRATION IN NORMOLIPIDEMIC INDIVIDUALS WITHOUT CLINICAL ATHEROSCLEROSIS

F. Dalpino¹; F. L. Sodré¹; L. N. Castilho^{1,2}; E. C. de Faria^{1,2}

Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas¹, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental², Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil

Abstract

Background: Lipoprotein (a) is an independent risk factor for coronary artery diseases. The main objective of this work is evaluate the determinants of plasma Lp(a) concentrations in normolipidemic individuals. Methods: Immunonephelometric quantification of Lp(a) was made in one hundred and seventy-seven volunteers. A multivariate analysis was employed to verified the influence of clinical and biochemical parameters on plasma Lp(a) concentration. Results: the Lp(a) concentration in this population ranged from 0.7 to 40 nmol/L. The Lp(a) predictors were: sex (women) , HDL₂tg (negative) and LDL-chol (positive). Conclusions: The modulation of plasma Lp(a) concentration in this study points to pro-atherogenic lipoprotein associations.

Introduction

A metanalysis including prospective studies found that Lp(a) is an independent risk factor for coronary artery disease (CAD) in both sexes (1).

It is demonstrated that this particle deposits on atherosclerotic plaques and that this accumulation would be proportional to its plasma concentration (2); moreover, this deposit would be ubiquitous on human atheroma plaques.

The inter-individual variation in plasma concentrations of Lp(a) is mainly under genetic control and, despite all its clinical and physiopathologic role in atherogenesis there are very few reports in the literature about the plasma reference ranges of Lp(a). The objective of this work was to determine the influence of clinical and biochemical parameters on Lp(a) plasma concentrations in 177 healthy individuals.

Material and Methods

One hundred and seventy-seven volunteers, 88 men and 89 women aged between 20 and 86 years, normolipidemic according to National Cholesterol Expert Panel (NCEP) III criteria were admitted to the present study. The population studied was quite mixed with a predominance of whites, 60%; 40% were afro Brazilians.

The subjects were examined in addition to application of a clinical questionnaire aiming to exclude cardiovascular disease. Smokers, patients with renal, hepatic or endocrine diseases were excluded from the study.

The blood samples were collected after a twelve-hour fast, in order to evaluate the plasma lipoprotein and apolipoprotein profiles (Tchol, LDL-chol, HDL-chol, HDL-subfractions (HDL₂ and ₃), triglycerides (Tg), apolipoprotein AI (apoAI) and apolipoprotein B (apoB100).

The Lp(a) quantification was carried out by immunonephelometry (3) with N Latex Human Lp(a) in the nephelometer BN II (Dade Behring), according to technical orientation of the manufacturer. HDL subfraction isolation was achieved by a microultracentrifugation technique.

Student t test, monofactorial variance analysis (ANOVA) with the post hoc Tukey test and Spearman correlation were used. A stepwise multivariate regression analysis was performed having Lp(a) as the dependent variable and age, sex and the lipid parameters measured as the independent ones. All statistical analyses were significant when the *p* value was lower than 0.05.

Results

The inter and intra-assay coefficients of variation of the Lp(a) assay were respectively: 5 % and 3% at 9 nmol/L.

The Lp(a) values did not present a Gaussian distribution and required logarithmic transformation. The 25% and 75% interpercentile range (IP) comprised 1.7 and 8 nmol/L, and the median was 5 nmol/L. The Lp(a) concentration in this population, ranged from 0.7 to 40 nmol/L.

The sub-groups at increased risk for CAD according to Lp(a) values higher than 10 nmol/L were as: 40 individuals (23% of the total population); 63% were women compared to 37% of men, $p<0.001$; individuals with a BMI higher than 25Kg/m^2 , 33% compared to 20% with BMI lower than 25Kg/m^2 , $p<0.001$ and in the higher (38y and up) and lower (20 to 25y) age tertiles, respectively 35% and 18%, $p<0.001$.

Tchol, LDL-chol and apoB100 correlated significantly with Lp(a), suggesting another possible mechanism for the atherogenicity of hypercholesterolemic states.

The multivariate analysis indicated that the Lp(a) predictors are: sex, HDL₂Tg and LDL-chol as in: $\ln \text{Lp (a)} = 13.396 - 0.397 \text{ sex} - 0.026 \text{ HDL}_2\text{Tg} + 0.017 \text{ LDL-chol}$ (Table 1).

Table 1: INFLUENCE OF CLINICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS ON PLASMA LIPOPROTEIN (a) CONCENTRATION IN A HEALTHY POPULATION

Independent variables: Tchol, Tg, LDL-chol, HDL-chol, HDL₂chol, HDL₂Tg, HDL₃chol, HDL₃Tg, Apo AI, Apo B100, sex, age and BMI. The significant associations are shown below:

Parameters	Value	Std.Error	t value	P value
Intercept	13.396	0.3515	38.111	0.0002
Sex	-0.3976	0.1573	-25.281	0.0124
HDL ₂ Tg	-0.0259	0.0111	-23.356	0.0207
LDLchol	0.0169	0.0030	56.685	0.0000

Discussion

A high-resolution phenotyping system for Lp(a) for distinguishing genetic isoforms was not used in this study but the latex-enhanced immunonephelometric assay (Behring, Germany) in the Behring Nephelometer system was used and previously validated with the immunoenzymometric assay.

The values found in this study are similar to those obtained in an Italian population (4), higher than those found for the Caucasian population in the Framingham study but lower than those found for a Spanish population (5). Such differences may be partly due to the methods employed for Lp(a) measurement, since none of the studies utilized the same methodology employed in the present investigation, but rather other like ELISA, a lectin-based assay (LipoproTM) and immunoturbidimetry associated with latex particles.

The main modulators of Lp(a) plasma concentration were the female sex, probably via an estrogen effect and HDL₂Tg (negative) and LDL-chol. The last two indicate a pro-atherogenic association of the three lipoproteins.

Conclusion

Lp(a) in plasma was modulated by the female sex and concentrations of HDL₂Tg (negatively) and LDL-chol (positively).

A high number of individuals presented values above 10nmol/L the cut-off point recommended by the NCEP.

References

1. Danesh J, Collins R, Peto R. Lipoprotein (a) and coronary heart disease: meta-analysis of prospective studies. *Circulation* 2000; 102: 1082-1085
2. Rath M, Niendorf A, Reblin T, Dietel M, Krebber HJ, Beisiegel U. Detection and quantification of lipoprotein(a) in arterial wall of 107 coronary bypass patients. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 579-592.
3. Lippi G, Ruzzenente O, Brentegani C, Pierotti A, Guidi G. Evaluation of the analytical performances of a new fully automated commercial immunonephelometric assay for lipoprotein(a). *Clin Chem Lab Med.* 1998; 36: 719-723.
4. Cicero FG, Panourgia MP, Linarello S, D'Addato S, Sangiorgi Z, Gaddi A. Serum lipoprotein(a) levels in a large sample of subjects affected by familial combined hyperlipoproteinaemia and in general population. *J Cardiovasc Risk* 2003; 10: 149-151.
5. Simó JM, Camps J, Gómez F, Ferre N, Joven J. Evaluation of a fully-automated particle-enhanced turbidimetric immunoassay for the measurement of plasma lipoprotein(a). Population-based reference values in an area with low incidence of cardiovascular disease. *Clin Biochem* 2003; 36: 129-134.

MANUSCRITO 4

BIOLOGICAL RHYTHMS IN SERUM LIPIDS AND LIPOPROTEINS OF A BRAZILIAN POPULATION CORRELATE WITH THE PREVALENCE OF CARDIOVASCULAR DISEASE

Fabio Dalpino¹, Luiz Menna-Barreto², Helena Oliveira³, Eliana de Faria¹

¹Department of Clinical Pathology – School of Medical Science and ³Department of Physiology – Institute of Biology of the State University of Campinas; ²Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Science of the University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

ABSTRACT

Background: Rhythmic patterns were demonstrated for lipids and lipoproteins and were object of extensive research, mainly due to the fact that dyslipidemia is associated with a higher risk of coronary artery disease. This study evaluated the occurrence of biological rhythms in serum lipids and lipoproteins, effects of sex, age, dyslipidemia and their correlations with atherosclerotic disease in a Brazilian population. Methods: Retrospective laboratory study was carried out to evaluate the results of lipid profiles from individuals registered at a referral University Hospital in Campinas, State of São Paulo, during 8 years, from 1996 to 2003. The studied population was composed of individuals of both sexes and all ages totaling 38,579 participants. The number of exams performed per parameter was: 88,587 for cholesterol, 66,265 for HDL-cholesterol, 61,828 for LDL-cholesterol and 85,254 for triglycerides, totalizing 301,934 measurements. Statistical analyses were carried out using the SAS program and the temporal analysis used the Cosinor method. Results: Significant seasonal rhythmicity was observed in cholesterol ($p=0.002$), LDL-cholesterol ($p<0.001$) and HDL-cholesterol ($p<0.001$), with maximum values in the winter and minimum values in the summer. Triglycerides did not present significant differences. Sex changed triglycerides rhythm, but no age differences were found among the four parameters. Dyslipidemia attenuated HDL-cholesterol rhythm. The positive cross-

correlation between the rhythms of cholesterol and LDL-cholesterol and the prevalence of manifestations of atherosclerosis suggests the participation of seasonality on cardiovascular disease (CVD) occurrence. Conclusion: The biological rhythms detected in serum cholesterol, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol should be considered a significant cause of pre-analytical variation in these laboratory tests.

INTRODUCTION

Laboratory exams are subject to several interfering aspects and even healthy individuals may present variations stemming from biological and/or laboratory factors, generating problems in outcome interpretation of exams.

Typically, these factors have been divided into pre-analytical, occurring before and during collection; analytical, related to manipulation, processing and analysis of samples; and post-analytical, including transcription and access to results (1).

As a consequence of laboratory technological improvement, generalized information technology and strict quality control systems, a marked decrease in analytical and post-analytical variability has taken place in clinical laboratories (2). Accordingly, studies have preferably focused on the origin of pre-analytical mistakes, responsible for a larger percentage of variation if compared with the analytical ones (3,4). Among the biological components currently being investigated is the intra-individual, which is inherent to the individual and changes over time. When intra-individual factors were investigated making use of statistical procedures, a rhythmic pattern could be demonstrated for some parameters, with well-established cycles along time (5,6,7).

Few experiments have evaluated seasonal variations of biochemical parameters routinely analyzed in clinical laboratories, although these rhythms would impact medical decisions (5,8,9). Due to the fact that dyslipidemias are a strong risk factor for coronary artery disease (CAD), lipid serum profiles have been the object of much research (10,11,12).

Studies have demonstrated cholesterol elevation and HDL-cholesterol reduction in winter that are not associated with changes in diet and physical activity, but related to increase in morbidity/mortality by myocardial infarction (12,13,14). Nevertheless, some studies have not observed this rhythmicity (15,16). As for LDL-cholesterol, marked elevations are observed in the winter when compared to the summertime (11,14). Triglycerides may vary seasonally without relation to cholesterol variations, but studies diverge about the time of year that shows the highest levels (11,14,16).

In this study, we evaluated the occurrence of biological rhythms in lipids and serum lipoproteins and measured their correlations with the prevalence of cardiovascular disease in a Brazilian population. We also looked into sex and age effects on the presence of rhythms.

MATERIALS AND METHODS

A retrospective study was carried out to evaluate the results of serum lipids and lipoproteins from individuals registered at a referral University Hospital in Campinas, State of São Paulo (Hospital das Clínicas (HC), Unicamp), during the years of 1996 to 2003. This information was generated by the database program of the Computer System of the HC. The population of Campinas is composed of 1,031,887 inhabitants, with 63% of Caucasians; 4% are illiterate with an average monthly salary value of US\$408.00 (17).

The studied population, totalizing 38,579 participants, included individuals of both sexes and all age groups, from 1 month to 124 years old (y), product of racial miscegenation and with a very heterogeneous social-economic background.

After fasting for 10-12 hours, blood samples were collected in the morning (07:00-09:00h) in dry, sterile vacuum tubes (Vacutainer, Beckton & Dickinson). Within a period of up to two hours after collection, the serum was separated from the blood using low speed refrigerated centrifugation.

The exams were performed in an automatic chemical analyzer (Hitachi 917, Roche-Diagnostics) under standardized conditions following the manufacturer's instructions. Control materials (Precinorm and Precipath, Roche) were systematically used to determine analytic variability and the maintain accuracy. Colorimetric-enzymatic methods were used for cholesterol and triglycerides. HDL-cholesterol was analyzed by colorimetric-enzymatic methods with precipitation until 1999, and later by direct homogeneous methods. LDL-cholesterol was measured by Friedewald equation until 2000, and later by direct homogeneous methods.

The number of exams performed per parameter was: 88,587 for cholesterol (C), 66,265 for HDL-cholesterol (HDL-C), 61,828 for LDL-cholesterol (LDL-C) and 85,254 for triglycerides (TG), totalizing 301,934 measurements. The data bank also provided information regarding individual identification, sex, age, date and time of blood collection. The number of participants in each group was: 16,851 Males and 21,728 Females; 1,911 of 0-12 y, 1,444 of 13-19 y, 11,019 of 20-39 y, 19,043 of 40-64 y and 5,162 of 65 y or older. Only one lipid profile per year per patient was randomly chosen among ambulatory patients to be analyzed.

The population sample was classified into different groups according to age, defined as children (0-12 y), adolescents (13-19 y), young adults (20-39 y), mature adults (40-64 y) and elderly (65 y and above) and to sex (Males/Females, M/F).

The prevalence of cardiovascular diseases, comprising myocardial infarction, cerebral infarction, atherosclerosis and other vascular diseases from the same area in the state of São Paulo used to measure correlations with the rhythms (in the eight-year period studied) was obtained from the data bank of the Brazilian Health System (DATASUS) (18).

Statistical analyses were carried out by the SAS (Statistical Analysis System, v.8.01, SAS Institute Inc, 1999-2000, Cary, NC, USA.) program and the temporal analyses were carried out using the Cosinor method that tested the presence of biological rhythms throughout the 8-year period. This method consists of a periodic regression analysis that adjusts a cosine function to the temporal series values and is able to detect whether the adjusted curve has significant oscillation or not. The rhythm parameters determined were:

MESOR (the rhythm-adjusted mean), amplitude (the distance from MESOR to the peak of the best fitting cosine curve, approximating the data) and acrophase (the timing of the peak of the best fitting cosine curve approximating the time series data in relation to a reference, 00:00h, December 31) (19,20). The significance of rhythm level detection is expressed by the probability ($p \leq 0.05$).

RESULTS

The studied population comprised 38,579 participants, totaling 301,934 laboratory tests. The mean age was kept constant and equal to 44 years; likewise, all the samples consisted of 44% males and 56% females.

The inter-assay coefficients of variation (CV) for the control materials used in this study were 2.45 and 1.78% for C, respectively for non-altered and pathological controls. The performance of HDL-C and LDL-C was analyzed only with non-altered controls and the variation was 4.35 and 2.41%, respectively. TG presented CV equal to 2.81 and 3.02%, respectively for non-altered and pathological controls. All the variations are much below the total error allowed by the NCEP (21-24).

Table 1 displays the average lipid profile throughout the 8-year period.

TABLE 1: LIPIDS AND LIPOPROTEINS OF THE TOTAL POPULATION IN THE EIGHT-YEAR PERIOD

PARAMETERS	1996-2003			
	n participants ^a	n tests ^a	mean ^b	sd ^b
C	37,815	88,587	206.9	63.2
HDL-C	31,410	66,265	46.7	14.8
LDL-C	30,593	61,828	129.0	46.2
TG	36,952	85,254	171.7	173.2

^an= number of participants or tests; ^b as mg/dL

Table 2 presents the percentage frequencies of dyslipidemia throughout the eight-year period in the total population, males, females and by age. The most frequent dyslipidemia was hypercholesterolemia, present in 18,248 individuals (48% of the total population), in 10,429 mature adults (28% of the total population and 55% of the mature adult), in 2,811 individuals with 65y or more (7% of the total population and 55% of the elderly) and in 11,386 females (30% of the total population and 53% of the female population). Hypoalphalipoproteinemia was the most frequent dyslipidemia in males with 6,696 individuals (21% of total population and 50% of the male population), in 664 adolescents (2% of the total population and 55% of the adolescent population) and in 3,223 young adults (10% of the total population and 36% of the young adult population). Hypertriglyceridemia was the most frequent dyslipidemia in children with 1,142 individuals (3% of the total population and 63% of the children).

TABLE 2: FREQUENCIES OF LIPID PROFILES ABOVE OR BELOW THE NCEP'S CUTOFF LIMITS IN TOTAL POPULATION AND BY SEX AND AGE

Frequencies of Dyslipidemia																
Parameters	Total Population		M ^a		F ^a		0 – 12 y ^b		13 – 19 y		20 – 39 y		40 – 64 y		65 y or more	
	n ^c	% ^d	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
C	18,248	48	6,862	42	11,386	53	669	44	583	41	3,756	34	10,429	55	2,811	55
HDL-C	11,591	37	6,696	50	4,895	27	566	52	664	55	3,223	36	5,563	35	1,575	36
LDL-C	13,279	43	5,064	39	8,215	46	383	38	424	36	2,650	31	7,659	50	2,163	50
TG	13,081	35	5,917	37	7,164	34	1,142	63	674	48	2,695	25	6,734	37	1,836	37

^a M = males or F = females; ^b y= years, ^c n = number of dyslipidemic individuals; ^d percentages based on 37,815 individuals for cholesterol, 31,410 for HDL-cholesterol, 30,593 for LDL-cholesterol and 36,952 for triglycerides.

Figure 1 presents the raw data distribution (mean concentrations) along the eight-year study.

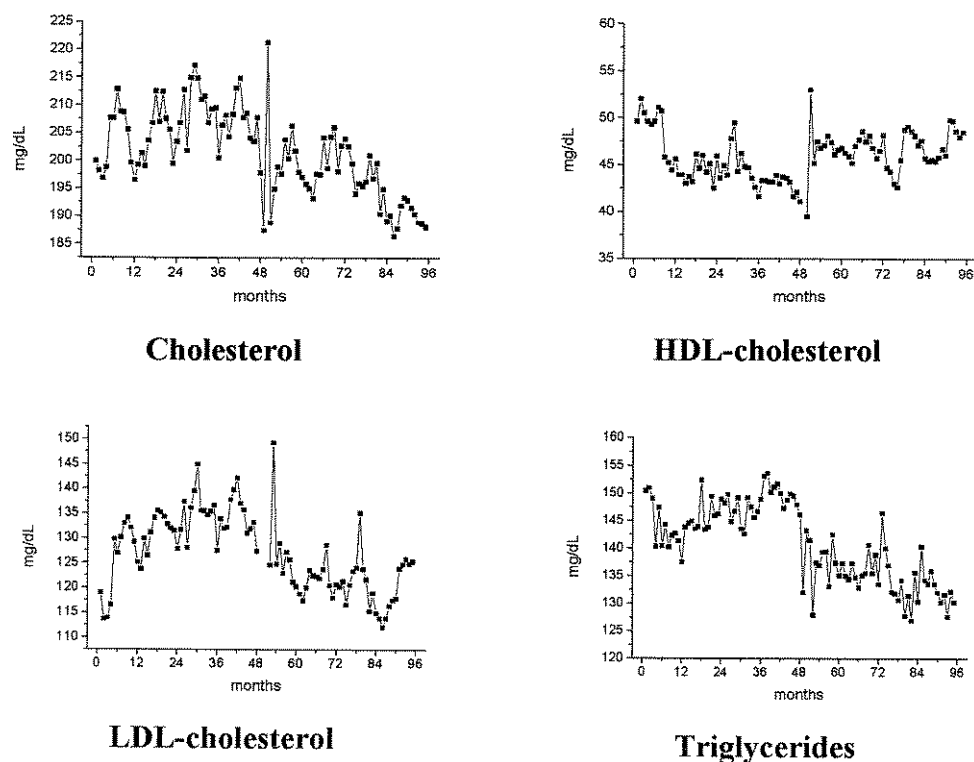
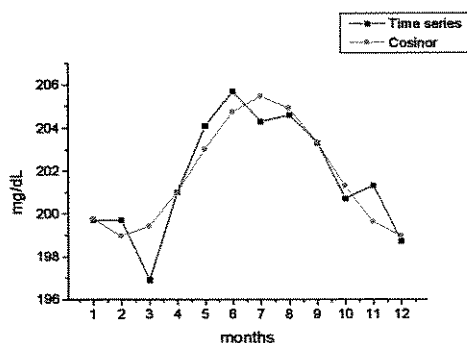
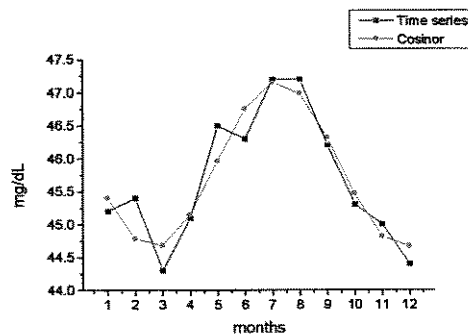


FIGURE 1: DISTRIBUTION OF ANALYTES' CONCENTRATIONS ALONG THE STUDY

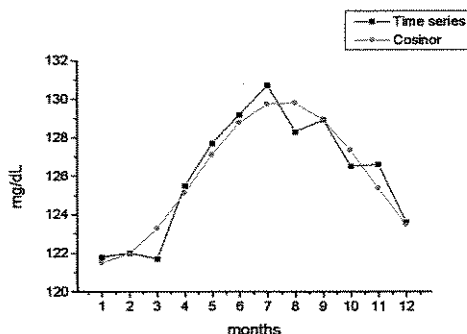
Figure 2 displays the Cosinor analyzes. The measured parameters as shown: M = MESOR (as mg/dL); A = amplitude (as mg/dL); PHI = acrophase (as months of the year: from 1 to 12 (January to December)); TAU = period of rhythm (as months of the years); P = probability of biorhythms.



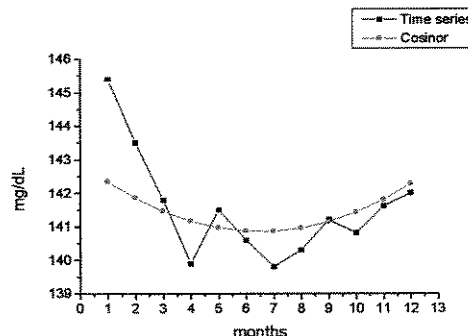
Cholesterol
(M=202.2; A=3.27; Phi=4.92;
Tau=9.9; p=0.002)



HDL-cholesterol
(M=45.9; A=1.26; Phi=4.4;
Tau=9.1; p<0.001)



LDL-cholesterol
(M=125.7; A=4.19; Phi=8.94;
Tau=13.1; p<0.001)

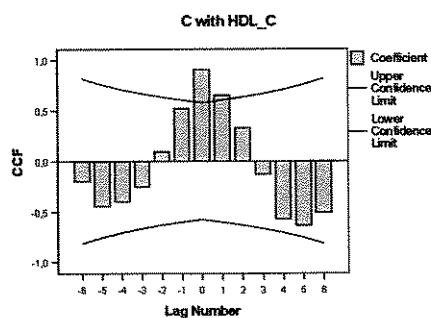


Triglycerides
(M=169.8; A=28.95; Phi=12.2;
Tau=108.5; p=0.200)

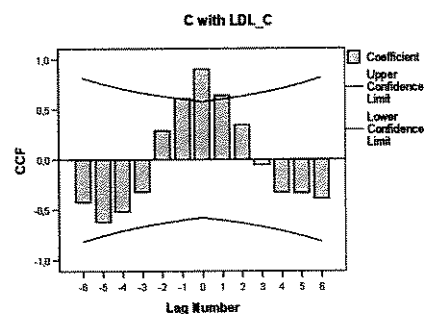
FIGURE 2: COSINOR ANALYSIS PER PARAMETER

Significant seasonal rhythmicity was observed in serum C ($p=0.002$), HDL-C ($p<0.001$) and LDL-C ($p<0.001$) in a 12-month period, with maximum values in the winter and minimum values in the summer. TG did not present significant rhythm.

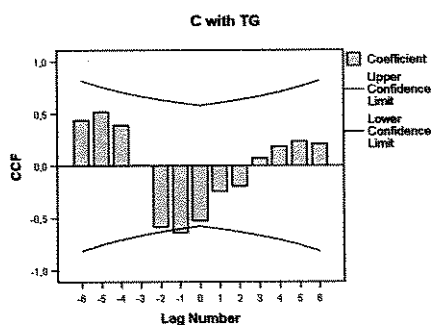
Using a cross-correlation function between each studied parameter, a positive correlation was shown between rhythms of C and HDL-C, C and LDL-C and HDL-C and LDL-C, and a negative correlation between rhythms of C and TG and LDL-C and TG. HDL-C and TG did not show correlation (Figure 3).



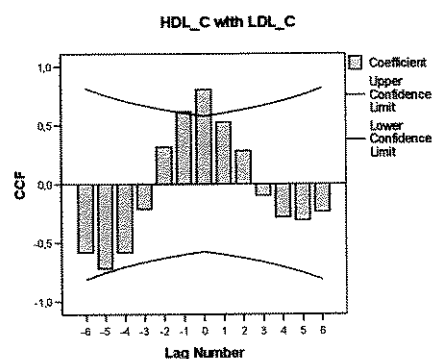
Lag 0 (CCorr=0.904)



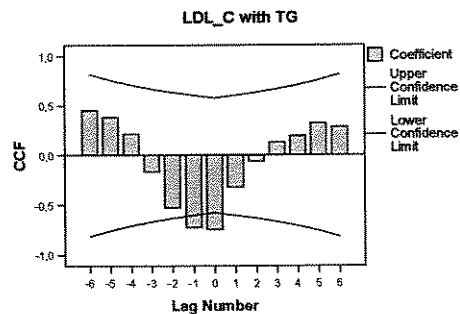
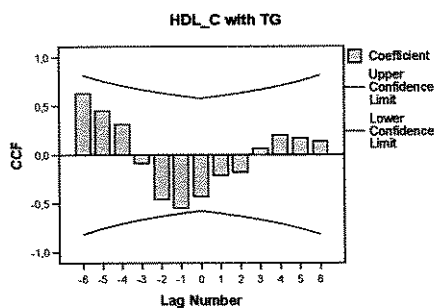
Lag 0 (CCorr=0.902)



Lag -1 (CCorr=-0.640)



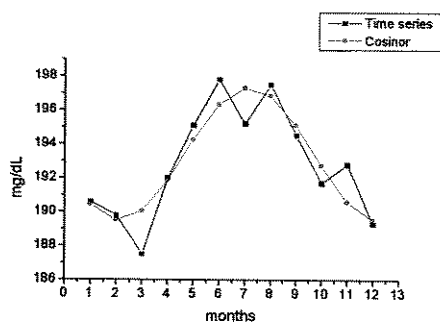
Lag 0 (CCorr=0.805)



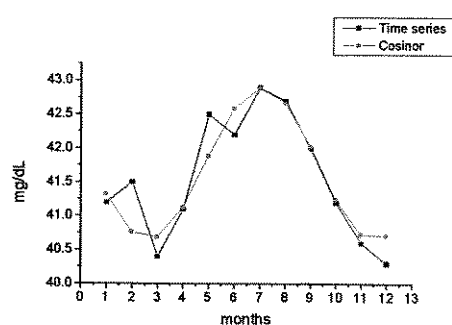
Lag 0 (CCorr=-0.747)

FIGURE 3: CROSS-CORRELATION FUNCTION BETWEEN CHOLESTEROL, HDL-CHOLESTEROL, LDL-CHOLESTEROL AND TRIGLYCERIDES RHYTHMS

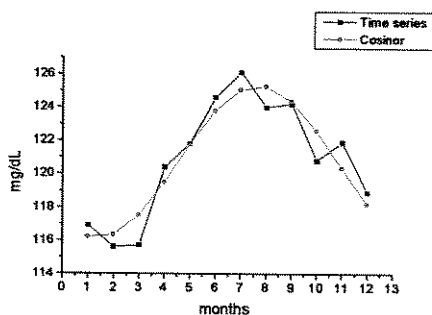
Figures 4 and 5 present the Cosinor analysis by sex. All parameters were rhythmic in both sexes except for TG, only in females. A positive cross-correlation was shown between rhythms of males and females for all parameters, but not for TG.



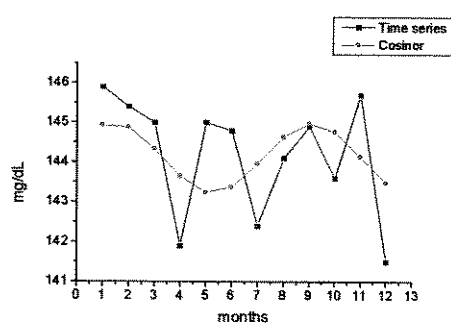
Cholesterol
(M=193.4; A=-3.91; Phi=4.95;
Tau=10.1; $p=0.002$)



HDL-cholesterol
(M=41.8; A=1.13; Phi=1.28;
Tau=8.9; $p=0.001$)

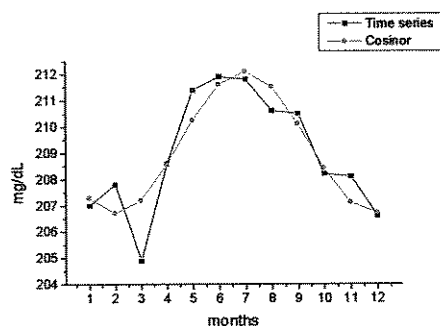


LDL-cholesterol
(M=120.7; A=-4.59; Phi=-0.69;
Tau=12.6; $p<0.001$)

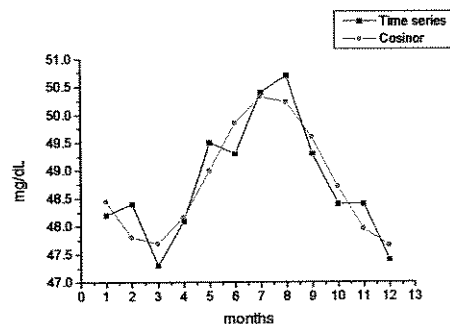


Triglycerides
(M=144.1; A=0.88; Phi=1.15;
Tau=-7.7; $p=0.631$)

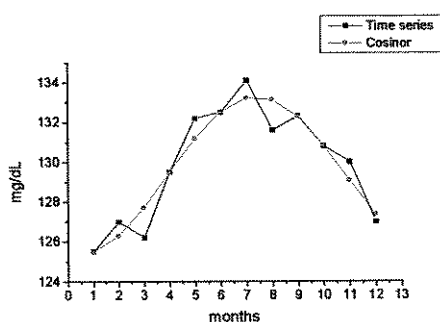
FIGURE 4: COSINOR ANALYSIS FOR MALES



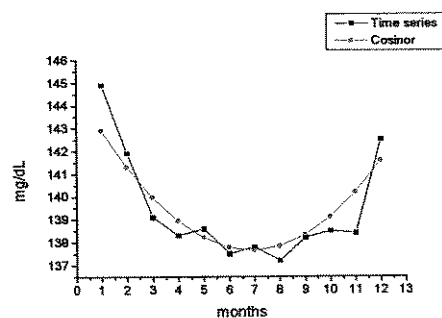
Cholesterol
(M=209.4; A=-2.70; Phi=4.98;
Tau=9.8; $p=0.002$)



HDL-cholesterol
(M=49.0; A=-1.35; Phi=4.47;
Tau=9.3; $p<0.001$)



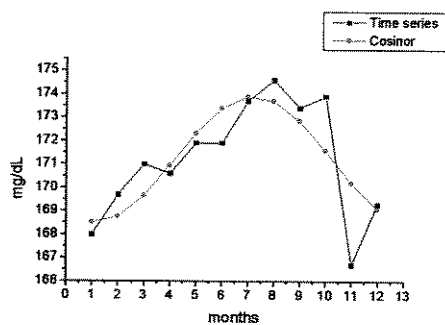
LDL-cholesterol
(M=129.3; A=-3.96; Phi=6.08;
Tau=13.9; $p<0.001$)



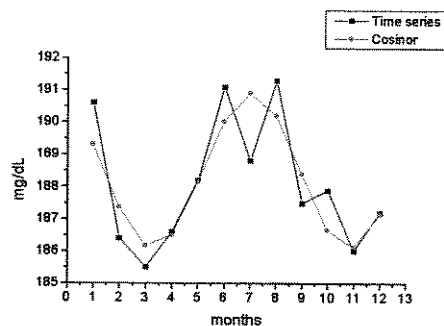
Triglycerides
(M=185.1; A=47.46; Phi=8.87;
Tau=78.2; $p=0.002$)

FIGURE 5: COSINOR ANALYSIS FOR FEMALES

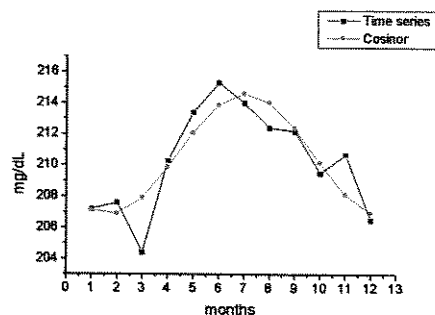
Figures 6-8 present biological rhythms of previously shown significant parameters in the studied population by age groups. The non significant 0-12 age group is not shown.



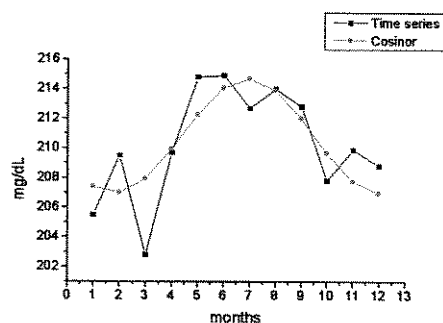
13-19 years
(M=171.2; A=-2.70; Phi=5.69;
Tau=12.2; $p=0.035$)



20-39 years
(M=188.5; A=-2.41; Phi=9.03;
Tau=-0.9; $p=0.013$)

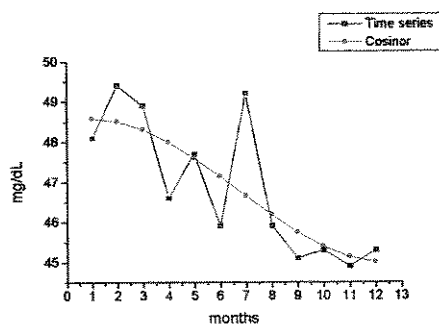


40-64 years
(M=210.7; A=3.89; Phi=10.41;
Tau=-10.8; $p=0.005$)

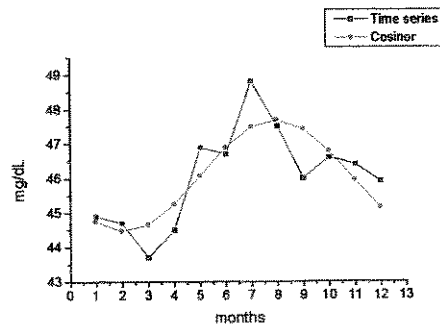


≥ 65 years
(M=210.8; A=-3.87; Phi=5.18;
Tau=10.3; $p=0.044$)

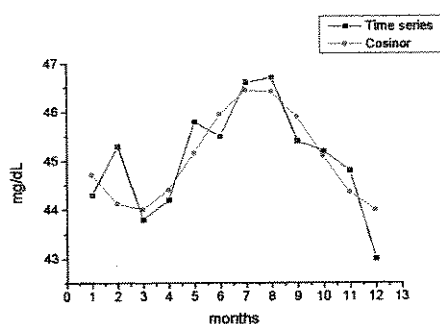
FIGURE 6: COSINOR ANALYSIS FOR CHOLESTEROL BY AGE



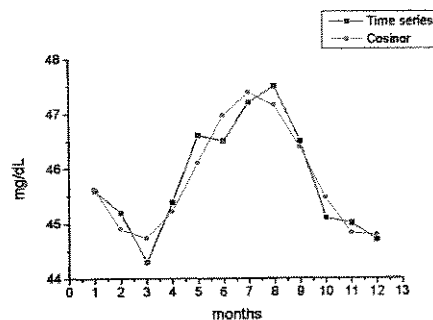
0-12 years
(M=46.8; A=1.80; Phi=6.03;
Tau=23.3; p=0.041)



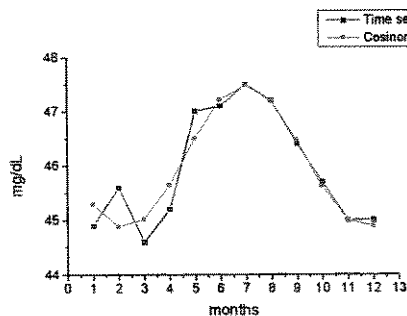
13-19 years
(M=46.1; A=1.60; Phi=8.29;
Tau=11.7; p=0.019)



20-39 years
(M=45.2; A=-1.26; Phi=4.48;
Tau=9.5; p=0.015)

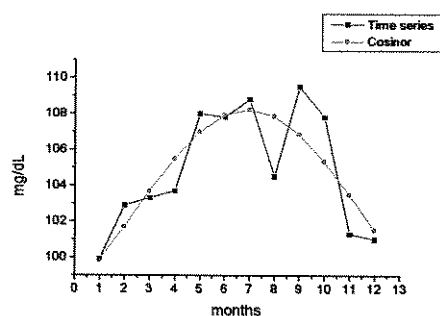


40-64 years
(M=46.1; A=-1.33; Phi=4.32;
Tau=8.8; p<0.001)

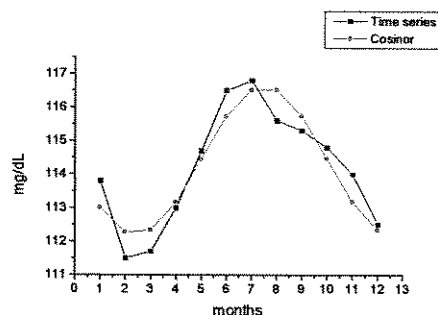


≥ 65 years
(M=46.2; A=-1.31; Phi=4.78; Tau=9.5; p<0.001)

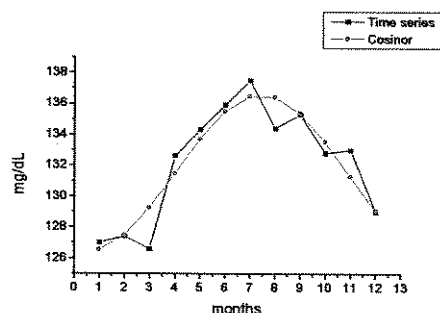
FIGURE 7: COSINOR ANALYSIS FOR HDL-CHOLESTEROL BY AGE



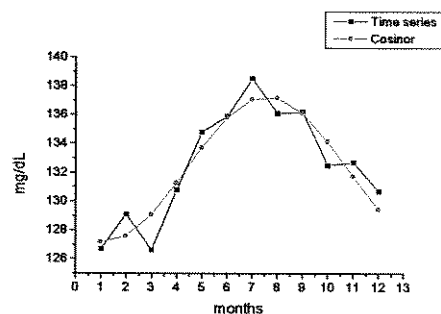
13-19 years
(M=102.5; A=5.71; Phi=-7.02;
Tau=-18.2; $p=0.015$)



20-39 years
(M=114.4; A=2.21; Phi=127.0;
Tau=10.2; $p<0.001$)



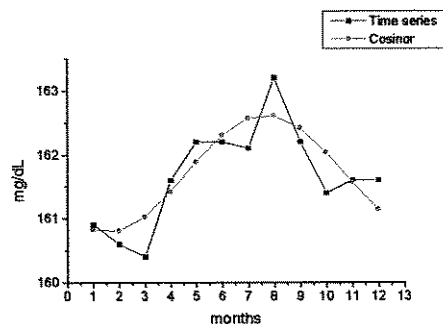
40-64 years
(M=131.5; A=5.06; Phi=-138.5;
Tau=13.7; $p<0.001$)



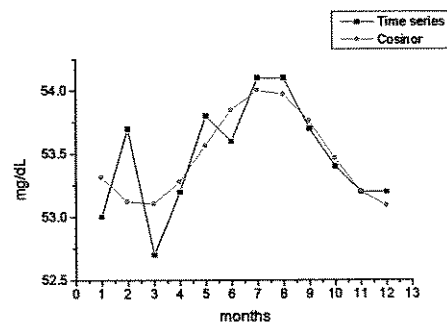
≥ 65 years
(M=132.2; A=5.05; Phi=-178.5;
Tau=-12.9; $p<0.001$)

FIGURE 8: COSINOR ANALYSIS FOR LDL-CHOLESTEROL BY AGE

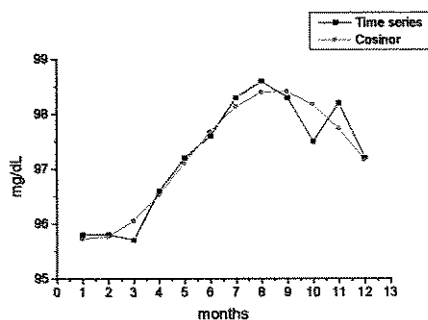
Figure 9 shows the Cosinor analysis for the total population per parameter of non-altered individuals and figure 10 presents the same analysis for pathological values. TG was not rhythmic and HDL-cholesterol rhythm disappeared among dyslipidemic individuals. Positive cross-correlation was shown between rhythms of non-altered and pathological individuals for C and LDL-C. HDL-C and TG did not show correlation.



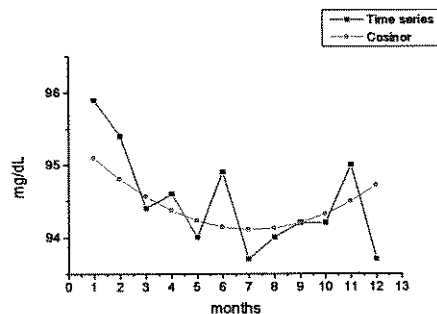
Cholesterol
(M=161.7; A=-0.92; Phi=5.47;
Tau=12.2; **p=0.010**)



HDL-cholesterol
(M=53.5; A=-0.46; Phi=4.59;
Tau=9.5; **p=0.040**)

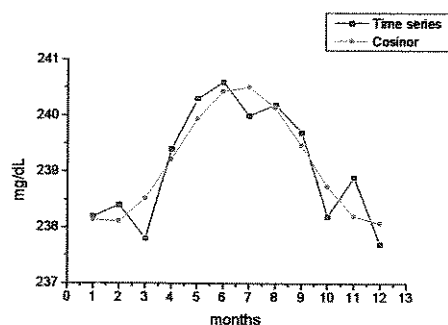


LDL-cholesterol
(M=97.1; A=-1.36; Phi=5.70;
Tau=14.4; **p<0.001**)

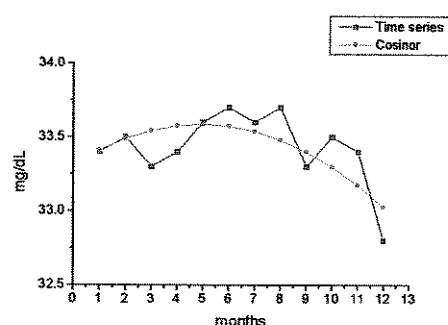


Triglycerides
(M=103.5; A=9.40; Phi=8.89;
Tau=83.7; **p=0.243**)

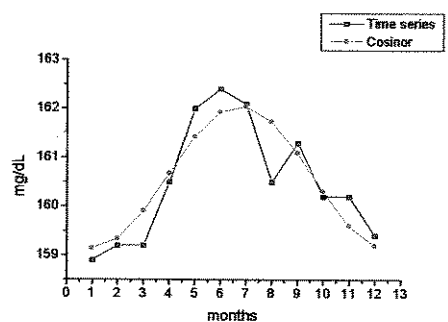
FIGURE 9: COSINOR ANALYSIS FOR NON-ALTERED VALUES



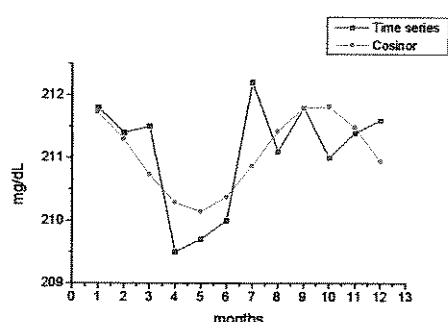
Cholesterol
(M=239.3; A=-1.24; Phi=5.32;
Tau=10.2; p=0.002)



HDL-cholesterol
(M=23.6; A=-10.0; Phi=9.19;
Tau=132.2; p=0.105)



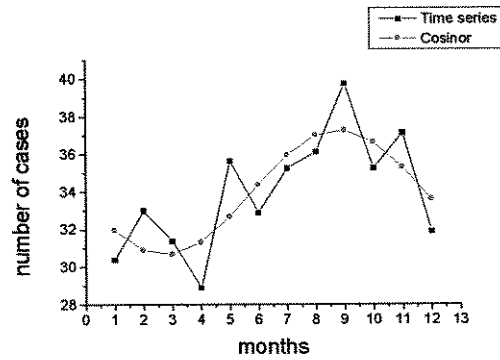
LDL-cholesterol
(M=160.6; A=-1.46; Phi=5.71;
Tau=11.5; p=0.003)



Triglycerides
(M=211.0; A=0.86; Phi=6.15;
Tau=9.37; p=0.149)

FIGURE 10: COSINOR ANALYSIS FOR PATHOLOGICAL VALUES

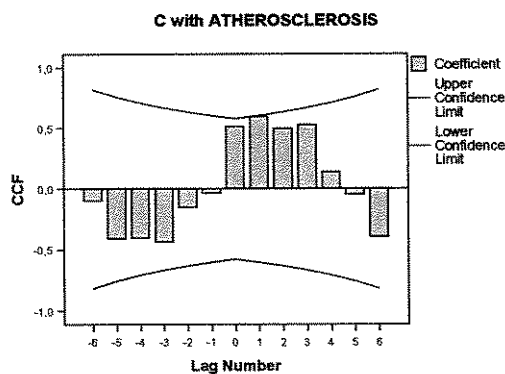
The Cosinor analysis for prevalence of cardiovascular diseases such as myocardial infarction, cerebral infarction, atherosclerosis and other vascular diseases along the study showed seasonal variations for atherosclerosis, with maximum frequency in the winter and minimum values in the summer (Figure 11).



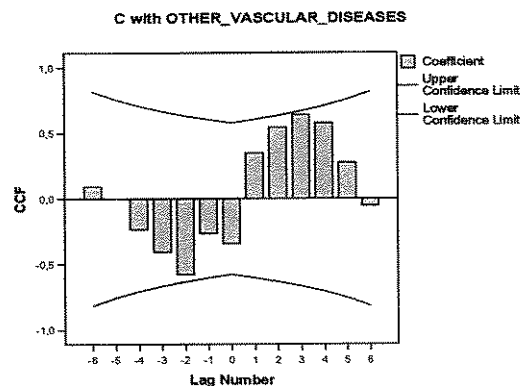
Atherosclerosis
(M=33.9; A=-3.32; Phi=-4.84;
Tau=-12.0; p=0.042)

FIGURE 11: COSINOR ANALYSIS FOR ATHEROSCLEROSIS PREVALENCE

Using a cross-correlation function between each parameter studied and the prevalence of cardiovascular diseases, a positive association was shown between rhythms of C and LDL-C with the prevalence of atherosclerosis and with other vascular diseases (Figure 12).



Lag 1 (CCorr=0.594)



Lag 3 (CCorr=0.637)

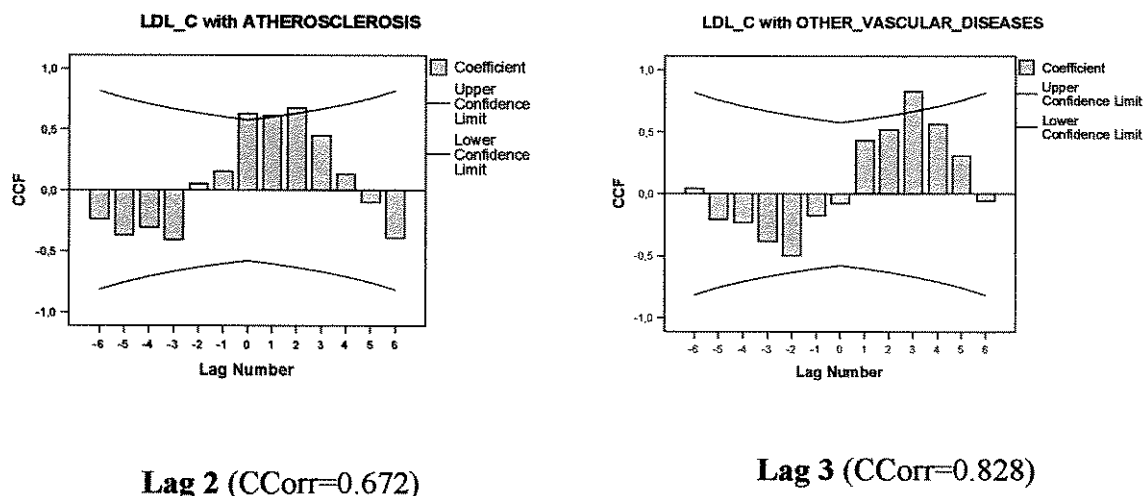


FIGURE 12: CROSS-CORRELATION FUNCTION BETWEEN CHOLESTEROL AND LDL-CHOLESTEROL AND THE PREVALENCE OF CARDIOVASCULAR DISEASES

DISCUSSION

It is important to establish the extent to which biological oscillations affect routine exams in the clinical laboratory, because of its potential to alter medical decisions. Since the pre-analytical components of total error have additive effects these rhythmic oscillations should be considered a component of the pre-analytical variation of these clinical laboratory tests [7]. Some rhythms of large amplitude may pose diagnostic problems and require the establishment and the use of time-qualified usual ranges, so called chronodesms.

This study reported data on 38,579 participants collected along 8 years, totaling 301,934 laboratory determinations of four different serum biochemical variables. Because this is a retrospective study, variables like diet, physical activity or use of medications were not controlled.

The average lipid and lipoprotein concentrations revealed values below the NCEP recommended cutoff points, except for cholesterol and triglycerides that were, respectively, around 4% and 14% above the recommended limit. However, 48% of population present hypercholesterolemia, 37% hypoalphalipoproteinemia, 43% hyperbetalipoproteinemia and 35% hypertriglyceridemia, indicating a very high prevalence of dyslipidemia.

Circannual variations in serum C, HDL-C and LDL-C, with maximum values in winter and minimal ones in summer were detected. TG did not present significant differences. Positive cross-correlation was shown between rhythms of C and HDL-C, C and LDL-C and HDL-C and LDL-C with the same acrophase, and a negative correlation between rhythms of C and TG with different acrophase (1 month before) and LDL-C and TG with the same acrophase. HDL-C and TG did not show correlation.

When the influences of sex were studied, all parameters presented circannual variations in both sexes, except for TG with seasonality present only in females.

Regarding age, with the exception of HDL-C that presented rhythms in all age groups, the other parameters showed seasonality only for those above 13 years old.

Non-altered and pathological values showed the maintenance of their rhythms, with the exception of HDL-C that presented circannual variation only with non-altered values.

Seasonal variation of atherosclerosis's prevalence with maximum values in the winter and minimum values in the summer, in addition to the same oscillation of C, HDL-C and LDL-C serum levels were observed. The correlation analysis presented positive association of C and LDL-C with atherosclerosis and with other vascular diseases, with a 3-month lag time to event 1.

Similar results of circannual variations in serum lipids and lipoproteins were found by Donahoo et al. that observed values significantly higher of C in the winter if compared with the summer and a borderline significance for LDL-C rhythm, although HDL-C and TG did not present variation [14].

Nazir et al. studying 22 healthy individuals along a one-year period observed reduction in the levels of C, HDL-C and LDL-C in the summer if compared with the other seasons, without variation in the TG levels [11].

Similar results were described by Gordon et al. studying 1,446 hypercholesterolemic men followed for 7 years as placebo group of a scientific research and found seasonal variations in C, HDL-C and LDL-C with peaks in winter and nadir in summer. TG presented irregular rhythms with maximum values in the fall and minimum values in the spring [25].

Mavri et al. evaluating risk factors for CAD demonstrated similar results in the coldest months, even so with significant reduction of HDL-C [26].

Several other studies showed also circannual rhythms for C with maximum values in the winter and minimum in the summer, speculating that this variation is due to alterations in the diet, physical activity or hormonal factors, associated or not with increase in the risk of CAD [10,27,28].

Fuller et al., Reilly et al. and Letellier and Desjarlais did not find seasonal variation in these analyses either; even so all these studies presented circannual variation for TG, with the only difference found in the months of peak and nadir [8,16,29].

Letellier and Desjarlais, analyzing 2,600 blood samples during 4 years, observed TG elevation in the winter with decline in the fall and they suggest that this is an adaptation mechanism to the cold weather or due to the increased consumption of fat and drink [8]. Reilly et al. studying elderly subjects presented reduction of TG serum levels in the spring when compared with the other seasons, in both sexes. They mention other studies that investigated a larger consumption of calories with consequent weight increase in the fall/winter when compared with the spring/summer, believing that there is a combination of factors such as diet and endogenous rhythms [29].

Fuller et al. reported elevations in serum TG from summer to winter and reduction from spring to fall, without significant variation in diet, weight and physical activities [16].

Blüher et al. studying 147 healthy individuals for 2 years divided the participants into 3 groups: one composed of 19 strict vegetarians, another of 14 professional athletes and a control with 114 subjects ranging from 20-26 and 40-48 years old. They demonstrated circannual rhythms for C and HDL-C in all groups, with increase in the winter and decrease in the summer. They concluded that annual rhythms are not primarily induced by seasonal differences in dietary intake or physical activity. Therefore, the seasonal variation is most likely determined by endogenous factors or factors directly related to seasonal changes in the environment [13].

In an American study developed by Mustad et al. with 27 year-old women they observed results opposed to the presented by Blüher et al., since the C and the HDL-C values did not vary in the groups with and without controlled diet. Even so they observed an increase in components related with CAD risk, LDL-C and apolipoprotein B in the fall and winter [15].

Dannenberg et al. evaluated 1,598 men and 1,762 women aged between 20 and 69 years for 4 years and observed an increase in consumption of kilocalories in physical activities in the summer when compared with the winter associated with an elevation in the HDL-C serum levels in the same period. LDL-C did not have consistent differences [30]. They described therefore an inverse relationship between physical activity and cardiovascular risk and no other studies in the literature showed similar analysis.

Confirming these data, Matthews et al. analyzing healthy adults found variation in the daily physical activity along the year, with significant reduction in the winter for both sexes [31].

Van Rossum et al. followed 19,019 males aged between 40 and 69 years for 25 years, observing elevation in CAD mortality in the winter months when compared with the summer.

Masumura et al. studying Wistar rats divided into groups with and without physical activity suggested that moderate physical training in the summer protects the arteries from thrombogenesis and lipid accumulation, since these illnesses were significantly more frequent in sedentary rats [12,32].

Therefore, the distinction of exogenous (brightness and temperature) or endogenous factors (genetically established) effects as causes of seasonal variation in laboratory exams is difficult because many exogenous factors can act as synchronizers of endogenous rhythmic functions [18,33].

Some discrepancies between this and other studies may be inherent to climatic variations in each country. The geographical location of the study aiming at the detection of seasonal rhythmicity is very important. The circannual acrophase may depend on the latitude as already demonstrated [34,35,36]. Countries with higher latitudes like the European have well defined seasons with significant changes in climatic conditions that are very different from most of Brazil.

The biological rhythms of serum cholesterol, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol should be considered a significant cause of pre-analytical variation in these laboratory tests. Triglycerides did not present significant differences in this study. Sex changed triglycerides rhythm but no age differences were found among the four parameters; dyslipidemia attenuated the HDL-cholesterol rhythm. The cross-correlation analysis between the rhythms of cholesterol and LDL-cholesterol and the prevalence of manifestations of atherosclerosis is suggestive of an impact of seasonality on cardiovascular disease in this region of Brazil.

REFERENCES

- 1- Irjala KM, Gronroos PE. Preanalytical and analytical factors affecting laboratory results. *Ann Med* 1998;30(3):267-72.
- 2- Rifai N, Dufour R, Cooper GR. Preanalytical variation in lipid, lipoprotein, and apolipoprotein testing. In: Rifai N, Warnick R, Dominiczak M, eds. *Handbook of Lipoprotein Testing*. Washington, DC: AACC Press, 1997: chapter 4.
- 3- Haus E, Nicolau GY, Lakatua DJ, Sackett-Lundeen L, Petescu E, Swoyer J. Chronobiology in laboratory medicine. *Ann Ist Super Sanità* 1993;29(4):81-606.

- 4- Wallaert C, Babin PJ. Age-related, sex-related, and seasonal changes of plasma lipoprotein concentration in trout. *J Lipid Research* 1994;35:1619-33.
- 5- Montalbetti N. Chronobiology in the clinical laboratory. *Chronobiologia* 1989;16(4):409-15.
- 6- Vanderschueren D, Gevers G, Dequeker J, Geusens P, Nijs J, Devos P et al. Seasonal variation in bone metabolism in young healthy subjects. *Calcif Tissue Int* 1991; 49:84-9.
- 7- Haus E, Lakatua DJ, Sackett-Lundeen LL, Swoyer J. Chronobiology in laboratory medicine. In: Reitveld WJ, ed. *Clinical Aspects of Chronobiology*. The Netherlands: Meducation Service Hoechst, 1984:13-82.
- 8- Letellier G, Desjarlais F. Study of seasonal variations for eighteen biochemical parameters over a four-year period. *Clin Bioch* 1982;15(4):206-11.
- 9- Gidlow DA, Church JF, Clayton BE. Seasonal variations in haematological and biochemical parameters. *Ann Clin Biochem* 1986;23(Pt.3):310-6.
- 10- Kristal-Boneh E, Harari G, Green MS. Circannual variations in blood cholesterol levels. *Chronobiol Int* 1993;10(1):37-42.
- 11- Nazir DJ, Roberts RS, Hill SA, McQueen MJ. Monthly intra-individual variation in lipids over a 1-year period in 22 normal subjects. *Clin Biochem* 1999;32(5):381-9.
- 12- van Rossum CTM, Shipley MJ, Hemingway H, Grobbee DE, Mackenbach JP, Marmot MG. Seasonal variation in cause-specific mortality: are there high-risk groups? 25-year follow-up of civil servants from the first Whitehall study. *Int J Epidemiol* 2001;30(5):1109-16.
- 13- Bluher M, Hentschel B, Rassoul F, Richter V. Influence of dietary intake and physical activity on annual rhythm of human blood cholesterol concentrations. *Chronobiol Int* 2001;18(3):541-57.

- 14- Donahoo WT, Jensen DR, Shepard TY, Eckel RH. Seasonal variation in lipoprotein lipase and plasma lipids in physically active, normal weight humans. *J Clin Endocr and Met* 2000;85(9):3065-8.
- 15- Mustad V, Derr J, Channa Reddy C, Pearson TA, Kris-Etherton PM. Seasonal variation in parameters related to coronary heart disease risk in young men. *Atheroscl* 1996;126:117-29.
- 16- Fuller JH, Grainger SL, Jarrett RJ, Keen H. Possible seasonal variation of plasma lipids in a healthy population. *Clin Chem Acta* 1974;52:305-10.
- 17- Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2000> (Accessed April 2005).
- 18- Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. DATASUS. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defhttm.exe?sih/cnv/misp.def> (Accessed April 2005).
- 19- Marques N, Menna-Barreto L, eds. *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. São Paulo: Edusp, 1997: 276pp.
- 20- Nelson W, Tong YL, Lee JK, Halberg F. Methods for Cosinor-rhythmometry. *Cronobiologia* 1979;6(4):305-23.
- 21- Current status of blood cholesterol measurement in clinical laboratories in the United States: a report from the Laboratory Standardization Panel of the National Cholesterol Education Program. *Clin Chem* 1988;34(1):193-201.
- 22- National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of low-density lipoprotein cholesterol: executive summary. The National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurement. *Clin Chem* 1995;41(10):1414-20.

- 23- National Cholesterol Education Program recommendations for triglyceride measurement: executive summary. The National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurement. Clin Chem 1995;41(10):1421-26.
- 24- National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of high-density lipoprotein cholesterol: executive summary. The National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurement. Clin Chem 1995;41(10):1427-33.
- 25- Gordon DJ, Hyde J, Trost DC, Whaley FS, Hannan PJ, Jacobs DR et al. Cyclic seasonal variation in plasma lipid and lipoprotein levels: the lipid research clinics coronary primary prevention trial placebo group. J Clin Epidemiol 1988;41(7):679-89.
- 26- Mavri A, Guzic-Salobir B, Salobir-Pajnic B, Kleber I, Stare J, Stegnar M. Seasonal variation of some metabolic and haemostatic risk factors in subjects with and without coronary artery disease. Blood Coagul Fibrinolysis 2001;12(5):359-65.
- 27- Durrington PN. Biological variation in serum lipid concentration. Scand J Clin Lab Invest Suppl 1990;198:86-91.
- 28- Garde AH, Hansen AM, Skovgaard LT, Christensen JM. Seasonal and biological variation of blood concentrations of cholesterol, dehydroepiandrosterone sulfate, hemoglobin A_{1c}, IgA, prolactin, and free testosterone in healthy women. Clin Chem 2000;46(4):551-9.
- 29- Reilly C, Nicolau GY, Lakatua DJ, Bogdan C, Sackett-Lundeen L, Petrescu E et al. Circannual rhythms of laboratory measurements in serum of elderly subjects. Prog Clin Biol Res 1987;227B:51-72.
- 30- Dannenberg A, Leller J, Wilson P, Castelli W. Leisure time physical activity in the Framingham Offspring Study. Am J Epidemiol 1989;129:76-88.
- 31- Matthews C, Hebert J, Freedson P, Stanek III E, Meeriam P, Ebbeling C et al. Sources of variance in daily physical activity levels in the Seasonal Variation of Blood Cholesterol Study. Am J Epidemiol 2001;153:987-995.

- 32- Masumura S, Furui H, Hashimoto M, Watanabe Y. The effects of season and exercise on the levels of plasma polyunsaturated fatty acids and lipoprotein cholesterol in young rats. *Bioch Biophys Acta* 1992;1125:292-96.
- 33- Brigden ML, Heathcote JC. Problems in interpreting laboratory tests. *Postgrad Med* 2000; 107(7),145-6,151-2,155-8.
- 34- Batchelet E, Hillman D, Smolensky M, Halberg F. Angular-linear correlation coefficient for rhythmometry and circannual change in human birth rates at different geographic latitudes. *Int J Chronobiol* 1973;1:183-202.
- 35- Bohlen J, Simpson H. Latitude and the human circadian system. In: Mills JN, ed. *Biological Aspects of circadian rhythms*. New York: Plenum Press, 1973:85-120.

BIOLOGICAL RHYTHMS OF BIOCHEMICAL SERUM PARAMETERS IN A BRAZILIAN POPULATION: A THREE-YEAR STUDY

Fabio Dalpino¹, Luiz Menna-Barreto², Lúcia Castilho¹, Eliana de Faria¹

¹Departamento de Patologia Clínica - Faculdade de Ciências Médicas - Universidade de Campinas; ²Departamento de Fisiologia e Biofísica – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

ABSTRACT

A marked decrease in analytical and post-analytical variability has been achieved in clinical laboratories by the use of automated analytical systems. Current studies are now focused on the origin of pre-analytical variability, such as that due to intra-individual differences and biological rhythms. The objective of this work was to evaluate the occurrence of biological rhythms in several biochemical serum parameters in a Brazilian population. A retrospective study (1996 to 1998) was carried out to collect the test results within the reference intervals of adults, from 21 to 50 years of age (average age of 36 years) attending the outpatient clinics of the Teaching Hospital at the University of Campinas, São Paulo, Brazil. The reference sample was 52.9% male and 47.1% female and encompassed 15,036 calcium, 7,478 phosphorus, 53,641 urea, 58,315 creatinine and 6,433 uric acid determinations (140,903 in total). Significant annual rhythms were detected in serum calcium ($p \leq 0.001$), with maximum and minimum values in fall and spring, and in serum creatinine ($p \leq 0.002$), with maximum and minimum values in summer and winter. The other parameters did not present significant annual rhythmicity. The seasonal rhythms present in the serum concentrations of calcium and creatinine observed in this large population study, although of small amplitude, should be considered a component of the pre-analytical variation of these clinical laboratory tests.

INTRODUCTION

Laboratory examinations are subject to several interfering factors and even healthy individuals may present variations stemming from biological and/or laboratory factors that generate problems in the interpretation of results. Typically, these factors are divided into pre-analytical, occurring before and during collection; analytical, related to manipulation, processing, and analysis of samples; and post-analytical, including transcription and access to results (Irjala and Gronroos, 1998).

As a consequence of advances in laboratory methods, generalized information technology, and strict quality control systems, a marked decrease in analytical and post-analytical variability has been achieved in clinical laboratories (Rifai et al., 1997). Accordingly, recent studies have focused primarily on the origin of pre-analytical errors, which are responsible for a larger amount of variation than analytical ones (Haus et al., 1993; Wallaert and Babin, 1994). Among the components currently being intensively investigated are the intra-individual ones, which are representative of differences between individuals, and biological rhythms. When intra-individual factors are investigated making use of statistical procedures, a rhythmic pattern with well-established cycles can be demonstrated in some parameters (Montalbetti, 1989; Vanderschueren et al., 1991).

Few experiments have evaluated seasonal variations of the biochemical parameters routinely analyzed in clinical laboratories that impact medical decisions. Also, some advocate the replacement of the current reference values (RV) with so-called *chronodesms* (Montalbetti, 1989; Letellier and Desjarlais, 1982; Gidlow et al., 1986), i.e., chronobiologically qualified reference values. Chronodesms can be developed for single individuals by repeated measurements over numerous periods or they can be determined for groups of subjects by measurements of a parameter over a single or a few periods in a representative peer population (Haus et al., 1984).

This study explored the occurrence of annual rhythms in several selected biochemical serum parameters in a healthy Brazilian population, expressing values in the normal ranges, to assess their contribution to the observed variation in laboratory results.

METHODS

A retrospective study was conducted to evaluate the results of several selected laboratory tests of individuals attending the outpatient clinics of the Teaching Hospital, University of Campinas, São Paulo, Brazil, South American, between 1996 and 1998. The information was generated by the database program of the hospital computer system. The study population comprised individuals of both sexes, aged between 21 and 50 years, whose examinations presented results within the reference intervals established by the clinical pathology department in accordance with the Merck manufacturer's recommendations. The study was conducted following the ethical principles for research on human beings and their blood fluids as expected by the Journal (Touitou et al., 2004).

Blood samples from these individuals were obtained by venous puncture in the morning between 07:00 to 09:00 h, after a 10-12 h fast. The serum was separated from whole blood by refrigerated low-speed centrifugation within 2 h after sample collection and forwarded for analysis. The clinical laboratory analyses were performed by chemical analyzers under standardized conditions and using methods recommended by Merck® manufacturers. Control materials (Qualitrol N - Merck®) were systematically utilized for the determination of analytical variability and accuracy maintenance. The database in this study included 15,036 calcium, 7,478 phosphorus, 53,641 urea, 58,315 creatinine, and 6,433 uric acid (140,903 in total) determinations, along with information on hospital identification, sex, age, and blood collection dates. Only data from individuals that were within the current reference ranges per variable were considered for this investigation.

Parametric statistical analyses were carried out using the SAS program (Statistical Analysis System, v.8.01, SAS Institute Inc, 1999-2000, Cary, NC, USA.) for determination of the mean, standard deviation, coefficient of variation, and comparisons among means.

The temporal analysis measured the presence of biological rhythms for each analyte during the 3-year study span. For such, the monthly mean was calculated from the values of each serum variable giving rise to time series of 12 data points. The data were further categorized according to sex and the age groups, 21 to 35 years and 36 to 50 years,

for additional analyses. The seasons were defined as: Summer (1 = January, 2 = February, 3 = March), Fall (4 = April, 5 = May, 6 = June), Winter (7 = July, 8 = August, 9 = September), and Spring (10 = October, 11 = November, and 12 = December).

The Cosinor method of the El Temps (A. Díez-Noguera, University of Barcelona) computer program was used for the assessment of annual rhythms. The Cosinor program is a periodic regression analysis that approximates a cosine function of a given period, 12 months in this study, to the time series values by the least squares method (Nelson et al., 1979; Noguera, 1998, 2000). The rhythm parameters determined were: MESOR (the rhythm-adjusted mean), amplitude (the distance from MESOR to the peak of the cosine curve best fitting approximating the data), and acrophase (the timing of the peak of the cosine curve best approximating the time series data in relation to a reference, 00:00h, December 31) (Gidlow et al., 1986; Marques and Menna-Barreto, 1997). The significance of rhythm detection (at $p \leq 0.05$) is based upon F-testing of the variance accounted by the fit a 12 month cosine curve versus that accounted for by the fit of a straight line to the time series data. Essentially, this is a test of the amplitude of the annual variation being non-zero in value. Rejection of the zero-amplitude null hypothesis, at a given level of probability, is the basis for the existence of rhythmicity of the given trial period, herein 12 months.

RESULTS

The population in this study presented a similar sex and age distribution during each of the 3 years of the study; although, the number of tests per each year varied, respectively, 40,318 in 1996, 42,891 in 1997, and 57,694 in 1998. The average age was constant from one year to the next (36 years). Also, each yearly sample consisted of results from individuals equally distributed by sex -- male 53% and female 47%. All parameters analyzed were in the reference ranges and the observed standard deviations of the control material (Qualitrol N – Merck®) were as recommended in the literature (Barnett, 1968; CLIA, 88 1992; Fraser, 1992). The means and interassay standard deviations were very stable throughout the 3-year study span (Table 1).

Table 1- MEANS, INTERASSAY STANDARD DEVIATIONS, AND COEFFICIENTS OF VARIATION OF THE STUDIED ANALYTES OVER THE THREE-YEAR STUDY

Parameters	n ^a	Population mean ^b	sd ^b	Reference limits ^b	Method precision ^c (sd) ^b	Recommended precision (sd) ^b
Calcium	15,036	9.1	0.43	8.5 - 10.2	0.27	0.25 ^d
Phosphorus	7,478	3.6	0.61	2.5 - 4.8	0.25	0.45 ^d
Urea	53,641	27	6.78	15 - 40	1.94	0.6 ^e / 2.0 ^f
Creatinine	58,315	0.8	0.15	0.6 - 1.2	0.05	0.08 ^d
Uric acid	6,433	4.9	1.22	2.4 - 7.0	0.25	0.25 ^d

^an= number of tests; ^bas mg/dL; ^ccontrol material = Qualitrol N – Merck®; ^dsd value from CLIA 88 (1992); ^esd value from Fraser (1992); ^fsd value from Barnett (1968).

Figure 1 shows the graphic representations of the seasonal variation in the data.

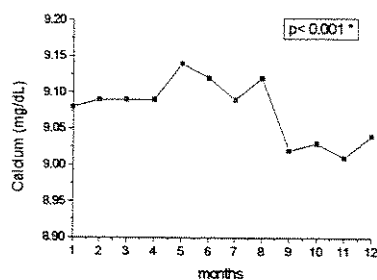


Figure 1a

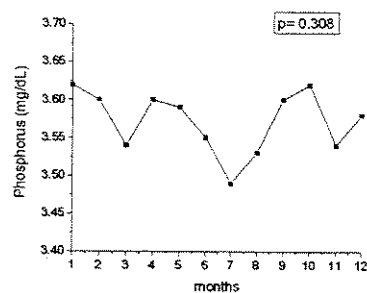


Figure 1b

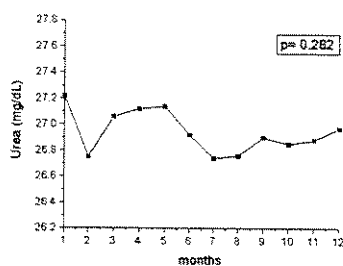


Figure 1c

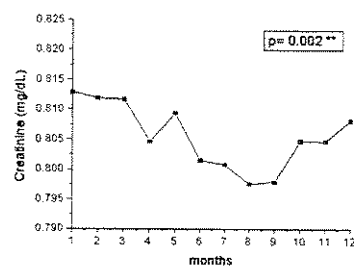


Figure 1d

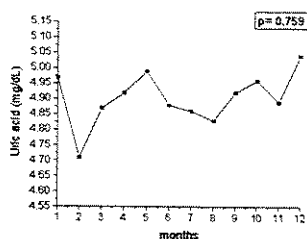


Figure 1e

Figure 1– ANNUAL VARIATION OF SERUM CALCIUM (1a), PHOSPHORUS (1b), UREA (1c), CREATININE (1d), AND URIC ACID (1e) IN THE ENTIRE GROUP

*seasonal differences between fall/spring; **seasonal differences between summer/winter.

Significant annual rhythmicity was observed in serum calcium concentration ($p \leq 0.001$), with maximum values in the fall and minimum ones in the spring, with the MESOR equal to 9.08 mg/dL and amplitude 0.05 mg/dL. Significant annual rhythmicity was also observed in serum creatinine concentration ($p \leq 0.002$), with the maximum values in the summer and minimum ones in the winter, with the MESOR equal to 0.81 mg/dL and amplitude 0.01 mg/dL (Table 2).

Table 2- SEASONAL VARIATION IN ANALYTES AND THEIR RHYTHM PARAMETERS IN THE WHOLE GROUP AND IN DESIGNATED SUBGROUPS

Time (year)		1996-1997-1998				P values ^c			
Parameters	Peak / Nadir	MESOR ^a	Amplitude ^a	Acrophase ^b	Total population	($\%$) ^d			
						M ^e	F ^e	21-35y ^f	36-50y ^f
Calcium	fall/spring	9.08	0.05	4	≤ 0.001 (1.10)	0.003 (0.88)	≤ 0.001 (1.32)	0.005 (0.88)	≤ 0.001 (1.32)
Phosphorus	spring/fall	3.57	0.03	12	0.308 (1.68)	0.928 (0.56)	0.085 (2.79)	0.407 (1.66)	0.193 (2.25)
Urea	summer/winter	26.94	0.13	1	0.282 (0.97)	0.728 (0.58)	0.142 (1.29)	0.962 (0.23)	0.080 (1.98)
Creatinine	summer/winter	0.81	0.01	1	0.002 (2.47)	0.028 (2.38)	0.034 (2.63)	0.071 (2.50)	≤ 0.001 (2.47)
Uric acid	winter/summer	4.90	0.02	9	0.759 (0.82)	0.842 (1.14)	0.808 (1.29)	0.619 (1.67)	0.850 (0.80)

^aas mg/dL; ^bas months of the year: from 1 to 12 (January to December); ^csignificant probabilities are in bold;

^dpercentage differences between peak/nadir based on the Cosinor-derived amplitude. ^eM=Males, F=Females;

^fyears: age groups.

The ANOVA test with the application of the Duncan post-hoc test to compare the 12 months during the 3 years showed the mean values for calcium for months 1 to 8 to be significantly higher ($p < 0.005$) than those of months 9 to 12 and the mean values for creatinine for months 1 and 3 to be significantly higher ($p < 0.05$) than that for month 8. The other parameters did not demonstrate significant annual rhythms.

When the data were analyzed according to sex and age, significant annual rhythms were seen in calcium, for both men and women in both age groups, and in creatinine for both men and women between 36 and 50 years of age; the results for the 21-35 year-old group were of borderline significance ($p=0.07$). The amplitude of the annual rhythms for both sexes and age groups in creatinine was the same as for the total population (0.01 mg/dL). For calcium the amplitude was 0.04 mg/dL for males and the 21-35 year-old group, which was comparable to that of the total population for females (0.05 mg/dL) and 36-50 year-old group (0.06 mg/dL).

The peak-to-trough percent variation in the raw data values relative to the annual mean were as follows: calcium 2.2, phosphorus 7.8, urea 5.5, creatinine 3.7, and uric acid 13.3. The peak-to-trough percent variation in the subgroups was as follows: calcium - men 2.1 and women 2.8, 21 to 35 year-olds 2.1, and 36 to 50 year-olds 2.4; phosphorus - men 10.4 and women 10.3, 21 to 35 year-olds 9.4 and 36 to 50 year-olds 10.7; urea - men 5.8 and women 5.3, 21 to 35 year-olds 6.8 and 36 to 50 year-olds 9.3; creatinine - men 4.8 and women 5.3, 21 to 35 year-olds 5.0 and 36 to 50 year-olds 4.9; uric acid - men 13.8 and women 16.9, 21 to 35 year-olds 15.2 and 36 to 50 year-olds 14.8.

The amplitudes (mg/dL) of the rhythms of the five parameters shown in Table 2 for the entire group were also compared between the subgroups categorized by sex. Large differences were seen between men and women for phosphorus (5 times; 0.05 women vs. 0.01 men), urea (2 times; 0.17 women vs. 0.08 men), and calcium (1.5 times; 0.06 women vs. 0.04 men), all being higher in women. Creatinine (0.01) and uric acid (0.03) were similar in both sexes. The older (36-50 year-old) as compared to the younger aged (21-35 year-old) group presented large differences for urea (9 times; 0.27 older vs. 0.03 younger), phosphorus (2 times; 0.04 older vs. 0.02 younger) and calcium (1.5 times; 0.06 older vs. 0.04 younger). Similar amplitudes were found for the annual rhythm in creatinine (0.01), but the amplitude of the uric acid rhythm was higher (2 times; 0.04 vs. 0.02) in the younger group.

DISCUSSION

In this study we have emphasized the analysis of the intra and inter-individual biological components of pre-analytical errors, evaluating the presence of seasonal rhythms in several serum biochemical variables. We believe it is important to establish the extent to which biological oscillations affect the routine exams in the clinical laboratory, because of its potential to alter medical decisions. In this paper we report data of a total of 140,903 laboratory determinations involving five different serum biochemical variables. Because this is a retrospective study, it was not possible to control all important influences on the variables, like diet, physical activity, and medications.

Several of the routine analytes tested in the clinical chemistry laboratory present circannual variations that may be of importance for clinical diagnosis (Gidlow et al., 1986; Bjornsson et al., 1984; Letellier and Desjarlais, 1982). They are markers of rhythmic functions in the organism and possibly changes in the susceptibility and resistance to disease. This study found that the serum concentration of calcium and creatinine exhibits circannual variation. The calcium serum concentration showed maximum values in fall and minimal ones in spring, and the serum creatinine concentration showed maximum values in the summer and minimal ones in winter.

Although small-amplitude, expressed relative to MESOR, annual rhythms were observed in calcium and creatinine, such variation should be considered as one of the biological factors that contributes to pre-analytical error. Such variation has laboratory and clinical importance, especially when one adds up the large amount of other pre-analytical sources of variation. Also, the importance becomes even greater when examining large population groups, where even small differences may be significant.

Similar seasonal rhythmicity was reported by Reilly et al. (1987) analyzing several biochemical parameters in 160 elderly individuals over a 3-year span; these investigators demonstrated a reduction in the serum concentration of calcium during the spring and an increase during summer, with a peak in the fall in male subjects. We observed in addition that the annual rhythm of serum calcium was independent of sex and age.

Studying bone metabolism in healthy young individuals, Vanderschueren et al. (1991) also observed seasonal variation in the serum concentration of calcium with higher values in winter and lower ones in summer, in both sexes. These authors also verified that variation in bone turnover, bone density, or activity of the parathyroid glands was not an important influence.

Our results on calcium are in contrast to those reported by Letellier and Desjarlais (1982), who studied a group of women for four years and did not observe any seasonal variation in its serum concentration. This was the case also for the reports of ionized calcium (Harris and DeMets, 1971).

The other study parameter that also showed significant seasonal rhythmicity was serum creatinine, with maximum values in summer and minimum ones in winter. This rhythm was present in both sexes and the 36-50 year-old age group; however, the annual variation in individuals 21-35 years of age was only of borderline significance ($p=0.07$).

Gidlow et al. (1986) reported seasonal rhythmicity in creatinine concentration with maximum values in the spring and fall and lower ones in summer, with the peak level 6.6% above the trough level. Rocker et al. (1980) measured the creatinine serum concentration in 78 healthy subjects and reported significantly higher values during the summer compared with winter in females, but not showing significant oscillation in males. The difference of values between the seasons for females was 7%, similar to that reported by Gidlow et al. (1986). Iseki et al. (1996) studying 1,982 patients with terminal renal disease in Japan did not detect seasonal variation in creatinine serum concentration based on monthly blood samples collected prior to dialysis. Moreover, Gowans and Fraser (1988) studying the male workforce of a large chemical company for 5 consecutive years and Bjornsson et al. (1984) based in a prospective cardiovascular health study did not observe seasonality in creatinine concentration.

The other studied analytes did not present significant seasonal oscillation, contrasting with the work of Vanderschueren et al. (1991), who detected seasonality in both sexes for phosphorus, with maximum values in winter and minimal values in summer with a difference of approximately 12% among the peak and nadir values.

Reilly et al. (1987) studied 160 elderly subjects over a 3-year span and demonstrated seasonal rhythms in uric acid, with lower concentrations during the spring and summer compared with the fall and winter, the seasonal variation being more pronounced in males than females. Revert et al. (2000) reported the results of a study performed in Valencia, Spain, showing higher concentration of uric acid in the summer compared to winter. Letellier and Desjarlais (1982) evaluated 2,600 blood samples from a homogeneous group of women collected over a 4-year period finding evidence for seasonal oscillation, with increased uric acid concentration in the summer compared to fall, mainly in males. However, some studies did not show evidence of such rhythmicity, such as the 1-year investigation conducted by Bjornsson et al. (1984) and the one by Rocker et al. (1980) in which 78 healthy individuals were evaluated during two seasons of the year, summer and winter.

The finding of an absence of rhythms in phosphorus and urea concentration in the present study is consistent with that of other reports (Letellier and Desjarlais, 1982; Reilly et al., 1987). Rocker et al. (1980) did not detect a seasonal rhythm in the serum concentration of phosphorus or urea. Iseki et al. (1996) also did not demonstrate a seasonal rhythm in urea.

The geographical location of the study aiming at the detection of seasonal rhythmicity is very important. The circannual acrophase (peak time) may depend on the latitude as previously demonstrated (Batschelet et al., 1973; Bohlen and Simpson, 1973). Moreover, discrepancies between this and other studies may be inherent to climatic variations of each country. The climatic conditions of countries located in the higher latitudes, for example the European countries, where seasons are well defined and with significant change, differ from those of most regions of Brazil.

In conclusion, although the seasonal rhythms described in the serum concentrations of calcium and creatinine in this large population study are of small amplitude, they are in accord with most other studies in the literature. Since the pre-analytical components of the total error are additive in effect, these rhythmic oscillations should be considered a component of the pre-analytical variation of these clinical laboratory tests.

REFERENCES

1. Barnett, R.N. (1968). Medical significance of laboratory results. *Am. J. Clin. Pathol.* 50(6):671-676.
2. Batschelet, E., Hillman, D., Smolensky, M., Halberg, F. (1973). Angular-linear correlation coefficient for rhythmometry and circannual change in human birth rates at different geographic latitudes. *Int. J. Chronobiol.* 1:183-202.
3. Bjornsson, O.J., Davidsson, D., Filippusson, H., Olafsson, O., Sigfusson, N., Thorsteinsson, T. (1984). Distribution of haematological, serum and urine values in a general population of middle-aged men. The Reykjavik Study. *Scand. J. Soc. Med. Suppl.* 32:1-12.
4. Bohlen, J., Simpson, H. (1973). Latitude and the human circadian system. In: Mills, J.N., ed. *Biological Aspects of Circadian Rhythms*. New York: Plenum Press, pp. 85-120.
5. Clinical Laboratory Improvements Amendments (CLIA) 1988. Final rule. Laboratory Requirements (1992). *Fed. Regist.* 57: 7002-7288.
6. Fraser, C.G. (1992). Biological Variation in Clinical Chemistry. An update: collated data, 1988-1991. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 116(9):916-923.
7. Gidlow, D.A., Church, J.F., Clayton, B.E. (1986). Seasonal variations in haematological and biochemical parameters. *Ann. Clin. Biochem.* 23:310-316.
8. Gowans, E.M., Fraser, C.G. (1988). Biological variation of serum and urine creatinine and creatinine clearance: ramifications for interpretation of results and patient care. *Ann. Clin. Biochem.* 25:259-263.
9. Harris, E.K., DeMets, D.L. (1971). Biological and analytic components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects – V. Estimated biological variations in ionized calcium. *Clin. Chem.* 17(10):983-987.

10. Haus, E., Lakatua, D.J., Sackett-Lundeen, L.L., Swoyer, J. (1984). Chronobiology in laboratory medicine. In: Reitveld, W.J., ed. *Clinical Aspects of Chronobiology*. Bakker, Baarn, pp.13-82.
11. Haus, E., Nicolau, G.Y., Lakatua, D.J., Sackett-Lundeen, L., Petrescu, E., Swoyer, J. (1993). Chronobiology in laboratory medicine. *Ann. Ist. Super Sanità* 29(4):581-606.
12. Irjala, K.M., Gronroos, P.E. (1998). Preanalytical and analytical factors affecting laboratory results. *Ann. Med.* 30(3):267-272.
13. Iseki, K., Morita, O., Fukiyama, K. (1996). Seasonal variation in the incidence of end-stage renal disease. *Am. J. Nephrol.* 16:375-381.
14. Letellier, G., Desjarlais, F. (1982). Study of seasonal variations for eighteen biochemical parameters over a four-year period. *Clin. Biochem.* 15(4):206-211.
15. Marques, N., Menna-Barreto, L. (1997). *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. São Paulo: Edusp, 277 p.
16. Montalbetti, N. (1989). Chronobiology in the clinical laboratory. *Chronobiologia* 16(4):409-415.
17. Nelson, W., Tong, Y.L., Lee, J.K., Halberg, F. (1979). Methods for Cosinor-rhythmometry. *Cronobiologia* 6(4):305-323.
18. Noguera, A.D. (1998). El Temps. Aplicación Integrada para Análisis Cronobiológico, com Windows-95. In: *Reunión de Grupos de Cronobiología y Cronopsicología*, Valladolid, México. In: <<http://revilla.mac.cie.uva.es/cronobiologia/resumen.html>> (accessed January 2004).
19. Noguera, A.D. (2000). El Temps for Windows-95) In:<<http://www.ub.es/dpfisiv/soft/ElTemps/principal.html>> (accessed January 2004).

20. Reilly, C., Nicolau, G.Y., Lakatua, D.J., Bogdan, C., Sackett-Lundeen, L., Petrescu, E., Haus, E. (1987). Circannual rhythms of laboratory measurements in serum of elderly subjects. *Prog. Clin. Biol. Res.* 227B:51-72.
21. Revert, J.M., Martinez-Lahuerta, J.J., Porcar, L.A. (2000). Seasonal change in blood concentration of uric acid and its potential clinical implications. *Aten. Primaria* 26(7):468-471.
22. Rifai, N., Dufour, R., Cooper, G.R. (1997). Preanalytical variation in lipid, lipoprotein, and apolipoprotein testing. In: Rifai, N., Warnick, R., Dominiczak, M., eds. *Handbook of Lipoprotein Testing*. AACC Press, chapter 4.
23. Rocker, L., Feddersen, H.M., Hoffmeister, H., Junge, B. (1980). Seasonal variation of blood components important for diagnosis. *Klin. Wochenschr* 58(15):769-778.
24. Touitou, Y., Portaluppi, F., Smolensky, M.H., Rensing L. (2004). Ethical standards and principles for the conduct of human and animal biological rhythm research. *Chronobiol. Int.* 21:161-170.
25. Vanderschueren, D., Gevers, G., Dequeker, J., Geusens, P., Nijs, J., Devos, P., De Roo, M., Bouillon, R. (1991). Seasonal variation in bone metabolism in young healthy subjects. *Calcif. Tissue Int.* 49:84-89.
26. Wallaert, C., Babin, P.J. (1994). Age-related, sex-related, and seasonal changes of plasma lipoprotein concentration in trout. *J. Lipid Res.* 35:1619-1633.

5- DISCUSSÃO GERAL

As variações pré-analíticas que ocorrem num laboratório clínico tornaram-se as principais causas de alteração no resultado de um exame, sendo que neste trabalho foi dada ênfase para o seu componente biológico intra-individual (cronotipos), avaliando-se os ritmos sazonais dos analitos.

É importante o estabelecimento do quanto a variação circanual afeta a rotina do laboratório clínico, podendo eventualmente alterar uma decisão médica.

A maioria dos analitos dosados em bioquímica clínica apresenta magnitude de mudança circanual de pouca importância para o diagnóstico clínico, mas que pode ser útil no acompanhamento de um paciente, despertando especial interesse a partir do momento que descreve funções rítmicas no organismo.

Analisando a característica das populações estudadas observa-se uma distribuição homogênea com relação ao sexo e a idade ao longo dos anos. Pelo seu caráter retrospectivo não foi possível controlar variáveis como dieta, atividade física, influência de medicamentos ou da própria coleta do material. Com relação às características descritivas, como o desvio-padrão e o coeficiente de variação, os diversos analitos assemelham-se com os descritos na literatura para esse tipo de amostra populacional ^{56,57,82}.

Optou-se por estudar inicialmente os exames que compõem o perfil lipídico (C, HDL-C, LDL-C e TG) desta amostra populacional pela estreita associação com a presença da doença arterial coronariana.

No Brasil, de acordo com dados do Sistema Único de Saúde (SUS) ¹⁵, as doenças do aparelho circulatório representam 27% de todas as causas de morte para todas as idades, sendo que 6% são por infarto agudo do miocárdio (IAM). Estes dados são muito semelhantes aos encontrados na região estudada, aonde 8% das pessoas morrem por IAM.

A incidência dessas doenças está diminuindo. Nos EUA as mortes por DAC estão caindo aproximadamente 3% ao ano e no Brasil esta taxa está em torno de 2% ao ano ⁵¹. Apesar disso, que em parte se deve aos novos tratamentos disponíveis no mercado e às mudanças nos hábitos de vida, este problema está longe de ser solucionado.

Estudos realizados nos EUA demonstram que na faixa etária dos 20-74 anos, 1/3 da população têm hipertensão arterial e mais de 1/4 têm hipercolesterolemia e obesidade, além do marcante sedentarismo ^{21,42}. Estudos brasileiros mostram 20-30% de hipertensos na população, 44% de obesos, 49% de sedentários e 21% de tabagistas ¹⁰. Portanto, uma grande porcentagem da população tem algum fator de risco para DAC além das dislipidemias.

Como diversos estudos têm demonstrado que o processo aterosclerótico inicia-se na infância, é importante estabelecer a prevalência de dislipidemias também nesta faixa etária, pois este é um dos principais fatores de risco para o surgimento das estrias gordurosas na camada íntima das artérias ⁷³.

A análise do perfil lipídico é indispensável no diagnóstico das dislipidemias e prevenção primária de DAC. Como exemplo dessa importância clínico-epidemiológica, têm-se as concentrações séricas do colesterol. Aproximadamente 70% dos valores de colesterol dos indivíduos com doença cardíaca isquêmica estão na faixa de 200-240 mg/dL ⁷⁴.

A adoção de valores de corte para as concentrações séricas dos lípides e lipoproteínas tem se mostrado muito eficaz no controle das dislipidemias, mas a escassez de estudos regionalizados gera alguns problemas. É importante se estabelecer os valores de corte para cada região, e não simplesmente adotar as mesmas recomendações para populações tão distintas, com características sócio-econômicas e culturais próprias.

Um dos objetivos deste trabalho foi o de estudar uma amostra populacional atendida num pólo de referência médico-hospitalar do interior do Estado de São Paulo, Brasil, composta por diferentes classes sócio-econômicas e culturais. Durante quatro anos foram realizadas 11.305 dosagens de lípides e lipoproteínas em 2.031 crianças e adolescentes com idade média de 12 anos e 156.678 dosagens de lípides e lipoproteínas em adultos com idade média de 46 anos.

Com relação ao estudo realizado com crianças e adolescentes, a concentração média dos analitos para esta amostra mostra valores de C e TG acima dos recomendados, sendo que os valores médios de HDL-C e LDL-C estão dentro dos valores estabelecidos.

Comparando-se os resultados encontrados neste estudo com os recomendados pelo NCEP e IIIDBSD, observa-se que 44% dos indivíduos apresentam hipercolesterolemia, 48% hipoalfalipoproteinemia, 36% hiperbetalipoproteinemia e 52% hipertrigliceridemia. Ou seja, os intervalos percentis revelam que uma alta porcentagem desta amostra populacional apresenta dislipidemias. Demonstrou-se também uma alta frequência de dislipidemias mistas nestas crianças e adolescentes.

Este fato pode ser explicado em parte por se tratar de uma amostra “concentrada” de indivíduos atendidos num ambiente hospitalar, mas estes refletem a regionalidade das dislipidemias; além disso, as amostras são de pacientes ambulatoriais e de todos os setores especializados do hospital.

Houve uma redução significativa dos valores séricos de C e LDL-C, comparando-se o ano de 2000 com 2003, fato que não ocorreu com o HDL-C e TG. Isto pode ter ocorrido pelos mesmos motivos que estão levando à redução de DAC, como já descritos acima.

Quando se analisa o sexo separadamente, pôde-se observar valores significativamente mais elevados no sexo feminino para o HDL-C e no sexo masculino para o TG. Com relação às diferentes faixas etárias, com exceção do HDL-C que não variou com a idade, nota-se uma tendência para a redução das concentrações séricas dos lípides e lipoproteínas comparando-se a faixa etária de 0-12 anos com 13-19 anos.

Portanto, os resultados encontrados neste trabalho vão de encontro com os da literatura, que apontam uma alta frequência de dislipidemias em crianças e adolescentes, o que a torna um importante problema de saúde pública na infância^{51,76,77}.

É difícil estabelecer nas crianças e adolescentes uma relação entre DAC e as concentrações séricas do colesterol porque as manifestações clínicas não costumam ocorrer; entretanto estudos feitos a partir de autópsias demonstram placas de gordura nas artérias coronárias a partir dos 10 anos de idade^{28,81}. Acredita-se que exista uma associação de fatores ambientais e genéticos, sendo este último de maior importância.

Diversos estudos na literatura estão apontando para uma alta prevalência de dislipidemias entre as crianças e adolescentes, com concentrações séricas de colesterol, frações e triglicérides bem acima dos recomendados ^{19,28,68,73}. MOURA et al. (2000) estudando escolares de 7 a 14 anos na cidade de Campinas, a mesma deste estudo, encontrou níveis percentuais elevados de hipercolesterolemia com 35% da amostra estudada tendo $C > 170\text{mg/dL}$ ⁵⁹.

A obesidade, que também é um fator de risco cardiovascular, está cada vez mais freqüente em crianças, com estudos americanos mostrando elevação de 5% para 11% na sua prevalência se comparar as décadas de 1960 com as de 1990 ⁸⁰. Outros estudos também observam uma alta prevalência de fatores de risco cardiovasculares em crianças e adolescentes ¹².

Como uma das complicações da obesidade são as dislipidemias, a tendência é observar um aumento também no número de crianças dislipidêmicas e possivelmente uma antecipação na faixa etária de ocorrência de DAC.

Avaliando-se a amostra populacional adulta, alvo de outro estudo e comparando-se os resultados encontrados com os recomendados pelo NCEP e IIIDBSD, observa-se que 40% dos indivíduos apresentam hipercolesterolemia, 29% hipoalfalipoproteinemia, 34% hiperbetalipoproteinemia e 32% hipertrigliceridemia. Ou seja, os intervalos percentis revelam que uma alta porcentagem dos adultos apresenta dislipidemias.

Resultados similares foram observados por GUIMARÃES et al. (1998) ²⁷ e NICOLAU et al. (1992) ⁶⁴. MARTINEZ et al. (2003) publicou um estudo nacional com 81.262 indivíduos cuja média do colesterol estava dentro dos limites recomendados pelo NCEP, porém analisando pessoas com 1 fator de risco para DAC encontraram 40% com $C > 200\text{ mg/dL}$ e 14% com $C > 240\text{ mg/dL}$. Considerando indivíduos sem fatores de risco para DAC estes valores reduziram-se para 30% e 8%, respectivamente ⁵³.

Quando se analisa o sexo separadamente, observa-se valor significativamente mais elevado nas mulheres, com exceção de triglicérides. Além dos fatores dietéticos, diferenças biológicas como a curva de produção de estrógeno interfere neste resultado, principalmente na mulher após a menopausa, cujo declínio na produção de estrógeno é provavelmente o fator mais importante para a elevação do C e LDL-C ²⁷.

Com relação às diferentes faixas etárias, com exceção do HDL-C, pôde-se notar uma tendência para a elevação das concentrações séricas dos lípides e lipoproteínas com a idade, provavelmente devido a fatores hormonais e redução na atividade física. Os resultados vão de encontro com os de literatura, que apontam as dislipidemias como um importante problema de saúde pública ^{51,53,76}.

Trabalhos de literatura demonstram que os tratamentos atuais com estatinas reduzem o risco de DAC, daí a importância da dosagem dos lípides e lipoproteínas e da padronização regionalizada dos seus valores aceitáveis ^{8,29,53}.

O estudo feito com 177 voluntários para determinações séricas de lipoproteína(a), lípides, lipoproteínas e apolipoproteínas e para avaliar a influência de parâmetros clínicos e bioquímicos na concentração plasmática de Lp(a) demonstrou valores elevados de Lp(a) em 23% dos participantes, sendo modulada positivamente pelo sexo feminino e LDL-C e negativamente pelo HDL-C, indicando uma associação pró-aterogênica dessas lipoproteínas.

Com isso, programas educativos e terapêuticos devem ser instituídos para alertar a população sobre os fatores de risco para doenças cardiovasculares.

Após detalhar as características das amostras populacionais destes trabalhos com relação aos valores dos lípides e lipoproteínas, deu-se prosseguimento ao trabalho com um estudo para a detecção de ritmos circanuais nestes resultados de exames.

Foram encontrados ritmos sazonais estatisticamente significativos nas concentrações séricas do C, HDL-C e LDL-C, com um período de 12 meses, com valores máximos no inverno e mínimos no verão. Ambos os sexos apresentaram ritmo com as mesmas características nestes analitos, mas o TG só apresentou em mulheres. Com exceção

do HDL-C, que teve ritmicidade em todas as faixas etárias selecionadas, os demais parâmetros somente apresentaram sazonalidade nas faixas etárias acima dos 13 anos. Não detectamos ritmicidade nas diferentes faixas etárias para o TG sérico.

Quando os resultados de exames foram separados em valores não alterados e patológicos, as características rítmicas mantiveram-se iguais para o C, LDL-C e TG, sendo que este último manteve a não sazonalidade, porém o HDL-C apresentou ritmo apenas nos valores não alterados.

Com relação à sazonalidade de doenças cardiovasculares na região de Campinas, foi encontrado ritmo para a prevalência de aterosclerose, com valores mais elevados no inverno e menores no verão. Através da análise estatística, observaram-se correlações positivas entre os ritmos do C e LDL-C na amostra estudada com a prevalência populacional de aterosclerose e outras doenças vasculares periféricas na mesma região e período.

Resultados similares em relação a sazonalidade dos lípides e lipoproteínas foram descritos por outros autores que observaram valores significativamente maiores de C e LDL-C no inverno se comparado com o verão ^{16,62}. Em alguns estudos foi possível também observar ritmo no HDL-C, com a mesma periodicidade ^{25,55,71}. Todos estes trabalhos não apontam ritmo para o TG sérico.

Diversos outros estudos também apontam um ritmo circanual para o C, especulando que esta variação seja decorrente de alterações na dieta, atividade física ou fatores hormonais, associados ou não com aumento do risco de doença arterial coronariana ^{18,23,45}.

Entretanto outros autores não demonstram ritmicidade na concentração sérica de C, porém apresentam ciclos circanuais para o TG, diferindo apenas nos meses de pico e nadir, sugerindo que este seja um mecanismo de adaptação ao frio ou devido ao aumento no consumo de alimentos e bebidas alcoólicas ^{22,49,67}.

Com relação a análise do risco cardiovascular, DANNENBERG et al. (1989) avaliaram 1.598 homens e 1.762 mulheres com idades entre 20-69 anos durante 4 anos e puderam observar um aumento no consumo de kilocalorias nas atividades físicas no verão se comparados com o inverno, associados com uma elevação das concentrações séricas do HDL-C na mesma época. O LDL-C não teve diferença consistente. Descrevem, portanto, uma relação inversa entre atividade física e risco cardiovascular ¹⁴.

Confirmando estes dados, MATTHEWS et al. (2001) analisando adultos supostamente saudáveis também encontraram variação na atividade física diária ao longo do ano, com redução significativa no inverno para ambos os sexos ⁵⁴.

van ROSSUM et al. (2001) acompanharam 19.019 homens com idades entre 40-69 anos durante 25 anos e observaram elevação na mortalidade por doença cardíaca isquêmica nos meses do inverno se comparado com o verão ⁸⁴.

Dando continuidade ao trabalho de análise da variação sazonal em parâmetros bioquímicos, tendo como base a periodicidade já observada para as concentrações séricas de C, HDL-C e LDL-C, foi realizado um outro estudo retrospectivo para avaliação dos resultados de cálcio, fósforo, uréia, creatinina e ácido úrico, entre 1996 e 1998, envolvendo 140.903 determinações, no qual foram encontrados ritmos sazonais significativos para o cálcio, com valores máximos no outono e mínimos na primavera e para a creatinina, com picos no verão e declínio no inverno, ambos de baixa amplitude (duas casas decimais após a vírgula nas concentrações séricas).

Ritmo sazonal similar para o cálcio sérico foi relatado por outros estudiosos ^{67,85}, porém contrastam com alguns autores ^{31,49,75}. Neste trabalho não foi observada interferência da idade e do sexo neste analito.

Assim como neste trabalho, GIDLOW et al. (1986) ²⁴ e ROCKER et al. (1980) ⁷² obtiveram ritmicidade na creatinina, sendo que o primeiro observou elevação na primavera e outono com declínio no verão, contrastando com o segundo trabalho que demonstrou aumentos significativos no verão para o sexo feminino se comparado com as

outras estações, não variando no sexo masculino. A diferença de valores entre o pico e nadir foi semelhante nos dois estudos, aproximadamente 6%.

Não se observou interferência do sexo no ritmo da creatinina, entretanto observou-se influência da faixa etária entre 36 a 50 anos. Alguns trabalhos não apresentam ritmicidade para as concentrações séricas deste analito ^{4,26,39}.

Os demais parâmetros estudados não apresentaram ritmicidade circanual, contrastando com o trabalho de VANDERSCHUEREN et al. (1991) que detectaram sazonalidade para o fósforo, com elevações no inverno e diminuição no verão, com diferença de aproximadamente 12% entre esses valores ⁸⁵.

Ritmo sazonal para o ácido úrico foi demonstrado por REILLY et al. (1987) ⁶⁷ com baixos níveis durante a primavera e verão comparados com o outono e inverno, REVERT et al. (2000) ⁶⁹ com elevação nos níveis médios no verão se comparado com o inverno e LETELLIER et al. (1982) ⁴⁹ que apresentou aumento no verão comparado com outono. Porém alguns trabalhos na literatura não evidenciam ritmos sazonais para o ácido úrico ^{4,72}.

A ausência de ritmicidade demonstrada neste trabalho para o fósforo e a uréia vai de encontro com alguns relatos na literatura ^{49,67,72}.

Deve-se ressaltar que as diferenças em relação às estações do ano que apresentam os valores mais altos ou mais baixos podem ser decorrentes das variações climáticas e predominantemente sócio-culturais inerentes a cada país.

A localização geográfica de um estudo que visa analisar ritmos circanuais é muito importante. A acrofase circanual pode ser dependente da geografia como já havia sido demonstrada por BATCHELET et al. (1973) ³ e BOHLEN e SIMPSON (1973) ⁶. Mudanças ocorridas no comprimento do dia ao longo do ano, que variam conforme a latitude, são consideradas como o principal fator responsável pela sincronização dos ritmos circanuais em várias espécies ⁶⁷.

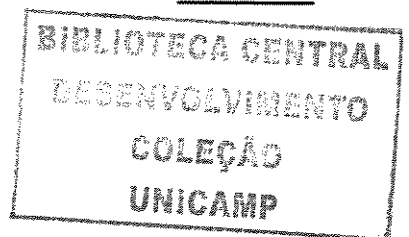
Na Europa, por exemplo, as estações são bem definidas com mudanças significativas nas condições climáticas, ao contrário do que ocorre em grande parte do território brasileiro, onde as estações não são tão definidas.

A distinção dos efeitos de fatores exógenos (sócio-culturais, luminosidade, temperatura ambiente e disponibilidade de alimentos) ou endógenos (determinados geneticamente) como causa de variação sazonal nos exames laboratoriais é difícil porque muitos fatores exógenos podem servir como sincronizadores de funções rítmicas endógenas ⁶⁷.

Ainda com relação à análise dos ritmos circanuais também existe o problema de se transformar informações populacionais para individuais, já que cada organismo pode reagir de forma diferente aos mais variados estímulos. Estudos prospectivos individuais neste campo de pesquisa são difíceis devido ao número elevado de coletas de sangue, a necessidade de uma amostragem representativa e o tempo despendido, que no mínimo é de três anos para estudos sazonais, a fim de se obter valores significativos estatisticamente.

Ressalta-se que este tipo de estudo, por ser retrospectivo, tem características econômicas favoráveis e simultaneamente aglomera um vasto número de participantes.

6- CONCLUSÃO GERAL



- Os valores observados para o Colesterol, o HDL-colesterol, o LDL-colesterol e o Triglicérides tanto em adultos como crianças e adolescentes, diferem dos recomendados pelo NCEP e adotados pelas IIDBSD e indicam a alta prevalência de dislipidemias nesta região. As concentrações de Lp(a) foram moduladas por HDL₂Tg, LDL-C e o sexo feminino;
- A sazonalidade do Colesterol, HDL-colesterol, LDL-colesterol, Cálcio e Creatinina deve ser valorizada como uma importante causa de variação pré-analítica no laboratório clínico;
- Os ritmos do Colesterol e do LDL-colesterol por análise de correlação cruzada se correlacionaram com a prevalência da aterosclerose, o que indica em parte um papel do “relógio biológico” na ocorrência das doenças, no caso da doença cardiovascular aterosclerótica.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ARENDT, J. **Melatonin and the Mammalian Pineal Gland**. London: Ed. Chapman&Hall, 1995. v.1
- 2- ARMSTRONG, S. M.; CASSONE, V. M.; CHESWORTH, M. J.; REDMAN, J. R.; SHORT, R. V. Synchronization of mammalian circadian rhythms by melatonin. **J Neural Transm Suppl**, 21: 375-94, 1986.
- 3- BATCHELET, E.; HILLMAN, D.; SMOLENSKY, M.; HALBERG, F. Angular-linear correlation coefficient for rhythmometry and circannual change in human birth rates at different geographic latitudes. **Int J Chronobiol**, 1: 183-202, 1973.
- 4- BJORNSSON, O. J.; DAVIDSSON, D.; FILIPPUSON, H.; OLAFSSON, O.; SIGFUSSON, N.; THORSTEINSSON, T. Distribution of haematological, serum and urine values in a general population of middle-aged men. The Reykjavik Study. **Scand J Soc Med Suppl**, 32: 1-12, 1984.
- 5- BLUHER, M.; HENTSCHEL, B.; RASSOUL, F.; RICHTER, V. Influence of dietary intake and physical activity on annual rhythm of human blood cholesterol concentrations. **Chronobiol Int**, 18(3): 541-57, 2001.
- 6- BOHLEN, J.; SIMPSON, H. Latitude and the human circadian system. In: Mills, J. N. **Biological Aspects of circadian rhythms**. New York: Plenum Press, 1973. p. 85-120.
- 7- BRIGDEN, M. L.; HEATHCOTE, J. C. Problems in interpreting laboratory tests. **Postgrad Med**, 107(7): 145-64, 2000.
- 8- CARO, J.; KLITTICH, W.; MCGUIRE, A.; FORD, I.; NORRIE, J.; PETTITT, D. et al. The West of Scotland coronary prevention study: economic benefit analysis of primary prevention with pravastatin. **BMJ**, 315(7122): 1577-82, 1997.
- 9- CASSONE, V. M.; CHESWORTH, M. J.; ARMSTRONG, S. M. Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. **Physiol Behav**, 36(6): 1111-21, 1986.
- 10- CASTANHO, V. S.; OLIVEIRA, L. S.; PINHEIRO, H. P.; OLIVEIRA, H. C. F.; DE FARIA, E. C. Sex differences in risk factors for coronary heart disease: a study in a Brazilian population. **BMC Public Health**, 1(1): 3, 2001.

- 11-CHESWORTH, M. J.; CASSONE, V. M.; ARMSTRONG, S. M. Effects of daily melatonin injections on activity rhythms of rats in constant light. **Am J Physiol**, 253(1Pt 2): R101-7, 1987.
- 12-CORONELLI, C. L. S.; MOURA, E. C. Hipercolesterolemia em escolares e seus fatores de risco. **Rev Saúde Pública**, 37: 24-31, 2003.
- 13-DANESH, J.; COLLINS, R.; PETO, R. Lipoprotein(a) and coronary heart disease: meta-analysis of prospective studies. **Circulation**, 102: 1082-1085, 2000.
- 14-DANNENBERG, A.; LELLER, J.; WILSON, P.; CASTELLI, W. Leisure time physical activity in the Framingham Offspring Study. **Am J Epidemiol**, 129: 76-88, 1989.
- 15-DATASUS: banco de dados. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sih/cnv/misp.def> Acesso em: 20 abr. 2005.
- 16-DONAHOO, W. T.; JENSEN, D. R.; SHEPARD, T. Y.; ECKEL, R. H. Seasonal variation in lipoprotein lipase and plasma lipids in physically active, normal weight humans. **J Clin Endocr Met**, 85(9): 3065-8, 2000.
- 17-DOUGLAS, A. S.; MILLER, M. H.; REID, D. M.; HUTCHISON, J. D.; PORTER, R. W.; ROBINS, S. P. Seasonal differences in biochemical parameters of bone remodeling. **J Clin Pathol**, 49: 284-9, 1996.
- 18-DURRINGTON, P. N. Biological variation in serum lipid concentration. **Scand J Clin Lab Invest Suppl**, 198: 86-91, 1990.
- 19-ELIAS, M. C.; BOLÍVAR, M. S. M.; FONSECA, F. A. H.; MARTINEZ, T. L. R.; ANGELINI, J.; FERREIRA, C. et al. Comparação do Perfil Lipídico, Pressão Arterial e Aspectos Nutricionais em Adolescentes, Filhos de Hipertensos e de Normotensos. **Arq Bras Cardiol**, 82: 139-42, 2004.
- 20-Fleury. **Manual de Exames**. São Paulo: Ed. Laboratório Fleury S/C Ltda. 1999.
- 21-FRANCO, L. J. Epidemiologia do Diabetes Mellitus. In: Lessa, I. **O adulto brasileiro e as doenças da modernidade. Epidemiologia das doenças crônicas não-transmissíveis**. São Paulo: Hucitec/Abrasco, 1998. v.1

- 22-FULLER, J. H.; GRAINGER, S. L.; JARRETT, R. J.; KEEN, H. Possible seasonal variation of plasma lipids in a healthy population. **Clin Chem Acta**, 52: 305-10, 1974.
- 23-GARDE, A. H.; HANSEN, A. M.; SKOVGAARD, L. T.; CHRISTENSEN, J. M. Seasonal and biological variation of blood concentrations of total cholesterol, dehydroepiandrosterone sulfate, hemoglobin A_{1c}, IgA, prolactin, and free testosterone in healthy women. **Clin Chem**, 46(4): 551-9, 2000.
- 24-GIDLOW, D. A.; CHURCH, J. F.; CLAYTON, B. E. Seasonal variations in haematological and biochemical parameters. **Ann Clin Biochem**, 23 (Pt.3): 310-6, 1986.
- 25-GORDON, D. J.; HYDE, J.; TROST, D. C.; WHALEY, F. S.; HANNAN, P. J.; JACOBS, D. R.; et al. Cyclic seasonal variation in plasma lipid and lipoprotein levels: the lipid research clinics coronary primary prevention trial placebo group. **J Clin Epidemiol**, 41(7): 679-89, 1988.
- 26-GOWANS, E. M.; FRASER, C. G. Biological variation of serum and urine creatinine and creatinine clearance: ramifications for interpretation of results and patient care. **Ann Clin Biochem**, 25: 259-63, 1988.
- 27-GUIMARÃES, A. C.; LIMA, M.; MOTA, E.; LIMA, J. C.; MARTINEZ, T.; CONTI, A. et al. The Cholesterol Level of a Selected Brazilian Salaried Population: Biological and Socioeconomic Influences. **CVD Prevention**, 1: 306-317, 1998.
- 28-GULATI, S.; SAXENA, A. Study of Lipid Profile in Children of Patients with Premature Coronary Artery Disease. **Indian Pediatrics**, 40: 556-60, 2003.
- 29-HANKEY, G. J. Role of lipid-modifying therapy in the prevention of initial na recurrent stroke. **Curr Opin Lipidol**, 13(6): 645-51, 2002.
- 30-HARRINGTON, M. E.; RAHMANI, T.; LEE, C. A. Effects of damage to SCN neurons and efferent pathways on circadian activity rhythms of hamsters. **Brain Res Bull**, 30(5): 655-69, 1993.
- 31-HARRIS, E. K.; DEMETS, D. L. Biological and analytic components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects – V. Estimated biological variations in ionized calcium. **Clin Chem**, 17(10): 983-7, 1971.

- 32-HAUS, E.; LAKATUA, D. J.; SACKETT-LUNDEEN, L. L.; SWOYER, J. Chronobiology in laboratory medicine. In: REITVELD, W. J. **Clinical Aspects of Chronobiology**. The Netherlands: Meducation Service Hoechst, 1984. p. 13-82.
- 33-HAUS, E.; NICOLAU, G. Y.; LAKATUA, D. J.; SACKETT-LUNDEEN, L.; PETESCU, E.; SWOYER, J. Chronobiology in laboratory medicine. **Ann Ist Super Sanità**, 29(4): 581-606, 1993.
- 34-HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. São Paulo: Ed. Manole, 1999. v.19
- 35-HOFMAN, M. A. The human circadian clock and aging. **Chronobiol Int**, 17(3): 245-59, 2000.
- 36-III Diretrizes Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol**, 77(supl.III): 4-48, 2001.
- 37-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: banco de dados. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2000> Acesso em: 20 abr. 2005.
- 38-IRJALA, K. M.; GRONROOS, P. E. Pre-analytical and analytical factors affecting laboratory results. **Ann Med**, 30(3): 267-72, 1998.
- 39-ISEKI, K.; MORITA, O.; FUKIYAMA, K. Seasonal variation in the incidence of end-stage renal disease. **Am J Nephrol**, 16: 375-81, 1996.
- 40-JOHNSON, R. F.; MOORE, R. Y.; MORIN, L. P. Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. **Brain Res**, 460: 297-313, 1988a.
- 41-JOHNSON, R. F.; MORIN, L. P.; MOORE, R. Y. Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. **Brain Res**, 462: 301-12, 1988b.
- 42-JUDELSON, D. R. Coronary heart disease in women: risk factors and prevention. **J Am Med Women Assoc**, 49: 186-197, 1994.

- 43-KLEIN, D. C.; MOORE, R. Y.; REPERT, S. M. **Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock**. Oxford: Ed. Oxford University, 1991. v.1
- 44-KONDO, T.; STRAYER, C. A.; KULKARNI, R. D.; TAYLOR, W.; ISHIURA, M.; GOLDEN, S. S. et al. Circadian rhythms in prokaryotes: Luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. **Proc Natl Acad Sci USA**, 90: 5672-6, 1993.
- 45-KRISTAL-BONEH, E.; HARARI, G.; GREEN, M. S. Circannual variations in blood cholesterol levels. **Chronobiol Int**, 10(1): 37-42, 1993.
- 46-KRISTIANSEN, J.; CHRISTENSEN, J. M. Traceability and uncertainty in analytical measurements. **Ann Clin Biochem**, 35: 371-9, 1998.
- 47-KWITEROVICH, P. O. Plasma Lipid and Lipoprotein Levels in Childhood. **Ann N Y Acad Sci**, 623: 90-107, 1991.
- 48-LEE, T. M.; ZUCKER, I. Suprachiasmatic nucleus and photic entrainment of circannual rhythms in ground squirrels. **J Biol Rhythms**, 6(4): 315-30, 1991.
- 49-LETELLIER, G.; DESJARLAIS, F. Study of seasonal variations for eighteen Biochemical parameters over a four-year period. **Clin Bioch**, 15(4): 206-11, 1982.
- 50-LYDIC, R.; ALBERS, H. E.; TEPPER, B.; MOORE-EDE, M. C. Three-dimensional structure of the mammalian suprachiasmatic nuclei: a comparative study of five species. **J Comp Neurol**, 204(3): 225-37, 1982.
- 51-MANSUR, A. P.; FAVARATO, D.; SOUZA, M. F. M.; AVAKIAN, S. D.; ALDRIGUI, J. M.; CÉSAR, L. A. M. et al. Trends in Death from Circulatory Diseases in Brazil Between 1979 and 1996. **Arq Bras Cardiol**, 76(6): 504-10, 2001.
- 52-MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. São Paulo: Ed. Edusp, 1997. v.1
- 53-MARTINEZ, T. L. R.; SANTOS, R. D.; ARMAGANIAN, D.; TORRES, K. P.; LOURES-VALE, A.; MAGALHÃES, M. E. et al. National Alert Campaign about Increased Cholesterol. Determination of Cholesterol Concentrations in 81.262 Brazilians. **Arq Bras Cardiol**, 80: 635-638, 2003.

- 54-MATTHEWS, C.; HEBERT, J.; FREEDSON, P.; STANEK III, E.; MEERIAM, P.; EBBELING, C.; et al. Sources of variance in daily physical activity levels in the Seasonal Variation of Blood Cholesterol Study. **Am J Epidemiol**, 153: 987-995, 2001.
- 55-MAVRI, A.; GUZIC-SALOBIR, B.; SALOBIR-PAJNIC, B.; KLEBER, I.; STARE, J.; STEGNAR, M. Seasonal variation of some metabolic na haemostatic risk factors in subjects with and without coronary artery disease. **Blood Coagul Fibrinolysis**, 12(5): 359-65, 2001.
- 56-Medicare program; Medicare and laboratory certification program; enforcement procedures for laboratories-HCFA. Final rule. **Fed Regist**, 57(40): 7218-43, 1992.
- 57-Medicare, Medicaid and CLIA programs; revision of the laboratory regulations for the Medicare, Medicaid, and Clinical Laboratories Improvement Act of 1967 programs-HCFA. Final rule with comment period. **Fed Regist**, 55(50): 9538-610, 1990.
- 58-MONTALBETTI, N. Chronobiology in the clinical laboratory. **Chronobiologia**, 16(4): 409-15, 1989.
- 59-MOURA, E. C.; CASTRO, C. M.; MELLIN, A. S.; FIGUEIREDO, D. B. Perfil lipídico em escolares de Campinas, SP, Brasil. **Rev Saúde Pública**, 34: 499-505, 2000.
- 60-MUSTAD, V.; DERR, J.; CHANNA REDDY, C.; PEARSON, T. A.; KRIS-ETHERTON, P. M. Seasonal variation in parameters related to coronary heart disease risk in young men. **Atheroscl**, 126: 117-29, 1996.
- 61-National Cholesterol Education Program. Third Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). **Circulation**, 24: 3144-421, 2002.
- 62-NAZIR, D. J.; ROBERTS, R. S.; HILL, S. A.; MCQUEEN, M. J. Monthly intra-individual variation in lipids over a 1-year period in 22 normal subjects. **Clin Biochem**, 32(5): 381-9, 1999.
- 63-NELSON, W.; TONG, Y. L.; LEE, J. K.; HALBERG, F. Methods for Cosinor-rhythmometry. **Cronobiologia**, 6(4): 305-23, 1979.

- 64-NICOLAU, J. C.; BECHARA, D. L.; NASCIMENTO, S. D.; GRECO, O. T.; JACOB, J. L.; LORGA, A. M. The cholesterol profile in the city of São José do Rio Preto. **Arq Bras Cardiol**, 59: 433-440, 1992.
- 65-PEVET, R. Comparative Physiology of Environmental Adaptations. In: PEVET, R. **Adaptations to Climatic Changes**. London: Karger, 1987. v.3
- 66-RATH, M.; NIENDORF, A.; REBLIN, T.; DIETEL, M.; KREBBER, H. J.; BEISIEGEL, U. Detection and quantification of lipoprotein(a) in arterial wall of 107 coronary bypass patients. **Arteriosclerosis**, 9: 579-592, 1989.
- 67-REILLY, C.; NICOLAU, G. Y.; LAKATUA, D. J.; BOGDAN, C.; SACKETT-LUNDEEN, L.; PETRESCU, E. et al. Circannual rhythms of laboratory measurements in serum of elderly subjects. **Prog Clin Biol Res**, 227B: 51-72, 1987.
- 68-REINEHR, T.; WABITSCH, M.; ANDLER, W.; BEYER, P.; BOTTNER, A.; CHEN-STUTE, A. et al. Medical care of obese children and adolescents. APV: a standardised multicentre documentation derived to study initial presentation and cardiovascular risk factors in patients transferred to specialised treatment institutions. **Eur J Pediatr**, 163: 308-12, 2004.
- 69-REVERT, J. M.; MARTINEZ-LAHUERTA, J. J.; PORCAR, L. A. Seasonal change in blood concentration of uric acid and its potential clinical implications. **Aten Primaria**, 26(7): 468-71, 2000.
- 70-RICHTER, C. P. Psychopathology of periodic behavior in animals and man. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PSYCHOPATHOLOGICAL ASSOCIATION, 55, 1965. New York City. **Comparative Psychopathology**. New York: APA, 1967. p. 205-227.
- 71-RIFAI, N.; DUFOUR, R.; COOPER, G. R. Preanalytical variation in lipid, lipoprotein, and apolipoprotein testing. In: RIFAI, N.; WARNICK, R.; DOMINICZAK, M. **Handbook of Lipoprotein Testing**. Washington, DC: AACC Press, 1997. chapter 4.
- 72-ROCKER, L.; FEDDERSEN, H. M.; HOFFMEISTER, H.; JUNGE, B. Seasonal variation of blood components important for diagnosis. **Klin Wochenschr**, 58(15): 769-78, 1980.

- 73-ROMALDINI, C. C.; ISSLER, H.; CARDOSO, A. L.; DIAMENT, J.; FORTI, N.
Fatores de risco para aterosclerose em crianças e adolescentes com história familiar de
doenças arterial coronariana prematura. **Jornal de Pediatria**, 80: 135-40, 2004.
- 74-RUBINS, H. B.; ROBINS, S. J.; COLLINS, D.; IRANMANESH, A.; WILT, T. J.;
MANN, D. et al. Distribution of lipids in 8500 men with coronary artery disease. **Am J
Cardiol**, 75: 1196-1201, 1995.
- 75-RUDNICKI, M.; THODE, J.; JORGENSEN, T.; HEITMANN, B. L.; SORENSEN, O.
H. Effects of age, sex, season and diet on serum ionized calcium, parathyroid hormone
and vitamin D in a random population. **J Intern Med**, 234: 195-200, 1993.
- 76-SANTOS, R. D.; SPOSITO, A. C.; SANTOS, J. E.; FONSECA, F. H.; MORIGUCHI,
E. H.; MARTINEZ, T. L. R. PANDORA – Survey of Brazilian Cardiologists about
Cholesterol Reduction. **Arq Bras Cardiol**, 75(4): 289-302, 2000.
- 77-SEKI, M.; SEKI, M. O.; NIYAMA, F. P.; PEREIRA, P. G. JR.; SEKI, M. O.;
MATSUO, T. et al. Determinação dos intervalos de referência para lipídeos e
lipoproteínas em escolares de 10 a 19 anos de idade de Maracá(SP). **J Bras Patol**,
39(4): 309-16, 2003.
- 78-SHERMAN, S. S.; HOLLIS, B. W.; TOBIN, J. D. Vitamin D status and related
parameters in a healthy population: the effects of age, sex, and season. **J Clin Endocr
Met**, 71(2): 405-13, 1990.
- 79-SILVER, R.; LE SAUTER, J. Efferent signals of the suprachiasmatic nucleus. **J Biol
Rhythms**, 8 Suppl: S89-92, 1993.
- 80-SOROF, J.; DANIELS, S. Obesity Hypertension in Children: A Problem of Epidemic
Proportions. **Hypertension**, 40: 441-7, 2002.
- 81-STRONG, J. P.; MCGILL, H. C. JR. The pediatric aspect of atherosclerosis.
J Atheroscler Res, 9: 251-65, 1969.
- 82-TIETZ, N. **Fundamentals of Clinical Chemistry**. Philadelphia: Ed. WB Saunders Co,
2001. v.5

- 83- USP. Departamento de Astronomia da Universidade de São Paulo. Disponível em: <<http://www.astro.iag.usp.br/estacoes.html>>. Acesso em: 14 abr. 2004.
- 84- van ROSSUM, C. T. M.; SHIPLEY, M. J.; HEMINGWAY, H.; GROBBEE, D. E.; MACKENBACH, J. P.; MARMOT, M. G. Seasonal variation in cause-specific mortality: are there high-risk groups? 25-year follow-up of civil servants from the first Whitehall study. **Int J Epidemiol**, 30(5): 1109-16, 2001.
- 85- VANDERSCHUEREN, D.; GEVERS, G.; DEQUEKER, J.; GEUSENS, P.; NIJS, J.; DEVOS, P. et al. Seasonal variation in bone metabolism in young healthy subjects. **Calcif Tissue Int**, 49: 84-9, 1991.
- 86- WALLAERT, C.; BABIN, P. J. Age-related, sex-related, and seasonal changes of plasma lipoprotein concentration in trout. **Journal of Lipid Research**, 35: 1619-33, 1994.
- 87- WOITGE, H. W.; SCHEIDT-NAVE, C.; KISSLING, C.; LEIDIG-BRUCKNER, G.; MEYER, K.; GRAUER, A. et al. Seasonal variation of biochemical indexes of bone turnover: results of a population-based study. **J Clin Endocr Met**, 83(1): 68-75, 1998.
- 88- YU, H. S.; PANG, S. F.; TANG, P. L.; BROWN, G. M. Persistence of circadian rhythms of melatonin and N-acetylserotonin in the serum of rats after pinealectomy. **Neuroendocrinology**, 32(5): 262-5, 1981.
- 89- ZUCKER, I.; BOSHES, M.; DARK, J. Suprachiasmatic nuclei influence circannual and circadian rhythms of ground squirrels. **Am J Physiol**, 244(4): R472-80, 1983.