

4. Resultados e discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para a análise de esteróis.

Para avaliar a aplicabilidade do método HPLC-DAD na quantificação de esteróis em amostras biológicas, começou-se por determinar os tempos de retenção dos diferentes esteróis, utilizando-se padrões na concentração de 250 e 125 μM . Obtiveram-se os seguintes cromatogramas:

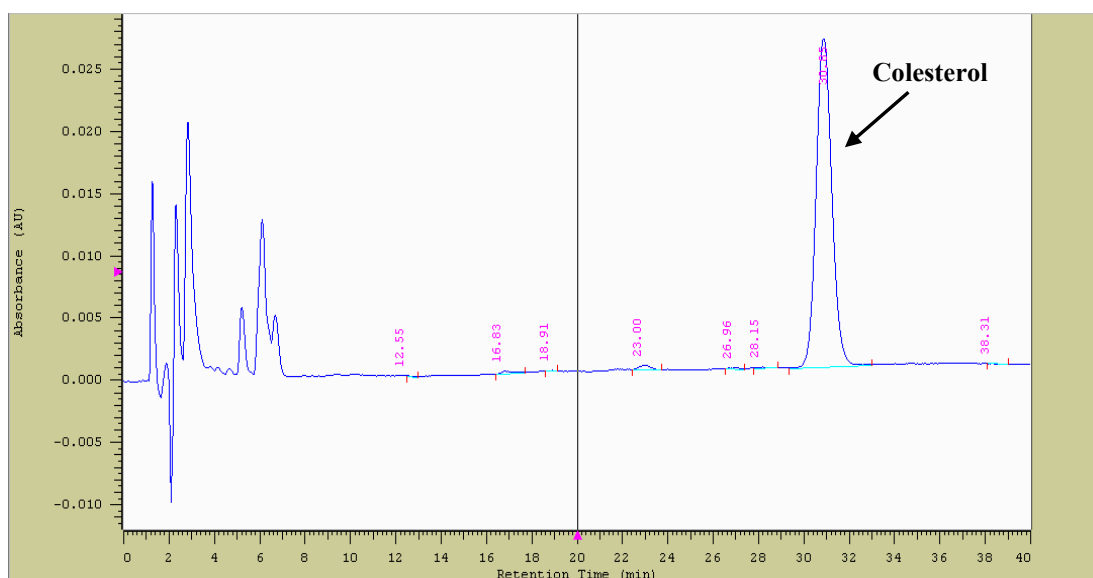


Figura 4.1. Cromatograma de HPLC de um padrão de colesterol com concentração de 125 μM . O tempo de retenção é de 30.85 min.

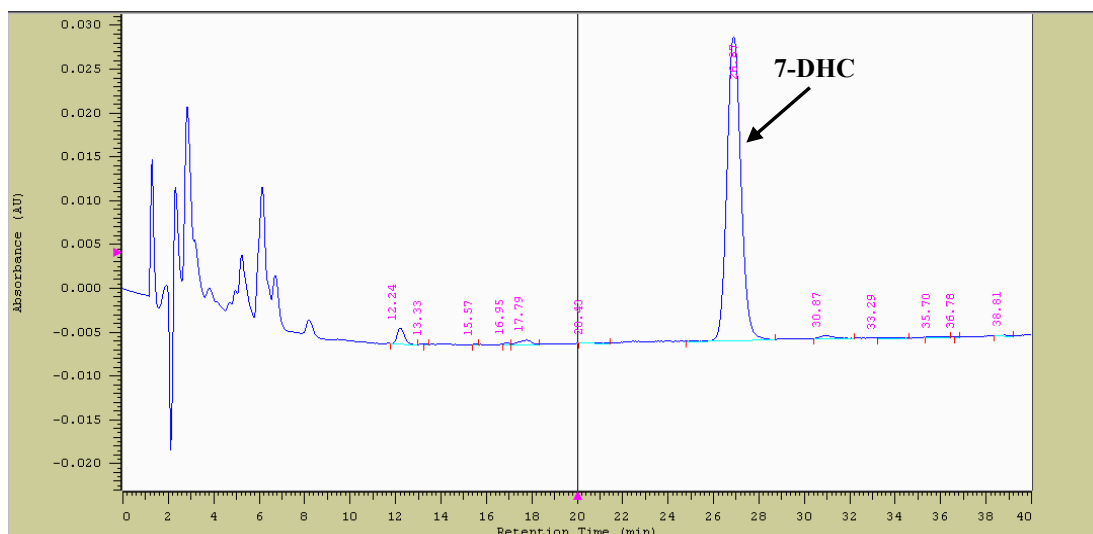


Figura 4.2. Cromatograma de HPLC de um padrão de 7-DHC com concentração de 125 μ M. O tempo de retenção é de 26.87 min.

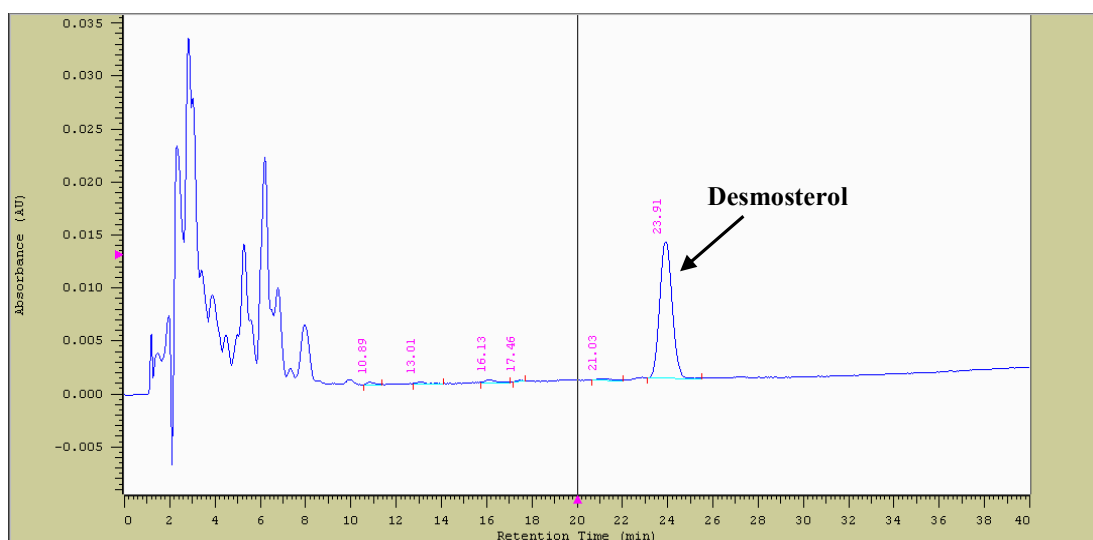


Figura 4.3. Cromatograma de HPLC de um padrão de desmosterol com concentração de 125 μ M. O tempo de retenção é de 23.91 min.

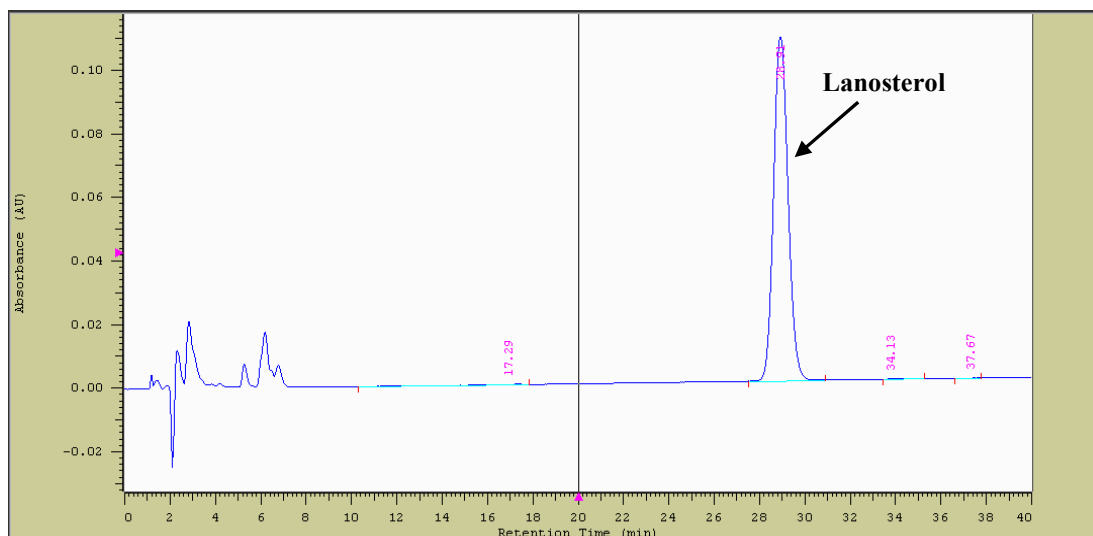


Figura 4.4. Cromatograma de HPLC de um padrão de lanosterol com concentração de 125 μ M. O tempo de retenção é de 28.91 min.

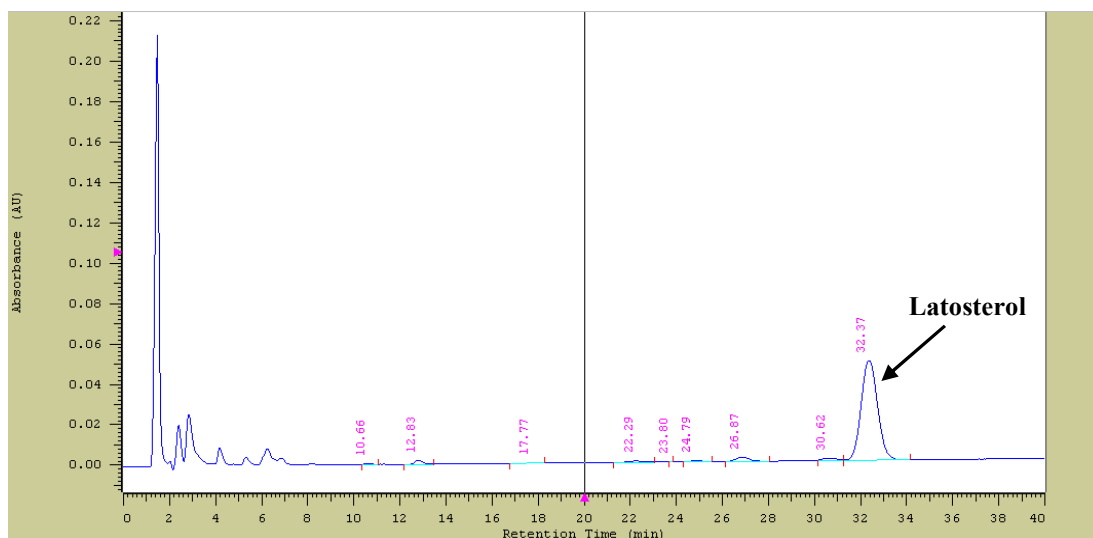


Figura 4.5. Cromatograma de HPLC de um padrão de latosterol com concentração de 125 μ M. O tempo de retenção é de 32.37 min.

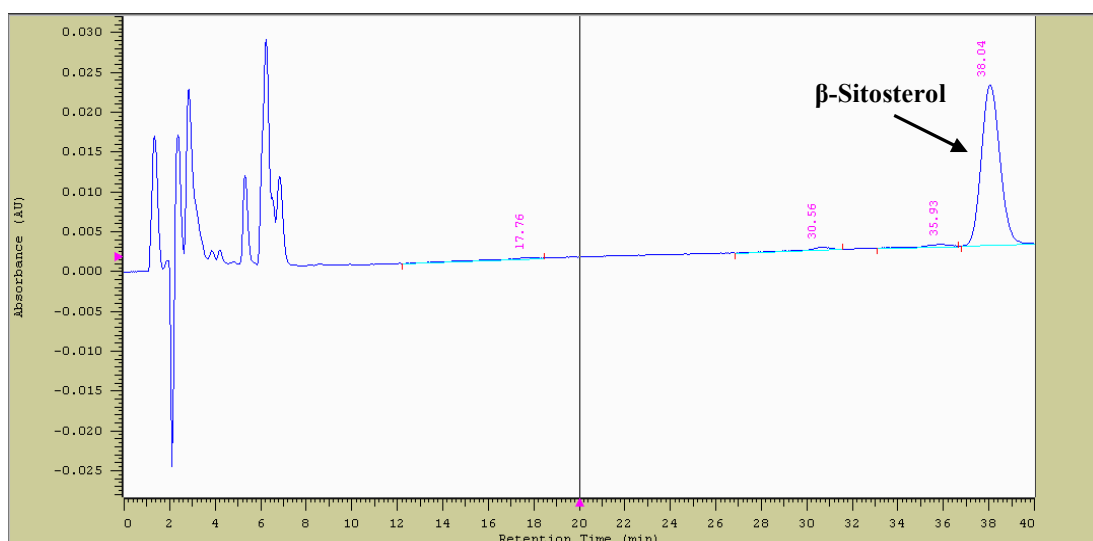


Figura 4.6. Cromatograma de HPLC de um padrão de β -Sitosterol com concentração de 125 μ M. O tempo de retenção é de 38.04 min.

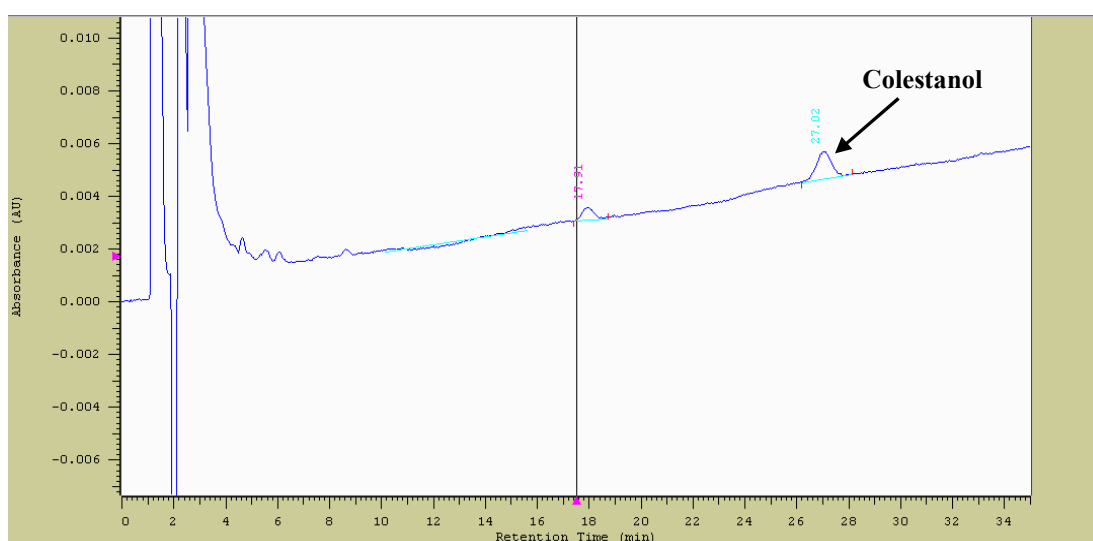


Figura 4.7. Cromatograma de HPLC de um padrão de colestanol com concentração de 125 μ M. O tempo de retenção é de 27.02 min.

Após a análise cromatográfica individual, que permitiu a determinação do tempo de retenção de cada esterol, procedeu-se à análise por HPLC de uma mistura de 7-DHC, colesterol, desmosterol, lanosterol, latosterol, colestanol e β -sitosterol, tendo-se obtido o seguinte cromatograma:

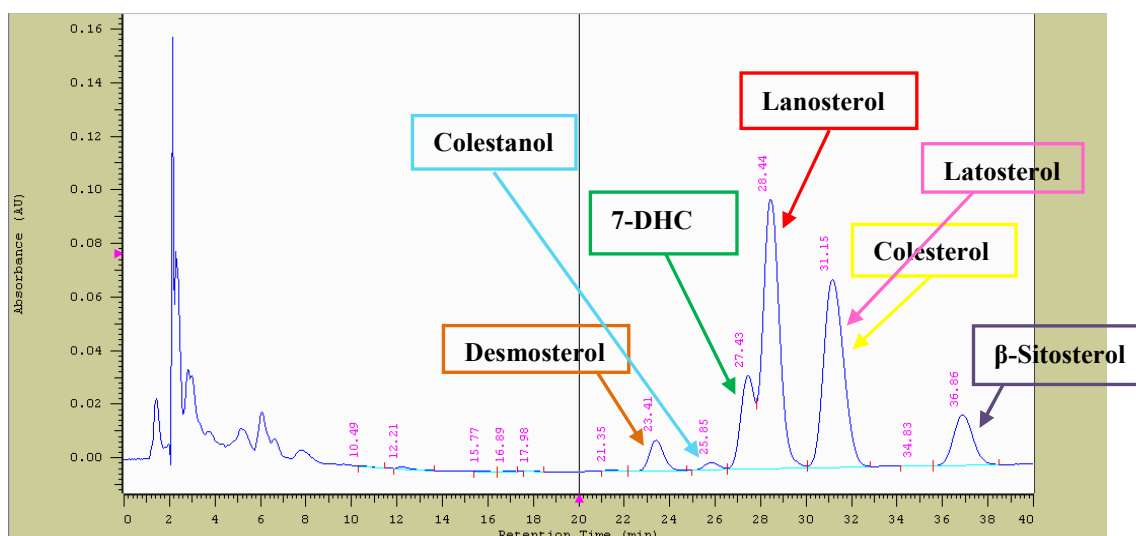


Figura 4.8. Cromatograma de HPLC de uma mistura padrão de 7-DHC, colesterol, desmosterol, lanosterol, latosterol, coletanol e β -sitosterol com concentração de 125 μ M. Os tempos de retenção para cada esterol são: para o 7-DHC é de 27.43 min., para o colesterol é de 31.15 min., para o desmosterol é de 23.41 min., para o lanosterol é de 28.44 min., para o latosterol é de 31.15 min., para o coletanol é de 25.85 min. e para o β -sitosterol é de 36.86 min.

Observou-se que o método desenvolvido permite separar todos os esteróis com exceção do colesterol e latosterol que co-eluem (pois possuem tempos de retenção muito próximos). Face a esta observação, repetiram-se as análises com novas misturas padrão, tendo-se obtido resultados idênticos.

A análise de uma mistura padrão de colesterol e latosterol na concentração de 125 μ M, resultou no seguinte cromatograma:

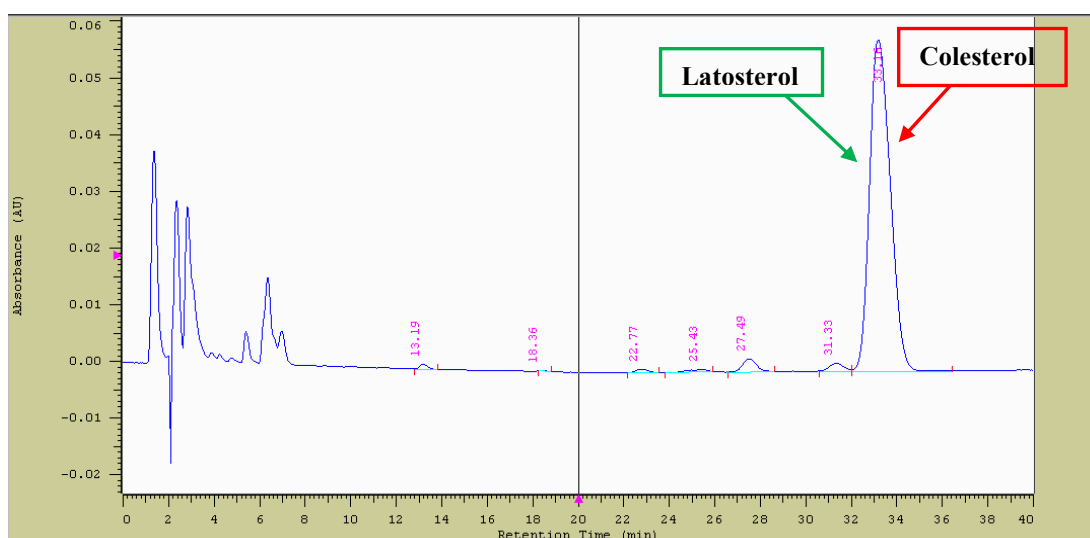


Figura 4.9. Cromatograma de HPLC de uma mistura padrão de colesterol e latosterol com concentração de 125 μM . O tempo de retenção do colesterol e latosterol é de 33.16 min.

Como confirma o cromatograma anterior, constatou-se que o colesterol e o latosterol não são separados pelo método HPLC-DAD utilizado, quando presentes numa mesma amostra, apesar de cada um isoladamente, apresentar tempos de retenção ligeiramente diferentes. Esta situação, pode ser explicada pelo facto de os dois compostos terem uma estrutura semelhante e o mesmo peso molecular (386.65 g/mol), o que faz com que migrem na coluna de modo idêntico e, conseqüentemente, não se consigam separar.

Uma alternativa testada no trabalho mas sem melhorias na separação do colesterol e latosterol foi modificar as condições cromatográficas, variando a temperatura, pressão, a constituição da fase móvel e o comprimento de onda do detector.

Assim, esteróis com pequenas diferenças na estrutura química, podem ter tempos de retenção muito próximos, o que limita a sua separação e quantificação em amostras biológicas e, por sua vez, o estabelecimento de valores de referência para os diferentes esteróis em amostras de uma população controlo.

O facto de não existir até à data nenhum método de HPLC-DAD descrito na literatura que quantifique, numa mesma amostra biológica, os esteróis que pretendemos analisar neste trabalho, principalmente o colesterol e o latosterol, vai de acordo com a observação feita.

Ahmida e colaboradores referem que uma boa separação cromatográfica para os esteróis, em várias matrizes biológicas, é obtida utilizando colunas capilares em cromatografia gás-líquido (GLC), uma vez que, os métodos de HPLC apresentam menor resolução e má

separação dos esteróis plasmáticos. Para além disso, o detector UV de HPLC e o detector de “flame ionisation” (FID) de GLC não permitem assegurar a pureza dos “picos”. Uma vez que, estes sistemas de detecção não são específicos estruturalmente, existe um risco potencial de interferência por outros analitos e por compostos da matriz plasmática não identificados e, que possam co-eluir com os esteróis (Ahmida *et al.*, 2006). A alternativa mais viável e a mais descrita na literatura é a quantificação dos diversos esteróis, em amostras biológicas, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa operando no modo de ião selectivo (SIM).

A utilização do método HPLC-DAD na quantificação dos diversos esteróis em amostras de soros e líquidos amnióticos, constituiria uma alternativa prática para o diagnóstico de algumas síndromes da via de biossíntese de colesterol, contudo, este objectivo não foi atingido por limitações da própria metodologia. Desta forma, foi optimizado um método de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, para a identificação e quantificação dos diferentes esteróis em amostras biológicas, método este que é o mais utilizado e descrito na literatura.

4.2. Método de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS) para a quantificação de esteróis em líquidos amnióticos

Através do método de GC-MS otimizado e validado e, por análise de 330 amostras de LA, agrupadas por diferentes idades gestacionais – das 13 às mais de 22 semanas de gestação, foram estabelecidos valores de referência para o colesterol, 7-dehidrocolesterol, latosterol, desmosterol e β -sitosterol, em amostras de líquidos amnióticos de fetos normais, em função do número de semanas de gestação. Para além de amostras LA de fetos normais, foi também analisada uma amostra de LA de um feto com suspeita de Síndrome Smith-Lemli-Opitz, em que os esteróis foram quantificados e comparados com os valores de referência estabelecidos para as amostras de gestações normais.

Os esteróis de cada LA, analisados no GC-MS (*QP 2010 Plus, Shimadzu*) operando no SIM, foram quantificados por integração manual das áreas dos respectivos picos, utilizando o software *Labsolutions – GCMS solutions, Shimadzu*, pelo método do padrão interno (Pi) (razão entre a área do composto e a área do Pi) e recorrendo-se às rectas de calibração de cada esterol.

4.2.1. Cromatogramas

O método GC-MS otimizado permite obter cromatogramas no modo varrimento e no modo SIM.

Para a análise qualitativa das amostras, por GC-MS, utilizou-se o modo varrimento, onde os esteróis são identificados pelos respectivos tempos de retenção e espectros de massa característicos. Para a análise quantitativa, programou-se o método para funcionar em modo de aquisição SIM, onde os esteróis são quantificados pelos iões (m/z) mais comuns, uma vez que, este modo é mais sensível e desta forma, permite uma maior resolução na detecção e quantificação dos esteróis.

A figura 4.10 representa um cromatograma em modo de varrimento e a figura 4.11. um cromatograma em modo de aquisição SIM, de uma mistura padrão com todos os esteróis. As figuras 4.12 e 4.13 correspondem a cromatogramas de um LA de um feto normal com 16 semanas de gestação, em modo de varrimento e em modo de aquisição SIM, respectivamente.

Nos cromatogramas em modo de varrimento, de ambas as amostras, é também possível observar o comportamento dos iões seleccionados para a quantificação de cada esteroel.

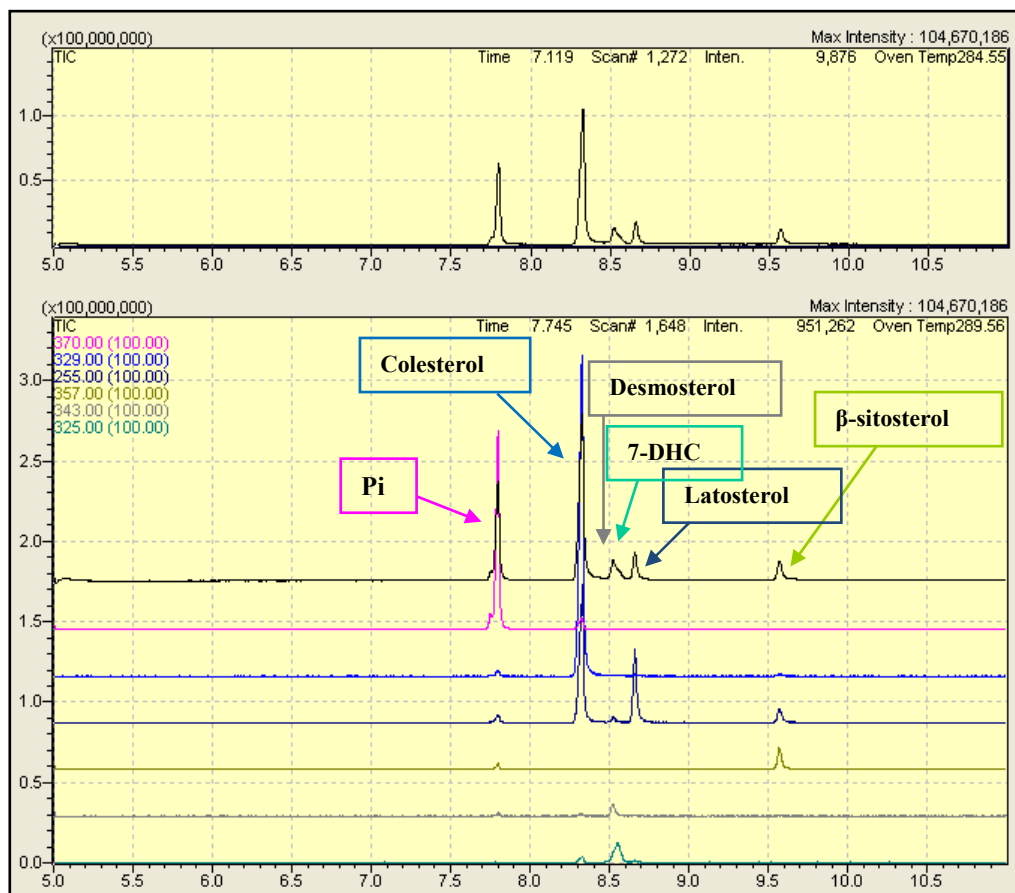


Figura 4.10. Cromatograma em modo de varrimento de uma mistura padrão de esteróis com concentração de 40µM para o colesterol e de 5µM para o latosterol, 7-DHC, desmosterol e β-sitosterol. As linhas com cores representam o comportamento dos iões seleccionados para cada esteroel.

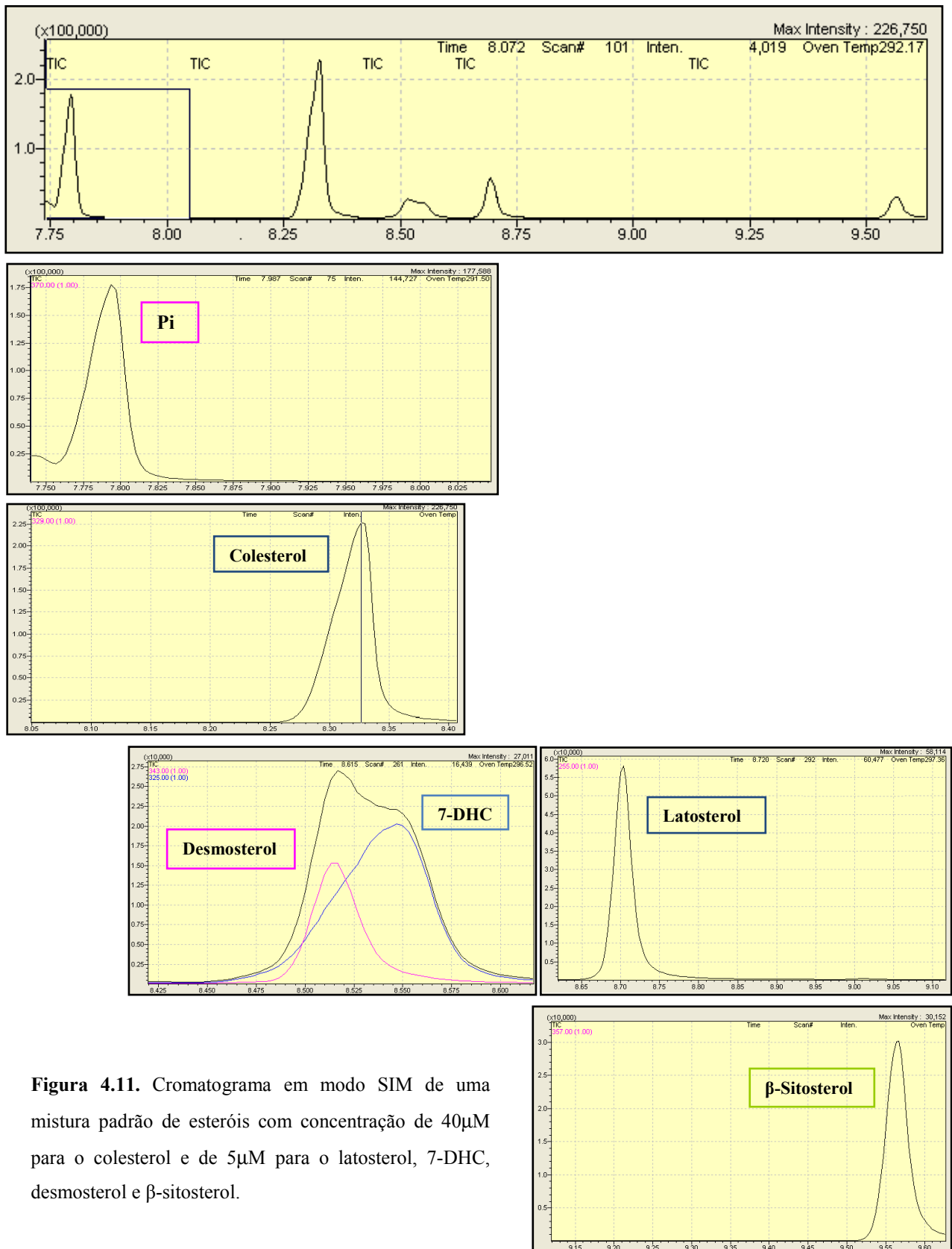


Figura 4.11. Cromatograma em modo SIM de uma mistura padrão de esteróis com concentração de 40µM para o colesterol e de 5µM para o latosterol, 7-DHC, desmosterol e β-sitosterol.

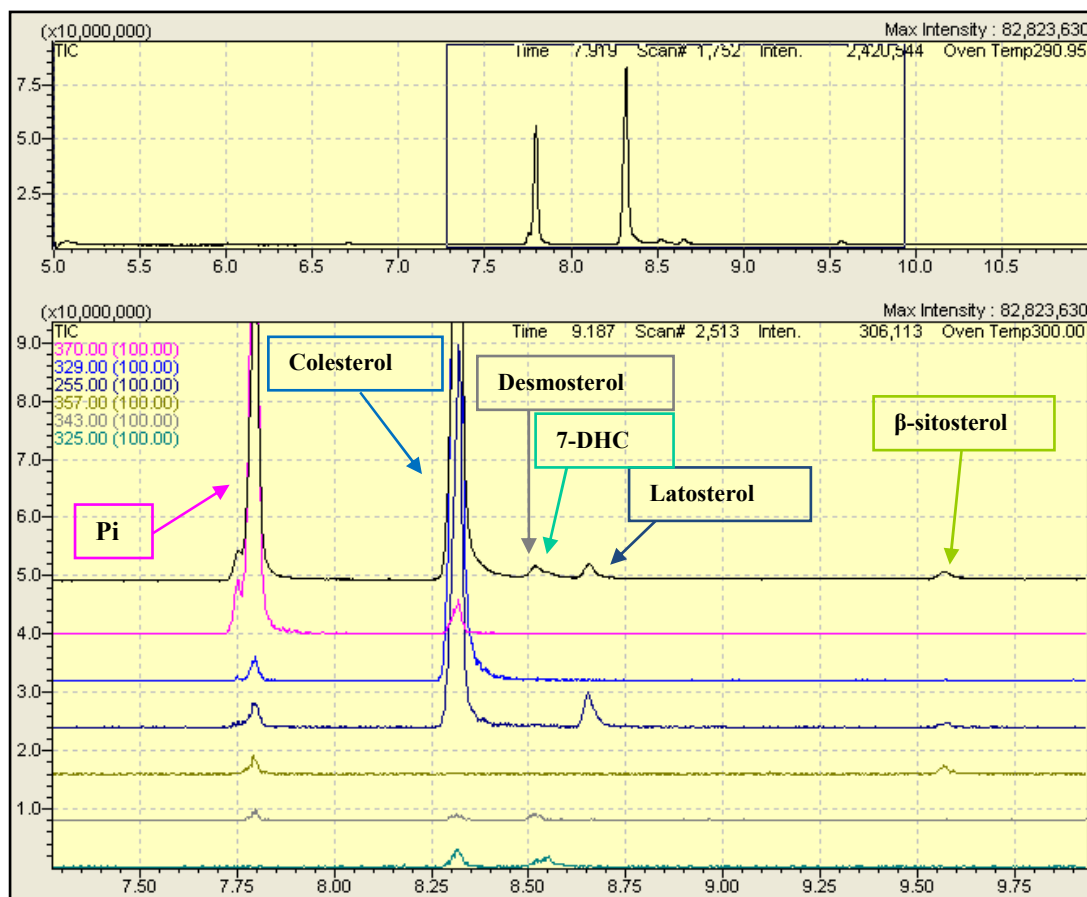


Figura 4.12. Cromatograma em modo de varrimento de uma amostra LA com 16 semanas de gestação. As linhas com cores representam o comportamento dos iões seleccionados para cada esterol.

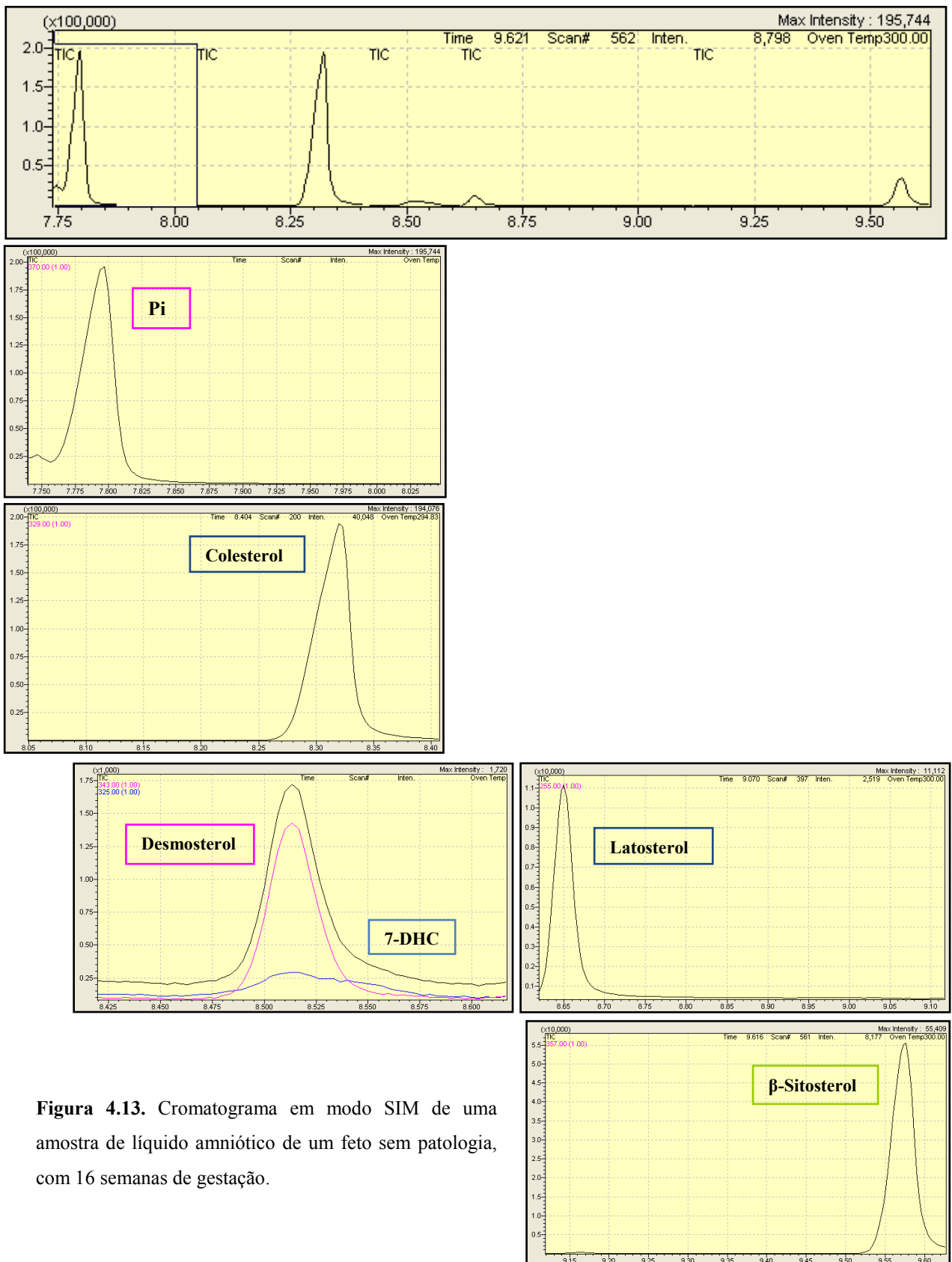


Figura 4.13. Cromatograma em modo SIM de uma amostra de líquido amniótico de um feto sem patologia, com 16 semanas de gestação.

4.2.2. Quantificação dos esteróis

Para a quantificação dos esteróis colesterol, 7-DHC, desmosterol, latosterol e β -sitosterol numa amostra de LA, inicialmente integrou-se manualmente as áreas dos picos respectivos a cada esterol, utilizando o software *Labsolutions – GCMS solutions, Shimadzu*. Pelo método do padrão interno (razão entre a área do composto e a área do Pi) e por interpolação da razão área de cada esterol/área Pi na equação da recta de calibração de cada esterol (razão quantidade de esterol/quantidade do Pi versus razão área do esterol/área Pi), determinaram-se as concentrações em μM de cada esterol, nas diferentes amostras.

Como se pode observar nas figuras 4.11 e 4.13, verifica-se que há uma co-eluição dos esteróis 7-DHC e desmosterol. Apesar de todas as tentativas falhadas, alterando os parâmetros e condições analíticas do método, e tal como descrito na literatura (o mesmo acontece nos artigos que utilizam o GC-MS para quantificar estes esteróis), estes dois compostos não são possíveis de separar uma vez que, ambos têm o mesmo peso molecular (384.64 g/mol) e uma estrutura química semelhante (diferença no local da segunda dupla ligação) (ver figura 4.14.). No entanto, em modo de aquisição SIM, o desmosterol pode ser quantificado isoladamente, seleccionando o ião 343 para o quantificar. Para o 7-DHC e seleccionando os iões 351 e 325, principais iões característicos deste esterol, observa-se contudo que o desmosterol era “englobado” na quantificação do 7-DHC (o desmosterol contribui para a área do 7-DHC), uma vez que este esterol também contém estes iões no seu espectro de massa global (ver figura 3.5. da secção 3.5.3. ou figura 4.16.).

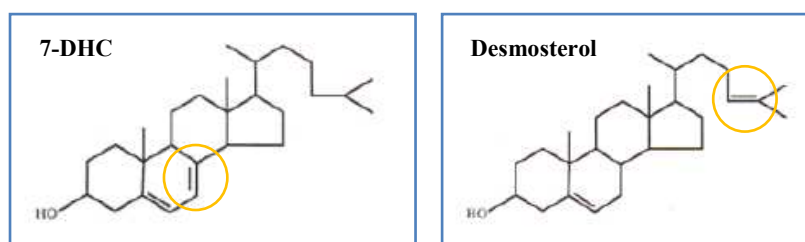


Figura 4.14. Estrutura química do 7-DHC e desmosterol. O círculo em laranja assinala a diferença entre os dois compostos, que corresponde ao local de uma dupla ligação, que em 7-DHC encontra-se em Δ^7 e no desmosterol está situada em Δ^{24} (adaptado de Herman, 2003).

Face a este problema e tendo em conta a definição de espectrometria de massa (a contribuição e intensidade de um ião no espectro de massa global de um composto é sempre constante, independentemente da quantidade do composto analisado) e, a alternativa utilizada

para este problema posposta por Kelley (1995), a quantidade absoluta do esterol 7-DHC foi determinada algebricamente tendo em conta a contribuição e o factor de resposta do desmosterol para os iões 325 e 351.

Uma vez que o ião 343 do desmosterol não afecta a quantificação do 7-DHC (podendo o desmosterol ser quantificado isoladamente pelo ião 343) e apenas os iões 325 e 351, como também aparecem no espectro de massa do desmosterol, afectam a quantificação do 7-DHC, foi assim, determinado o factor de resposta do desmosterol para estes iões. A partir deste factor de resposta é descontado o valor de interferência do composto desmosterol no cálculo da concentração de 7-DHC.

Para a determinação do factor de resposta do desmosterol para os iões 325 e 351, fizeram-se vários ensaios utilizando padrões isolados de desmosterol com concentrações de 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 e 10 μ M (utilizaram-se concentrações baixas de desmosterol, uma vez que nas amostras de LA a quantidade de desmosterol presente também é baixa). A partir destes ensaios, e para todos os padrões isolados de desmosterol, determinou-se a contribuição do ião 325, através da razão área desmosterol para m/z 325/área desmosterol para m/z 343, e para o ião 351, através da razão área desmosterol para m/z 351/área desmosterol para m/z 343. Os resultados estão apresentados na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Tabela com os valores de factor de resposta do desmosterol para os iões 325 e 351.

Concentração de desmosterol μ M	Área de desmosterol para m/z 343	Área de desmosterol para m/z 325	Área de desmosterol para m/z 351	Razão 325:343 (%)	Razão 351:343 (%)
0.1	367	35	190	9.54	51.77
0.2	548	52	278	9.49	50.73
0.5	1193	114	601	9.56	50.38
1	2977	279	1502	9.37	50.45
2	5236	499	2637	9.53	50.36
5	10520	1008	5258	9.58	49.98
10	23096	2165	11560	9.37	50.05
Média das razões	-	-	-	9.49	50.53
Desvio Padrão	-	-	-	0.09	0.60
Coef. Variacção (%)	-	-	-	0.90	1.19

Legenda: razão 325:343 – (razão área desmosterol para m/z 325/área desmosterol para m/z 343) x 100; razão 351:343 – (razão área desmosterol para m/z 351/área desmosterol para m/z 343) x 100.

Como se verifica pela tabela 4.1., o desmosterol apresenta um factor de resposta para o ião 351 de 50.53% e para o ião 325 de 9.49%, o que indica que o ião 351 têm uma maior contribuição para o desmosterol do que o ião 325, logo, o ião 351 afecta com maior intensidade a quantificação isolada do 7-DHC. Desta forma, seleccionou-se para a quantificação do 7-DHC, o ião 325, uma vez que este interfere menos com o desmosterol, logo o erro de determinar algebricamente a quantidade de 7-DHC presente nas amostras, é menor do que seria se fosse utilizado o ião 351. Esta constatação pode também ser visualizada pelo espectro de massa global do desmosterol e pelo seguinte cromatograma:

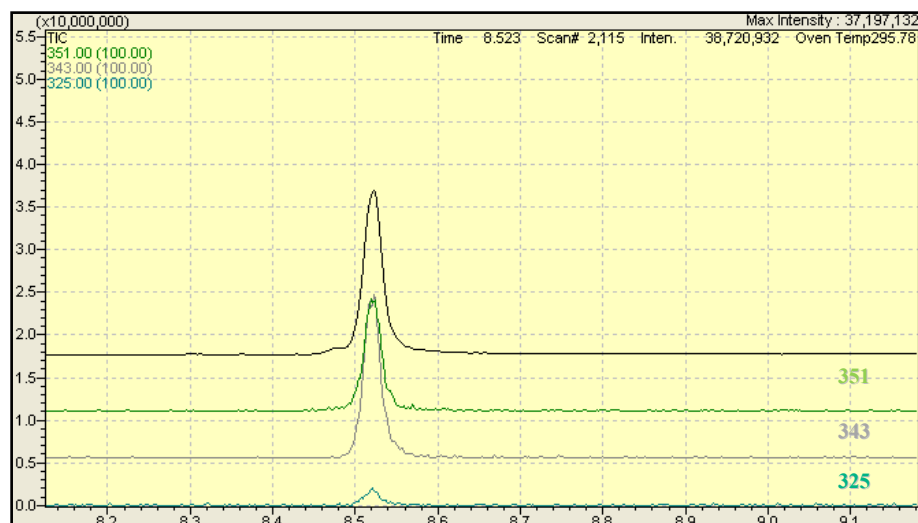


Figura 4.15. Cromatograma de um padrão de desmosterol com concentração 10 μ M. A linha em cinza corresponde ao comportamento do ião 343 (3 $^{\circ}$ linha do cromatograma), a linha verde claro ao ião 351 (2 $^{\circ}$ linha do cromatograma), e a linha verde escuro ao ião 325 (4 $^{\circ}$ linha do cromatograma).

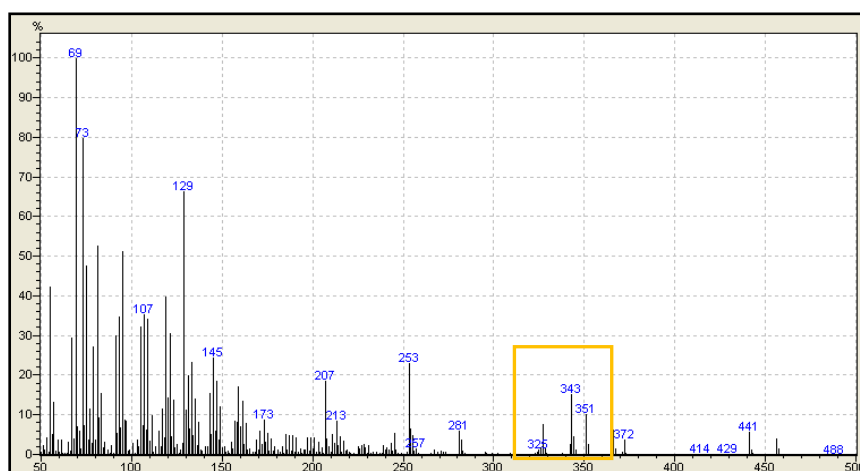


Figura 4.16. Espectro de massa global de um padrão de desmosterol com concentração 10µM. Como se verifica pelo espectro, o ião 343 é mais intenso que o ião 351 e ião 325, e por sua vez, o ião 351 é mais intenso que o ião 325.

Assim, **para a quantificação do esterol 7-DHC:**

1. Determina-se o factor de resposta do desmosterol para o ião 325;
2. Retira-se à área do desmosterol (A_{DT}) a % de contribuição deste ião, ficando-se no final com a área de desmosterol para este ião (A_{D325});
3. Subtrai-se a área do desmosterol, para o ião 325 (A_{D325}), pela área total do 7-DHC ($A_{D+7-DHC}$, que corresponde à área 7-DHC + desmosterol), ficando-se no final com a área correspondente apenas ao 7-DHC (A_{7-DHC});
4. Interpolação da área correspondente ao 7-DHC (A_{7-DHC}) na equação da recta do 7-DHC, ficando-se no final com a concentração absoluta do 7-DHC.

Para a validação desta forma de quantificar o 7-DHC, fizeram-se ensaios, onde foram adicionados à amostra LA controlo (CQI), várias concentrações de desmosterol e 7-DHC. Nos primeiros 3 ensaios, adicionaram-se ao CQI concentrações de desmosterol de 1µM e concentrações de 7-DHC de 1, 5 e 10µM, alternadamente. Nos restantes ensaios, adicionaram-se ao CQI concentrações de 1µM de 7-DHC e 1, 5 e 10µM de desmosterol, alternadamente. Para cada ensaio, quantificou-se a concentração de desmosterol pelo ião 343, através do método do padrão interno e por interpolação da razão área de desmosterol/área Pi na equação da recta de calibração do desmosterol. A quantificação do 7-DHC foi feita pelo ião 325, como descrito anteriormente. Após os cálculos, verificou-se que o cálculo algébrico, em função da contribuição e do factor de resposta do desmosterol para o ião 325, permite

quantificar correctamente o 7-DHC, uma vez que as concentrações calculadas por este método correspondiam às quantidades adicionadas inicialmente nos ensaios.

4.2.3. Valores de referência e tratamento estatístico

Utilizando o programa SPSS[®], inicialmente começou-se por caracterizar estatisticamente as amostras, determinando os vários parâmetros estatísticos. De entre as várias formas de caracterizar a amostra, tomam particular importância as medidas de tendência central – a média e mediana (que caracterizam o valor da variável sob estudo que ocorre com mais frequência), as medidas de dispersão – o desvio padrão, a variância, o coeficiente de variação e o intervalo inter-quartil (que correspondem à dispersão das observações em torno das estatísticas de tendência central ou da amostra) e as medidas de assimetria e achatamento – o coeficiente de assimetria e curtose (medidas que correspondem à forma de distribuição dos elementos da amostras).

Os vários parâmetros estatísticos determinados para cada esterol em função das semanas de gestação, para um intervalo de confiança de 95%, estão apresentados nas tabelas:

Tabela 4.2. Estatística descritiva da concentração de colesterol (μM) em função das semanas de gestação.

Estatística da concentração de colesterol (μM)														
Semanas de gestação	N	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Variância	Coeficiente de variação (%)	Intervalo Inter-quartil	Percentis (mediana)			Curtose	Assimetria
										25%	50%	75%		
13	30	22.1758	21.3661	4.2716	15.0114	32.5165	18.2468	19.2626	4.9251	19.6127	21.3661	24.3370	0.5230	0.7420
14	30	29.1728	29.7185	5.6353	17.3159	40.0004	31.7562	19.3169	8.0102	25.0952	29.7185	32.8592	-0.4541	-0.0571
15	30	33.8983	33.4030	5.3652	23.3218	41.8940	28.7855	15.8274	9.0247	30.4563	33.4030	39.2530	-0.7472	-0.2362
16	30	35.4871	35.8923	5.0159	25.6411	48.5712	25.1596	14.1345	6.4398	32.0721	35.8923	38.4476	0.4820	0.4801
17	30	42.2910	42.7270	6.0937	32.5360	57.8970	37.1335	14.4090	10.4305	36.4420	42.7270	46.4040	0.0963	0.1423
18	30	51.5383	50.4693	7.2699	39.2590	69.0651	52.8508	14.1057	12.0140	46.0785	50.4693	57.8666	-0.4622	0.3890
19	30	56.9507	56.7330	6.2065	45.0000	70.0000	38.5200	10.9805	6.3872	53.0000	56.7330	59.1350	0.1131	0.1924
20	30	64.2287	63.2753	8.4369	45.4775	81.9948	71.1821	13.1358	11.8723	58.0836	63.2753	69.8386	-0.1480	0.2281
21	30	70.3197	68.3132	12.2709	47.9138	92.5233	150.5744	17.4501	21.0109	60.5174	68.3132	81.3403	-0.7420	0.3495
22	30	78.5082	76.8004	12.9041	53.0730	104.885	166.5145	16.1603	19.7230	69.9960	76.8004	88.8164	-0.6031	0.1832
> 22	30	94.3786	91.7205	21.4154	57.0581	144.787	458.6193	22.6910	29.2408	81.6084	91.7205	108.5103	0.1042	0.4571

Tabela 4.3. Estatística descritiva da concentração de desmosterol (μM) em função das semanas de gestação.

Estatística da concentração de desmosterol (μM)														
Semanas de gestação	N	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Variância	Coeficiente de variação (%)	Intervalo Interquartil	Percentis (mediana)			Curtose	Assimetria
										25%	50%	75%		
13	30	0.1562	0.1526	0.0406	0.0824	0.2202	0.0016	26.0544	0.0707	0.1250	0.1526	0.1955	-0.9629	-0.2969
14	30	0.2275	0.2222	0.0441	0.1618	0.3125	0.0019	19.3796	0.0614	0.1977	0.2222	0.2551	-0.7941	0.3947
15	30	0.2742	0.2806	0.0505	0.1911	0.3947	0.0026	18.4190	0.0635	0.2356	0.2806	0.2985	0.5693	0.5612
16	30	0.2829	0.2832	0.0538	0.1923	0.3852	0.0029	19.0304	0.0892	0.2369	0.2832	0.3256	0.4272	0.1513
17	30	0.3348	0.3508	0.0787	0.1655	0.4470	0.0062	23.5014	0.1060	0.3018	0.3508	0.4046	-0.2340	-0.6240
18	30	0.4209	0.4042	0.0578	0.3472	0.5433	0.0033	13.7231	0.0931	0.3801	0.4042	0.4659	-0.8694	0.5548
19	30	0.5333	0.5423	0.0852	0.3539	0.6849	0.0073	15.9849	0.1480	0.4645	0.5423	0.6096	-0.9113	-0.2392
20	30	0.6232	0.6079	0.0915	0.4328	0.8160	0.0084	14.6770	0.1138	0.5819	0.6079	0.6903	-0.0567	0.1013
21	30	0.7061	0.7182	0.1010	0.4155	0.8684	0.0102	14.3036	0.1500	0.6379	0.7182	0.7812	0.8431	-0.6784
22	30	0.7691	0.7701	0.0821	0.5607	0.9788	0.0067	10.4967	0.1188	0.7140	0.7701	0.8311	1.0852	0.0051
> 22	30	0.9072	0.8729	0.1829	0.6944	1.6063	0.0334	20.1590	0.1546	0.7943	0.8729	0.9421	6.8270	2.2708

Tabela 4.4. Estatística descritiva da concentração de 7-dehidrocolesterol (μM) em função das semanas de gestação.

Estatística da concentração de 7-dehidrocolesterol (μM)														
Semanas de gestação	N	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Variância	Coeficiente de variação (%)	Intervalo Interquartil	Percentis (mediana)			Curtose	Assimetria
										25%	50%	75%		
13	30	0.0039	0.0036	0.0007	0.0027	0.0057	0.0000006	18.9632	0.0011	0.0034	0.0036	0.0044	0.0260	0.9324
14	30	0.0041	0.0040	0.0007	0.0027	0.0055	0.0000006	18.6285	0.0010	0.0037	0.0040	0.0047	-0.5072	-0.1235
15	30	0.0044	0.0045	0.0004	0.0033	0.0052	0.0000002	9.6414	0.0005	0.0043	0.0045	0.0047	0.8361	-0.8697
16	30	0.0047	0.0046	0.0006	0.0038	0.0057	0.0000004	13.058	0.0011	0.0043	0.0046	0.0054	-1.3502	0.2121
17	30	0.0059	0.0061	0.0005	0.0048	0.0068	0.0000003	8.8757	0.0009	0.0054	0.0061	0.0063	-0.6471	-0.4280
18	30	0.0086	0.0085	0.0008	0.0074	0.0108	0.0000006	8.7609	0.0010	0.0080	0.0085	0.0090	1.1404	0.8642
19	30	0.0144	0.0148	0.0031	0.0085	0.0192	0.00001	21.545	0.0056	0.0118	0.0148	0.0172	-1.0913	-0.2293
20	30	0.0295	0.0293	0.0060	0.0143	0.0409	0.00004	20.3289	0.0071	0.0270	0.0292	0.0334	0.6252	-0.5957
21	30	0.0919	0.0936	0.0240	0.0438	0.1568	0.0006	26.1034	0.0325	0.0759	0.0936	0.1080	0.8021	0.1410
22	30	0.1150	0.1181	0.0212	0.0706	0.1807	0.0004	18.0746	0.0207	0.1053	0.1181	0.1250	2.2505	0.6040
> 22	30	0.1759	0.1774	0.0329	0.1145	0.2558	0.0011	18.6748	0.0437	0.1520	0.1774	0.1944	0.2816	0.0213

Tabela 4.5. Estatística descritiva da concentração de latosterol (μM) em função das semanas de gestação.

Estatística da concentração de latosterol (μM)														
Semanas de gestação	N	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Variância	Coeficiente de variação (%)	Intervalo Interquartil	Percentis (mediana)			Curtose	Assimetria
										25%	50%	75%		
13	30	0.0272	0.0273	0.0035	0.0193	0.0355	0.00001	12.8027	0.0046	0.0248	0.0273	0.0292	0.4201	0.0152
14	30	0.0389	0.0373	0.0066	0.0286	0.0562	0.00004	17.0776	0.0062	0.0346	0.0373	0.0406	0.9984	1.1043
15	30	0.0472	0.0460	0.0093	0.0332	0.0697	0.00009	19.7030	0.0097	0.0418	0.0460	0.0508	0.1770	0.7161
16	30	0.0542	0.0506	0.0091	0.0422	0.0708	0.00008	16.8115	0.0147	0.0468	0.0506	0.0614	-0.9250	0.5841
17	30	0.0833	0.0830	0.0139	0.0625	0.1079	0.0002	16.6306	0.0259	0.0710	0.0830	0.0967	-10.2962	0.1634
18	30	0.1228	0.1234	0.0204	0.0866	0.1722	0.0004	16.6130	0.0207	0.1116	0.1234	0.1320	0.1680	0.2690
19	30	0.2433	0.2315	0.0705	0.1389	0.4774	0.0049	28.9703	0.1023	0.1864	0.2315	0.2868	2.7335	1.2801
20	30	0.5674	0.5846	0.1395	0.2133	0.9047	0.0195	24.5789	0.1854	0.4640	0.5846	0.6463	1.0133	-0.1881
21	30	0.6652	0.6660	0.1089	0.4036	0.8909	0.0119	16.3807	0.1287	0.6125	0.6660	0.7398	0.6231	-0.4702
22	30	0.8551	0.8428	0.1791	0.4374	1.0894	0.0321	20.5973	0.3212	0.7180	0.8428	1.0313	-0.4970	-0.4030
> 22	30	1.0514	1.0107	0.2660	0.6729	1.9090	0.0708	25.3017	0.2979	0.8882	1.0107	1.1830	3.6814	1.6140

Tabela 4.6. Estatística descritiva da concentração de β -Sitosterol (μM) em função das semanas de gestação.

Estatística da concentração de β -Sitosterol (μM)														
Semanas de gestação	N	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Variância	Coeficiente de variação (%)	Intervalo Interquartil	Percentis (mediana)			Curtose	Assimetria
										25%	50%	75%		
13	30	0.0404	0.0409	0.0039	0.0320	0.0506	0.00001	9.5645	0.0046	0.0381	0.0410	0.0425	0.9278	0.0239
14	30	0.0434	0.0441	0.0063	0.0311	0.0520	0.00004	14.5165	0.00934	0.0398	0.0441	0.0489	-0.7801	-0.4671
15	30	0.0499	0.0493	0.0057	0.03977	0.0677	0.00003	11.3205	0.0054	0.0471	0.0493	0.0524	2.3004	0.9261
16	30	0.0501	0.0493	0.0057	0.0390	0.0612	0.00003	11.3930	0.0076	0.0458	0.0493	0.0529	-0.4165	0.4474
17	30	0.0645	0.0650	0.0080	0.0505	0.0813	0.00006	12.4641	0.0133	0.0578	0.0650	0.0707	-0.7250	0.0202
18	30	0.1042	0.1036	0.0178	0.0789	0.1415	0.0003	17.0892	0.0332	0.0876	0.1036	0.1205	-0.9403	0.3907
19	30	0.2034	0.1959	0.0582	0.1046	0.3422	0.0034	28.6245	0.0726	0.1733	0.1959	0.2345	-0.0672	0.4613
20	30	0.2195	0.2152	0.0326	0.1667	0.3309	0.0011	14.8323	0.0334	0.2038	0.2152	0.2335	3.7858	1.3344
21	30	0.2306	0.2212	0.0394	0.1192	0.3263	0.0015	17.0667	0.0510	0.2098	0.2212	0.2573	1.6410	-0.1048
22	30	0.2326	0.2194	0.0386	0.1721	0.3693	0.0015	16.2988	0.0405	0.2147	0.2194	0.2538	4.3043	1.6661
> 22	30	0.2593	0.2378	0.0720	0.1285	0.4599	0.0052	27.7542	0.0844	0.2136	0.2378	0.2944	1.1191	0.9792

Significado dos parâmetros estatísticos (Maroco, 2007):

- ✓ **Média:** valor médio da população amostral e corresponde à soma de todos os valores dividida pelo n.º total de observações;
- ✓ **Mediana:** define-se como sendo o valor de X, tal que depois de ordenados por ordem crescente todas as observações da variável X, 50% das observações sejam superiores ou iguais à mediana e 50% sejam inferiores ou iguais à mediana.
- ✓ **Percentis:** os percentis dividem a amostra ordenada por ordem crescente em múltiplos de ordem 100% e correspondem ao valor da distribuição até ao qual se encontram v% dos seus valores (v = ordem v de percentagem). O percentil de ordem 25%, é conhecido como 1.º quartil (Q₁), o percentil de ordem 50%, é designado como 2.º quartil (Q₂) e o percentil de ordem 75%, corresponde ao 3.º quartil (Q₃).
- ✓ **Variância:** é uma medida relativa da dispersão de valores em torno da média.
- ✓ **Desvio Padrão:** corresponde à raiz quadrada da variância.
- ✓ **Coeficiente de variação:** é uma medida de dispersão relativa ao valor da média e obtém-se exprimindo o desvio padrão como quociente da média. Corresponde assim, a uma medida de variação relativa - valor do desvio padrão relativo ao valor da média.
- ✓ **Intervalo inter-quartil:** é definido como sendo a diferença entre o 3.º quartil (valor de X superior ou igual a 75% das observações da amostra depois destas terem sido ordenadas por ordem crescente) e o 1.º quartil (valor de X superior ou igual a 25% das observações da amostra depois destas terem sido ordenadas por ordem crescente). Assim o Intervalo inter-quartil engloba 50% das observações da amostra.
- ✓ **Curtose:** caracteriza o achatamento que a distribuição apresenta relativamente à média. Se o valor da curtose for zero a distribuição diz-se mesocúrtica; se o valor da curtose for menor que zero, a distribuição é achatada e diz-se platocúrtica; se a distribuição for pontiaguda, o valor da curtose é maior que zero e a distribuição diz-se leptocúrtica.
- ✓ **Assimetria:** caracteriza o enviesamento que a distribuição apresenta relativamente à média. Se a distribuição for simétrica (em torno da média) o valor da assimetria é nulo; se a distribuição se concentrar no lado direito com uma longa cauda para o lado esquerdo o valor da assimetria é menor que zero e a distribuição diz-se com enviesamento negativo ou assimétrica à esquerda; se a distribuição se concentrar no lado esquerdo com uma longa cauda para a direita, os valores da assimetria são maiores que zero e a distribuição diz-se com enviesamento positivo ou assimétrica à direita.

Quadro 1. Quadro resumo com os valores de referência de cada esterol para cada semana de gestação.

Semanas de gestação	Concentração em μM				
	Colesterol	Desmosterol	7-DHC	Latosterol	β -Sitosterol
13	22.1758 \pm 4.2716	0.1562 \pm 0.0406	0.0039 \pm 0.0007	0.0272 \pm 0.0035	0.0404 \pm 0.0039
14	29.1728 \pm 5.6353	0.2275 \pm 0.0441	0.0041 \pm 0.0007	0.0389 \pm 0.0066	0.0434 \pm 0.0063
15	33.8983 \pm 5.3652	0.2742 \pm 0.0505	0.0044 \pm 0.0004	0.0472 \pm 0.0093	0.0499 \pm 0.0057
16	35.4871 \pm 5.0159	0.2829 \pm 0.0538	0.0047 \pm 0.0006	0.0542 \pm 0.0091	0.0501 \pm 0.0057
17	42.2910 \pm 6.0937	0.3348 \pm 0.0787	0.0059 \pm 0.0005	0.0833 \pm 0.0139	0.0645 \pm 0.0080
18	51.5383 \pm 7.2699	0.4209 \pm 0.0578	0.0086 \pm 0.0008	0.1228 \pm 0.0204	0.1042 \pm 0.0178
19	56.9507 \pm 6.2065	0.5333 \pm 0.0852	0.0144 \pm 0.0031	0.2433 \pm 0.0705	0.2034 \pm 0.0582
20	64.2287 \pm 8.4369	0.6232 \pm 0.0915	0.0295 \pm 0.0060	0.5674 \pm 0.1395	0.2195 \pm 0.0326
21	70.3197 \pm 12.2709	0.7061 \pm 0.1010	0.0919 \pm 0.0240	0.6652 \pm 0.1089	0.2306 \pm 0.0394
22	78.5082 \pm 12.9041	0.7691 \pm 0.0821	0.1150 \pm 0.0212	0.8551 \pm 0.1791	0.2326 \pm 0.0386
> 22	94.3786 \pm 21.4154	0.9072 \pm 0.1829	0.1759 \pm 0.0329	1.0514 \pm 0.2660	0.2593 \pm 0.0720

A representação gráfica dos resultados, permite visualizar as características da variável em estudo na amostra, ou seja, permite visualizar a tendência da concentração de cada esterol em função do aumento da semana de gestação. Para descrever graficamente as variáveis em estudo, utilizou-se o diagrama de extremos e quartis (caixa de bigodes), que inclui a mediana (ou 2.º quartil), o 1.º e o 3.º quartil, os valores mínimos e máximos e eventuais *outliers* e extremos.

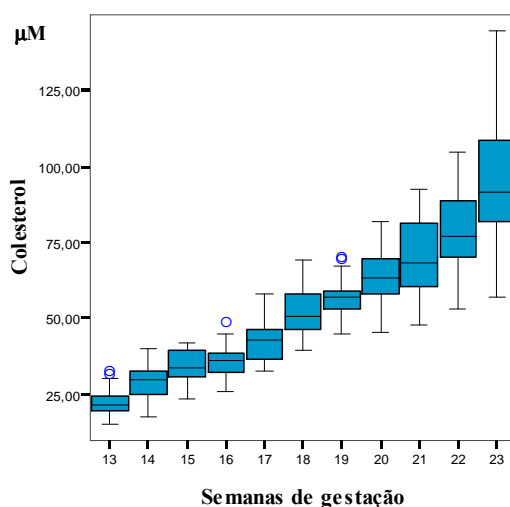


Figura 4.17. Diagrama de extremos e quartis da concentração de colesterol (μM) em função das semanas de gestação. Há presença de maiores valores que não são considerados *outliers* na 13.ª semana de gestação e há 2 *outliers* superiores nas 16.ª e 19.ª semanas de gestação.

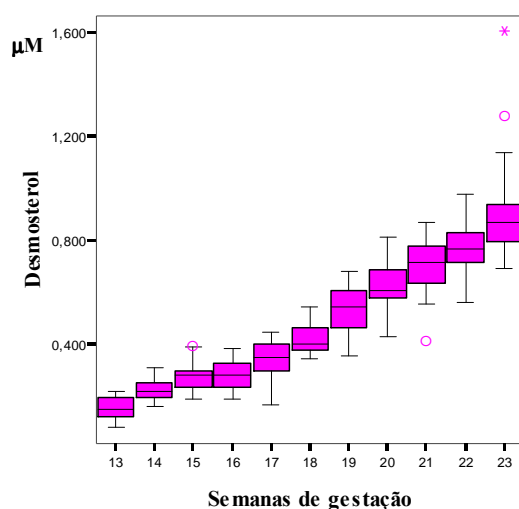


Figura 4.18. Diagrama de extremos e quartis da concentração de desmosterol (μM) em função das semanas de gestação. Há presença de um maior valor que não é um *outlier* na 15.ª gestação, há 2 *outliers* na 21.ª gestação (inferior) e no grupo das mais de 22 semanas de gestação (superior) e, há presença de um extremo superior no grupo das mais de 22 semanas de gestação.

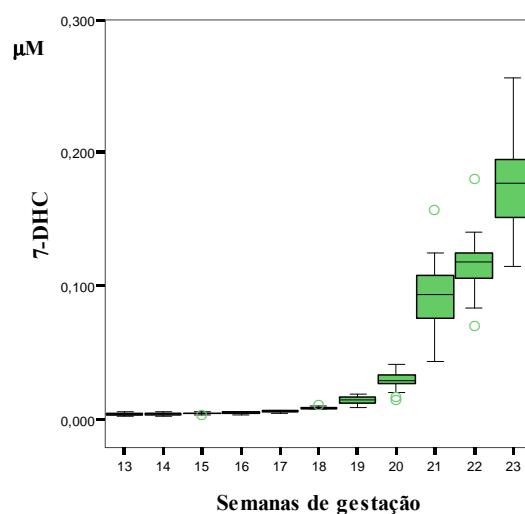


Figura 4.19. Diagrama de extremos e quartis da concentração de 7-dehidrocolesterol (μM) em função das semanas de gestação. Há presença de maiores valores que não são *outliers* nas 15.º e 18.º semanas de gestação e de menores valores que não são outliers na 20.º semana de gestação, há 2 *outliers* superiores nas 21.º e 22.º semanas de gestação e um *outlier* inferior na 22.º gestação.

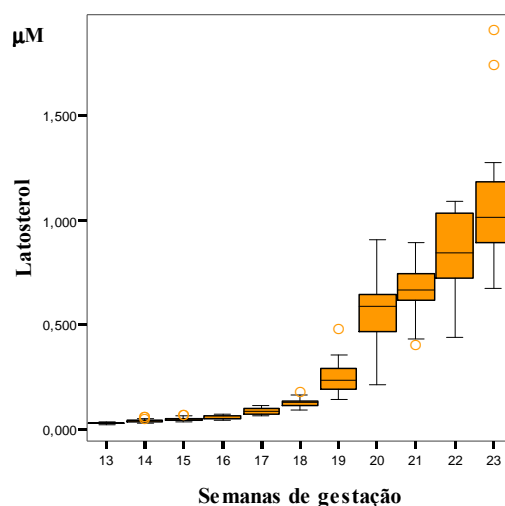


Figura 4.20. Diagrama de extremos e quartis da concentração de latosterol (μM) em função das semanas de gestação. Há presença de maiores valores que não são *outliers* nas 14.º, 15.º e 18.º semanas de gestação e de um menor valor que não é *outlier* na 21.º semana de gestação, há um *outlier* superior na 19.º gestação e 2 *outliers* superiores no grupo das mais de 22 semanas de gestação.

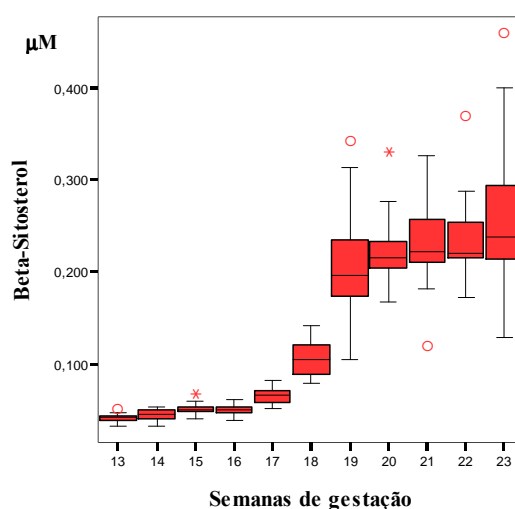


Figura 4.21. Diagrama de extremos e quartis da concentração de β -sitosterol (μM) em função das semanas de gestação. Há um maior valor que não é *outlier* na 13.ª gestação, há 3 *outliers* superiores nas 19.ª, 22.ª e no grupo das mais de 22 semanas de gestação, há um *outlier* inferior na 21.ª gestação e 2 extremos superiores nas 15.ª e 20.ª semanas de gestação.

Nota: O grupo representado nos diagramas como 23 semanas de gestação corresponde na realidade, ao grupo heterogéneo de LA com mais de 22 semanas de gestação. Amostras de LA com idade gestacional avançada são raras e correspondem na sua maioria a gestações com problemas.

Os diagramas de extremos e quartis para além de permitirem visualizar o comportamento de cada esterol com a progressão da gestação, indicam a presença de *outliers* (o “bolas” nos gráficos) e extremos (* nos gráficos). Os *outliers*, correspondem a valores 1.5 vezes superiores ao (3.º quartil + intervalo inter-quartil) ou 1.5 vezes inferiores ao (1.º quartil - intervalo inter-quartil) e os extremos correspondem a valores 3 vezes superiores ao (3.º quartil + intervalo inter-quartil) ou 3 vezes inferiores ao (1.º quartil - intervalo inter-quartil).

Os *outliers* e extremos encontrados no grupo das mais de 22 semanas de gestação, devem-se à heterogeneidade do grupo, uma vez que, abrange LA de fetos entre as 23 e 30 semanas de gestação e desta forma, os valores encontrados fora da range normal podem corresponder a LA de fetos com maiores gestações. Para as outras gestações, os *outliers* e extremos encontrados para cada esterol, podem corresponder a amostras de LA pertencentes àquele grupo de gestação mas, provavelmente com mais ou menos dias que os outros LA, ou pode ser explicado por erros na quantificação, pelas condições da amostra (amostra estar

contaminada), ou pelo metabolismo intrínseco variar de feto para feto. No entanto, é de salientar que estes valores, comparados com a amostragem total não são muito significativos (pequena ordem de grandeza), e desta forma, não põem em causa os valores de referência estabelecidos para cada esterol em função da idade gestacional.

Através dos diagramas de extremos e quartis da concentração de cada esterol em função das semanas de gestação, pode observar-se que a quantidade de cada esterol presente nas amostras de LA aumenta com o aumento do número de semanas de gestação.

O aumento do colesterol com o aumento da idade gestacional é devido à contínua necessidade de colesterol para o desenvolvimento fetal, uma vez que este esterol é um importante componente das membranas plasmática e mitocondrial, é importante na formação das bainhas de mielina do SNC e periférico, é o principal modulador da fluidez membranar, desempenha papel importante nos mecanismos de transporte e transmissão de sinais, é precursor de uma vasta gama de moléculas esteróides (hormonas esteróides, sais biliares, oxisteróides e neurosteróides) e desempenha importantes funções na morfogénese e embriogénese por activação das moléculas Hedgehog.

O aumento dos precursores de colesterol, nomeadamente do desmosterol, 7-dehidrocolesterol e latosterol com o aumento da gestação é devido à crescente necessidade de colesterol para o desenvolvimento fetal, por aumento da via de biossíntese endógena de colesterol.

A presença de fitoesteróis, β -sitosterol, nas amostras de LA, é um indicador indirecto de que o colesterol é capaz de atravessar a barreira placentária nos humanos (Chevy *et al.*, 2005) e indicador da absorção e captação de colesterol pelas células (Nissien *et al.*, 2000; Ahmida *et al.*, 2006), o que explica o aumento da concentração deste esterol com o aumento da gestação.

Segundo Chevy e colaboradores (2005) o aumento de esteróis a partir das 18 semanas de gestação é explicado por haver um aumento de esteróis contidos nas membranas celulares, uma vez que, por volta das 20 semanas de gestação o número de amniócitos presentes numa amostra de LA aumenta abruptamente.

Assim, pode-se concluir que a quantidade de colesterol, 7-DHC, desmosterol, latosterol e β -sitosterol presente numa amostra de LA é dependente da idade gestacional, uma vez que, há uma relação directa de proporcionalidade com a concentração de esterol versus semanas de gestação.

Esta constatação, pode também ser observada pelos seguintes gráficos de dispersão, que ilustram a relação e associação entre duas variáveis - concentração de esterol versus semanas de gestação. Os gráficos de dispersão são úteis para verificar se a relação entre as duas variáveis é linear, condição que é necessária para calcular o coeficiente de Pearson.

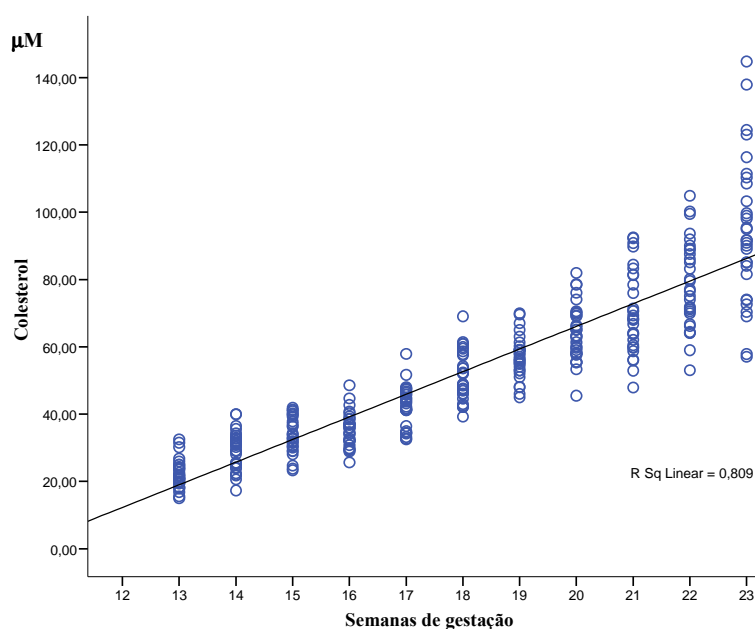


Figura 4.22. Gráfico de dispersão da concentração de colesterol (μM) em função das semanas de gestação.

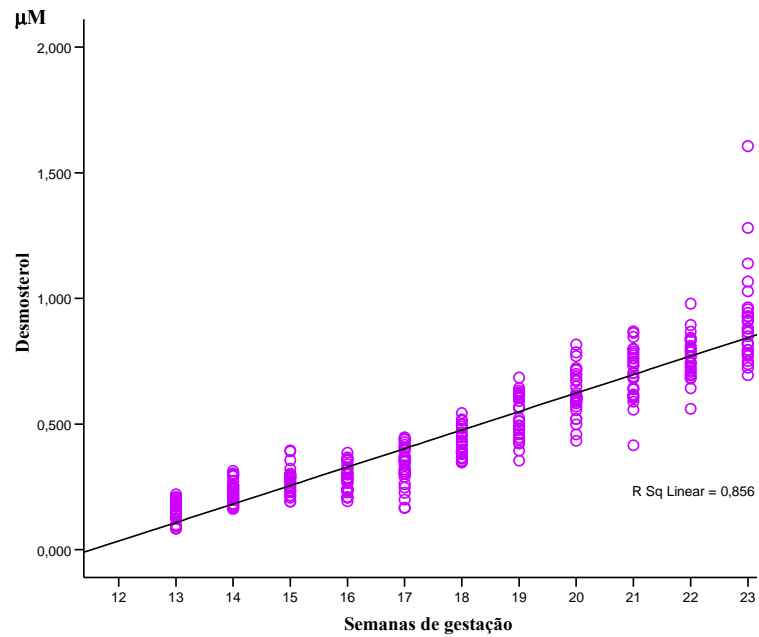


Figura 4.23. Gráfico de dispersão da concentração de desmosterol (μM) em função das semanas de gestação.

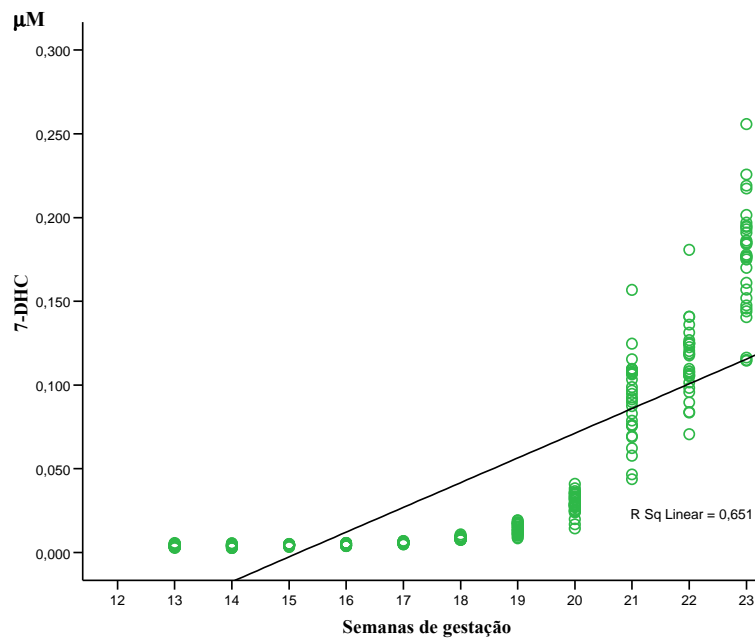


Figura 4.24. Gráfico de dispersão da concentração de 7-dehidrocolesterol (μM) em função das semanas de gestação.

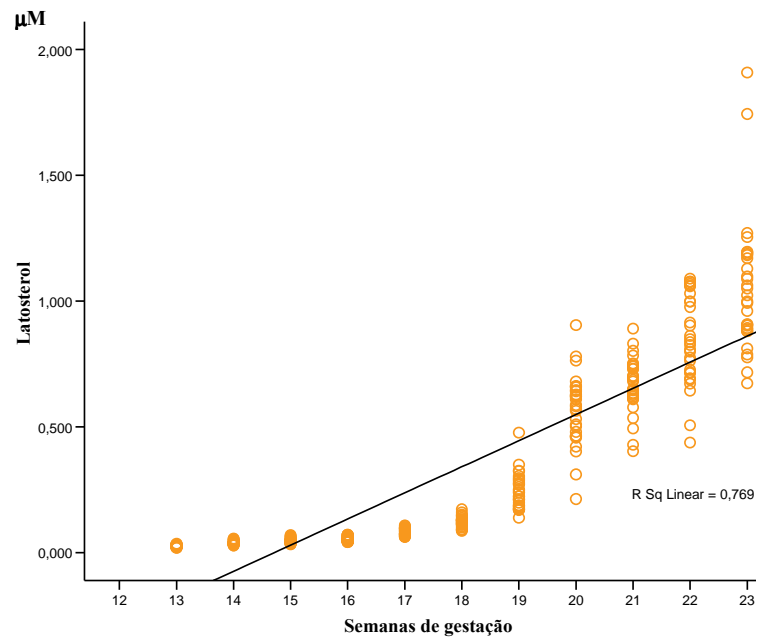


Figura 4.25. Gráfico de dispersão da concentração de latosterol (µM) em função das semanas de gestação.

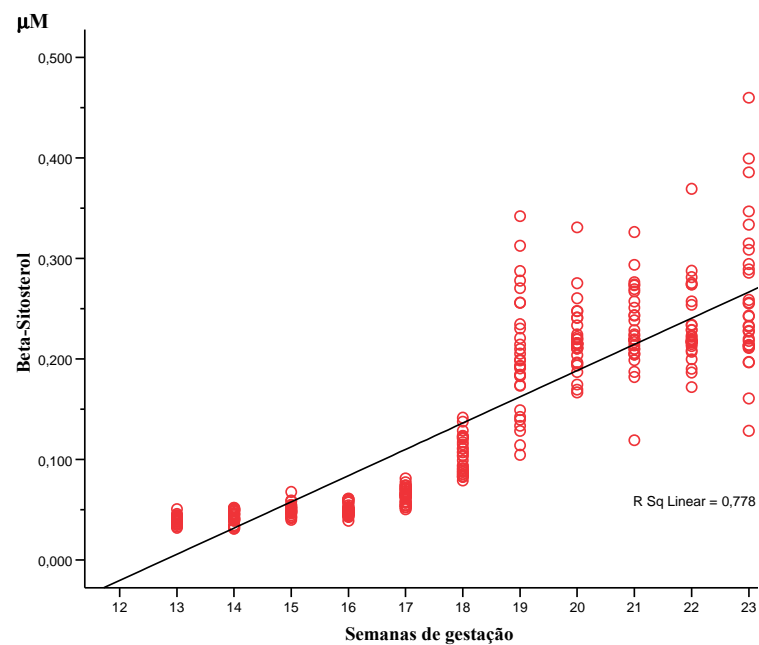


Figura 4.26. Gráfico de dispersão da concentração de β -sitosterol (µM) em função das semanas de gestação.

Nota: O grupo das 23 semanas de gestação representado nos gráficos corresponde ao grupo heterogéneo com mais de 22 semanas de gestação (como referido anteriormente).

Uma vez, que gráficos de dispersão são do tipo linear, verifica-se que há uma relação de proporcionalidade directa entre a quantidade de esteróis presentes numa amostra de LA e o número de semanas de gestação, logo, a quantidade de esteróis presentes numa amostra de LA é dependente da fase da gravidez em que a amostra é colhida.

Para inferir acerca dos valores dos parâmetros da população de onde foram obtidas as amostras e ou validar hipóteses acerca desses parâmetros, em análise estatística, usualmente, recorre-se a processos de inferência estatística, que subdivide-se em duas áreas: a teoria de estimação (estimar o valor dos parâmetros da população teórica a partir de estimativas amostrais) e a teoria da decisão (o objectivo é fundamentar decisões, por recurso a teste de hipóteses relativos ao parâmetros da população) (Maroco, 2007).

4.2.3.1. Intervalo de confiança para as médias da concentração de esterol em função das semanas de gestação

Para comparar e avaliar as significâncias e, a distribuição das variáveis semanas de gestação versus concentração de esterol, para cada composto, recorreu-se a gráficos “Error Bar”, que permitem visualizar a distribuição e dispersão, indicando a variabilidade entre variáveis.

Estes gráficos incluem a média e o intervalo de valores para ± 1 SD (desvio padrão) e ± 1 SE (erro padrão), para um determinado intervalo de confiança ($P = 95\%$) e nível de significância ($\alpha = 0.05\%$). Desta forma, é possível visualizar o intervalo onde com 95% de confiança a média da população se encontra e, avaliar as significâncias entre variáveis. A este intervalo dá-se o nome de intervalo de confiança a 95% para a média da concentração de esterol, em função das semanas de gestação.

A tabela 4.7. apresenta o intervalo de confiança a 95% para as médias de cada esterol e as figuras 4.27, 4.28., 4.29., 4.30., 4.31. apresentam graficamente estes intervalos de confiança.

Tabela 4.7. Tabela com as médias e intervalo de confiança a 95% para as médias de cada esterol, em função das semanas de gestação.

Semanas de gestação	Colesterol		Desmosterol		7-DHC		Latosterol		β-Sitosterol	
	Média	Intervalo de confiança a 95% para a média	Média	Intervalo de confiança a 95% para a média	Média	Intervalo de confiança a 95% para a média	Média	Intervalo de confiança a 95% para a média	Média	Intervalo de confiança a 95% para a média
13	22.1758	[20.5808 - 23.7709]	0.1562	[0.1410 - 0.1714]	0.0039	[0.0036 - 0.0042]	0.0272	[0.0259 - 0.0285]	0.0404	[0.0390 - 0.0418]
14	29.1728	[20.5808 - 23.7709]	0.2275	[0.2111 - 0.2440]	0.0041	[0.0038 - 0.0043]	0.0389	[0.0364 - 0.0414]	0.0434	[0.0410 - 0.0457]
15	33.8983	[31.8949 - 35.9017]	0.2742	[0.2553 - 0.2930]	0.0044	[0.0043 - 0.0046]	0.0472	[0.0437 - 0.0507]	0.0499	[0.0478 - 0.0521]
16	35.4871	[33.6142 - 37.3601]	0.2829	[0.2628 - 0.3030]	0.0047	[0.0045 - 0.0050]	0.0542	[0.0508 - 0.0576]	0.0501	[0.0479 - 0.0522]
17	42.2910	[40.0155 - 44.5664]	0.3348	[0.3054 - 0.3642]	0.0059	[0.0057 - 0.0061]	0.0833	[0.0781 - 0.0885]	0.0645	[0.0615 - 0.0675]
18	51.5383	[48.8237 - 54.2529]	0.4209	[0.3994 - 0.4425]	0.0086	[0.0083 - 0.0089]	0.1228	[0.1152 - 0.1304]	0.1042	[0.0975 - 0.1108]
19	56.9507	[54.6332 - 59.2682]	0.5333	[0.5015 - 0.5651]	0.0144	[0.0132 - 0.0156]	0.2433	[0.2170 - 0.2696]	0.2034	[0.1817 - 0.2252]
20	64.2287	[61.0783 - 67.3791]	0.6232	[0.5891 - 0.6574]	0.0295	[0.0273 - 0.0318]	0.5674	[0.5153 - 0.6195]	0.2195	[0.2073 - 0.2317]
21	70.3197	[65.7377 - 74.9017]	0.7061	[0.6684 - 0.7438]	0.0919	[0.0829 - 0.1008]	0.6652	[0.6245 - 0.7059]	0.2306	[0.2159 - 0.2453]
22	78.5082	[73.6897 - 83.3266]	0.7691	[0.7384 - 0.7997]	0.1150	[0.1071 - 0.1229]	0.8551	[0.7882 - 0.9220]	0.2326	[0.2182 - 0.2470]
> 22	94.3786	[86.3820 - 102.3753]	0.9072	[0.8389 - 0.9755]	0.1759	[0.1636 - 0.1881]	1.0514	[0.9520 - 1.1507]	0.2593	[0.2324 - 0.2862]

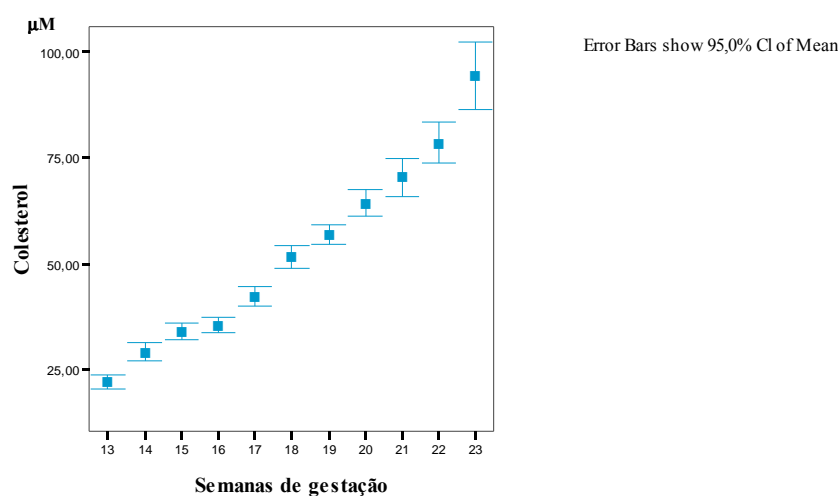


Figura 4.27. Representação gráfica (Error Bar) do intervalo de confiança a 95% para as médias da concentração de colesterol (μM) em função das semanas de gestação.

Nota: O grupo das 23 semanas de gestação representado no gráfico corresponde ao grupo heterogéneo com mais de 22 semanas de gestação (como referido anteriormente).

O gráfico Error Bar da concentração de colesterol em função das semanas de gestação, indica que, em média, os valores de colesterol obtidos para cada semana de gestação são estatisticamente diferentes entre si, excepto nas semanas 15 e 16 e nas semanas 20, 21 e 22.

Assim, para o colesterol, as semanas 15 e 16, tal como, as semanas 20, 21 e 22, poderiam ser agrupadas num mesmo grupo (grupo 15-16 semanas e grupo 20-22 semanas), uma vez que os seus valores de concentração não são significativamente e estatisticamente diferentes.

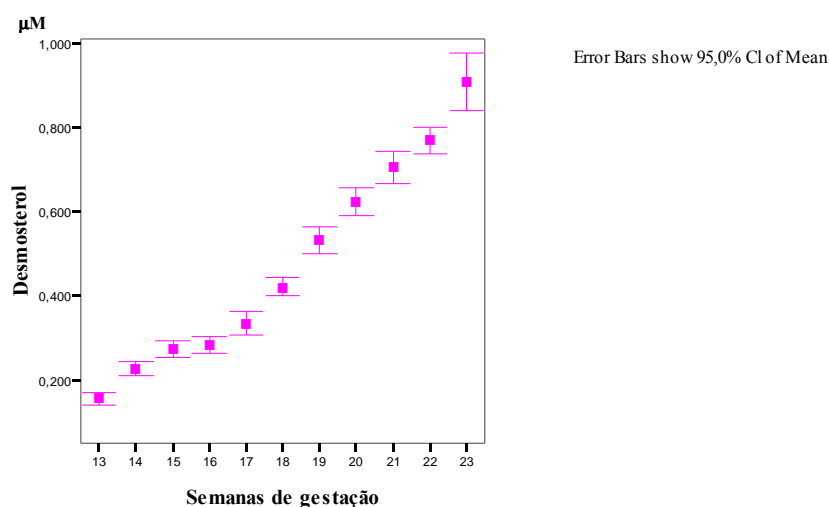


Figura 4.28. Representação gráfica (Error Bar) do intervalo de confiança a 95% para as médias da concentração de desmosterol (μM) em função das semanas de gestação.

Nota: O grupo das 23 semanas de gestação representado no gráfico corresponde ao grupo com mais de 22 semanas de gestação (como referido anteriormente).

Também no caso do desmosterol o gráfico Error Bar da concentração de desmosterol, em função do número de semanas de gestação, indica que, em média, as concentrações para as semanas 15 e 16 não são estatisticamente diferentes entre si e que a semana 21 não é estatisticamente diferente da semana 22. Por sua vez, as restantes semanas são estatisticamente e significativamente diferentes entre elas.

Assim, para o desmosterol, as semanas 15 e 16 assim como, as semanas 21 e 22, poderiam ser agrupadas num mesmo grupo (grupo 15-16 semanas e grupo 21-22 semanas), uma vez que os seus valores de concentração não são significativamente e estatisticamente diferentes.

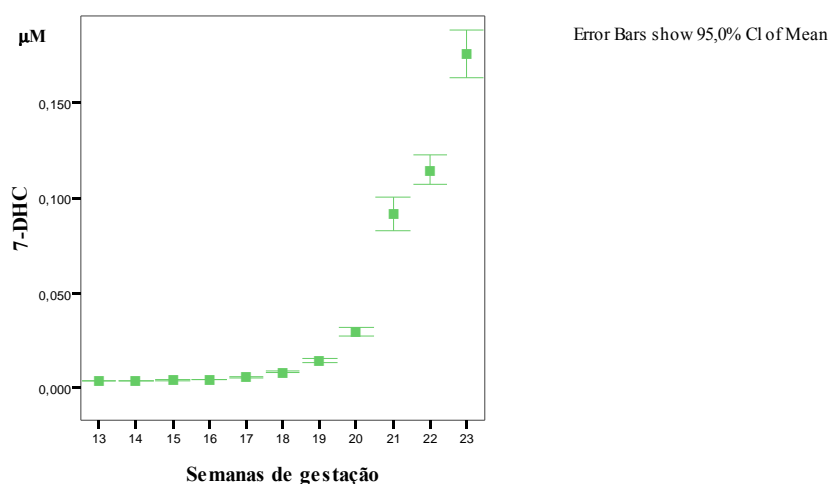


Figura 4.29. Representação gráfica (Error Bar) do intervalo de confiança a 95% para as médias da concentração de 7-deidrocolesterol (μM) em função das semanas de gestação.

Nota: O grupo das 23 semanas de gestação representado no gráfico corresponde ao grupo com mais de 22 semanas de gestação (como referido anteriormente).

No caso do 7-DHC o gráfico Error Bar da concentração de 7-DHC, em função das semanas de gestação, indica que as semanas 13, 14, 15, 16 e 17 não são estatisticamente diferentes entre si. No entanto, a semana 18 não é estatisticamente diferente das semanas 15, 16 e 17, mas é estatisticamente diferente das semanas 13 e 14. Assim, para o 7-DHC, as semanas 13, 14, 15, 16 e 17 poderiam ser agrupadas num mesmo grupo (grupo 13-17 semanas), uma vez que os seus valores de concentração de 7-DHC não são significativamente e estatisticamente diferentes, contudo, existem outras semanas que variam com este grupo geral, logo, este grupo teria que ser dividido em dois, o grupo das 13-14 semanas e o grupo das 15-17 semanas de gestação.

As semanas 19, 20, 21 e 22 são estatisticamente diferentes umas das outras, assim como, o grupo das mais de 22 semanas de gestação.

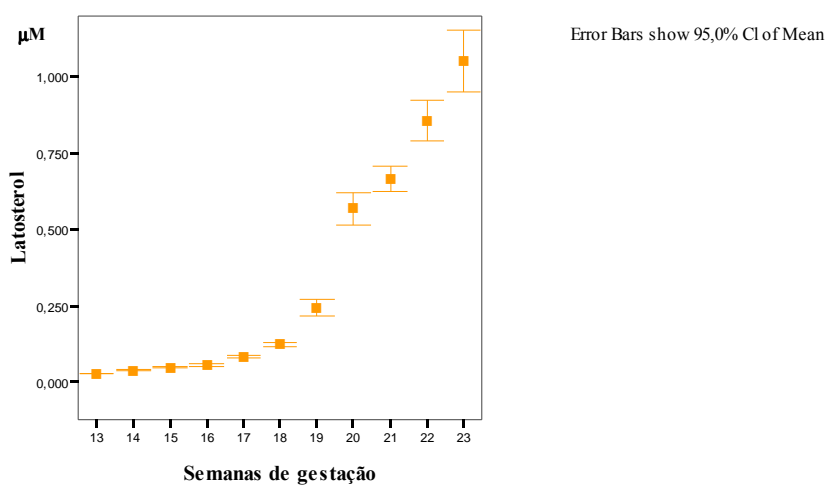


Figura 4.30. Representação gráfica (Error Bar) do intervalo de confiança a 95% para as médias da concentração de latosterol (μM) em função das semanas de gestação.

Nota: O grupo das 23 semanas de gestação representado no gráfico corresponde ao grupo com mais de 22 semanas de gestação (como referido anteriormente).

O gráfico Error Bar da concentração de latosterol, em função das semanas de gestação, indica que as semanas 13 e 14 não são estatisticamente diferentes entre si, assim como, as semanas 14, 15 e 16 não são estatisticamente diferentes entre si. Assim, para o latosterol, as semanas 13 e 14 assim como as semanas 14, 15 e 16 poderiam ser agrupadas num mesmo grupo (grupo 13-14 semanas e grupo 14-16 semanas).

Os valores de concentração de latosterol para as restantes semanas são estatisticamente e significativamente diferentes.

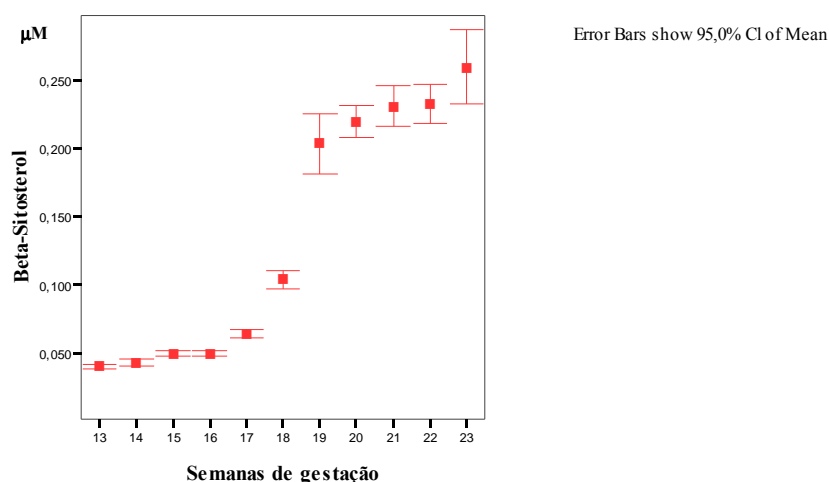


Figura 4.31. Representação gráfica (Error Bar) do intervalo de confiança a 95% para as médias da concentração de β -sitosterol (μM) em função das semanas de gestação.

Nota: O grupo das 23 semanas de gestação representado no gráfico corresponde ao grupo das mães de 22 semanas de gestação (como referido anteriormente).

O gráfico Error Bar da concentração de β -sitosterol, em função das semanas de gestação, indica que as semanas 13 e 14 não são estatisticamente diferentes entre si, assim como, as semanas 15 e 16 não são estatisticamente diferentes, no entanto, a semana 14 é estatisticamente diferente das semanas 15 e 16. A semana 17 é estatisticamente diferente da semana 16 e da semana 18, e esta última é diferente estatisticamente da semana 19. As semanas 19, 20, 21 e 22 não são estatisticamente diferentes entre si, assim como as semanas 21, 22 e 23 (grupo com mães de 22 semanas de gestação).

Assim, para o β -sitosterol, as semanas 13 e 14 assim como, as semanas 15 e 16, as semanas 19 e 20 e as semanas 21, 22 e 23, poderiam ser agrupadas num mesmo grupo (grupo 13-14 semanas, grupo 15-16 semanas, grupo das 19-20 e grupo das 21-23 semanas), uma vez que, os seus valores de concentração não são significativamente e estatisticamente diferentes entre si.

A representação gráfica (gráficos Error Bar) dos intervalos de confiança a 95% para as médias da concentração de esterol, em função das semanas de gestação, permitiu avaliar a

distribuição de concentração de esterol para as diferentes gestações, por análise dos intervalos de confiança entre as várias semanas, indicando se havia diferenças ou não estatisticamente significativas, para os valores de concentração de esterol nas várias semanas de gestação.

4.2.3.2. Correlações entre esteróis

Para avaliar correlações existentes entre os diversos esteróis, recorreu-se a medidas de associação, que quantificam a intensidade e a direcção de associação entre várias variáveis.

O coeficiente de correlação de Pearson mede a intensidade e a direcção da associação, tipo linear entre duas variáveis (daí a necessidade do gráfico de dispersão para cada esterol ser do tipo linear, como apresentado anteriormente). Esta associação é calculada a partir da covariância entre duas variáveis e, quanto mais próxima for de 1, mais forte é a correlação. Por sua vez, quanto mais próximo de zero for o coeficiente, indica que a correlação entre as duas variáveis é fraca, e se a correlação for nula indica que não existe nenhuma relação linear.

Inicialmente, começou-se por avaliar a correlação existente entre os vários esteróis, independentemente do número de semanas de gestação. Os coeficientes de correlação de Pearson determinados entre os vários esteróis são apresentados na seguinte tabela:

Tabela 4.8. Coeficiente de correlação de Pearson entre os vários esteróis, independentemente do número de semanas de gestação.

		Colesterol	Latosterol	7-DHC	Desmosterol	β-Sitosterol
Colesterol	Correlação Pearson	1	0.844 ^(**)	0.789 ^(**)	0.889 ^(**)	0.849 ^(**)
	N	330	330	330	330	330
Latosterol	Correlação Pearson	0.844 ^(**)	1	0.897 ^(**)	0.866 ^(**)	0.809 ^(**)
	N	330	330	330	330	330
7-DHC	Correlação Pearson	0.789 ^(**)	0.897 ^(**)	1	0.808 ^(**)	0.708 ^(**)
	N	330	330	330	330	330
Desmosterol	Correlação Pearson	0.889 ^(**)	0.866 ^(**)	0.808 ^(**)	1	0.860 ^(**)
	N	330	330	330	330	330
β-Sitosterol	Correlação Pearson	0.849 ^(**)	0.809 ^(**)	0.708 ^(**)	0.860 ^(**)	1
	N	330	330	330	330	330

Legenda: ** Correlação para um nível de significância de 0.01 ($\alpha = 0.01$) com probabilidade de significância nula ($P = 0.00$).

Por análise da tabela 4.8., verifica-se que: (1) existe uma correlação muito forte estatisticamente significativa ($\alpha = 0.01$) entre os vários esteróis, uma vez que, os coeficientes de correlação de Pearson são próximos de 1 e que, (2) os valores de concentração dos esteróis quando comparados entre si, são estatisticamente diferentes, uma vez que a probabilidade de significância (P) é menor que o nível de significância (α) ($P < \alpha$).

Uma correlação muito forte, estatisticamente significativa e, a existência de significativas diferenças estatísticas entre as concentrações dos vários esteróis, indica que, a variação de concentração entre os esteróis varia proporcionalmente. Ou seja, à medida que a concentração de colesterol aumenta com a idade gestacional, também aumenta a concentração de desmosterol, 7-DHC, latosterol e β -sitosterol, presente na amostra. Este facto, está relacionado com a crescente necessidade de colesterol para o desenvolvimento fetal, com consequente aumento da síntese endógena de colesterol, como referido anteriormente.

No entanto, quando se avalia as correlações entre os vários esteróis tendo em conta, cada semana de gestação (coeficientes de correlação de Pearson apresentados nas seguintes tabelas) verifica-se que, em geral, as correlações são fracas, mas estatisticamente significativas.

Tabela 4.9. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para a 13^o. semana de gestação.

Semana			Colesterol	Latosterol	7-DHC	Desmosterol	β -Sitosterol
13	Colesterol	Correlação Pearson	1	0.091	-0.023	0.280	-0.149
		P		0.633	0.904	0.134	0.433
		N	30	30	30	30	30
	Latosterol	Correlação Pearson	0.091	1	-0.130	0.224	0.002
		P	0.633		0.493	0.235	0.993
		N	30	30	30	30	30
	7-DHC	Correlação Pearson	-0.023	-0.130	1	0.008	-0.472 ^(**)
		P	0.904	0.493		0.968	0.008
		N	30	30	30	30	30
	Desmosterol	Correlação Pearson	0.280	0.224	0.008	1	-0.106
		P	0.134	0.235	0.968		0.578
		N	30	30	30	30	30
	β -Sitosterol	Correlação Pearson	-0.149	0.002	-0.472 ^(**)	-0.106	1
		P	0.433	0.993	0.008	0.578	
		N	30	30	30	30	30

Legenda: P = probabilidade de significância. ****** Correlação para um nível de significância de 0.01 ($\alpha = 0.01$). **Nota:** Para a semana 13, os coeficientes de correlação de Pearson são negativos para: o 7-DHC versus latosterol, colesterol, β -sitosterol; o β -sitosterol versus desmosterol, colesterol.

Tabela 4.10. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para a 14^o. semana de gestação.

Semana			Colesterol	Latosterol	7-DHC	Desmosterol	β -Sitosterol
14	Colesterol	Correlação Pearson	1	0.165	0.310	0.601 ^(**)	0.079
		P		0.382	0.095	0.000	0.679
		N	30	30	30	30	30
	Latosterol	Correlação Pearson	0.165	1	0.039	0.374 ^(*)	-0.092
		P	0.382		0.839	0.042	0.627
		N	30	30	30	30	30
	7-DHC	Correlação Pearson	0.310	0.039	1	0.174	-0.258
		P	0.095	0.839		0.359	0.169
		N	30	30	30	30	30
	Desmosterol	Correlação Pearson	0.601 ^(**)	0.374 ^(*)	0.174	1	-0.109
		P	0.000	0.042	0.359		0.568
		N	30	30	30	30	30
	β -Sitosterol	Correlação Pearson	0.079	-0.092	-0.258	-0.109	1
		P	0.679	0.627	0.169	0.568	
		N	30	30	30	30	30

Legenda: P = probabilidade de significância. ****** Correlação para um nível de significância de 0.01 ($\alpha = 0.01$). ***** Correlação para um nível de significância de 0.05 ($\alpha = 0.05$). **Nota:** Para a semana 14, os coeficientes de correlação de Pearson são: (1) negativos para o β -sitosterol versus latosterol, desmosterol e 7-DHC e, são (2) fortes para colesterol versus desmosterol ($\alpha = 0.01$) e para desmosterol versus latosterol ($\alpha = 0.05$).

Tabela 4.11. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para a 15. semana de gestação.

Semana			Colesterol	Latosterol	7-DHC	Desmosterol	β -Sitosterol
15	Colesterol	Correlação Pearson	1	0.057	0.262	0.254	0.459 ^(*)
		P		0.767	0.162	0.175	0.011
		N	30	30	30	30	30
	Latosterol	Correlação Pearson	0.057	1	0.306	-0.101	0.071
		P	0.767		0.100	0.595	0.710
		N	30	30	30	30	30
	7-DHC	Correlação Pearson	0.262	0.306	1	0.246	0.297
		P	0.162	0.100		0.189	0.111
		N	30	30	30	30	30
	Desmosterol	Correlação Pearson	0.254	-0.101	0.246	1	-0.152
		P	0.175	0.595	0.189		0.423
		N	30	30	30	30	30
	β -Sitosterol	Correlação Pearson	0.459 ^(*)	0.071	0.297	-0.152	1
		P	0.011	0.710	0.111	0.423	
		N	30	30	30	30	30

Legenda: P = probabilidade de significância. * Correlação para um nível de significância de 0.05 ($\alpha = 0.05$). **Nota:** Para a semana 15, os coeficientes de correlação de Pearson são: (1) negativos para o desmosterol versus β -sitosterol, latosterol e, são (2) fortes para β -sitosterol versus colesterol ($\alpha = 0.05$).

Tabela 4.12. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para a 16. semana de gestação.

Semana			Colesterol	Latosterol	7-DHC	Desmosterol	β -Sitosterol
16	Colesterol	Correlação Pearson	1	-0.133	-0.281	0.337	0.216
		P		0.484	0.133	0.069	0.253
		N	30	30	30	30	30
	Latosterol	Correlação Pearson	-0.133	1	0.000	0.144	0.215
		P	0.484		0.999	0.447	0.255
		N	30	30	30	30	30
	7-DHC	Correlação Pearson	-0.281	0.000	1	0.033	0.037
		P	0.133	0.999		0.863	0.845
		N	30	30	30	30	30
	Desmosterol	Correlação Pearson	0.337	0.144	0.033	1	0.141
		P	0.069	0.447	0.863		0.456
		N	30	30	30	30	30
	β -Sitosterol	Correlação Pearson	0.216	0.215	0.037	0.141	1
		P	0.253	0.255	0.845	0.456	
		N	30	30	30	30	30

Legenda: P = probabilidade de significância. **Nota:** Para a semana 16, os coeficientes de correlação de Pearson são: (1) negativos para o colesterol versus latosterol, 7-DHC e, (2) é igual a zero para latosterol versus 7-DHC.

Tabela 4.13. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para a 17. semana de gestação.

Semana			Colesterol	Latosterol	7-DHC	Desmosterol	β -Sitosterol
17	Colesterol	Correlação Pearson	1	-0.065	0.280	0.743 ^(**)	0.184
		P		0.734	0.133	0.000	0.331
		N	30	30	30	30	30
	Latosterol	Correlação Pearson	-0.065	1	0.138	-0.015	-0.117
		P	0.734		0.468	0.939	0.538
		N	30	30	30	30	30
	7-DHC	Correlação Pearson	0.280	0.138	1	0.239	-0.041
		P	0.133	0.468		0.204	0.829
		N	30	30	30	30	30
	Desmosterol	Correlação Pearson	0.743 ^(**)	-0.015	0.239	1	0.258
		P	0.000	0.939	0.204		0.169
		N	30	30	30	30	30
	β -Sitosterol	Correlação Pearson	0.184	-0.117	-0.041	0.258	1
		P	0.331	0.538	0.829	0.169	
		N	30	30	30	30	30

Legenda: P = probabilidade de significância. ****** Correlação para um nível de significância de 0.01 ($\alpha = 0.01$). **Nota:** Para a semana 17, os coeficientes de correlação de Pearson são: (1) negativos para o latosterol versus β -sitosterol, desmosterol, colesterol; o β -sitosterol versus 7-DHC e, são (2) fortes para desmosterol versus colesterol ($\alpha = 0.01$).

Tabela 4.14. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para a 18. semana de gestação.

Semana			Colesterol	Latosterol	7-DHC	Desmosterol	β -Sitosterol
18	Colesterol	Correlação Pearson	1	0.231	0.098	0.122	0.058
		P		0.218	0.607	0.519	0.759
		N	30	30	30	30	30
	Latosterol	Correlação Pearson	0.231	1	-0.211	-0.141	-0.247
		P	0.218		0.263	0.456	0.188
		N	30	30	30	30	30
	7-DHC	Correlação Pearson	0.098	-0.211	1	-0.104	0.128
		P	0.607	0.263		0.583	0.499
		N	30	30	30	30	30
	Desmosterol	Correlação Pearson	0.122	-0.141	-0.104	1	-0.056
		P	0.519	0.456	0.583		0.771
		N	30	30	30	30	30
	β -Sitosterol	Correlação Pearson	0.058	-0.247	0.128	-0.056	1
		P	0.759	0.188	0.499	0.771	
		N	30	30	30	30	30

Legenda: P = probabilidade de significância. **Nota:** Para a semana 18, os coeficientes de correlação de Pearson são negativos para: o latosterol versus β -sitosterol, desmosterol, 7-DHC; o 7-DHC versus desmosterol; o β -sitosterol versus desmosterol.

Tabela 4.15. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para a 19^o. semana de gestação.

Semana			Colesterol	Latosterol	7-DHC	Desmosterol	β -Sitosterol
19	Colesterol	Correlação Pearson	1	-0.066	0.049	-0.135	0.336
		P		0.727	0.799	0.477	0.069
		N	30	30	30	30	30
	Latosterol	Correlação Pearson	-0.066	1	0.138	-0.079	-0.164
		P	0.727		0.467	0.677	0.387
		N	30	30	30	30	30
	7-DHC	Correlação Pearson	0.049	0.138	1	-0.012	0.301
		P	0.799	0.467		0.951	0.106
		N	30	30	30	30	30
	Desmosterol	Correlação Pearson	-0.135	-0.079	-0.012	1	-0.033
		P	0.477	0.677	0.951		0.862
		N	30	30	30	30	30
β -Sitosterol	Correlação Pearson	0.336	-0.164	0.301	-0.033	1	
	P	0.069	0.387	0.106	0.862		
	N	30	30	30	30	30	

Legenda: P = probabilidade de significância. **Nota:** Para a semana 19, os coeficientes de correlação de Pearson são negativos para: o colesterol versus latosterol; o desmosterol versus colesterol, 7-DHC, latosterol, β -sitosterol; o β -sitosterol versus latosterol.

Tabela 4.16. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para a 20^o. semana de gestação.

Semana			Colesterol	Latosterol	7-DHC	Desmosterol	β -Sitosterol
20	Colesterol	Correlação Pearson	1	-0.267	-0.287	0.112	0.243
		P		0.154	0.124	0.556	0.196
		N	30	30	30	30	30
	Latosterol	Correlação Pearson	-0.267	1	-0.011	0.085	0.130
		P	0.154		0.954	0.655	0.494
		N	30	30	30	30	30
	7-DHC	Correlação Pearson	-0.287	-0.011	1	0.107	-0.497(**)
		P	0.124	0.954		0.575	0.005
		N	30	30	30	30	30
	Desmosterol	Correlação Pearson	0.112	0.085	0.107	1	-0.008
		P	0.556	0.655	0.575		0.967
		N	30	30	30	30	30
β -Sitosterol	Correlação Pearson	0.243	0.130	-0.497(**)	-0.008	1	
	P	0.196	0.494	0.005	0.967		
	N	30	30	30	30	30	

Legenda: P = probabilidade de significância. ** Correlação para um nível de significância de 0.01 ($\alpha = 0.01$). **Nota:** Para a semana 20, os coeficientes de correlação de Pearson são: (1) negativos para o colesterol versus latosterol, 7-DHC; o latosterol versus 7-DHC; o desmosterol versus β -sitosterol e, são (2) fortes para β -sitosterol versus 7-DHC ($\alpha = 0.01$).

Tabela 4.17. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para a 21.ª semana de gestação.

Semana			Colesterol	Latosterol	7-DHC	Desmosterol	β -Sitosterol
21	Colesterol	Correlação Pearson	1	0.240	0.146	0.298	0.656(**)
		P		0.201	0.440	0.110	0.000
		N	30	30	30	30	30
	Latosterol	Correlação Pearson	0.240	1	0.265	0.045	0.199
		P	0.201		0.157	0.814	0.291
		N	30	30	30	30	30
	7-DHC	Correlação Pearson	0.146	0.265	1	0.014	0.140
		P	0.440	0.157		0.942	0.461
		N	30	30	30	30	30
	Desmosterol	Correlação Pearson	0.298	0.045	0.014	1	0.070
		P	0.110	0.814	0.942		0.713
		N	30	30	30	30	30
	β -Sitosterol	Correlação Pearson	0.656(**)	0.199	0.140	0.070	1
		P	0.000	0.291	0.461	0.713	
		N	30	30	30	30	30

Legenda: P = probabilidade de significância. ** Correlação para um nível de significância de 0.01 ($\alpha = 0.01$). **Nota:** Para a semana 21, os coeficientes de correlação de Pearson são fortes para o β -sitosterol versus colesterol ($\alpha = 0.01$).

Tabela 4.18. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para a 22.ª semana de gestação.

Semana			Colesterol	Latosterol	7-DHC	Desmosterol	β -Sitosterol
22	Colesterol	Correlação Pearson	1	0.231	0.125	-0.008	0.327
		P		0.220	0.509	0.966	0.077
		N	30	30	30	30	30
	Latosterol	Correlação Pearson	0.231	1	0.139	0.032	0.003
		P	0.220		0.463	0.866	0.988
		N	30	30	30	30	30
	7-DHC	Correlação Pearson	0.125	0.139	1	-0.108	-0.359
		P	0.509	0.463		0.570	0.051
		N	30	30	30	30	30
	Desmosterol	Correlação Pearson	-0.008	0.032	-0.108	1	-0.091
		P	0.966	0.866	0.570		0.632
		N	30	30	30	30	30
	β -Sitosterol	Correlação Pearson	0.327	0.003	-0.359	-0.091	1
		P	0.077	0.988	0.051	0.632	
		N	30	30	30	30	30

Legenda: P = probabilidade de significância. **Nota:** Para a semana 22, os coeficientes de correlação de Pearson são negativos para: o desmosterol versus colesterol, 7-DHC, β -sitosterol; o β -sitosterol versus 7-DHC.

Tabela 4.19. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para o grupo das mais de 22 semanas de gestação.

Semana			Colesterol	Latosterol	7-DHC	Desmosterol	β -Sitosterol
> 22	Colesterol	Correlação Pearson	1	0.147	-0.123	0.345	0.314
		P		0.437	0.517	0.062	0.092
		N	30	30	30	30	30
	Latosterol	Correlação Pearson	0.147	1	0.251	-0.046	-0.128
		P	0.437		0.180	0.810	0.501
		N	30	30	30	30	30
	7-DHC	Correlação Pearson	-0.123	0.251	1	-0.170	-0.097
		P	0.517	0.180		0.369	0.610
		N	30	30	30	30	30
	Desmosterol	Correlação Pearson	0.345	-0.046	-0.170	1	0.331
		P	0.062	0.810	0.369		0.074
		N	30	30	30	30	30
β-Sitosterol	Correlação Pearson	0.314	-0.128	-0.097	0.331	1	
	P	0.092	0.501	0.610	0.074		
	N	30	30	30	30	30	

Legenda: P = probabilidade de significância. **Nota:** Para o grupo das mais de 22 semanas de gestação, os coeficientes de correlação de Pearson são negativos para: o 7-DHC versus colesterol, desmosterol, β -sitosterol; o latosterol versus desmosterol, β -sitosterol.

Para coeficientes de correlação de Pearson negativos, a probabilidade de significância é maior que o nível de significância ($P > \alpha$), logo, os valores de concentração entre esteróis não são estatisticamente diferentes, o que indica que não há diferenças estatisticamente significativas na ordem de grandeza de variação das concentrações dos esteróis. O mesmo acontece para os restantes valores de coeficientes de correlação de Pearson.

Para coeficientes de correlação fortes (marcados com asteriscos), a probabilidade de significância é menor que o nível de significância ($P < \alpha$), logo, os valores de concentração entre os esteróis são estatisticamente diferentes, o que indica que há diferenças estatisticamente significativas na ordem de grandeza de variação das concentrações dos esteróis.

Estas constatações podem ser melhor visualizadas nos gráficos Error Bar (figuras 4.27., 4.28, 4.29, 4.30 e 4.31).

Também foram avaliadas as correlações existentes entre (1) cada esterol da via de biossíntese de colesterol versus esteróis totais da via de biossíntese de colesterol (E.T.₁ - somatório de colesterol, latosterol, 7-DHC e desmosterol), (2) as correlações entre o somatório dos precursores de colesterol (E.T.₂ - somatório de latosterol, desmosterol e 7-DHC) e o colesterol e (3) as correlações entre cada esterol versus esteróis totais doseados neste trabalho (E.T.₃ - somatório de colesterol, latosterol, desmosterol, 7-DHC e β -sitosterol), por determinação dos coeficientes de correlação de Pearson.

Na tabela 4.20. estão apresentados os coeficientes de correlação de Pearson existentes entre cada esterol da via de biossíntese de colesterol versus E.T.₁.

Tabela 4.20. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis da via de biossíntese de colesterol versus esteróis totais da via de biossíntese de colesterol.

		E.T. ₁	Desmosterol	7-DHC	Latosterol	Colesterol
E.T.₁	Correlação de Pearson	1	0.893 ^(**)	0.794 ^(**)	0.850 ^(**)	1.000 ^(**)
	P		0.000	0.000	0.000	0.000
	N	330	330	330	330	330
Desmosterol	Correlação de Pearson	0.893 ^(**)	1	0.808 ^(**)	0.866 ^(**)	0.889 ^(**)
	P	0.000		0.000	0.000	0.000
	N	330	330	330	330	330
7-DHC	Correlação de Pearson	0.794 ^(**)	0.808 ^(**)	1	0.897 ^(**)	0.789 ^(**)
	P	0.000	0.000		0.000	0.000
	N	330	330	330	330	330
Latosterol	Correlação de Pearson	0.850 ^(**)	0.866 ^(**)	0.897 ^(**)	1	0.844 ^(**)
	P	0.000	0.000	0.000		0.000
	N	330	330	330	330	330
Colesterol	Correlação de Pearson	1.000 ^(**)	0.889 ^(**)	0.789 ^(**)	0.844 ^(**)	1
	P	0.000	0.000	0.000	0.000	
	N	330	330	330	330	330

Legenda: P = probabilidade de significância. E.T.₁ - somatório dos esteróis da via de biossíntese de colesterol, são eles: colesterol, latosterol, 7-DHC e desmosterol. ** Correlação para um nível de significância de 0.01 ($\alpha = 0.01$) com probabilidade de significância nula (P = 0.00).

Por análise da tabela 4.20. e dos coeficientes de correlação de Pearson, verifica-se que (1) existe uma correlação forte entre cada um dos esteróis e os E.T.₁. e que (2) a probabilidade

de significância é menor que o nível de significância ($P < \alpha$) para todos os esteróis e E.T.₁, logo, os valores de concentração entre os esteróis e somatório são estatisticamente diferentes. Assim, pode afirmar-se que as concentrações entre os diversos esteróis são significativamente e estatisticamente diferentes, seguindo um padrão linear, condição necessária à aplicação da correlação de Pearson.

Desta forma, existe uma relação de proporcionalidade entre os esteróis da via de biossíntese de colesterol e entre estes e o somatório dos respectivos esteróis, o que vai corroborar a crescente necessidade de colesterol para o desenvolvimento fetal, por aumento da via de biossíntese de colesterol com, conseqüente aumento da síntese dos precursores de colesterol, à medida que aumenta o número de semanas de gestação.

O diagrama de extremos e quartis do somatório das concentrações dos esteróis da via de biossíntese de colesterol, em função das semanas de gestação (figura 4.32.), permite visualizar o aumento dos esteróis da via de biossíntese de colesterol com o aumento da gestação.

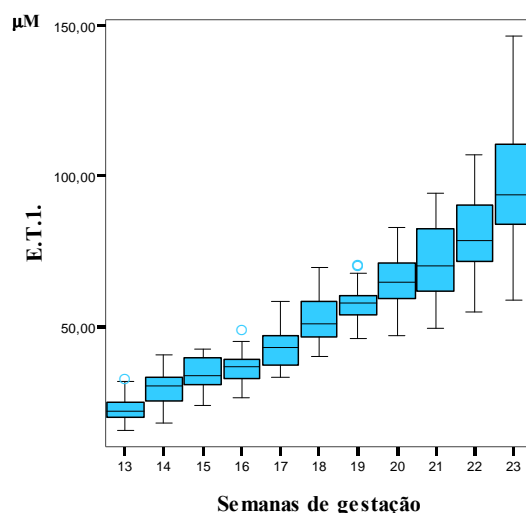


Figura 4.32. Diagrama de extremos e quartis do somatório das concentrações (μM) dos esteróis da via de biossíntese de colesterol (E.T.₁ – somatório dos esteróis colesterol, latosterol, 7-DHC e desmosterol), em função das semanas de gestação. Através deste gráfico é possível observar nas 13 semanas de gestação a presença de 1 maior valor que não é um *outlier* e, a presença de *outliers* superiores às 16 e 19 semanas de gestação.

O aumento dos precursores de colesterol, com o aumento da síntese endógena de colesterol, face à crescente necessidade de colesterol para o desenvolvimento embrionário, à medida que aumenta o número de semanas de gestação, pode ser comprovado pelos coeficientes de correlação de Pearson entre os precursores de colesterol (somatório de latosterol, desmosterol e 7-DHC) versus colesterol (tabela 4.21.).

Tabela 4.21. Coeficientes de correlação de Pearson entre os precursores de colesterol (somatório de latosterol, desmosterol e 7-DHC) versus colesterol.

		E.T.₂	Colesterol
E.T.₂	Correlação de Pearson	1	0.890 ^(**)
	P		0.000
	N	330	330
Colesterol	Correlação de Pearson	0.890 ^(**)	1
	P	0.000	
	N	330	330

Legenda: P = probabilidade de significância. E.T.₂ - somatório dos precursores de colesterol, são eles: latosterol, 7-DHC e desmosterol. ** Correlação para um nível de significância de 0.01 ($\alpha = 0.01$) com probabilidade de significância nula (P = 0.00).

Por análise da tabela 4.21. e dos coeficientes de correlação de Pearson, verifica-se que (1) existe uma correlação forte do tipo linear entre o colesterol e os E.T.₂. e que (2) a probabilidade de significância é menor que o nível de significância ($P < \alpha$) para o colesterol e E.T.₂. , logo, há diferença estatisticamente significativa entre o somatório das concentrações dos precursores de colesterol e o próprio colesterol. Assim, pode afirmar-se que existe uma relação de proporcionalidade entre o colesterol e o somatório dos seus precursores, o que corrobora a ideia referida anteriormente.

O diagrama de extremos e quartis do somatório das concentrações dos precursores de colesterol, em função das semanas de gestação (figura 4.33.), permite visualizar o aumento dos precursores de colesterol há medida que a gravidez progride.

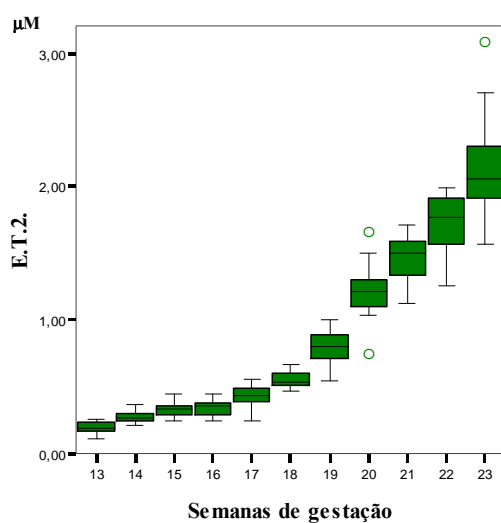


Figura 4.33. Diagrama de extremos e quartis do somatório das concentrações (μM) dos precursores de colesterol (E.T.₂ – somatório dos esteróis latosterol, 7-DHC e desmosterol), em função das semanas de gestação. Através deste gráfico é possível observar nas 20 semanas de gestação a presença de 2 *outliers* superior e inferior, e a presença de um *outlier* superior no grupo com mais de 22 semanas de gestação (representado no gráfico como 23 semanas de gestação).

Na tabela 4.22. estão apresentados os coeficientes de correlação de Pearson existentes entre cada esterol versus E.T.₃. (somatório de colesterol, latosterol, desmosterol, 7-DHC e β -sitosterol, esteróis doseados neste trabalho).

A figura 4.34. representa um diagrama de extremos e quartis do somatório das concentrações de todos os esteróis doseados neste trabalho em função das semanas de gestação.

Tabela 4.22. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis versus esteróis totais doseados neste trabalho.

		Desmosterol	7-DHC	Latosterol	Colesterol	β -Sitosterol	E.T. ₃ .
Desmosterol	Correlação de Pearson	1	0.808 ^(**)	0.866 ^(**)	0.889 ^(**)	0.860 ^(**)	0.894 ^(**)
	P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	N	330	330	330	330	330	330
7-DHC	Correlação de Pearson	0.808 ^(**)	1	0.897 ^(**)	0.789 ^(**)	0.708 ^(**)	0.795 ^(**)
	P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	N	330	330	330	330	330	330
Latosterol	Correlação de Pearson	0.866 ^(**)	0.897 ^(**)	1	0.844 ^(**)	0.809 ^(**)	0.850 ^(**)
	P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	N	330	330	330	330	330	330
Colesterol	Correlação de Pearson	0.889 ^(**)	0.789 ^(**)	0.844 ^(**)	1	0.849 ^(**)	1.000 ^(**)
	P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	N	330	330	330	330	330	330
β-Sitosterol	Correlação de Pearson	0.860 ^(**)	0.708 ^(**)	0.809 ^(**)	0.849 ^(**)	1	0.853 ^(**)
	P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	N	330	330	330	330	330	330
E.T.₃.	Correlação de Pearson	0.894 ^(**)	0.795 ^(**)	0.850 ^(**)	1.000 ^(**)	0.853 ^(**)	1
	P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	N	330	330	330	330	330	330

Legenda: P = probabilidade de significância. E.T.₃. - somatório dos esteróis doseados neste trabalho: colesterol, latosterol, 7-DHC, desmosterol e β -sitosterol. ** Correlação para um nível de significância de 0.01 ($\alpha = 0.01$) com probabilidade de significância nula ($P = 0.00$).

Por análise da tabela 4.22. e dos coeficientes de correlação de Pearson, verifica-se que (1) existe uma correlação forte do tipo linear entre cada esterol e os E.T.₃. e que (2) a probabilidade de significância é menor que o nível de significância ($P < \alpha$), para todos os esteróis e E.T.₃., logo, há diferença estatisticamente significativa entre os valores de concentração dos esteróis e entre os esteróis e o somatório dos esteróis doseados neste trabalho. Assim, verifica-se que existe uma relação de proporcionalidade entre todos os esteróis, o que indica que, a quantidade de um determinado esterol numa amostra é dependente da quantidade total dos esteróis presentes, ou seja, há medida que aumenta a concentração de um dos esteróis com o aumento da gestação, também aumenta a quantidade dos restantes esteróis.

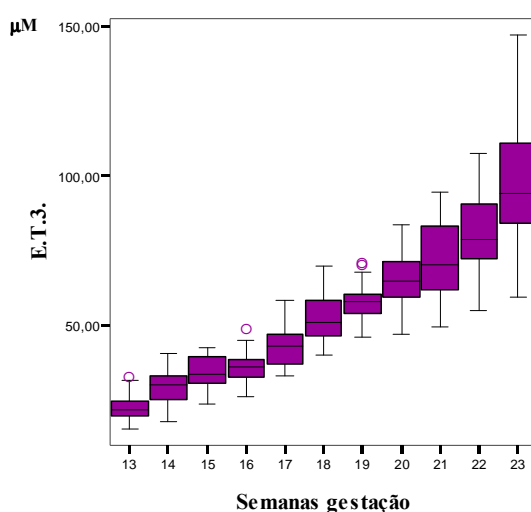


Figura 4.34. Diagrama de extremos e quartis do somatório das concentrações (μM) de todos os esteróis doseados neste trabalho (colesterol, latosterol, desmosterol, 7-DHC e β -sitosterol), em função das semanas de gestação. Através deste gráfico é possível observar às 13 semanas de gestação a presença de um maior valor que não é um *outlier* e às 16 e 19 semanas de gestação a presença de *outliers* superiores.

Através deste diagrama de extremos e quartis verifica-se que com o aumento da semana de gestação, há um aumento de todos os esteróis doseados neste trabalho, o que indica que a quantidade de esteróis presentes numa amostra de LA é dependente do seu número de semanas de gestação.

4.2.3.3. Teste de hipóteses para avaliar a distribuição de esterol pelas várias semanas de gestação

A teoria de decisão, através de testes de hipóteses, é uma outra forma de inferir sobre o parâmetro da população, associando este processo a um determinado nível de significância. O teste de hipóteses tem como objectivo refutar (ou não) uma determinada hipótese acerca de um ou mais parâmetros da população, a partir de uma ou mais estimativas obtidas nas amostras. Desta forma, um teste de hipótese desenrola-se em 3 passos: (1) formular as hipóteses a testar – a 1.º hipótese designa-se por hipótese nula (H_0), a 2.º hipótese designa-se por hipótese alternativa (H_1); (2) calcular a estatística do teste e (3) decidir se refuta-se a H_0 . A H_0 é sempre a hipótese mais restritiva e, só deve ser rejeitada, caso exista evidência suficiente, a um nível

significativo, que H_0 não é válida. Os testes de hipóteses estão subdivididos em dois grupos, com metodologias diferentes: (1) testes paramétricos – exigem que a forma de distribuição da amostra seja conhecida e normal (segundo o teorema do limite central); (2) testes não-paramétricos – não exigem o conhecimento da distribuição amostral e que esta seja normal, e são aplicados como alternativa aos testes paramétricos. No entanto, é de salientar que de um modo geral, a potência dos testes paramétricos é superior à dos testes não-paramétricos (isto é, a probabilidade de rejeitar, correctamente, H_0 é maior num teste paramétrico do que não-paramétrico) e que, os testes não-paramétricos devem apenas utilizar-se quando não existe alternativa, isto é, quando não é possível validar as condições de aplicação dos testes, como por exemplo, homogeneizar as variâncias e ou normalizar a variável dependente, ou quando a escala de medida da variável dependente é qualitativa (Maroco, 2007).

Para se seleccionar qual dos testes de hipóteses é o mais correcto a aplicar na amostragem, começou-se por avaliar a distribuição das variáveis (semana de gestação versus concentração de esterol), averiguando se os dados se distribuíam de modo normal, utilizando os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, testam se a distribuição da variável é ou não normal com parâmetros média (μ) e desvio padrão (σ), quaisquer que estes sejam.

Para a aplicação destes testes formularam-se as seguintes hipóteses:

- ✓ H_0 : $X \sim N(\mu, \sigma)$ - (a variável X tem uma distribuição normal da média μ e desvio padrão σ);
- ✓ H_1 : $X \neq N(\mu, \sigma)$ - (a variável X não tem uma distribuição normal da média μ e desvio padrão σ);

Tabela 4.23. Estatísticas dos testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para os diferentes esteróis.

	Kolmogorov-Smirnov ^(a)			Shapiro-Wilk		
	Estatística	N	P	Estatística	N	P
Desmosterol	0.105	330	0.000	0.940	330	0.000
β-Sitosterol	0.194	330	0.000	0.867	330	0.000
7-DHC	0.294	330	0.000	0.697	330	0.000
Latosterol	0.239	330	0.000	0.801	330	0.000
Colesterol	0.079	330	0.000	0.951	330	0.000

Legenda: P = probabilidade de significância com nível de significância de 0.05 ($\alpha = 0.05$). (a) Correção de Lilliefors.

Para os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, a probabilidade de significância é menor que o nível de significância ($P < \alpha$), uma vez que $P = 0$ e $\alpha = 0.05$. Segundo Fisher e Newman & Pearson, para um determinado nível de significância ou probabilidade de erro tipo I (α), deve-se rejeitar significativamente H_0 se $P < \alpha$ (Maroco, 2007). Logo, a hipótese H_0 é rejeitada significativamente, o que indica que $X \neq N(\mu, \sigma)$, a variável X não tem uma distribuição normal da média μ e desvio padrão σ .

Outra das formas de avaliar se a distribuição é ou não normal, é através das medidas de assimetria e achatamento, ou seja, coeficiente de assimetria e curtose (coeficiente de achatamento), pois para que, uma distribuição se possa assumir como normal, os valores dos coeficientes descritos devem ser próximos de zero, isto é, dentro de um intervalo de [-0.5: 0.5]. Sempre que os valores são superiores a um, pode assumir-se que a distribuição dos dados não é do tipo normal (Maroco, 2007). Os coeficientes de assimetria e achatamento determinados estatisticamente para cada esterol, em função das semanas de gestação, estão apresentados nas tabelas 4.2. (colesterol), 4.3. (desmosterol), 4.4. (7-DHC), 4.5. (latosterol) e 4.6. (β -sitosterol). Tal como esperado, estes coeficientes indicam que a distribuição da concentração de cada esterol, em função das semanas de gestação, não é normal, pelo que se optou por utilizar os testes não-paramétricos para o estudo posterior.

Para avaliar as significâncias e a distribuição da concentração de esterol em função das semanas de gestação, através de um teste de hipóteses não-paramétrico, avaliou-se inicialmente: (1) se as variáveis estatísticas eram qualitativas, numa escala nominal ou ordinal,

ou se eram quantitativas, numa escala intervalar ou razão, (2) se a população amostral era contínua ou não e, (3) se era emparelhada ou independente. Considerando as semanas de gestação - uma variável qualitativa ordinal e, a concentração de esterol, uma variável quantitativa numa escala de medida de razão, contínua e independente, seleccionou-se como teste de hipóteses não-paramétrico, o teste das Medianas (para N variáveis independentes e contínuas). É de notar que se uma variável for contínua e a sua distribuição não for normal, a melhor medida de tendência central é a mediana (Maroco, 2007).

Para aplicação do teste não paramétrico das medianas, formularam-se as seguintes hipóteses:

- ✓ H_0 : a concentração de esterol é independente do aumento da semana de gestação, não sendo os seus valores estatisticamente diferentes;
- ✓ H_1 : a concentração de esterol aumenta com o aumento da semana de gestação, sendo os seus valores estatisticamente diferentes.

Tabela 4.24. Estatísticas do teste não-paramétrico das medianas para os diferentes esteróis, com a variável de grupo definida para as semanas de gestação.

	β-Sitosterol	Desmosterol	7-DHC	Latosterol	Colesterol
N	330	330	330	330	330
Mediana	0.1036	0.4191	0.0085	0.1234	48.5312
Chi-Square	300.000	274.933	300.000	300.000	268.267
df	10	10	10	10	10
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Legenda: Chi-Square - valor da estatística de teste. df - graus de liberdade. P - probabilidade de significância calculada assintoticamente, com nível de significância de 0.05 ($\alpha = 0.05$).

Através do teste não-paramétrico das medianas para os diferentes esteróis, com a variável de grupo definida para as semanas de gestação e nível de significância de 0.05, verifica-se que, a probabilidade de significância é menor que o nível de significância ($P < \alpha$), uma vez que $P = 0$ e $\alpha = 0.05$. Segundo Fisher e Newman & Pearson, para um determinado nível de significância ou probabilidade de erro tipo I (α), deve-se rejeitar significativamente H_0 se $P < \alpha$ (Maroco, 2007).

Logo, para os valores de concentração (medianas) de esterol, há diferenças estatisticamente significativas com o aumento das semanas de gestação e a hipótese H_0 é rejeitada significativamente, o que indica que a concentração de esterol aumenta com o aumento da semana de gestação.

Este teste de hipóteses corrobora a ideia de que, o aumento de esteróis com o aumento das semanas de gestação é concordante com o progressivo crescimento e desenvolvimento fetal, dependente de quantidades crescentes de moléculas biologicamente importantes como o colesterol.

4.2.3.4. Discussão dos resultados

Após a análise e tratamento de dados estatísticos com recurso ao SPSS[®], pode concluir-se que à medida que aumenta o número de semanas de gestação, há um aumento da quantidade de esteróis presente em amostras de LA, ou seja, a quantidade de esteróis é dependente da fase de gestação, uma vez que, existe uma relação de proporcionalidade directa entre estas duas variáveis.

O aumento de colesterol com o avançar da gestação é explicado pela crescente necessidade deste composto para o desenvolvimento fetal e, o aumento dos precursores de colesterol (latosterol, desmosterol e 7-DHC), deve-se ao aumento da síntese endógena de colesterol, para conseqüente aumento da quantidade de colesterol necessário ao feto. O aumento de β -sitosterol ao longo da gestação está relacionado com o aumento de colesterol e precursores. O β -sitosterol é indicador da existência de transferência de colesterol materno-fetal, pela placenta e, do estado de absorção e captação de colesterol pelas células.

4.2.4. Análise comparativa de valores de referência

Estão descritos na literatura vários métodos de GC-MS aplicáveis ao diagnóstico de défices da via de biossíntese de colesterol, por determinação de valores de referência de colesterol, 7-dehidrocolesterol, 8-dehidrocolesterol, desmosterol e latosterol em líquidos amnióticos de fetos sem patologia (Kelley, 1995; Irons and Tint, 1998; Tint *et al.*, 1998; Kratz and Kelley, 1999 e Chevy *et al.*, 2005).

Na tabela 4.25., são apresentados os valores de referência para cada esterol, determinados pelo método GC-MS, operando num modo SIM, neste trabalho e os descritos na literatura.

É de salientar que (1) somente neste trabalho e no de Chevy e colaboradores (2005), foram quantificados em simultâneo os vários esteróis da via de biossíntese de colesterol e que (2) à excepção deste trabalho, não foi encontrada nenhuma bibliografia, que refira valores de referência para o β -sitosterol em líquidos amnióticos.

Por comparação dos valores de referência calculados neste trabalho com os descritos na literatura, verifica-se que, a concentração de colesterol aqui determinada se encontra dentro dos parâmetros de referência previamente descritos. Para o 7-DHC, os valores aqui determinados e os da literatura, apresentam uma diferença, sobretudo em relação ao trabalho de Tint e colaboradores (1998). As variações, na bibliografia descrita, podem ser explicadas pela dificuldade em separar o desmosterol do 7-DHC numa mesma corrida cromatográfica e, pela pequena quantidade deste esterol presente em amostras biológicas de uma população normal, pois este esterol, só se encontra elevado em patologias da via de biossíntese de colesterol.

A concentração de latosterol determinada, também é diferente da encontrada por Chevy e colaboradores (2005), embora comparando a amostragem e o intervalo de semanas de gestação, os níveis baixos de latosterol aqui determinados fazem mais sentido com as características bioquímicas intrínsecas a um feto sem patologia, pois, todo o latosterol produzido durante a biossíntese de colesterol é convertido a colesterol.

Embora o 8-DHC seja um dos importantes marcadores bioquímicos de défices da via de biossíntese de colesterol (nomeadamente do síndrome Smith-Lemli-Opitz), os seus valores não foram determinados neste trabalho, uma vez que a quantidade deste composto presente numa amostra de líquido amniótico de um feto normal é muito pequena, pois, este esterol é apenas proveniente de uma reacção de isomerização com o 7-DHC, que normalmente se encontra por si só em quantidades pequenas nos LA.

Em resumo, os valores de referência para os diferentes esteróis determinados no curso deste trabalho, são úteis para auxiliar no diagnóstico bioquímico pré-natal de défices da via de

biossíntese de colesterol, como a SLO, desmosterolose e latosterolose, uma vez que estas síndromes polimalformativas se caracterizam bioquimicamente por hipocolesterolemia e acumulação dos precursores de colesterol (ver Tabela 1.2.).

Tabela 4.25. Tabela com a comparação de valores de referência para os diversos esteróis em líquidos amnióticos, determinados pelo método utilizado neste estudo e por métodos descritos na literatura.

Metodologia	Amostra	N.º de Amostras (N)	Grupo Etário (semanas)	Concentração (µM)					Referência
				Colesterol	7-DHC	8-DHC	Latosterol	Desmosterol	
GC-MS + SIM	LA	40	-	[33.10 – 84.30]*	[0.0108 – 0.212]*	-	-	-	(Kelley, 1995)
GC-MS + SIM	LA	20	15-18	[36.21 – 46.55]*	[2.56 – 2.62]*	-	-	-	(Tint <i>et al.</i> , 1998)
GC-MS + SIM	LA	8	14 - 24	[41.38 – 56.90]*	[0.1 – 0.16]*	< 0.013*	-	-	(Irons e Tint, 1998)
GC-MS + SIM	LA	76	-	-	[0.0022 – 0.0178]*	-	-	-	(Kratz e Kelley, 1999)
GC-MS + SIM	LA	69	10 – 37	102.93*	0.78*	-	5.94*	[0.03 – 0.81]*	(Chevy <i>et al.</i> , 2005)
GC-MS + SIM	LA	330	13	Colesterol	7-DHC	β-sitosterol	Latosterol	Desmosterol	Neste trabalho
				[17.90 - 26.45]	[0.0032 - 0.0046]	[0.037 - 0.044]	[0.024 - 0.031]	[0.115 - 0.197]	
			14	[23.53 - 34.81]	[0.0034 - 0.0048]	[0.037 - 0.050]	[0.032 - 0.046]	[0.184 - 0.272]	
			15	[28.53 - 39.27]	[0.0040 - 0.0048]	[0.044 - 0.056]	[0.038 - 0.057]	[0.223 – 0.325]	
			16	[30.47 - 40.51]	[0.0041 - 0.0053]	[0.044 - 0.056]	[0.045 - 0.063]	[0.229 – 0.337]	
			17	[36.20 - 48.38]	[0.0054 - 0.0064]	[0.057 - 0.073]	[0.069 - 0.097]	[0.256 – 0.415]	
			18	[44.27 - 58.81]	[0.0078 - 0.0094]	[0.086 - 0.122]	[0.102 - 0.143]	[0.363 – 0.479]	
			19	[50.74 - 56.95]	[0.0113 - 0.0175]	[0.145 - 0.262]	[0.173 - 0.314]	[0.448 – 0.618]	
			20	[55.79 – 72.67]	[0.0235 - 0.0355]	[0.187 - 0.252]	[0.428 - 0.707]	[0.531 – 0.715]	
			21	[58.05 – 82.59]	[0.0679 - 0.1159]	[0.191 - 0.270]	[0.556 - 0.774]	[0.605 – 0.807]	
22	[65.61 – 91.41]	[0.0938 - 0.1362]	[0.194 - 0.271]	[0.676 - 1.034]	[0.687 - 0.851]				
23 - 30	[72.96 - 115.80]	[0.1430 - 0.2088]	[0.187 - 0.331]	[0.785 - 1.317]	[0.724 - 1.09]				

Legenda: * Estes valores foram obtidos por conversão das unidades referidas na bibliografia em μM , atendendo as massas moleculares de cada composto (colesterol 386.65 g/mol, 7-DHC 384.64 g/mol, 8-DHC 384.64 g/mol, latosterol 386.65 g/mol, desmosterol 384.64 g/mol).

4.2.5. Quantificação de esteróis numa amostra de um feto com suspeita de Síndrome Smith-Lemli-Opitz

Para além da quantificação de esteróis em amostras de líquidos amnióticos sem patologia, foi analisado em duplicado, pelo método GC-MS otimizado, uma amostra LA de um feto com suspeita de síndrome Smith-Lemli-Opitz (SLO), com 15 semanas de gestação e história familiar positiva.

4.2.5.1. Cromatogramas

A figura 4.34. representa um cromatograma em modo de aquisição SIM, de uma amostra LA de um feto suspeito de SLO, com 15 semanas de gestação, onde foi possível identificar e separar todos os esteróis de interesse.

Por comparação deste cromatograma com os cromatogramas apresentados anteriormente, em especial as figuras 4.12. e 4.13. (cromatogramas de uma amostra LA de um feto sem patologia), verifica-se que a área relativa dos picos cromatográficos de cada esterol é diferente, nomeadamente, a área dos picos de 7-DHC e β -sitosterol é maior e o pico de colesterol é menor, no LA do feto suspeito de SLO do que num LA sem patologia.

Estudo dos défices da via de biossíntese de colesterol: implementação de uma metodologia e determinação de valores de referência de esteróis em amostras de líquido amniótico

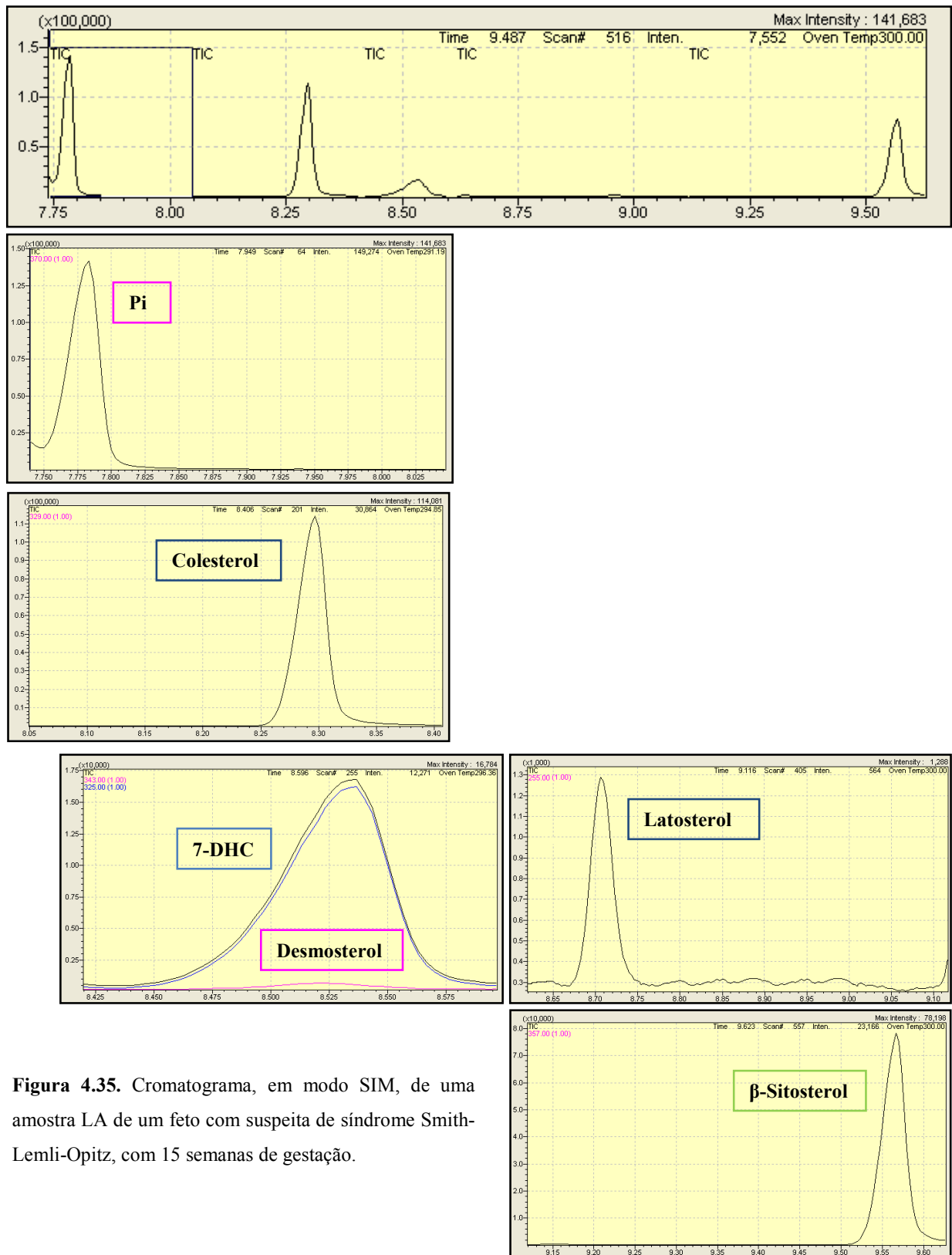


Figura 4.35. Cromatograma, em modo SIM, de uma amostra LA de um feto com suspeita de síndrome Smith-Lemli-Opitz, com 15 semanas de gestação.

4.2.5.2. Quantificação dos esteróis

A quantificação, em duplicado, dos esteróis colesterol, 7-DHC, desmosterol, latosterol e β -sitosterol na amostra LA, foi feita como descrito anteriormente.

Obtiveram-se os seguintes resultados para cada esterol doseado na amostra:

Tabela 4.26. Concentração em μM de cada esterol numa amostra LA de um feto com suspeita de síndrome Smith-Lemli-Opitz, analisada em duplicado.

Amostra LA suspeita de SLO	Concentração em μM				
	Colesterol	Desmosterol	7-DHC	Latosterol	β -sitosterol
1.º	17.44	0.31	3.61	0.14	17.71
2.º	17.60	0.32	3.98	0.16	12.94
Média	17.52	0.32	3.79	0.15	15.32
Desvio Padrão	0.12	0.01	0.26	0.01	3.37
Coefficiente de variação (%)	0.67	2.68	6.89	6.82	13.32

A tabela 4.27. compara os valores de referência estabelecidos durante o trabalho para amostras LA de 15 semanas de gestação com os valores de esteróis quantificados na amostra LA do feto suspeito de SLO.

Tabela 4.27. Concentração em μM para cada esterol e razão esterol/esteróis totais da via de biossíntese de colesterol, em amostras LA de fetos sem patologia e numa amostra de um feto com suspeita de síndrome Smith-Lemli-Opitz, de 15 semanas de gestação.

Amostras	Concentração em μM				
	Colesterol	Desmosterol	7-DHC	Latosterol	β -sitosterol
LA sem patologia	33.90 \pm 5.37	0.27 \pm 0.05	0.0044 \pm 0.0004	0.047 \pm 0.009	0.050 \pm 0.006
Razão esterol/E.T.₁. (%)	98.95	0.79	0.13	0.14	-
LA suspeito de SLO	17.52 \pm 0.12	0.32 \pm 0.01	3.79 \pm 0.26	0.15 \pm 0.01	15.32 \pm 3.37
Razão esterol/E.T.₁. (%)	80.44	1.47	17.40	0.69	-

Legenda: E.T.₁. - esteróis totais da via de biossíntese de colesterol.

Por análise da tabela 4.27., verifica-se que a concentração de colesterol é menor na amostra correspondente ao feto suspeito de SLO do que nos fetos sem patologia e que as concentrações de 7-DHC, latosterol e β -sitosterol são maiores nesta mesma amostra. Pelo contrário, a razão colesterol/esteróis totais da via de biossíntese de colesterol é menor no feto suspeito de SLO do que nos fetos do grupo controlo, evidenciando os níveis diminuídos de colesterol. Também as razões 7-DHC/E.T.₁., desmosterol/E.T.₁ e latosterol/E.T.₁ são maiores no líquido do feto em risco para SLO do que nos LA controlo. Estes resultados são bioquimicamente compatíveis com um feto afectado de SLO. Este facto, está de acordo, com os resultados do diagnóstico pré-natal (DPN), efectuado na UBC do CGMJM, quer a nível bioquímico quer a nível molecular e, que tinham previamente evidenciado uma gravidez com feto afectado de síndrome Smith-Lemli-Opitz.

A concentração baixa de colesterol na amostra LA com suspeita clínica de SLO é provocada pelo défice na enzima DHCR7, que ao não converter o 7-DHC em colesterol, também provoca um aumento de 7-DHC na amostra.

Uma vez que a enzima se encontra em défice e não há uma produção normal de colesterol, os mecanismos de feedback negativo da via de biossíntese de colesterol são activados, através da activação da enzima HMG-CoA reductase. A activação destes mecanismos, vai provocar um aumento da via de biossíntese de colesterol, de forma a aumentar a produção de colesterol e diminuir a sua carência. Como na patologia, há um défice enzimático na última etapa desta via, há acumulação dos respectivos precursores de colesterol, o 7-DHC e latosterol.

Na amostra com suspeita de SLO analisada e por comparação com os valores de referência, confirma-se que há um aumento de 7-DHC e latosterol no LA, embora o desmosterol se encontre dentro dos parâmetros normais.

Num estudo de Kratz e Kelley (1999), a concentração de latosterol e os níveis de latosterol como fracção dos esteróis totais, também se encontravam elevados nas gravidezes afectadas com SLO.

Verifica-se um aumento acentuado de β -sitosterol na amostra LA com suspeita de SLO. Este aumento pode ser explicado pelo facto de haver carência de colesterol no LA e, a existência de mecanismos de compensação para diminuir esta carência. Como o β -sitosterol

pode funcionar como um indicador da transferência materno-fetal de colesterol, podemos inferir que o aumento deste esterol num feto com patologia é indicativo de que existe uma transferência aumentada de esteróis da mãe para o feto, de forma, a diminuir a carência de colesterol, uma vez que, este é extremamente importante para o desenvolvimento embrionário. É ainda de notar, tendo em conta o aumento de β -sitosterol, que a quantidade de colesterol presente na amostra com suspeita de SLO pode em parte vir da mãe, uma vez que há evidências de um aumento da transferência materno-fetal de colesterol. Num estudo de Kratz e Kelley (1999), a variabilidade dos níveis de colesterol no LA em 19 doentes SLO, sugere que a mãe pode contribuir para a quantidade de colesterol no LA.

Outra das razões para o aumento de β -sitosterol e uma vez que, este não é um esterol característico das amostras biológicas humanas e provém maioritariamente da dieta, é a possível alimentação da mãe ser rica em vegetais e consequentemente, por transferência materno-fetal, ter elevado a quantidade de β -sitosterol no feto. No entanto, esta hipótese não pode ser verificada uma vez que, não havia nenhuma amostra de soro materno colhida na mesma altura que o LA, que possa ser doseada de forma, a determinar os níveis de β -sitosterol presentes na mãe, que possam provocar o aumento deste esterol no feto.

Face a estes resultados, pode inferir-se que o método GC-MS optimizado, operando no modo não selectivo, permite a confirmação do diagnóstico pré-natal para síndrome Smith-Lemli-Opitz, no feto com suspeita clínica.

Concentrações elevadas de 7-DHC no LA associadas a fetos com SLO, foram descritas na literatura por diversos autores: McGaughan *et al.* (1994, 1995), Dallaire *et al.* (1995), Kelley (1995), Mills *et al.* (1996), Irons e Tint (1998), Tint *et al.* (1998), Kratz e Kelley, (1999) e Chevy *et al.* (2005).

Para avaliar a severidade da patologia e uma vez que, a quantificação dos esteróis não é indicativa, seria interessante avaliar a actividade da enzima DHCR7, através do método HPLC-DAD optimizado (anexo A), o que não foi possível por problemas de natureza externa ao trabalho. No entanto, tendo em conta os nossos resultados, pode afirmar-se que existe uma actividade residual da enzima.

4.2.5.3. Análise comparativa dos esteróis quantificados

Estão descritos na literatura vários métodos de GC-MS aplicáveis ao diagnóstico pré-natal da síndrome Smith-Lemli-Opitz, por determinação das concentrações de colesterol, 7-DHC, 8-DHC, desmosterol e latosterol em líquidos amnióticos (Kelley, 1995; Irons and Tint, 1998; Tint *et al.*, 1998; Kratz and Kelley, 1999 e Chevy *et al.*, 2005). Alguns artigos fazem referência a doseamentos dos esteróis quantificados neste trabalho, mas no geral apenas quantificam simultaneamente o colesterol e 7-DHC em amostras de LA.

Tabela 4.28. Tabela com a comparação das concentrações em μM para os diversos esteróis, determinadas pelo método utilizado neste estudo e por métodos descritos na literatura em doentes com síndrome Smith-Lemli-Opitz.

Metodologia	Amostra	N.º de Amostras (N)	Grupo Etário (semanas)	Concentração (μM)					Referências
				Colesterol	7-DHC	8-DHC	Latosterol	Desmosterol	
GC-MS + SIM	LA	6	-	[20.69 – 49.59]*	[7.28- 25.48]*	-	-	-	(Kelley, 1995)
GC-MS + SIM	LA	1	17	-	22*	-	-	-	(Dallaire <i>et al.</i> , 1995)
GC-MS + SIM	LA	7	21 – 27	[38.79 – 54.31]*	[22.87 – 28.07]*	[7.67 – 14.81]*	-	-	(Tint <i>et al.</i> , 1998)
GC-MS + SIM	LA	7	14 - 24	[38.79 – 54.31]*	[22.87 – 28.07]*	[7.67 – 14.81]*	-	-	(Irons e Tint, 1998)
GC-MS + SIM	LA	76	-	-	[4.68 – 33.28]*	-	-	-	(Kratz e Kelley, 1999)
GC-MS + SIM	LA	13	10 – 37	40.08*	13*	-	6.46*	-	(Chevy <i>et al.</i> , 2005)
GC-MS + SIM	LA	1	15	17.52 ± 0.12	3.79 ± 0.26	15.32 ± 3.37	0.15 ± 0.01	0.32 ± 0.01	Neste trabalho

Legenda: * Estes valores foram obtidos por conversão das unidades referidas na bibliografia em μM , atendendo as massas moleculares de cada composto (colesterol 386.65 g/mol, 7-DHC 384.64 g/mol, 8-DHC 384.64 g/mol, latosterol 386.65 g/mol, desmosterol 384.64 g/mol).

A concentração de cada esterol determinada neste trabalho, é inferior aos valores descritos na literatura, no entanto, é de notar que apenas foi possível analisar uma amostra de

um feto com SLO, com uma idade gestacional de 15 semanas. Este facto, impede a análise comparativa com os restantes valores da literatura, pois a amostragem é maior e não existem valores descritos especificamente para as 15 semanas, mas apenas para uma gama de gestações, o que pode afectar se se tiver em conta que a quantidade de esteróis presentes na amostra depende da idade gestacional.

Além disso as concentrações de esteróis presentes em amostras de fetos com patologia, variam consoante a actividade residual da enzima DHCR7. Num estudo de Kratz e Kelley (1999), foi observada uma correlação muito forte entre os níveis de 7-DHC no LA e a severidade clínica de fetos afectados.

Contudo, a tendência observada para as concentrações dos esteróis aqui doseados é a mesma que se encontra descrita na literatura, se compararmos com os valores de referência em fetos sem patologia pois, nos fetos com SLO há uma diminuição dos níveis de colesterol e um aumento dos níveis dos precursores de colesterol, o 7-DHC e o latosterol.

4.2.6. Limitações do método

Como esterol dieno conjugado (5,6; 7,8) e como substrato da reacção enzimática para a produção da vitamina D₃, o esterol 7-DHC é instável na presença de oxigénio e luz ultravioleta. Para evitar perda de 7-DHC nas amostras e padrões utilizados, os tubos com as soluções padrão de 7-DHC, foram envolvidos em prata e bem rolhados, para minorar a exposição do 7-DHC à luz e ao oxigénio.

No entanto, tal como no trabalho de Kelley (1995), durante o processo de armazenamento, extração e processamento das amostras de LA, verificou-se que a perda de 7-DHC comparado com outros esteróis foi insignificante, utilizando precauções simples para evitar o excesso de exposição à luz e ao oxigénio. Por exemplo, a taxa de recuperação, obtida para o 7-DHC foi cerca de 96.1% com um coeficiente de variação de 1.2%, a repetibilidade intra-série foi de 0.5% e a reprodutibilidade inter-série foi de 1.6% e a carta de controlo para o 7-DHC cumpria todas as regras de controlo de qualidade, não tendo sido detectada qualquer situação anómala. Posto isto, é de referir que para o uso de 7-DHC nesta metodologia, devem ser tomadas precauções para se evitar o contacto com o oxigénio e luz solar.

Para uma melhor separação do 7-DHC e desmosterol, numa mesma corrida cromatográfica, evitando a co-eluição destes dois compostos, poderia recorrer-se a outro tipo de coluna capilar, diferente da utilizada. No trabalho de Kelley (1995), utilizou-se uma coluna capilar de metilsilicone para uma melhor resolução do 7-DHC em relação aos outros esteróis. No trabalho de Chevy e colaboradores (2005) foi utilizada uma coluna capilar de polaridade média e no trabalho de Ahmida *et al.* (2006), uma coluna capilar com 14% de cianopropilfenil e 86% de dimetilpolisiloxane. A coluna usada neste trabalho, era a disponível na UBC do CGMJM, embora para uma melhor separação dos dois esteróis, seria vantajoso seleccionar outro tipo de coluna, provavelmente mais polar, uma vez que, colunas menos polares apresentam dificuldade em separar os esteróis (Chevy *et al.*, 2005).

Toda a bibliografia recomendada utiliza a extração líquido-líquido na preparação das amostras, contudo, seria também importante testar uma extração do tipo sólido-líquido, com uma matriz que permitisse uma boa separação dos lípidos dos restantes compostos. Este tipo de extração evitaria possíveis interferências de compostos biológicos no processo cromatográfico, permitindo melhores separações e cromatogramas mais limpos. Por questões de limitação de tempo, esse tipo de preparação de amostra não foi testado embora fosse um dos pontos inicialmente pensados, em termos de alteração da metodologia instalada.

4.2.7. Discussão final dos resultados

O método GC-MS otimizado neste trabalho permite a quantificação simultânea dos esteróis colesterol, desmosterol, 7-DHC, latosterol e β -sitosterol em amostras de LA. A quantificação destes esteróis em amostras de LA de fetos sem patologia, em função das semanas de gestação, permitiu estabelecer valores de referência para cada esterol em cada semana de gestação e, verificar que a quantidade de cada esterol presente nas amostras de LA aumenta com o aumento da gestação.

O tratamento estatístico, com recurso ao SPSS[®], dos valores de referência de cada esterol, permitiu verificar que (1) existem diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de cada esterol ao longo das gestações; (2) existem diferenças estatisticamente significativas e uma correlação forte entre as concentrações dos vários esteróis com o aumento da gestação, o que indica que, a variação de concentração entre esteróis varia

proporcionalmente com o aumento do número de gestação; (3) existem diferenças estatisticamente significativas e uma correlação forte entre a concentração dos esteróis da via de biossíntese de colesterol e entre estes e o seu somatório, assim como, entre o somatório dos precursores de colesterol, o que indica que, existe uma necessidade crescente de colesterol para o desenvolvimento fetal e um aumento da actividade da via de biossíntese de colesterol, com conseqüente aumento dos precursores de colesterol, à medida que aumenta o número de semanas de gestação; (4) existe uma correlação forte do tipo linear e diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações individuais dos esteróis e o somatório de todos os esteróis doseados neste trabalho, o que indica que, existe uma relação de proporcionalidade entre todos os esteróis e, que a quantidade de um determinado esterol numa amostra é dependente da quantidade total dos esteróis presentes, à medida que aumenta a gestação. O teste de hipóteses corrobora a relação de proporcionalidade directa entre a concentração de esterol e a semana de gestação.

Os resultados deste trabalho contrariam vários estudos (Kelley, 1995; Kratz e Kelley, 1999; Chevy *et al.*, 2005) que sugeriam que não existe nenhuma correlação entre as concentrações de esteróis e o número de semanas de gestação. Como este estudo, abrangeu um maior número de amostras, divididas em grupos homogéneos (número de semanas de gestação) que correspondiam a uma datação correcta, permite obter uma informação mais precisa do comportamento de cada esterol em função da gestação, verificando-se uma correlação forte entre esteróis e, uma relação de dependência da quantidade de esterol presente na amostra com a semana de gestação. Apenas o estudo de Tint *et al.* (1998), tinha estabelecido uma correlação entre os esteróis totais presentes no LA e a idade gestacional, de gravidezes com fetos SLO.

O aumento da concentração de colesterol com o aumento da idade gestacional é devido à contínua necessidade de colesterol para o desenvolvimento fetal. O aumento dos precursores de colesterol, nomeadamente do desmosterol, 7-DHC e latosterol com a progressão da gestação é devido ao aumento da via de biossíntese endógena de colesterol. A presença de β -sitosterol, nas amostras de LA, é sugestivo de que os esteróis são capazes de atravessar a barreira placentária nos humanos e que existe absorção e captação de colesterol pelas células.

Os valores de referência de cada esterol em função das semanas de gestação, determinados neste trabalho, encontram-se em concordância com os descritos na literatura e, são úteis, uma vez que, permitem o diagnóstico bioquímico pré-natal de défices da via de biossíntese de colesterol, pois estes défices, caracterizam-se bioquimicamente por níveis baixos de colesterol e elevados níveis dos precursores de colesterol, em fluídos e tecidos biológicos.

A análise por GC-MS de uma amostra LA de um feto com diagnóstico bioquímico e molecular de SLO, permitiu aplicar a metodologia a uma amostra real de défice na biossíntese de colesterol e verificar que a concentração de colesterol é menor no feto SLO do que nos fetos sem patologia e, que as concentrações de 7-DHC, latosterol e β -sitosterol são maiores no LA do feto SLO do que nos LA do grupo controlo, validando a aplicabilidade do método no diagnóstico de situações patológicas.

