

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TATIANA MARIA COSTA DE CAMPOS

**HOMOCISTEÍNA: VALIDAÇÃO DO MÉTODO E
AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS EM
PACIENTES PORTADORES DE HIPERTENSÃO
PULMONAR**

Belo Horizonte

2012

TATIANA MARIA COSTA DE CAMPOS

**HOMOCISTEÍNA: VALIDAÇÃO DO MÉTODO E
AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS EM
PACIENTES PORTADORES DE HIPERTENSÃO
PULMONAR**

Dissertação como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós - graduação de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho

Co-orientadora Profa. Dra. Josianne Nicácio Silveira

Belo Horizonte

2012

C198h Campos, Tatiana Maria Costa de.
Homocisteína: validação do método e avaliação dos níveis plasmáticos em pacientes portadores de hipertensão pulmonar / Tatiana Maria Costa de Campos. – 2012.

146 f. : il.

Orientadora: Maria das Graças Carvalho.
Co-Orientadora: Josianne Nicácio Silveira.

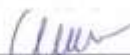
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Hipertensão pulmonar - Teses. 2. Homocisteína – Teses. 3. Lesão endotelial - Teses. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência - Teses. 5. Técnica espectrofotométrica enzimática cíclica – Teses. I. Carvalho, Maria das Graças. II. Silveira, Josianne Nicácio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:616.24

FOLHA DE APROVAÇÃO**TATIANA MARIA COSTA DE CAMPOS****"Homocisteína: validação do método e avaliação dos níveis plasmáticos em pacientes portadores de hipertensão pulmonar"**

Dissertação, como requisito parcial para obter o título de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em vinte e seis de novembro de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA_____
Profa. Dra. Edna Maria Alvarez Leite - UFMG_____
Prof. Dr. Lauro Mello Vieira - UFMG_____
Profa. Dra. Jostenne Nicácio Silveira - UFMG_____
Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho - UFMG

Instituições Participantes:

- Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG
- Centro de Especialidades Médicas da Santa Casa de Belo Horizonte
- Labtest Diagnóstica SA.

Apoio Financeiro:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Dedico este trabalho ao André pelos valores e sonhos compartilhados. Aos meus pais pelos incentivos constantes em minha vida. Aos meus sobrinhos que dão novo sentido na nossa família.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e pela iluminação em todos os momentos.

À profa. Maria das Graças pela oportunidade de aprender e compartilhar conhecimentos, pela leveza de enfrentar situações inusitadas.

À profa. Josianne Nicácio pelo exemplo de ética profissional, orientação técnica e metodológica e pelo empenho contínuo no desenvolvimento deste trabalho.

À médica pneumologista Junia Garib pela parceria e ensinamentos.

À Lara Godói e Guilherme Costa pela realização das análises de homocisteína na Labtest.

Às amigas Elisângela Apolônio e Claudinha Pedrosa pelo auxílio nas etapas de validação.

Ao professor Armando, coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, aos funcionários da Secretaria da Pós-graduação Eduardo e Silas, que sempre estiveram disponíveis para me auxiliar.

Ao bolsista de Iniciação Científica Marcos Vinícius Ferreira pela ajuda nos trabalhos experimentais.

À Flávia Komatsuzaki pela realização da análise estatística deste trabalho.

Aos amigos Leandro Vilhena e José Eduardo Bueno pelo apoio no trabalho e amizade.

À minha irmã Heleninha pela melhor amizade. À Tamara pelo companheirismo.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|-------------------------|---|
| 5 HT | Serotonina |
| 5,10 - metil THF | 5,10 metilenotetra-hidrofolato |
| 5- metil THF | 5 metilenotetra-hidrofolato |
| AdoMET | S adenosilmetionina |
| ADMA | Dimetil arginina |
| ALK-1 | <i>Activina receptor like kinase – 1</i> |
| ANP | Peptídeo Natriurético Atrial |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| B6 | Piridoxal fosfato |
| B12 | Cobalamina |
| BMPR2 | <i>Bone Morphogenetic Protein type 2 Receptor</i> |
| BMPs | <i>Bone Morphogenetic Protein</i> |
| BNP | Peptídeo Natriurético Cerebral |
| CAP | <i>College of American Pathologists</i> |
| CIA | Comunicação interatrial |
| CIV | Comunicação interventricular |
| CBS | Cistationina β – sintetase |
| CH3 | Grupo metal |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| Co-Smad | Proteína Smad papel Colaborador |
| CT | Cateterismo direito |
| CV | Coefficiente de Variação |
| CX3CL-1 | Fractalcina |
| CX3CR-1 | Receptor da fractalcina |
| DPOC | Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica |
| DPR | Desvio Padrão Relativo |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| ECE | Enzima Conversora de Endotelina |
| ECG | Eletrocardiograma |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetraacético |

| | |
|-----------------------------------|---|
| E-EC | Técnica Espectrofotométrica Enzimática Cíclica |
| EC | Enzimática Cíclica |
| EGF | Fator de Crescimento da Epiderme |
| e-NOS | Óxido Nítrico Sintase tipo endotelial |
| ET-1 | Endotelina 1 |
| ET-A | Receptor de Endotelina tipo A |
| ET-B | Receptor de Endotelina tipo B |
| ETE | Ecocardiograma Transesofágico |
| ETT | Ecocardiograma Transtorácico |
| FGF-2 | Fator de Crescimento Derivado dos Fibroblastos |
| FvW | Fator de von Willebrand |
| GMPc | Monofosfato Cíclico de Guanosina |
| h | Horas |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrogênio |
| HAP | Hipertensão Arterial Pulmonar |
| HAPI | Hipertensão Arterial Pulmonar Idiopática |
| HDL | Lipoproteína de alta densidade |
| HIF-1 | Fator Indutível pela Hipóxia tipo 1 |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| HP | Hipertensão Pulmonar |
| IL-1 | Interleucina 1 |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-8 | Interleucina 8 |
| IMC | Índice de Massa Corporal |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial |
| ISO | <i>International Organization for Standardization</i> |
| i-NOS | Óxido Nítrico Sintase tipo induzível |
| I-Smad | Proteína Smad papel Inibidor |
| Kv | Canais de potássio |
| LD | Limite de Detecção |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| LQ | Limite de Quantificação |

| | |
|---------------------------------|---|
| MAP quinase | <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> |
| MAT | Metionina- adenosiltransferase |
| MCP-1 | <i>Monocyte Chemoattractant Protein</i> |
| NADPH | Fosfato Dinucleótido Adenina Nicotinamida |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| MRC | Material de Referência Certificado |
| MTHFR | 5,10 metilenotetra-hidrofolato redutase |
| n | Número |
| NF- κB | <i>Factor nuclear kappa β</i> |
| NO | Óxido Nítrico |
| NOS | Óxido Nítrico Sintase |
| n- NOS | Óxido Nítrico Sintase tipo neuronal |
| NYHA | <i>New York Heart Association</i> |
| PAPm | Pressão média arterial pulmonar |
| PASMCs | Células musculares lisas da artéria pulmonar |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline system</i> |
| PDGF | Fator de crescimento derivado das plaquetas |
| PI | Padrão Interno |
| PPH | Hipertensão Pulmonar Primária |
| RANTES | <i>Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted</i> |
| r | Coeficiente de correlação |
| r² | Coeficiente de determinação |
| RNA | Ácido Ribonucléico |
| RNI | Relação Normatizada Internacional |
| R-Smad | Proteína Smad papel Regulador |
| Rx | Radiografia |
| SBD-F | <i>7-fluorobenzo-2,1,3-oxadiazole-4-sulfonic acid</i> |
| SPSS | <i>Software Statistical Package of the Social Sciences</i> |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TC6M | Teste de Caminhada de 6 minutos |
| TCEP | <i>Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride</i> |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |

| | |
|---------------------------------|--|
| TEP | Tromboembolismo pulmonary |
| TEV | Tromboembolismo venoso |
| TGF – β | Fator de transformação de crescimento beta |
| THF | Tetra-hidrofolato |
| TVP | Trombose Venosa Profunda |
| VCAM-1 | <i>Vascular Cell Adhesion Protein-1</i> |
| VD | Ventrículo Direito |
| VEGF | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> |
| λ_{em} | Comprimento de onda de emissão |
| λ_{ex} | Comprimento de onda de excitação |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1 - Características histológicas da hipertrofia medial..... | 31 |
| Figura 2 - Características histológicas da hiperplasia da íntima..... | 32 |
| Figura 3 - Esquema para diagnóstico da hipertensão pulmonar..... | 44 |
| Figura 4 - Via metabólica da homocisteína | 47 |
| Figura 5 - Ações da homocisteína implicadas na disfunção endotelial..... | 50 |
| Figura 6 - Delineamento experimental da precisão interensaio para o método de determinação da homocisteína plasmática..... | 69 |
| Figura 7 - Cromatograma obtido na análise de homocisteína, utilizando coluna Techesphere C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm), e fase móvel composta por tampão acetato, com fluxo de 1,1 mL/min..... | 79 |
| Figura 8 - Curvas analíticas aquosas e em matriz nas concentrações de homocisteína de 5,0 a 85,0 µmol/L..... | 81 |
| Figura 9 - Representação gráfica do estudo de efeito de matriz na determinação de homocisteína plasmática..... | 83 |
| Figura 10 - Gráfico de dispersão dos resultados de homocisteína plasmática obtidos por CLAE e pela técnica espectrofotométrica enzimática cíclica..... | 93 |
| Figura 11 - Gráfico de Bland-Altman para a avaliação dos resultados obtidos por CLAE e resultados obtidos pela técnica espectrofotométrica enzimática cíclica | 94 |
| Figura 12 - Níveis plasmáticos de homocisteína associados à idade em pacientes portadores de hipertensão pulmonar..... | 100 |
| Figura 13 - Níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de hipertensão arterial pulmonar idiopática e hipertensão pulmonar secundária a outras doenças expressos como mediana e intervalo interquartil (II)..... | 103 |
| Figura 14 - Níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes com HP associada ou não ao TEP crônico..... | 106 |

| | |
|--|-----|
| Figura 15 - Níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de HP <u>a</u> - em função da distância percorrida no TC6M; <u>b</u> - em função da classificação funcional da doença..... | 109 |
| Figura 16 - Níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de HP em função do IMC..... | 112 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Parâmetros analíticos na condição nominal e as variações propostas para a análise da robustez..... | 72 |
| Tabela 2 - Matriz de Youden para o experimento da robustez..... | 73 |
| Tabela 3 - Normalidade dos resíduos das curvas em matriz e aquosa na avaliação da linearidade da homocisteína..... | 81 |
| Tabela 4 - Avaliação do efeito de matriz para homocisteína..... | 82 |
| Tabela 5 - Precisão intra e interensaio obtidas na determinação da homocisteína plasmática em cinco níveis de concentração..... | 84 |
| Tabela 6 - Dados da precisão obtidos sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial para dois analistas..... | 85 |
| Tabela 7 - Recuperação obtida na determinação da homocisteína plasmática em cinco níveis de concentração..... | 85 |
| Tabela 8 - Concentrações de homocisteína ($\mu\text{mol/L}$) obtidas para as amostras do programa interlaboratorial CAP (<i>round march 2011</i>)..... | 86 |
| Tabela 9 - Resultados obtidos na avaliação da robustez..... | 88 |
| Tabela 10 - Resultados das diferenças entre as concentrações obtidas nas condições variadas em relação à condição nominal ($n=3$), na avaliação da robustez..... | 88 |
| Tabela 11 - Efeitos dos parâmetros analíticos em relação aos parâmetros nominais avaliados pelo teste de F e t, na avaliação da robustez..... | 89 |
| Tabela 12 - Perfil dos pacientes portadores de HP expressos em percentual em função do sexo, classificação clínica, classificação funcional, teste de caminhada de 6 minutos e o IMC..... | 98 |
| Tabela 13 - Níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de HP, por faixa etária, expressos como mediana e intervalo interquartil (II)..... | 99 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 14 - Níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de HAP idiopática e em pacientes portadores de HP associado a outras doenças, expressos como mediana e intervalo interquartil(II)..... | 102 |
| Tabela 15 - Níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de HP associado ao TEP crônico e nos demais pacientes do estudo, expressos como mediana e intervalo interquartil (II) | 105 |
| Tabela 16 - Níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de HP, distância percorrida no teste de caminhada de 6 minutos e a classificação funcional da doença expressos como mediana e intervalo interquartil (II)..... | 108 |
| Tabela 17 - Níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de HP em função do IMC expressos em mediana e intervalo interquartil (II)..... | 111 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 - Classificação clínica atualizada da hipertensão pulmonar (Dana Point, 2008)..... | 27 |
| Quadro 2 - Classificação Funcional da hipertensão pulmonar (<i>New York Heart Association</i> e modificada pela Organização Mundial de Saúde)..... | 29 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 19 |
| ABSTRACT..... | 20 |
| 1. INTRODUÇÃO | 21 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 25 |
| 2.1 Conceito da hipertensão pulmonar | 26 |
| 2.2 Classificação da hipertensão pulmonar | 26 |
| 2.2.1 Classificação clínica | 26 |
| 2.2.2 Classificação funcional | 28 |
| 2.3 Aspectos epidemiológicos da hipertensão pulmonar | 29 |
| 2.4 Aspectos histológicos da hipertensão pulmonar | 30 |
| 2.5 Mecanismos envolvidos na hipertensão pulmonar | 33 |
| 2.5.1 Fatores genéticos | 34 |
| 2.5.2 Fatores de crescimento | 36 |
| 2.5.3 Endotelina-1 | 36 |
| 2.5.4 Óxido nítrico | 38 |
| 2.5.5 Inflamação | 39 |
| 2.5.6 Prostaciclina e tromboxano A2 | 40 |
| 2.5.7 Serotonina e plaquetas..... | 40 |
| 2.5.8 Proliferação das células musculares lisas da artéria pulmonar | 41 |
| 2.6 Disfunção endotelial, indução da ativação da coagulação e trombose na hipertensão pulmonar | 41 |
| 2.7 Diagnóstico da hipertensão pulmonar | 42 |
| 2.8 Homocisteína e a hipertensão pulmonar | 44 |
| 2.8.1 Metabolismo da homocisteína | 47 |
| 2.8.2 Alterações patológicas provenientes da hiper-homocisteinemia .. | 49 |
| 2.8.3 Diagnóstico laboratorial da homocisteína | 52 |

| | |
|--|----|
| 2.9 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) | 53 |
| 2.10 Validação do método | 55 |
| 3. OBJETIVOS | 57 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 58 |
| 3.2 Objetivos específicos | 58 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 59 |
| 4.1 Materiais | 60 |
| 4.1.1 Padrões, substâncias químicas e controles..... | 60 |
| 4.1.2 Reagentes e vidrarias..... | 60 |
| 4.1.3 Equipamentos e acessórios..... | 61 |
| 4.2 Método para a determinação da homocisteína plasmática..... | 62 |
| 4.2.1 Preparo das soluções | 62 |
| 4.2.2 Otimização das condições cromatográficas | 63 |
| 4.2.3 Método de análise | 64 |
| 4.2.4 Teste de estabilidade da homocisteína derivatizada | 65 |
| 4.2.5 Validação do método | 65 |
| 4.2.5.1 Linearidade | 66 |
| 4.2.5.2 Efeito de matriz..... | 67 |
| 4.2.5.3 Precisão..... | 68 |
| 4.2.5.4 Exatidão..... | 69 |
| 4.2.5.5 Limites de detecção e quantificação..... | 71 |
| 4.2.5.6 Robustez | 72 |
| 4.2.6 Estudo comparativo | 74 |
| 4.2.7 Aspectos éticos..... | 74 |
| 4.2.8 Diagnóstico dos pacientes | 75 |
| 4.2.9 Casuística | 75 |
| 4.2.10 Coleta de sangue dos pacientes..... | 76 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.11 Análise Estatística | 76 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 77 |
| 5.1 Validação do método de homocisteína | 78 |
| 5.1.1 Condições cromatográficas | 78 |
| 5.1.2 Estabilidade da homocisteína derivatizada..... | 80 |
| 5.1.3 Linearidade..... | 80 |
| 5.1.4 Efeito de matriz..... | 82 |
| 5.1.5 Precisão..... | 83 |
| 5.1.6 Exatidão..... | 85 |
| 5.1.7 Limite de detecção e quantificação..... | 87 |
| 5.1.8 Robustez | 87 |
| 5.1.9 Considerações gerais sobre a validação | 90 |
| 5.2 Estudo comparativo dos níveis de homocisteína plasmática obtidos por CLAE e E-EC..... | 92 |
| 5.3 Características gerais dos pacientes com hipertensão pulmonar | 97 |
| 5.4 Níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de hipertensão pulmonar | 98 |
| 5.4.1 Níveis plasmáticos de homocisteína e a idade dos pacientes portadores de hipertensão pulmonar..... | 99 |
| 5.4.2 Níveis plasmáticos de homocisteína e a classificação clínica dos pacientes portadores de hipertensão pulmonar..... | 101 |
| 5.4.3 Níveis plasmáticos de homocisteína, classificação funcional da hipertensão pulmonar e teste de caminhada de 6 minutos, em pacientes portadores de hipertensão pulmonar..... | 107 |
| 5.4.4 Níveis plasmáticos de homocisteína e o índice de massa corporal (IMC) em pacientes portadores de hipertensão pulmonar..... | 111 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 114 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 116 |
| 8. ANEXOS | 138 |

| | |
|--|-----|
| ANEXO A – Aprovação do comitê de ética em pesquisa – Universidade Federal de Minas Gerais..... | 139 |
| ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido..... | 140 |
| ANEXO C – Ficha clínica..... | 141 |

RESUMO

A hipertensão pulmonar (HP) é uma doença grave que acomete as artérias pulmonares e evolui para uma disfunção ventricular direita. A HP pode estar associada a outras doenças ou pode ser deflagrada por uma causa desconhecida (idiopática). Os sintomas, como o cansaço e intolerância ao esforço, são inespecíficos, o que dificulta o diagnóstico. Todavia, o grau de sintomatologia clínica reflete o nível de progressão funcional da doença. O acometimento das artérias pulmonares é desencadeado por um remodelamento destas, sendo que a lesão ao endotélio possui características prognósticas relevantes. Desse modo, o acompanhamento do dano endotelial por meio de exames laboratoriais pode assumir grande importância. Dentro deste contexto, a determinação da homocisteína, tem sido relatada como um marcador de risco de interesse em doenças graves que cursam com lesões endoteliais. O objetivo do presente estudo foi avaliar os níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de hipertensão pulmonar e associar seus níveis a variáveis clínicas e epidemiológicas, tais como índice de massa corporal, idade, distância percorrida no teste de caminhada de 6 minutos e com a classificação clínica e funcional da doença. Para responder esse objetivo foi otimizado e validado um método analítico para a determinação plasmática de homocisteína por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cujos resultados foram comparados com aqueles obtidos pela técnica espectrofotométrica - enzimática cíclica (E-Ec). Este estudo avaliou um grupo de 37 pacientes portadores de HP, classificados clinicamente na forma idiopática (n=12) e HP secundária à: TEP crônico (n=12), esquistossomose (n=1), cardiopatia congênita (n=8), lúpus (n=1) e esclerodermia (n=3). O método validado por CLAE apresentou-se adequado para uso e a E-Ec mostrou-se comparável em relação ao método validado. Por meio da avaliação dos níveis plasmáticos da homocisteína pelos dois métodos, verificou-se que seus níveis se mostraram mais elevados com o avançar da idade dos pacientes, bem como em pacientes portadores de HP associado ao TEP crônico quando comparados aos demais pacientes do estudo. Não foi observado diferenças dos níveis de homocisteína em relação à forma idiopática da doença, à classificação funcional e ao IMC o que pode ser justificado pelos diferentes estilos de vida e ampla faixa etária dos pacientes.

Palavras-chave: hipertensão pulmonar, homocisteína, lesão endotelial, cromatografia líquida de alta eficiência, técnica espectrofotométrica enzimática cíclica

ABSTRACT

Pulmonary hypertension (PH) is a serious disease that affects the pulmonary arteries and evolves into a right ventricular dysfunction. PH may be associated with other diseases or may be triggered by an unknown cause (idiopathic). Symptoms such as fatigue and exercise intolerance, which are nonspecific, makes diagnosis difficult. However, the degree of clinical symptoms reflects the level of functional progression of the disease. The involvement of the pulmonary arteries is triggered by a remodeling of these, and the injury to the endothelium has important prognostic features. Thus, monitoring the endothelial damage by laboratory tests may assume great importance. Within this context, the determination of homocysteine, has been reported as a risk marker of interest in serious illnesses in which endothelial damage is associated. The aim of this study was to evaluate plasma levels of homocysteine in patients with pulmonary hypertension and to associate its levels to clinical and epidemiological variables such as body mass index, age, distance walked during the 6-minutes walking test and to clinical and functional disease. To meet this objective it was optimized and validated an analytical method for the determination of plasma homocysteine by high performance liquid chromatography (HPLC), and results were compared with those obtained by the spectrophotometric method- cyclicenzymatic (E-Ec). This study evaluated a group of 37 patients with PH, clinically classified as idiopathic (n = 12) and secondary to: chronic PTE (n = 12), schistosomiasis (n = 1), congenital heart disease (n = 8), lupus (n = 1) and scleroderma (n = 3). The validated HPLC method proved to be appropriate for use and Ec-E results proved to be comparable with those obtained by the validated method. Through measuring homocysteine by the two methods, it was found that its levels were more elevated in older patients and in patients with PH associated with chronic PTE compared to the other patients in the study. There was no difference in the levels of homocysteine in relation to idiopathic form of the disease, the functional classification and BMI which may be explained for different lifestyles and wide age range.

Key - words: pulmonary hypertension, homocysteine, endothelial injury, high performance liquid chromatography, spectrophotometric enzymatic cycling technique

1. INTRODUÇÃO

A homocisteína é um aminoácido sulfurado formado durante o metabolismo da metionina proveniente da dieta ou da degradação de proteínas endógenas (SACHDEV, 2004; GRAVINA- TADDEI et al., 2005 NETO et al., 2010). A hiper-homocisteinemia pode ocorrer devido a causas genéticas e/ou adquiridas. Os principais defeitos genéticos são decorrentes de mutações nas enzimas metilenotetraidrofolato-redutase ou cistationina β -sintetase, enquanto as causas adquiridas incluem deficiências de vitamina B6, vitamina B12 ou folato, idade avançada, hábito tabagista, insuficiência renal crônica e uso de antifólicos (ZAGO et al., 2004; ROSINI et al., 2006).

Estudos publicados a partir da década de 70 apontam para a hipótese de que o aumento dos níveis de homocisteína favorece a ocorrência de doenças vasculares oclusivas como o infarto agudo do miocárdio, trombose e doença aterosclerótica (MCCULLY, 1969, MALINOW, 1995; HARBOE-GONÇALVES et al., 2005; GUIMARÃES, A. C., 2006). Os mecanismos envolvendo a ação da hiper-homocisteinemia no desenvolvimento destas doenças não são ainda totalmente compreendidos. No entanto, a patogenia da lesão vascular que ocorre na presença de níveis plasmáticos elevados deste aminoácido inclui injúria à célula endotelial, crescimento da musculatura lisa vascular, maior adesividade plaquetária, aumento da oxidação do LDL-colesterol, com deposição na parede vascular, e ativação direta da cascata da coagulação (VANNUCCHI et al., 2009). Acredita-se que a hiper-homocisteinemia possa causar alterações no endotélio vascular, mediadas principalmente pelo efeito tóxico das formas oxidadas deste aminoácido (AMORIM et al., 2011a). Além disso, níveis plasmáticos elevados de homocisteína podem contribuir para uma redução da biodisponibilidade do óxido nítrico, resultando na diminuição das propriedades dilatadoras do vaso (OKADA et al., 1999).

Até o momento pouco se conhece sobre a influência da hiper-homocisteinemia na função celular. Entretanto, a avaliação dos níveis plasmáticos deste aminoácido, tem sido relatada como um biomarcador de dano endotelial relacionado ao aumento deste no sangue, em doenças graves que cursam com lesões endoteliais, como a hipertensão pulmonar (ARROLIGA et al., 2003).

A hipertensão pulmonar (HP) é caracterizada por pressão elevada nas artérias pulmonares podendo refletir em uma disfunção e falência ventricular direita (BICHARA et al., 2011). É uma doença rara acompanhada da perda das características morfológicas normais das artérias pulmonares. Fatores diversos podem causar ou deflagrar o aparecimento da HP, como associação ao HIV, esquistossomose, cardiopatia congênita, doenças do tecido conectivo, uso prolongado de anorexígenos entre outros. Entretanto, na grande maioria dos pacientes, a causa desta doença permanece desconhecida (SIMONNEAU et al., 2004).

Embora, atualmente, sejam conhecidos alguns mecanismos que justificam o aparecimento da mesma, ainda assim, esta doença é pouco entendida em suas bases fisiopatológicas, o que implica na busca de informações adicionais, principalmente em nosso meio, para melhor caracterização desta rara e grave enfermidade.

Alguns estudos envolvendo a avaliação plasmática dos níveis de homocisteína em pacientes portadores de HP, associada ou não a outras doenças, estão descritos na literatura (ZIGHETTI et al., 1997; ARROLIGA et al., 2003; OZEROL et al., 2004). Entretanto, conhecimentos obtidos em outras partes do mundo nem sempre refletem exatamente as condições locais, uma vez que variáveis genéticas e epidemiológicas podem interferir na manifestação da HP. Assim, uma melhor caracterização desta doença no que tange ao dano endotelial, aspecto tão relevante na expressão da HP, avaliado com base na determinação dos níveis plasmáticos de homocisteína, assume grande importância e vem preencher uma lacuna da literatura em nosso país.

À luz do conhecimento da importância da mensuração dos níveis de homocisteína na hipertensão pulmonar e em outras doenças, torna-se imprescindível o aperfeiçoamento de métodos bioanalíticos para quantificação desse aminoácido, bem como a implantação de tais métodos em serviços especializados. A técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é definida como padrão ouro para esta análise, entretanto, há, ainda, possibilidade de avaliação dos níveis de homocisteína por meio do uso de outras técnicas como a quimioluminescência, a espectrofotométrica -

enzimática cíclica, a fluorescência de luz polarizada, entre outras (NEVES et al., 2004; LA'ULU et al., 2008; GASCÓN et al., 2010).

Conforme descrito anteriormente, a hiper-homocisteinemia possui importante papel como agente lesivo à célula endotelial, com consequente implicação desta lesão no sistema hemostático favorecendo o estado de hipercoagulabilidade, bem como do possível agravamento desta rara e grave doença em função do aumento gradual deste aminoácido no sangue. Dessa forma, este estudo propõe responder algumas questões que foram levantadas visando uma melhor compreensão desta doença em nosso meio, a saber:

- Estão os níveis plasmáticos de homocisteína aumentados em relação à classificação funcional da doença?

- Os fatores como idade, tabagismo e IMC, contribuem para o aumento dos níveis de homocisteína, em pacientes portadores de HP?

- Os níveis plasmáticos de homocisteína são diferentes em pacientes com HAP idiopática quando comparados àqueles de pacientes com HP secundária a outra doença?

- Existe alguma técnica de análise, diferente do padrão ouro (CLAE), para a determinação da homocisteína plasmática que fornece resultados semelhantes para o acompanhamento clínico?

- Quais as principais vantagens e desvantagens dos métodos utilizados no presente estudo para análise deste aminoácido?

Espera-se que as respostas e considerações feitas ao longo deste estudo possam contribuir para uma melhor caracterização da HP em nosso meio, além de trazer inegáveis avanços no quesito referente à determinação deste aminoácido em laboratórios clínicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Conceito da hipertensão pulmonar

A hipertensão pulmonar (HP) é uma doença grave que se caracteriza pelo aumento da resistência vascular pulmonar levando à insuficiência ventricular direita. São várias as vias patogênicas que levam ao desenvolvimento da HP incluindo aspectos moleculares e genéticos, doenças cardíacas, pulmonares ou sistêmicas.

Os parâmetros hemodinâmicos medidos pelo cateterismo que determinam esta condição patológica se resumem em pressão média arterial pulmonar (PAPm) ≥ 25 mmHg em repouso ou ≥ 30 mmHg durante o exercício (KOVACS et al., 2009). A PAPm é considerada normal no intervalo entre 8 e 20 mmHg (GRIGNOLA, 2011).

Mais recentemente, alguns autores passaram a não considerar os valores de PAPm durante o exercício e, ainda, passaram a recomendar uma atenção especial aos pacientes com PAPm > 20 mmHg (BICHARA et al., 2011). Segundo estes autores, a HP pode ser estabelecida em pacientes com PAPm ≥ 25 mmHg e resistência pulmonar > 240 dinas.seg.cm⁻⁵ (3 Unidades Wood).

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) obedece os mesmos parâmetros hemodinâmicos da HP acrescentando a pressão de oclusão da artéria pulmonar inferior a 15 mmHg (GRIGNOLA, 2011).

2.2 Classificação da hipertensão pulmonar

Ao longo do tempo, à medida que novos conhecimentos sobre a HP iam sendo agregados, surgiu a necessidade de classificar esta rara doença segundo seus aspectos clínicos ou funcionais.

2.2.1 Classificação clínica

Em Dana Point no ano de 2008, Califórnia, Estados Unidos, ocorreu um encontro de especialistas em HP, durante o qual foi discutida a necessidade de

atualização de alguns aspectos do diagnóstico e tratamento dessa doença subsidiada por diversas publicações nessa área. Dessa forma uma nova classificação da HP foi descrita por estes especialistas, a qual está apresentada no Quadro 1 (HOETTE et al., 2010).

Quadro 1 - Classificação clínica atualizada da hipertensão pulmonar (Dana Point, 2008)

1. Hipertensão arterial pulmonar (HAP)

1.1. HAP Idiopática

1.2. HAP Hereditária

1.2.1. Relacionada à alteração no gene BMPR2

1.2.2. Relacionada à alteração no gene ALK-1 e endogлина (presença ou não de telangiectasia hemorrágica hereditária)

1.2.3. Desconhecido

1.3. HAP induzida por drogas ou toxinas

1.4. HAP associada a:

1.4.1. Doenças do tecido conectivo

1.4.2. Infecção pelo vírus da imunodeficiência humana

1.4.3. Hipertensão portal

1.4.4. Cardiopatias congênitas

1.4.5. Esquistossomose

1.4.6. Anemia hemolítica crônica

1.5. Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido

1.6. Doença veno-oclusiva pulmonar e/ou hemangiomatose capilar pulmonar

2. Hipertensão pulmonar por doenças do coração esquerdo

2.1. Disfunção sistólica

2.2. Disfunção diastólica

2.3. Doença valvar

3 Hipertensão pulmonar causada por doenças pulmonares e/ou hipoxemia

3.1. Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)

3.2. Doença pulmonar intersticial

- 3.3. Outras doenças pulmonares com padrão restritivo e obstrutivo misto
- 3.4. Distúrbios respiratórios do sono
- 3.5. Distúrbios com hipoventilação alveolar
- 3.6. Exposição crônica a altas altitudes
- 3.7. Anormalidades do desenvolvimento pulmonar

4. Tromboembolismo pulmonar crônico hipertensivo

5. Hipertensão pulmonar com mecanismos multifatoriais não esclarecidos

- 5.1. Desordens hematológicas: doenças mieloproliferativas e esplenectomia
- 5.2. Desordens sistêmicas: sarcoidose e histiocitose pulmonar de células de Langerhans
- 5.3. Desordens metabólicas: doença de armazenamento de glicogênio, doença de Gaucher e tireoidopatias
- 5.4. Outras: obstrução tumoral, mediastinite fibrosante e insuficiência renal crônica em diálise.

Antigamente a classificação da HP diferenciava entre duas categorias: primária e secundária. A partir do encontro em Dana Point, 2008, o termo primário, designado para aqueles pacientes cujo desencadeamento da doença acontecia de forma desconhecida, passou a ser denominado como hipertensão arterial pulmonar idiopática. Analogamente, a classificação secundária passou a englobar várias condições patológicas que promovem o aparecimento da HP. Os consensos das classificações permitiram um avanço nas investigações focadas na fisiopatologia da HP e, certamente, amplificaram o leque de informações sobre novas terapêuticas associadas a esta condição.

2.2.2 Classificação funcional

Com o objetivo de avaliar o comprometimento da doença instalada no paciente portador de HP, foram criados pela *New York Heart Association* (NYHA) e modificados pela Organização Mundial de Saúde, parâmetros que

definem uma classificação baseada na limitação em atividades rotineiras para fins prognósticos e caracterização inicial da doença (Quadro 2) (MCGOON et al., 2004).

Quadro 2 - Classificação Funcional da hipertensão pulmonar (*New York Heart Association* e modificada pela Organização Mundial de Saúde)

CLASSE I: pacientes com HP, mas sem limitação das atividades físicas. Atividades físicas habituais não causam dispnéia ou fadiga excessiva, dor torácica ou pré-síncope.

CLASSE II: pacientes com HP resultando em discreta limitação das atividades físicas. Esses pacientes estão confortáveis ao repouso, mas atividades físicas habituais causam dispnéia ou fadiga excessiva, dor torácica ou pré-síncope.

CLASSE III: pacientes com HP resultando em importante limitação das atividades físicas. Esses pacientes estão confortáveis ao repouso, mas esforços menores que as atividades físicas habituais causam dispnéia ou fadiga excessiva, dor torácica ou pré-síncope.

CLASSE IV: Pacientes com HP resultando em incapacidade para realizar qualquer atividade física sem sintomas. Esses pacientes manifestam sinais de falência ventricular direita. Dispnéia e/ou fadiga podem estar presentes ao repouso, e o desconforto aumenta em qualquer esforço.

2.3 Aspectos epidemiológicos da hipertensão pulmonar

Até o momento, não existem dados no Brasil referentes à prevalência da HP na população. No entanto, dados europeus e norte-americanos estimam 15 casos desta doença por milhão (LAPA et al., 2006).

A forma idiopática parece ser mais prevalente no sexo feminino do que no sexo masculino na razão de 1,7:1 sendo mais comum na terceira e quarta década de vida (GUIMARÃES, 2005).

Dados sobre pacientes que desenvolveram hipertensão portal secundária à esquistossomose indicam uma prevalência de HP em torno de 13% (GUIMARÃES, 2005) enquanto Lapa et al., 2006, reportaram que, embora

variável, até 30% dos pacientes com esquistossomose na forma hepatoesplênica podem desenvolver HP.

Machado et al., 2009, em um estudo multicêntrico na Bahia envolvendo 48 pacientes com HP, constataram que 19% dos casos eram secundários à cardiopatia congênita, 25% à esquistossomose, 10% a TEP crônico e 4% associados a outros fatores, enquanto 42% dos pacientes apresentaram a forma idiopática da doença. A expectativa de vida para pacientes portadores de HAP era considerada como inferior a 3 anos, entretanto, com o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento, tem-se observado avanços significativos no que se refere à sobrevida destes pacientes (HUMBERT et al., 2006).

2.4 Aspectos histológicos da hipertensão pulmonar

As alterações vasculares na hipertensão pulmonar envolvem vários mecanismos e o aspecto histológico específico apresenta implicações diagnósticas e prognósticas importantes.

Fisiologicamente, as artérias pulmonares apresentam túnica íntima provida de uma camada de células endoteliais e pequena quantidade de matriz extracelular. A lâmina elástica interna delimita o espaço entre a túnica íntima e a média além de exercer importante papel de comunicação entre as células musculares lisas contidas na túnica média e as células endoteliais contidas na íntima. Esta também permite o mecanismo de comunicação de substâncias entre as túnicas por um processo adaptativo. A túnica muscular apresenta-se bem desenvolvida com diâmetro maior nas artérias quando comparadas com as arteríolas. A lâmina elástica externa apresenta-se fenestrada e delimita o espaço entre a túnica média e a camada adventícia que, por sua vez, é constituída por tecido fibroso e colágeno (WAGENSEIL et al., 2009).

Na hipertensão pulmonar, ocorrem diversas lesões vasculares. É no ramo das artérias pré-acinares (Figura 1) que se inicia o remodelamento presente nesta doença, embora as alterações vasculares possam afetar a

totalidade da árvore arterial, desde as artérias pulmonares principais até as arteríolas.

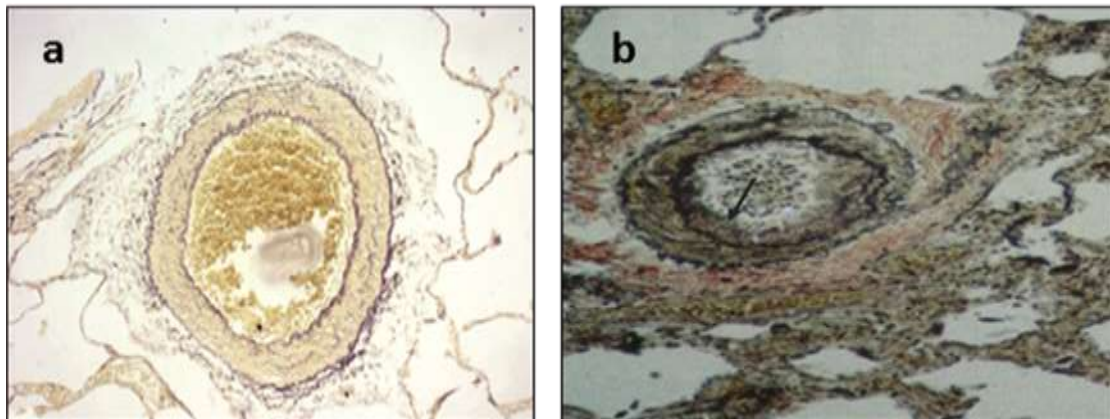


Figura 1 - Características histológicas da hipertrofia medial

a - Acentuada hipertrofia medial da artéria pré-acinar. Coloração elastina de Miller. Objetiva x 20 (AIELLO et al., 2009). **b** – Túnica média arterial característica de hipertensão pulmonar e obliteração do lúmen (seta). Coloração de Verhoeffs para fibras elásticas e contracorados com VanGieson. Objetiva: 100X (CHAZOVA et al., 1995)

As arteríolas e pequenas artérias são as mais afetadas com aumento na espessura muscular da túnica média ou hipertrofia medial, sendo a exposição crônica à hipóxia a principal causa da muscularização arterial pulmonar (DALEY et al., 2008).

A hipertrofia medial é acompanhada pela deposição de matriz e hipertrofia das células musculares lisas que corroboram para alterações hemodinâmicas e elevação da pressão arterial. Ocorre também na túnica média, o processo de desdiferenciação celular onde as células passam a ter a característica secretora e não contrátil, diferente da condição normal (GUIMARÃES, 2005). Além disso, o aumento das organelas responsáveis pela síntese protéica e substâncias promotoras de crescimento celular são observadas na desdiferenciação.

As alterações na túnica íntima (Figura 2), denominadas de fibrose na íntima ou hiperplasia da mesma, apresentam como característica principal o afluxo de células da túnica média a partir da lâmina elástica interna. Há também deposição de matriz extracelular e espessamento progressivo em concomitância com as alterações da túnica média.

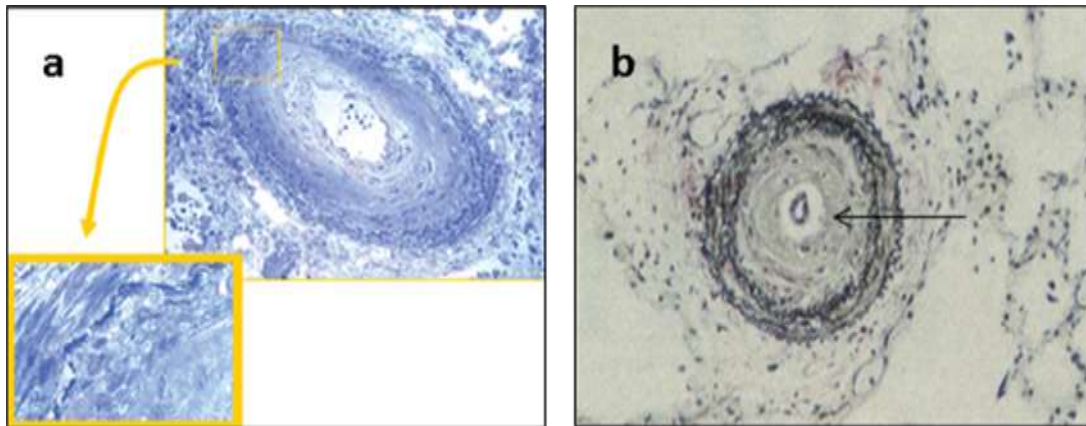


Figura 2 - Características histológicas da hiperplasia da íntima

a - Lesão proliferativa da túnica íntima de uma artéria pré-acinar. A parte aproximada demonstra a lâmina elástica interna interrompida. Coloração azul de metileno/Azur, objetivas 63x e 100x respectivamente (AIELLO et al., 2009). **b** - Espessamento da íntima com aumento relevante da camada média e obliteração do lúmen arterial. Coloração de Verhoeffs para fibras elásticas e contracorados com VanGieson. Objetiva: 100X (CHAZOVA et al., 1995)

Chazova et al., (1995) sugeriram que na camada adventícia, o remodelamento é caracterizado pela deposição de fibroblastos e colágeno. As alterações patológicas nas camadas média, íntima e adventícia, contribuem para o estreitamento do lúmen podendo ocorrer como desfecho a presença de trombos em organização ou recanalizados, o que favorece a formação de êmbolos pulmonares recorrentes (CHAZOVA et al., 1995; GUIMARÃES, 2005). Essas alterações estão presentes em todas as formas de hipertensão pulmonar, de modo especial, na idiopática (COTRAN et al., 2000).

Pode-se também observar lesões arteriais dilatadas que aparecem sob as formas plexiforme ou angiomatóide. A arteriopatia pulmonar plexogênica (plexiforme) é resultante de grandes alterações patológicas observadas principalmente na forma idiopática e na cardiopatia congênita com derivação esquerda-direita, se caracterizando pela formação de um tufo de capilares expandindo por toda artéria de paredes finas (TUDER et al., 1994; COTRAN et al., 2000).

Já o outro tipo de lesão, conhecida como angiomatóide, é representada por vasos de diferentes diâmetros que circundam a artéria pulmonar.

2.5 Mecanismos envolvidos na hipertensão pulmonar

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento desta doença têm sido descritos por vários autores como sendo mais provavelmente de etiologia multifatorial (FREDENBURGH et al., 2009).

O aparecimento da HAP no lúpus eritematoso sistêmico (LES) pode estar associado à presença de anticorpos antifosfolípidos e ao fenômeno de Raynaud. Os desfechos do LES contribuem para vasculite, vasorreatividade pulmonar e eventos trombóticos (GAVI et al., 1997; SOUZA, E. J. R. et al., 2003). Na esclerodermia outra doença auto-imune, o aparecimento da HAP se deve ao acometimento do pulmão na forma de hipertensão pulmonar isolada ou associada à fibrose.

A esquistossomose mansônica é uma das causas de HP a ser considerada em pacientes provenientes de áreas endêmicas. Admite-se que as lesões pulmonares sejam uma conseqüência da embolização de ovos dos vermes que vivem nas veias mesentéricas, provocando hipertensão portal. Ocluindo as artérias periféricas, esses ovos promovem uma reação granulomatosa local, característica da doença. Entretanto, a hipertensão portal, por si só, já constitui uma condição associada à HP como observado na cirrose de diversas etiologias, motivo pelo qual se deve especular se a oclusão vascular por embolia de ovos é um fator secundário na patogênese da HP que acompanha a esquistossomose (GUIMARÃES, 2005; CORREA et al., 2011).

Condições que provocam desvio (*shunt*) esquerdo-direito com hiperfluxo pulmonar, tais como comunicação interatrial (CIA), comunicação interventricular (CIV) e persistência no canal arterial são causas muito citadas da HAP associada às cardiopatias congênitas (MACHADO et al., 2009).

O surgimento da hipertensão pulmonar no grupo 4 da classificação clínica, que abrange pacientes com tromboembolismo pulmonar crônico, se dá pelo acúmulo de tromboembolos no sistema arterial pulmonar. Os mecanismos de aparecimento envolvem comprometimento da lâmina elástica, arteriopatia de pequenas artérias e arteríolas distais, lesões típicas da HAPI e também lesões plexiformes. Estes aspectos são originados pela obstrução dos

vasos por ação dos trombos que contribuem para progressão da hipertensão pulmonar (MCLAUGHLIN et al., 2009). O tromboembolismo pulmonar crônico hipertensivo é definido como um quadro de hipertensão pulmonar após um período mínimo de três meses depois de um episódio de embolia pulmonar, tendo sido excluídas outras formas de acometimento da hipertensão pulmonar (TERRA-FILHO et al., 2010a).

Na forma idiopática da HAP, o fenótipo é caracterizado por disfunção endotelial, uma relação coexistente entre a diminuição da apoptose e a proliferação de células musculares lisas, espessamento desordenado da camada adventícia e com ativação de metaloproteases. O surgimento da hipertensão pulmonar na forma idiopática é desconhecido e, por este motivo, esta classificação era comumente denominada de hipertensão pulmonar primária (MCLAUGHLIM et al., 2009).

Os fatores genéticos, anormalidades no sangue e endotélio, incluindo alterações na endotelina-1, óxido nítrico, substâncias vasoativas, prostaciclina, tromboxano A₂, serotonina, células musculares lisas da artéria pulmonar (PASMCs), além de processo inflamatório, são os fatores mais citados no desencadeamento da hipertensão arterial pulmonar.

2.5.1 Fatores genéticos

Os fatores genéticos têm sido estudados a fim de conhecer melhor o desencadeamento e agravamento desta doença. Modelos animais testados têm contribuído para elucidar aspectos genéticos, bem como para sugerir mecanismos no aparecimento da HAP.

As mutações no gene *bone morphogenetic protein type 2 receptor* (BMPR2) podem estar relacionadas aos pacientes portadores de HAP associada à história familiar e, esporadicamente, na forma idiopática da doença (DENG et al., 2000).

Estudos demonstram que pacientes portadores de HAP apresentam alteração no receptor tipo 2 do BMP (BRMP2), precisamente no gene que o codifica, localizado no cromossomo 2q33 (LANE et al., 2000). O BMPR2 é expresso no endotélio da circulação pulmonar normal e também pelos miofibroblastos

contidos na íntima de pacientes portadores de HP (ATKINSON et al., 2002), sendo receptor da superfamília do fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) (DENG et al., 2000). Essa superfamília pode ser dividida em duas grandes classes de ligantes: BMPs e TGF- β s. Com relação à *Bone morphogenetic protein* (BMP), esta é considerada a maior citocina da superfamília TGF- β e está envolvida na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose celular (WANG et al., 2009). O BMPR2 possui a capacidade de se ligar a esta e outras citocinas da superfamília TGF- β exercendo a função de sinalização dentro da célula por meio de proteínas específicas conhecidas como Smad (BARRETO et al., 2005). Estas proteínas são divididas em três classes: R-Smad (papel regulador), Co-Smad (colaborador) e I-Smad (papel inibidor).

A sinalização inicia com a ativação de R-Smad 1/5 que se une a Co-Smad 4, translocando-se para o núcleo e dando início à regulação do alvo genético. R-Smad 2/3 é um importante mediador que antagoniza a resposta de R-Smad 1/5 e também pode levar à proliferação anormal pela estimulação de TGF- β (WANG et al., 2009).

Sugere-se que mutações no BMPR2 causam deficiência na sinalização podendo desencadear os mecanismos de proliferação celular da circulação pulmonar (BARRETO et al., 2005). A falha na sinalização do BMP reflete em um aumento de R-Smad 2/3 pela estimulação da superfamília TGF- β e também pela inibição de R-Smad 1/5, gerando o quadro de remodelamento vascular presente nos pacientes portadores de HAP. É também importante ressaltar que estudos relacionados à alteração deste receptor mostram que a expressão de BMPR2 pode estar reduzida na circulação pulmonar em pacientes portadores de HAP Idiopática, e até mesmo em indivíduos que não sofreram mutação neste receptor (ATKINSON et al., 2002).

Outra alteração genética relacionada a HAP é a mutação nos genes que codificam os receptores *activina-receptor like Kinase-1* (ALK-1) e endoglin, ambos também expressos por receptores da super-família TGF- β . Esta alteração causa o quadro de telangiectasia hemorrágica hereditária que, posteriormente, pode desencadear a hipertensão pulmonar (PROVIDÊNCIA et al., 2010).

2.5.2 Fatores de crescimento

Além da superfamília TGF- β envolvida na proliferação celular, outros fatores também contribuem para o crescimento e remodelamento celular.

Assim o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) é expresso pelas células endoteliais nesta doença. Embora seu papel protetor seja evidenciado, a superexpressão favorece à hipercoagulação, compromete a íntima pela presença de aglomerados de células endoteliais promovendo o crescimento endotelial e até o surgimento de lesões plexiformes (BUDHIRAJA et al., 2004).

O Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (PDGF) estimula a produção de Interleucina 1 (IL-1) favorecendo o quadro de inflamação. Níveis aumentados de PDGF foram evidenciados em pacientes com HAPI e secundária à HIV (GUIMARÃES, 2005).

Outros fatores como o Fator de Crescimento derivado dos Fibroblastos (FGF-2) e o Fator de Crescimento da Epiderme (EGF) também estão envolvidos na gênese da HP (BARRETO et al., 2005).

2.5.3 Endotelina-1

A endotelina-1 (ET-1) é um potente peptídeo vasoconstritor pertencente à família endotelina composta também por endotelina-2 e endotelina-3. Estes peptídeos são produzidos por várias células e tecidos e, em especial, pelas células endoteliais (SCHNEIDER et al., 2007).

A endotelina é investigada na patogênese de algumas doenças com maior ênfase naquelas em que a vasoconstrição e a proliferação celular estão envolvidas (LÜSHER et al., 2000). Estão também presentes em processos patológicos onde as deposições de matriz e colágeno ocorrem de forma desregulada.

A produção de ET-1 acontece por meio de uma reação proteolítica dos dois precursores: prepro ET-1 e big-ET-1. A prepro ET-1 é clivada por endopeptidases neutras dependentes de cálcio fornecendo o composto

biologicamente inativo, big-ET-1. Este, por sua vez, é clivado por metaloproteases, também conhecidas como enzima conversora de endotelina (ECE), gerando a ET-1 (RUSSEL et al., 2000; SCHNEIDER et al., 2007; MOURA, 2008).

A endotelina-1 possui a característica autócrina e parácrina agindo sob os seus receptores (ET-A e ET-B) e é liberada na luz dos vasos a partir do endotélio. Pequena quantidade de endotelina-1 é encontrada no plasma de pacientes normais, representando aquela fração de ET-1 que não se liga aos seus receptores. Concentrações picomolares de ET-1 no plasma são capazes de atingir seu efeito fisiológico (CODY et al., 1992, MOURA, 2008).

No pulmão, ambos os receptores (ET-A e ET-B), participam da proliferação de células musculares lisas em resposta à ET-1. Os receptores ET-A induzem vasoconstrição pelo aumento do influxo celular de cálcio, enquanto o ET-B encontrado nas células endoteliais possibilita a liberação de prostaciclina e óxido nítrico. Entretanto, quando expressos (ET-B) pelas células musculares lisas, o efeito é de hiperplasia e vasoconstrição. Na HP, observa-se o efeito predominante, ou seja, aquele mediado pelas células musculares lisas (RAMZY et al., 2007; SCHNEIDER et al., 2007).

Schneider et al. (2007) mostraram que em modelos animais portadores de HAP induzidos pela hipóxia, a ativação dos receptores ET-A e também ET-B contribuem para resposta proliferativa das células musculares lisas. Esta resposta vem acompanhada da diminuição da atividade da óxido nítrico sintase e guanilato ciclase, intensificando a resistência pulmonar dos animais em estudo (SCHNEIDER et al., 2007).

São diversas as ações provenientes da liberação desregulada da endotelina-1 sendo relevante seu papel no remodelamento das artérias de baixa resistência devido a sua ação estimuladora na atividade do gene do colágeno I, na deposição de proteínas na matriz extracelular, na expressão da fibronectina, e na estimulação de TGF- β e de PDGF (ROSSI et al., 2006).

A atividade pró-inflamatória da ET-1 também é muito citada (ROSSI et al., 2006). Este fato pode despertar grande interesse na investigação da atividade pró-inflamatória da ET-1 na hipertensão pulmonar.

2.5.4 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir da L-arginina por uma família de enzimas, óxido nítrico sintases (NOS). A reação catalisada por essa família de enzimas [subdivididas em: tipo I ou neuronal (nNOS), tipo II ou induzível (iNOS) e tipo III ou endotelial (eNOS)] converte a L-arginina em L-citrulina e NO utilizando como substratos, o oxigênio e o fosfato dinucleotídeo adenina nicotinamida (NADPH). Um importante mecanismo de ação no qual o NO está envolvido consiste na ativação da guanilato ciclase que leva a um aumento do GMPc intracelular (FLORA-FILHO & ZILBERSTEIN et al., 2000).

O NO está envolvido em vários processos fisiológicos essenciais, incluindo neurotransmissão central e periférica, vasodilatação, broncodilatação, atividade citotóxica do sistema imune, e inibição da adesão e agregação plaquetárias (FLORA-FILHO & ZILBERSTEIN et al., 2000; BRUNINI et al., 2006). O seu tempo de ação é muito curto, pois é rapidamente degradado por enzimas chamadas fosfodiesterases. Entretanto, fármacos que inibem as enzimas fosfodiesterases levam a um aumento da disponibilidade do GMPc, dessa forma, potencializando os efeitos do NO (FUENTE et al., 2001).

Na hipertensão pulmonar a disponibilidade de NO está diminuída (BARRETO, 2011). As hipóteses da diminuição de NO incluem a diminuição da atividade da eNOS, aumento da atividade da arginase II que compete com a NOS pelo substrato L-Arginina, diminuição da L-arginina e aumento da dimetil arginina (ADMA) que inibe diretamente a produção de NO (BRUNINI et al., 2006; SKORO-SAJER et al., 2007).

A disfunção endotelial presente na HP pode estar associada a causas multifatoriais que se complementam agravando o remodelamento. A diminuição de NO, o aumento de ET-1 e tromboxano A₂, interação da parede vascular com as plaquetas e a presença de células inflamatórias são frequentemente citados como agentes ativos na evolução da doença.

2.5.5 Inflamação

O processo inflamatório tem sido associado a pacientes portadores de Hipertensão Arterial Pulmonar Idiopática (HAPI), HAP associada a doenças do tecido conjuntivo e infecção ao HIV (ISERN et al., 1992 ; NICOLLS , et al., 2005; HAUSSON, 2010).

Os anticorpos antinucleares podem estar circulantes em pacientes com HAP (ISERN et al., 1992). Os níveis das citocinas pró-inflamatórias em especial interleucina - 6 (IL-6) e IL-1 podem estar aumentados e a expressão do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) também acompanha o processo inflamatório (EDDAHIBI et al., 2002) nesta doença.

Outra evidência que agrava a inflamação pulmonar é a expressão de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ devido à ligação da fractalcina (CX3CL1), quimiocina produzida pelas células endoteliais, a seu receptor (CX3CR1). O padrão de migração das populações celulares e, em particular, dos leucócitos está intimamente relacionado com a expressão do receptor citado (GUERREIRO et al., 2011).

As CX3CL1 produzem ação quimiotática e sua fração livre pode estar aumentada no plasma de pacientes portadores de HAP quando comparados a controles (HASSOUN et al., 2010).

A quimiocina RANTES (*“Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted”*; CCL5) é citada no recrutamento de monócitos e linfócitos T e pode estar ligada também na indução da enzima conversora de ET-1 agravando o quadro de vasoconstrição na HP. A quimiocina MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein*) recruta células mononucleares para o sítio inflamatório e está envolvida no processo de desdiferenciação das células musculares lisas (BARRETO et al., 2005).

Eddahibi et al., (2002) sugeriram que os processos inflamatórios envolvendo as quimiocinas, citocinas e o fator de crescimento citado podem alterar a reatividade da parede vascular contribuindo para a remodelação e trombose *in situ* em pacientes portadores de HAP.

2.5.6 Prostaciclina e tromboxano A2

A prostaciclina, metabólito do ácido araquidônico, é um potente vasodilatador proveniente do endotélio, que exerce ação nas células musculares lisas. Esta promove inibição da adesão plaquetária e inibe o efeito da endotelina-1. Por outro lado, o tromboxano A2, também um derivado do ácido araquidônico, possui atividade antagônica exercendo papel vasoconstritor e ativador da agregação plaquetária (BATLOUNI, 2001; BARRETO et al., 2005).

Fisiologicamente, a produção de prostaciclina e tromboxano A2 deve-se manter em equilíbrio. Na doença estudada, percebe-se uma diminuição da síntese de prostaciclina e aumento de tromboxano A2 favorecendo a trombose, proliferação e vasoconstrição (CHISTMAN et al., 1992 ; TUDER et al., 1999; McLAUGHLIN et al., 2009).

2.5.7 Serotonina e plaquetas

A serotonina (5-HT) é produzida a partir do triptofano pelas células do trato gastrointestinal e neuroepiteliais pulmonares, e são estocadas nas plaquetas (CROTI, et al., 2008).

O uso de anorexígenos e o posterior desenvolvimento de HAP têm coincidido com a diminuição de 5-HT plaquetária e aumento dos níveis séricos de 5-HT. Estes dados contribuíram de forma marcante para o estudo aprofundado deste aminoácido na HAP idiopática (BARRETO et al., 2005).

O papel da serotonina na gênese da HAP justifica-se pela ativação plaquetária como evento principal. Uma vez ativada, as plaquetas liberam grânulos de serotonina e de outros fatores que estimulam o efeito mitogênico nas células musculares lisas, fibroblastos e células endoteliais (CROTI et al., 2008; McLAUGHLIN et al., 2009).

Vários são os estudos que sugerem a importância da serotonina na HAP idiopática. A contribuição principal deste aminoácido seria a vasoconstrição, bem como a formação de espécies reativas de oxigênio e ativação da via

envolvendo as *Mitogen Activated Protein Kinases* (MAP quinases) que contribuem para o desfecho da hipertrofia e proliferação celular (EDDAHABBI et al. 2001; MARCOS, et al., 2003; BARRETO, et al., 2005; CROTI et al., 2008).

2.5.8 Proliferação das células musculares lisas da artéria pulmonar

Muitos eventos já citados promovem a vasoconstrição. Porém, outro aspecto ainda não abordado consiste no aumento de cálcio nas células musculares lisas vasculares da artéria pulmonar (PASMCs). O mecanismo inicial envolvido na vasoconstrição destas células seria a inibição dos canais de potássio (Kv) seguido de despolarização da membrana e entrada de cálcio nas células através de canais do tipo L. Este evento é desencadeado pela hipoxemia aguda e crônica e pode ser considerado complementar aos demais efeitos promotores da vasoconstrição na HP (MCLAUGHLIM et al., 2009).

Em especial, a hipóxia crônica leva à ativação do fator indutível pela hipóxia-1 (HIF-1), presente nas PASMCs. Este tem a propriedade de estimular o aumento dos adrenoreceptores alfa-1 (“*up regulation*”) e de induzir a transcrição de vários genes com aumento do VEGF ET-1 e PDGF (GUILLEMIN et al., 1997). McGlauglim et al., (2009) sugeriram que na HAP, as PASMCs apresentam diversas anormalidades que contribuem para a diminuição da razão existente entre apoptose/proliferação celular.

2.6 Disfunção endotelial, indução da ativação da coagulação e trombose na hipertensão pulmonar

O endotélio representa um papel fundamental na hemostasia da coagulação. Uma vez lesado, há produção de substâncias com características trombóticas presentes nas várias formas de HP.

A trombomodulina, um importante proteoglicano que se liga à trombina, ativa a proteína C e degrada os fatores V e VIII da coagulação, estando seus níveis plasmáticos diminuídos nos pacientes com HP.

A atividade da P-selectina produzida pelas plaquetas e células endoteliais está aumentada nos pacientes favorecendo a hipercoagulação (HERESI et al., 2010).

O fator de Von Willebrand (fvW) produzido nos megacariócitos e endotélio podem ser armazenados nos corpúsculos de Weibel-Palade. Na condição patológica, há rápida secreção de fvW e liberação dos depósitos que juntamente com a liberação de P-selectina favorecem a alteração da hemostasia (LOPES, A. A. B. et al., 1998).

O fvW têm sido associado a HP causada por hipoxemia (grupo 3 da classificação clínica). A hipóxia é considerada um estímulo na liberação de fvW pelos corpúsculos de Weibel-Palade.

Estudos relacionados aos níveis aumentados de fvW têm sido associados a uma menor sobrevida dos pacientes portadores de HP idiopática e associada a outras doenças (BARRETO et al., 2005; BUDHIRAJA et al., 2004).

Os anticorpos antifosfolípide estão associados a HAP secundária ao Lupus eritematoso por mecanismos ainda desconhecidos (KAMEL et al., 2011). Este anticorpo pode estar diretamente ligado na formação de trombos. Espinosa et al. (2002), sugerem que o tromboembolismo pulmonar nesta síndrome seja a principal causa da HAP.

A homocisteína, aminoácido cujo aumento no sangue favorece a adesão celular e coagulação, tem sido implicada na agregação plaquetária e disfunção endotelial. Seu papel pode estar relacionado à gênese da doença por alterar a hemostasia (ARROLIGA et al., 2003).

2.7 Diagnóstico da hipertensão pulmonar

O diagnóstico da HP representa um desafio aos clínicos pela complexidade da doença. Os sinais e sintomas são comuns a outras patologias tornando o diagnóstico muitas vezes tardio para o paciente.

O diagnóstico clínico deve ser minuciosamente investigado. Sintomas como intolerância ao esforço, fadiga, ortopnéia, dispnéia paroxística noturna, palpitações, síncope, pré síncope e hemoptise são queixas freqüentes dos pacientes.

A classificação funcional é avaliada com base no relato do paciente e na observação do clínico em relação às limitações físicas, dispnéia, síncope, pré-síncope, fadiga e dor torácica durante o exercício e o repouso. Trata-se de uma avaliação qualitativa que visa enquadrar o paciente em grupos de acordo com a progressão da hipertensão pulmonar (MCGOON et al., 2004).

Para avaliação do exame físico o Teste de Caminhada de 6 Minutos (TC6M) é utilizado como uma medida da capacidade ao exercício nos pacientes, sendo importante na caracterização do seu comportamento físico diante de atividades rotineiras (BARRETO, S. S. M., 2009; SOARES et al., 2011). Este teste é muito útil na determinação da tolerância ao exercício e da saturação de oxigênio durante um exercício submáximo (MORALES-BLANHIR et al., 2011). O TC6M pode estar relacionado à classificação da doença, sendo a distância percorrida inversamente proporcional à gravidade da doença definida de forma qualitativa pela *New York Heart Association* (NYHA).

Para a classificação clínica, vários exames laboratoriais são úteis na investigação da doença, entretanto, o método mais eficiente na caracterização é o cateterismo direito que juntamente com outros métodos diagnósticos permitem descartar patologias que não estejam ligadas à HP (BICHARA et al., 2011).

Guimarães, (2005) descreveu um algoritmo investigativo (Figura 3) sobre as possíveis formas de aparecimento de HP bem como os exames auxiliares utilizados na elucidação da doença.

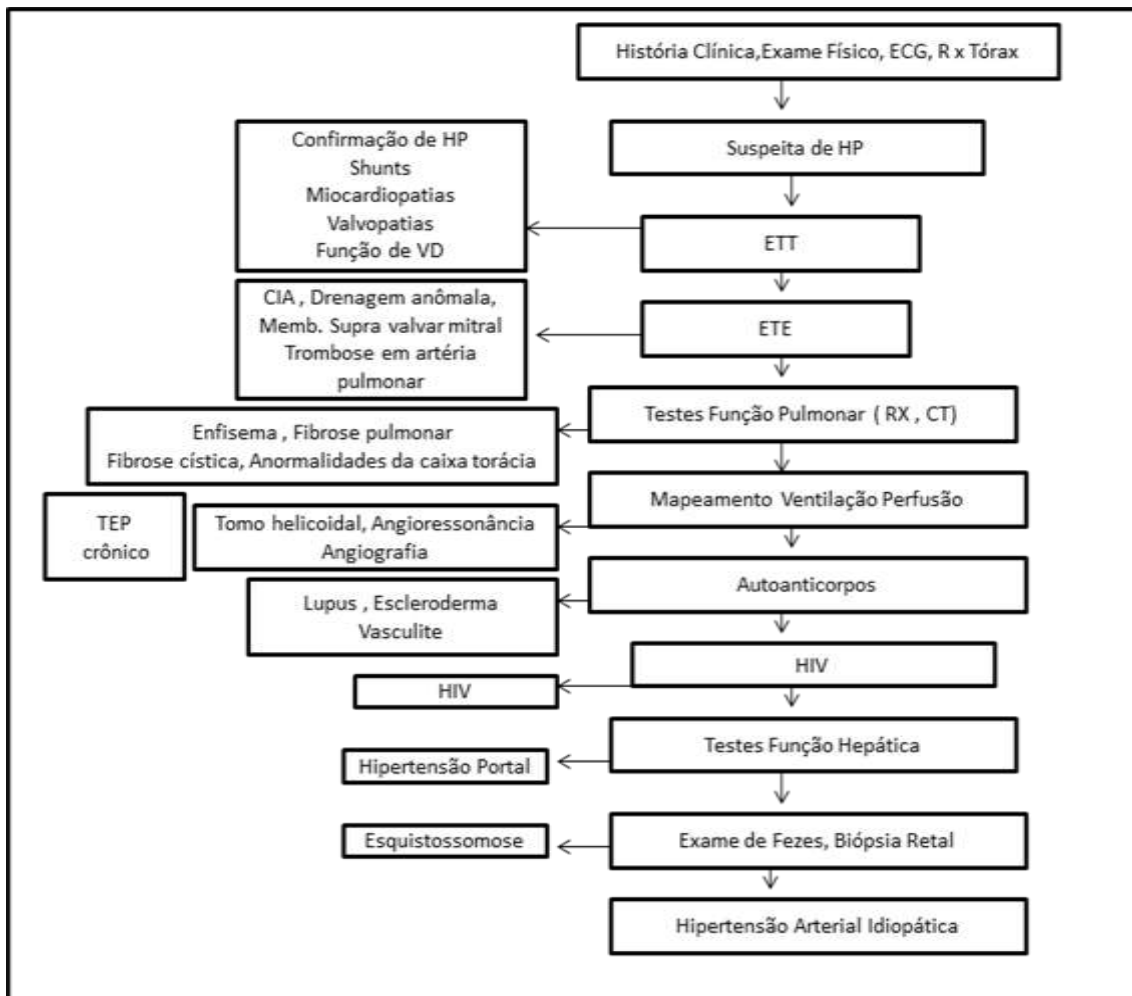


Figura 3 - Esquema para diagnóstico da hipertensão pulmonar

Abreviaturas: ECG: eletrocardiograma; Rx: radiografia; HP: hipertensão pulmonar; ETT: ecocardiograma transtorácico; ETE: ecocardiograma transesofágico; CT: cateterismo direito; VD: ventrículo direito; CIA: comunicação intra-atrial; TEP: tromboembolismo pulmonar; HIV: vírus da imunodeficiência humana. Adaptado de Guimarães, 2005

2.8 Homocisteína e a hipertensão pulmonar

Em concomitância com as variáveis funcionais, esforços têm sido feitos na caracterização de marcadores biológicos, e sua importância prognóstica na HP. (HERESI et al., 2010).

Significativos avanços têm ocorrido na compreensão da HP e um arsenal de agentes terapêuticos têm sido testados tornando a doença de um ponto de vista clínico mais controlada (HOETTE et al., 2010; BICHARA et al., 2011).

Um crescente número de biomarcadores tem sido descritos na hipertensão pulmonar podendo auxiliar no diagnóstico e no acompanhamento da progressão desta doença. Tais marcadores possuem a capacidade de avaliar a disfunção endotelial, plaquetária, insuficiência cardíaca, *stress* oxidativo e lesão dos cardiomiócitos (HOEPER et al., 2004; BARRETO et al., 2005).

As lesões dos cardiomiócitos são acompanhadas pelos marcadores peptídeos natriuréticos atrial (ANP), cerebral (BNP) e o fragmento N- terminal de BNP, o NT pró – BNP, que são peptídeos liberados da sobrecarga ventricular, pressórica e volumétrica (BARRETO, 2011). Os níveis plasmáticos de troponina também podem ser monitorados pois são indicativos do rompimento da membrana dos cardiomiócitos.

Vale ressaltar também que tanto o fWV como o dímero D podem apresentar um importante papel no monitoramento da HP, por ser o primeiro, um marcador de disfunção endotelial e o segundo um marcador de ativação da cascata de coagulação e da fibrinólise. A endotelina-1 pode ser correlacionada com índices hemodinâmicos e variáveis clínicas da HAP, enquanto o ácido úrico plasmático parece estar relacionado com as alterações hemodinâmicas (HERESI et al., 2010).

Outros marcadores também estão associados à doença, entretanto a busca pelo marcador ideal ainda é relevante na expectativa de acompanhamento efetivo da HP.

O remodelamento vascular presente na hipertensão pulmonar e os mecanismos de aparecimento desta doença estão intimamente ligados com o dano endotelial nas artérias pulmonares.

A hiper-homocisteinemia consiste em uma importante causa de lesão endotelial, agindo como um fator causal direto no processo aterotromboembólico (NEVES et al., 2004). Evidências epidemiológicas mostram que a hiper-homocisteinemia é um fator de risco independente para a doença vascular, coronariana e arterial periférica (VANNUCHI et al., 2009). Segundo Terra-Filho et al. (2010a), esta pode contribuir para a manifestação e gravidade do tromboembolismo venoso sendo considerado um fator de risco importante. Postula-se que ocorra uma potencialização de efeitos deletérios sobre as artérias nos casos de hiper-homocisteinemia, por meio de

mecanismos como o fator auto-oxidativo, diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico, atividade procoagulante e pela participação deste aminoácido no processo inflamatório (OZEROL et al., 2004). Dessa forma, têm-se evidências do importante papel da hiper-homocisteinemia na progressão da patogênese da hipertensão pulmonar, podendo se tornar o monitoramento deste aminoácido uma importante avaliação da lesão endotelial nesta doença (ARROLIGA et al., 2003; OZEROL et al., 2004).

O interesse no estudo da homocisteína surgiu com a descoberta da doença de erros inatos do metabolismo, a homocistinúria, a qual se caracteriza pelo aumento da excreção de homocisteína na urina.

Gerristen et al. (1962 e 1964) reportaram um dos primeiros estudos envolvendo a homocisteína, no qual foi relatada uma criança com retardo mental apresentando tromboembolismo como evidência clínica importante. Ainda em 1964, Gibson e colaboradores, descreveram que o aumento deste aminoácido estava associado à trombose na presença de doenças cardiovasculares.

Em 1969, McCully em estudos envolvendo artérias de pequeno, médio e grande calibre, introduziu o conceito da estreita relação entre a presença de níveis elevados de homocisteína e alterações vasculares. Relatou também o espessamento da íntima, diminuição do lúmen arterial, fibrose da camada média e o desgaste das lâminas elásticas dos vasos nos pacientes com homocistinúria.

Em consonância com estudos anteriores, outros posteriores reportaram a relação entre níveis elevados de homocisteína plasmática e doença aterosclerótica (ALTINOVA&YETKIN, 2002; STAHLKE-JUNIOR et al., 2004; HUANG et al., 2008). Wilcken & Wilcken em 1976, confirmaram que a homocisteína plasmática elevada era fator de risco independente para a doença aterosclerótica. Essa relação também foi confirmada em pacientes com doença carotídea e coronariana (NEHLER & TAYLOR, 1997; MALINOW et al., 1999).

Muitos trabalhos experimentais mostram que a hiper-homocisteinemia pode provocar alterações da parede arterial tendo sido mostrada sua relação com lesões vasculares relevantes (ALTINOVA&YETKIN, 2002; STAHLKE-JUNIOR et al., 2004; HUANG et al., 2008).

2.8.1 Metabolismo da homocisteína

A homocisteína é um aminoácido sulfurado formado durante o metabolismo da metionina, aminoácido proveniente da dieta ou do catabolismo. A metionina não incorporada à proteína endógena, é convertida a S-adenosilmetionina (AdoMet) pela enzima metionina-adenosiltransferase (MAT). Uma pequena fração da AdoMet é utilizada para a síntese de poliaminas, porém a maior parte doa seu grupo metil a outros compostos, incluindo creatina, DNA e RNA. Deste modo, a AdoMet é metabolizada em S-adenosil-homocisteína que, por sua vez, é hidrolisada à homocisteína e adenosina (BYDLOWSKY et al., 1998).

Após sua formação, o metabolismo poderá seguir por duas vias: a transulfuração e a remetilação (HARBOE-GONÇALVES et al., 2005). A Figura 4 ilustra o metabolismo da homocisteína.

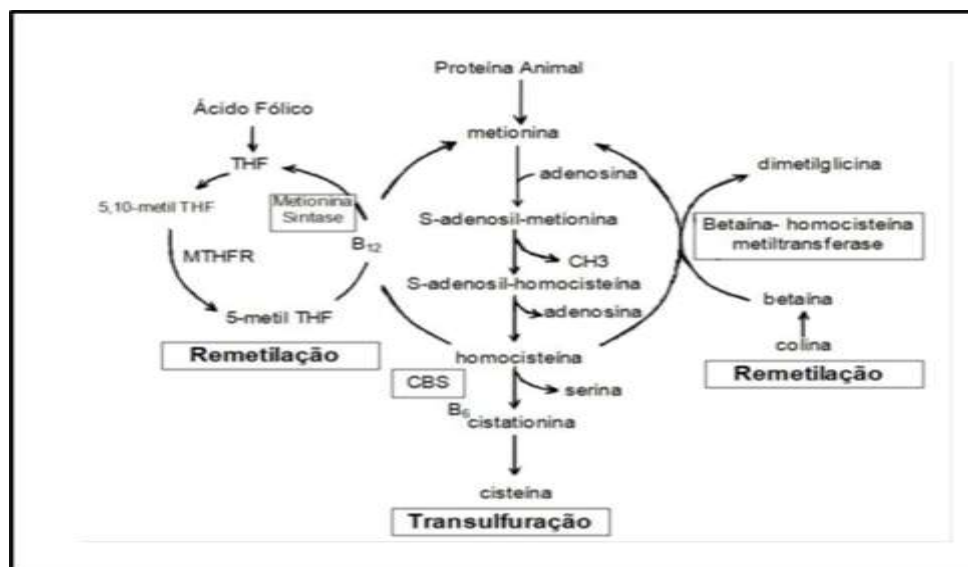


Figura 4 - Via metabólica da homocisteína

Abreviaturas: CH₃: grupo metil; CBS: cistationina β-sintetase; B₆: piridoxal fosfato; THF: tetra-hidrofolato; 5,10-metil THF: 5,10-metilenotetra-hidrofolato; 5-metil THF: 5-metilenotetra-hidrofolato B₁₂: cobalamina; MTHFR: 5,10-metilenotetra-hidrofolato redutase. (AMORIM, F.G. et al., 2011)

Na via de transulfuração, a homocisteína se condensa com a serina para formar cistationina por meio da enzima cistationina β-sintetase. A reação é caracterizada como irreversível e dependente de piridoxal fosfato (vitamina B₆).

Forma-se a cistationina que quando catalizada, origina a cisteína. Esta por sua vez, é convertida a sulfatos que são excretados na urina (NEVES et al., 2004).

Na remetilação, a homocisteína remanescente, adquire um grupo metil para formar a metionina. Nesta etapa, a reação pode ser catalizada por duas enzimas diferentes. Ambas, tem como cofator a vitamina B12 (VANNUCCHI et al., 2009).

Quando a remetilação ocorre catalizada pela enzima 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferase (metionina sintetase), há a conversão do 5-metiltetra-hidrofolato (a forma circulante do folato reduzido) a tetra-hidrofolato, que então entra nas células. A geração do 5-metiltetra-hidrofolato por esta reação requer a redução do 5,10-metilenotetra-hidrofolato a 5-metiltetra-hidrofolato, que é catalisado pela 5,10-metilenotetra-hidrofolato redutase (MTHFR). MTHFR é inibida alostericamente pela AdoMet; assim, altos níveis de metionina previnem a formação de 5-metiltetra-hidrofolato e, indiretamente, a síntese de metionina a partir da homocisteína. Esta reação acontece em vários tecidos (NEVES e al., 2004; VANNUCCHI et al., 2009).

A betaína, que é derivada da colina, proveniente da dieta, também pode atuar como um doador de metil na conversão da homocisteína em metionina. Esta reação é catalizada pela betaína-homocisteína metiltransferase e é encontrada em quantidades significantes somente no fígado.

A homocisteína plasmática pode estar na forma livre, como um dissulfeto que contém enxofre (homocistina) e dissulfetos mistos (homocisteína-cisteína) ou ligada a proteínas. Essas formas conjuntamente são denominadas de homocisteína total ou plasmática (AMORIM, F.G. et al., 2011).

Cerca de 70% da homocisteína circulam ligadas às proteínas plasmáticas, principalmente à albumina. Aproximadamente 7% da homocisteína na forma livre estão presentes em sua forma reduzida (NETO et al., 2010).

A homocisteína é liberada para o plasma, a partir dos tecidos, em quantidades reduzidas. Até mesmo quando há um excesso de metionina, o excedente de homocisteína é direcionado para a via de transulfuração. Todos esses mecanismos, de alguma forma, controlam a concentração plasmática. Porém, quando o balanço encontra-se desregulado há o acúmulo da homocisteína no sangue.

2.8.2 Alterações patológicas provenientes da hiper-homocisteinemia

O aumento da homocisteína está ligado a muitos fatores. Os defeitos genéticos estão relacionados principalmente às enzimas cistationina β -sintetase, MTHFR e metionina sintase. A dieta deficiente em vitaminas B6, B12, ácido fólico, assim como o sedentarismo e o tabagismo, estão relacionados com o aumento da homocisteína no plasma (BYDLOWSKI et al., 1998 ; LLEVADOT et al., 2005).

Os fatores fisiológicos influenciam os níveis plasmáticos de homocisteína, sendo que homens têm propensão a ter níveis maiores deste aminoácido. Com o avançar da idade também observam-se valores mais altos, o que confere risco para certas doenças (NEVES et al., 2004). Alguns fármacos como carbamazepina, fenitoína e metrotexate, podem aumentar os níveis de homocisteína por afetar o metabolismo de folato e vitamina B12 (DIAS et al., 2001).

Os mecanismos biológicos associados com a hiper-homocisteinemia não são completamente entendidos (BYDLOWSKI et al., 1998). Evidências experimentais sugerem que o aumento plasmático da homocisteína leva à disfunção endotelial e que as lesões resultantes diminuiriam a vasodilatação, podendo também ocorrer dano oxidativo, proliferação de células do músculo liso endotelial, oxidação de lipoproteínas de baixa densidade e redução da produção de óxido nítrico. Todos estes efeitos suportam o desenvolvimento ou progressão de lesões ateroscleróticas e formação de trombos (Figura 5).

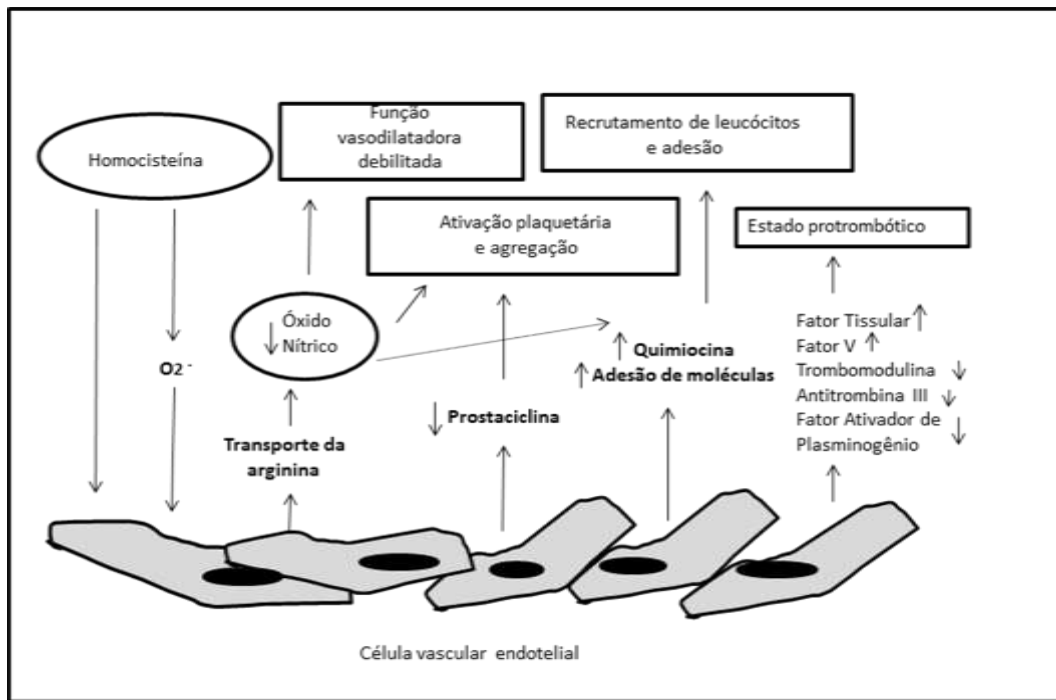


Figura 5 - Ações da homocisteína implicadas na disfunção endotelial

(adaptado de WEISS et al., 2002)

Quando liberada para o plasma, a homocisteína é rapidamente auto-oxidada, originando a homocistina e homocisteína tiolactona, bem como formas ativas de oxigênio consideradas citotóxicas, tais como o superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (WEISS et al., 2002). Domagala et al., 1998, sugerem que a oxidação da homocisteína favorece a disfunção endotelial.

O endotélio lesado por sua vez, induz à formação de trombos por meio da ativação da coagulação e das plaquetas (WEISS et al., 2002). A lesão das células endoteliais em função do aumento de homocisteína, conduz à atividade procoagulante por meio principalmente da expressão do fator tissular e do fator V. Consequente à lesão endotelial, também são observadas a redução da atividade da proteína C e da expressão da trombomodulina, além da supressão da expressão do sulfato de heparan pelo endotélio. Observa-se ainda, a inibição do ativador de plasminogênio tecidual que corrobora ainda mais para a formação da trombina e a atividade coagulante (ZHANG C. et al., 2001).

Na presença de níveis elevados de homocisteína, observa-se também uma diminuição da produção de endotelina-1 possivelmente pela inibição da peproET-1. A secreção de endotelina passa a ser insuficiente e sua ação

endotelial mediada pelo receptor ET-B fica prejudicada (FRANÇA, 2007; HUANG et al., 2008).

Deve-se ressaltar também que o processo inflamatório acompanha o quadro de hiper-homocisteinemia com a migração de leucócitos. A atração de monócitos por meio da quimiocina MCP-1 e IL-8 foi observada na aorta humana com significativa alteração também nas artérias pulmonares, tornando-as mais reativas pelo constante *stress* oxidativo (TASATARGIL et al., 2007). O processo inflamatório também é realçado pelo aumento da produção de IL-6, ativação de NF- κ B e aumento da expressão de VCAM-1. Zhang L. et al., (2006) sugerem que, na aorta de ratos, estes mecanismos são os responsáveis pela proliferação das células musculares lisas.

A produção deficiente de óxido nítrico é outro fator relevante na hiper-homocisteinemia. Neste contexto, Weiss et al., (2002) sugeriram que quando ocorre produção de espécies reativas de oxigênio como o superóxido de hidrogênio, há geração do ânion superóxido que pode reagir com o óxido nítrico produzindo uma espécie citotóxica, o peroxinitrito, inibindo a atividade vasodilatadora do NO. Outra hipótese para explicar a redução de óxido nítrico, consiste na diminuição do transporte de arginina, o que influenciaria também a função biológica.

Sabe-se também que a atividade da enzima glutathiona peroxidase encontra-se diminuída na hiper-homocisteinemia. Essa enzima serve de combate ao *stress* oxidativo, pois possui a capacidade de reduzir o peróxido de hidrogênio e peróxido de lipídio em seus respectivos alcoóis. Por outro lado, a presença do peróxido de lipídio também contribui para a inativação do óxido nítrico (UEHARA et al., 2005).

Corroborando com os processos de *stress* oxidativo, as formas oxidadas da homocisteína, na presença de cobre, geram H₂O₂ e radicais superóxidos, que favorecem a oxidação da LDL que possui um alto potencial aterogênico. (HARBOE-GONÇALVES et al., 2007). A diminuição de HDL por inibição de apo-A também é relevante no processo. A peroxidação lipídica, em decorrência de um maior *stress* oxidativo, contribui para aumentar o processo inflamatório através da ativação de NF- κ B e aumento da secreção de MCP-1, acelerando ainda mais o processo aterosclerótico (HUANG et al., 2008).

Considerando as informações encontradas na literatura, pode-se inferir que a homocisteína possui um relevante papel na resposta inflamatória e na disfunção endotelial quando seus níveis plasmáticos encontram-se aumentados.

2.8.3 Diagnóstico laboratorial da homocisteína

A determinação de homocisteína pode ser feita por muitas técnicas analíticas. Dentre essas, destaca-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) considerada por muitos autores como técnica de referência para determinação deste aminoácido (KAPRAL et al., 2002; CHICHIZOLA et al., 2003; STAUFFENBERG et al., 2004; GASCÓN et al., 2010). A sensibilidade e especificidade atribuídas à técnica de CLAE contribuem para que esta seja considerada padrão ouro nesta análise, entretanto, devido à necessidade de *expertise* técnica na operação do equipamento, sua utilização fica restrita na rotina laboratorial (ZIGHETTI et al., 2002; DUBSKÁ & HYÁNEK, 2009). Outras técnicas como a quimioluminescência, a espectrofotométrica - enzimática cíclica e imunoensaio podem também ser utilizadas na determinação dos níveis plasmáticos de homocisteína e representam uma alternativa para o laboratório clínico, com a grande vantagem de serem parcial ou totalmente automatizadas. São vários os estudos comparativos demonstrando que o método de CLAE é referência para avaliar se os níveis de homocisteína estão de acordo com as outras técnicas citadas (STAUFFENBERG et al., 2004; LA'ULU et al., 2008; GASCÓN et al., 2010).

As faixas de referência são controversas na literatura, entretanto, estudos utilizando a técnica de CLAE, fornecem valores estratificados por sexo de 6,0 a 12,0 $\mu\text{mol/L}$ para mulheres, e de 8,0 a 14 $\mu\text{mol/L}$ para homens (VANNUCHI et al. 2009). Ueland et al, 1993, também utilizaram a técnica de CLAE para determinar os níveis de homocisteína em indivíduos hígidos e definiram que os valores entre 5 e 15,0 $\mu\text{mol/L}$ podem ser considerados como, valores de referência.

Para a técnica espectrofotométrica - enzimática cíclica, os valores de referência são descritos como <10,0 $\mu\text{mol/L}$ para pacientes menores de 15 anos, <15,0 $\mu\text{mol/L}$ para pacientes entre 15 e 65 anos e <20,0 $\mu\text{mol/L}$ para pacientes com idade superior a 65 anos. A faixa do valor de referência de homocisteína considerada na técnica de quimioluminescência é de 5,0 a 15,0 $\mu\text{mol/L}$ (GARCIA et al., 2007).

A faixa de 5,0 a 15,0 $\mu\text{mol/L}$ é muito citada, como valor de referência de homocisteína em indivíduos saudáveis (MALINOW et al., 1999; DIAS et al., 2001; FONSECA et al., 2003). Weiss et al., 2002, reportaram que em um estudo multicêntrico europeu, valores superiores a 12,0 $\mu\text{mol/L}$, dosados em jejum, estão associados ao risco cardiovascular.

A hiper-homocisteinemia é classificada em leve, moderada e severa e correlaciona com os intervalos de concentrações entre 15,1 a 30 $\mu\text{mol/L}$, 30,1 a 100 $\mu\text{mol/L}$ e > 100 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente (GARCIA et al., 2007).

A coleta de sangue para a determinação da homocisteína pode ser realizada utilizando o EDTA como anticoagulante ou em soro, estando o paciente em jejum de 12 horas (MALINOW et al., 1999 ; VENÂNCIO et al., 2009). Quando coletada em EDTA, a amostra deve ser centrifugada e separada imediatamente, pois os valores de homocisteína podem aumentar quando em contato com glóbulos vermelhos em presença deste anticoagulante (CHICHIZOLA et al., 2003).

2.9 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida é uma técnica de separação que se baseia no transporte da mistura dos analitos, pela fase móvel, através de uma coluna, sendo que as diferenças nas interações dos analitos com a superfície porosa da coluna cromatográfica resultam em tempos de migração diferentes (KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

O equipamento de CLAE é constituído por um reservatório contendo a fase móvel, uma bomba que permite o fluxo da fase móvel de modo constante

ou gradativo para todo o sistema, o injetor que permite a entrada da amostra, a coluna cromatográfica que permite a separação da amostra introduzida, o detector capaz de identificar os componentes e o processador de dados que transforma o que foi identificado no detector em um sinal elétrico, que tratado matematicamente fornece um cromatograma.

Esta técnica tem sido muito valorizada pela versatilidade combinatória das fases móvel e estacionária, tornando-a uma técnica de grande aplicação (CASS. & DEGANI, 2001). Esta é utilizada na determinação de uma grande variedade de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos. Na cromatografia líquida, a fase móvel é um solvente líquido, o qual contém a amostra na forma de uma mistura de solutos. A cromatografia líquida é geralmente definida pelo mecanismo de separação ou pelo tipo de fase estacionária. Estes incluem partição, adsorção, troca iônica, cromatografia por exclusão de tamanho, por afinidade e quiral (SKOOG et al., 2005).

A cromatografia líquida de alta eficiência caracteriza-se por possuir colunas menores (diâmetro interno entre 2 e 8 mm e comprimento entre 10 e 30 cm), em que as partículas sólidas constituintes da coluna são também menores (diâmetro médio $<10 \mu\text{m}$) e esféricas. As colunas desta forma, suportam alta pressão no interior do sistema favorecendo o aumento da velocidade da fase móvel possibilitando, assim, uma melhor separação dos constituintes da amostra estudada (SILVA & SALDANHA, 1991).

A escolha do detector é dependente das propriedades do analito. Diferentes tipos de detectores estão disponíveis sendo os mais utilizados o ultravioleta, o fluorimétrico, o eletroquímico, o índice de refração, o espectrômetro de massas, entre outros (KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

A detecção fluorimétrica é utilizada na determinação de substâncias nas quais ocorre o fenômeno da fluorescência, que é resultado da absorção de energia radiante e da posterior emissão de parte dessa energia (SANTOS et al., 2010). Para favorecer a detecção fluorimétrica, o analito a ser determinado deve possuir características fluorescentes. Entretanto, alguns analitos não possuem tal característica para serem detectados, sendo necessário empregar o processo de derivatização (pré ou pós-coluna) para tornar esta detecção viável (KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007). A derivatização é uma reação química de modificação de compostos a fim de gerar novos produtos com

melhores propriedades cromatográficas (LOPES, 2011). Os compostos que contêm anéis aromáticos, certos compostos carbonílicos, alicíclicos e alifáticos, bem como as estruturas de ligações duplas altamente conjugadas, apresentam emissão fluorescente. Muitos hidrocarbonetos aromáticos não substituídos fluorescem em solução com uma eficiência quântica que aumenta com o número de anéis e seu grau de condensação (SKOOG et al., 2005). Substâncias que possuem as características estruturais citadas podem ser utilizadas como derivatizantes na detecção fluorimétrica por CLAE.

A cromatografia líquida com detecção fluorimétrica é muito utilizada na determinação da homocisteína (PFEIFFER et al., 1999; KAPRAL et al., 2002; HARBOE-GONÇALVES et al., 2005) pela boa sensibilidade e especificidade.

Para a quantificação da homocisteína por CLAE com detecção fluorimétrica, a etapa de derivatização é realizada no preparo da amostra (derivatização pré-coluna). Esta consiste em uma reação química da homocisteína com o agente derivatizante resultando em uma maior intensidade fluorescente do aminoácido complexado que, posteriormente, é identificado no detector através de comprimentos de ondas característicos. Esta etapa é extremamente importante e fornece especificidade e sensibilidade na determinação da homocisteína plasmática.

2.10 Validação do método

O desenvolvimento, a adaptação ou implementação de um método conhecido envolve o processo de avaliação visando a estimativa de sua eficiência na rotina do laboratório (BRITO et al., 2003). Para garantir que um novo método analítico possa gerar informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, este deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI et al., 2004).

A validação pode ser definida como a confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional (ISO/IEC 17025).

Existem razões técnicas, legais e comerciais que justificam a execução da validação, entretanto, os guias de validação disponíveis sugerem diretrizes

a serem seguidas ficando abertos à interpretação. Por um lado, este fator se torna benéfico pois possibilita flexibilização das condições analíticas mas, por outro, algumas informações ficam vagas no sentido de como os experimentos devem ser conduzidos (RIBANI et al., 2004; CASSIANO et al., 2009).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) fornecem orientações de como a validação pode ser conduzida por meio da Resolução 899 de 29 de março de 2003 e o DOC-CGCRE-008 de fevereiro de 2010.

O estudo da validação envolve várias figuras de mérito a serem avaliadas. Dentre estas, as mais comuns são linearidade, faixa ou intervalo linear, seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (BERNARDES & SOUZA, 2011). Os testes de efeito de matriz não estão contemplados na revisão do DOC-CGCRE-008 do INMETRO. Este guia só faz menção à seletividade e ao estudo de componentes que possam interferir na matriz. A Resolução 899 da ANVISA também não menciona tal teste. Entretanto, a investigação do efeito de matriz na quantificação dos compostos é um importante parâmetro a ser avaliado no desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos (CASSIANO et al., 2009).

Os parâmetros analíticos ou figuras de método devem ser conduzidos conforme a intenção de uso do método. É essencial que o estudo de validação seja representativo e conduzido de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados (RIBANI et al., 2004).

Com o término dos estudos de validação, o laboratório deve monitorar a implementação do método por meio de controle interno, carta controle e participação em ensaios de proficiência ou programas interlaboratoriais a fim de garantir a qualidade do exame validado.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de hipertensão pulmonar e associar seus níveis a variáveis clínicas e epidemiológicas.

3.2 Objetivos específicos

- Otimizar e validar um método analítico para a determinação plasmática de homocisteína por CLAE com detector fluorimétrico.
- Realizar um estudo comparativo entre a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a espectrofotométrica - enzimática cíclica (E-EC), para a determinação dos níveis plasmáticos de homocisteína.
- Correlacionar os níveis plasmáticos de homocisteína com o Índice de Massa Corporal, idade, distância percorrida no teste de caminhada de 6 minutos e com a classificação clínica e funcional da doença.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Padrões, substâncias químicas e controles

Os padrões e as substâncias químicas que foram utilizados na metodologia desenvolvida e validada para a determinação de homocisteína foram adquiridos da Sigma Aldrich® (St Louis, USA) e incluem:

- D-L Homocisteína com grau de pureza de 95%;
- Dicloridrato de Cistamina (padrão interno);
- *Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride* (TCEP, agente redutor);
- *7-fluorobenzo-2,1,3-oxadiazole-4-sulfonic acid* (SBDF, agente derivatizante) com grau de pureza de 98%;
- *phosphate buffered saline system*, pH 7,4 (PBS).

Os controles utilizados na validação do método e na rotina de análise das amostras para determinação da homocisteína plasmática foram:

- Controle Interno: *Liquicheck Homocysteine control*, nível 1 - (7,30 - 12,1) $\mu\text{mol/L}$ e nível 2 - (22,6 - 33,8) $\mu\text{mol/L}$, lote 34900, Biorad®, (Irvine, USA);
- Programa Interlaboratorial: CR-A 2011 (*Cardiac Risk*), número 7206871-01, identificação Kit 23958451, *College of American Pathology* (CAP) (Northfield, USA).

4.1.2 Reagentes e vidrarias

Os reagentes utilizados foram da marca Merck® (Darmstadt, Germany), J.T. Baker® (México) e Vetec® (Duque de Caxias, Brasil), a saber:

- Ácido acético glacial (grau HPLC);

- Ácido tricloroacético (TCA, grau analítico);
- Ácido bórico (grau analítico);
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA, grau analítico);
- Acetato de sódio triidratado (grau analítico);
- Hidróxido de sódio (NaOH, grau analítico);
- Metanol (grau HPLC).

A água deionizada utilizada foi proveniente do sistema de tratamento de água com resistividade de $18,2 \text{ megaohms.cm}^{-1}$.

As vidrarias utilizadas foram:

- Balões volumétricos de 5,0; 10,0; 25,0 e 100,0 mL;
- Béqueres;
- *Vials* para injeção no equipamento;
- Erlenmeyers;
- Sistema de filtração à vácuo.

4.1.3 Equipamentos e acessórios

Os equipamentos utilizados no preparo da amostra, fase móvel, padrões, reagentes e para a determinação da homocisteína foram:

- Aparelho de ultra-som – Ultrasonic Cleaner, TDR Force® (*Fujian, China*);
- Balança analítica – OHAUS modelo Explorer, *Ohaus Corporation (USA)*;
- Banho-Maria – FANEM®, modelo 102 (São Paulo, Brasil);
- Microcentrífuga - SIGMA Laborzentrifugen® (*Osterode am Harz, Germany*);
- Sistema de *tratamento de água, módulos Rios e Milliq gradiente, Millipore® (Bedford, USA)*;
- Agitador mecânico modelo MS1, Ika® (*Wilmington, USA*);

- Pipetas reguláveis de 200 µL e 1.000 µL das marcas Thermo/Finnpipette e da Brand;
- Medidor de pH DM 21 (Digimed®);
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), modelo 1100 equipado com bomba isocrática, termostato, injetor automático, detector fluorimétrico modelo 1200 e *ChemStation software*, Agilent® (Santa Clara, USA);
- Filtros de membrana de celulose regenerada de 0,45 µm da marca Millipore® (São Paulo, Brasil).

4.2 Método para a determinação da homocisteína plasmática

4.2.1 Preparo das soluções

A – Soluções Padrão Estoque

- Solução padrão estoque de homocisteína de 2.000,0 µmol/L em água deionizada;
- Solução padrão estoque de cistamina (padrão interno - PI) de 705,0 µmol/L em água deionizada.

B – Soluções Padrão Intermediárias

As soluções padrão intermediárias aquosas nas concentrações de 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0; 300,0; 350,0; 400,0; 450,0; 500,0; 650,0; 750,0; 800,0; 850,0; 1.050,0 e 1.250,0 µmol/L foram preparadas com volumes variados a partir da solução padrão estoque de homocisteína de 2.000 µmol/L. As soluções padrão de uso foram preparadas em água e na matriz nas concentrações de 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0; 40,0; 45,0; 50,0; 65,0;

75,0; 80,0; 85,0; 105,0 e 125,0 $\mu\text{mol/L}$ partindo das respectivas soluções padrão intermediárias.

A solução padrão intermediária de cistamina de 20,0 $\mu\text{mol/L}$ aquosa foi preparada a partir da solução padrão estoque de cistamina de 705,0 $\mu\text{mol/L}$ enquanto a solução padrão de uso de cistamina de 10,0 $\mu\text{mol/L}$ aquosa foi preparada a partir da solução padrão intermediária de cistamina de 20,0 $\mu\text{mol/L}$.

C – Demais soluções utilizadas na metodologia

- Solução de hidróxido de sódio 0,39 mol/L;
- Solução de hidróxido de sódio 5,0 mol/L;
- Solução de tampão borato – EDTA (pH 9,5): 3,8644 g de ácido bórico, 0,7444 g de EDTA para 500,0 mL de solução. O pH foi ajustado com a solução de NaOH 5,0 mol/L;
- Solução de TCEP 25,0 g/L;
- Solução de SBD-F 1,0 g/L;
- Solução de PBS: preparada conforme informação do fabricante;
- Solução de TCA – EDTA – 5,0 g de TCA e 0,0186 g de EDTA para 50,0 mL de solução.

D – *Pool de plasma*

Para o estudo das figuras de mérito, na etapa de validação, foi utilizado o *pool* de plasma que consistiu de diversas amostras de plasma de voluntários que foram misturadas e homogeneizadas em um recipiente. O *pool* de plasma foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

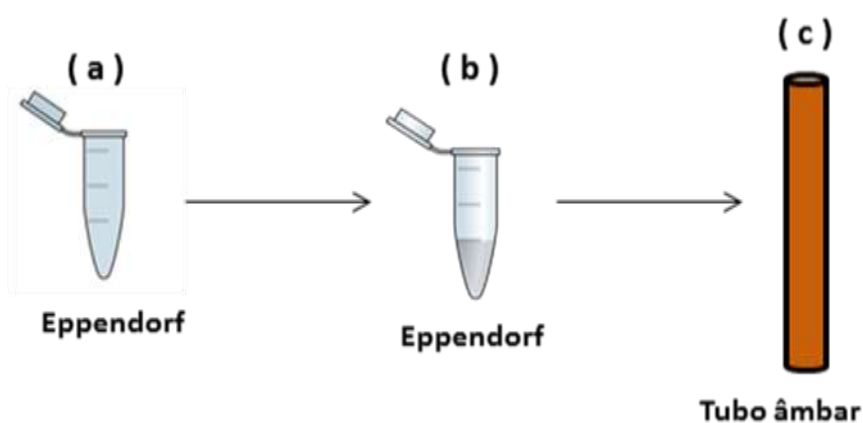
4.2.2 Otimização das condições cromatográficas

Após alguns testes preliminares foram selecionadas as seguintes condições cromatográficas:

- Fase móvel: tampão acetato (6,8040 g de acetato de sódio e 2,9 mL de ácido acético para 1,0 L de solução) pH 5,5, ajustado com NaOH 5,0 mol/L;
- fluxo = 1,1 mL/min;
- Coluna cromatográfica Techsphere C18 (15cm x 4,6mm; 5 μ m), Sun SRI® (Welwyn Garden, USA);
- volume de injeção: 50 μ L;
- detector fluorescente: λ_{ex} = 385 nm e λ_{em} = 515 nm;
- tempo total da corrida cromatográfica: 10 minutos

4.2.3 Método de análise

O método proposto por Pfeiffer et al. (1999) após modificações consistiu inicialmente na redução dos grupos tióis pelo TCEP, na precipitação de proteínas e em seguida na derivatização da homocisteína pelo SBD-F. O esquema do preparo de amostra está apresentado a seguir :



(a) no eppendorf, adicionar 50 μ L de plasma ou de solução padrão de uso ou de controle de homocisteína, 40 μ L da solução padrão de uso do PI, 25 μ L de PBS e 40 μ L do TCEP. Aguardar 30 minutos para ocorrer a reação de redução dos grupos tióis;

- (b) ainda no eppendorf, adicionar 90 μL do agente precipitante TCA-EDTA, agitar por 30 seg e centrifugar a 13.000g por 10 min a 24°C;
- (c) no tubo âmbar, adicionar 40 μL de NaOH 0,39 mol/L, 125 μL de solução tampão borato-EDTA, 50 μL do SBD-F e 50 μL do sobrenadante obtido no item b. Homogeneizar e incubar por 60 min em banho-maria 60°C. Injetar 50 μL desta solução no cromatógrafo.

4.2.4 Teste de estabilidade da homocisteína derivatizada

Com o objetivo de avaliar a estabilidade da amostra derivatizada foi realizado um estudo que consistiu no preparo de alíquotas do *pool* de plasma adicionadas de homocisteína nas concentrações de 5,0; 25,0; 65,0 e 105,0 $\mu\text{mol/L}$, em sextuplicatas independentes. As amostras foram submetidas ao método de análise descrito no item 4.2.3, com injeção no dia do preparo e reinjeção após 24h.

Foram considerados, desta forma, dois grupos para a avaliação:

Grupo 1 – amostras analisadas em tempo zero, após a derivatização e

Grupo 2 – amostras analisadas 24 horas após o preparo.

Os dados foram tratados comparando as áreas relativas obtidas dos grupos 1 e 2. Foi utilizado o teste de Mann Whitney para avaliar as diferenças das medianas das áreas relativas através do *software Statistical Package of the Social Sciences* 12.0 (SPSS 12.0).

4.2.5 Validação do método

O método de determinação da homocisteína plasmática por CLAE após ser otimizado para as condições cromatográficas e preparo de amostra, foi validado de acordo com o protocolo descrito a seguir para cada figura de mérito avaliada.

4.2.5.1 Linearidade

A linearidade é definida como a habilidade do método produzir resultados de ensaios que sejam proporcionais à concentração do analito nas amostras em uma dada faixa de concentração (NATA, 1997). Os experimentos descritos para avaliação da linearidade frequentemente envolvem preparo de curvas com ou sem matriz, em sua maioria com cinco a seis níveis de concentração, incluindo ou não o ponto zero, e com um mínimo de duas a sete replicatas por nível (SOUZA, 2007). A verificação da linearidade ainda é aceita pela avaliação do coeficiente de correlação (superior a 0,99) (GREEN, 1996; BRUCE, MINKKINEM & RIEKKOLA, 1998). Atualmente, outros tratamentos estatísticos são indicados para avaliar a linearidade do método (INMETRO, 2010). Thompson et al., (2002), não recomendam a análise da linearidade pelo coeficiente de correlação e ainda citam como importantes a realização do cálculo dos resíduos, a presença de homoscedasticidade além de testar o desvio da linearidade e verificar se o intercepto é diferente de zero.

Para o estudo dessa figura de mérito foram utilizadas soluções de homocisteína em sete níveis, preparadas na matriz (*pool* de plasma) e em água deionizada. A escolha do intervalo proposto na linearidade abrangeu os quadros de hiper-homocisteinemia (leve, moderada e severa) e obviamente a faixa considerada como referência para este aminoácido, sendo então proposta, a faixa de 5,0 a 125 $\mu\text{mol/L}$.

As soluções padrão de uso de homocisteína para o teste de linearidade foram preparadas separadamente em água e na matriz a partir das soluções intermediárias citadas no item 4.2.1. B, obtendo as concentrações de 5,0; 25,0; 45,0; 65,0; 85,0; 105,0 e 125,0 $\mu\text{mol/L}$. Estas soluções padrão e o branco do *pool* de plasma (sem adição de homocisteína) foram submetidos ao método de análise descrito no item 4.2.3, em quintuplicata e injetados no cromatógrafo no mesmo dia.

Para verificar a linearidade do método, as curvas analíticas foram construídas, sendo a razão da área (área do padrão/área do padrão interno) no eixo das ordenadas e a concentração de homocisteína no eixo das abcissas. Os dados obtidos para as soluções padrão em matriz e aquosas foram

submetidos inicialmente à verificação de *outliers* pelo Boxplot, em seguida à avaliação da normalidade pelo teste de Shapiro Wilk e posteriormente à análise de regressão linear ANOVA.

As ferramentas estatísticas foram aplicadas com auxílio do programa SPSS 12.0.

4.2.5.2 Efeito de matriz

A verificação do efeito de matriz é feita com o objetivo de assegurar o grau no qual o método é capaz de quantificar o analito acuradamente na presença do interferente (THOMPSON et al., 2002). Este teste é extremamente aplicado quando se deseja trabalhar com curva aquosa (em substituição ao método de adição) na quantificação do analito que está inserido na matriz. A verificação deste efeito pode ser feita comparando-se as inclinações das curvas sem a matriz, com as curvas na matriz (INMETRO, 2003).

Para o estudo do efeito de matriz foram utilizadas as mesmas curvas propostas na linearidade (item 4.2.5.1). Após o tratamento estatístico citado na etapa da linearidade, o intervalo considerado linear e o utilizado para avaliação do efeito de matriz foi de 5,0 a 85,0 $\mu\text{mol/L}$ de homocisteína.

Desta forma, as curvas analíticas foram construídas, os resíduos foram calculados e as variâncias das curvas em matriz e das curvas aquosas foram avaliadas pelo teste de Levene e o teste t, utilizando o programa SPSS 12.0, com o objetivo de verificar a interferência de matriz.

Após análise estatística da linearidade e do efeito de matriz, a faixa linear foi determinada e as curvas de calibração aquosas nas concentrações de 5,0; 20,0; 35,0; 50,0; 65,0 e 80,0 $\mu\text{mol/L}$ de homocisteína, foram utilizadas para o estudo das outras figuras de mérito. As equações das retas das curvas de calibração foram obtidas pelo programa Microsoft Office Excel 2007 e utilizadas para quantificar a homocisteína plasmática.

4.2.5.3 Precisão

A precisão de um método é a medida dos erros aleatórios e representa a proximidade dos resultados obtidos a partir de medidas independentes de amostragens múltiplas de uma amostra homogênea (CASSIANO et al., 2009). A precisão permite estudar variações que ocorrem quando medidas são feitas em condições de repetitividade e reprodutibilidade (GREEN, 1996). Pode ser expressa por meio do cálculo de desvio padrão ou desvio padrão relativo (INMETRO, 2010).

Na avaliação da precisão intra e interensaio do método as amostras de *pool* de plasma foram adicionadas de homocisteína a fim de obter as concentrações de 10,0; 15,0; 30,0; 40,0 e 75,0 $\mu\text{mol/L}$. As soluções foram preparadas em quintuplicatas distintas e processadas conforme descrito no item 4.2.3.

Na precisão intraensaio, sob condições de repetitividade, as soluções foram preparadas e analisadas pelo cromatógrafo no mesmo dia do preparo.

Na precisão interensaio, sob condições de reprodutibilidade parcial, as mesmas soluções foram preparadas em três dias consecutivos, em quintuplicata e analisadas pelo cromatógrafo.

A precisão, intra e interensaio, foi obtida pelo cálculo do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação por meio da fórmula:

$$\text{DPR} = 100 \times \left[\frac{S}{\bar{X}} \right]$$

Onde:

DPR – desvio padrão relativo em porcentagem;

S - desvio padrão;

\bar{X} - concentração média determinada.

Outra maneira de avaliar a precisão interensaio parcial foi variando os analistas (2) em dois dias utilizando amostras de pacientes do estudo (Figura

6). Para tal, dez amostras foram preparadas em cada dia de análise, em duplicata (Figura 6). As soluções padrão de uso, curva de calibração e controles foram preparados por cada analista, separadamente.

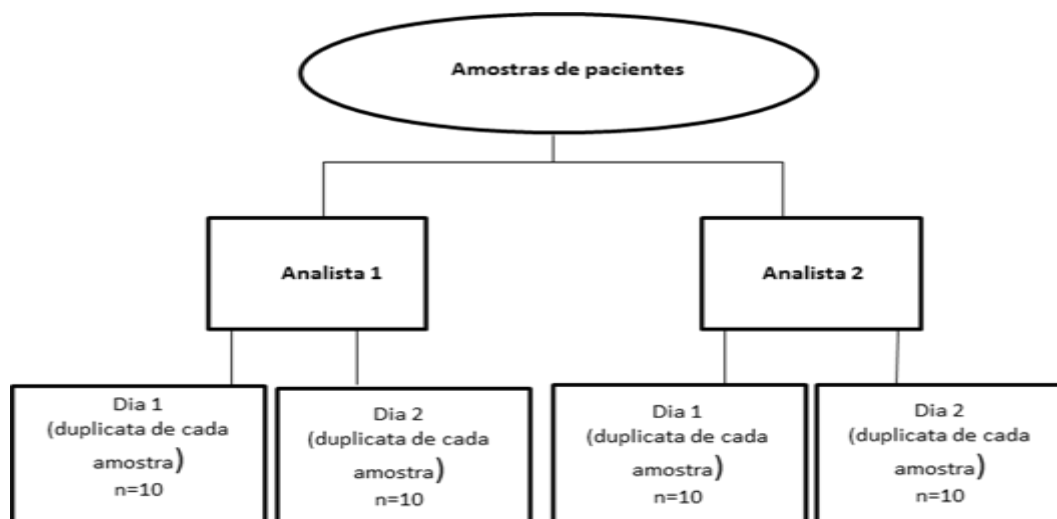


Figura 6 - Delineamento experimental da precisão interensaio para o método de determinação da homocisteína plasmática

Na avaliação estatística da precisão interensaio parcial foi realizado, inicialmente, o cálculo das diferenças das concentrações de cada duplicata de amostra analisada, e para cada analista separadamente. Com as diferenças obtidas foi possível verificar a normalidade dos resultados através do teste de Anderson-Darling e em seguida foi utilizado o teste de t para verificar a igualdade das diferenças de cada analista avaliado. As análises foram realizadas pelo programa Minitab 16.0.

4.2.5.4 Exatidão

A exatidão do método deve ser avaliada com o objetivo de verificar a proximidade de concordância entre os resultados de ensaios com o valor de referência aceito para a propriedade que está sendo medida. É estabelecida quantitativamente em termos de tendência (THOMPSON et al., 2002). Os processos normalmente utilizados para avaliar a tendência de um método são: uso de materiais de referência certificados (MRC), participação em

comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2010).

Para avaliar a exatidão do método analítico as amostras de *pool* de plasma foram adicionadas de homocisteína a fim de obter as concentrações de 10,0; 15,0; 30,0; 40,0 e 75,0 $\mu\text{mol/L}$. As soluções foram preparadas em quintuplicatas distintas e processadas conforme descrito no item 4.2.3.

A exatidão do método foi verificada pelas médias das recuperações aparentes obtidas através das amostras adicionadas a cada nível de concentração. As porcentagens de recuperação foram calculadas como se segue:

$$\% \text{ recuperação: } \left[\frac{C1 - C2}{C3} \right] \times 100$$

Onde:

C1- concentração determinada na amostra adicionada;

C2 - concentração determinada na amostra não adicionada;

C3 - concentração adicionada.

Para avaliar a exatidão também foi verificado a assertividade no Programa Interlaboratorial do *College of American Pathology* (CAP), CR-A 2011 (*Cardiac Risk*), contendo 3 níveis de concentrações, realizados em duplicata no mesmo dia.

A análise dos resultados foi realizada de acordo com a faixa liberada pelo programa interlaboratorial para cada nível de concentração analisado.

A exatidão também foi avaliada em cada dia de experimento por meio dos Controles Internos da Biorad (2 níveis de concentração). A análise dos resultados foi realizada levando em consideração a faixa de concentração informada para cada nível no relatório emitido pelo fabricante.

4.2.5.5 Limites de detecção e quantificação

Os estudos dos limites de detecção devem ser verificados com o objetivo de se conhecer a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não quantificada sob as condições de ensaio pré-definidas (NATA, 1997). O limite de quantificação pode ser considerado como a menor concentração do analito que pode ser determinada com exatidão e precisão satisfatórias (NATA, 1997; INMETRO, 2003).

Para a avaliação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método foram preparados 10 replicatas independentes do branco do *pool* de plasma. As soluções foram processadas conforme descrito no item 4.2.3.

O LD do método foi obtido de acordo com a equação:

$$LD = \frac{3 \times \sigma}{S}$$

Onde:

σ – desvio padrão das áreas relativas obtidas dos brancos (área da homocisteína/área do padrão interno);

S - inclinação da curva.

O limite de quantificação foi obtido de acordo com a equação:

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

Onde:

σ - desvio padrão das áreas relativas obtidas dos brancos (área da homocisteína/área do padrão interno);

S - inclinação da curva.

4.2.5.6 Robustez

A robustez consiste em estudar a resistência do método produzida quando pequenas alterações são feitas nas condições experimentais estabelecidas no procedimento (THOMPSON et al., 2002). Pode-se recorrer ao teste de Youden para verificar a robustez do método frente à variação dos parâmetros. Trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão (INMETRO, 2011).

Pequenas variações no método foram propostas com o objetivo de se avaliar a robustez. Neste estudo, foram avaliados 7 parâmetros analíticos, adição de metanol na fase móvel, quantidades de SBD-F, TCEP, TCA-EDTA, rotação e tempo de centrifugação e temperatura do banho-maria. Os valores nominais e as variações estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros analíticos na condição nominal e as variações propostas para a análise da robustez

| Parâmetros | Nominal | Varição |
|-------------------------------------|----------------|--------------------|
| A – Metanol na fase móvel | 0 | 1 % |
| B – SBD-F | 1 g/L | 0,9 g/L |
| C – Rotação | 13.000 g | 14.000 g |
| D – Temperatura banho- maria | 60 ° C | 65 ° C |
| E – TCA – EDTA | 100g/L+1mmol/L | 110g/L + 1,1mmol/L |
| F – TCEP | 25 g/L | 20 g/L |
| G – Tempo rotação | 10 minutos | 7 minutos |

Robustez avaliada no método desenvolvido para a determinação de homocisteína plasmática

O experimento foi realizado de acordo com o proposto pelo Teste de Youden, contendo 8 eventos organizados por meio de uma análise combinatória dos 7 parâmetros avaliados, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Matriz de Youden para o experimento da robustez

| Fator | Combinação ensaiada | | | | | | | |
|-----------|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| A ou a | A | A | A | A | a | a | a | a |
| B ou b | B | B | b | b | B | B | b | b |
| C ou c | C | c | C | c | C | c | C | c |
| D ou d | D | D | d | d | d | d | D | D |
| E ou e | E | e | E | e | e | E | e | E |
| F ou f | F | f | f | F | F | f | f | F |
| G ou g | G | g | g | G | g | G | G | g |
| Resultado | s | t | u | v | W | x | y | z |

As letras maiúsculas (A,B,C,D,E,F) representam o parâmetro nominal e as letras minúsculas (a,b,c,d,e,f) representam o parâmetro variado. As letras s,t,u,v,w,s,y,z representam os resultados dos eventos da combinação ensaiada dos parâmetros.

Uma curva de calibração foi preparada nas condições nominais e cada evento (1,2,3,4,5,6,7,8) foi preparado em triplicata para posterior análise no cromatógrafo.

A avaliação da influência de cada parâmetro foi realizada calculando-se a média dos quatro valores considerados nominais subtraindo da média dos quatro valores onde os parâmetros foram variados.

Por exemplo, para avaliar o efeito da rotação de 13.000 g para 14.000 g seguimos a seguinte equação:

$$\text{Efeito C/c} = \frac{s + u + w + y}{4} - \frac{t + v + x + z}{4}$$

Após análise pelo teste de Youden os dados foram organizados em **grupo 1** – valores obtidos da execução nominal e **grupo 0** - valores onde os parâmetros analíticos foram variados. A normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro Wilk. Em seguida os testes F e t foram aplicados utilizando o software SPSS 12.0.

4.2.6 Estudo comparativo

Foi realizado um estudo comparativo entre a metodologia validada neste estudo por CLAE, com a técnica espectrofotométrica - enzimática cíclica, kit lançado pela Labtest Diagnóstica SA, nesse ano, para análise de homocisteína.

As determinações de homocisteína utilizando a técnica espectrofotométrica - enzimática cíclica foram realizadas pela Dra. Lara Carvalho Godói e Guilherme Hideki Yoshizane Costa, no laboratório da Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Minas Gerais. O equipamento utilizado nesta metodologia foi um analisador para testes bioquímicos com capacidade de leitura no comprimento de onda de 300nm a 800nm, Labmax 560, Nishinomiya-shi, Japão.

As amostras analisadas (68) foram as mesmas avaliadas neste estudo (37), ou seja, amostras de pacientes portadores de HP e o restante (31), pacientes portadores de Doença e Alzheimer, provenientes de um projeto de doutorado do programa de pós-graduação de Ciências Farmacêuticas. As dosagens de homocisteína foram feitas em dias diferentes, analistas diferentes, técnicas diferentes e analisadas em duplicata.

A análise estatística empregada na comparação dos dois métodos foi o teste de Anderson-Darling, seguido do teste de Mann Whitney e do método de Bland & Altman para verificação da concordância dos ensaios. Essas análises foram realizadas pelos softwares Minitab 16.0 e Medcalc.

4.2.7 Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (**ANEXO A**).

O esclarecimento dos objetivos da pesquisa, utilizando-se linguagem clara, foi feito pelos pesquisadores, a todos os pacientes do estudo, e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido em todos os casos (**ANEXO B**). Uma ficha clínica contendo informações sobre tabagismo, idade, Índice de Massa Corporal (IMC), sexo, classe funcional, classificação clínica e

teste de caminhada de 6 minutos (TC6M), foi preenchida para todos os pacientes com HP (**ANEXO C**).

4.2.8 Diagnóstico dos pacientes

Os pacientes que fizeram parte deste estudo foram diagnosticados por médico pneumologista responsável pelos atendimentos no ambulatório específico de Pneumologia do Centro de Especialidades Médicas da Santa Casa de Belo Horizonte. O diagnóstico seguiu os critérios publicados pela “*European Society of Cardiology*” (GALIÉ et al., 2009).

4.2.9 Casuística

Foram incluídos 37 pacientes, de ambos os sexos, portadores de hipertensão pulmonar, classificados no grupo 1 e 4 de acordo com a classificação clínica obtida no encontro de pneumologistas em Dana Point, Califórnia, Estados Unidos, 2008. De acordo com a doença de base dos pacientes diagnosticados com HP, estes foram distribuídos em grupos: TEP crônico (n=12), cardiopatia congênita (n=8), lúpus eritematoso (n=1), esquistossomose (n=1), esclerodermia (n=3), idiopática (n=12).

A classificação funcional também foi aplicada neste estudo sendo que os pacientes apresentaram a seguinte distribuição: Classe I (n=2), Classe II (n=16), Classe III (n=17), Classe IV (n=2).

A idade dos pacientes compreendeu a faixa de 19 a 80 anos. A ficha clínica de cada paciente foi preenchida com os dados de IMC, a distância percorrida no TC6M e as informações sobre tabagismo, dentre outros.

Para cada paciente foi realizada a dosagem em duplicata de homocisteína no plasma por CLAE. Os valores de homocisteína encontrados foram correlacionados com os vários parâmetros dos pacientes contidos na ficha clínica.

Neste estudo não foi incluído o grupo controle pela dificuldade em triar indivíduos saudáveis com faixa etária semelhante ao grupo de hipertensão pulmonar e também pela fragilidade no monitoramento do estilo de vida dos indivíduos que seriam selecionados para compor tal grupo.

4.2.10 Coleta de sangue dos pacientes

Foram coletados 5 mL de sangue em EDTA de cada paciente em jejum de 12h, com diagnóstico de HP firmado no ambulatório de Pneumologia da Santa Casa de Belo Horizonte. As amostras de sangue foram centrifugadas durante 20 min à 3000 rpm para obtenção do plasma que foi aliquoteado e mantido a -80°C, até a realização da análise.

4.2.11 Análise Estatística

No presente estudo, investigou-se a normalidade dos níveis plasmáticos de homocisteína para os pacientes com HP pelo teste de Shapiro Wilk. Como os resultados não apresentaram distribuição normal, os dados foram apresentados como mediana e intervalo interquartil (II), enquanto as comparações entre os grupos foram realizadas empregando-se o teste de Mann Whitney. O método de Bland & Altman foi utilizado para determinar o grau de consistência entre os dois métodos (CLAE e E-EC). Outros métodos estatísticos utilizados se encontram descritos na seção apropriada. Todas as análises foram realizadas utilizando-se os *softwares* SPSS 12.0, Minitab 16.0 e Medcalc e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação do método de homocisteína

5.1.1 Condições cromatográficas

Após otimização das condições analíticas, descritas no item 4.2.2, foi obtido o perfil cromatográfico da solução padrão aquosa de 25 $\mu\text{mol/L}$ de homocisteína que está demonstrado na figura 7 (a). Pode-se observar que as condições otimizadas foram adequadas para se obter uma boa separação da homocisteína e do padrão interno (PI), cistamina. O tempo total de corrida foi de 10 minutos, no fluxo de 1,1 mL/min, podendo ser diminuído. O cromatograma apresenta dois sinais analíticos, sendo o primeiro da homocisteína, com tempo de retenção de 3,283 min e, o segundo, do PI com tempo de retenção de 6,526 min. A figura 7 (b), apresenta o perfil cromatográfico obtido de uma amostra de paciente do estudo. Nesse cromatograma pode-se observar quatro sinais analíticos, sendo a homocisteína o segundo sinal com tempo de retenção de 3,230 min, e o PI, o quarto sinal analítico, com tempo de retenção de 6,384 min. Os sinais analíticos 1 e 3, provavelmente, se referem a cisteína e a cisteinilglicina, respectivamente, conforme descrito por Pfeiffer et al. (1999), porém não foram objeto de estudo.

As modificações feitas no preparo de amostra, quando comparado com o método descrito por Pfeiffer et al. (1999), foram realizadas com o objetivo de aumentar o volume do sobrenadante para facilitar a pipetagem dos 50 μL da amostra desproteinizada e do produto final (amostra derivatizada), caso alguma reinjeção fosse necessária. Os volumes e concentrações das soluções descritas por Pfeiffer et al., (1999) foram de 25 μL de PI de 10,0 $\mu\text{mol/L}$; 10 μL de NaOH de 1,55 $\mu\text{mol/L}$ e de 10 μL de TCEP de 100 g/L, enquanto na presente validação foi de 40 μL de PI de 10,0 $\mu\text{mol/L}$; 40 μL de NaOH de 0,39 $\mu\text{mol/L}$ e 40 μL de TCEP de 25 g/L.

A coluna utilizada por Pfeiffer et al. (1999) foi a Prodigy C18 ODS2 (150 mm X 3,2 mm, 5 μm) da Phenomenex a qual foi substituída pela Techisphere C18 (150 mm X 4,6 mm, 5 μm) da Sun-SRI. A fase móvel utilizada por estes autores foi composta por tampão acetato pH 5,5 com adição de 30 mL/L de

metanol. Nesse estudo, o metanol foi retirado da fase móvel, para diminuir o custo da análise. Porém, sem a presença de metanol o tempo de corrida aumentou e para compensar, o fluxo que seria de 0,7 mL/min (adotado pelos autores) passou para 1,1 mL/min.

Os parâmetros analíticos modificados e otimizados não comprometeram a separação dos compostos e nem a resolução como demonstrado na figura 7.

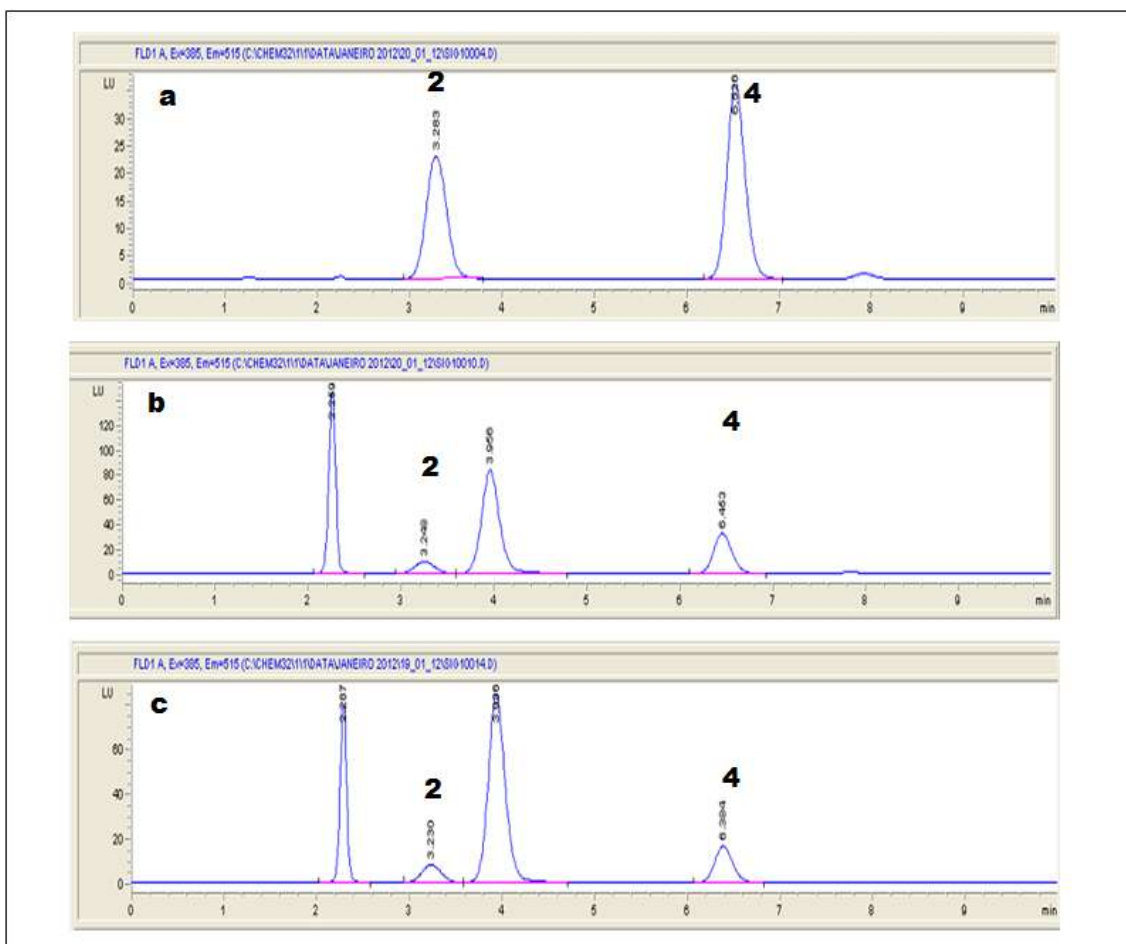


Figura 7 - Cromatograma obtido na análise de homocisteína, utilizando coluna Techesphere C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m), e fase móvel composta por tampão acetato, com fluxo de 1,1 mL/min

a- padrão aquoso de homocisteína na concentração de 25,0 μ mol/L; **b-** *pool* de plasma que representa o branco utilizado nos testes do limites de detecção e quantificação; **c-** plasma de paciente do estudo para homocisteína; **2** – representa o sinal analítico da homocisteína e o tempo de retenção; **4** – representa o sinal analítico da cistamina e tempo de retenção

5.1.2 Estabilidade da homocisteína derivatizada

A estabilidade é um importante parâmetro citado pela Resolução 899 da ANVISA descrita como estabilidade pós-processamento e permite avaliar os resultados obtidos após um tempo superior ao da corrida analítica comparando-os com aqueles apresentados após a leitura das amostras recém-preparadas.

No presente estudo, o teste de estabilidade permitiu avaliar o tempo de estabilidade da amostra derivatizada por um período de 24 horas. A avaliação foi feita com base nas áreas relativas obtidas das concentrações nominais de 5,0; 25,0, 65,0 e 105,0 $\mu\text{mol/L}$ realizadas em sextuplicatas independentes, injetadas no tempo zero (após o preparo, grupo 1) e reinjetadas 24 horas depois (grupo 2). Como os dados obtidos não apresentaram distribuição normal, o teste de Mann Whitney foi utilizado para comparação entre as medianas do grupo 1 (área relativa de $0,69 \pm 1,69$) e do grupo 2 (área relativa de $0,65 \pm 1,73$). Nenhuma diferença foi observada entre os dados obtidos nos grupos 1 e 2, o que significa que a amostra derivatizada é estável até 24h ($p=0,377$). A estabilidade da amostra derivatizada por 24h permitiu a realização de um maior número de amostras por experimento e, quando necessário, a reinjeção foi feita.

5.1.3 Linearidade

Os dados obtidos para avaliação da linearidade mostraram que as concentrações de 105,0 e 125,0 $\mu\text{mol/L}$ de homocisteína aquosa e em matriz (*pool* de plasma) apresentaram variações maiores não tendo apresentado distribuição normal. Desta forma foi considerada a faixa de concentração de 5,0 a 85,0 $\mu\text{mol/L}$ de homocisteína para avaliação da linearidade.

Os resíduos da regressão para as curvas aquosas e para as curvas em matriz foram calculados por meio da diferença entre a concentração real e a concentração obtida pela equação da reta.

Os valores dispersos dos resíduos foram tratados através do *Boxplot* e foram retirados um *outlier* da curva em matriz (correspondente à concentração de 45,0 $\mu\text{mol/L}$) e um *outlier* da curva aquosa (corresponde à concentração de 85,0 $\mu\text{mol/L}$).

A distribuição dos dados foi avaliada e a normalidade dos dados foi confirmada pelo Teste de Shapiro Wilk (Tabela 3).

Tabela 3 - Normalidade dos resíduos das curvas em matriz e aquosa na avaliação da linearidade da homocisteína

| Normalidade dos resíduos | Curva em matriz | Curva aquosa |
|--------------------------|-----------------|--------------|
| <i>N</i> | 24 | 24 |
| <i>p</i> * | 0,460 | 0,107 |

*Teste de Shapiro Wilk ; n= número de dados

Os dados obtidos apresentaram-se bem ajustados ao modelo linear demonstrados pela análise ANOVA. A regressão significativa ($p < 0,001$) e o intercepto (β_0) diferente de zero, indicaram que a faixa de 5,0 a 85,0 $\mu\text{mol/L}$ de homocisteína foi linear. As curvas aquosas e em matriz com as respectivas equações e coeficientes de determinação estão apresentados na Figura 8.

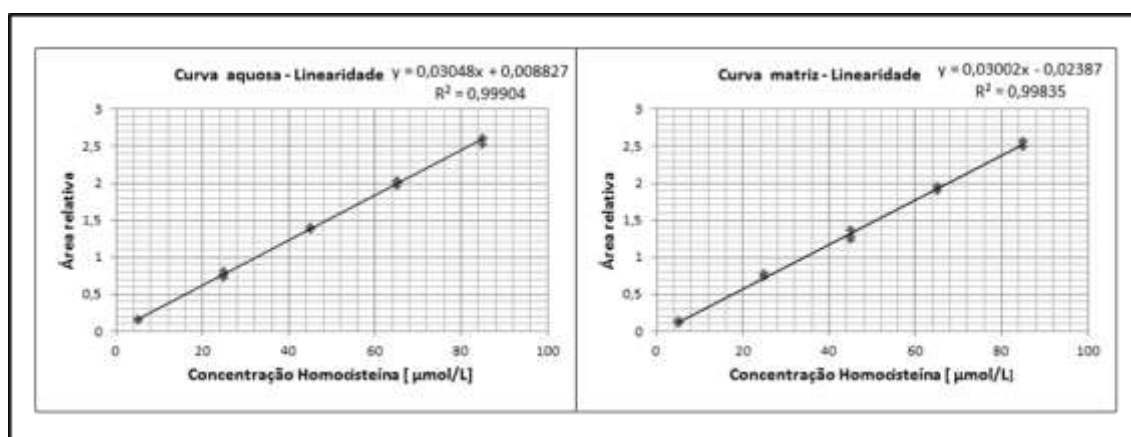


Figura 8 - Curvas analíticas aquosas e em matriz nas concentrações de homocisteína de 5,0 a 85,0 $\mu\text{mol/L}$

n=5 para as curvas aquosas e em matriz

5.1.4 Efeito de matriz

Para análise do efeito de matriz, os resíduos referentes aos dados das curvas em água e em matriz foram organizados para verificar a interferência da matriz nas análises. A faixa avaliada compreendeu as concentrações distribuídas entre 5,0 e 85,0 $\mu\text{mol/L}$ de homocisteína, que foi considerada linear (item 5.1.3).

Como a normalidade de ambas as curvas foram verificadas, o teste de Levene foi aplicado a fim de avaliar a homogeneidade das variâncias dos resíduos e, em seguida, o teste de t foi aplicado a fim de verificar a diferença das médias dos resíduos das curvas aquosas e em matriz.

O teste de Levene indicou homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas em água e na matriz, possibilitando o uso do teste de t com variâncias combinadas para avaliação do efeito de matriz (Tabela 4). Os dados demonstraram que não há efeito de matriz (Tabela 4), possibilitando a utilização da curva aquosa no estudo dos outros parâmetros de mérito, assim como, para a quantificação da homocisteína nas amostras dos pacientes portadores de HP.

Tabela 4 - Avaliação do efeito de matriz para homocisteína

| Estatística | Avaliação do efeito de matriz |
|------------------------|--------------------------------------|
| <i>n</i> | 48 |
| Teste de Levene | $p=0,210$ |
| Teste de t | $p=1,0$ |

Resultado da comparação das variâncias e das médias dos resíduos das curvas em matriz e aquosa.

n= número de dados

A Figura 9 mostra as curvas aquosas (n=5) e em matriz (n=5) com as respectivas equações da reta e os coeficientes de determinação. Pode-se observar que as retas são paralelas com uma pequena variação na inclinação, $(0,03048 \pm 0,0002684)$ para a curva aquosa e $(0,03002 \pm 0,0004011)$ para a curva em matriz. Os coeficientes de determinação para ambas as curvas foram maiores que 0,99.

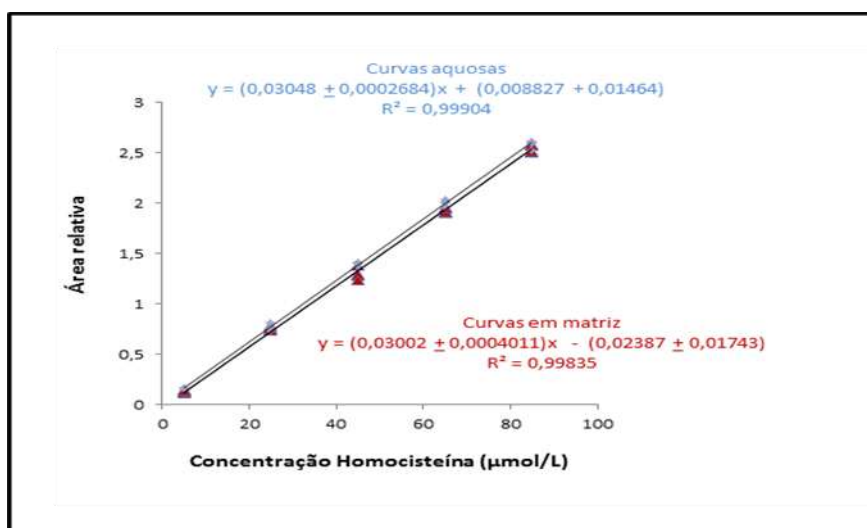


Figura 9 - Representação gráfica do estudo de efeito de matriz na determinação de homocisteína plasmática

5.1.5 Precisão

A precisão intra e interensaio (reprodutibilidade parcial) do método para determinação da homocisteína plasmática por CLAE foi avaliada em cinco concentrações ao longo da faixa de linearidade do método e expressa pelos valores dos desvios padrão relativos (DPR). As precisões intra e interensaio do método analítico estão apresentadas na Tabela 5.

A precisão intraensaio apresentou valores de DPR entre 2,9% (concentração de 75 µmol/L) a 5,5% (concentração de 30 µmol/L) e a interensaio parcial, as variações compreenderam valores entre 5,8% (concentração de 40 µmol/L) a 8,0% (concentração de 15 µmol/L). As variações maiores apresentadas na precisão interensaio já eram esperadas, por se tratar de soluções que são preparadas a cada dia de trabalho.

Tabela 5 - Precisão intra e interensaio obtidas na determinação da homocisteína plasmática em cinco níveis de concentração

| Concentração de homocisteína ($\mu\text{mol/L}$) | Desvio Padrão Relativo (%) | | | | |
|---|----------------------------|------|------|------|------|
| | 10,0 | 15,0 | 30,0 | 40,0 | 75,0 |
| Intra | 4,3 | 4,6 | 5,5 | 4,0 | 2,9 |
| Inter | 7,1 | 8,0 | 7,9 | 5,8 | 6,2 |

Devios padrão relativos intra (n=5) e interensaio (n=3 dias e n=5 replicatas)

A precisão também foi avaliada em condições de reprodutibilidade parcial na qual dois analistas processaram as mesmas amostras (n=20), em dois dias de análise (n=10/dia) e em duplicata. Dos dados obtidos dois foram perdidos, sendo que a falha foi identificada no preparo da amostra, pela ausência do padrão interno no perfil cromatográfico, impossibilitando assim, a quantificação da homocisteína.

Para a análise estatística, a diferença entre a concentração da primeira replicata com a da segunda replicata para cada amostra e para cada analista foi feita separadamente (ver item 4.2.5.3).

A repetitividade entre cada analista foi avaliada através da duplicata de cada amostra e a reprodutibilidade entre os analistas foi verificada pela concordância entre as amostras processadas por ambos analistas nos diferentes dias de análise.

A normalidade foi comprovada pelo teste de Anderson-Darling para as condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial. Desta forma foi possível avaliar a igualdade das médias das diferenças obtidas entre o mesmo analista e entre os analistas 1 e 2 pelo teste de t (Tabela 6).

Tabela 6 - Dados da precisão obtidos sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial para dois analistas

| Precisão | | Analista 1 | Analista 2 |
|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Repetitividade | Anderson-Darling | p= 0,964 | p=0,368 |
| | Teste de t | p= 0,329 | p=0,427 |
| | $\mu \pm SD$ | 0,272 \pm 1,182 | 0,224 \pm 1,199 |
| Reprodutibilidade | Anderson-Darling | p= 0,083 | |
| | Teste de t | p= 0,982 | |

μ = média das diferenças; SD= desvio padrão das diferenças

Os dados mostraram diante deste delineamento que a reprodutibilidade parcial entre os analistas (1 e 2) é adequada, e que a repetitividade de cada analista também é apropriada para o método de homocisteína em estudo.

5.1.6 Exatidão

A exatidão foi avaliada pela adição de homocisteína ao *pool* de plasma, em cinco níveis de concentração, em quintuplicata. As porcentagens de recuperação de cada concentração avaliada estão demonstradas na Tabela 7.

Os valores de recuperação variaram entre (89,6 \pm 3,5)% e (104,5 \pm 4,2)% mostrando que o método apresentou boa recuperação.

Tabela 7 - Recuperação obtida na determinação da homocisteína plasmática em cinco níveis de concentração

| Concentração ($\mu\text{mol/L}$) | Recuperação (%) | | | | |
|---------------------------------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | 10,0 | 15,0 | 30,0 | 40,0 | 75,0 |
| | 98,7 \pm 6,8 | 89,6 \pm 3,5 | 96,6 \pm 4,5 | 104,5 \pm 4,2 | 100,0 \pm 7,5 |

A exatidão também foi avaliada por meio da análise do programa interlaboratorial para homocisteína (CAP – *round march* 2011). Esta rodada foi

composta por três amostras em concentrações diferentes de homocisteína. Cada amostra foi realizada em duplicata. Os resultados obtidos e os valores divulgados pelo ensaio de proficiência estão apresentados na Tabela 8. As concentrações determinadas estão dentro da faixa informada pelo provedor e próximas da média, mostrando uma boa exatidão para o método proposto.

Tabela 8 - Concentrações de homocisteína ($\mu\text{mol/L}$) obtidas para as amostras do programa interlaboratorial CAP (*round march 2011*)

| Amostra | Replicata 1 ($\mu\text{mol/L}$) | Replicata 2 ($\mu\text{mol/L}$) | Faixa de concentração ($\mu\text{mol/L}$) | Média da concentração ($\mu\text{mol/L}$) |
|----------------|---|---|---|---|
| CAP 1 | 13,2 | 13,7 | 10,8 – 15,1 | 12,97 |
| CAP 2 | 5,3 | 5,5 | 3,4 – 6,6 | 4,98 |
| CAP 3 | 23,6 | 23,2 | 21,2 – 27,3 | 24,26 |

A cada experimento realizado foi também avaliado os Controles Internos da Biorad (2 níveis de concentração de homocisteína), com o objetivo de garantir a qualidade das análises. Os níveis 1 e 2 do controle interno foram reveesados, de forma aleatória, entre os experimentos. Os resultados de concentração para cada nível foram compilados e os valores expressos em média e desvio padrão. Para o nível 1 ($n=9$) o resultado encontrado foi de $(9,64 \pm 0,84) \mu\text{mol/L}$ de homocisteína e o valor informado no relatório da Biorad foi de $(9,70 \pm 2,40) \mu\text{mol/L}$ de homocisteína. Já para o nível 2 ($n=9$) o resultado encontrado foi de $(26,2 \pm 1,14) \mu\text{mol/L}$ de homocisteína e o valor informado no relatório da Biorad foi de $(28,2 \pm 5,7) \mu\text{mol/L}$ de homocisteína. Os dados mostram que os valores de média e desvio padrão encontrados estão dentro da faixa e muito próximos das médias informadas no relatório emitido pela Biorad.

5.1.7 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação do método proposto para determinação de homocisteína plasmática foram avaliados a partir do preparo de 10 replicatas independentes do branco do *pool de plasma*. Como a homocisteína é um aminoácido de metabolismo endógeno de indivíduos saudáveis, a concentração de homocisteína de 8,82 $\mu\text{mol/L}$ foi encontrada a partir da média das 10 replicatas, no pool de plasma avaliado.

Desta forma, os cálculos dos limites de detecção e quantificação foram realizados de acordo com as equações descritas no item 4.2.5.5. Os limites de detecção e quantificação determinados para esse método foram de 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e 3,4 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente.

5.1.8 Robustez

A robustez do método cromatográfico para quantificação de homocisteína foi avaliada por meio do teste de Youden, descrito no item 4.2.5.6.

A robustez foi proposta com o objetivo de inserir pequenas modificações no método, avaliando as interferências destas modificações nos resultados. A adição de metanol na fase móvel foi feita com o objetivo de diminuir o tempo de corrida da análise, sem que houvesse sobreposição dos sinais analíticos. As diminuições nas concentrações de SBD-F e TCEP foram propostas para diminuir o custo da análise, pois entre os reagentes utilizados, esses são os mais caros. Entretanto, são dois reagentes muito importantes no preparo da amostra, ou seja, o TCEP, responsável pela redução dos grupos tióis e SBD-F, responsável pela derivatização desses grupos. O aumento da rotação e diminuição do tempo de rotação foram propostos com o objetivo de acelerar o processo de preparo da amostra. A temperatura do banho foi testada como forma de avaliar se alterações que porventura acontecessem na rotina, poderiam prejudicar o resultado final da análise. E por fim, o aumento na

concentração do agente precipitante (TCA-EDTA) foi feito com o objetivo de se obter um sobrenadante mais limpo.

A influência dos sete parâmetros analíticos sobre a concentração de homocisteína na amostra adicionada foi avaliada nos oito experimentos combinados, descritos na Tabela 2 do item 4.2.5.6, e as concentrações obtidas estão demonstradas na Tabela 9. Os valores apresentados na tabela representam a média das triplicatas.

Tabela 9 - Resultados obtidos na avaliação da robustez

| Fator | Combinação ensaiada | | | | | | | |
|---|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Concentração ($\mu\text{mol/L}$, n=3) | 54,2 | 62,7 | 57,6 | 49,6 | 53,4 | 55,5 | 49,4 | 53,4 |

Concentrações obtidas nos oito ensaios realizados para amostra adicionada de 55,0 $\mu\text{mol/L}$ de solução padrão de homocisteína

Para avaliar o efeito de cada parâmetro analítico, a média das concentrações de homocisteína dos quatro valores obtidos nas condições nominais foi subtraída da média das concentrações de homocisteína dos quatro valores correspondentes às variações analíticas aplicadas, conforme equação demonstrada no item 4.2.5.6. Os resultados das subtrações realizadas nos sete parâmetros avaliados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados das diferenças entre as concentrações obtidas nas condições variadas em relação à condição nominal (n=3), na avaliação da robustez

| Fator | A/a | B/b | C/c | D/d | E/e | F/f | G/g |
|-----------------|------|------|-------|------|------|-------|-------|
| Variação | 3,05 | 3,95 | -1,67 | 0,91 | 1,39 | -3,64 | -4,58 |

Os dados mostram que o efeito do parâmetro G (tempo de rotação 10 minutos) sobre g (tempo de rotação 7 minutos) apresenta maior valor absoluto dentre os outros parâmetros avaliados, porém o teste de Youden é subjetivo uma vez que não estabelece um corte predizendo se a variação obtida é aceitável ou não.

Dessa forma, a análise estatística foi realizada a fim de verificar os efeitos dos parâmetros variados em relação aos nominais. Como cada parâmetro nominal e o variado foram ensaiados 4 vezes (ver tabela 2 no item 4.2.5.6) e cada ensaio foi realizado em triplicata, os resultados obtidos foram organizados, para avaliação estatística, da seguinte forma:

Grupo 1 - valores obtidos na condição nominal (n=12).

Grupo 0 - valores obtidos na condição variada (n=12).

Inicialmente foi avaliado a presença de *outliers* pelo programa *Boxplot* sendo encontrados 4 *outliers* no Grupo 0, 2 referentes ao parâmetro temperatura do banho e 2 *outliers* referentes à quantidade de TCA/EDTA.

Em seguida, foi investigado se os dados obtidos apresentavam distribuição normal para o Grupo 1 e para o Grupo 0, tendo sido verificada distribuição normal. Os testes de F e t foram então aplicados e os dados estão apresentados na Tabela 11. Os resultados demonstraram que o parâmetro G (tempo de rotação 10 minutos) foi significativamente diferente do parâmetro g (tempo de rotação 7 minutos) ($p=0,036$).

Tabela 11 - Efeitos dos parâmetros analíticos em relação aos parâmetros nominais avaliados pelo teste de F e t, na avaliação da robustez

| Fator | A / a | B / b | C / c | D / d | E / e | F / f | G / g |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| P | 0,175 | 0,075 | 0,464 | 0,783 | 0,126 | 0,103 | 0,036* |
| n (Grupo 0) | 12 | 12 | 12 | 10 | 10 | 12 | 12 |
| n (Grupo 1) | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |

n= número de resultados para cada grupo avaliado; **Grupo 1** – condição nominal; **Grupo 0** – condição variada

Como pelo teste de Youden a diferença entre os grupos foi negativa (-4,58), pode-se inferir que o menor tempo de rotação foi a melhor condição. Como o valor de p estava próximo do valor de significância ($p>0,05$) e na prática só teria sentido utilizar a menor rotação se o número de giros fosse maior, para separar completamente as proteínas desnaturadas, foram então realizados outros experimentos para confirmar ou não o resultado encontrado para a variável, tempo de rotação.

Os resultados foram organizados como citado acima, para este parâmetro. Inicialmente foi avaliada a presença de *outliers* pelo programa *Boxplot* e não foi encontrado nenhum.

Em seguida foi investigada a normalidade dos resultados para o Grupo 1 e para o Grupo 0 tendo sido observada distribuição normal para os dados. Os testes de F e t foram aplicados com significância de $p > 0,05$. Os valores entre o Grupo 1 (para o tempo de rotação de 10 minutos) e o Grupo 0 (tempo de rotação de 7 minutos) não apresentaram diferenças estatísticas sendo considerados iguais ($p = 0,999$).

Com o resultado encontrado neste segundo experimento, a condição do tempo de rotação de 10 min foi mantida durante todos os experimentos, na etapa de preparo das amostras.

As variações testadas não influenciaram estatisticamente no resultado final em relação aos parâmetros nominais. O método desta forma se mostrou robusto propiciando segurança aos analistas, caso estas modificações fossem implementadas na rotina.

5.1.9 Considerações gerais sobre a validação

O método descrito por Pfeiffer et al. (1999) para determinação da homocisteína plasmática foi validado no Laboratório de Toxicologia (LATO) da Universidade Federal de Minas Gerais com algumas modificações. Dessa forma, o método validado apresentou linearidade até 85,0 $\mu\text{mol/L}$ de homocisteína e limite de detecção de 1,0 $\mu\text{mol/L}$ de homocisteína. Pfeiffer et al. (1999) descreveram que a linearidade do método foi de 200,0 $\mu\text{mol/L}$ de homocisteína e o limite de detecção de 0,16 $\mu\text{mol/L}$ de homocisteína. As diferenças na linearidade e sensibilidade encontradas na validação em estudo quando comparadas com o que foi publicado por Pfeiffer et al. (1999) podem ser justificadas com base nos diferentes equipamentos e detectores utilizados, e pela falta de precisão do analista, uma vez que foram encontrados vários *outliers* no estudo. Também a forma de avaliação estatística da linearidade pode influenciar no resultado encontrado. Pfeiffer et al., (1999) descreveram que o método apresentou linearidade utilizando o coeficiente de determinação

(r^2) na avaliação desta figura de mérito e encontraram valores de $r^2 = 0,997$ na curva preparada em solução de PBS e, $r^2 = 0,999$ na curva preparada em plasma. No presente estudo, avaliando o coeficiente de determinação na faixa inicialmente proposta de 5 a 125 $\mu\text{mol/L}$ de homocisteína foram observados os valores de $r^2 = 0,998$ nas curvas aquosas e $r^2 = 0,994$ nas curvas em matriz. Dessa forma, ter-se-ia como faixa linear de 5 a 125 $\mu\text{mol/L}$ de homocisteína. Entretanto, sabe-se que atualmente outros tratamentos estatísticos estão sendo indicados na verificação da linearidade do método (INMETRO, 2010), não sendo recomendada a utilização do coeficiente de correlação ou de determinação. A recomendação é que seja feito o cálculo dos resíduos e investigada a homoscedasticidade além de testar o desvio da linearidade e verificar se o intercepto é diferente de zero (THOMPSON et al., 2002). Nenhuma dessas premissas foram mencionadas no artigo de Pfeiffer et al., (1999) o que leva a acreditar, que os autores avaliaram a linearidade do método apenas pelo coeficiente de determinação.

No presente estudo, mesmo com uma faixa de trabalho menor, o método validado permitiu avaliar níveis de hiper-homocisteinemia leve e moderada estando o método dessa forma adequado ao propósito.

De acordo com a análise estatística não foi observado efeito de matriz ao comparar as inclinações da curva aquosa com a curva em plasma permitindo, dessa forma, trabalhar com curva aquosa nos estudos posteriores. Pfeiffer et al. (1999) realizaram o estudo do efeito de matriz com e sem a utilização do padrão interno (PI), comparando a inclinação e o intercepto. Estes autores chegaram à conclusão que a utilização do PI aumenta a precisão do método e sobrepõe o efeito de matriz do plasma, em função do intercepto, uma vez que as inclinações foram muito semelhantes.

A precisão intraensaio encontrada neste estudo apresentou valores de DPR entre 2,9% a 5,5% e a interensaio de 5,8% a 8,0%, valores mais altos do que os encontrados por Pfeiffer et al. (1999; intraensaio de 1,1% e interensaio de 5,6%). Um fator importante a ser considerado foi o fato da validação do método ter sido feita com injeção manual o que possibilita uma maior variabilidade quando comparada com a injeção automática. A instalação do amostrador automático foi feita posteriormente, tendo sido utilizada para a determinação da homocisteína em algumas amostras. De certa forma, a

variação máxima na avaliação da precisão (8,0%) apresentou-se inferior às especificações desejáveis propostas na variação biológica por Westgard que é $\leq 10,3\%$ (RICOS et al., 1999).

A precisão interensaio realizada entre analistas diferentes, também propiciou resultados satisfatórios (DPR $\leq 9,5\%$ para 18 amostras e DPR $\leq 14,7\%$ para 02 amostras) não comprometendo os resultados, caso as análises fossem feitas por mais de um analista. A reprodutibilidade entre os analistas foi avaliada pelo teste de t demonstrando que há concordância nos resultados avaliados ($p = 0,982$, significância do teste é $p > 0,05$).

A exatidão avaliada por meio da recuperação aparente apresentou valores entre $(89,6 \pm 3,5)\%$ e $(104,5 \pm 4,2)\%$ mostrando que o método apresenta boa recuperação, estando na faixa aceitável de 80,0 a 110,0% (EC, 2002). A recuperação média encontrada por Pfeiffer et al. (1999) foi de $(96,7 \pm 4,7)\%$ e a do presente estudo foi de $(97,9 \pm 7,1)\%$. Os valores de recuperação estão próximos, porém a dispersão foi maior para o método desenvolvido neste estudo.

Diante dos resultados obtidos na validação, o método desenvolvido por CLAE se mostrou adequado ao propósito e representa uma opção para a determinação dos níveis plasmáticos de homocisteína no laboratório clínico.

5.2 Estudo comparativo dos níveis de homocisteína plasmática obtidos por CLAE e E-EC

No estudo comparativo de métodos e técnicas foram utilizadas 68 amostras, analisadas em duplicata, em dias diferentes e por analistas diferentes. Os valores encontrados pela metodologia validada por CLAE foram comparados com os valores encontrados pela metodologia enzimática cíclica (técnica espectrofotométrica automatizada – E-EC).

Os dados obtidos em concentração por ambas as técnicas foram dispostos no gráfico de dispersão, o que permitiu verificar a existência de correlação positiva entre as duas técnicas em estudo (Figura 10).

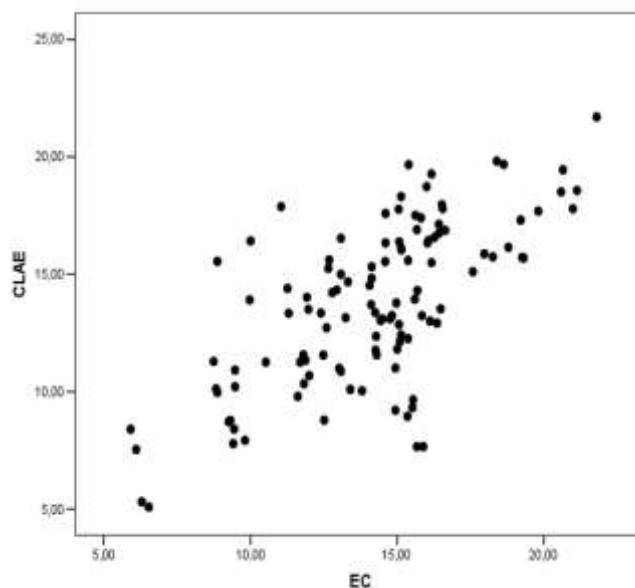


Figura 10 - Gráfico de dispersão dos resultados de homocisteína plasmática obtidos por CLAE e pela técnica espectrofotométrica enzimática cíclica

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, EC – Enzimática Cíclica

Posteriormente, o teste de Anderson-Darling foi aplicado aos dados obtidos pelos dois métodos, tendo sido observado que estes apresentavam distribuição normal ($p= 0,036$).

Desta forma, o teste de Mann Whitney foi aplicado para investigar se havia diferença entre as medianas dos resultados obtidos por CLAE e por E-EC. Entretanto, nenhuma diferença foi observada entre as medianas das metodologias avaliadas ($p= 0,404$), o que significa que estas são semelhantes e que as técnicas podem ser consideradas comparáveis.

A concordância entre as técnicas em estudo foi também verificada por meio da metodologia proposta por Bland & Altman onde as duas variáveis são representadas por CLAE e EC, em um gráfico de dispersão entre as diferenças das duas variáveis (no eixo y, sendo valores de $CLAE - EC$) e a média das duas $[(CLAE + EC)/2]$ no eixo x (Figura 11). Neste gráfico (Figura 11) foi possível visualizar o quanto os dados das duas técnicas se afastaram do valor zero, mostrando a dispersão das diferenças obtidas nas duas técnicas, além das tendências.

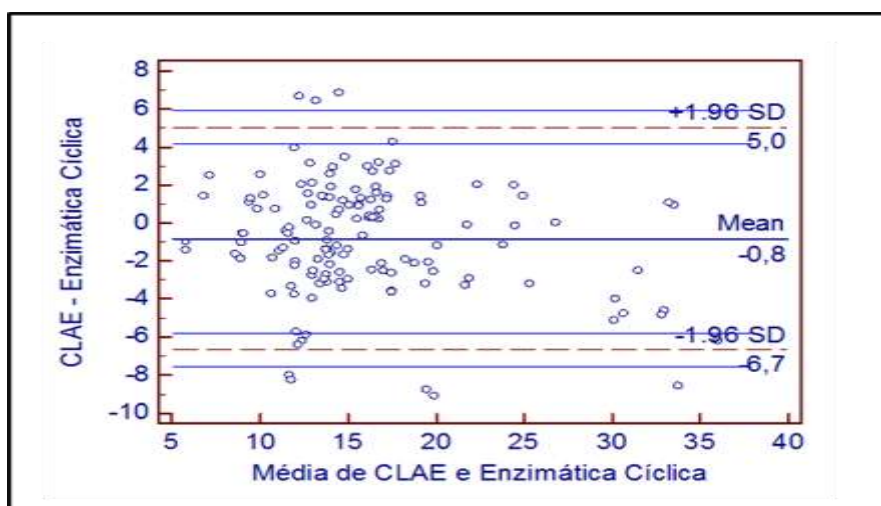


Figura 11 - Gráfico de Bland-Altman para a avaliação dos resultados obtidos por CLAE e resultados obtidos pela técnica espectrofotométrica enzimática cíclica

Eixo x - representando as médias das replicatas de ambas as técnicas e eixo y representando a diferença obtida entre o resultados de CLAE e a metodologia EC. CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, EC – Enzimática Cíclica, SD- desvio padrão representado pela linha tracejada, *Mean* – Média representada pela linha inteira.

O gráfico de Bland & Altman demonstrou que a média ($\mu = -0,817$) está próxima de zero sugerindo que as técnicas são concordantes. A dispersão das diferenças dos dados não está tendenciosa e, grande parte deles, está distribuída em torno da média.

As avaliações pelo teste de Mann-Whitney e por meio do gráfico de Bland & Altman demonstraram que as técnicas são comparáveis e que a metodologia enzimática cíclica pode ser outra opção adotada na determinação dos níveis plasmáticos de homocisteína em laboratórios clínicos.

O estudo comparativo ou comparação de métodos tem por objetivo conhecer o grau de proximidade dos resultados obtidos pelos diferentes métodos de ensaio. Pode ser feito utilizando um método interno e um método de referência, buscando avaliar a exatidão do método interno relativamente ao de referência (SILVA & ALVES, 2006).

A comparação de métodos fornece informações úteis aos laboratórios como sensibilidade, seletividade, robustez, precisão, exatidão, tempo e simplicidade no preparo da amostra, e custo por análise, permitindo a cada laboratório fazer a escolha do método/técnica de acordo com seu propósito e com as condições analíticas disponíveis.

A cromatografia líquida com detecção fluorimétrica é muito utilizada na determinação plasmática da homocisteína (PFEIFFER et al., 1999; KAPRAL et al., 2002; HARBOE-GONÇALVES et al., 2005) e é considerada padrão ouro na análise deste aminoácido pela boa sensibilidade e especificidade. Por este motivo e pela disponibilidade de equipamento, foi feita a escolha desta técnica no presente estudo, com a proposta de quantificar e conhecer o perfil em relação à homocisteína em pacientes portadores de hipertensão pulmonar. Entretanto, outras técnicas podem fornecer resultados com a mesma qualidade em um tempo menor de análise, como a metodologia enzimática cíclica, possibilitando ao pesquisador uma opção na determinação de homocisteína.

O preparo de amostra no método validado por CLAE é totalmente manual e envolve várias etapas como redução dos grupos tióis, precipitação de proteínas e derivatização da homocisteína. A metodologia enzimática cíclica, por sua vez, necessita de um analisador automático capaz de realizar a leitura em dois comprimentos de ondas (340 nm e 700 nm). O preparo prévio da amostra consiste na redução da homocisteína seguida de etapas catalisadas por enzimas que promovem a formação de uma reação cíclica permitindo a amplificação da resposta no sistema.

O tempo gasto no preparo de amostra pelo método de determinação de homocisteína validado por CLAE é de cerca de 2 horas enquanto que na metodologia enzimática cíclica, cerca de 10 minutos. Este fator é crucial para o laboratório uma vez que a agilidade na execução contribui muito para o tempo de liberação do resultado para o paciente, além de permitir realizar um maior número de amostras por dia.

A metodologia validada de homocisteína por CLAE (linearidade até 85,0 $\mu\text{mol/L}$ e limite de detecção de 1,0 $\mu\text{mol/L}$) apresenta maior faixa de trabalho e sensibilidade analítica quando comparada à metodologia enzimática cíclica (linearidade de 50,0 $\mu\text{mol/L}$ e limite de detecção de 1,74 $\mu\text{mol/L}$). O fabricante do kit menciona a possibilidade de realizar diluições das amostras que apresentarem valores superiores a 50 $\mu\text{mol/L}$, como uma alternativa para a liberação de resultados mais altos de homocisteína.

A precisão da metodologia enzimática cíclica com desvio padrão relativo de $\leq 5,6\%$ foi melhor quando comparada à CLAE com desvio padrão relativo de $\leq 8,0\%$. Ambas as metodologias atendem às especificações desejáveis

propostas na variação biológica por Westgard que é $\leq 10,3\%$ (RICOS et al., 1999).

Até a presente data, não existem *kits* comerciais para análise de homocisteína por CLAE, por este motivo a validação do método, assim como o preparo de todos os reagentes se fazem necessários em qualquer laboratório que escolher essa metodologia. Este fator pode contribuir para aumentar a variação do ensaio. O cromatógrafo é um equipamento de alta sensibilidade necessitando que a amostra seja introduzida o mais “limpa” possível, como forma de preservar os componentes deste equipamento. Os equipamentos de apoio utilizados como balança e medidor de pH e o próprio tempo de análise da homocisteína no cromatógrafo, podem também inferir maior variabilidade quando comparada à técnica automatizada, utilizada nesse estudo.

Quanto à relação custo/benefício, das duas técnicas, fica difícil de ser avaliada, pois vai depender das instalações de cada laboratório, bem como a qualificação da equipe que compõem o mesmo, da demanda requerida, do poder de compra etc. O equipamento de cromatografia é de custo elevado, é restrito a determinadas análises, de manuseio não muito fácil, sendo necessário uma equipe treinada. Já a metodologia enzimática cíclica utiliza um analisador automático que também pode ser adotado para análise de muitos outros analitos no laboratório, é de manuseio simples, e favorece maior assimilação da equipe que o opera. A possibilidade do laboratório obter o equipamento por meio de comodato vem facilitar ainda mais a implementação e aquisição desta técnica.

Alguns estudos avaliando as técnicas para determinação da homocisteína estão descritos na literatura. Gascón et al. (2010) avaliaram a técnica automatizada de quimioluminescência comparando-a com a CLAE analisando 20 amostras de pacientes. O estudo comparativo utilizou a correlação de Pearson e mostrou um coeficiente de correlação (r) de 0,821 para valores normais de homocisteína e r de 0,899 para valores de hiperhomocisteinemia. Os autores sugerem que a técnica de quimioluminescência pode ser adotada no laboratório para análise deste aminoácido. Dubská & Hyanek (2009) citam que a metodologia enzimática cíclica é facilmente realizada no laboratório podendo ser adotada na quantificação de homocisteína. La'ulu et al. (2008) avaliaram 6 métodos automatizados para

determinação de homocisteína. Entre estes, foram avaliados 2 ensaios enzimáticos (sendo a metodologia enzimática cíclica avaliada em um destes) e 4 metodologias por imunoensaio de fabricantes diferentes, cujos resultados foram comparados àqueles por meio da técnica de CLAE, detector fluorescente. Neste estudo foram avaliadas 101 amostras nas concentrações de 4,4 a 52,7 $\mu\text{mol/L}$. Todos os métodos empregados correlacionaram-se bem com a técnica de CLAE quando avaliados pela regressão de Deming apresentando coeficientes de correlação entre 0,95 e 0,99. A metodologia enzimática cíclica apresentou um r de 0,98 quando comparada com a técnica de CLAE. Este estudo mostrou que a automação pode ser uma excelente opção para o laboratório clínico na quantificação da homocisteína.

O achado neste estudo foi semelhante ao encontrado na literatura, ou seja, as técnicas podem ser comparáveis. A metodologia enzimática cíclica, sem dúvida, representa uma opção ao laboratório pela sua facilidade de execução, rapidez na análise e qualidade do resultado. Contudo, observa-se crescente avanço no emprego da cromatografia líquida de alta eficiência como “migração de técnica” em função da alta especificidade e sensibilidade. A indicação, desta técnica, seria feita, caso o laboratório tenha condições financeiras para aquisição do equipamento e mão-de-obra especializada para garantir o desenvolvimento de métodos confiáveis, exatos e precisos. Cabe ao laboratório clínico delinear as suas necessidades e escolher a melhor técnica que favoreça os dois lados, propiciando ao paciente um resultado confiável e um prazo de entrega adequado.

5.3 Características gerais dos pacientes com hipertensão pulmonar

Neste estudo 37 pacientes foram avaliados (26 do sexo feminino e 11 do sexo masculino). Os pacientes apresentaram uma ampla faixa etária, de 19 a 80 anos. Das 26 pacientes do sexo feminino com HP, apenas 8 manifestaram a forma idiopática da doença (7 delas com idade entre 32 e 49 anos), enquanto no grupo dos homens apenas 4 apresentaram a forma idiopática. Esse achado foi concordante com as diretrizes de Hipertensão Arterial Brasileira que

descreve uma prevalência maior da forma idiopática em mulheres na terceira e quarta década de vida.

A Tabela 12 demonstra o percentual dos pacientes do estudo em relação ao sexo, idade, às classificações clínica e funcional da HP, teste de caminhada de 6 minutos e IMC.

Tabela 12: Perfil dos pacientes portadores de HP expressos em percentual em função do sexo, classificação clínica, classificação funcional, teste de caminhada de 6 minutos e o IMC

| Parâmetro | Percentual dos pacientes (%) (n=37) |
|--|--|
| Sexo | |
| Feminino | 70,3 |
| Masculino | 29,7 |
| Classificação clínica | |
| Idiopática | 32,4 |
| TEP crônico | 32,4 |
| Cardiopatía congênita | 21,6 |
| Esclerodermia | 8,2 |
| Lupus Eritematoso | 2,7 |
| Esquistossomose | 2,7 |
| Classificação Funcional | |
| Classe I | 5,4 |
| Classe II | 43,3 |
| Classe III | 45,9 |
| Classe IV | 5,4 |
| Teste de caminhada de 6 minutos | |
| Inferior a 332 metros | 45,9 |
| Superior a 332 metros | 54,1 |
| IMC | |
| <30 kg/m ² | 81,1 |
| >30 kg/m ² | 18,9 |

Classificação clínica de acordo com Galié et al., (2009); Classificação funcional de acordo com NYHA; Corte estabelecido para Teste de caminhada de 6 minutos de acordo com BARRETO, S. S. M., (2009); IMC de acordo com a ABESO (2009)

5.4 Níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de hipertensão pulmonar

Dos resultados obtidos, 67,6% dos pacientes portadores de hipertensão pulmonar apresentaram valores compreendidos dentro da faixa normal, ou

seja, de 5,1 a 14,8 $\mu\text{mol/L}$, 27,0 % dos pacientes apresentaram o quadro de hiper-homocisteinemia leve e 5,4% apresentaram o quadro de hiper-homocisteinemia moderada. Os resultados de homocisteína foram correlacionados com parâmetros contidos na ficha clínica (**ANEXO C**) de forma agrupada para aumentar o “n” e obter maior relevância estatística. Os níveis de homocisteína foram analisados quanto à idade, classificação clínica e funcional da doença, desempenho no teste de caminhada de 6 minutos e o IMC.

5.4.1 Níveis plasmáticos de homocisteína e a idade dos pacientes portadores de hipertensão pulmonar

A média de idade do grupo dos pacientes portadores de HP foi utilizada como ponto de corte para avaliar a influência da idade nos níveis de homocisteína plasmática. Desta forma, os níveis de homocisteína foram avaliados em duas faixas etárias: pacientes com idade até 49 anos e pacientes com idade superior a 50 anos.

Como os resultados de homocisteína não seguiram a distribuição normal aplicou-se o teste de Mann Whitney para investigar se existe diferença entre as medianas dos dois grupos (Tabela 13). Observou-se que existe diferença significativa entre a mediana dos grupos avaliados. Assim, o grupo de pacientes com idade ≥ 50 anos apresentou valores de homocisteína mais elevados do que os pacientes com idade ≤ 49 anos ($p= 0,010$).

Tabela 13 - Níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de HP, por faixa etária, expressos como mediana e intervalo interquartil (II)

| Idade | Número de pacientes | Mediana (II) ($\mu\text{mol/L}$) | p* |
|----------------|---------------------|------------------------------------|-------|
| ≤ 49 anos | 18 | 11,85 (4,02) | 0,010 |
| ≥ 50 anos | 19 | 15,49 (4,83) | |

*Teste de Mann-Whitney, II – intervalo interquartil

A Figura 12 mostra a relação entre os valores de homocisteína nos grupos estratificados de acordo com a idade. Pode-se observar na Figura 12(a)

a diferença nítida entre as medianas dos dois grupos. O gráfico de pontos na Figura 12**(b)** apresenta um deslocamento para valores mais altos de homocisteína, de forma evidente, nos pacientes com idade superior a 50 anos.

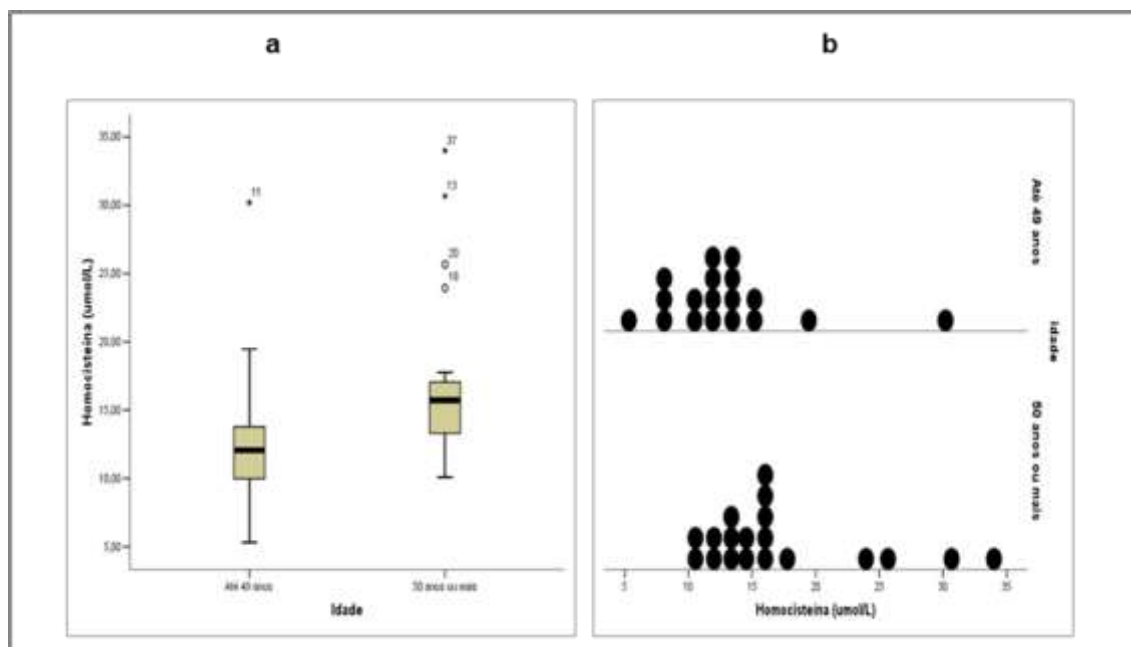


Figura 12 – Níveis plasmáticos de homocisteína associados à idade em pacientes portadores de hipertensão pulmonar

- a- Medianas e intervalos interquartis para os níveis de homocisteína em pacientes portadores de HP com idade até 49 anos e acima de 50 anos
- b- Distribuição dos níveis de homocisteína em pacientes portadores de HP com idade até 49 anos e acima de 50 anos

A idade representa um fator de risco para muitas doenças. Entre estas, cita-se a doença aterosclerótica, na qual a homocisteína parece ter importante papel (SANTOS-FILHO et al., 2002). Tem sido hipotetizado que o metabolismo deste aminoácido possa sofrer alterações com o avançar da idade favorecendo o seu aumento.

Diversos são os estudos que relacionam os níveis de homocisteína e a idade. Assim, Eckardstein et al. (1994) demonstraram em um estudo envolvendo 199 pacientes com doença coronária e 156 indivíduos controles, que os níveis de homocisteína apresentam uma correlação positiva com a idade em ambos os grupos estudados. Ganjii & Kafai (2003), também avaliaram os níveis de homocisteína em 6545 pacientes de ambos os sexos, tendo os autores reportado, importante correlação positiva entre os níveis de

homocisteína e a idade. Neste estudo foi observado que os pacientes com idade superior a 70 anos apresentaram valores de homocisteína cerca de 40% (3,6 $\mu\text{mol/L}$) mais altos que os indivíduos com idade entre 50 e 69 anos.

A correlação positiva, encontrada no presente estudo, dos níveis de homocisteína com a idade foi semelhante a da literatura. Os níveis aumentados de homocisteína observados em função da idade vêm corroborar com aqueles já descritos pela literatura. Os pacientes com idade acima de 50 anos apresentaram valor de mediana de 15,49 $\mu\text{mol/L}$ de homocisteína, enquanto os pacientes com idade inferior a 49 anos apresentaram mediana de 11,85 $\mu\text{mol/L}$ de homocisteína.

O aumento da homocisteína com o avançar da idade pode estar associado à diminuição da atividade da enzima cistationina β -sintetase. Gartler et al. (1981) relatam uma diminuição dessa enzima com o envelhecimento. Sabe-se que a redução dessa enzima inibe a etapa de transulfuração resultando em menor conversão da homocisteína em cistationina e, conseqüentemente, levando ao acúmulo deste aminoácido. Outros fatores relacionados ao aumento dos níveis de homocisteína em função do envelhecimento seriam o possível declínio da atividade da função renal, a menor absorção intestinal da vitamina B12 e a diminuição dos níveis de folato (TUCKER et al., 1996; PANICO et al., 2004).

5.4.2 Níveis plasmáticos de homocisteína e a classificação clínica dos pacientes portadores de hipertensão pulmonar

Para avaliar no presente estudo os níveis plasmáticos de homocisteína em função da classificação clínica da HP, os pacientes foram estratificados da seguinte forma: **a)** aqueles que evoluíram para a hipertensão pulmonar associada a outras doenças (TEP crônico, esclerodermina, lupus eritematoso, esquistossomose e cardiopatia congênita) e, **b)** aqueles que apresentaram a forma idiopática da doença.

Como os resultados de homocisteína não seguiram a distribuição normal aplicou-se o teste de Mann Whitney. Os resultados estão apresentados na

Tabela 14. Observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos estudados.

Tabela 14 - Níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de HAP idiopática e em pacientes portadores de HP associado a outras doenças, expressos como mediana e intervalo interquartil (II)

| Classificação Clínica | Número de pacientes | Mediana (II) ($\mu\text{mol/L}$) | p* |
|-----------------------------------|--------------------------------|--|-----------|
| HAP idiopática | 12 | 13,21 (4,21) | 0,347 |
| HP associada a doenças | 25 | 13,59 (6,97) | |

*Teste de Mann Whitney, II – interval interquartil

A Figura 13 apresenta os valores de homocisteína nos grupos estratificados de acordo com a classificação clínica da doença, se idiopática ou secundária a outras doenças. Observou-se que as medianas nos dois grupos avaliados estão muito próximas. O intervalo interquartil para os níveis de homocisteína dos pacientes, cuja hipertensão pulmonar evoluiu em função de outras doenças se mostrou maior quando comparado aos pacientes com a forma idiopática da doença.

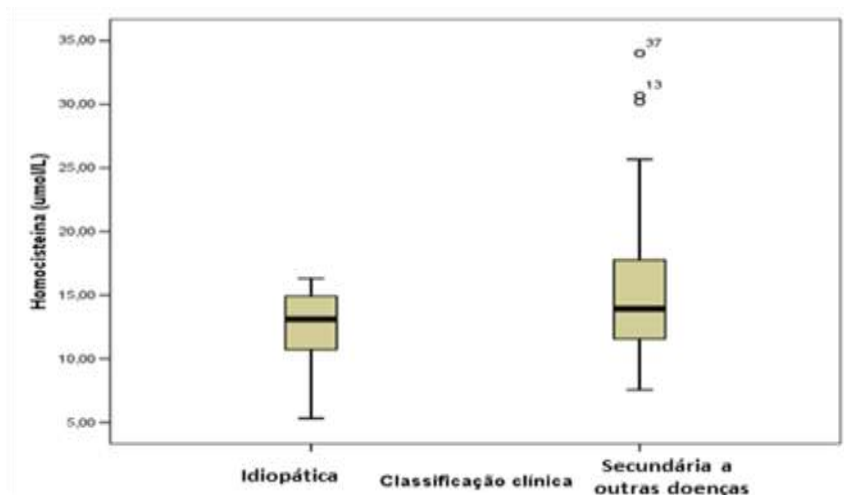


Figura 13 – Níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de hipertensão arterial pulmonar idiopática e hipertensão pulmonar secundária a outras doenças expressos como mediana e intervalo interquartil (II)

Neste estudo, a comparação entre os níveis plasmáticos de homocisteína de pacientes com a forma idiopática (mediana: 13,59 $\mu\text{mol/L}$) e aqueles associados a outras doenças (13,21 $\mu\text{mol/L}$) não mostrou diferença significativa. Embora o número de amostras testadas tenha sido bastante limitado por se tratar de doença rara, ao que parece, os níveis de homocisteína não sofrem influência em função da etiologia da HP. Níveis das vitaminas B6 e B12, cofatores no metabolismo da homocisteína, também poderiam refletir no perfil encontrado, além do estilo de vida no que se refere à alimentação e tabagismo por exemplo.

O aspecto histológico da hipertensão pulmonar é muito característico na forma idiopática (COTRAN et al., 2000), refletindo possivelmente o dano endotelial. Os esforços relacionados ao tratamento estão mais voltados à forma idiopática (HAPI), uma vez que a causa desta é desconhecida. Desse modo, pode-se sugerir que a avaliação da HP com marcadores de dano endotelial, como a homocisteína, poderia ser útil para acompanhar a evolução da doença na forma idiopática, em função da expectativa de se encontrar níveis mais elevados deste aminoácido e de outros fatores potencialmente lesivos à célula endotelial.

Zighetti et al., (1997) não encontraram associação entre os níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de HAPI quando

comparados ao grupo controle. Por outro lado, Arroliga et al. (2003) determinaram os níveis de homocisteína plasmática total, folato e vitamina B12 em 18 pacientes com hipertensão pulmonar primária (idiopática) da *Cleveland Clinic Foundation* e em 36 controles saudáveis tendo estes autores encontrado níveis aumentados de homocisteína nestes pacientes ($14,7 \pm 7,2$) $\mu\text{mol/L}$, quando comparados ao grupo controle ($10,2 \pm 5,1$) $\mu\text{mol/L}$.

Os resultados obtidos no presente estudo foram semelhantes aos encontrados por Zighetti et al. (1997) que também não observaram associação entre a hiper-homocisteinemia e hipertensão arterial pulmonar idiopática. Resultados não consistentes entre estudos podem ser atribuídos a diferenças na técnica empregada para a dosagem de homocisteína, além de fatores genéticos e estilo de vida, dentre outros. Embora não tenham sido observados níveis plasmáticos elevados de homocisteína nos pacientes com a forma idiopática da doença no presente estudo, ainda assim, acredita-se que, como a homocisteína é potencialmente indutora de lesão endotelial, a sua avaliação deve ser considerada na evolução e monitoramento do tratamento desta doença.

Avaliando os pacientes separadamente, pode ser observado que no grupo portador de HAPI, 25% (n=3) apresentaram valores superiores a 15,0 $\mu\text{mol/L}$, valor considerado acima da referência estimada por muitos autores, caracterizando estes pacientes como portadores de hiper-homocisteinemia leve (intervalo entre 15,1 a 30 $\mu\text{mol/L}$). Todavia, dentre estes pacientes, 2 apresentavam idade acima de 50 anos, ou seja, 60 e 64 anos, respectivamente. Nestes casos, pode-se inferir que a idade seja o fator determinante do aumento dos níveis de homocisteína. O outro paciente apresentou idade de 24 anos, classificação funcional IV, declarou hábito tabagista e IMC normal. Neste caso, outras variáveis como defeitos genéticos no metabolismo da homocisteína, alimentação e tabagismo, dentre outros fatores, podem ter influenciado no leve aumento deste aminoácido.

Com referência ao grupo de pacientes com HP associado a outras doenças, 40% (n=10) dos pacientes apresentaram valores acima da faixa de referência. A doença associada que contribuiu em maior parte para o aumento da homocisteína no grupo de HP secundária a outras doenças foi o TEP crônico.

Dos 12 pacientes portadores de TEP crônico, 7 apresentaram valores de homocisteína mais altos correspondendo a cerca de 58% dos pacientes. Os valores de homocisteína encontrados em 2 desses pacientes enquadraram-se na faixa de hiper-homocisteinemia moderada, entre 30,1 a 100 $\mu\text{mol/L}$. Os 5 restantes apresentaram hiper-homocisteinemia leve, entre 15,1 a 30 $\mu\text{mol/L}$. Desta forma, pode-se inferir que pacientes com TEP crônico podem apresentar níveis elevados de homocisteína, sendo possível que tal aumento seja provocado por fatores genéticos (deficiência genética da metileno tetraidrofolato redutase ou da β cistationina sintase) ou adquiridos (deficiências vitamínicas, tabagismo, idade, etc). Entretanto, cumpre ressaltar que tais fatores poderiam estar contribuindo para o desencadeamento do TEP.

Diante dos resultados obtidos, foi realizada a avaliação dos níveis plasmáticos de homocisteína nos pacientes portadores de HP associada ao TEP comparando com os demais pacientes do estudo. Como os resultados de homocisteína não seguiram a distribuição normal aplicou-se o teste de Mann Whitney, para verificar se havia diferença entre os pacientes obtendo os resultados demonstrados na Tabela 15.

Tabela 15 - Níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de HP associado ao TEP crônico e nos demais pacientes do estudo, expressos como mediana e intervalo interquartil (II)

| Classificação Clínica da HP | Número de pacientes | Mediana (II) ($\mu\text{mol/L}$) | p* |
|------------------------------------|----------------------------|--|-----------|
| TEP crônico | 12 | 15,81 (17,10) | |
| Demais pacientes | 25 | 13,10 (4,64) | 0,034 |

*Teste de Mann Whitney , HP – hipertensão pulmonar, TEP – tromboembolismo pulmonar, II - intervalo interquartil

Conforme observado na Tabela 15, houve diferença significativa entre as medianas dos dois grupos, sendo os níveis de homocisteína mais elevados em pacientes portadores de TEP crônico quando comparados aos demais pacientes do estudo ($p=0,034$).

A Figura 14 mostra os valores de homocisteína nos grupos estratificados de acordo com a associação ou não ao TEP crônico. Observa-se na Figura

14(a) que as medianas dos dois grupos são diferentes e que a variação presente no grupo associado ao TEP crônico, representado pelo intervalo interquartil, também é relevante. Na Figura 14(b), pode-se observar a distribuição dos valores de homocisteína nos dois grupos avaliados, sendo que alguns pacientes do estudo, portadores de HP associada ao TEP crônico, apresentaram valores de homocisteína superiores a 30 $\mu\text{mol/L}$, caracterizando o quadro de hiper-homocisteinemia moderada (entre 30,1 a 100 $\mu\text{mol/L}$).

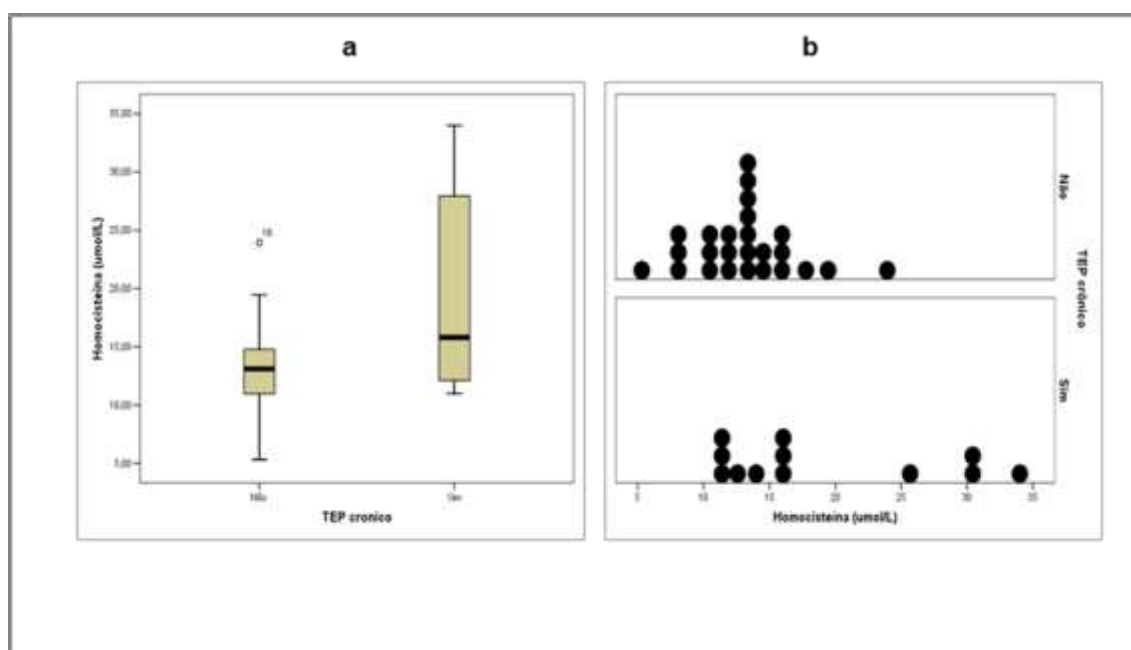


Figura 14 - Níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes com HP associada ou não ao TEP crônico

a- Medianas e intervalos interquartis para os níveis de homocisteína em pacientes portadores de HP associada ou não ao TEP crônico

b- Distribuição dos valores de homocisteína em pacientes portadores de HP associada ou não ao TEP crônico

Em um relato de caso publicado por Fumagalli et al. (2010), foi observado nível mais alto de homocisteína em uma paciente grávida portadora de TEP crônico. Em consonância com o relato de caso anterior, Terra-Filho et al. (2010b) relataram em um estudo com 31 pacientes portadores de HP associados ao TEP crônico que 5 destes apresentaram valores de homocisteína acima de 19,0 $\mu\text{mol/L}$.

A hiper-homocisteinemia é considerada atualmente fator de risco no aparecimento do tromboembolismo venoso. Acredita-se que em concentrações

mais altas o risco de trombose possa estar aumentado em até três vezes (TERRA-FILHO et al., 2010a).

De acordo com a Diretriz da Sociedade de Pneumologia e Tisiologia, alguns pacientes com HP que apresentam a forma hipertensiva do TEP crônico evoluíram do quadro de tromboembolismo venoso (TEV). O aparecimento desta forma hipertensiva pode estar ligado também a outros fatores como hereditários ou adquiridos, cuja fisiopatologia está intrinsecamente ligada à da trombose venosa profunda (TVP), pois aproximadamente 79% dos pacientes com TEP têm evidência de TVP nos membros inferiores e 50% dos pacientes com TVP apresentam embolização pulmonar. Sendo assim, os fenômenos tromboembólicos (TVP+TEP) podem compartilhar os mesmos fatores de risco (VOLPE et al., 2010).

Os trombos migram para os pulmões através da veia cava inferior, a partir das veias profundas dos membros inferiores e pelve. Desta maneira, a embolia pulmonar, ou melhor, o tromboembolismo pulmonar (TEP), pode ser considerado complicação da trombose venosa profunda (GUIMARÃES, 2005). Evidencia-se no quadro de TEP crônico, estase do fluxo venoso, lesão ou inflamação endotelial e estados de hipercoagulabilidade. Tais fatores também são influenciados indiretamente pelo aumento da homocisteína, podendo acentuar ainda mais o quadro hipertensivo.

Os achados neste estudo sugerem que a homocisteína possa ser um fator independente ao desenvolvimento da HP sendo importante seu monitoramento no grupo de pacientes, em especial, aqueles que evoluem para o quadro hipertensivo a partir do TEP crônico.

5.4.3 Níveis plasmáticos de homocisteína, classificação funcional da hipertensão pulmonar e teste de caminhada de 6 minutos, em pacientes portadores de hipertensão pulmonar

Os pacientes com HP foram agrupados de acordo com a classificação funcional em grupos I e II *versus* grupos III e IV. Para se avaliar a variável TC6M, calculou-se uma média da distância percorrida pelos pacientes, tendo sido estabelecido um ponto de corte de 350m. Assim, os pacientes, foram

distribuídos em dois subgrupos: **a)** aqueles que percorreram menos que 350m e, **b)** aqueles que percorreram 350m ou mais. Dos 37 pacientes do estudo, apenas 1 paciente não conseguiu completar o TC6M em decorrência do estado avançado da doença.

Como os resultados de homocisteína dos pacientes com HP não seguiram a distribuição normal, aplicou-se o teste de Mann Whitney para verificar se havia diferença entre os pacientes. Os resultados da análise estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de HP, distância percorrida no teste de caminhada de 6 minutos e a classificação funcional da doença expressos como mediana e intervalo interquartil (II)

| Parâmetro | Distância percorrida <350m | Distância percorrida ≥350m | Grupo I e II | Grupo III e IV |
|------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|---------------------|-----------------------|
| Mediana (µmol/L) (II) | 13,43 (3,69) | 13,59 (6,93) | 14,51 (5,92) | 13,10 (4,11) |
| p* | 0,496 | | 0,447 | |

*Teste de Mann Whitney, II – Intervalo interquartil

Nenhuma diferença foi observada para os níveis plasmáticos de homocisteína em relação à distância percorrida ($p= 0,496$), bem como, em relação aos grupos classificados sob o ponto de vista funcional I e II *versus* III e IV ($p= 0,447$). Estes resultados podem ser observados na Figura 15.

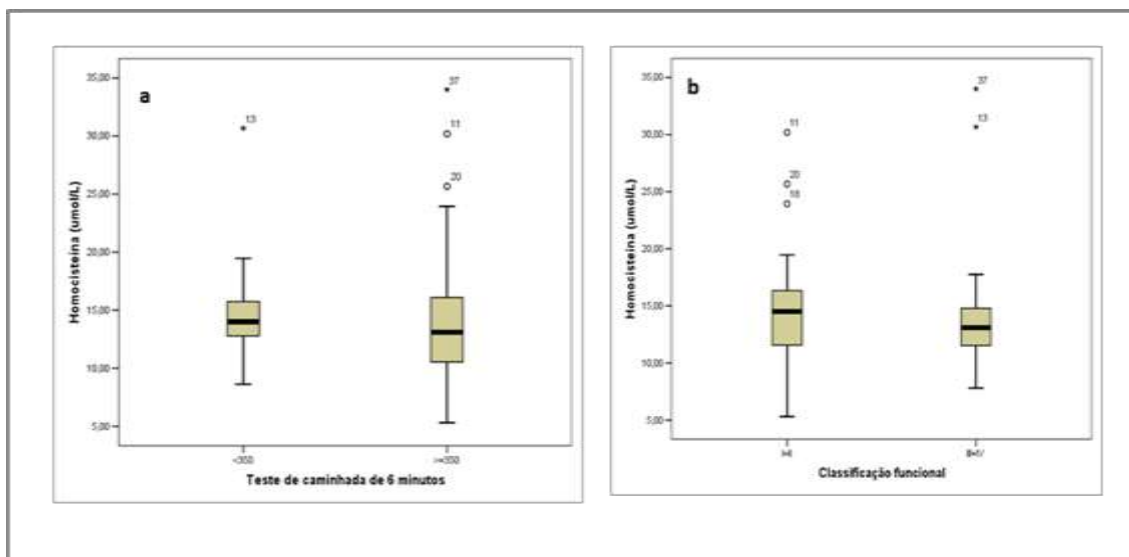


Figura 15 – Níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de HP
a - em função da distância percorrida no TC6M; b- em função da classificação funcional da doença

O diagnóstico e a evolução da HP são acompanhados por meio de avaliações que têm por objetivo monitorar e medir a capacidade física de cada paciente. A classificação funcional traduz qualitativamente o acometimento da doença e está intimamente ligado ao cansaço, dispnéia, fadiga e intolerância ao esforço relatados pelo paciente nos momentos da consulta (LAPA et al., 2006). O grau de sintomatologia clínica reflete o nível de acometimento funcional da doença. Todavia, é importante ressaltar que existem limitações na classificação funcional, a qual é dependente do paciente e do clínico que o acompanha, podendo haver diferença na existência de duplo-observador. Porém, estas avaliações assumem importância na sobrevida dos pacientes e são utilizadas para determinar a evolução da hipertensão pulmonar (CAMARGO, 2008).

Com base nos resultados dos níveis plasmáticos de homocisteína em função da distância percorrida e da classificação funcional, pode-se inferir que a homocisteína parece não ser um fator capaz de influenciar a intolerância ao esforço apresentada por estes pacientes.

Os valores normais para o teste de caminhada são considerados em distância percorrida, 576 metros para homens e 494 metros para mulheres (ENRIGHT & SHERRIL, 1998). Valores inferiores a 332 metros podem estar

associados à taxa de mortalidade, de forma independente (BARRETO, S. S. M., 2009). Alguns fatores podem influenciar em um menor desempenho no TC6M como baixa estatura, idade avançada, excesso de peso, gênero feminino e comprometimento do estado de saúde (MORALES-BLANHIR et al., 2011).

Apenas dois pacientes do presente estudo apresentaram-se dentro da normalidade (504 e 616 metros) para o TC6M. Ambos pacientes apresentaram níveis de homocisteína inferiores a 15,0 μ mol/L. Entretanto, vale ressaltar que as menores distâncias percorridas não apresentaram necessariamente níveis elevados de homocisteína. Como os pacientes estavam em uso de medicamentos, tais como Bosentana (antagonista do receptor de endotelina) e/ou Sildenafil (inibidor das fosfodiesterases-5), provavelmente estes contribuíram para melhorar o desempenho dos pacientes com HP (OLIVEIRA et al., 2005; TEIXEIRA, 2009).

Não foram encontradas referências na literatura que avaliassem simultaneamente a limitação física e os níveis de homocisteína na HP. Todavia, Amorim (2011b), avaliaram níveis de atividade física e de homocisteína em pacientes com artrite reumatóide e não encontraram associação. Estes autores descreveram que a prática do exercício físico está ligada ao aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico e que a hiperhomocisteinemia pode inibir este mecanismo. Além do mais, eles relataram que após inserção de exercício regular, os níveis de homocisteína não se apresentaram significativamente menores.

Curiosa e paradoxalmente, Refsum et al. (2006), encontraram níveis inversamente proporcionais de homocisteína em relação à atividade física. Os autores ainda mostraram que os níveis mais altos de homocisteína estavam associados aos pacientes praticantes de exercício intenso enquanto níveis menores estavam associados à prática de exercícios regulares.

5.4.4 Níveis plasmáticos de homocisteína e o índice de massa corporal (IMC) em pacientes portadores de hipertensão pulmonar

Para o estudo da variável IMC sobre os níveis plasmáticos de homocisteína, o corte de 30,0 kg/m² foi estabelecido para o agrupamento dos pacientes. Dessa forma, os pacientes com HP foram distribuídos em duas categorias: a) aqueles com o IMC <30 kg/m² e, b) aqueles com IMC ≥30 kg/m².

O teste Mann-Whitney foi aplicado para investigar a diferença estatística entre as medianas, comparadas separadamente para o IMC nos grupos estratificados. Os resultados estão demonstrados na Tabela 17.

Tabela 17- Níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de HP em função do IMC expressos em mediana e intervalo interquartil (II)

| Parâmetro avaliado | IMC <30 kg/m ² | IMC ≥30 kg/m ² |
|----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Mediana (µmol/L) (II) | 13,60 (5,79) | 12,47 (4,22) |
| p* | 0,078 | |

*Teste de Mann Whitney, II – intervalo interquartil

Os dados mostram que não foram observadas diferenças para os níveis plasmáticos de homocisteína de pacientes portadores de HP entre aqueles com IMC <30 kg/m² e IMC ≥30 kg/m².

A Figura 16 mostra a relação entre os níveis plasmáticos de homocisteína nos grupos estratificados de acordo com o IMC. Podemos observar que as medianas dos grupos formados apresentaram valores estatisticamente semelhantes.

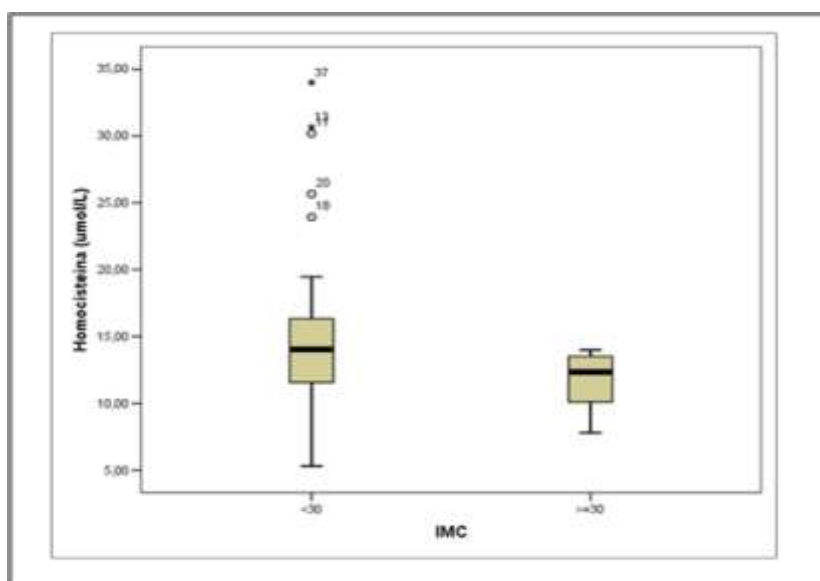


Figura 16 - Níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de HP em função do IMC

IMC – Índice de Massa Corporal

O IMC acima de 25 kg/m^2 pode caracterizar o sobrepeso estando associado ao maior risco de desenvolvimento de morbidades crônicas (CASTRO et al., 2004). Sabe-se que a obesidade, obtida por meio do IMC, e níveis elevados de homocisteína estão intimamente ligados a eventos ateroscleróticos (VENÂNCIO et al., 2009). No entanto, para a HP, não foram encontrados relatos na literatura investigando estes dois fatores simultaneamente.

A relação entre níveis de homocisteína e o IMC parece controversa nos estudos publicados. Assim, Lussier-Cacan et al. (1996) e Mendes et al. (2006) não encontraram relação entre os níveis aumentados de homocisteína e o IMC em pacientes com doença coronária. Por outro lado, Venâncio et al. (2009) encontraram correlação positiva entre os níveis de homocisteína e o IMC em pacientes com doença arterial periférica, enquanto Jacques et al. (2001) sugerem que o IMC a partir de $30,7 \text{ kg/m}^2$ começa a se correlacionar com níveis mais elevados de homocisteína.

Com base nos dados observados no presente estudo, embora obesidade e sobrepeso possam estar correlacionados com a peroxidação lipídica e com níveis mais altos de homocisteína o que, à princípio, poderia acelerar o processo inflamatório e talvez contribuir para a progressão da

hipertensão pulmonar, pode-se afirmar que os níveis de homocisteína não foram afetados pelo IMC dos pacientes com HP. Variáveis como ingestão de vitaminas, por exemplo, podem estar contribuindo para o perfil encontrado. Cumpre ressaltar que o número de pacientes com IMC ≥ 30 kg/m² (n=7) foi bastante limitado para permitir uma análise confiável entre os níveis de homocisteína e o IMC.

6. CONCLUSÃO

Os dados analisados em conjunto permitem concluir que:

- ✓ O estudo possibilitou a validação do método de determinação da homocisteína por cromatografia líquida de alta eficiência, com as seguintes vantagens:
 1. Precisão, exatidão e sensibilidade adequadas;
 2. Robustez satisfatória após pequenas modificações realizadas podendo refletir em menor custo da análise;
 3. Boa concordância entre diferentes analistas;
 4. Aplicável em outros estudos para avaliar os níveis de homocisteína.

- ✓ O estudo comparativo entre a metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência e a metodologia enzimática cíclica (EC) por espectrofotometria mostrou que a EC pode ser uma opção de método automatizado para laboratórios clínicos, com qualidade comparável ao método validado.

- ✓ Não foram observadas diferenças entre os níveis plasmáticos de homocisteína em relação ao IMC, classificação funcional da hipertensão pulmonar e resultados no teste de caminhada de 6 minutos.

- ✓ Os níveis plasmáticos de homocisteína não foram diferentes na forma idiopática da hipertensão pulmonar quando comparados aqueles observados em pacientes com hipertensão pulmonar associada a outras doenças.

- ✓ Os níveis plasmáticos de homocisteína se mostraram mais elevados em pacientes com hipertensão pulmonar em função da idade.

- ✓ Os níveis plasmáticos de homocisteína foram mais elevados em pacientes com HP secundária ao TEP crônico quando comparados aos níveis observados nos demais pacientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESO (Associação Brasileira para o estudo da obesidade e da síndrome metabólica). **Diretrizes Brasileiras de Obesidade**. São Paulo: ABESO, 2009, 85p.

AIELLO, V. D.; CANZIAN, M. Imagens Histopatológicas da Doença Vascular Pulmonar: Parte 1. **PVRI preview**, v.1, p. 4-8, 2009.

ALTINOVA, A. E.; YETKIN, I. Homocysteine and Atherosclerosis. **Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism.**, v. 4, p. 137-140, 2002.

AMORIM, F. G.; REZENDE, L. C. D.; COITINHO, L. B.; FREITAS, J. V.; SCHERR, J. A.; DETTOGNI, R. S. Bioquímica Clínica da aterosclerose provocada por hiperhomocisteinemia. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.8, n.1, 36-59, 2011.

AMORIM, K. S.; LOPES, A. S.; PEREIRA, I. A. Impacto do exercício físico nos níveis de homocisteína, um fator de risco para aterosclerose: revisão sistemática. **Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde**, v. 16, n.1, p. 70-75, 2011a.

AMORIM, K. S. Relação entre o nível de atividade física e a concentração plasmática de homocisteína em mulheres com artrite reumatóide. 2011. 81f. Dissertação- Pós Graduação em Educação física, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011b.

ARROLIGA, A. C.; SANDUR, S.; JACOBSEN, D.; TEWARI, S.; MUSTAFA, M.; MASCHA, E. J.; ROBINSON, K. Association between hyperhomocysteinemia and primary pulmonary hypertension. **Respiratory Medicine**, v. 97, p. 825-834, 2003.

ATKINSON, C.; STEWART, S.; UPTON, P. D.; MACHADO, R.; THOMSON, J. R.; TREMBATH, F. R. C. P; MORREL, W. Primary Pulmonary Hypertension Is Associated With Reduced Pulmonary Vascular Expression of Type II Bone Morphogenetic Protein Receptor. **Journal of the American Heart Association**, v.105, p. 1672 – 1678, 2002.

BARRETO, A. C.; FRANCHI, S. M.; PEREIRA, A. C.; LOPES, A. A. Hipertensão Arterial Pulmonar: Fisiopatologia, Aspectos Genéticos e Resposta ao Uso Crônico do Sildenafil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, n 2, p. 147-154, 2005.

BARRETO, S. S. M. Avaliação da capacidade de exercício na hipertensão pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.35, n.5, p. 401-403, 2009.

BARRETO, A. C. **Estudo de marcadores de disfunção endotelial e de inflamação em portadores de hipertensão arterial pulmonar: implicações terapêuticas e prognósticas**. 2011. 209f. Tese – Pós Graduação no Programa de Cardiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.8, n.3, p.328-338, 2001.

BERNARDES, A. C. M.; SOUZA S. V. C. Análise comparativa do guia para validação de métodos analíticos propostos pela ANVISA (RE no 899 de 2003) com o documento orientativo do Inmetro e o protocolo Internacional Harmonizado pela AOAC International, ISO e IUPAC. **Analytica**, n.51, p. 66-77, 2011.

BICHARA, V. M.; VENTURA, H. O.; PERRONE, S. V. Hipertensión pulmonar :la mirada del especialista. **Insuficiencia Cardiaca**,v. 6, n. 2, p. 65-79, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE no 899, de 29 de maio de 2003. Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 31 mai 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em 05/08/2012.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. **Revista Ecotoxicológica e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BRUCE, B.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochim.Acta**, v. 128, p.93-106, 1998.

BRUNINI, T. M. C.; PERINI, N.; COSTA, E.; MENDER-RIBEIRO, A. C. O papel da via L-arginina-óxido nítrico em doenças pulmonares. **Pulmão RJ**, v. 14, n.3, p.184-190, 2006.

BUDHIRAJA, R.; TUDER, R. M.; HASSOUN, P. M. Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension. **Journal of the American Heart Association**, v. 109, p. 159-165, 2004.

BYDLOWSKI, S. P.; MAGNANELLI, A. C.; CHAMONE, D. A. Hiper-Homocisteinemia e Doenças Vaso- Oclusivas. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 71, n.1, p. 69-76, 1998.

CAMARGO, V. M. **Validação de um protocolo em esteira para pacientes com hipertensão arterial pulmonar**. 2008. 66f. Tese - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. UFSCAR: São Carlos, 2001.

CASSIANO, N.; BARREIRO, C. J.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, V.; CASS, Q. B. Validação em Métodos Cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n.4, p. 1021-1030, 2009.

CASTRO, L. C. V.; FRANCESCHINI, S. C. C.; PRIORE, S. E.; PELÚZIO, M. C. G. Nutrição e doenças cardiovasculares: os marcadores de risco em adultos. **Revista de Nutrição**, v.17, n.3, p. 369-377, 2004.

CHAZOVA, I.; LOYD, J. E.; ZHDANOV, V. S.; NEWMAN, J. H.; BELENKOV, Y.; MEYRICK, B. Pulmonary Artery Adventitial Changes and Venous Involvement Primary Pulmonary Hypertension. **American Journal of Pathology**, v. 146, n. 2, p. 389-397, 1995.

CHICHIZOLA, C.; BEATRIZ, L.; MASTANDREA, C.; SÁNCHE, H. El valor diagnóstico de La homocisteína. **Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo**, v. 40, n.1, p.32-42, 2003.

CHRISTMAN, B. W.; MCPHERSON, C. D.; NEWMAN, J. H.; KING, G. A.; BERNARD, G. R.; GROVES, B. M.; LOYD, J. E. An imbalance between the excretion of tromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. **The New England Journal of Medicine**, v. 327, n.2, p. 70-75, 1992.

CODY, R. J.; HAAS, G. J.; BINKLEY, P. F.; CAPERS, Q.; KELLEY, R. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure. **Journal of the American Heart Association**, v. 85, p. 504-509, 1992.

CORREA, R. A.; MOREIRA, M. V. S. C.; SARAIVA, J. M. S.; MANCUZO, E. V.; SILVA, L. C. S.; LAMBERTUCCI, J. R. Tratamento da hipertensão pulmonar esquistossomótica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 37, n.2, p. 272-276, 2011.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2000, 1251p.

CROTI, U. A.; MATOS, S. S.; PINTO-JR, V. C.; AIELLO, V. D. **Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular Pediátrica**. São Paulo: Roca, 2008, 855p.

DALEY, E.; EMSON, C.; GUIGNABERT, C.; MELEFYT, W.; LOUTEN, J.; KURUP, V. P.; HOGABOAM, C.; TARASEVIVIENE-STEWART, L.; VOELKEL, N. F.; RABINOVITCH, M.; GRUNIG, E.; GRUNIG, G. Pulmonary arterial remodeling induced by Th2 immune response. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n.2, p. 361-372, 2008.

DENG, Z.; MORSE, J. H.; SLAGER, L. S.; CUERVO, N.; MOORE, K. J.; VENETOS, G.; KALACHICOV, S.; CAYANIS, E.; FISCHER, S. G.; BARST, R. J.; HODGE, S. E.; KNOWLES, A. J. Familial Primary Pulmonary Hypertension (Gene PPH1) Is caused by mutations in the bone Morphogenetic Protein Receptor-II Gene. **American Journal Human Genetics**, n 67, p. 737-744, 2000.

DIAS, P. M.; MEZZOMO, A.; PETEFFI, C.; PEZZI, D. R. Homocisteína : Um fator de risco vascular. **Revista Científica da AMECS**, v. 10, n.1, p. 53-58, 2001.

DOMAGALA, T. B.; UNDAS, A.; LIBURA, M.; SZCZEKLIK, A. Pathogenesis of vascular disease in hyperhomocysteinaemia. **Journal of Cardiovascular Risk**, v.5, n.4, p. 239-247, 1998.

DUBSKÁ, L.; HYÁNEK, J. Stanovení homocysteinu v biologickém materiálu. **Klin. Biochem. Metab.**, v. 17, n.38, p. 93-95, 2009.

EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, p. L221-8, 2002.

ECKARDSTEIN, A. V.; MALINOW, M. R.; UPSON, B.; HEINRICH, J.; SCHONFELD, R.; KOLLER, E.; ASSMAN, A. Effects of age, and hemostatic parameters on the role of homocyst(e)inemia as a cardiovascular risk factor in men. **Journal of the American Heart Association**, v. 14, p. 460-464, 1994.

EDDAHIBI, S.; HUMBERT, M.; FADEL, E.; RAFFESTIN, B.; DARMON, F. C.; SIMONNEAU, G.; DARTEVELLE, P.; HAMON, M.; ADNOT, S. Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n.8, p.1141-1150, 2001.

EDDAHIBI, S.; MORRELL, N.; D'ORTHO, M-P.; NAEIJE, R.; ADNOR, S. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension. **European Respiratory Journal**, v.20, p. 1559-1572, 2002.

ENRIGHT, P. L.; SHERRIL, D. L. Reference equations for the Six-Minute Walk in health adults. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 158, p. 1384-1387, 1998.

ESPINOSA, G.; CERVERA, R.; ASHERSON, R. A. The lung in the antiphospholipid syndrome. **Annals of Rheumatic Disease**, v.61, 195-198, 2002.

FLORA-FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxiido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista Ass. Med. Brasil.**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FONSECA, N.; VIDAL, N.; SANTOS, J.; BRITO, A. P.; BERNARDINO, L.; SILVESTRE, I.; INÊS, L. Um caso Clínico de Hiperhomocisteinémia. **Rev. Port. Cardiol.**, v. 22, n.2, p. 223-230, 2003.

FRANÇA, L. H. G. **Hiperplasia Inimal após implantes de stent em aorta de suínos submetidos a hiper-homocisteinemia induzida**. 2007. 157f. Tese – Pós Graduação em Medicina no Programa de Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

FREDENBURGH, L. E.; MA, J.; PERRELA, M. A. COX-2 inhibition and hypoxia-induced pulmonary hypertension: effects on pulmonary vascular remodeling and contractility. **Trends Cardiovascular Medicine**, v.19, n.2, p. 31-37, 2009.

FUENTE, J.L.; ESTEVÃO, L.; SOARES, J.; ALCINO, O.; PIMENTA, A.; A família das fosfodiesterases. **Acta Urológica Portuguesa**, v. 18, n.2, p. 17-21, 2001.

FUMAGALLI, E.; RIBEIRO, M. A. O.; FERREIRA, M. S.; SANTOS, C. I. S. Use of 6-minute Walk Test in Pulmonary Hypertension Management. **Arq Bras Cardiol.**, v. 95, p. 10-13, 2010.

GALIÉ, N.; BRUNDAGE, B. H.; GHOFrani, H. A.; OUDIZ, R. J.; SIMONNEAU, G.; SAFDAR, Z.; SHAPIRO, S.; WHITE, J.; CHAN, M.; BEARDSWORTH, A.; FRUMKIN, L.; BARST, R. J. Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. **Journal of American Heart Association**, v. 119, p. 2894-2903, 2009.

GANJII, V.; KAFAI, M. R. Demographic, health, lifestyle , and blood vitamin determinants of serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.77, p. 826-833, 2003.

GARCIA, G.; TREJOS, J.; RESTREPO, B.; LANDÁZURI, P. Homocisteína, folato e vitamina B12 em pacientes colombianos portadores de coronopatia. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 89, n.2, p. 79-85, 2007.

GARTLER, S. M.; HORNUNG, S. K.; MOTULSKY, A. G. Effect of chronologic age on introduction of cystathionine synthase, uroporphyrinogen I synthase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in lymphocytes. **Medical Sciences**, v.78, n.3, p. 1916-1919, 1981.

GASCÓN, M. T.; SCHINDLER, F.; OLIVEIRA, C. G. B.; et al. Avaliação do método de quimioluminescência na análise de homocisteína plasmática e sua comparação com o método de HPLC em amostras de crianças. **Einstein**, v.8, p. 187-191, 2010.

GAVI, M. B. R. O.; EMERICH, C.; SOUZA, E. A. M.; SILVA, M. N.; CARVALHO, K. S.; PATTERLINI, A. C. Hipertensão pulmonar no lúpus eritematoso sistêmico: relato de caso. **Revista Brasileira de reumatologia**, v.37, n.4, p. 227-231, 1997.

GERRISTEN, T.; VAUGHN, J. G.; WAISMAN, A. The identification of homocysteine in the urine. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 9, n. 6, p. 493 – 496, 1962.

GERRISTEN, T.; WAISMAN, A. Homocystinuria, an error in the metabolism of methionine. **Pediatrics**, v. 33, p. 413-420, 1964.

GIBSON, J. B.; CARSON, N. A. J.; NEILL, D. W. Pathological findings in homocystinuria. **Journal Clinical Pathology**, v.17, p.427-437, 1964.

GRAVINA-TADDEI, C. F.; BATLOUNI, M.; SARTESCHI, C.; BALTAR, V. T.; SALVARINI, N. A. C.; BERTOLAMI, M. C.; SOUSA, J. E. M. R. Hiper-Homocisteinemia como fator de risco para doença Aterosclerótica Coronariana em Idosos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, n.3, p.166-173, 2005.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Anal. Chem.**, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

GRIGNOLA, J. C. Hemodynamic assessment of pulmonary hypertension. **World J. Cardiology**, v.26, n.3, p.10 – 17, 2011.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. As quimiocinas e os seus receptores- Características e Funções Fisiológicas. **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, p. 967-976, 2011.

GUIMARÃES, I. J. **Diagnóstico, Avaliação e Terapêutica da Hipertensão Arterial Pulmonar – Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia**. São Paulo: INCOR, 2005, 196p.

GUIMARÃES, A. C. Hiper-Homocisteinemia como fator de risco para doença aterosclerótica coronariana em idosos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, n.2, p. 83 - 84, 2006.

GUILLEMIN, K.; KRASNOW, M. A. The hypoxic response: huffing and hifing. **Cell**, v.89, p. 9-12, 1997.

HARBOE-GONÇALVES, L.; VAZ, L. S.; BUZZI, M. Associação entre níveis plasmáticos de homocisteína e acidente vascular cerebral isquêmico. **Arquivo Neuropsiquiátrico**, v. 61, n.1, p. 97-103, 2005.

HARBOE-GONÇALVES, L.; VAZ, L. S.; BUZZI, M. Avaliação dos níveis de hiper-homocisteinemia, vitamina E, selênio, cobre, ceruloplasmina e ferritina em pacientes com diagnóstico de acidente vascular cerebral isquêmico. **J. Bras. Patol. Med. Pat.**, v. 43, n.1, p. 9-15, 2007.

HASSOUN, P. M. Papel da inflamação na hipertensão arterial Pulmonar. Traduzido por AIELLO, V.D. **PVRI Review**, v.2, p. 16-18, 2010.

HERESI, G. A.; DWEIK, R. A. Biomarcadores em Hipertensão Pulmonar. Traduzido por BANDEIRA, A. **PVRI Review**, v.2, p.10-15, 2010.

HOEPER, M. M.; OUDIZ, R. J.; PEACOCK, A.; TAPSON, V. F.; HAWORTH, S.; FROST, A. E.; TORBICKI, A. End points and clinical trial designs in pulmonary arterial hypertension. **Journal of the American College of cardiology**, v.43, n.12, p.48S-55S, 2004.

HOETTE, S.; JARDIM, C.; SOUZA, R. Diagnóstico e tratamento da hipertensão pulmonar: uma atualização. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n.6, p.795-811, 2010.

HUANG, T.; YUAN, G.; ZHANG, Z.; ZOU, Z.; LI, D. Cardiovascular pathogenesis in hyperhomocysteinemia. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, v.17, n.1, p. 8-16, 2008.

HUMBERT, M.; SITBON, O.; CHAOUAT, A.; BERTOCCHI, M.; HABIB, G.; GRESSIN, V.; YAICI, A.; WEITZENBIUM, E.; CORDIER, J. F.; CHABOT, F.; DROMER, C.; PISON, C.; REYNAUD-GAUBERT, M.; HALOUN, A.; LAURENT, M.; HACHULLA, E.; SIMONNEAU, G. Pulmonary Arterial Hypertension in France. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 173, p. 1023-1030, 2006.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2003, 35p.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010, 20p.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2011, 20p.

ISERN, R.; YANEVA, M.; WEINER, E.; PARKE, A.; ROTHIFIELD, N.; DANTZKER, D.; RICH, S. Autoantibodies in Patients With Primary Pulmonary Hypertension: Association With Anti-Ku. **The American Journal of Medicine**, v. 93, p. 307-312, 1992.

ISO (International Standart Organization). ISO/IEC 17025. **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Brasil: ISO, 2005. 31p.

JACQUES, P. F.; BOSTOM, A. G.; WILSON, P. W. F.; ROSENBERG, I. H.; SELHUB, J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. **The American Journal of Clinical Nutritional**, v. 73, p. 613-621, 2001.

KAMEL, S. R.; OMAR, G. M.; DARWISH, A. F.; ASKLANY, H. T.; ELLABBAN, A. S. Asymptomatic Pulmonary Hypertension in Systemic Lupus Erythematosus. **Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders**, v.4, p. 77-86, 2011.

KAPRAL, A.; HYANEK, J.; ZINY, J.; PEIZNOCHOVÁ, H.; DUBSKA, L.; FAILT, T. Homocysteinemia and ovariectomy-initial experience with functional monitoring. **Ceska Gynekol.**, v. 67, n.6, p. 328-332, 2002.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists**. New Jersey: Wiley, 2007, 1135p.

KOVACS, G.; BERGHOLD, A.; SCHEIDI, S.; OISCHEWSKI, H. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in health subjects: a systematic review. **European Respiratory Journal**, v.34, n.4, p. 888-894, 2009.

LANE, K. B.; MACHADO, R. D.; PAUCIULO, M. W.; THOMSON, J. R.; PHILIPS III, J. A.; LOYD, J. E.; NICHOLS, W. C.; TREMBATH, R. C. Heterozygous germline mutations in BMP2, encoding a TGF- β receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. **Nature Genetics**, v. 26, p. 81-84, 2000.

LAPA, M. S.; FERREIRA, E. V.; JARDIM, C.; MARTINS, B. C. S.; ARAKAKI, J. S. O.; SOUZA, R. Características clínicas dos pacientes com hipertensão pulmonar em dois centros de referência em São Paulo. **Revista Associação Med. Bras.**, v. 52, n.6, p. 139-143, 2006.

LA'ULU, S. L.; RAWLINS, M. L.; PFEIFFER, C. M.; ZHANG, M.; ROBERTS, W. L. Performance Characteristics of Six Homocysteine Assays. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.130, p. 969-975, 2008.

LLEVADOT, J.; VACA, F. B.; SASTRE, F. G. Determinación y utilización de La concentración plasmática de homocisteína em La práctica clínica. **Med. Clin. (Barc.)**, v. 124, n.14, p. 544-553, 2005.

LOPES, A. A. B.; MAEDA, N. Y.; BYDLOWSKI, S. P. Fator de Von Willebrand e Disfunção Endotelial Pulmonar: Implicações Prognósticas. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.70, n.3, p. 141-145, 1998.

LOPES, E. L. **Estudo e determinação das condições experimentais da reação de sililação utilizada na análise multiresíduo de anti-inflamatórios não-esteróides em matrizes aquosas ambientais por cromatografia a gás acoplado à espectrometria de massas**. 2011. 75f. Trabalho de conclusão de curso- Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

LÜSCHER, T. F.; BARTON, M. Endothelin Receptor Antagonists: Therapeutic Considerations for a Novel Class of Cardiovascular Drugs. **Journal of the American Heart Association**, v.102, p. 2434- 2440, 2000.

LUSSIER-CACAN, S.; XHIGNESSE, A. P.; SELHUB, J.; DAVIGNON, J.; GENEST, J. J. Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological traits. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.64, p. 587-593, 1996.

MACHADO, C.; BRITO, I.; SOUZA, D.; CORREIA, L. C. Frequência etiológica da Hipertensão Pulmonar em Ambulatório de Referência na Bahia. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 93, n. 6, p. 679-686, 2009.

MALINOW, M. R. Plasma Homocyst(e)ine and Arterial Occlusive Diseases: A Mini-Review. **Clin. Chem.**, v. 40, n.1, p. 173-176, 1995.

MALINOW, M. R.; BOSTOM, A. G.; KRAUSS, R. M. Homocysteine, Diet and Cardiovascular Diseases. **Journal of the American Heart Association**, v. 99, p. 178-182, 1999.

MARCOS, E.; ADNOT, S.; PHAM, M. F.; NOSJEAN, A.; RAFFESTIN, B.; HAMON, M.; EDDAHIBI, S. Serotonin Transporter Inhibitors Protect Against Hypoxic Pulmonary Hypertension. **American Journal of Respiratory and critical care medicine**, v. 168, p. 487-793, 2003.

MCCULLY, K. S. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. **American Journal of Pathology**, v.56, n.1, p. 111-128, 1969.

MCGOON, M.; GUTTERMAN, D.; STEEN, V.; BARST, V. S. R.; MCCRORY, D. C.; FORTIN, T. A.; LOYD, E. L. Screening Early Detection and Diagnosis of Pulmonary Arterial Hipertension : ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. **Chest** , v. 126, p. 14S-34S, 2004.

MCLAUGHLIN, V. V.; ARCHER, S. L.; BADESH, D. B.; BARST, R. J.; FARBER, H. W.; LINDNER, J. R.; MATHIER, M. A.; MCGOON, M. D. accf/aha 2009 Expert Consensus Document on Pulmonary Hypertension. **Journal of the American College Cardiology**, v. 53, n. 17, p. 1573-1621, 2009.

MENDES, L.; SANTOS, J. F.; SEIXO, F.; FONSECA, N.; LOURENÇO, J.; MATEUS, A.; DUARTE, J.; SANTOS, I.; MENDES, M. Impacto da homocisteinemia na gravidade da doença coronária e no prognóstico de doentes submetidos a intervenção coronária percutânea. **Rev. Bras. Cardiol. Invas.**, v.14, n.1, p. 40-46, 2006.

MORALES-BLANHIR, J. E.; VIDAL, D. P.; ROMERO, M. J. R.; CASTRO, M. G.; VILLEGAS, A. L.; ZAMBONI, M. Teste de caminhada de seis minutos: uma ferramenta valiosa na avaliação do comprometimento pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 37, n.1, p. 110-117, 2011.

MOURA, E. B. **Amplificação dos genes que codificam a endotelina-1 e seus receptores em valvas mitrais reumáticas**. 2008.60f. Dissertação - Pós Graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

NATA (National Association of Testing Authorities – Australia). Technical note 17. Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods. Sydney: **NATA**, 1997, 8p.

NEHLER, M. R.; TAYLOR, L. M.; PORTER, J. M. Homocysteinemia as a risk factor for atherosclerosis: a review. **Cariovascular Surgery**, v. 6, n.6, p. 559-567, 1997.

NETO, A. C.; AZEVEDO, P. R.; SANTOS, M. B. P.; GALDIERI, L. C. D'ALMEIDA, V.; AMARAL, J. L. G.; FREITAS, F. G. R.; MACHADO, F. R. Nível plasmático de homocisteína: marcador de gravidade em pacientes sépticos? **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 22, p. 327-332, 2010.

NEVES, B. L.; MACEDO, M. D.; LOPES, A. C. Homocisteína. **J. Bras Patol Med Lab.**, v. 40, p. 311-20, 2004.

NICOLLS, M. R.; TARASEVICIENE-STEWART, L.; RAI, P. R.; BADESCH, D. B.; VOELKEL, N. F. Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective. **European Respiratory Journal**, v.26, p. 1110-1118, 2005.

OKADA, E.; OIDA, K.; et al. Hyperhomocysteinemia is a risk factor for coronary arteriosclerosis in japanese patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 22, p. 484-490, 1999.

OLIVEIRA, E. C.; AMARAL, C. F. S. Sildenafil no tratamento da hipertensão arterial pulmonar idiopática em crianças e adolescentes. **Jornal de Pediatria**, v. 81, n.5, p. 390-394, 2005.

OZEROL, I. H.; PAC, F. A.; EGE, E.; et al. Plasma endothelin-1, homocysteine and serum nitric oxide values in Patients with left-to-right shunt. **Indian Heart J.**, v. 56, p 653-657, 2004.

PANICO, M. D. B. Hiper-homocisteinemia e doença vascular. **J. Vasc. Br.**, v.3, n.1, 2004.

PFEIFFER, C. M.; HUFF, L. D.; GUNTER, W. Rapid and Accurate HPLC Assay for Plasma Total Homocysteine and Cysteine in a Clinical Laboratory Setting. **Clinical Chemistry**, v. 45, p.290-292, 1999.

PROVIDÊNCIA, R.; CACHULU, M. C.; COSTA, G. V.; SILVA, J.; LEMOS, C. G.; LEITÃO-MARQUES, A. M. Telangiectasia Hereditária Hemorrágica: Causa Rara de Hipertensão Pulmonar? **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 94, n.3, p. e94-e96, 2010.

RAMZY, D.; RAO, V.; TUMIATI, L. C.; XU, N.; SHESHGIRI, R.; JACKMAN, J.; DELGADO, D. H.; ROSS, H. J. Endothelin-1 accentuates the proatherosclerotic effects associated with C-reactive protein. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v.133, n. 5, p. 1137-1146, 2007.

REFSUM, H.; NURK, E.; SMITH, D.; UELAND, P. M.; GJESDAL, C. G.; BJELLAND, I.; TVERDAL, A.; TELL, G. S.; NYGARD, O.; VOLSET, S. E. The Hordaland Homocysteine Study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 1731S-1740S, 2006.

RICOS, C.; ALVAREZ, V.; CAVA, F.; LARIO-GARCIA, J. V.; HERNADEZ, A.; JIMENEZ, C. V.; MINCHINELA, J.; PERICH, C.; SIMON, M. Desirable specifications for total error, imprecision and bias, derived from intra- and inter-individual biological variation. **Scand J. Clin. Lab. Invest.**, v. 459, p. 491-500, 1999. Disponível em: <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>. Acesso em: 05/06/2012.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

ROSINI, N.; ROSINI, A. D.; MOUSSE, D. M.; ROVARIS, M. L.; MACHADO, M. J. Presença de hiper-homocisteinemia em pacientes portadores de três fatores de risco para doença cardiovascular: hipertensão, tabagismo e histórico familiar. **RBAC**, v.38, n. 1, p. 43-45, 2006.

ROSSI, G. P.; PITTER, G. Genetic Variation in the Endothelin System. Do Polymorphisms Affect the Therapeutic Strategies? **Annals New York Academy of Sciences**, p. 34-50, 2006.

RUSSEL, F. D.; MOLENAAR, P. The human heart endothelin system: ET-1 synthesis, storage, release and effect. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, n.9, p. 353-359, 2000.

SACHDEV, P. Homocisteína e transtornos psiquiátricos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n.1, p. 50-56, 2004.

SANTOS, D. I.; GIL, E. S. Fluorimetria na análise farmacêutica: uma revisão. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. II, n.1, p. 24-38, 2010.

SANTOS-FILHO, R. D.; MARTINEZ, T. L. R. Fatores de Risco para Doença cardiovascular: Velhos e Novos Fatores de Risco, Velhos Problemas! **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.46,n.3, 2002.

SCHNEIDER, M. P.; BOESEN, E. I.; POLLOCK, D. M. Contrasting Actions of Endothelin ET_A and ET_BReceptors in Cardiovascular Disease. **Annu Rev. pharmacol.Toxicol.**, v.47, p.731-759, 2007.

SILVA, A. P.; ALVES, M. C. C. **Como iniciar a validação de métodos analíticos**. In: ENQUALAB, 2006. São Paulo. Anais eletrônicos. São Paulo: REMESP, 2006. Disponível em: www.grupocalibracao.com.br/download.aspx?idAttribute=artigo. Acesso em 05/05/2012.

SILVA, J. M.; SALDANHA, C. Actas de Bioquímica. Lisboa: Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina Universidade de Lisboa, 1991, 165p.
SIMONNEAU, A.G.; GALIE, N.;RUBIN, L.J.; et al. Clinical classification of pulmonary hypertension. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 43, 5S–12S, 2004.

SKORO-SAJER, N.; MITTERMAYER, F.; PANZENBOECK, A.; BONDERMAN, D.; SADUSHI, R.; HITSCH, R.; JAKOWITSC, J.; KLEPETKO, W.; KNEUSSI, M. P.; WOLZT, M.; LANG, I. M. Asymmetric Dimethylarginine Is Increased in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. **American Journal of respiratory and critical care medicine**, v. 176, p. 1154-1160, 2007.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUSH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. Belmont: Thomson Brooks, 2005, 1026p.

SOARES, M. R.; PEREIRA, C. A. C. Teste de caminhada de seis minutos: valores de referência para adultos saudáveis no Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 37, n.5, p. 576-583, 2011.

SOUZA, E. J. R.; GARIB, J. R.; GARIB, N. M.; PÁDUA, P. M. Sildenafil no tratamento da hipertensão pulmonar associada a lúpus eritematoso sistêmico e síndrome antifosfolipídico. **Jornal de Pneumologia**, v. 29, n.5, p. 302-304, 2003.

SOUZA, S. V. C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. 2007. 296f. Tese - Pós Graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

STAHLKE-JUNIOR, H. J.; FRANÇA, L. H. G.; STAHLKE, P. H.; STAHLKE, P. S. Hiper-homocisteinemia causando aterogênese na aorta de coelhos – modelo experimental. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.3, n.2, p. 20-30, 2004.

STAUFFENBERG, M. T.; LANGE, R. A.; HILLIS, D.; CIGARROA, J.; HSU, R.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Hyperhomocysteinemia Measured by Immunoassay A Valid Measure of Coronary Artery Atherosclerosis. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 28, p. 1263-1268, 2004.

TASATARGIL, A.; SADAN, G.; KARASU, E. Homocysteine-induced changes in vascular reactivity of guinea-pig pulmonary arteries: Role of the oxidative stress and poly (ADP- ribose) polymerase activation. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v.20, p. 265-272, 2007.

TEIXEIRA, R. H. O. B. **Reatividade da artéria pulmonar, ao óxido nítrico inalado, antes e após a tromboendarterectomia**. 2009. 81f. Tese- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TERRA-FILHO, M.; MENNA-BARRETO, S. S. et al. Diretriz da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia: Recomendações para o manejo da tromboembolia pulmonar, 2010. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, s.1, p. S1-S68, 2010a.

TERRA-FILHO, M.; MELLO, M. F.; LAPA, M. S.; TEIXEIRA, R. H. O. B.; JATENE, F. B. Clinical and haemodynamic evaluation of chronic thromboembolic pulmonary hypertension patients scheduled for pulmonary thromboendarterectomy. Is schistosomiasis hypertension an important confounding factor? **Clinical Science**, v. 65, p. 1155-1160, 2010b.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Appl. Chem.**, v. 74, p. 835-855, 2002.

TUCKER, K. L.; SELHUB, J.; WILSON, P. W.; ROSENBERG, I. H. Dietary Intake Pattern Relates to Plasma Folate and Homocysteine Concentrations in the Framingham Heart Study. **The Journal of Nutrition**, p. 3025-3031, 1996.

TUDER, R. M.; GROVES, B.; BADESCH, D. B.; VOELKEL, N. F. Exuberant Endothelial Cell Growth and Elements of Inflammation are present in Plexiform Lesions of Pulmonary Hypertension. **American Journal Of Pathology**, v. 144, n. 2, p.275-285, 1994.

TUDER, R. M.; COOL, C. D.; GERACI, M. W.; WANG, J.; ABMAN, S. H.; WRIGHT, L.; BADESCH, D.; VOELKE, N. F. Prostacyclin Synthase Expression Is Decreased in Lungs from Patients with Severe Pulmonary Hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 159, p.1925-1932, 1999.

UEHARA, S. K.; BALUZ, K.; ROSA, G. Possíveis mecanismos trombogênicos da hiper-homocisteinemia e o seu tratamento nutricional. **Revista de Nutrição**, v. 18, n.6, p. 743-751, 2005.

UELAND, P. M.; REFSUM, H.; STABLER, S. P.; et al. Total homocysteine in plasma: methods and clinical applications. **Clinical Chemistry**, v. 39, 1764-1779, 1993.

VANNUCHI, H.; MELO, S. S. Hiper-homocisteinemia e risco cardiometabólico **Arquivo Brasileiro Endocrinol. Metab.**, p. 53-55, 2009.

VENÂNCIO, L. S.; BURINI, C. R.; YOSHIDA, W. B. Concentração de homocisteína em pacientes portadores de doença arterial periférica atendidos em um serviço público de saúde. **J.Vasc.Bras.**, v.8, p. 318-325, 2009.

VOLPE, G. J.; JOAQUIM, L. F.; DIAS, L. B. A.; MENEZES, M. B.; MORIGUTI, J. C. Tromboembolismo pulmonar. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 43, n.3, p. 258-271, 2010.

WAGENSEIL, J. E.; MECHAM, R. P. Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. **Physiol. Rev.**, v.89, n.3, p. 957-989, 2009.

WANG, H.; LI, W.; ZHANG, W.; SUN, K.; SONG, X.; GAO, G.; ZHANG, C.; HUI, R.; HU, H. Novel promoter and exon mutations of BMPR2 gene in Chinese patients with pulmonary arterial hypertension. **European Journal of Human Genetics**, v.17, p. 1063-1069, 2009.

WEISS, N.; KELLER, C.; HOFFMANN, U.; LOSCALZO, J. Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. **Vascular Medicine**, v.7, p. 227-239, 2002.

WILCKEN, D. E.; WILCKEN, B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 57, n.4, p. 1079-1082, 1976.

ZAGO, A. M.; FALCÃO, P. R.; PASQUINI, R. **Hematologia Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2004, 1081p.

ZHANG, C.; CAL, Y.; ADACHI, M. T.; OSHIRO, S.; ASO, T.; KAUFMAN, R. J.; KITAJIMA, S. Homocysteine Induces Programmed Cell Death in Human Vascular Endothelial Cells through Activation of the Unfolded Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 38, p. 35867- 35874, 2001.



ZHANG, L.; JIN, M.; HU, X.; ZHU, J. Homocysteine stimulates nuclear factor $\kappa\beta$ activity and interleukin-6 expression in rat vascular smooth muscle cells. *Cell Biology International*, v.30, p. 592-597, 2006.

ZIGHETTI, M. L.; CATTANEO, M.; FALCON, C. R.; LOMBARDI, R.; HARARI, S.; SAVORITTO, S.; MANNUCCI, P. M. Absence of hyperhomocysteinemia in tenpatients with primary pulmonary hypertension. **Thrombosis Research**, v. 85, n.3, p. 279-282, 1997.

ZIGHETTI, M. L.; CHANTARANGKUL, V.; TRIPODI, A.; MANNUCCUI, P. M.; CATTANEO, M. Determination of total homocysteine in plasma : comparison of the Abbott IMx immunoassay with high performance liquid chromatography. **Hematologica**, v.87, n.1, p. 89-94, 2002.

8. ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do comitê de ética em pesquisa – Universidade Federal de Minas Gerais

| | |
|---|--|
|  | UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP |
| Projeto: CAAE – 00751512.9.0000.5149 | |
| Interessado(a): Profa. Maria das Graças Carvalho Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas Faculdade de Farmácia - UFMG | |
| DECISÃO | |
| O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 21 de junho de 2012, o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação dos níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes portadores de hipertensão arterial pulmonar e sua relação com variáveis clínicas" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. | |
| O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto. | |
|  Profa. Maria Teresa Marques Amaral Coordenadora do COEP-UFMG | |
| <small>Av. Pres. Antonio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II - 2º andar – Sala 2005 – Cep: 31270-901 – BH-MG Telefax: (031) 3409-4592 - e-mail: coep@ppq.ufmg.br</small> | |

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - Paciente

PROJETO DE PESQUISA: “AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE HOMOCISTEÍNA EM PACIENTES PORTADORES DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR E SUA RELAÇÃO COM VARIÁVEIS CLÍNICAS”

Prezado Paciente,

Você está sendo convidado (a) para participar desta pesquisa como voluntário, sem custo algum pelos exames realizados. O objetivo deste projeto é estudar níveis de homocisteína em pacientes com Hipertensão Arterial Pulmonar que pode contribuir para um maior entendimento, acompanhamento e controle desta doença.

Se você quiser participar, poderá fazê-lo doando 5 mL de seu sangue a serem coletados. A coleta de sangue será realizada por um profissional com capacidade técnica e experiência para estancar eventual sangramento. Será utilizado material descartável de boa qualidade, visando o sucesso da coleta. O procedimento de coleta de sangue não envolve riscos maiores, a não ser um pequeno hematoma (roxo) ocasionalmente no local da punção. A coleta de sangue será conciliada aos dias referentes às consultas médicas.

Todos os dados gerados nessa pesquisa serão mantidos em segredo e apenas a equipe de pesquisadores terá acesso a eles. Cada participante será identificado por um código. Seu nome e os resultados dos exames não serão revelados, mas você poderá ter acesso aos resultados individuais.

Serão armazenadas amostras do sangue coletado, por um período de cinco anos, no Banco de Material Biológico do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia. Essas amostras poderão ser eventualmente utilizadas em futuras análises que poderão auxiliar no tratamento da Hipertensão Arterial Pulmonar.

Você poderá interromper sua participação a qualquer momento sem afetar seu acompanhamento médico em andamento.

Se no transcorrer da pesquisa você tiver alguma dúvida, ou por qualquer outro motivo necessitar de orientações, poderá procurar um dos pesquisadores: Professora Maria das Graças Carvalho ou Tatiana Maria Costa de Campos no telefone (31) 3409-6881 da Faculdade de Farmácia da UFMG. Além disso, para esclarecimentos quanto aos aspectos éticos (bem-estar, riscos, entre outros) desta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa - COEP/UFMG, situado à Av. Antonio Carlos 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, Belo Horizonte – 31270-901, telefone (31) 3409-4592.

Ao assinar esse termo de consentimento você não está abrindo mão de seus direitos legais.

Declaro que concordo em participar como voluntário do projeto de pesquisa “AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE HOMOCISTEÍNA EM PACIENTES PORTADORES DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR E SUA RELAÇÃO COM VARIÁVEIS CLÍNICAS” e autorizo a doação de uma pequena amostra de sangue, que será armazenada para eventuais futura análises sobre a Hipertensão Arterial Pulmonar e que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 20 ____

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____

Nome do pesquisado _____

Assinatura do pesquisador: _____

ANEXO C – Ficha clínica



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



FICHA CLÍNICA - Paciente

PROJETO DE PESQUISA: “AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE HOMOCISTEÍNA EM PACIENTES PORTADORES DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR E SUA RELAÇÃO COM VARIÁVEIS CLÍNICAS”

Nome: _____

Idade: _____

Sexo: Feminino Masculino

Peso: _____ Kg

Altura: _____ metros²

Classe Funcional: _____

Classificação Clínica: _____

Distância Percorrida no Teste de Caminhada de 6 minutos: _____ metros

Hábito tabagista: Sim Não

Medicamentos em uso: _____

