

Avaliação do método de quimioluminescência na análise de homocisteína plasmática e sua comparação com o método de HPLC em amostras de crianças

Evaluation of chemiluminescence method for the analysis of plasma homocysteine and comparison with HPLC method in children samples

Thais Moura Gascón¹, Fernanda Schindler², Claudia Giorgia Bronzatti de Oliveira³, Fabiola Isabel Suano Souza⁴, Sonia Hix⁵, Roseli Oselka Sacardo Sarni⁶, Ana Paula Arantes Bacan⁷, Vania D'Almeida⁸, Auro del Giglio⁹, Fernando Luiz Affonso Fonseca¹⁰

RESUMO

Objetivo: Comparar os resultados da concentração de homocisteína usando os métodos de quimioluminescência e HPLC em amostras de crianças escolares. Determinar os valores de referência desse grupo etário e avaliar o valor prognóstico real da homocisteína em crianças saudáveis. **Métodos:** Um estudo prospectivo observacional foi executado para determinar os níveis de homocisteína usando dois ensaios diversos, o HPLC e a quimioluminescência, em 185 amostras de crianças em idade escolar moradoras da cidade de Santo André, que não apresentassem doenças crônicas ou inflamatórias, na ausência de desenvolvimento puberal. **Resultados:** Os resultados foram apresentados em percentis e os valores de referência foram determinados para esse grupo etário (7-9 anos). As concentrações de homocisteína variaram de 2,0 a 9,9 $\mu\text{mol/l}$ ($r = 0,821$ e $p < 0,001$). **Conclusões:** Verificamos que o método da quimioluminescência é comparável ao método HPLC quando as técnicas são usadas para detectar a homocisteína em crianças em idade escolar. Houve importante correlação entre os dois métodos, o que permite a investigação desse aminoácido como um fator de risco para doenças cardíacas.

Descritores: Homocisteína; Cromatografia líquida de alta pressão; Medições quimioluminescentes

ABSTRACT

Objective: To compare the results for homocysteine concentration using chemiluminescence and HPLC methods in samples from school-age children. In addition, to determine the reference values for patients of this age group and assess the real prognostic value of homocysteine in healthy children. **Methods:** A prospective observational study was undertaken to determine plasma levels of homocysteine using two different assays, HPLC and chemiluminescence, in 185 samples from school-age children living in Santo Andre, with no chronic or inflammatory diseases, and absence of pubertal development. **Results:** The results were presented in percentiles and reference values were determined within this age group (7-9 years old). Homocysteine concentration ranged from 2.0 to 9.9 $\mu\text{mol/l}$ ($r = 0.821$ and $p < 0.001$). **Conclusions:** It was verified that chemiluminescence is comparable to HPLC when both techniques are used to detect homocysteine in school-age children. There is an important correlation between both methods, which allows investigation of this amino acid as a risk factor for heart diseases.

Keywords: Homocysteine; Chromatography, high pressure liquid; Chemiluminescences measurements

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina do ABC – FMABC, Santo André (SP), Brasil.

¹ Pós-graduanda em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina do ABC – FMABC, Santo André (SP), Brasil.

² Mestre em Ciências Farmacêutica do Departamento de Hematologia e Oncologia da Faculdade de Medicina do ABC – FMABC, Santo André (SP), Brasil.

³ Mestre em Ciências pela Faculdade de Medicina do ABC – FMABC, Santo André (SP), Brasil.

⁴ Doutora; Professora do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina do ABC – FMABC, Santo André (SP), Brasil.

⁵ Doutora; Professora do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina do ABC – FMABC, Santo André (SP), Brasil.

⁶ Doutora; Professora do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina do ABC – FMABC, Santo André (SP), Brasil.

⁷ Acadêmica de Medicina da Faculdade de Medicina do ABC – FMABC, Santo André (SP), Brasil.

⁸ Livre-docente; Professora adjunto da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo (SP), Brasil.

⁹ Livre-docente; Professor Titular da Disciplina de Hematologia e Oncologia da Faculdade de Medicina do ABC – FMABC, Santo André (SP), Brasil; Setor de Oncologia do Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

¹⁰ Livre-docente; Professor do Departamento de Hematologia e Oncologia da Faculdade de Medicina do ABC – FMABC; Santo André (SP), Brasil; Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, Diadema, (SP), Brasil.

Autor correspondente: Fernando Luiz Affonso Fonseca – Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina do ABC – Avenida Príncipe de Gales, 821 – Príncipe de Gales – CEP 09060-650 – Santo André (SP), Brasil – Tel.: 11 4993-5488 – e-mail: fon_fonseca@yahoo.com.br

Data de submissão: 8/9/2009 – Data de aceite: 12/4/2010

INTRODUÇÃO

A homocisteína é um aminoácido sulfurado encontrado no cruzamento de duas vias metabólicas: remetilação para formar metionina e transulfuração, que resulta em cistationina irreversível⁽¹⁾.

A homocisteína é derivada da metionina da dieta e é um metabólito intermediário na via biossintética, que converte a metionina em cisteína. Portanto, a cisteína não é um aminoácido essencial em humanos, podendo ser sintetizada a partir da metionina através do processo de transulfuração. A metionina da dieta é convertida em S-adenosilmetionina (SAM) pela enzima metionina-adenosiltransferase (MAT), que forma ligações dissulfeto de alta energia entre o carbono-5' da ribose do ATP e o enxofre da metionina. Uma pequena quantidade de SAM é usada para a síntese de poliamina e a maior parte desta doa o seu grupo metila para outros compostos, como creatina, DNA e RNA. Portanto, a SAM é metabolizada em S-adenosilhomocisteína, que, por sua vez, é hidrolisada em homocisteína e adenosina⁽²⁾.

Os níveis intracelulares e plasmáticos de homocisteína são normalizados com a atividade das enzimas que participam da sua via metabólica, assim como os níveis apropriados de vitamina B12 e, principalmente, de folato⁽²⁾.

Várias doenças e situações estão associadas a níveis mais elevados de homocisteína – por exemplo, insuficiência cardíaca crônica⁽³⁾, efeitos de doenças vasculares⁽⁴⁾, além de estresse oxidativo⁽⁵⁾, diabetes tipo 1⁽⁶⁾, obesidade⁽⁷⁾ e homocistinúria⁽⁸⁾. Entretanto, não é seguro dizer se estas mudanças são a causa ou as consequências de doenças primárias. Em alguns casos, entretanto, esta situação parece mais nítida, como nos defeitos do tubo neural e nas cardiopatias⁽⁹⁾.

Entre vários métodos para analisar e determinar a homocisteína, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC – high performance liquid chromatography) é considerada o método de referência (padrão-ouro). Entretanto, ao comparar a relação custo/benefício, o seu uso pode estar prejudicado, pois tem alto custo e depende da experiência do analisador para ser realizado. Entretanto, outras técnicas laboratoriais já foram descritas e podem ser usadas sem implicações na qualidade e nos resultados da análise. Uma destas técnicas é a quimioluminescência que, quando comparada ao método de referência, não reduz a análise clínica dos resultados e pode ser mais vantajosa quanto à relação custo/benefício e fácil utilização⁽¹⁰⁾.

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi comparar os resultados da concentração de homocisteína usando os métodos de quimioluminescência e HPLC em amostras compostas

por crianças em idade escolar. Além disso, foram determinados os valores de referência em pacientes deste grupo etário e avaliou-se o verdadeiro valor prognóstico da homocisteína em crianças saudáveis.

MÉTODOS

Após ser aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, este estudo prospectivo observacional foi realizado entre 2006 e 2008. O grupo de estudo foi formado por 185 crianças em idade pré-puberal, com idade entre 7 e 9 anos, de uma escola pública na cidade de Santo André, Estado de São Paulo, Brasil.

Foram excluídas as crianças com qualquer tipo de doença crônica, genética, congênita ou imunodeficiência adquirida e doença infecciosa ou inflamatória. Também foram excluídas as crianças que estavam em uso de corticosteroides e que haviam sido hospitalizadas pelo menos uma vez nos últimos três meses.

Ambas as amostras foram coletadas para determinar os níveis plasmáticos de homocisteína usando os ensaios de HPLC e quimioluminescência. Foram colhidas 185 amostras por venopunção e os pacientes estavam em jejum por ao menos quatro horas.

As amostras de 10 ml foram separadas em dois tubos de ensaio com EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) e foram mantidas sob refrigeração até a centrifugação por 6-8 minutos, a 3000 rpm. As amostras de plasma obtidas foram armazenadas até o momento da análise.

As amostras foram analisadas com o uso de Shimadzu HPLC (SIL -10 Dvp) juntamente com a detecção fluorimétrica (RF-10 AXL) e eluição isocrática no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Centro de Genética Médica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). A separação cromatográfica utilizou o Phenomenex Prodigy ODS2 com coluna (3,2 x 150 mm, micropartículas de 5 µ). Os compostos separados por fluorescência foram capturados pelo detector ajustado para excitação de 385 nm e emissão de 515 nm. A homocisteína total foi estimada por meio de uma curva de calibração com quantidades conhecidas de homocisteína⁽¹¹⁾.

O ensaio imunoenzimático foi realizado com o uso de equipamento de quimioluminescência automática, modelo Immulite 2000, no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina do ABC (FMABC).

Ao iniciar a análise de rotina de quimioluminescência neste aparelho, os ajustes foram realizados em quatro réplicas, segundo as recomendações do fabricante.

Para comparar os resultados em ambas as técnicas, medimos 20 amostras com hiperhomocisteinúria (concentrações bem conhecidas determinadas por HPLC), que foram medidas novamente e determinadas por quimioluminescência.

O programa SPSS 18.0 foi utilizado para o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson, para estimar sensibilidade e especificidade e determinar a curva ROC (Receiver Operating Characteristic curve). Entretanto, ao analisar a hiperhomocisteinemia, utilizamos o coeficiente de correlação de Spearman.

RESULTADOS

Os percentis 50 dos valores de referência foram apresentados para as duas técnicas de análise: HPLC e quimioluminescência.

Os valores de percentis para a análise de HPLC demonstram que 50% dos pacientes com sete anos de idade apresentaram valores abaixo de $5,3 \mu\text{mol/l}$, enquanto as crianças com 8 e 9 anos de idade apresentaram valores abaixo de $5,4 \mu\text{mol/l}$ e $5,9 \mu\text{mol/l}$, respectivamente. No ensaio de quimioluminescência encontramos os seguintes valores: $3,2 \mu\text{mol/l}$; $3,3 \mu\text{mol/l}$ e $3,6 \mu\text{mol/l}$. Desta maneira, em crianças com idade entre 7 e 9 anos, o valor mínimo foi de $2,0 \mu\text{mol/l}$, o valor máximo foi $9,9 \mu\text{mol/l}$ e o valor médio foi $3,6 \mu\text{mol/L}$. Consequentemente, os valores de referência verificados estavam entre $2,0 \mu\text{mol/l}$ e $9,9 \mu\text{mol/l}$ (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de percentis para idade, HPLC e quimioluminescência

Percentil	HPLC			Quimioluminescência		
	7 anos	8 anos	9 anos	7 anos	8 anos	9 anos
99,0	12,317	11,320	13,033	9,9	8,4	9,3
95,0	8,916	9,010	8,646	5,6	5,5	6,1
90,0	7,613	7,407	8,098	5,3	5,0	5,4
75,0	6,689	6,270	6,610	4,2	4,1	4,2
50,0	5,312	5,410	5,860	3,2	3,3	3,6
25,0	4,189	4,716	4,953	2,3	2,6	3,0
10,0	3,634	3,917	4,443	2,0	2,0	2,6
5,0	3,119	2,857	4,091	2,0	2,0	2,4
1,0	2,497	0,000	3,598	2,0	2,0	2,0

Usando a análise de regressão linear em ambas as técnicas, HPLC e quimioluminescência, obtivemos uma correlação significativa entre as mesmas ($r = 0,821$, $p < 0,001$), como mostrado na Figura 1.

Os valores obtidos com as análises de HPLC e quimioluminescência mostram uma correlação positiva e significativa. Assim, quando a concentração obtida por meio de HPLC aumenta, os níveis resultantes na quimioluminescência também são maiores.

Portanto, observou-se que a sensibilidade deste método é 87,5%, a especificidade 97,0%, com valores preditivos positivos e negativos, 98,8 e 96,2%, respectivamente (Figura 2).

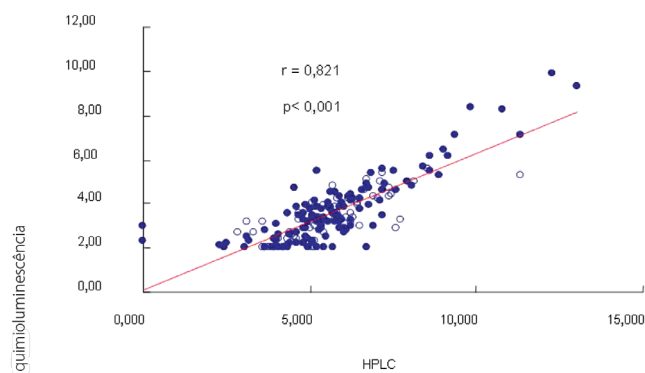


Figura 1. Correlação entre quimioluminescência e HPLC

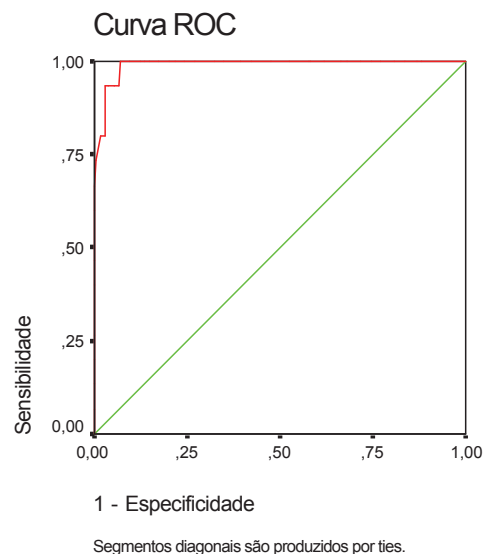


Figura 2. Curva ROC (sensibilidade e especificidade)

Os resultados da hiperhomocisteinemia medidos por quimioluminescência demonstraram, por meio do coeficiente de Spearman, a presença de uma correlação positiva e significativa entre as duas técnicas ($r = 0,889$ e $p < 0,001$).

As amostras de homocisteinúria apresentaram, na técnica de quimioluminescência, um valor médio de 167,9, um valor mediano de 187,5, e valores mínimos e máximos de 4,7 e 505,0. Na técnica de HPLC, o valor médio foi de 148,3, o valor mediano foi de 134,8 e os valores mínimos e máximos foram 333,8 (Figura 3).

DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstramos que o uso da técnica de quimioluminescência para medir a homocisteína plasmática apresenta uma correlação positiva e significativa, e avalia o verdadeiro valor prognóstico dos níveis de homocisteína em crianças saudáveis. Os resultados

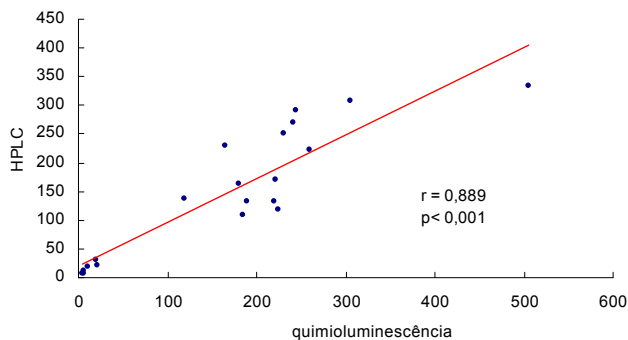


Figura 3. Correlação entre ambas as técnicas para medir a hiperhomocisteinemia

sugerem que é possível usar a técnica de quimioluminescência como método diagnóstico no distúrbio metabólico envolvendo a homocisteína.

Na maioria das pesquisas, a preocupação é avaliar a concentração total de homocisteína em adultos para estabelecer um valor de referência para ajudar a prevenir, ou mesmo definir, o prognóstico clínico do risco cardiovascular.

Por enquanto, esta quantificação padrão em crianças pré-escolares ainda não foi totalmente elucidada, como demonstrado por um estudo realizado com crianças na Bélgica, que determinou os valores de referência em três grupos etários, medidos em ambos os sexos, com o uso da técnica de HPLC da seguinte maneira: entre 5 e 9 anos de idade ($6,21 \mu\text{mol/l}$), entre 10 e 14 anos ($7,09 \mu\text{mol/l}$) e entre 15 e 19 anos de idade ($8,84 \mu\text{mol/l}$). O aumento dos níveis de homocisteína próximo à idade adulta é nitidamente distinguível, sendo provavelmente causado pelos efeitos dos hormônios durante a puberdade⁽¹²⁾.

Nossos resultados, quando comparados aos do estudo mencionado anteriormente, ambos envolvendo populações jovens, indicam que os níveis plasmáticos de homocisteína encontrados são consistentes, embora a metodologia usada seja o ensaio de quimioluminescência em vez de HPLC.

Neste trabalho, os autores citam outros estudos que fornecem diretrizes para avaliar a média da concentração de homocisteína entre os pacientes jovens. Vilaseca et al. analisaram a concentração de homocisteína em crianças entre 2 e 10 anos de idade ($5,8 \mu\text{mol/l}$), 11 e 15 anos de idade ($6,6 \mu\text{mol/l}$) e entre 16 e 18 anos de idade ($8,1 \mu\text{mol/l}$)⁽¹²⁾.

O National Institutes of Health (NIH) acompanhou um estudo da concentração de homocisteína em uma amostra representativa de adolescentes e adultos norte-americanos. Três coletas de amostras foram realizadas em diferentes momentos relacionados à fortificação com folato. O método analítico usado para determinar a homocisteína foi modificado durante o estudo. Eles começaram com HPLC (1991-1999) e concluíram a análise usando o analisador imunoenzimático Abbott

IIMX[®] (1999-2001) e Abbott AxSYM[®] (2002-2004). Foram usados os programas estatísticos SAS e SUDAN, os quais provaram que o uso de diferentes técnicas analíticas não envolve mudanças prejudiciais na análise final dos resultados, como demonstrado pelos nossos resultados⁽¹³⁾.

As técnicas laboratoriais para quantificar a homocisteína (HPLC) têm alto custo, o que aumenta as dificuldades para a análise de rotina, principalmente no que diz respeito à elucidação dos resultados dos usuários dos Serviços de Saúde Pública.

Portanto, a análise da homocisteína plasmática necessitaria de menos tempo, bem como diminuiria os gastos de reagentes e também forneceria assistência à maioria da população ao realizar estes exames.

Há poucos estudos publicados sobre a determinação da homocisteína em crianças saudáveis e não-saudáveis, mas outras técnicas analíticas já foram descritas e podem ser usadas sem interferir em qualidade e resultados.

De acordo com Stauffenberg, a técnica de quimioluminescência, quando comparada ao método de referência (HPLC), não prejudica a avaliação clínica da concentração de homocisteína e pode ser ainda mais favorável quanto à relação custo/benefício e facilidade de realização⁽¹⁴⁾.

Embora a homocisteína seja um fator de risco, a sua dosagem raramente é realizada, talvez em razão dos altos custos da técnica HPLC. Portanto, os nossos resultados sugerem que é possível medi-la efetivamente com o uso da técnica de quimioluminescência, já que as amostras apresentando homocisteinúria foram estatisticamente significativas quando ambos os métodos foram comparados.

CONCLUSÕES

Os resultados provaram que a determinação dos níveis plasmáticos de homocisteína usando a quimioluminescência é representativa para ser usada como um ensaio de rotina nas amostras dentro dos valores de referência, assim como em amostras que apresentam altos níveis de homocisteína.

REFERÊNCIAS

1. Verhoeve P, Steenge RG, Boelsma E, Vliet T, Olthof RM, Katan BM. Dietary serine and cystine attenuate the homocysteine-raising effect of dietary methionine: a randomized crossover trial in humans. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(3):674-9.
2. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic basis of inherited disease.* 3th ed. New York: McGraw Hill; 1995. p. 1887-912.
3. Herrman M, Shomal O, Hubner U, Bohm M, Herrman W. A Review of homocysteine and heart failure. *Eur J Heart Failure.* 2006;8(6):571-6.

4. Bouschey CJ, Beresford SA, Omeni GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*. 1995;274(13):1049-57.
5. Weiss N. Mechanisms of Increased Vascular Oxidant Stress in Hyperhomocysteinemia and Its Impact on Endothelial Function. *Cur Drug Metab*. 2005;6(1):27-36.
6. Meloni FG, Tonolo CG, Zuppi C. Hyper-homocysteinemia is not a main feature of juvenile uncomplicated type 1 diabetes. *J Atheroscl Thromb*. 2004;12(1):14-20.
7. Oshaug A, Brigge KH, Refsum H. Diet, an independent determinant for plasma total homocysteine: a cross sectional study of Norwegian Works on platforms in the North Sea. *Eur J Clin Nutr*. 1998;52(1):7-11.
8. Tewari CP, Zhang B, Bluestein IB. Analytical and clinical evaluation of the Bayer ADVIA Centaur® homocysteine assay. *Clin Chim Acta*. 2004;342:171-8.
9. Neves LB, Macedo DM, Lopes AC. Homocisteína. *J Bras Patol Med Lab*. 2004;40(5):311-20.
10. Tuschl K, Bodamer AO, Erwa W, Muhl A. Rapid analysis of total plasma homocysteine by tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. 2005;351(1-2):139-41.
11. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Ann Rev Med*. 1998;49:31-62.
12. Laet C, Wautrecht JC, Brasseur D, Dramaix M, Boeynaems MJ, Decuyper J, et al. Plasma Homocysteine concentrations in a Belgian school – age population. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(5):968-72.
13. Pfeiffer MC, Osterloh DJ, Stephenson KM, Yetley AE, Rader IJ, Johnson LC. Trends in Circulating Concentrations of Total Homocysteine among US Adolescents and adults: Findings from the 1991-1994 and 1999-2004. National Health and Nutrition Examination Surveys. *Clin Chem*. 2008;54(5):801-13.
14. Stauffenberg TM, Lange AR, Hillis DL. Hyperhomocysteinemia Measured by Imunoassay. *Arch Pathol Lab Med*. 2004;128(11):1263-6.