

Aline Barnabé

**AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE
2,3-DIFOSFOGLICERATO, HOMOCISTEÍNA
PLASMÁTICA, ÁCIDO FÓLICO, VITAMINA B₁₂ E
POLIMORFISMOS NO GENE DA MTHFR EM
PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR
OBSTRUTIVA CRÔNICA**

Campinas

2010

Aline Barnabé

**AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE
2,3-DIFOSFOGLICERATO, HOMOCISTEÍNA
PLASMÁTICA, ÁCIDO FÓLICO, VITAMINA B₁₂ E
POLIMORFISMOS NO GENE DA MTHFR EM
PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR
OBSTRUTIVA CRÔNICA**

**Tese de Mestrado apresentada à Pós-graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção de título de
Mestre em Ciências Médicas, área de concentração
Ciências Biomédicas.**

Orientador (a): Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr

Campinas

2010

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

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

B252a Barnabé, Aline
Avaliação da concentração de 2,3-difosfoglicerato, homocisteína plasmática, ácido fólico, vitamina B₁₂ e polimorfismo no gene da MTHFR em pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica / Aline Barnabé. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientadores : Nelci Fenalti Höehr, Joyce Annichino-Bizzacchi
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doença pulmonar obstrutiva crônica. 2. Vitaminas. 3. Hiperhomocisteinemia. 4. Pulmões – doença obstrutiva. 5. Transferência de oxigênio. I. Höehr, Nelci Fenalti. II. Annichino-Bizzacchi., Joyce III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Evaluation of 2,3-diphosphoglycerate, plasma homocysteine, folic acid, vitamin B₁₂ and polymorphisms in MTHFR gene in COPD patients

Keywords: • COPD
• Vitamins
• Hyperhomocysteinemia
• Pulmonary disease obstructive
• Oxygen transfer

Titulação: Mestre em Ciências Médicas
Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

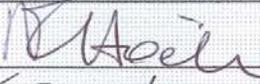
Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr
Profa. Dra. Vânia D’Almeida
Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino

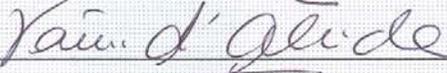
Data da defesa: 23-02-2010

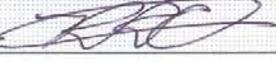
Banca examinadora da Dissertação de Mestrado
Aline Barnabé

Orientadora: Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr

Membros:

1. Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr - 

2. Profa. Dra. Vania D'Almeida - 

3. Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino 

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

Data: 23/02/2010

Dedicatória

A Deus por ter me concedido mais uma conquista.

Aos meus pais, Clélio e Maria Aparecida, modelos de dedicação, amor e perseverança.

Ao Lucas, minha razão de viver e por entender minha ausência nesta etapa importante em minha vida.

Aos meus irmãos, Paula e Fernando, pelo carinho, incentivo e paciência.

Ao César, por compartilhar todos os momentos.

À minha querida Profa. Nelci, pelos conhecimentos transmitidos com dedicação, paciência e amor.

AGRADECIMENTOS

A todos os meus amigos, por compartilharem dificuldades e alegrias ao longo de todos esses anos.

À minha grande amiga Eloá pela amizade e que sempre esteve por perto quando precisei, compartilhando alegrias e tristezas.

Aos meus amigos André e Thiago pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar em todos os momentos.

À Profa. Dra. Joyce M. Annichino-Bizzacchi, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal, e pela atenção e carinho.

Aos colegas Cíntia e Jonathan que muito me ajudaram, e pelo carinho e atenção.

Aos amigos do Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP, principalmente a Ucha, Cris e Deva, pelo apoio e ensinamentos para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Físico-química Orgânica do Instituto de Química da UNICAMP, pela colaboração, paciência e dedicação.

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica do Hospital das Clínicas da UNICAMP, principalmente a Hilda, Miriam e Marielza, pela atenção, colaboração, carinho e amizade.

Aos funcionários do serviço de coleta do Hospital das Clínicas da UNICAMP, pela ajuda na realização da coleta das amostras.

À Dra. Ilma A. Paschoal do Ambulatório de Pneumologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP, pela atenção e colaboração.

À Profa. Dra. Vânia D'Almeida da Universidade Federal de São Paulo, que tornou possível a realização da dosagem de homocisteína em nosso laboratório.

A todos os funcionários da Divisão de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP, pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Roberto Rittner, pelo apoio, carinho, incentivo e amizade.

A todos os voluntários, pacientes do Ambulatório de Pneumologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A toda a minha família, pelo apoio e incentivo.

A Capes, FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

“Os ideais que iluminaram meu caminho e sempre me deram coragem para enfrentar a vida com alegria foram a verdade, a bondade e a beleza.”

“No meio de qualquer dificuldade encontra-se a oportunidade.”

“A imaginação é mais importante do que o conhecimento.”

Albert Einstein

Resumo	xviii
Abstract	xx
1. Introdução	22
1.1. Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica	23
1.2. 2,3-Difosfoglicerato	31
1.3. Homocisteína	36
2. Objetivos	44
3. Materiais e Métodos	46
3.1. Pacientes	47
3.1.1. Critérios de Inclusão	47
3.1.2. Critérios de Exclusão	47
3.2. Controles	48
3.2.1. Critérios de Inclusão	48
3.2.2. Critérios de Exclusão	48
3.3. Coleta de Sangue	48
3.4. Determinação de Homocisteína plasmática	49

3.4.1. Preparação das soluções	50
3.4.2. Preparação da fase móvel	51
3.4.3. Preparação da amostra	51
3.4.4. Curva de Calibração	52
3.4.5. Equipamento	53
3.4.6. Cromatograma	54
3.5. Determinação de 2,3-DPG	54
3.5.1. Preparação da amostra	55
3.5.2. Princípio do método	55
3.5.3. Reagentes	56
3.5.4. Protocolo de análise de 2,3-DPG	57
3.6. Determinação de Ácido Fólico	59
3.7. Determinação de Vitamina B₁₂	60
3.8. Determinação do Perfil Hepático	61
3.8.1. AST	61
3.8.2. ALT	62
3.8.3. GGT	63
3.8.4. ALP	63
3.9. Determinação do Perfil Renal	64

3.9.1. Creatinina	64
3.9.2. Uréia	65
3.10. Métodos Moleculares	65
3.10.1. Extração de DNA de sangue periférico	65
3.10.2. Estudo do polimorfismo C677T no gene da MTHFR	67
3.10.3. Estudo do polimorfismo A1298C no gene da MTHFR	69
3.11. Análise Estatística	71
4. Resultados	72
5. Discussão	84
6. Conclusão	91
7. Referências	94
8. Anexos	106

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BHMT	Betaína homocisteína metiltransferase
BSA	Soro albumina bovina
CBS	Cistationina β -sintase
CGL	Cistationina γ -liase
Cis	Cisteína
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
dL	Decilitro
DNA	Ácido dessoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfato
DP	Desvio padrão
DPGF	Difosfoglicerato fosfatase
DPMG	Difosfoglicerato mutase
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético

FALC	Fosfatase Alcalina
GAP-DH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GDH	Glicerol 3-fosfato desidrogenase
GGT	Gama glutamil transferase
Genótipo AA	Homozigoto normal para o polimorfismo A1298C no gene da MTHFR
Genótipo AC	Heterozigoto para o polimorfismo A1298C no gene da MTHFR
Genótipo CC	Homozigoto mutante para o polimorfismo A1298C ou homozigoto normal para o polimorfismo C677T no gene da MTHFR
Genótipo CT	Heterozigoto para o polimorfismo C677T no gene da MTHFR
Genótipo TT	Homozigoto mutante para o polimorfismo C677T no gene da MTHFR
KCl	Cloreto de potássio
HCl	Ácido clorídrico
Hci	Homocisteína
Máx	Máximo
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Mín	Mínimo
mL	Mililitro
M	molar
mM	milimolar
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato redutase

MTR	Metionina sintase
MTRR	Metionina sintase redutase
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de amônio
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
ODS	Octadecilsilano
pb	Pares de base
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pg	Picograma
PG	Fosfoglicerato
PGM	Fosfoglicerato mutase
PGK	Fosfoglicerato quinase
Pi	Fosfato inorgânico
PI	Padrão interno
rpm	Rotações por minuto
SAH	S-Adenosil-homocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SBD-F	7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfônico

TCA	Ácido tricloroacético
TCEP	Tris (carboxietil) fosfato
TE	Tampão Tris/ etilenodiaminotetracético (EDTA)
TEB	Tris/Ácido bórico/Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)
tHci	Homocisteína plasmática total
THF	5,10-metilenotetrahidrofolato
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
1,3-DPG	1,3-difosfoglicerato
2,3-DPG	2,3-difosfoglicerato
2,3-DPG/Hct	2,3-difosfoglicerato por hematócrito
3-PG	3-fosfoglicerato
U	Unidades

- Figura 1.** Efeitos do tabagismo e outros insultos no tecido pulmonar.
- Figura 2.** Brônquio normal versus Bronquite Crônica.
- Figura 3.** Alvéolo normal versus enfisematoso.
- Figura 4.** Mecanismo protease-antiprotease do Enfisema.
- Figura 5.** Estruturas da Metionina, Homocisteína e Cisteína.
- Figura 6.** Metabolismo da Homocisteína.
- Figura 7.** Espécies de Homocisteína encontradas no plasma.
- Figura 8.** Glicólise, mostrando o shunt de Rapoport-Luebering onde o 2,3-DPG é formado.
- Figura 9.** Curva de dissociação da hemoglobina.
- Figura 10.** Curva analítica obtida através dos valores da área de homocisteína.
- Figura 11.** Cromatograma obtido a partir da amostra de um paciente: os picos em 3.725, 4.757 e 8.211 minutos são correspondentes a cisteína (Cis), homocisteína (Hci) e padrão interno (PI) - cistamina.
- Figura 12.** Digestão do polimorfismo C677T no gene da MTHFR.
- Figura 13.** Digestão do polimorfismo A1298C no gene da MTHFR.

- Tabela 1.** Causas do aumento da homocisteína de acordo com a idade os níveis de homocisteína plasmática total.
- Tabela 2.** Características clínicas de pacientes e controles.
- Tabela 3.** Características bioquímicas de pacientes e controles.
- Tabela 4.** Concentração de homocisteína e 2,3-DPG em pacientes com DPOC, segundo o uso ou não de oxigenioterapia.
- Tabela 5.** Prevalência dos polimorfismos C677T e A1298C no gene da MTHFR em pacientes e controles.
- Tabela 6.** Prevalência dos haplótipos em pacientes e controles.
- Tabela 7.** Concentração de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ de acordo com os polimorfismos no gene da MTHFR em pacientes e controles.
- Tabela 8.** Identificação de fatores que determinaram a homocisteína nos pacientes com DPOC.



RESUMO

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é caracterizada por obstrução do fluxo aéreo que envolve um processo inflamatório crônico das vias aéreas e destruição do parênquima pulmonar induzidos pela bronquite crônica ou enfisema. Devido às anormalidades na troca gasosa que ocorre na DPOC, mudanças no pH podem alterar as concentrações de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), um fosfato orgânico presente nos eritrócitos e que exerce função importante no transporte de oxigênio. A baixa concentração de 2,3-DPG aumenta a afinidade do oxigênio à hemoglobina, dificultando sua liberação, comprometendo a oxigenação dos tecidos. Além disso, oxigenioterapia indicada para pacientes com DPOC pode levar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) responsáveis pela injúria celular. Por outro lado, EROS também pode ser produzido por um aumento nos níveis de homocisteína no plasma e com isso causar lesão celular. Estudos sugerem que pacientes com DPOC podem apresentar aumento da homocisteína plasmática, um fator de risco para doenças cardiovasculares. Baseando-se nisso, o objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de 2,3-DPG e homocisteína em pacientes com DPOC. Nossos resultados mostraram que não houve diferença na concentração de 2,3-DPG entre pacientes e controles, pois a concentração desse fosfato foi semelhante em ambos os grupos. Nos pacientes com DPOC que fazem uso ou não de oxigenioterapia também não houve diferença nas concentrações de 2,3-DPG. Portanto, o transporte e distribuição de oxigênio não estavam prejudicados nesses pacientes. No entanto, os pacientes com DPOC apresentaram hiperhomocisteinemia leve e baixos níveis de ácido fólico. Esta observação sugere a necessidade de suplementação com ácido fólico para pacientes com DPOC. Os polimorfismos C677T e A1298C no gene da MTHFR não influenciaram as concentrações de homocisteína nos pacientes com DPOC. A contribuição de nossos dados é de grande importância para o monitoramento de pacientes com DPOC.



ABSTRACT

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is characterized by chronic airflow obstruction that involves a chronic inflammation of the airways and destruction of lung parenchyma induced by chronic bronchitis or emphysema. Abnormalities in gas exchange that occurs in COPD leads to changes in pH altering 2,3-DPG levels, an organic phosphate present in red blood cells and play an important role in oxygen transport. Reduced levels of 2,3-DPG increase the oxygen affinity of hemoglobin and reduces oxygen delivery, compromising tissue oxygenation. On the other hand, oxygen therapy which is used in COPD patients induces the production of reactive oxygen species (ROS) responsible for cellular injury. ROS can be also produced by an excess of homocysteine in plasma. Studies suggest that COPD patients may have increased homocysteine, a risk factor for cardiovascular diseases. The aim of the present study was to evaluate 2,3-DPG and homocysteine levels in COPD patients. Our results showed no difference in the 2,3-DPG levels between patients and controls. In patients with COPD who use oxygen therapy or not there was no difference in the 2,3-DPG. Therefore, oxygen transport and unloading were not affected. Patients with COPD had mild hyperhomocysteinemia and low levels of folic acid. This observation suggests that dietary supplement of folate to COPD patients is necessary. C677T and A1298C polymorphisms in the MTHFR gene showed no influence on concentrations of homocysteine in COPD patients. Our data make an important contribution for the monitoring of COPD patients.



1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma doença prevenível e tratável, que se caracteriza pela presença de obstrução crônica do fluxo aéreo, que não é totalmente reversível. A obstrução crônica do fluxo aéreo é geralmente progressiva e está associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões à inalação de partículas ou gases tóxicos, causada principalmente pelo tabagismo (PAUWELS et. al., 2001; Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2004; HOGG et. al., 2008).

Clinicamente a DPOC caracteriza-se por dispnéia crônica e progressiva - principal sintoma associado a incapacidade, redução da qualidade de vida e pior prognóstico; tosse - sintoma mais encontrado, podendo ser diária ou intermitente e proceder a dispnéia ou aparecer simultaneamente; e produção de escarro (SHARAFKHANEH et. al., 2008; GOLD, 2008; FROMER e COOPER, 2008).

O processo inflamatório crônico pode produzir alterações importantes no tecido pulmonar, como a bronquite crônica caracterizada por eventos inflamatórios nos brônquios e bronquíolos, e o enfisema pulmonar causado pela destruição do parênquima pulmonar (Figura 1) (GEA et. al., 2009).

As alterações no tecido pulmonar provocados pela bronquite crônica ou pelo enfisema pulmonar resultam em hipersecreção de muco, disfunção ciliar, limitação do fluxo aéreo, anormalidades na troca gasosa, hiperinflação pulmonar, hipertensão pulmonar e cor pulmonale. A hipersecreção de muco e a disfunção ciliar levam a tosse crônica e produção de escarro. A obstrução das vias aéreas, destruição do parênquima pulmonar e anormalidade vascular dos pulmões reduzem a capacidade pulmonar para a troca gasosa, produzindo hipoxemia e hipercapnia. A hiperinflação pulmonar ocorre quando o ar é aprisionado nos pulmões depois de cada respiração, devido a um

desequilíbrio no volume de ar inspirado e expirado. A hipertensão pulmonar que se desenvolve durante o curso da doença é a maior complicação cardiovascular da DPOC e está associada com o desenvolvimento de cor pulmonale (PAUWELS et. al., 2001; FROMER e COOPER, 2008; GEA et. al., 2009).

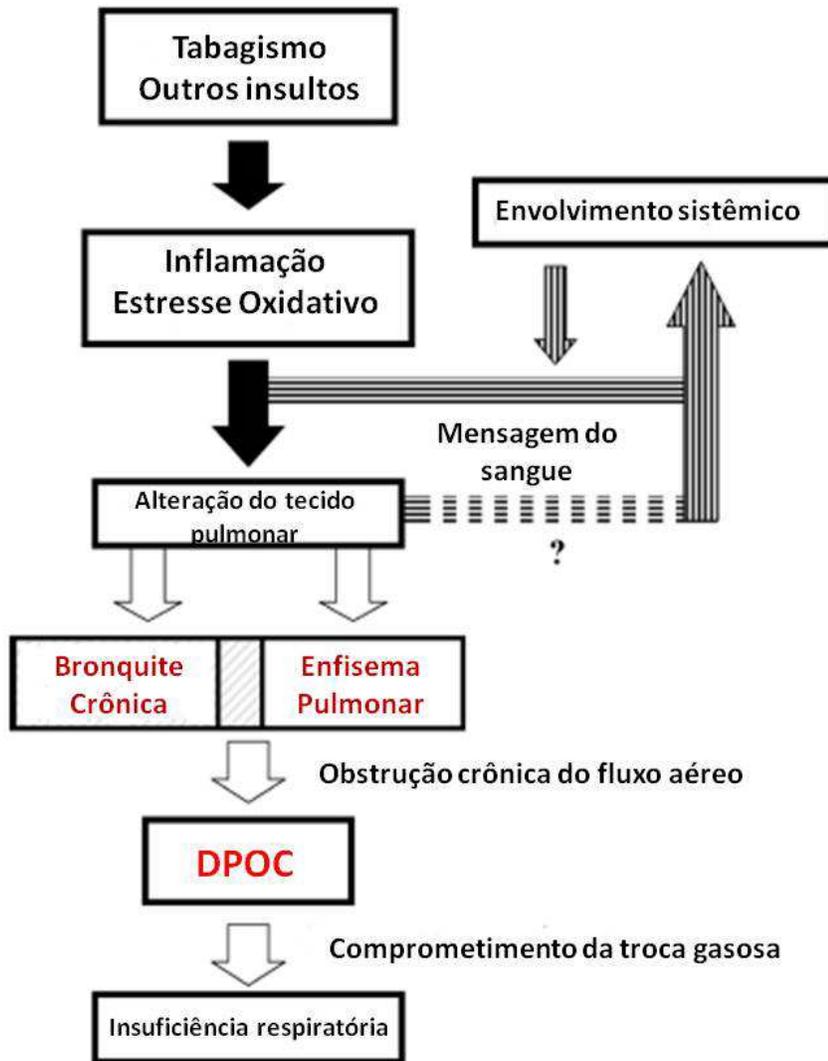


Figura 1. Efeitos do tabagismo e outros insultos no tecido pulmonar. Adaptado de Gea et. al., 2009.

A Bronquite Crônica é uma desordem caracterizada pela produção diária e excessiva de muco, e tosse persistente com produção de escarro por três meses em dois anos consecutivos, ocasionando estreitamento das vias aéreas pulmonares (Figura 2) (STEPHENS e YEW, 2008).

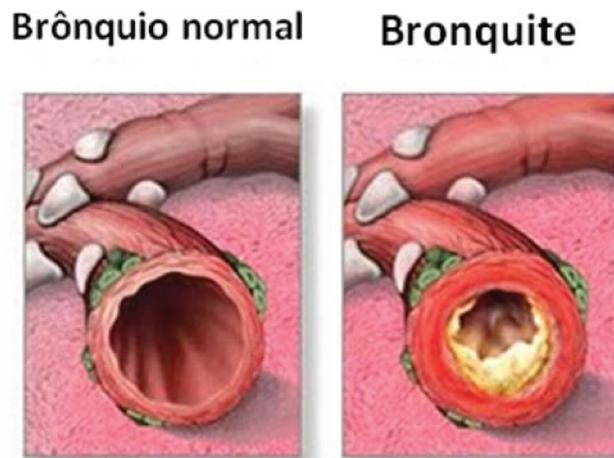


Figura 2. Brônquio normal versus Bronquite Crônica.

A irritação crônica por substâncias inaladas e infecções microbiológicas são importantes na gênese da bronquite crônica. O tabagismo é o principal fator de risco, por causar inflamação das vias aéreas e hipersecreção de muco, que contribuem para a obstrução das vias aéreas (SNIDER, 1989; KUMAR et.al., 2005; PELKONEM, 2008).

A fumaça do cigarro aumenta a susceptibilidade a infecções por interferir na ação ciliar do epitélio respiratório ou por causar lesão no epitélio das vias aéreas, inibindo a capacidade dos leucócitos de remover as bactérias (KUMAR et. al., 2005). A hipersecreção de muco nas grandes vias aéreas está associada a hipertrofia das

glândulas submucosas da traquéia e dos brônquios, e o aumento das células caliciformes nas pequenas vias aéreas resulta na produção excessiva de muco que contribui para a obstrução das vias aéreas (KUMAR et. al., 2005; SZILASI et. al., 2006; CHUNG e ADCOCK, 2008).

O Enfisema Pulmonar é caracterizado por aumento anormal dos espaços aéreos distais aos bronquíolos terminais, acompanhado de destruição das paredes alveolares sem fibrose óbvia (Figura 3) (SNIDER, 1989; HOGG et. al., 2008; KIM, 2008). A destruição das células alveolares e capilares (epiteliais e endoteliais) por enzimas proteolíticas é o principal mecanismo de destruição do parênquima pulmonar (TARASEVICIENE-STEWART e VOELKEL, 2008).

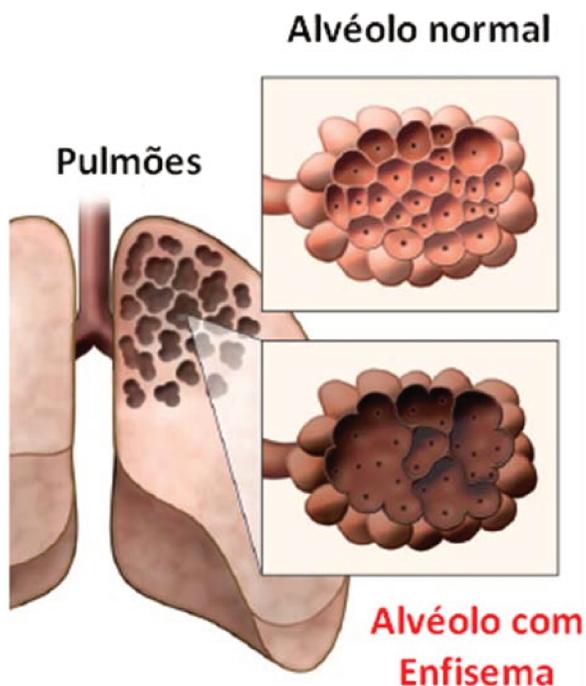


Figura 3. Alvéolo normal versus enfisematoso. Adaptado de Taraseviciene-Stewart e Voelkel, 2008.

As proteases podem degradar enzimaticamente uma grande variedade de proteínas pulmonares e as antiproteases protegem o pulmão dessa degradação (TARASEVICIENE-STEWART e VOELKEL, 2008). No entanto, a destruição da parede alveolar resulta de um desequilíbrio entre as atividades das proteases (elastase) e as antiproteases (α_1 -antitripsina), levando a destruição da elastina, proteína responsável pela manutenção da elasticidade das paredes alveolares. Com a perda da elastina ocorre colapso alveolar e estreitamento dos bronquíolos, limitando o fluxo aéreo no pulmão (KUMAR et.al., 2005; KIM et. al., 2008; GOLD, 2008).

A deficiência de a α_1 -antitripsina, principal inibidor da elastase neutrofílica, é um fator de risco para o desenvolvimento do enfisema pulmonar, que é agravado pelo tabagismo (Figura 4) (SHARAFKHANEH et. al., 2007; TARASEVICIENE-STEWART e VOELKEL, 2008). Nesta deficiência, a proteção antiprotease no interstício pulmonar e no espaço alveolar está diminuída em aproximadamente 15 a 20% (ABBOUD e VIMALANATHAN, 2008).

Um desequilíbrio entre a atividade protease-antiprotease também pode ser desencadeado pelo fumo, pois os fumantes apresentam um número maior de neutrófilos e macrófagos nos alvéolos. O fumo induz a produção de citocinas pelas células endoteliais, estimulando o recrutamento de macrófagos e neutrófilos. O aumento de neutrófilos no pulmão também resulta da liberação de fatores quimiotáticos pelos macrófagos. Os neutrófilos estimulados liberam elastase, promovendo um aumento da sua atividade e assim ocorre a inibição da atividade da α_1 -antitripsina. Os oxidantes produzidos pelo fumo, neutrófilos e macrófagos também inibem a α_1 -antitripsina, reduzindo a atividade antielastase nos fumantes. O desequilíbrio entre a elastase e a α_1 -antitripsina leva a

destruição da elastina, causando o enfisema pulmonar (Figura 4) (KUMAR et. al., 2005; ABOUD e VIMALANATHAN, 2008).

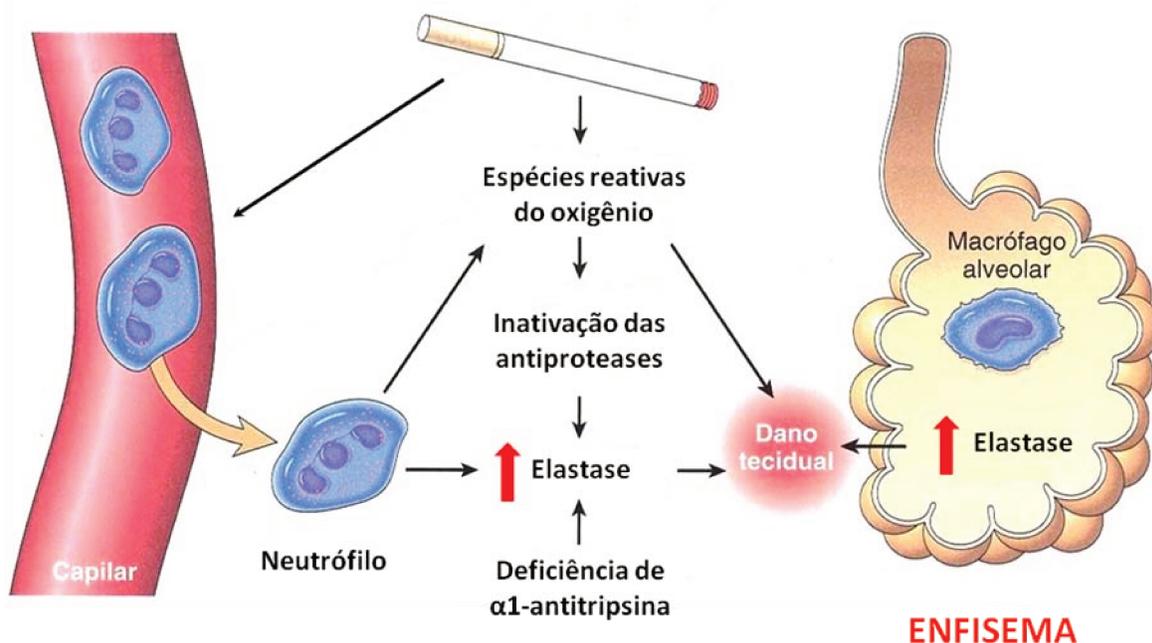


Figura 4. Mecanismo protease-antiprotease do Enfisema Pulmonar. Adaptado de Kumar, 2005.

A identificação dos fatores de risco é um importante passo no desenvolvimento de estratégias para a prevenção e tratamento de qualquer doença. Os fatores de risco para a DPOC incluem fatores individuais e ambientais, e a doença geralmente ocorre devido a interação destes fatores (PAUWELS et. al., 2001; GOLD, 2008).

✓ **Fatores de risco individuais.**

- **Deficiência de α_1 -antitripsina.** O fator individual mais importante de origem hereditária é a deficiência de α_1 -antitripsina, pois outros genes envolvidos na patogênese da DPOC ainda não foram identificados.

✓ **Fatores de risco ambientais.**

- **Tabagismo.** O fator de risco mais comum é o tabagismo, pois os fumantes apresentam maior susceptibilidade para o desenvolvimento de sintomas respiratórios e anormalidades no funcionamento pulmonar. Embora o tabagismo seja a principal causa da DPOC, apenas 15 a 20% dos fumantes desenvolvem a doença, sugerindo que a predisposição genética e fatores ambientais executam um papel importante na patogênese da doença. A exposição passiva a fumaça do cigarro também pode contribuir para o aparecimento de sintomas respiratórios e DPOC.

- **Exposição ocupacional.** Exposição à poeira orgânica e inorgânica, e agentes químicos.

- **Infecções virais e bacterianas.** As infecções podem contribuir para a patogênese e progressão da DPOC.

- **Outros fatores de risco:** gênero, nutrição e asma (PAUWELS et. al., 2001; GOLD, 2008).

O diagnóstico da DPOC deve ser realizado especialmente em pacientes que apresentam dispnéia, tosse, produção de escarro, ou história de exposição a um dos fatores de risco. Além da presença de sintomas e da exposição a fatores de risco, o diagnóstico deve ser confirmado através da avaliação da função pulmonar pela espirometria (PAUWELS et. al., 2001; FROMER e COOPER, 2008).

A DPOC também é caracterizada por um declínio progressivo na função pulmonar e na qualidade de vida. Entretanto, na DPOC podem ocorrer períodos intermitentes de sintomas agudos chamados de exacerbações (GEA et. al, 2009). A frequência e a severidade das exacerbações aumentam com a severidade da doença, e geralmente estão associadas a infecções virais ou bacterianas (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis*) (MACLNTYRE e HUANG, 2008; GARCIA-AYMERICH et. al., 2009). Os sintomas apresentados pelos pacientes com exacerbações são: dificuldade para respirar, dor no peito, produção de escarro aumentada com alteração no aspecto do escarro de mucóide para purulento, e febre. As exacerbações podem também ser acompanhadas por taquicardia, taquipnéia, mal estar, insônia, fadiga, depressão e confusão (PAUWELS et. al., 2001; FROMER e COOPER, 2008).

Algumas comorbidades como câncer de pulmão, doença coronariana, hipertensão, insuficiência cardíaca, diabetes, caquexia, anormalidades do músculo esquelético e osteoporose podem estar presentes nos pacientes com DPOC (VAN EEDEN e SIN, 2008; STOCKLEY, 2009).

O tratamento da DPOC envolve uma combinação de intervenções farmacológicas e não farmacológicas de acordo com a severidade da doença. A terapia farmacológica previne e controla os sintomas, reduz a frequência e a severidade das exacerbações, melhora o estado de saúde e a tolerância ao exercício. A terapia farmacológica consiste em broncodilatadores (anticolinérgicos, β 2-agonistas e xantinas), inalação de corticosteróides, mucolíticos e vacinas (antiinfluenza e antipneumocócica). Embora o tratamento farmacológico seja fundamental para o controle e redução dos sintomas, existe uma série de intervenções não farmacológicas que são cruciais para a obtenção de

bons resultados. Dentre os tratamentos não farmacológicos estão: cessação do tabagismo; reabilitação pulmonar como o exercício físico, aconselhamento nutricional e educação do paciente; oxigenioterapia e cirurgia que inclui a redução do volume pulmonar e o transplante de pulmão. (PAUWELS et. al., 2001; FROMER e COOPER, 2008; STOCKLEY, 2009).

A DPOC é a maior causa de morbidade e mortalidade, e atualmente é a quarta causa de morte no mundo (BOURBEAU e BARTIETT, 2008; FROMER e COOPER, 2008). A prevalência global da DPOC em adultos com idade superior a 40 anos é de 9 a 10 % (CHUNG e ADCOCK, 2008). A prevalência desta doença vem aumentando e estima-se que até o ano de 2020 a DPOC seja a terceira causa de morte no mundo (PAUWELS et. al., 2001; STOCKLEY, 2008; GOLD, 2008). Segundo a Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (2004), no Brasil a DPOC vem ocupando nos últimos anos da quarta a sétima posição entre as principais causas de morte e aproximadamente 33 mil pessoas morre por ano dessa doença.

1.2. 2,3-DIFOSFOGLICERATO

O 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) é um fosfato orgânico presente nos eritrócitos e exerce uma função importante no transporte de oxigênio. Em humanos, o 2,3-DPG apresenta concentração equimolar à hemoglobina nos eritrócitos (BENECH e BENECH, 1969; POMPONI et. al., 2001; TORRES et. al., 2007).

O metabolismo dos eritrócitos depende unicamente da glicólise para a obtenção de energia, e o 2,3-DPG é um metabólito intermediário normal da glicólise sintetizado por uma via conhecida como shunt de Rapoport-Luebering (Figura 8). O 1,3-difosfoglicerato

(1,3-DPG) é convertido a 3-fosfoglicerato (3-PG), produzindo uma molécula de ATP. Por outro lado, o 1,3-DPG também pode ser convertido a 2,3-DPG pela enzima difosfoglicerato mutase (DPGM) sem produção de ATP. A enzima difosfoglicerato fosfatase (DPGF) converte o 2,3-DPG em 3-PG, que entra novamente na via glicolítica (HSIA, 1998; CASTILHO et. al., 2003; CHO et. al., 2008).

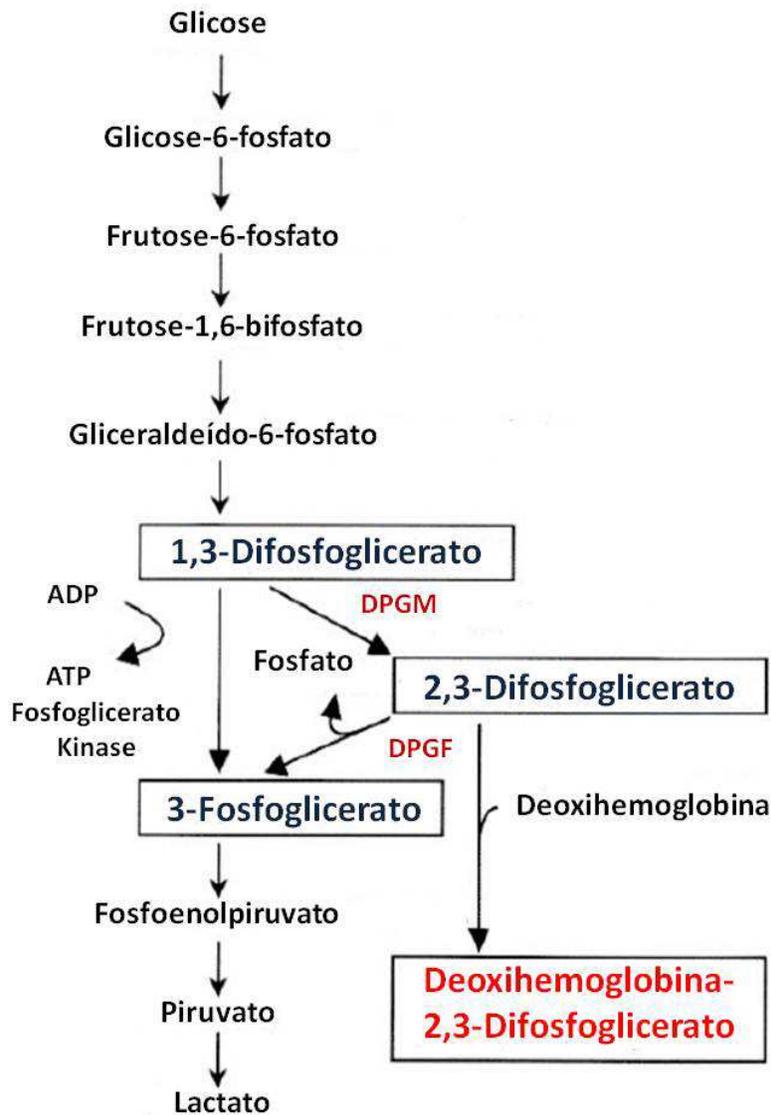


Figura 8. Glicólise, mostrando o shunt de Rapoport-Luebering onde o 2,3-DPG é formado. Adaptado de Hsia, 1998.

Em 1967, Benesch e Benesch, e Chanutin e Curnish, mostraram que o 2,3-DPG presente em altas concentrações nos eritrócitos, diminui a afinidade do oxigênio com a hemoglobina (BELLINGHAM et. al., 1971).

O transporte de oxigênio e sua distribuição para os tecidos são regulados pela afinidade da hemoglobina ao oxigênio. Esta afinidade pode ser alterada por mudanças no pH, temperatura, concentração de dióxido de carbono, e fosfatos orgânicos como 2,3-DPG e adenosina trifosfato. A relação entre a hemoglobina e o oxigênio em equilíbrio é descrita pela forma sigmóide da curva de dissociação da hemoglobina (Figura 9) (TIMMS e TISI, 1984; PICCIONI et. al., 2003).

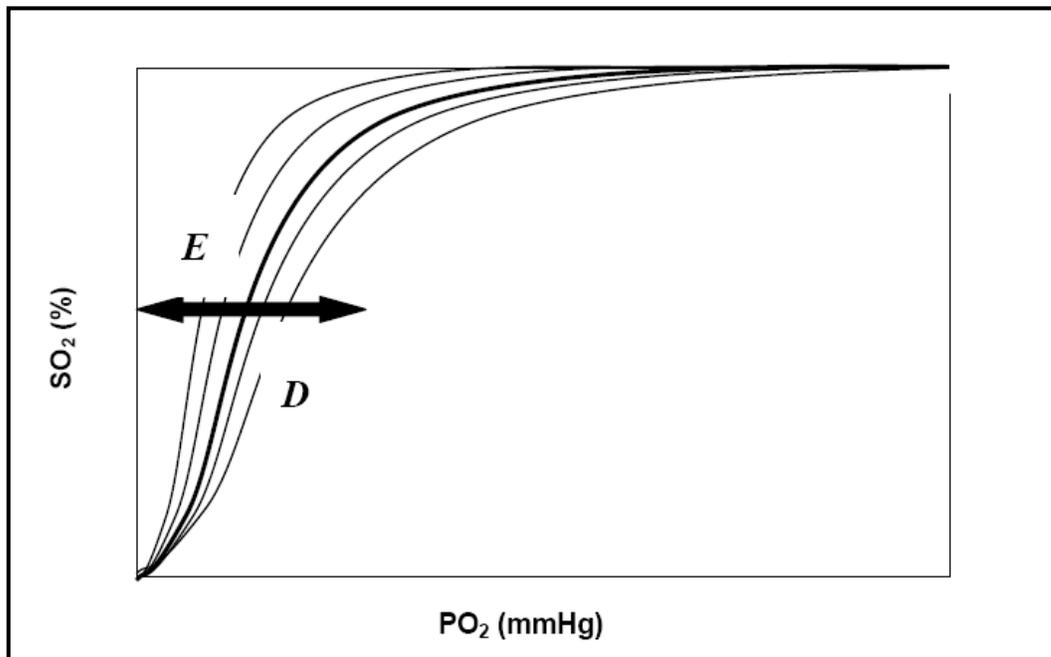


Figura 9. Curva de dissociação da hemoglobina.

A redução do pH ou o aumento da temperatura e do 2,3-DPG deslocam a curva para a direita (D). O aumento do pH ou a redução da temperatura e do 2,3-DPG deslocam a curva para a esquerda (E) (CASTILHO et. al., 2003).

O 2,3-DPG se liga a um sítio específico na cadeia beta da hemoglobina mudando a conformação da molécula de hemoglobina, devido a alterações do meio químico e eletrostático do sítio de ligação do oxigênio na hemoglobina (propriedades alostéricas), estabilizando-a energeticamente para forma desoxigenada (conformação-T). Essa mudança de conformação diminui a afinidade do oxigênio a hemoglobina e causa o deslocamento da curva de dissociação da hemoglobina para a direita, aumentando a liberação de oxigênio para os tecidos (MELDON, 1985; HSIA, 1998; DUBEY et. al., 2003). Níveis diminuídos de 2,3-DPG aumentam a afinidade da hemoglobina ao oxigênio e desvia a curva de dissociação da hemoglobina para a esquerda, fazendo com que haja uma redução na liberação de oxigênio para os tecidos (CASTILHO et. al., 2003).

Os principais fatores que regulam a concentração de 2,3-DPG nos eritrócitos são alterações no pH intra-eritrocitário e hipóxia (TORRES et. al., 2007).

Elevações no pH intracelular estimulam a glicólise, aumentando a atividade da DPGM e inibindo a atividade da DPGF, resultando numa maior síntese e menor degradação de 2,3-DPG. Do mesmo modo, a queda do pH intracelular provoca um efeito contrário (DUHN e GERLACH, 1971; DEUTICKE et al., 1971).

A hipóxia também altera a concentração de 2,3-DPG e esta alteração baseia-se em três hipóteses:

- 1- O eritrócito desoxigenado altera o pH plasmático para alcalino, pois a hemoglobina desoxigenada é um ácido mais fraco do que a forma oxigenada. Como descrito anteriormente, a elevação do pH intra-eritrocitário aumenta a síntese do 2,3-DPG (DUHN e GERLACH, 1971).

- 2- O 2,3-DPG possui maior afinidade pela hemoglobina desoxigenada. Em situação de hipóxia, há um aumento da hemoglobina desoxigenada, fazendo com que o 2,3-DPG ligue-se mais facilmente à hemoglobina. Desta forma, ocorre uma diminuição do 2,3-DPG livre que reduz sua ação como inibidor da DPGM, resultando num aumento da síntese do 2,3-DPG (DUHN e GERLACH, 1971; NELSON e DAVEY, 1995b).
- 3- A hipóxia também estimula a eritropoiese, aumentando o número de eritrócitos jovens que possuem maior concentração de 2,3-DPG que os mais velhos (SAMAJA et. al., 1991).

Alterações na concentração de 2,3-DPG podem ocorrer quando o transporte de oxigênio está comprometido, como na anemia, altas altitudes, problemas cardíacos congênitos, dispnéia do sono e doença pulmonar obstrutiva crônica (MULQUINEY e KUCHEL, 1999; CASTILHO et. al., 2003; CLERBAUX et. al., 2006).

Na DPOC, devido as anormalidades na troca gasosa a eliminação de dióxido de carbono pelos pulmões pode estar prejudicada. Do mesmo modo, a oxigenioterapia realizada por esses pacientes, pode causar a retenção de dióxido de carbono (FREMAULT et. al., 2008).

A eliminação reduzida do dióxido de carbono pelos pulmões faz elevar o seu nível no sangue, e conseqüentemente, eleva-se o nível do ácido carbônico. Com isso há maior quantidade de íons hidrogênio livres no organismo, ocasionando a queda do pH sanguíneo. Como já visto anteriormente, a queda no pH reduz a atividade da via glicolítica, que diminui a ação da DPGM e estimula a DPGF, resultando numa menor síntese e maior degradação de 2,3-DPG (NIELSEN et. al., 1990). Assim, a diminuição na

concentração de 2,3-DPG pode afetar a distribuição de oxigênio aos tecidos, podendo comprometer a oxigenação dos tecidos.

1.3. HOMOCISTEÍNA

A homocisteína (Hci) é um aminoácido sulfidrílico, formado durante o metabolismo da metionina, aminoácido essencial proveniente da dieta. Uma vez formada, a homocisteína pode ser metabolizada intracelularmente por transulfuração à cisteína ou por remetilação à metionina. (Figura 5 e 6) (BYDLOWSKI et. al., 1998; ZHOU e AUSTIN, 2008).

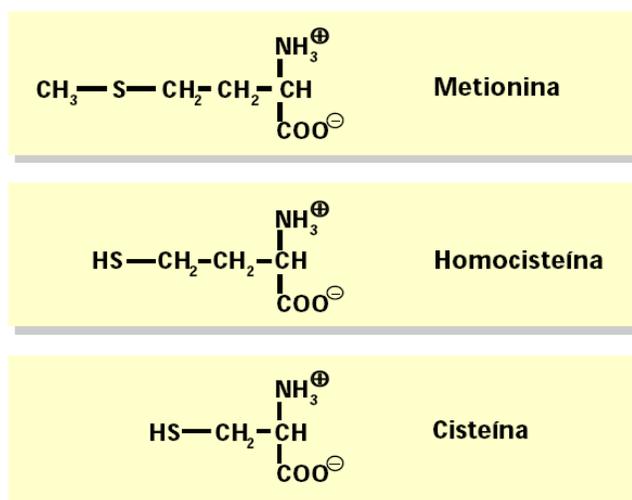


Figura 5. Estruturas da Metionina, Homocisteína e Cisteína. Adaptado de Jacobsen.

A metionina da dieta é convertida a S-adenosilmetionina (SAM) pela enzima metionina-adenosiltransferase (MAT). A SAM é desmetilada a S-adenosil-homocisteína

(SAH) e sofre hidrólise para formar a homocisteína, que pode ser metabolizada pela via de remetilação ou pela via de transulfuração (BYDLOWSKI et. al., 1998; ZHOU e AUSTIN, 2008).

Na via de transulfuração a homocisteína é convertida pela enzima cistationina β -sintase (CBS) e pela vitamina B₆ em cistationina que por sua vez sofre ação da enzima cistationina γ -liase (CGL) e da vitamina B₆ para formar a cisteína. A cisteína pode ser utilizada em diversas funções celulares, como na a síntese de proteínas e glutathione - um importante agente antioxidante (MARON et. al., 2006; ZHOU et. al., 2008). A via de transulfuração ocorre quando a metionina está em excesso (WIERZBICKI, 2007; ANTONIADES et. al., 2009).

Em condições em que ocorre baixa ingestão de proteína, a homocisteína pode ser remetilada à metionina pelo ciclo do folato e pelo fígado e rins. No ciclo do folato, são necessárias as enzimas metionina sintase e 5,10-metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR), e a vitamina B₁₂ como cofator. O folato é convertido a 5-metiltetrahydrofolato, um importante doador metil na transformação da homocisteína em metionina. No fígado e rins, a homocisteína é remetilada pela enzima betaína homocisteína metiltransferase (BHMT), que transfere um grupo metil a homocisteína pela desmetilação da betaína a dimetilglicina, formando novamente a metionina (MARON e LOSCALZO, 2006; ZHOU e AUSTIN, 2008; WIERZBICKI, 2007; ANTONIADES et. al., 2009).

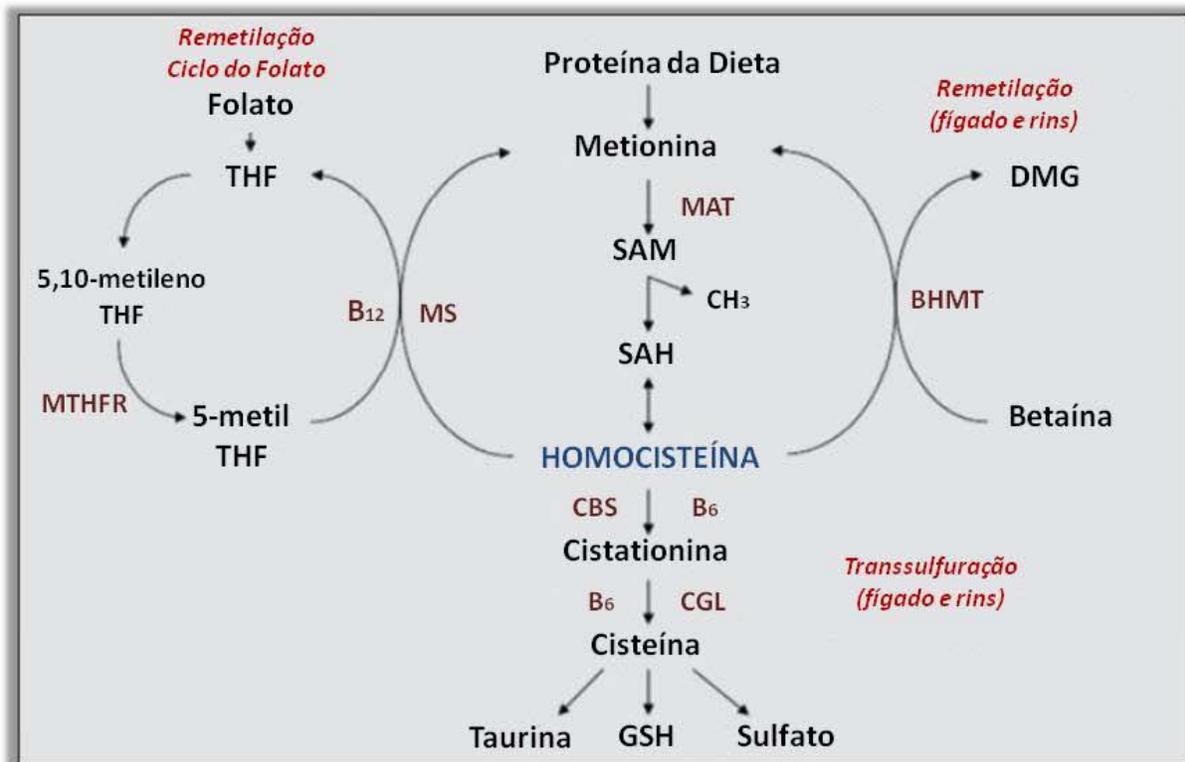


Figura 6. Metabolismo da Homocisteína. Adaptado de Zhou e Austin, 2009.

A homocisteína total plasmática (tHci) é representada pelas frações de homocisteína livre, homocistina, homocisteína ligada à proteína e dissulfetos mistos de homocisteína-cisteína (Figura 7). O nível normal de tHci é $\leq 15 \mu\text{mol/L}$. Fatores genéticos ou adquiridos podem influenciar nos níveis de homocisteína plasmática – Tabela 1 (REFSUM et. al., 2004; ANTONIADES et. al., 2009).

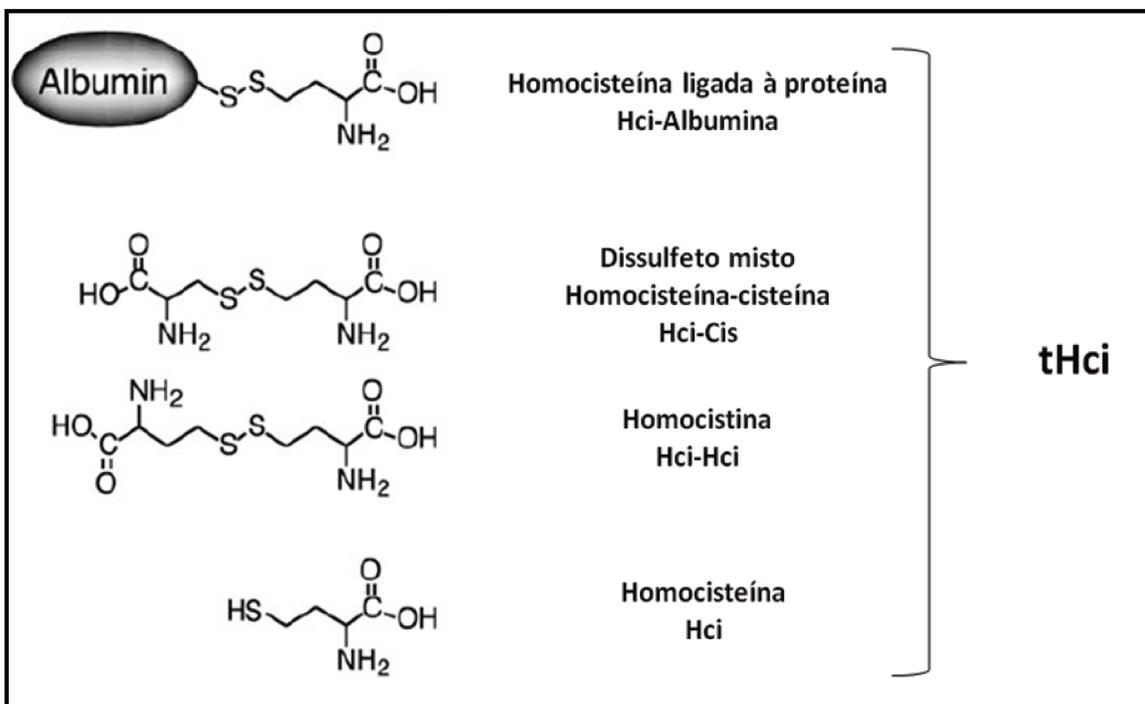


Figura 7. Espécies de Homocisteína encontradas no plasma. Adaptado de Refsum et. al., 2004.

O termo “hiperhomocisteinemia” é usado quando os níveis de homocisteína excedem 15 µmol/L. A hiperhomocisteinemia pode ser classificada como leve (15-30 µmol/L), moderada (30-100 µmol/L) e grave (>100 µmol/L) – Tabela 1 (REFSUM et. al., 2004; ZHOU e AUSTIN, 2008; BOLDYREV, 2009).

Tabela 1. Causas do aumento da homocisteína de acordo com a idade os níveis de homocisteína plasmática total (REFSUM et. al., 2004).

Categoria	Causas
<u>De acordo com a idade</u>	
Recém-nascidos	Deficiência de vitamina B ₁₂ Hipermetioninemia Homocistinúria
Crianças	Deficiência de ácido fólico e vitamina B ₁₂ Homocistinúria
Adultos	Estilo de vida não saudável Dieta vegetariana Polimorfismo C677T no gene da MTHFR
Idosos	Deficiência de vitamina B ₁₂ (má absorção) Estilo de vida não saudável Insuficiência renal Medicamentos
<u>De acordo com as concentrações de Hci plasmática total</u>	
15 – 30 µmol/L	Estilo de vida não saudável Dieta vegetariana Polimorfismo C677T no gene da MTHFR Função renal prejudicada Drogas que afetam a concentração de Hci, ácido fólico e vitamina B ₁₂
30 – 100 µmol/L	Deficiência de vitamina B ₁₂ (moderada ou severa) Deficiência de ácido fólico (moderada ou severa) Insuficiência renal
>100 µmol/L	Deficiência de vitamina B ₁₂ severa Homocistinúria

Diversos fatores alteram a concentração de homocisteína plasmática, tais como:

- ✓ **Defeitos genéticos nas enzimas envolvidas no metabolismo da homocisteína.**

A deficiência da enzima CBS resulta em homocistinúria, um raro erro inato do metabolismo que leva a uma excreção urinária de grandes quantidades de homocisteína

combinado com um aumento da homocisteína plasmática, geralmente acima de 100 $\mu\text{mol/L}$ (BYDLOWSKI et. al., 1998; REFSUM et. al., 2004). O polimorfismo C677T no gene da MTHFR reduz a atividade enzimática da MTHFR em 50% e está associado com níveis elevados de homocisteína no plasma. Este polimorfismo troca C por T na posição 677, substituindo alanina por valina (ARRUDA et. al., 1998; CATTANEO, 2006). O polimorfismo A1298C no gene da MTHFR sozinho, não afeta os níveis de homocisteína, mas indivíduos heterozigotos para ambas as mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR podem apresentar hiperhomocisteinemia. O polimorfismo A1298C, troca A por C na posição 1298, substituindo glutamina por alanina (KOLLING et. al., 2004; ELDIBANY e CAPRINI, 2007). Outros polimorfismos envolvidos nas enzimas do metabolismo da homocisteína que resultam em hiperhomocisteinemia são: MTR A2756G e MTRR A66G (GAUGHAN et. al, 2001; CATTANEO, 2006).

✓ **Fatores nutricionais.**

A deficiência de vitamina B₆ e B₁₂ prejudicam o metabolismo da homocisteína, pois as atividades das enzimas responsáveis por esse metabolismo dependem destas vitaminas como cofatores. A deficiência de folato não afeta diretamente estas enzimas, mas reduz o suprimento de THF no ciclo do folato. A concentração de tHci está inversamente relacionada com a concentração plasmática de folato, vitamina B₆ e B₁₂, bem como, a ingestão destas vitaminas (CASTRO et. al., 2006; ZHOU et. al.; 2009).

✓ **Função renal.**

A insuficiência renal é acompanhada pela elevação nas concentrações de tHci, devido a uma diminuição na excreção de homocisteína, ou falha no seu metabolismo (BYDLOWSKI et. al., 1998; CASTRO et. al., 2006).

✓ **Idade e gênero.**

Os níveis de homocisteína aumentam com a idade e após a puberdade os homens tendem a apresentar concentrações de homocisteína maiores (REFSUM et. al., 2004).

✓ **Outros fatores.**

Tabagismo, alcoolismo, sedentarismo, medicamentos (anticonvulsivantes e diuréticos tiazídicos), doença hepática, diabetes e hipotireoidismo elevam as concentrações de homocisteína no plasma (CASTRO et. al., 2006; ELDIBANY e CAPRINI, 2007).

Estudos epidemiológicos sugerem que níveis elevados de homocisteína estão associados com um aumento do risco para doenças cardiovasculares, pois a hiperhomocisteinemia pode causar lesão e disfunção endotelial. Além destas desordens, a hiperhomocisteinemia também está envolvida nas complicações neurológicas e psiquiátricas, defeitos congênitos, complicações na gravidez, e doenças neoplásicas (McCULLY, 1969; REFSUM et. al., 2004; ELDIBANY e CAPRINI, 2007).

Muitos estudos mostram que a hiperhomocisteinemia causa lesão e disfunção celular através do estresse oxidativo. Dessa maneira, nos pacientes com DPOC que dependem da oxigenioterapia, pode haver um aumento na formação de espécies reativas do oxigênio capazes de causar dano ao parênquima pulmonar (KIM et. al., 2008; CARPAGNANO et. al., 2009).

O grupo sulfidril (-SH) da homocisteína sofre oxidação facilmente, gerando espécies reativas do oxigênio que ocasiona lesão e disfunção celular. As espécies reativas do oxigênio são produzidas durante a auto-oxidação da homocisteína em excesso. Normalmente, a glutatona neutraliza os radicais livres. No entanto, o aumento

da homocisteína plasmática reduz a atividade da glutathione peroxidase e a formação de glutathione, alterando o sistema de defesa antioxidante extra e intracelular e assim compromete o sequestro de radicais livres produzidos pela oxidação da homocisteína e pela oxigenioterapia (ELDIBANY e CAPRINI, 2007; VENTURA et. al., 2008; ZHOU e AUSTIN, 2009).

A investigação das concentrações de 2,3-DPG, bem como, da homocisteína e de fatores que influenciam na sua concentração (ácido fólico, vitamina B₁₂ e alguns polimorfismos no gene da MTHFR), é de grande relevância para o acompanhamento de pacientes com DPOC. Pois, alterações importantes nas concentrações de 2,3-DPG e homocisteína podem estar envolvidas no comprometimento da distribuição do oxigênio para os tecidos e na progressão da doença, respectivamente, agravando ainda mais o quadro clínico desses pacientes.



2. OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os níveis plasmáticos de homocisteína e de 2,3-DPG em uma amostra da população brasileira com DPOC.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar as concentrações de homocisteína plasmática, 2,3-DPG, vitamina B₁₂, ácido fólico e os perfis hepático e renal.
2. Investigar a presença dos polimorfismos C677T e A1298C no gene da MTHFR.
3. Comparar os polimorfismos com os parâmetros bioquímicos analisados (homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂).



3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Ambulatório de Pneumologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP sob o parecer número 659/2006. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido, por escrito, pelos pacientes ou pelos familiares responsáveis pelo paciente.

3.1. Pacientes

O grupo de pacientes foi composto por homens e mulheres com DPOC, acompanhados no Ambulatório de Pneumologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

3.1.1. Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo pacientes, de ambos os gêneros, idade acima de 30 anos e diagnóstico de DPOC.

3.1.2. Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão foram: presença de doença renal e hepática, diabetes, hipotireoidismo e neoplasia.

3.2. Controles

O grupo controle foi composto por homens e mulheres em acompanhamento clínico preventivo no Hospital de Clínicas da UNICAMP.

3.2.1. Critérios de Inclusão

Foram incluídos no grupo controle homens e mulheres sem história de DPOC ou qualquer outra doença pulmonar e idade superior a 30 anos.

3.2.2. Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão para o grupo controle foram: presença de doença renal e hepática, diabetes, hipotireoidismo e neoplasia.

3.3. Coleta de Sangue

Todos os participantes do estudo responderam um questionário (Anexo 1 e 2) onde foram avaliados a presença de patologias, tabagismo, uso de medicamentos e o uso de oxigenioterapia.

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 3), foi realizada a coleta de sangue, após jejum de 12 horas. Foram coletados 28 mL de sangue do grupo de pacientes com DPOC e grupo controle, sendo:

- 4 mL de sangue em tubo seco para a determinação dos perfis hepático e renal;
- 4 mL de sangue em tubo seco protegido da luz para a determinação de ácido fólico e vitamina B₁₂;
- 4 mL de sangue em tubo contendo EDTA para dosagem de homocisteína;
- 8 mL de sangue em tubo contendo heparina para a dosagem de 2,3-DPG.
- 8 mL de sangue em tubo contendo EDTA para a extração de DNA;

3.4. DETERMINAÇÃO DE HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA

Para a dosagem de Homocisteína foram coletados 4 mL de sangue em tubo contendo EDTA. Logo após a coleta a amostra foi colocada em banho de gelo até a centrifugação. O material foi centrifugado por 10 minutos a 2000 rpm e uma alíquota do plasma (aproximadamente 1,5 mL) foi armazenada a - 80° C até a realização das análises.

A dosagem de Homocisteína foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A CLAE é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases (fase estacionária e fase móvel), que estão em contato íntimo (COLLINS, C.H. et. al., 2006).

Para determinação de Homocisteína plasmática o método por CLAE foi padronizado, com eluição isocrática e detecção fluorométrica (PFFEIFER et. al., 1999).

O valor de referência para Homocisteína é $\leq 15 \mu\text{mol/L}$.

3.4.1. Preparação das Soluções

PBS: em um becker colocou-se aproximadamente 200 mL de água Milli-Q, ao qual foi adicionado 0,05 g de fosfato de sódio bibásico e 2 g de cloreto de sódio. Após ajustar o pH para 7,4 com ácido ortofosfórico 0.5%, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL para completar o volume.

Tampão Borato 0,125 M com EDTA: aproximadamente 200 mL de água Milli-Q foram colocados em um becker. Adicionou-se 1,933 g de ácido bórico e 0,2924 g de EDTA. A solução foi agitada com aquecimento por 10 minutos para a dissolução do EDTA. O pH foi ajustado para 9,5 com NaOH 5 M e a solução foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL para completar o volume .

Ácido Tricloroacético (TCA) 10% com EDTA: 40 mL de água Milli-Q foram colocados em um becker. Adicionou-se 5 mL de TCA (diluído 1 g/mL) e 0,0145 g de EDTA. Agitou-se com aquecimento por 10 minutos. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL para completar o volume.

NaOH 1,55 M: colocou-se 3,1 g de NaOH em um balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água Milli-Q.

Padrão Interno: em um tubo de ensaio pipetou-se 1910 μL de PBS e 90 μL de padrão interno (Cistamina 4 μM).

Meio 1: para a realização de 30 análises, incluindo os pontos da curva de calibração, pipetou-se 750 μL de PBS, 750 μL de padrão interno, 300 μL de água Milli-Q e adicionou-se 0,03 g de TCEP.

Meio 2: 0,0015 g de SBD-F foram diluídos em 1500 μL de tampão borato, em seguida adicionou-se mais 3750 μL de tampão borato e 300 μL de NaOH 1,55 M. A quantidade de meio 2 foi preparada para a realização de 30 análises, incluindo os pontos da curva de calibração.

3.4.2. Preparação da Fase Móvel

Ácido acético (0,1 M) – 250 mL de água Milli-Q foram colocados em um balão volumétrico de 500 mL, em seguida foram adicionados 3 mL de ácido acético e completou-se com água Milli-Q até o menisco.

Acetato de Sódio (0,1 M) – colocou-se 6,8 g de acetato de sódio em um balão volumétrico de 500 mL, e completou-se com água Milli-Q.

As soluções foram misturadas na proporção 1:1 e o pH foi ajustado para 5,5. Após o ajuste do pH a solução foi filtrada a vácuo e adicionou-se 3% de metanol.

3.4.3. Preparação da amostra

A preparação da amostra envolveu três processos: redução, precipitação de proteínas e derivatização.

1. Redução: 50 μL de amostra (plasma) foram colocados em um eppendorf, ao qual foi adicionado 60 μL de Meio 1, em seguida as amostras foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Esse procedimento permite a redução dos tióis e o desacoplamento da homocisteína de proteínas presentes no plasma.
2. Precipitação de proteínas: após o período de incubação adicionou-se 100 μL de TCA 10% contendo EDTA. As amostras foram agitadas por 30 segundos no vórtex e centrifugadas por 10 minutos a 13000 rpm.
3. Derivatização: 50 μL do sobrenadante foram colocados em um eppendorf protegido da luz e em seguida adicionou-se o Meio 2. As amostras foram incubadas a 60°C por 60 minutos. Após o período de incubação, 10 μL das amostras foram injetadas no HPLC.

3.4.4. Curva de Calibração

Para a realização da curva de calibração (Figura 10), foi preparada uma solução padrão de homocisteína na concentração de 1mg/mL.

A curva de calibração foi construída através de sucessivas diluições da solução padrão de homocisteína nas seguintes concentrações: 50, 25, 12.5, 6.25 e 3.125 $\mu\text{mol/L}$.

Os pontos da curva foram tratados com o mesmo procedimento realizados nas amostras.

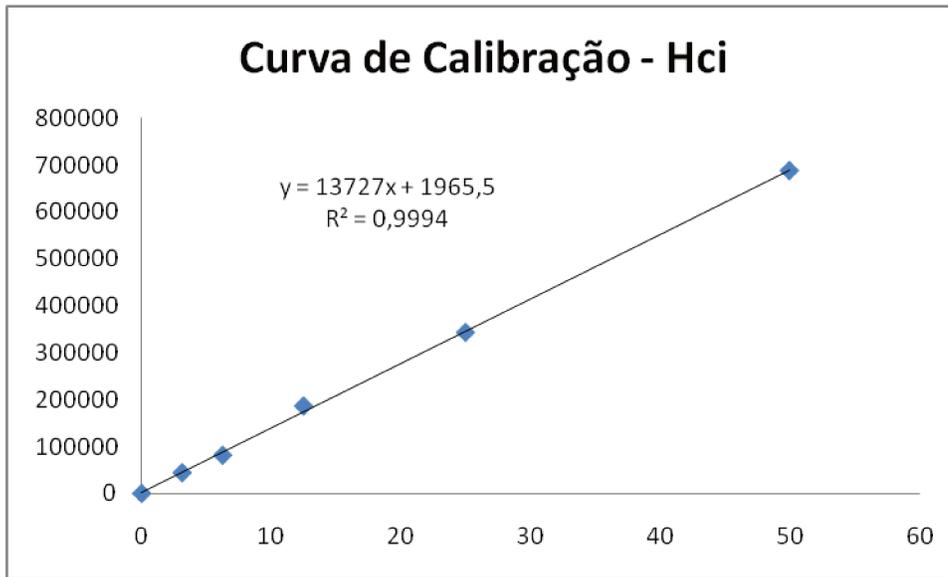


Figura 10. Curva analítica obtida através dos valores da área de homocisteína.

3.4.5. Equipamento

As análises foram realizadas em um cromatógrafo da Shimadzu com detector de fluorescência RF-10AXL. A separação foi realizada em uma coluna ODS2 250x3,0 mm com micropartículas de 5 μm e por uma pré-coluna. A detecção foi realizada em um comprimento de onda de excitação de 385 nm e emissão de 515 nm. A fase móvel foi composta pelo tampão ácido acético/acetado de sódio 0,1 M contendo 3% de metanol, num fluxo de 0,7 mL/minuto a temperatura ambiente.

3.4.6. Cromatograma

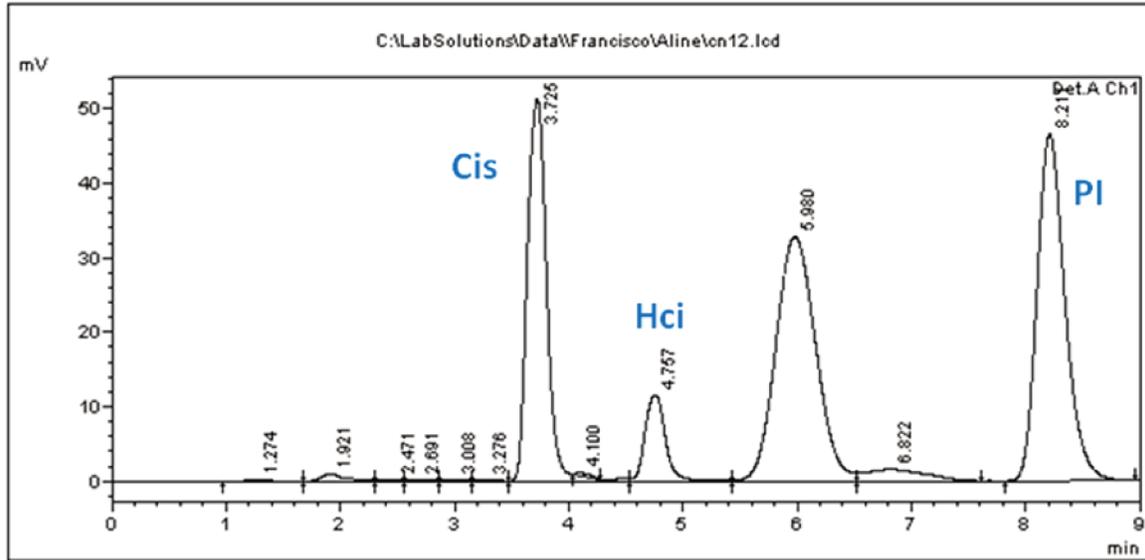


Figura 11. Cromatograma obtido a partir da amostra de um paciente: os picos em 3.725, 4.757 e 8.211 minutos são correspondentes a cisteína (Cis), homocisteína (Hci) e padrão interno (PI) - cistamina.

3.5. DETERMINAÇÃO DE 2,3-DPG

Para a determinação de 2,3-DPG foram coletados 8 mL de sangue em tubo heparinizado. O transporte das amostras foi realizado em isopor contendo gelo. Devido à degradação nos níveis sanguíneos do 2,3-DPG, realizamos a primeira etapa de desproteinização num período de no máximo 2 horas após a coleta.

A concentração de 2,3-DPG por hematócrito foi medida por espectrofotometria, utilizando os reagentes da *Roche Diagnostics*.

O valor de referência para o 2,3-DPG é de 4,5 – 5,7 mM de 2,3-DPG/L de eritrócitos.

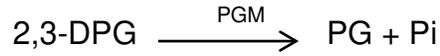
3.5.1. Preparação da Amostra

3.5.1.1. Desproteínização

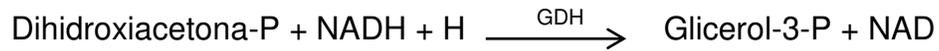
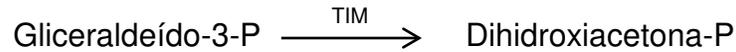
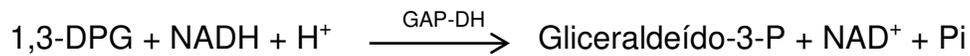
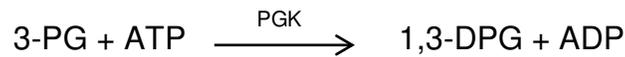
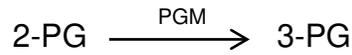
Em um tubo de ensaio foi pipetado 5 mL de Ácido Perclórico 0,6 M e adicionado 1 mL de sangue heparinizado. O material foi homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 5000 rpm. Após a centrifugação, retirou-se 4 mL do sobrenadante, o qual foi neutralizado com 500 µL de Carbonato de Potássio 2,5M. O material foi colocado em banho de gelo por aproximadamente 60 minutos e o precipitado removido por centrifugação. Retirou-se 1 mL do sobrenadante para a dosagem de 2,3-DPG.

3.5.2. Princípio do método

O 2,3 DPG é enzimaticamente hidrolisado a fosfoglicerato (PG) e fósforo inorgânico (Pi). Esta reação é catalizada pela fosfoglicerato mutase (PGM) em presença do ácido 2-fosfoglicérico.



ácido 2-fosfoglicérico



Ambos, 2-PG e 3-PG podem ser formados. 2-PG é transformado em 3-PG, que por sua vez é convertido pela fosfoglicerato quinase (PGK) em 1,3-DPG que sofre ação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAP-DH), originando gliceraldeído-3-P. A triosefosfato isomerase (TIM) converte gliceraldeído-3-P em dihidroxiacetona-P e o glicerol 3-fosfato desidrogenase (GDH) a transforma em Glicerol-3-P. Dois moles de NADH são oxidados por mol de 2,3-DPG.

3.5.3. Reagentes

A determinação do 2,3-DPG foi realizada utilizando-se os seguintes reagentes:

Solução 1 - solução tampão de trietanolamina

Solução 2 - ATP e NADH

Solução 3 - fosfoglicerato mutase (PGM), fosfoglicerato quinase (PGK), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAP-DH), triosefosfato isomerase (TIM) e glicerol 3-fosfato desidrogenase (GDH)

Solução 4 - fosfoglicerato mutase (PGM)

Solução 5 - glicolato-2-fosfato.

3.5.4. Protocolo de Análise de 2,3-DPG

Pipetaram-se os seguintes reagentes nos tubos de ensaio (BRANCO e AMOSTRA):

Reagente	Branco	Amostra
Solução 1	1000 uL	1000 uL
Solução 2	25 uL	25 uL
Solução 3	25 uL	25 uL
Amostra neutralizada	-	50 uL
Água destilada	50 uL	-

Após a adição das soluções os tubos foram homogeneizados e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. Após o período de incubação as amostras foram colocadas em cubetas de caminho ótico de 1 cm e as absorvâncias (A_1) do branco e das amostras foram lidas espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 340 nm.

Em seguida, adicionaram-se os seguintes reagentes:

Reagente	Branco	Amostra
Solução 4	10 uL	10 uL
Solução 5	10 uL	10 uL

Os tubos foram homogeneizados novamente e incubados a temperatura ambiente por 25 minutos. As absorvâncias (A_2) do branco e das amostras foram lidas espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 340 nm.

3.5.4.1. Cálculos para determinação da concentração de 2,3-DPG:

$$\Delta A = (A_1 - A_2)_{\text{amostra}} - (A_1 - A_2)_{\text{branco}}$$

$$C = 11,93 \times \Delta A_{340\text{nm}} \text{ (mmol/L)}$$

3.5.4.2. Cálculo baseado no volume de eritrócitos

$$\text{Concentração de 2,3-DPG} \times \frac{100}{\text{HCT}} = 2,3\text{DPG/L de eritrócitos}$$

3.6. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO

Para a dosagem de Ácido Fólico foram coletados 4 mL de sangue em tubo seco protegido da luz. O valor de referência do ácido fólico é de 3,2 a 9,0 ng/mL.

A determinação de Ácido fólico ocorre por fixação através da utilização de analisadores de imunoenaios **Elecsys** (Roche, Mannheim, Germany).

Princípio do teste

- 30 µL da amostra são incubados com os reagentes de pré-tratamento do folato, onde o folato fixado é liberado a partir das proteínas de fixação do folato.
- Através da incubação da amostra pré-tratada com a proteína de fixação do folato marcada com rutênio, forma-se um complexo de folato, cuja quantidade é depende da concentração do analito na amostra.
- Após a incorporação das micropartículas revestidas de estreptavidina e de folato marcado com biotina, os locais não ocupados da proteína de fixação do folato marcado com rutênio são ocupados, formando-se um complexo de proteína de fixação do folato marcada com rutênio-folato biotinilado. O complexo formado liga-se à fase sólida pela interação da biotina e da estreptavidina.
- A mistura da reação é aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eletrodo. Os elementos não ligados são removidos. A aplicação de uma corrente elétrica ao eletrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador.

- Os resultados são determinados com base numa curva de calibração, gerada especificamente pelo analisador através de uma calibração.

3.7. DETERMINAÇÃO DE VITAMINA B₁₂

Para a dosagem de Vitamina B₁₂ foram coletados 4 mL de sangue em tubo seco protegido da luz. O valor de referência para a Vitamina B₁₂ é de 202 a 900 pg/mL.

A dosagem da Vitamina B₁₂ ocorre por fixação através da utilização de analisadores de imunoenaios **Elecsys** (Roche, Mannheim, Germany).

Princípio do teste

- 15 µL da amostra são incubados com o reagente de pré-tratamento da vitamina B₁₂, a vitamina B₁₂ fixada é então liberada.
- A amostra pré-tratada com o fator intrínseco marcado com rutênio, forma um complexo de vitamina B₁₂ e proteína de ligação, cuja quantidade é depende da concentração do analito na amostra.
- Após a incorporação das micropartículas revestidas de estreptavidina e de vitamina B₁₂ marcada com biotina, os pontos de fixação ainda vazios de fator intrínseco marcado com rutênio-vitamina B₁₂ com biotina. O complexo formado liga-se à fase sólida pela interação da biotina e da estreptavidina.

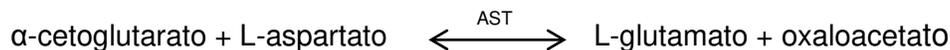
- A mistura da reação é aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eletrodo. Os elementos não ligados são removidos. A aplicação de uma corrente elétrica ao eletrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador.
- Os resultados são determinados com base numa curva de calibração, gerada especificamente pelo analisador através de uma calibração.

3.8. DETERMINAÇÃO DO PERFIL HEPÁTICO

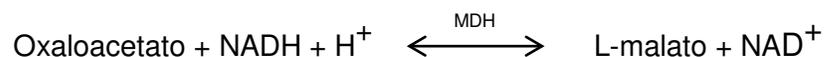
Para a determinação do perfil hepático foram colhidos 4 mL de sangue em tubo seco. As dosagens de AST, ALT, GGT e ALP foram realizadas através de um analisador automático (Modular[®] - Roche).

3.8.1. AST (Aspartato Aminotransferase)

Princípio do teste: colorimétrico.



A enzima AST catalisa a reação e o aumento de oxaloacetato é determinado na reação indicadora catalisada pela malato desidrogenase (MDH).



NADH é oxidado para NAD⁺. A velocidade de diminuição do NADH é diretamente proporcional à velocidade de formação do oxaloacetato e a atividade da AST.

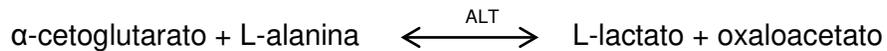
✓ **Valor de referência.**

Homem: < 27 U/L

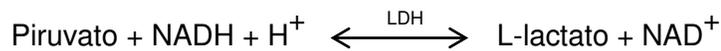
Mulher: < 33 U/L

3.8.2. ALT (Alanina Aminotransferase)

Princípio do teste: colorimétrico.



A enzima ALT catalisa a reação e o aumento do piruvato é determinado na reação indicadora catalisada pela lactato desidrogenase (LDH).



NADH é oxidado para NAD⁺. A velocidade de diminuição do NADH é diretamente proporcional à velocidade de formação do piruvato e à atividade da ALT.

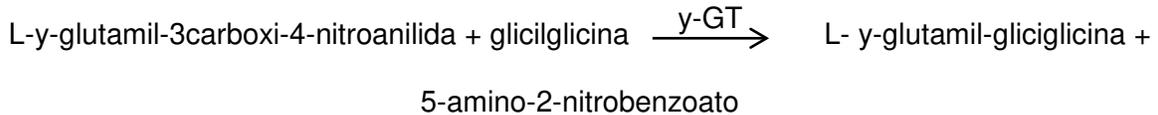
✓ **Valor de referência.**

Homem: < 50 U/L

Mulher: < 34 U/L

3.8.3. GGT (Gama Glutamittransferase)

Princípio do teste: cinético colorimétrico.



A gama-glutamilttransferase transfere o grupo y-glutamil (y-GT) da L- y-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida para a glicilglicina. A quantidade liberada de 5-amino-2-nitrobenzoato é proporcional à atividade de GGT e pode ser medida fotometricamente.

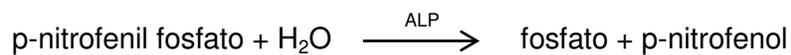
✓ **Valor de referência.**

Homem: < 71 U/L

Mulher: < 42 U/L

3.8.4. ALP (Fosfatase Alcalina)

Princípio teste: cinético colorimétrico.



Na presença de íons de magnésio e zinco, o p-nitrofenil fosfato é hidrolisado por fosfatases, formando fosfato e p-nitrofenil. O p-nitrofenil liberado é proporcional à atividade de ALP e pode ser medido fotometricamente.

✓ **Valor de referência.**

Homem: < 129 U/L

Mulher: < 104 U/L

3.9. DETERMINAÇÃO DO PERFIL RENAL

Para a determinação do perfil renal foram colhidos 4 mL de sangue em tubo seco. As dosagens de Uréia e Creatinina foram realizadas através de um analisador automático (Modular® - Roche).

3.9.1. Creatinina (Cinético colorimétrico)

Princípio do teste:



Numa solução alcalina, a creatinina forma um complexo amarelo-avermelhado com picrato. A intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de creatinina, podendo ser determinada fotometricamente.

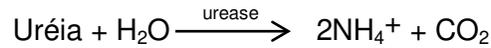
✓ **Valor de referência.**

Homem: até 1,20 mg/dL

Mulher: até 0,90 mg/dL

3.9.2. Uréia (Cinético)

Princípio do teste:



A amônia formada reage com α -cetoglutarato e o NADH na presença da GLDH e produz glutamato e NAD⁺.



A redução da absorbância causada pelo consumo do NADH é medida cineticamente.

✓ **Valor de referência.**

Adultos < ou = 65 anos: < 50 mg/dL

> 65 anos: < 71 mg/dL

3.10. MÉTODOS MOLECULARES

3.10.1. Extração de DNA de sangue periférico

O DNA foi isolado de células nucleadas a partir de aproximadamente 8 mL de sangue venoso coletado. O plasma foi descartado, após centrifugação do sangue a 3000 rpm por 10 minutos. Para a lise das hemácias adicionou-se NH₄Cl 0.144M na proporção de 0.5 vezes o volume de células. Após 15 minutos à temperatura ambiente,

a solução foi centrifugada a 2.000 rpm, por 20 minutos. Esta etapa foi repetida até a obtenção de um precipitado nuclear de leucócitos livre de hemácias.

Os leucócitos foram dissolvidos em 10 mL de tampão TKM1 (KCl 1M, EDTA 0,2M, Tris/HCl 2M pH 7.6 MgCl₂ 1M). A seguir acrescentou-se 125µL de Triton X-100 e após homogeneização por inversão, o material foi novamente centrifugado a 2.200 rpm por 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em 5 mL de TKM1 e centrifugado novamente. Desta vez, o sedimento obtido foi ressuspenso em 1 mL de tampão TKM2 (KCl 1M, EDTA 0.2M, Tris/HCl 2M pH 7.6, MgCl₂ 1M, NaCl 5M).

Após a adição de 50 µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) a 10%, à suspensão foi homogeneizada e incubada em banho-maria a 55°C, por 30 minutos. Acrescentaram-se então, 300 µL de NaCl 5M, e após mistura por inversão, centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos.

Ao final, a camada superior contendo o DNA foi transferida para um tubo estéril de 15 mL. Procedeu-se a extração de DNA, adicionando-se 1 mL de fenol (redesilado e saturado em tris/HCl 0.2 mM, pH 8.0, contendo 0.1% de hidroxiquinolina), clorofórmio e álcool-isoamílico, na proporção de 25:24:1. Após mistura por inversão, centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido e novamente adicionou-se 1 mL de clorofórmio/álcool-isoamílico (24:1). Misturou-se por inversão e centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos.

Para a precipitação do DNA foi utilizado etanol absoluto gelado na proporção de 2 vezes o volume da fase aquosa, à temperatura ambiente. Esta mistura foi invertida diversas vezes até a obtenção do precipitado de DNA.

O DNA precipitado foi lavado em etanol gelado a 70%, para eliminar resíduos de sal. O DNA obtido foi ressuspensão em quantidade apropriada de TE (Tris pH 8,0 10mM, EDTA 0,1mM pH 7,4).

3.10.2. Estudo da Mutação C677T no gene da MTHFR

Após a extração do DNA, foi realizada a técnica de amplificação pela PCR (SAIKI et. al., 1989).

A amplificação do DNA genômico para a identificação do polimorfismo C677T no gene da MTHFR foi realizada em um aparelho termociclador automático, através da reação com 0.5 µg de DNA, 2 mM de MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, 50 mM de KCl, 0.33 mM de dNTP (dATP, dGTP, dTTP e dCTP), 0.1 pmol de cada primer (Sense: 5'-TAGAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' e Anti-sense: 5'-AGGACGGTGCGGTGAAGATG-3') e duas unidades de Taq polimerase (Invitrogen).

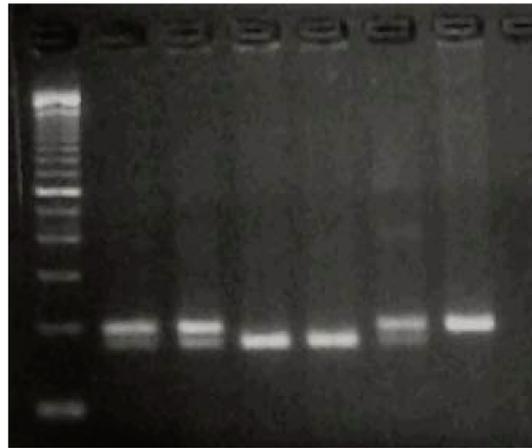
Os parâmetros da PCR utilizados foram os seguintes: desnaturação inicial com duração de 5 minutos a 94°C, seguidos por 35 ciclos com 1 minuto de desnaturação do DNA a 94°C, 1 minuto para anelamento dos primers a 60°C, 1 minuto para a extensão do DNA complementar a 72°C para ação da Taq polimerase e uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

O fragmento do produto obtido da PCR foi de 198 pb. O material amplificado foi separado em gel de agarose a 1.5% em uma cuba contendo tampão TBE, e visualizado sob luz ultravioleta, após coloração com brometo de etídio.

A digestão enzimática foi realizada com 8 µL do produto amplificado utilizando-se 3 U da enzima *Hinf I* e uma solução contendo 5 mM de KCl, 1 mM de Tris-HCl (pH 7.4), 0.01 mM de EDTA, 0.1 mM de DTT, 20 µg/mL de BSA e 0.05% de glicerol, por 12 horas, em banho-maria a 37°C. A presença do polimorfismo no ponto estudado é reconhecida pela enzima, ocorrendo clivagem neste ponto.

Após a digestão do produto amplificado, os fragmentos foram observados através de eletroforese em gel de agarose 3% em tampão de corrida TBE, visualizados sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio e fotografados.

Na presença do alelo mutante (T), no ponto 677, observou-se um fragmento de 175 pb. O fragmento menor de 23 pb é perdido no decorrer da eletroforese. Quando o alelo normal (C) está presente não há clivagem do sítio pela enzima e o fragmento é de 198 pb. A presença dos dois fragmentos é verificada em indivíduos heterozigotos.



M CT CT TT TT CT CC

Figura 12. Digestão do polimorfismo C677T no gene da MTHFR. M – Marcador molecular, CC – Homozigoto normal, CT – Heterozigoto e TT – Homozigoto mutante.

3.10.3. Estudo da Mutação A1298C no gene da MTHFR

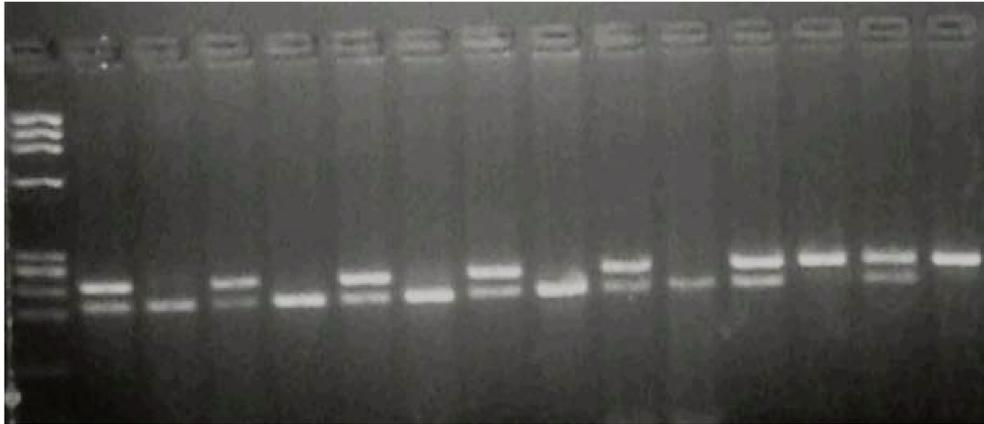
A amplificação do DNA genômico para a identificação do polimorfismo A1298C no gene da MTHFR foi realizada em um aparelho termociclador automático, através da reação com 0.5 µg de DNA, 2 mM de MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, 50 mM de KCl, 0.33 mM de dNTP (dATP, dGTP, dTTP e dCTP), 0.1 pmol de cada primer (Sense: 5'-ATGTGGGGGGAGGAGCTGAC-3' e Anti-sense: 5'-CACTCCCCAACCAAATTCTTCAAAG-3') e duas unidades de Taq polimerase (Invitrogen).

Os parâmetros da PCR utilizados para a detecção do polimorfismo A1298C no gene da MTHFR foram os seguintes: desnaturação inicial com duração de 5 minutos a

94°C, seguidos por 35 ciclos com 1 minuto de desnaturação do DNA a 94°C, 40 segundos para anelamento dos primers a 62°C, 40 segundos para a extensão do DNA complementar a 72°C para ação da Taq polimerase e uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

A digestão enzimática foi realizada com 8 µL do produto amplificado utilizando-se 1.5 U da enzima *Mob II* e uma solução contendo 5 mM de KCl, 1 mM de Tris-HCl (pH 7.4), 0.01 mM de EDTA, 0.1 mM de DTT, 20 µg/mL de BSA e 0.05% de glicerol, por 12 horas, em banho-maria a 37°C. Os fragmentos foram observados através de eletroforese em gel de agarose 3% em tampão de corrida TBE, visualizados sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio e fotografados.

Após a digestão do produto amplificado, a presença do alelo mutante (C), no ponto 1298, observou-se um fragmento de 240 pb. Quando o alelo normal (A) está presente não há clivagem do sítio pela enzima e o fragmento é de 215 pb. O fragmento menor de 25 pb é perdido no decorrer da eletroforese. A presença dos dois fragmentos é verificada em indivíduos heterozigotos.



M AC AA AC AA AC AA AC AA AC AA AC CC AC CC

Figura 13. Digestão do polimorfismo A1298C no gene da MTHFR. M – Marcador molecular, AA – Homozigoto normal, AC – Heterozigoto e CC – Homozigoto mutante.

3.11. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através dos seguintes testes: Qui-quadrado e teste exato de Fisher, quando necessário, para a comparação de proporções; teste de Mann-Whitney; ANOVA para a comparação de variáveis numéricas; e análise de regressão linear. Também foi realizada uma análise descritiva através de tabelas de freqüências para variáveis categóricas e medidas de posição e dispersão para variáveis numéricas. Estas análises foram realizadas através do programa SAS for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.2, SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, USA.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi 5%.



4. RESULTADOS

4.1. Características Clínicas

Neste estudo foram incluídos 28 pacientes com DPOC, sendo 13 pacientes do sexo feminino com idade média de 63.23 ± 17.26 (36 – 87 anos) e 15 pacientes do sexo masculino com idade média de 66.46 ± 8.91 (54 – 79 anos).

O grupo controle foi composto por 28 indivíduos que não apresentavam DPOC ou qualquer outra doença pulmonar, sendo 14 do sexo feminino com idade média de 58.43 ± 11.23 (42 – 82 anos) e 14 do sexo masculino com idade média de 62.21 ± 11.30 (41 – 75 anos).

As características clínicas de pacientes e controles estão descritas na tabela 1. Alguns dados estão expressos como média e desvio padrão, outros por número e porcentagem (%).

Os dados mostram que não houve diferença estatisticamente significativa quando comparamos idade, sexo e hipertensão entre pacientes e controles. O mesmo ocorreu ao compararmos pacientes que faziam uso de oxigenioterapia de acordo com o gênero. Entretanto, quando comparamos o tabagismo entre pacientes e controles, houve uma diferença estatisticamente significativa ($p=0.0005$). Através desses resultados podemos observar que 85.71% dos pacientes com DPOC eram ex-fumantes, reforçando os dados existentes na literatura de que o principal fator de risco para a DPOC é o tabagismo.

Tabela 1. Características clínicas de pacientes e controles.

Características	DPOC (n=28)	Controle (n=28)	P*
Idade	64.96±13.28	60.32±11.22	0.1192
Sexo			
Feminino	13 (46.43)	14 (50)	0.7891
Masculino	15 (53.57)	14 (50)	
Tabagismo			
Fumante	3 (10.71)	9 (32.14)	
Ex-fumante	24 (85.71)	10 (35.71)	0.0005
Não fumante	1 (3.57)	9 (32.14)	
Hipertensão	11 (39.29)	14 (50)	0.4200
Oxigenioterapia			
Feminino	5 (45.45)	-	0.9337
Masculino	6 (54.55)	-	

*Teste Qui-quadrado foi utilizado para comparar sexo, tabagismo, hipertensão e oxigenioterapia e o teste de Mann-Whitney para comparar a idade entre os pacientes e controles.

4.2. Análise Bioquímica

A tabela 2 mostra os resultados expressos como média e desvio-padrão das análises bioquímicas realizadas em pacientes e controles. As médias das concentrações

de todos os parâmetros bioquímicos analisados estavam dentro dos valores de referência nos dois grupos.

A concentração média de homocisteína em pacientes e controles foi de 14.48 ± 5.45 $\mu\text{mol/L}$ e 12.73 ± 4.62 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Esse resultado revelou que nenhuma diferença estatística foi observada mesmo quando ajustado para idade, e idade e tabagismo. No entanto, 39.3% dos pacientes apresentaram hiperhomocisteinemia leve e apenas 25% dos controles mostraram um aumento na concentração de homocisteína, sendo este aumento também considerado de intensidade leve.

A concentração média de 2,3-DPG nos pacientes com DPOC foi de 4.77 ± 1.68 mM/L de eritrócitos e nos controles foi de 4.46 ± 1.76 mM/L de eritrócitos. Por meio desses resultados, observamos que não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0.4217$) mesmo quando ajustado para tabagismo.

Dentre todos os parâmetros bioquímicos analisados em pacientes e controles, apenas o ácido fólico mostrou diferença estatisticamente significativa ($p<0.0001$). O ácido fólico também apresentou diferença estatística quando ajustado para tabagismo ($p<0.0001$). A concentração média de ácido fólico nos pacientes com DPOC foi de 5.85 ± 2.85 ng/mL e nos controles foi de 10.28 ± 3.05 ng/mL. Quanto menor a concentração de ácido fólico maior a concentração de homocisteína.

Tabela 2. Características bioquímicas de pacientes e controles.

Características	DPOC (n=28)	Controle (n=28)	P
Perfil Hepático			
AST (U/L)	23.21±8.04	22.68±5.25	0.6454
ALT (U/L)	19.39±9.68	20.18±6.56	0.2002
ALP (U/L)	77.93±24.80	78.93±21.71	0.9347
GGT (U/L)	35.64±41.13	31.43±41.49	0.2979
Perfil Renal			
Uréia (mg/dL)	32.11±9.39	31.89±13.70	0.2976
Creatinina (mg/dL)	0.91±0.28	0.89±0.24	0.9152
Ácido fólico (ng/mL)	5.85±2.85	10.28±3.05	<0.0001 (<0.0001)¹
Vitamina B12 (pg/mL)	424.65±140.10	517.23±252.22	0.2284
2,3-DPG (2,3-DPG/Hct)	4.77±1.68	4.46±1.76	0.4217 (0.4586) ¹
Hci (µmol/L)	14.48±5.45	12.73±4.62	0.1954 (0.4228) ¹ (0.6071) ²

Teste de Mann-Whitney

¹ANOVA - ajustado para tabagismo

²ANOVA - ajustado para idade e tabagismo

4.3. 2,3-DPG e homocisteína em pacientes com DPOC

A tabela 3 apresenta os valores expressos como média e desvio-padrão da concentração de 2,3-DPG e homocisteína de pacientes com DPOC que faziam ou não uso de oxigenioterapia.

Tabela 3. Concentração de homocisteína e 2,3-DPG em pacientes com DPOC, segundo o uso ou não de oxigenioterapia.

Variáveis	Oxigenioterapia		P*
	Sim (n=11)	Não (n=17)	
2,3-DPG (2,3-DPG/Hct)	4,58±0.98	4.89±2.03	0.3832
Hci (µmol/L)	13.60±5.51	15.04±5.50	0.4659

*Teste de Mann-Whitney

A análise estatística das concentrações de 2,3-DPG e homocisteína de pacientes que faziam ou não uso de oxigenioterapia mostrou que não houve diferença estatística. Através desses resultados observamos que a oxigenioterapia não afetou os níveis de 2,3-DPG e que a homocisteína estava aumentada tanto nos pacientes que faziam ou não o uso de oxigenioterapia.

4.4. Polimorfismos C677T e A1298C no gene da MTHFR envolvidos na hiperhomocisteinemia

Em nosso estudo, nós investigamos a presença de alguns polimorfismos relacionados à hiperhomocisteinemia, tais como, os polimorfismos C677T e A1298C no gene da MTHFR. As prevalências desses polimorfismos e dos haplótipos estão descritas nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4. Prevalência dos polimorfismos C677T e A1298C no gene da MTHFR em pacientes e controles.

Polimorfismo	DPOC (n=28)	Controle (n=28)	P*
<u>MTHFR C677T</u>			
Genótipos			
CC	9 (32.14)	12 (42.86)	
CT	16 (57.14)	12 (42.86)	0.6489
TT	3 (10.71)	4 (14.29)	
<u>MTHFR A1298C</u>			
Genótipos			
AA	18 (64.29)	19 (67.86)	
AC	8 (28.57)	9 (32.14)	0.7778
CC	2 (7.14)	-	

Valores expressos em número e porcentagem (%).

*Teste Qui-quadrado e Fisher

Tabela 5. Prevalência dos haplótipos em pacientes e controles.

Haplótipo	DPOC	Controle	P*
C677T/A1298C	(n=28)	(n=28)	
CCAA	3 (10.71)	10 (35.71)	0.0852
CCAC	4 (14.29)	2 (7.14)	
CCCC	2 (7.14)	-	
CTAA	12 (42.86)	5 (17.86)	
CTAC	4 (14.29)	7 (25)	
TTAA	3 (10.71)	4 (14.29)	

Valores expressos em número e porcentagem (%).

*Teste de Fisher

A prevalência de homozigotos para os polimorfismos C677T e A1298C no gene da MTHFR em pacientes foi 10.71% e 7.14%, respectivamente. Para os controles a prevalência de homozigotos para o polimorfismo C677T no gene da MTHFR foi 14.29%. O genótipo CC do polimorfismo A1298C no gene da MTHFR não esteve presente nos controles. No entanto, a análise da prevalência dos polimorfismos C677T e A1298C no gene da MTHFR em pacientes e controles não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p=0.6489$ e 0.7778 , respectivamente).

De acordo com os resultados descritos na tabela 5, podemos observar que o haplótipo CTAA (42.86%) foi mais prevalente nos pacientes, enquanto que no grupo controle o haplótipo de maior prevalência foi o CCAA (35.71%) e CTAC (25%). No entanto, somente os pacientes com DPOC apresentaram o haplótipo CCCC. Neste estudo, não foi observado homozigose para ambos os polimorfismos C677T e A1298C no

gene da MTHFR, tanto em pacientes como em controles. A prevalência de heterozigose para ambos os polimorfismos em pacientes e controles foi de 14.29% e 25%, respectivamente. Também nenhuma diferença estatística foi observada para os haplótipos avaliados ($p=0.0852$).

4.5. Polimorfismos C677T e A1298C no gene da MTHFR e sua relação com a concentração de Homocisteína, Ácido Fólico e Vitamina B₁₂

Para avaliação da influência dos polimorfismos sobre as concentrações de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂, empregou-se o teste de Mann-Whitney (tabela 6). Os valores estão expressos como média, desvio-padrão e número. As médias das concentrações de ácido fólico e vitamina B₁₂ estavam dentro dos valores de referência nos grupos analisados.

Ao compararmos o genótipo CC com o genótipo CT+TT do polimorfismo C677T no gene da MTHFR em relação a concentração de homocisteína nos pacientes, não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0.7678$). Também não houve diferença estatística ao analisarmos as concentrações de ácido fólico ($p=0.3627$) e vitamina B₁₂ ($p=0.5224$) em relação ao polimorfismo C677T no gene da MTHFR.

Ao compararmos o genótipo AA com o genótipo AC+CC do polimorfismo A1298C no gene da MTHFR em relação a concentração de homocisteína nos pacientes, não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0.4288$). Não foi observada diferença

estatística ao analisarmos as concentrações de ácido fólico ($p=0.3622$) e vitamina B₁₂ ($p=0.6836$) em relação ao polimorfismo A1298C no gene da MTHFR.

Nos controles, a comparação entre o genótipo CC com os genótipos CT+TT do polimorfismo C677T no gene da MTHFR em relação a concentração de homocisteína observamos uma diferença estatisticamente significativa ($p=0.005$). A comparação entre o genótipo AA e AC+CC do polimorfismo A1298C no gene da MTHFR em relação a concentração de homocisteína nos controles não revelou diferença estatística ($p=0.1211$).

Nenhuma diferença estatística foi observada em relação as concentrações de ácido fólico ($p=0.1858$) e vitamina B₁₂ ($p=0.0914$) com o polimorfismos C677T nos controles. A relação entre a concentração de ácido fólico ($p= 0.6580$) e vitamina B₁₂ ($p=0.7306$) para o polimorfismo A1298C no gene da MTHFR nos controles também não revelou diferença estatística.

Tabela 6. Concentração de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ de acordo com os polimorfismos no gene da MTHFR em pacientes e controles.

Genótipo	Hci (μmol/L)		Ácido Fólico (ng/mL)		Vitamina B ₁₂ (pg/mL)	
	DPOC (n=28)	Controles (n=28)	DPOC (n=28)	Controles (n=28)	DPOC (n=28)	Controles (n=28)
MTHFR C677T						
CC	14.79±5.79 (9)	10.34±4.94 (12)	6.80±3.34 (9)	11.43±3.16 (12)	407.38±148.23 (9)	625.13±288.25 (12)
CT	13.13±4.94 (16)	15.13±5.60 (12)	5.45±2.74 (16)	9.39±3.15 (12)	435,43±148,30 (16)	465.71±212.82 (12)
TT	20.73±3.12 (3)	12.68±3.42 (4)	5.10±1.71 (3)	9.49±1.16 (4)	419.00±99.08 (3)	348.10±80.65 (4)
MTHFR A1298C						
AA	15.03±5.04	12.70±5.23	5.35±2.56 (18)	10.46±3.26 (19)	433.06±151.64 (18)	502.13±241.83 (19)
AC	11.45±4.33	12.78±3.24	7.22±3.36 (8)	9.89±2.70 (9)	429.28±130.69 (8)	549.12±285.38 (9)
CC	21.60±7.64	-	4.79±2.70 (2)	-	330.50±17.68 (2)	-

*Teste de Mann-Whitney

Comparando CC e CT+TT (C677T)

Comparando AA e AC+CC (A1298C)

4.6. Identificação de fatores que determinaram a homocisteína nos pacientes com DPOC

Um modelo da regressão linear foi utilizado para definir os possíveis fatores que determinaram a concentração de homocisteína nos pacientes com DPOC (Tabela 7).

Tabela 7. Identificação de fatores que determinaram a homocisteína nos pacientes com DPOC.

	R²	P
Idade	0.0011	0.8685
MTHFR C677T	0.0017	0.8357
MTHFR A1298C	0.0401	0.3071
Ácido fólico	0.1665	0.0311
Vitamina B₁₂	0.1376	0.0520

Esta análise demonstrou que a idade, os polimorfismos C677T e A1298C no gene da MTHFR e vitamina B₁₂ não apresentam influência estatisticamente significativa sobre a concentração de homocisteína nos pacientes. No entanto, a análise estatística do modelo de regressão linear revelou que o ácido fólico ($p=0.0311$) tem uma influência sobre concentração de homocisteína nesses pacientes.



5. DISCUSSÃO

A DPOC tem emergido como um grande desafio para a saúde pública mundial. É caracterizada pela obstrução crônica do fluxo aéreo devido à inflamação persistente. A resposta inflamatória leva ao aumento da espessura das paredes das vias aéreas, redução do lúmen e secreção de muco, o que contribui para a obstrução das vias aéreas (Rodriguez-Roisin et al., 2009).

O estresse oxidativo parece executar um papel importante na patogênese da DPOC, devido ao seu efeito potencial em promover injúria e inflamação às células pulmonares, inativação das antiproteases e também por estimular a secreção de muco. Além disso, os radicais livres podem se estender além dos pulmões em pacientes com DPOC, contribuindo para as manifestações sistêmicas da doença (GEA et. al., 2007; GOLD, 2008).

A oxigenioterapia é usada em pacientes com DPOC para melhorar a oxigenação dos tecidos (TIMMS e TISI, 1984). Por outro lado, a oxigenioterapia pode promover a formação de espécies reativas do oxigênio, teoricamente resultando em aumento da inflamação e piora da doença.

O propósito deste estudo foi avaliar as concentrações de 2,3-DPG e homocisteína em pacientes com DPOC e controles. Uma vez que alterações em suas concentrações podem comprometer a oxigenação dos tecidos e levar a formação de espécies reativas do oxigênio que resultam em lesões celulares.

Assim, um dos primeiros objetivos deste estudo foi realizar a análise da concentração de 2,3-DPG em pacientes com DPOC e controles, para identificarmos alterações que poderiam justificar a nossa hipótese.

O 2,3-DPG nos eritrócitos tem uma importante função no transporte de oxigênio para os tecidos. A concentração de 2,3-DPG abaixo do normal aumenta a afinidade do oxigênio à hemoglobina, dificultando sua liberação para os tecidos (BENESCH e BENESCH, 1967; CHANUTIN e CURNISH, 1967). A síntese e a degradação de 2,3-DPG são controladas por diversas enzimas pelo shunt de Rapoport-Luebering. Os fatores que controlam a síntese e a degradação de 2,3-DPG incluem: (1) a própria concentração de 2,3-DPG: o mecanismo feedback negativo inibe a atividade da DPGM; (2) concentração de íons hidrogênio: na acidose, há uma diminuição da glicólise e da atividade da DPGF, e então, há diminuição de 2,3-DPG (CLERBAUX et. al.,2006). No entanto, o principal mecanismo mediador de alterações na concentração de 2,3-DPG é o pH.

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas entre a concentração de 2,3-DPG nos pacientes com DPOC comparados aos controles. A concentração média de 2,3-DPG permaneceu predominantemente dentro da normalidade, sugerindo que a distribuição de oxigênio nos pacientes com DPOC não estava prejudicada. Sabe-se que a diminuição dos níveis de 2,3-DPG dificulta a distribuição de oxigênio para os tecidos e que o aumento de sua concentração provoca o efeito contrário.

Existem evidências de que em uma variedade de estados clínicos, onde a diminuição da afinidade do oxigênio à hemoglobina ocorre devido ao aumento dos níveis de 2,3-DPG funcionando como um mecanismo compensador para facilitar o transporte de oxigênio para os tecidos (TIMMS e TISI, 1984).

Outro fator que pode interferir na concentração de 2,3-DPG é a concentração de fósforo inorgânico. A hipofosfatemia pode causar queda na concentração de 2,3-DPG devido a diminuição de 1,3-DPG, levando ao aumento da degradação de 2,3-DPG e a

hiperfosfatemia provoca o efeito contrário (CLERBAUX et. al., 2006; TORRES et. al., 2007).

Edwards e Canon (1972) sugerem que na DPOC a hipóxia possa coexistir com a acidose, podendo produzir níveis normais ou reduzidos de 2,3-DPG. Estes fatos podem explicar os resultados encontrados por este estudo.

Nossos resultados mostraram também que nenhuma diferença foi encontrada ao avaliarmos a concentração de 2,3 DPG entre os pacientes com DPOC que faziam uso ou não de oxigenioterapia.

Agusti et. al. (1986) mostraram que pacientes com DPOC que recebiam ventilação mecânica apresentaram maiores concentrações de 2,3-DPG quando comparados com pacientes com DPOC não ventilados. Supõe-se que a correção da acidose respiratória durante a ventilação mecânica leva a uma alcalose intra-eritrocitária, causando aumento da síntese de 2,3-DPG. Por outro lado, estudos relatam que a administração crônica de oxigênio resulta em redução nos níveis de 2,3-DPG (TIMM e TISI, 1984). Entretanto, este estudo mostrou que os pacientes com DPOC que faziam uso da oxigenioterapia apresentaram níveis normais de 2,3-DPG.

Outro objetivo deste estudo foi avaliar as concentrações de homocisteína, vitaminas envolvidas no seu metabolismo como o ácido fólico e a vitamina B₁₂, e polimorfismos envolvidos no gene da MTHFR em pacientes e controles.

A homocisteína é produzida no fígado como um metabólito intermediário da metionina à cisteína. A deficiência de ácido fólico e vitamina B₁₂, e polimorfismos no gene da MTHFR estão envolvidos na hiperhomocisteinemia. Um excesso de homocisteína induz a produção de espécies reativas do oxigênio por auto-oxidação, sendo este um dos

mecanismos causadores de injúria celular (KAI et. al., 2006; VENTURA et.al., 2008). Além disso, a hiperhomocisteinemia é considerada um marcador do aumento do risco cardiovascular (McCULLY, 1969).

No presente estudo, observamos que 39,3% dos pacientes com DPOC apresentaram hiperhomocisteinemia leve, apesar de não encontrarmos diferença estatística entre os grupos. Em concordância com nossos resultados, diversos estudos observaram um aumento na concentração de homocisteína plasmática em pacientes com DPOC (KAI et. al., 2006; SEEMUNGAL et. al., 2007; FIMOGNARI et. al., 2009). Kai et. al. (2006) sugere que o tabagismo pode aumentar a concentração de homocisteína no plasma, levando ao declínio da função pulmonar em indivíduos predispostos a DPOC ou em fase inicial da doença.

O aumento da homocisteína na DPOC tem sido relacionado ao estresse oxidativo (KAI et. al., 2006). Andersson et. al. (2001) mostrou um aumento na concentração de homocisteína e níveis reduzidos de glutathiona em pacientes com DPOC.

Recentes estudos têm encontrado uma relação entre os marcadores do estresse oxidativo, tais como, a glutathiona reduzida e a gravidade da DPOC (KAI et. al. 2007). Esses dados reforçam a nossa hipótese de que a hiperhomocisteinemia pode exercer um importante papel na patogênese da DPOC.

Fimognari et. al. (2009) sugere que a hiperhomocisteinemia em pacientes com DPOC pode resultar da diminuição da concentração de vitamina B e ácido fólico que são importantes cofatores no metabolismo da homocisteína. Sabe-se, que os pacientes com DPOC apresentam anormalidades nutricionais, tais como, alteração do metabolismo, perda de massa muscular esquelética e índice de massa corpórea diminuída.

Em relação aos fatores nutricionais avaliados (ácido fólico e vitamina B₁₂), os pacientes com DPOC apresentaram baixas concentrações de ácido fólico quando comparados aos controles.

Este achado é de grande importância, pois mesmo após o programa de fortificação de ácido fólico adotado pela ANVISA nossos pacientes apresentaram baixos níveis desse fator nutricional. O ácido fólico além participar do metabolismo da homocisteína, também atua em processos biológicos fundamentais como: cofator para enzimas implicadas na biossíntese de RNA e DNA.

Está bem estabelecido na literatura que polimorfismos nos genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo da homocisteína, particularmente a MTHFR, são causas comuns que levam ao aumento da homocisteína plasmática. Os polimorfismos C677T e A1298C no gene da MTHFR são os mais comuns. No entanto, o polimorfismo C677T no gene da MTHFR está associado com um aumento da homocisteína no plasma em aproximadamente 25%. Por outro lado, o polimorfismo A1298C no gene da MTHFR parece não alterar as concentrações de homocisteína, mas quando combinado com o polimorfismo C677T no gene da MTHFR a concentração de homocisteína plasmática encontra-se elevada (KÖLLING et. al., 2004).

Contudo, nenhum estudo avaliou a relação entre as concentrações de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ com os polimorfismos C677T e A1298C no gene da MTHFR em pacientes com DPOC.

A análise do polimorfismo C677T no gene da MTHFR para o genótipo TT em pacientes com DPOC mostrou uma prevalência de 10.71% e nos controles apresentou

prevalência de 14.29%. Arruda et. al. (1998), mostrou que na população brasileira a prevalência de homozigotos para o polimorfismo C677T no gene da MTHFR foi de 10.3% nos indivíduos descendentes de caucasianos e de 1.45% nos indivíduos afro descendentes. Na população brasileira em geral a prevalência de homozigotos para este polimorfismo é de 4% (ARRUDA et. al., 1998). A prevalência do genótipo CC no polimorfismo A1298C no gene da MTHFR em pacientes foi de 7.14%, diferentemente dos controles que não apresentaram este genótipo. A alta miscigenação da nossa população pode ser responsável pelos resultados apresentados por este estudo.

A prevalência do haplótipo CTAC nos pacientes foi de 14.29%, entretanto, não observamos homozigose para ambos os polimorfismos no gene da MTHFR nos grupos estudados.

O aumento dos níveis plasmáticos de homocisteína nos pacientes com DPOC não foi influenciado significativamente pela presença dos polimorfismos estudados, diferentemente do que foi encontrado no grupo controle que mostrou uma diferença estatística para o polimorfismo C677T no gene da MTHFR.

Portanto, o presente estudo demonstrou que o aumento da concentração de homocisteína nos pacientes com DPOC pode resultar de uma diminuição da concentração de ácido fólico, um importante cofator no metabolismo da homocisteína. De fato, os pacientes com DPOC tiveram níveis de ácido fólico significativamente mais baixo do que os controles.



6. CONCLUSÃO

1 – Nossos resultados mostraram que não houve diferença na concentração de 2,3-DPG entre pacientes e controles, pois a concentração desse fosfato foi semelhante em ambos os grupos. Assim podemos concluir que, o transporte e distribuição de oxigênio nos pacientes com DPOC não estava prejudicado.

2 – Não houve diferença na concentração de 2,3-DPG entre pacientes com DPOC que fazem ou não uso de oxigenioterapia. Portanto, nossos resultados demonstraram que a oxigenioterapia não afetou os níveis 2,3-DPG nesses pacientes como foi sugerido em estudos anteriores.

3 – As concentrações de homocisteína estavam relativamente aumentadas nos pacientes com DPOC, sendo este aumento caracterizado como hiperhomocisteinemia leve.

4 - Os polimorfismos C677T e A1298C no gene da MTHFR não contribuíram significativamente para o aumento das concentrações de homocisteína nos pacientes com DPOC.

5 – A causa desse pequeno aumento nas concentrações de homocisteína foi devido a presença de baixas concentrações de ácido fólico encontrados nos pacientes com DPOC.

6 – Nosso estudo sugere que o monitoramento e a suplementação com ácido fólico seriam de grande importância para os pacientes com DPOC atendidos no Ambulatório de Pneumologia (HC/UNICAMP), uma vez que o ácido fólico além de ser necessário para o metabolismo da homocisteína, também é importante para processos biológicos fundamentais (biossíntese de RNA e DNA).



7. REFERÊNCIAS

Abboud RT, Vimalanathan S. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12: 361-367.

Antoniades C, Antonopoulos AS, Tousoulis D, Marinou K, Stefanadis C. Homocysteine and coronary atherosclerosis: from folate fortification to the recent clinical trials. *Eur Heart J* 2009; 30: 6-15.

Arruda VR, Siqueira LH, Gonçalves MS, von Zuben PM, Soares MCP, Menezes R, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF. Prevalence of the mutation C677T in the Methylene Tetrahydrofolate Reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet* 1998; 78:332-335.

Agusti AGN, Rodríguez-Roisin R, Roca J, Aguilar JLL, Agusti-Vidal A. Oxyhemoglobin affinity in patients with chronic obstructive pulmonary disease and acute respiratory failure: Role of mechanical ventilation. *Crit Care Med* 1986; 14: 610-613.

Aymerich JG, Agustí A, Barberà JA, Belda J, Farrero E, Ferrer A, Ferrer J, Gáldiz JB, Gea J, Gómez FP, Monsó E, Morera J, Roca J, Sauleda J, Antó JM. Phenotypic heterogeneity of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Arch Bronconeumol* 2009; 45: 133:142.

Bellingham AJ, Detter JC, Lenfant C. Regulatory mechanism of hemoglobin oxygen affinity in acidosis and alkalosis. *J Clin Inves* 1971; 50: 700-706.

Benech R, Benech RE. The Effect of Organic from the Human Erythrocyte On The Allosteric Properties Of Hemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun* 1967; 26: 162-168.

Benech R, Benech RE. Intracellular Organic Phosphates as Regulators of Oxygen Release by Haemoglobin. *Nature* 1969; 221: 618-622.

Boldyrev AA. Molecular mechanism of homocysteine toxicity. *Biochemistry* 2009; 74: 589-598.

Bourbeau J, Bartlett SJ. Patient adherence in COPD. *Thorax* 2008; 63: 831-838.

Bremner K, Bubb WA, Kemp GJ, Trenell MI, Thompson CH. The effect of phosphate loading on erythrocyte 2,3-bisphosphoglycerate levels. *Clin Chim Acta* 2002; 323: 111-114.

Bydlowski SP, Magnanelli AC, Chamone DA. Hiper-homocisteinemia e doenças vasculares. *Arq Bras Cardiol* 1998; 71: 69-76.

Carpagnano GE, Kharitonov SA, Foschino-Barbaro MP, Resta O, Gramiccioni E, Barnes PJ. Supplementary oxygen in healthy subjects and those with COPD increases oxidative stress and airway inflammation. *Thorax* 2004; 59: 1016-1019.

Castilho EM, Glass ML, Manço JC. The effects of 2,3-diphosphoglycerate, adenosine triphosphate, and glycosylated hemoglobin on the hemoglobin-oxygen affinity of diabetic patients. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 731-737.

Castro R, Rivera I, Blom HJ, Jakobs C. Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinemia and vascular disease: an overview. *J Inher Metab Dis* 2006; 29: 3-20.

Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia and venous thromboembolism. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 716-723.

Clerbaux T, Detry B, Geubel A, Veriter C, Liistro G, Horsmans Y, Frans A. The oxyhemoglobin dissociation curve in liver cirrhosis. *Chest* 2006; 129: 438-445.

Cho J, King JS, Qian X, Harwood AJ, Shears SB. Dephosphorylation of 2,3-bisphosphoglycerate by MIPP expands the regulatory capacity of the Rapoport-Luebering glycolytic shunt. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105: 5998-6003.

Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J* 2008; 31: 1334-1356.

Deuticke B, Duhm J, Dierksmann R. Maximal elevation of 2,3 -diphosphoglycerate concentrations in human erythrocytes: influence on glycolytic metabolism and intracellular pH. *Pflugers Arch* 1971; 326:15-34.

Collins CH. *Fundamentos da Cromatografia*. Campinas: UNICAMP, 2006.

Duhn J, Gerlach E. On the Mechanisms of the Hypoxia-Induced Increase of 2,3-Diphosphoglycerate in Erythrocytes. *Pflugers Arch* 1971; 326: 254-269.

Duhn J. Effects of 2,3-Diphosphoglycerate and Other Organic Phosphate Compounds on Oxygen Affinity and Intracellular pH of Human Erythrocytes. *Pflugers Arch* 1971; 326: 341-356.

Duhn J. Dual Effect of 2,3-Diphosphoglycerate on the Bohr Effect of Human Blood. *Pflugers Arch* 1976; 363: 55-66.

Eldibany M, Caprini JA. Hyperhomocysteinemia and thrombosis. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 872-884.

Fimognari FL, Loffredo L, Di Simone S, Sampietro F, Pastorelli R, Monaldo M, Violi F, D'Angelo A. Hyperhomocystenaemia and poor vitamin B status in chronic obstructive pulmonary disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009; 19: 654-659.

Fremault A, Silva M, Beaucage F, Berckmans D, Decramer M. Inspired fraction of carbon dioxide in oxygen supply to chronic pulmonary disease. *Respir Med* 2008; 102: 1827-1829.

Fromer L, Cooper CB. A review of the GOLD guidelines for the diagnosis and treatment of patients with COPD. *Int J Clin Pract* 2008; 62: 1219-1236.

Garcia-Arymerich J, Agustí A, Barberà JA, Belda J, Farrero E, Ferrer A, Ferrer J, Gàldiz JB, Gea J, Gòmez FP, Monsò E, Morera J, Roca J, Sauleda J, Antò JM. Phenotypic heterogeneity of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Arch Bronconeumol* 2009; 45: 133-142.

Gaughan DJ, Kluijtmans LAJ, Barbaux S, McMaster D, Young IS, Yarnell JWG, Evans A, Whitehead A. The methionine syntase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis* 2001; 157: 451-456.

Gea J, Barreiro E, Orozco L. Free radicals, cytokines, and respiratory muscles in COPD patients. *Clin Pulm Med* 2007; 14: 117-126.

Gea J, Barreiro E, Orozco L. Systemic inflammation in COPD. *Clin Pulm Med* 2009; 16: 233-242.

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (Update 2008). Available at: www.goldcopd.com.

Hogg JC. Lung structure and function in COPD. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12: 467-479.

Hogg JC, Timens W. The pathology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2009; 4: 435:459.

Hsia CCW. Respiratory Function of Hemoglobin. *N Eng J Med* 1998; 338: 239-247.

Kim V, Rogers TJ, Criner GJ. New concepts in the pathobiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 478-485.

Kim V, Benditt JO, Wise RA, Sharafkhaneh A. Oxygen therapy in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 513-518.

Kolling K, Ndrepepa G, Koch W, Braun S, Mehilli J, Schömig A, Kastrati A. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphism, plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 levels and the extent of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2004; 93: 1201-1206.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 7. ed. Elsevier: Rio de Janeiro, p. 753 – 760, 2005.

Macintyre N, Huang YC. Acute exacerbations and respiratory failure in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Proc Am Thorac Soc 2008; 5: 530-535.

Maron BA, Loscalzo nJ. Homocysteine. Clin Lab Med 2006; 26: 591-609.

37. Meldon JH. Blood Gas Transport and 2,3-DPG. Adv Exp Med Bio 1985; 191: 63-73.

McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia. Nature Medicine 1969; 2: 386-389.

Mulquiney PJ, Kuchel PW. Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations: computer simulation and metabolic control analysis. Biochem J 1999; 342: 597-604.

Nielsen C, Hindsholm KB, Nielsen EM, Dahl B. Blood oxygen parameters in patients with chronic obstructive pulmonary disease. An evaluation of measured and calculated 2,3-diphosphoglycerate concentrations.

Pauwels RA, Buist S, Calverley PMA, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Am J Resp Crit Care Med 2001; 163: 1256-1276.

Pelkonen M. Smoking: relationship to chronic bronchitis, chronic obstructive pulmonary disease and mortality. *Curr Opin Pulm Med* 2008; 14: 105-109.

Pfeiffer CM, Huff DL, Gunter EW. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. *Clin Chem* 1999; 45: 290-292.

Philips M, Cataneo RN, Greenberg J, Grodman R, Gunawardena R, Naidu A. Effect of oxygen on breath markers of oxidative stress. *Eur Resp J* 2003; 21: 48-51.

Piccioni MA, Cestari IA, Strunz CMC, Auler JO. Decreased 2,3-diphosphoglycerate concentration in low cardiac output patients and its influence on the determination of in vivo P50. *Art Org* 2003; 27: 676-680.

Pomponi M, Bertonati C, Fuglei E, Wiig O, Derocher A. 2,3-DPG-Hb complex: a hypothesis for an asymmetric binding. *Biophys Chem* 2000; 84: 253-260.

Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, Johnston C, Engbaek F, Schneede J, McPartlin C, Scott JM. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004; 50: 3-32.

Rodríguez-Roisin R, Draukulovic M, Rodríguez DA, Roca J, Barberà JÁ, Wagner PD. Ventilation-perfusion imbalance and chronic obstructive pulmonary disease staging severity. *J Appl Physiol* 2009; 106: 1902-1908.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Erlich H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 1989; 239:487-491.

Samaja M, Rovida E, Motterlini R, Taratola M. The relationship between the blood oxygen transport and the human red cell aging process. *Adv Exp Med Biol* 1991; 307:115-23.

Sharafkhaneh A, Hanania NA, Kim V. Pathogenesis of emphysema. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5:475-477.

Snider GL. Chronic Obstructive Pulmonary Disease: risk factors, pathophysiology and pathogenesis. *Ann Rev Med* 1989; 40: 411-429.

Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. *J Bras Pneum* 2004; 30: suplemento 5.

Stephens MB, Yew KS. Diagnosis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am Fam Physic* 2008; 78: 87-92.

Stockley RA. Progression of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: impact of inflammation, comorbidities and therapeutic intervention. *Curr Med Res Opin* 2009; 25: 1235-1245.

Szilasi M, Dolinay T, Nemes Z, Strausz J. Pathology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pathol Oncol Res* 2006; 12: 52-60.

Taraseviciene-Stewart L, Voelkel NF. Molecular pathogenesis of emphysema. *J Clin Invest* 2008; 118: 394-402.

Timms RM, Tisi GM. The effect of short-term oxygen supplementation on oxygen hemoglobin affinity in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 69-72.

Torres RT, Terzi RGG, Falcão ALE, Höehr NF, Dantas VP. Optimized hyperventilation preserves 2,3-diphosphoglycerate in severe traumatic brain injury. *Arq Neuropsiquiatr* 2007; 65: 739-744.

Van Eeden SF, Sin DD. Chronic Obstructive Pulmonary Disease: a chronic systemic inflammatory disease. *Respiration* 2008; 75: 224-238.

Ventura E, Durant R, Jaussent A, Picot MC, Morena M, Badiou S, Dupuy AM, Jeandel C, Cristol JP. Homocysteine and inflammation as main determinants of oxidative stress in the elderly. *Free Rad Biol Med* 2009; 46: 737-744.

Wierzbicki A. Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Diabetes Vas Dis Res* 2007; 4: 143-149.

Zhou J, Austin RC. Contributions of hyperhomocysteinemia to atherosclerosis: causal relationship and potential mechanisms. *Biofactors* 2009; 35: 120-12.



8. ANEXO

Questionário – Grupo DPOC

Data da Coleta: ____ / ____ / ____

Nome:	
HC:	
Idade:	Sexo: () Feminino () Masculino
Fumo	() Fumante () Ex-fumante () Nunca fumou
Sofre de algumas destas patologias:	
Hipertensão arterial () Sim () Não	
Diabetes () Sim () Não	
Hipotireoidismo () Sim () Não	
Doença renal () Sim () Não	
Doença hepática () Sim () Não	
Neoplasia () Sim () Não	
Outras: _____	
Faz uso de oxigenioterapia: () Sim () Não	
Faz uso de algum medicamento: () Sim () Não Qual?	

Questionário – Grupo controle

Data da Coleta: ____ / ____ / ____

Nome:	
HC:	
Idade:	Sexo: ()Feminino () Masculino
Fumo	() Fumante () Ex-fumante () Nunca fumou
Sofre de algumas destas patologias:	
Doença pulmonar	() Sim () Não Qual? _____
Hipertensão arterial	() Sim () Não
Diabetes	() Sim () Não
Hipotireoidismo	() Sim () Não
Doença renal	() Sim () Não
Doença hepática	() Sim () Não
Neoplasia	() Sim () Não
Outras:	_____
Faz uso de algum medicamento: () Sim () Não Qual?	

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Titulo do projeto: **Avaliação da Homocisteinemia e da concentração de 2,3-Difosfoglicerato em Pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.**

Responsáveis pelo projeto: Aline Barnabé

Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr

Eu, _____, idade: _____

RG: _____, HC: _____, residente à Rua/Av. _____

Concordo em participar do presente estudo, após estar absolutamente esclarecido (a) dos propósitos do mesmo.

Responsável pelo paciente: _____

idade: _____, RG: _____, grau de parentesco: _____

O objetivo deste projeto será determinar os níveis séricos da homocisteína e investigar a presença de mutações no gene MTHFR em pacientes portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC).

O procedimento a que o senhor/senhora será submetido (a) compreende na coleta de 12 mL de sangue para análise de Homocisteína, Ácido fólico e Vitamina B₁₂, bem como, análises bioquímicas (dosagem de 2,3-DPG, AST, ALT, Fosfatase alcalina, Gama GT, Uréia e Creatinina). O material colhido também será submetido à extração do DNA para procedermos a determinação das mutações e poderá ser armazenado para futuras investigações, que deverão ser aprovadas pelo CEP/FCM-UNICAMP.

É essencial que o paciente tenha feito jejum de 8 horas antes da coleta para maior confiabilidade nos resultados dos exames. E, eventualmente, o paciente será convocado a

comparecer ao hospital, para nova coleta de material, com a finalidade de confirmar os resultados dos exames.

Os riscos a que o senhor/senhora estará sujeito ao participar do estudo são apenas decorrentes da punção venosa, podendo aparecer um hematoma (mancha roxa) e/ou uma pequena dor no local.

Os benefícios ao paciente que participar da pesquisa são: prevenção e tratamento da hiperhomocisteinemia caso seja encontrada as mutações. Outros benefícios esperados serão contribuições na comparação de valores da homocisteína com a presença ou não das mutações no gene MTHFR em pacientes com DPOC para assim elucidar a causa da hiperhomocisteinemia.

Outras informações:

1. O participante estará livre para desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
2. Haverá reembolso de gastos com transporte, em consequência de convocação para comparecimento ao hospital, exclusivamente para a pesquisa.
3. O participante autoriza o armazenamento da amostra? () Sim () Não
4. O participante poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, sobre o mesmo, havendo compromisso dos pesquisadores em respondê-las.
5. Todas as informações obtidas pelo estudo terão caráter sigiloso e confidencial, e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade será sempre preservada.
6. A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente em qualquer serviço de nosso hospital.

Quaisquer outras dúvidas de sua parte poderão ser dirigidas à pesquisadora Aline Barnabé no telefone 3521 9455 ou 3521 7456, e em caso de denúncias ou reclamações dirigir-se ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP no telefone 3521 8936.

Campinas, ____/____/____

Assinatura do Paciente

Aline Barnabé

Mestranda

Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr

Orientadora