

CUIDADOS PRÁTICOS NAS ANÁLISES LABORATORIAIS DE VITAMINA D E FRAÇÕES LIPÍDICAS

Prof. Dr. Victor Nowosh

Introdução

Há muita competitividade no ramo da Patologia Clínica Veterinária.

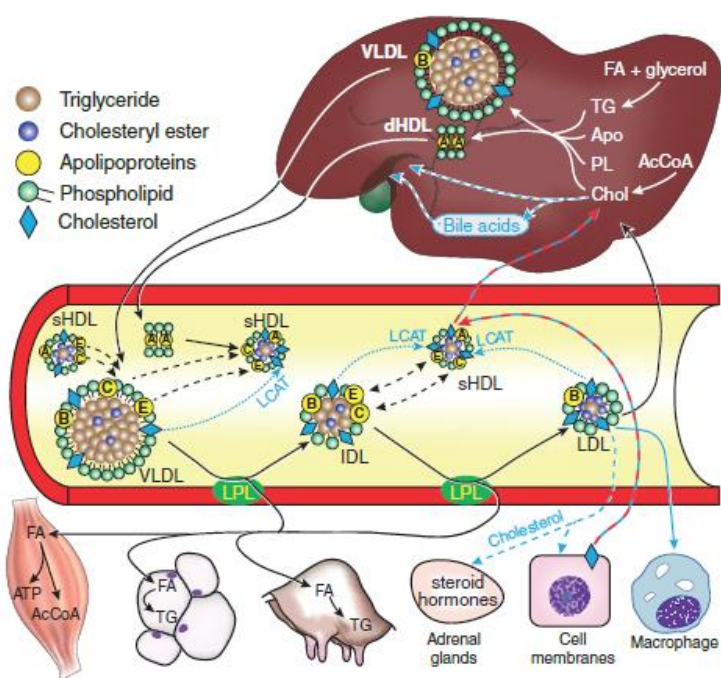


<https://www.westparkanimalhospital.com/veterinary-services/inhouse-laboratory/>

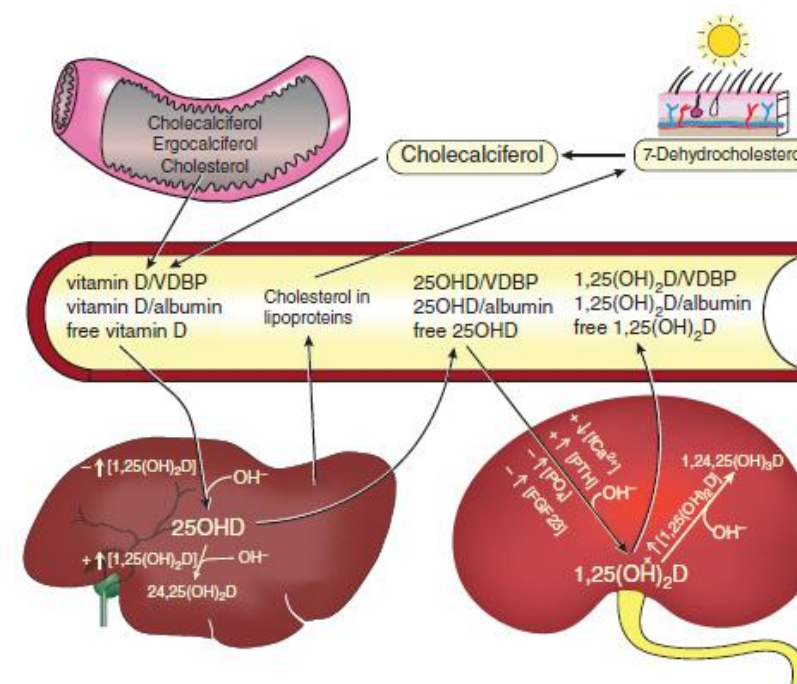
Muitos laboratórios têm expandido seus portfólios para englobar exames mais especializados

Introdução

Dentro do contexto de nutrologia e endocrinologia, hoje estão disponíveis



Dosagem de lipoproteínas



Dosagem de vitamina D

Problemática

Sempre que novos exames surgem no mercado, alguns questionamentos devem ser levantados. Para estes exames:

PROBLEMA N. 1

Falta padronização de metodologias para a realização das dosagens de lipoproteínas e de vitamina D.

PROBLEMA N. 2

Devido a esta falta de padronização, a utilização e interpretação desses exames deve ser cautelosa.

Problemática

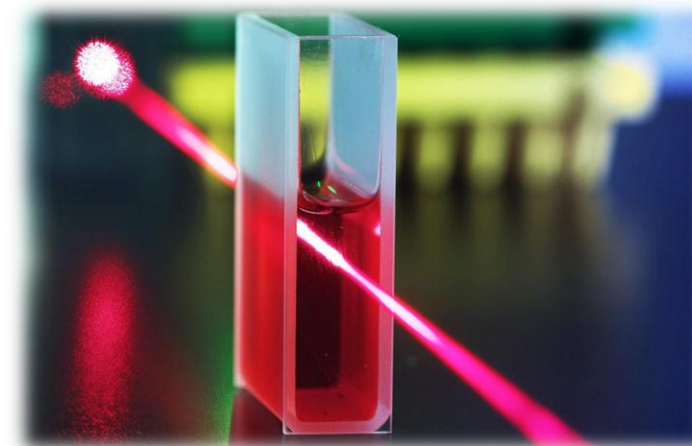


Vocês sabem qual metodologia o laboratório de vocês está usando para estas análises?

Vocês sabem interpretar e utilizar esses resultados para os seus pacientes?

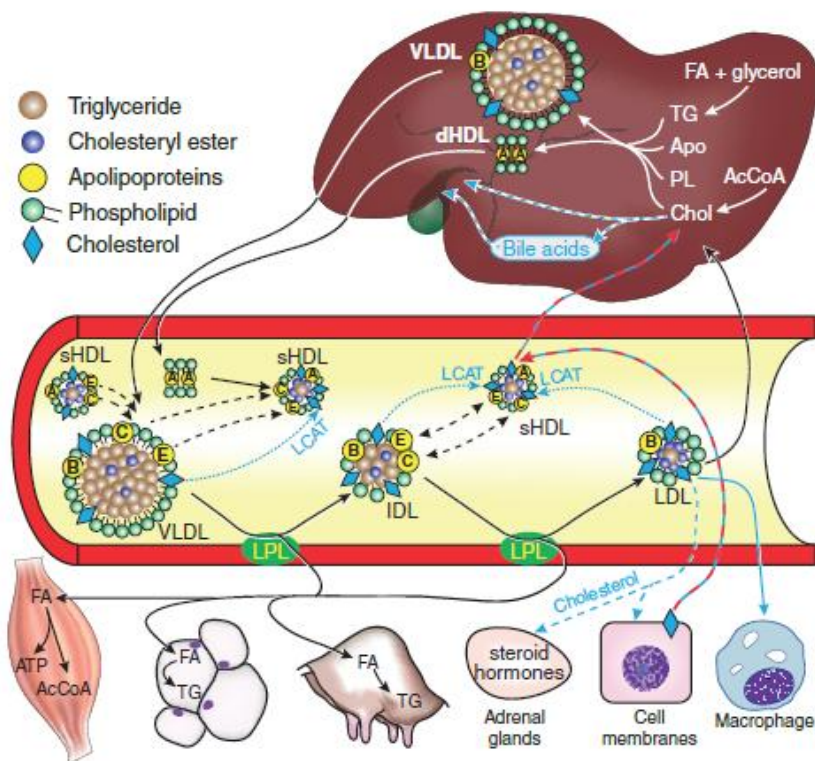
Análise laboratorial das lipoproteínas

Tradicionalmente, a avaliação dos lipídeos em Medicina Veterinária é realizada pela dosagem de Colesterol Total e Triglicerídeos.



A sua dosagem por meio de espectrofotometria foi amplamente validada, e os equipamentos e reagentes necessários são amplamente disponíveis.

Análise laboratorial das lipoproteínas

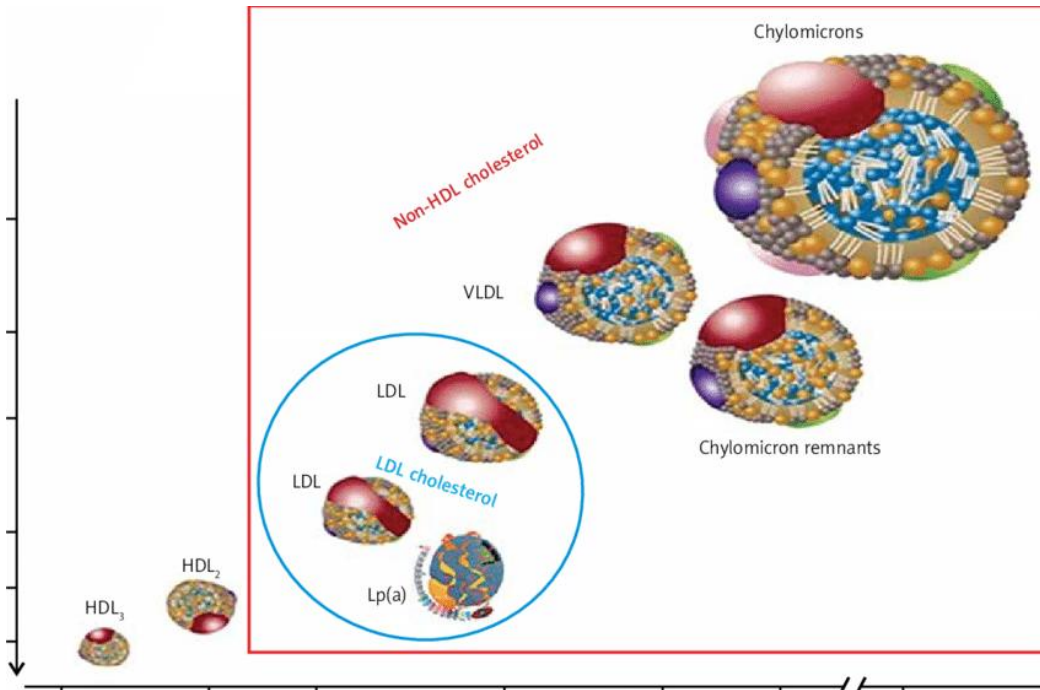


Alguns laboratórios começaram a fornecer a dosagem das “Frações do colesterol” ou de “Lipoproteínas”, caracterizando **HDL, LDL e VLDL**.

Porém, ao contrário do colesterol total e triglicerídeos, esses analitos não são tradicionalmente realizados por métodos bioquímicos clássicos.

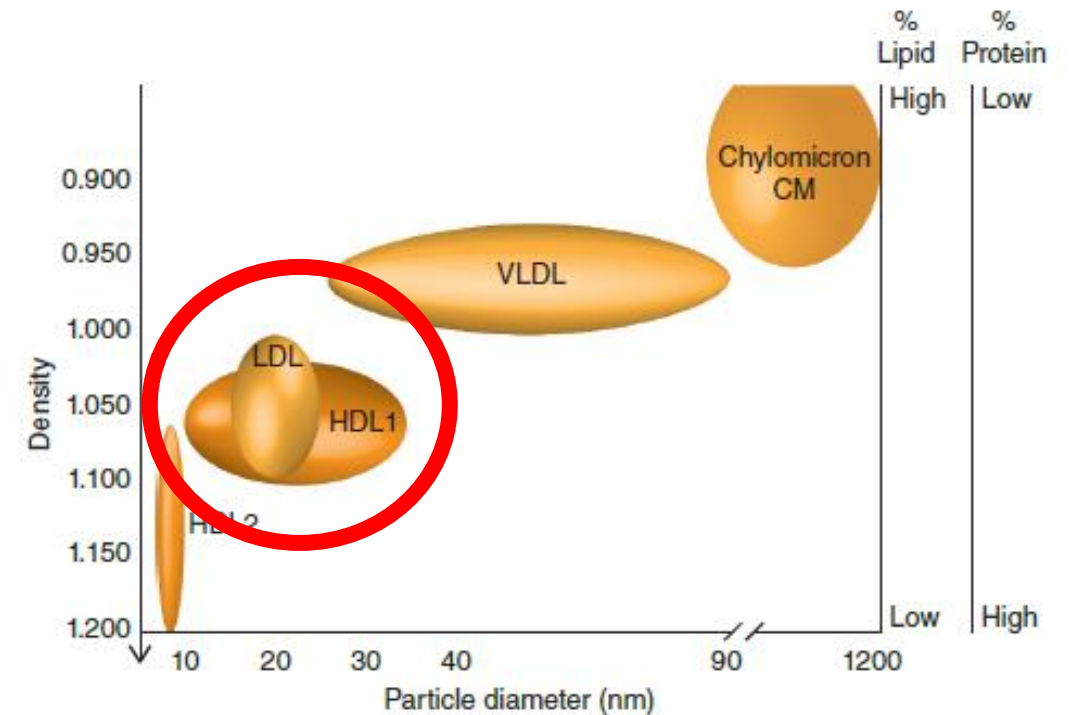
Análise laboratorial das lipoproteínas

Densidade e tamanho das lipoproteínas em humanos



(SOLNICA et al., 2020)

Densidade e tamanho das lipoproteínas em caninos



(STOCKHAM, SCOTT et al., 2025)

Ou seja, há diferenças entre lipoproteínas humanas e veterinárias.

Análise laboratorial das lipoproteínas

Table 16.2. Lipoprotein classification, content, and selected properties					
Property	Lipoproteins				
	Chylomicron	VLDL	IDL	LDL	HDL
Predominant lipids	Dietary TG	Hepatic TG, phospholipid	Hepatic TG, cholesteryl esters, phospholipid	Cholesteryl esters, phospholipid	Phospholipid, cholesteryl esters
Apolipoproteins	A, B, C, E	B, C, E	B, C, E	B	A, C, D, ^a E
Electrophoretic migration	Origin	Pre- β	Between β and pre- β	β	α
Contribute to serum lactescence	Yes, floats with time	Yes	Maybe	No	No
Major site of formation	Small intestinal enterocytes	Hepatocytes	Plasma (from VLDL)	Plasma (from IDL and VLDL)	Hepatocytes, enterocytes
Major sites of degradation or transformation	Plasma, hepatocytes	Plasma	Plasma	Nonhepatic cells, hepatocytes, macrophages	Hepatocytes
Function	Transports dietary lipids to tissues (e.g., muscle, fat, mammary gland)	Transports hepatic lipid to tissues	VLDL remnant after TG transfer to tissues	Transports cholesterol from liver to tissues	Transports cholesterol from tissues to liver
Notable species differences					
Dogs and cats			May not exist		2 or 3 fractions in dogs; ^b 2 in cats
Cattle	Less TG and more phospholipid	Also Apo A; low liver synthesis	Also called LDL1; very little present	Comparatively low concentrations	3 fractions
Horses	Not detected in adults		Little or none	2–3 subfractions; Apo C and E too	1 fraction

Source: Modified from Remaley, 2012¹

Apo = Apolipoprotein

^a Apolipoprotein D is present mostly in HDL; very low amounts are present in LDL and VLDL.

^b Some authors indicate three fractions while others indicate two.

(STOCKHAM, SCOTT et al., 2025)

Análise laboratorial das lipoproteínas

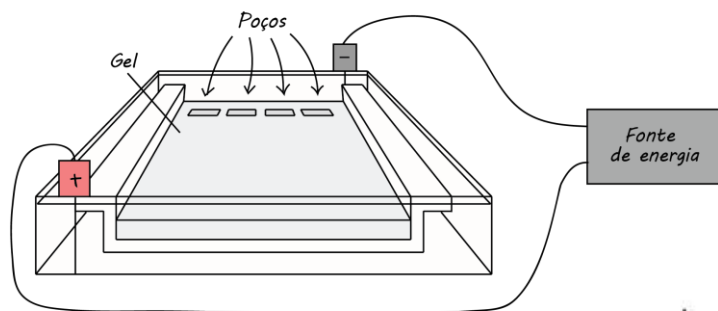
Para a correta avaliação das lipoproteínas, o ideal é utilizar algum método que consiga fazer a separação física nas diferentes frações!



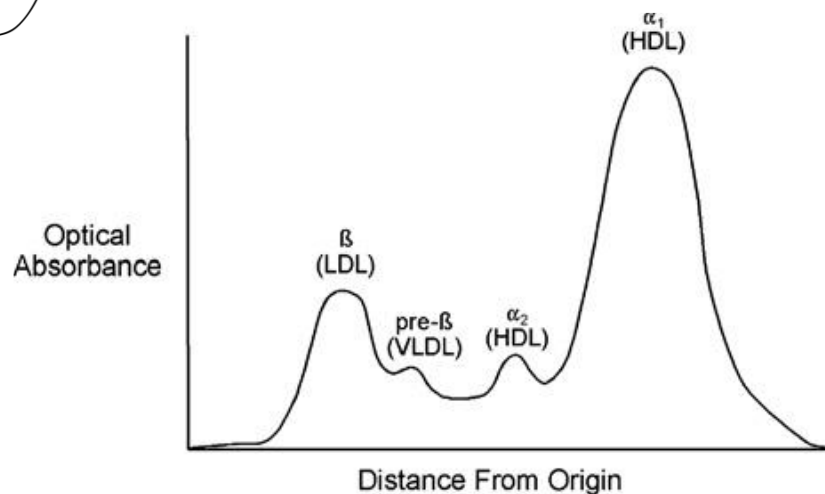
O método padrão-ouro para humanos é a Ultracentrifugação

Análise laboratorial das lipoproteínas

Outros métodos possíveis incluem a separação dos lipídeos por sua carga elétrica (eletroforese) ou por características físicas (cromatografia líquida de alta precisão).



pt.khanacademy.org



(KANEKO et al., 2009)

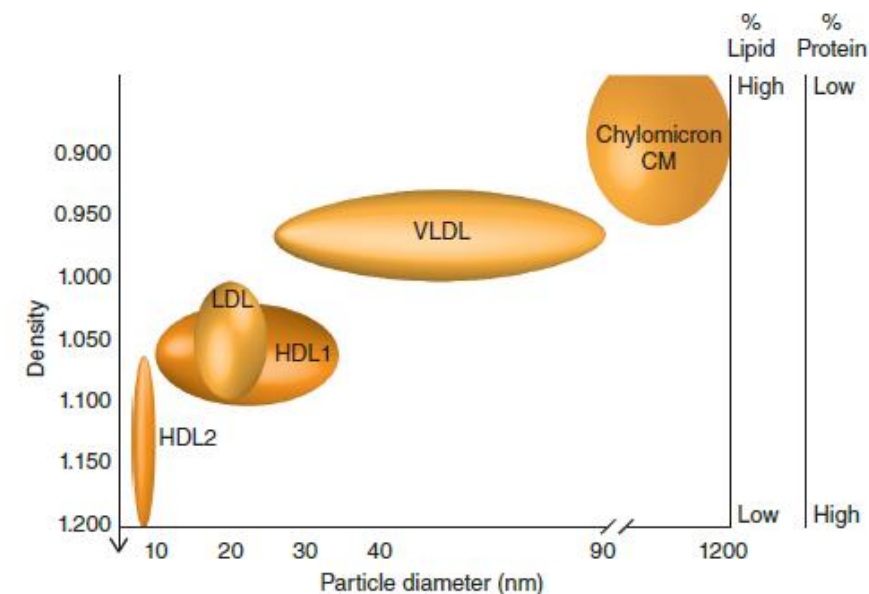


<https://www.gbptester.com>

Análise laboratorial das lipoproteínas

Os métodos citados são pouco viáveis no cenário comercial!!!

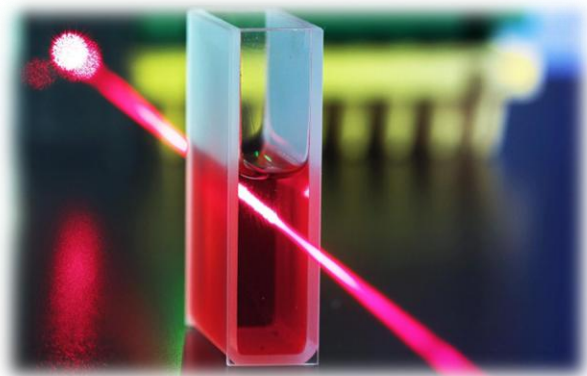
- Caros
- Demorados
- Trabalhosos
- Possível sobreposição de resultados em cães.



Ainda restritos a ambientes de pesquisa!

Análise laboratorial das lipoproteínas

Então o que é feito nos laboratórios?



Após a caracterização física das lipoproteínas, foram criados kits de bioquímica para a dosagem de HDL e LDL.

Nesse contexto, o kit para HDL foi amplamente validado...

...para uso humano.

Análise laboratorial das lipoproteínas

Como são feitos o VLDL e o LDL então?

O VLDL e o LDL são calculados por meio do **Método de Friedewald**:

$$\text{VLDL} = \text{Triglicerídeos} / 5$$

$$\text{LDL} = \text{Colesterol total} - \text{HDL} - \text{VLDL}$$

Análise laboratorial das lipoproteínas

Quais são os potenciais problemas?

1º: Os métodos de bioquímica não foram validados para espécies veterinárias:

Comparative Study > Vet Clin Pathol. 2016 Mar;45(1):124-34. doi: 10.1111/vcp.12318.

Epub 2016 Jan 12.

Comparison of 2 electrophoretic methods and a wet-chemistry method in the analysis of canine lipoproteins

Erica Behling-Kelly ¹

“Os métodos de química úmida para avaliação de lipoproteínas humanas podem não ser aplicáveis aos estudos de lipoproteínas caninas”

Análise laboratorial das lipoproteínas

Quais são os potenciais problemas?

2º: O cálculo é feito a partir de estimativas e está sujeito a muitos erros:

Exemplo: Em pacientes com > 400 mg/dL de triglicerídeos, frequentemente o LDL dá negativo.

$$\text{LDL} = \text{CT} (200) - \text{HDL} (150) - \text{VLDL} (400/5 = 80) = -30 \text{ mg/dL}$$

Para humanos, estima-se que em amostras acima de 150 mg/dL de triglicerídeos a metodologia de Friedewald está sujeita a erros!

Análise laboratorial das lipoproteínas

Apesar disso, não se esqueçam de um dado extremamente relevante:

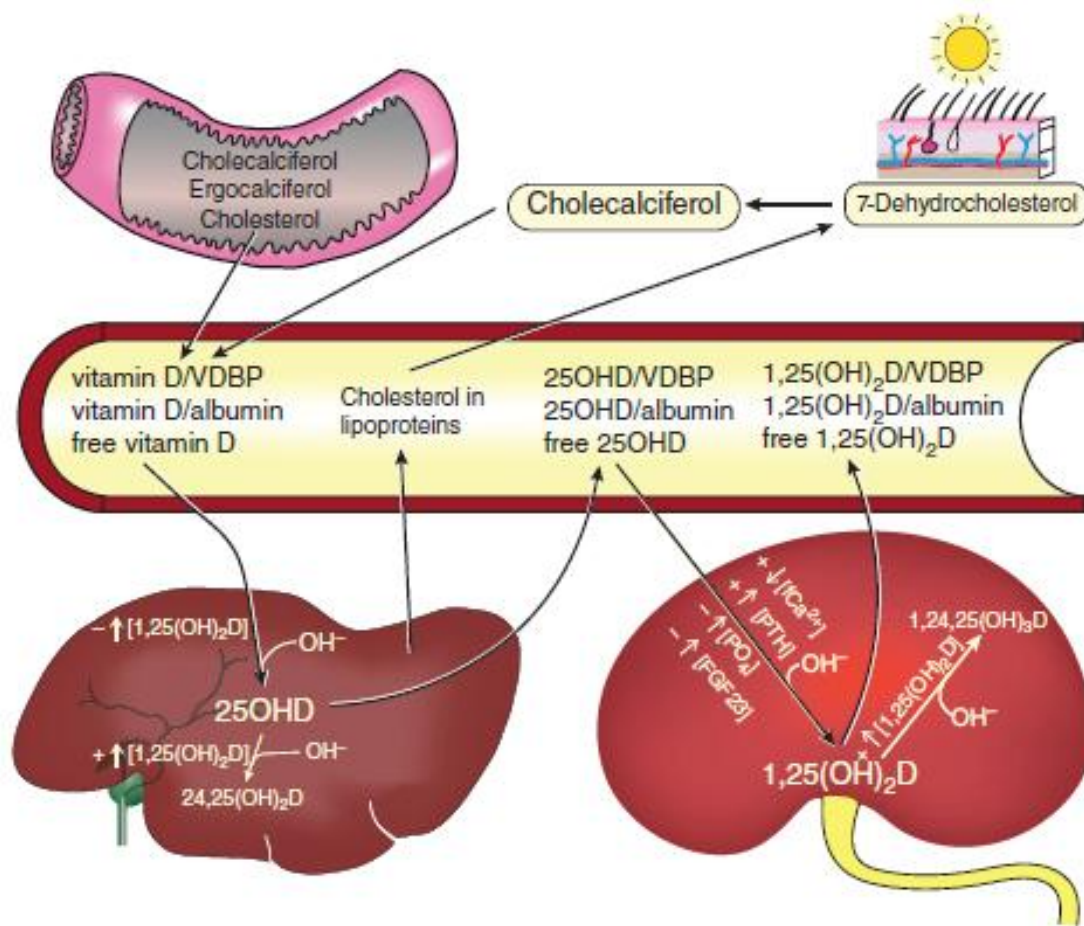
A real relevância das dosagens de lipoproteínas em veterinária ainda não é esclarecida!!!



Existem vários estudos correlacionando estados de doença com variação do perfil do lipidograma, porém:

1. Não se discute a relação entre causa / consequência;
2. Não se discute relevância prognóstica;
3. Não se discute necessidade de terapêutica.

Análise laboratorial da vitamina D



Primeiro ponto:

O metabolismo da vitamina D é complexo, com diversos metabólitos diferentes podendo ser identificados e detectados laboratorialmente.

Análise laboratorial da vitamina D

O metabólito de escolha para avaliação do estado da vitamina D é o **calcidiol (25OHD)**.

Apesar do calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) ser mais metabolicamente ativo:

- Sua quantidade é muito inferior;
- Sua meia-vida é mais curta;
- Sua quantidade sofre interferência de outros mecanismos reguladores no corpo, podendo ser contraditória com a avaliação do calcidiol.

Análise laboratorial da vitamina D

O ponto crítico a respeito da vitamina D é a **falta de padronização!**

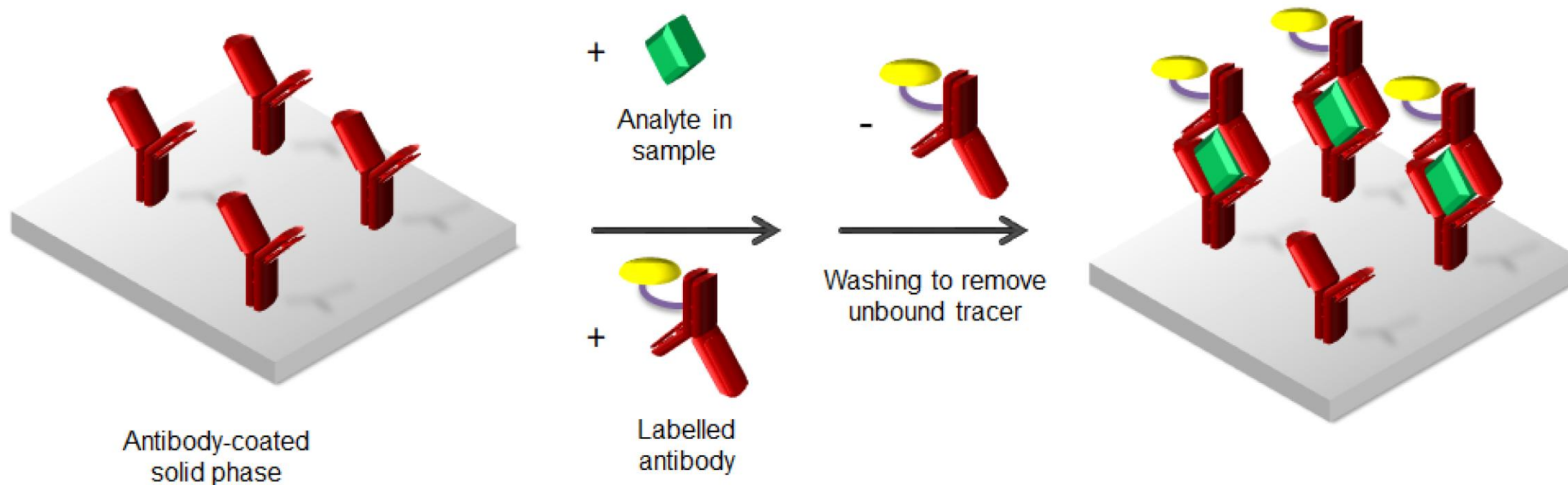
O método tradicionalmente considerado padrão-ouro é a **Cromatografia líquida acoplada à espectrofotometria de massas em tandem (LC-MS/MS)**



Também restrito a ambientes de pesquisa, sendo substituído por imunoenaios.

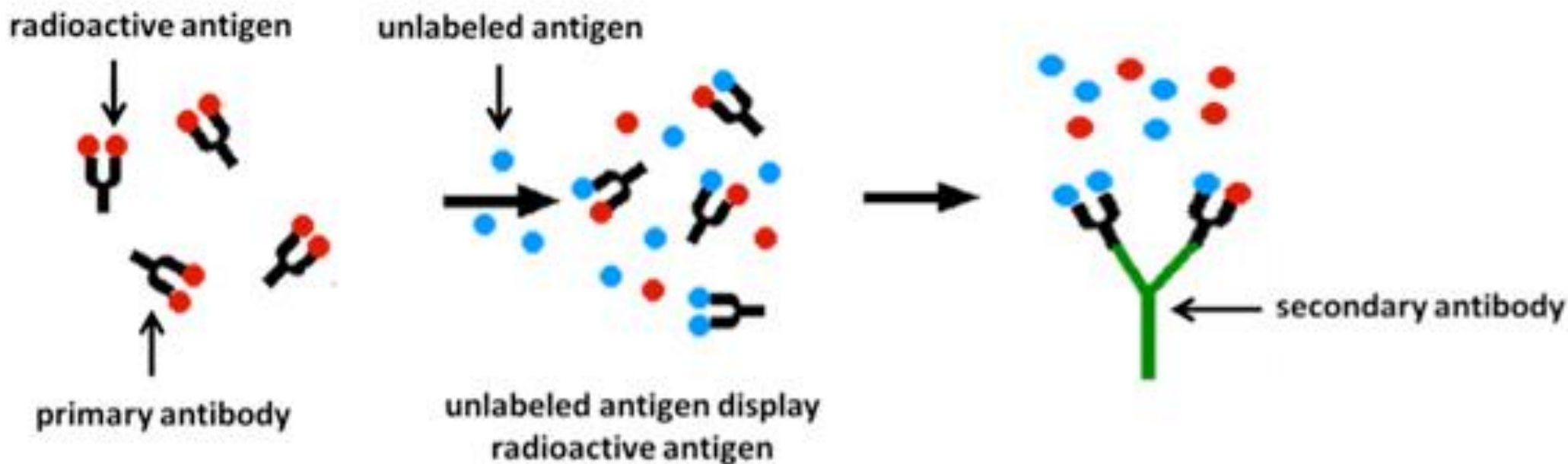
Análise laboratorial da vitamina D

Métodos mais disponíveis para a realidade comercial: **Quimioluminescência**



Análise laboratorial da vitamina D

Métodos mais disponíveis para a realidade comercial: **Radioimunoensaio**



Análise laboratorial da vitamina D

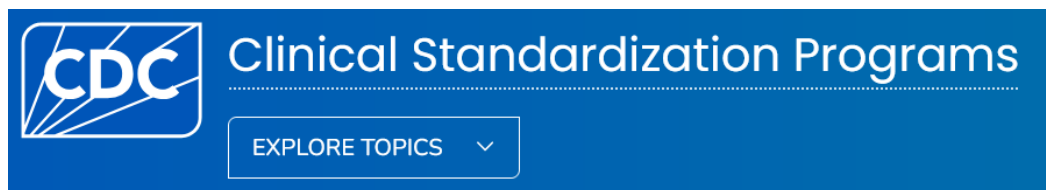
O que pode acontecer se os métodos não forem bem validados?



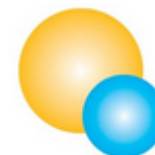
- Recomenda-se a coleta e separação do soro em até uma hora, para aumentar estabilidade dos analitos e evitar resultados falsamente diminuídos.
- A vitamina D precisa ser “extraída” das proteínas ligadoras. A extração incompleta leva a resultados falsos diminuídos, o que já foi detectado em estudos caninos.
- Porém, o principal problema associado aos imunoenaios é a **seletividade**, ou seja, a capacidade dos anticorpos em se ligarem exclusivamente ao metabólito-alvo!!!

Análise laboratorial da vitamina D

Com a maior demanda pela dosagem de vitamina D, precisamos buscar a padronização laboratorial como é feito em humanos.



DEQAS (Vitamin D External Quality Assessment Scheme)



Scheme Organiser: Dr Emma Walker

Endocrine Laboratory – Charing Cross Hospital – Fulham Palace Road – London W6 8RF – UK

Telephone: +44 (0)20 331 33645 – Email: administrator@deqas.org; deqasresults@nhs.net

Introduction

DEQAS was established in 1989. Its objective is to ensure the analytical reliability of 25 hydroxyvitamin D (25OHD) and 1,25 dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂D) assays.

A aplicação destes programas reduziu a variação interlaboratorial dos ensaios de vitamina D.

Vitamin D Standardization-Certification Program

Análise laboratorial da vitamina D

A falta de padronização também interfere na confiabilidade dos valores de referência!!!

Research article | [Open access](#) | Published: 15 September 2015

The effect of diet on serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in dogs

[Claire R. Sharp](#) , [Kim A. Selting](#) & [Randy Ringold](#)

[BMC Research Notes](#) **8**, Article number: 442 (2015) | [Cite this article](#)

10k Accesses | **30** Citations | **5** Altmetric | [Metrics](#)

“Suficiência foi determinada como 25(OH)D > 100 ng/mL, insuficiência como 25 a 100 ng/mL e deficiência como < 25 ng/mL”

Análise laboratorial da vitamina D

Porém, logo em seguida, no mesmo estudo:

Research article | [Open access](#) | Published: 15 September 2015

The effect of diet on serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in dogs

[Claire R. Sharp](#) , [Kim A. Selting](#) & [Randy Ringold](#)

[BMC Research Notes](#) **8**, Article number: 442 (2015) | [Cite this article](#)

10k Accesses | **30** Citations | **5** Altmetric | [Metrics](#)

“No coorte deste estudo, muitos cães aparentemente normais são considerados insuficientes e alguns são até deficientes”

Análise laboratorial da vitamina D

Sendo assim, será que é necessário suplementar apenas pelo resultado laboratorial???



A clínica é soberana!!!

O resultado deve ser interpretado em associação com outros achados laboratoriais, com a clínica e com a dieta para então serem tomadas decisões terapêuticas de forma correta.

Análise laboratorial da vitamina D

Um exemplo de responsabilidade com resultados laboratoriais:

“Se o paciente não estiver suplementado e apresentar nível de vitamina D abaixo de 200 ng/mL, com cálcio normal:

Manter a dieta atual, pois nenhuma mudança imediata é necessária.”

Conclusões



- De um modo geral, conheçam a metodologia que o seu laboratório e se foi feita a validação correta do teste.
- Quanto às lipoproteínas, ainda não há relevância clínica demonstrada por estudo científico que justifique o seu uso.
- Cuidado com a tomada de decisões terapêuticas baseadas exclusivamente em resultados laboratoriais.

Referências

1. **BEHLING-KELLY, E.** Comparison of 2 electrophoretic methods and a wet-chemistry method in the analysis of canine lipoproteins. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 45, n. 1, p. 132-140, 2016.
2. **BEHLING-KELLY, E.; WONG, C.** Agarose gel electrophoresis determination of bovine lipoproteins compared with a wet chemistry method. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 44, n. 3, p. 362-370, 2022.
3. **CHOI, K. et al.** A pilot study of the total cholesterol/high-density lipoprotein ratio as a prognostic indicator of hyperlipidemia-related diseases in dogs and cats. *Molecules*, v. 46, n. 11, p. 722, 2024.
4. **CLARKE, K. E.; HURST, E. A.; MELLANBY, R. J.** Vitamin D metabolism and disorders in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*, v. 62, n. 1, p. 1-13, 2021.
5. **MIZUTANI, H. et al.** Application of gel permeation HPLC for lipoprotein profiling in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 74, n. 5, p. 601-604, 2012.

Referências

6. **RIBEIRO, R. M. et al.** Comparison between the direct method and Friedewald's formula for the determination of low-density lipoprotein cholesterol serum levels in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 34, n. 3, p. 396-400, 2014.
7. **SELTING, K. A. et al.** Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in dogs – correlation with health and cancer risk. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 14, n. 3, p. 295-305, 2016.
8. **SHARP, C. R.; SELTING, K. A.; RINGOLD, R.** The effect of diet on serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in dogs. *BMC Research Notes*, v. 8, p. 442, 2015.
9. **STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A.** *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. 3. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2013.
10. **XENOULIS, P. G.; STEINER, J. M.** Canine hyperlipidaemia. *Journal of Small Animal Practice*, v. 51, n. 10, p. 521-532, 2010.
11. **XENOULIS, P. G. et al.** Novel lipoprotein density profiling in healthy dogs of various breeds, healthy Miniature Schnauzers, and Miniature Schnauzers with hyperlipidemia. *BMC Veterinary Research*, v. 9, p. 47, 2013.

Obrigado!!!

Prof. Dr. Victor Nowosh