**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

***HIPERHOMOCISTEINEMIA E O RISCO
CARDIOVASCULAR***

GANNABATHULA SREE VANI

Tese de Doutorado

ORIENTADORA

PROFA. DRA. VIRGÍNIA BERLANGA CAMPOS JUNQUEIRA

**SÃO PAULO
13.05.2002**

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Gannabathula, Sree Vani
G198h Hiperhomocisteinemia e o risco cardiovascular /
Sree Vani Gannabathula. -- São Paulo, 2002.
130p

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Junqueira, Virgínia Berlanga Campos

1. Vitamina : Bioquímica 2. Aminoácido : Metabolismo
3. Doenças cardiovasculares I. T. II. Junqueira, Virgínia
Berlanga Campos, orientador.

574.1926 CDD

“Hiperhomocisteinemia e o Risco Cardiovascular”

GANNABATHULA SREE VANI

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Profa. Dra. VIRGÍNIA BERLANGA CAMPOS JUNQUEIRA
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. WALTER COLLI
IQ – USP

Profa. Dra. DULCINÉIA SAES PARRA ABDALLA
FCF – USP

Profa. Dra. ANA CAMPA
FCF – USP

Prof. Dr. LUIZ ROBERTO RAMOS
UNIFESP

SÃO PAULO
13 DE MAIO 2002.

“Aos meus amados pais, a quem devo todas as minhas conquistas. . . . que apesar de não estarem mais fisicamente presentes, sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, difíceis e alegres, e para sempre permanecerão vivos no fundo do meu coração”.

“In memory of my beloved parents who are responsible for all my achievements, . . . although are not present in this world anymore, have always been present in all the difficult and happy moments of my life. They will remain for ever deep inside my heart”.

"A vida é um jogo no qual as regras mudam constantemente; nada estraga mais um jogo do que aqueles que o levam a sério".

G,

Você, com seu amor, compreensão e respeito, soube me ajudar nos momentos mais difíceis. Te amo.

Aos meus amados filhos, sentido da minha vida, que aceitaram tantos sacrifícios e pacientemente esperam pela minha atenção.

Aos meus sogros, que tanto me incentivaram nessa minha caminhada.

Life is a game in which the rules are constantly changing; nothing spoils a game more than those who take it seriously.

G,

Your love, understanding and respect, always helped me in the most difficult moments of my life. Love u

To my loving kids, meaning of my life, who accepted so many sacrifices and patiently wait for my attention.

*My in laws (Mr. Govinda Rao & Mrs. Lakshmi Kantamma),
Who gave me lots of incentive to conquer this step.*

Chefe(Prof. Dr. Edson Rodrigues):

*Se houvesse mais pessoas como o senhor, o mundo seria bem
Melhor.*

*Meus irmãos e sister in laws, parte da minha vida que de alguma
maneira contribuíram para as minhas vitórias*

Não basta conquistar a sabedoria, é preciso usá-la.

À Vi,

*Que com sua sabedoria soube guiar e ensinar tudo que é essencial.
Obrigada pela oportunidade e amizade.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto Ramos, por acreditar em nós e toda ajuda indispensável na hora de decifrar os dados.

Aos participantes deste estudo, voluntários urbanos e rurais, sem os quais não seria possível realizar este trabalho. Obrigado a todos.

Aos amigos e colegas que trabalharam no laboratório, Leandro Giavarotti, Ligia Azzalis, Ligia Gomes, Sandra Chan, Sandra Poppe, André Fonseca, Adriana carvalho, Alessandra F.Lima, Alcione Moscardi e Maria Antonietta Leitão, meus sinceros agradecimentos.

A Alessandro de Grande, por seu importante auxílio na etapa final.

Aos Amigos do Laboratório VITÆ, Luciano e Tania Rodrigues, que pacientemente me auxiliaram a entender a cromatografia líquida.

À grande Adri, esteja onde você estiver, estará sempre nas nossas lembranças.

Ao Dr Clóvis A. Peres e Alexandre Shinzato, pelo auxílio durante a análise estatística.

À Andréa L. Oliveira e Silva da Análise, por toda boa vontade durante as dosagem das vitaminas

À Dr. Vania d' Almeida e ao Allan, pelos momentos gostosos e pelo o trabalho conjunto nas determinações de homocisteína.

À equipe da pós-graduação da IQ-USP, pela boa vontade e atenção prestada durante todos estes anos.

Às Profa. Dra. Ana Campa e Profa. Dra. Dulcineia Abdalla, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e Profa Dra. Marisa de Medeiros e Prof. Dr. Pio Colepicolo, do Instituto de Química da USP, pelo incentivo e amizade.

À Prof. Ms. Angela Maria S. Mattos Pinto da UNITAU, pela compreensão e auxílio nos momentos difíceis.

Ao pessoal do Hemocentro - USF, pelo auxílio na coleta de sangue (especialmente durante fins de semanas) dos voluntários urbanos e rurais .

À Carmem de Luna Yelisetty, amiga e irmã, pela ajuda nas coletas, amizade e revisão do texto.

Àlê pelo auxílio na hora de dosagem dos lipídeos.

Agradecimentos

À Karin Somon Giavarotti, ser amiga nos momentos negros é dom de poucos, desejo muito sucesso.

À D. Vitória, pela sua atenção.

Às meninas do laboratório de bioquímica- UNITAU, que de várias maneiras me ajudaram.

Ao CNPq, FAPESP, UNITAU, USF e Análise Produtos e Serviços para Laboratório LTDA, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Os meus sinceros agradecimentos a todos que se fizeram presentes, voluntariamente, no desenvolvimento deste trabalho.

R E S U M O

Nível elevado de homocisteína (Hcy) no plasma é considerado fator de risco de doença cardiovascular. Consumo reduzido de vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico tem sido relacionado com hiperhomocisteinemia. O objetivo desse estudo foi verificar o consumo de vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico nas populações urbana e rural, bem como a correlação dos níveis plasmáticos dessas vitaminas com os níveis plasmáticos de Hcy. Também determinamos os níveis séricos de lipídeos e avaliamos o risco cardiovascular das populações frente a hiperlipemia. O consumo de B₆ e ácido fólico é maior na população urbana, com $p=0,00$ e $p=0,04$ respectivamente, sendo o consumo de B₁₂ maior na população rural, com $p=0,47$. As correlações são significativamente negativa entre Hcy e as vitaminas B₁₂ e ácido fólico. A população rural apresenta Hcy com valor médio de $16,5\pm 9,2\mu\text{mol/L}$, classificada como hiperhomocisteinemia moderada, e a população urbana $12,8\pm 5,5\mu\text{mol/L}$, o qual está dentro da faixa de referência. O valor médio de LDL sérica é maior na população urbana ($3,4\pm 0,8\text{mmol/L}$) do que na população rural ($2,8\pm 0,9\text{mmol/L}$), com valor de $p=0,00$. Como fator de risco cardiovascular, consideramos Hcy plasmática $>14\mu\text{mol/L}$ e LDL sérica $>3,38\text{mmol/L}$. Neste caso, 41,4% da população rural e 7,4% população urbana apresentam Hcy maior que $14\mu\text{mol/L}$. O inverso ocorre em relação a LDL, onde 43,2% da população urbana e 11% na população rural apresentam níveis acima de $3,38\text{mmol/L}$. Concluímos que o risco cardiovascular decorrente de hiperhomocisteinemia é maior na população rural que na urbana e este risco poderia reduzir mediante o consumo de vitaminas.

ABSTRACT

Elevated levels of plasma homocysteine (Hcy) are considered a risk factor for cardiovascular diseases. Low intake of vitamins B₆, B₁₂ and folic acid have been related to hyperhomocysteinemia. The purpose of the present study is to determine the consumption of the vitamins B₆, B₁₂ and folic acid in two Brazilian urban and rural populations, along with the plasmatic levels of these vitamins and plasmatic homocysteine. In addition, the serum levels of lipids have been determined to evaluate the cardiovascular risk in the two populations regarding their hyperlipidemic condition. The consumption of B₆ and folic acid is higher in the urban population ($p=0.00$ and $p=0.04$ respectively), while the consumption of B₁₂ is not significantly different ($p=0.47$). There is a negative correlation between B₁₂ and folic acid with Hcy. The rural population shows mean Hcy value of $16.5\pm 9.2\mu\text{mol/L}$ and is classified as having moderate hyperhomocysteinemia, while for the urban population, the mean value is $12.8\pm 5.5\mu\text{mol/L}$ and is well within the normal range. The mean value of the serum LDL is higher in the urban population ($3.4\pm 0.8\text{mmol/L}$) compared to the rural population ($2.8\pm 0.9\text{mmol/L}$) with a significance of $p=0.00$. Plasma Hcy values $>14\mu\text{mol/L}$ and serum LDL $>3.38\text{mmol/L}$ were considered as the risk factors for cardiovascular disease. With in the reference values, 41.4% of the rural population and 7.4% of the urban population show a Hcy as a risk factor. For LDL, the inverse is true, i.e 43.2% of urban and 11% of the rural population are at risk. We conclude that the cardiovascular risk arising from hyperhomocysteinemia is higher in the rural population and that this can be reduced by increased consumption of vitamins.

ABREVIATURAS

BHMT	Betaina-homocisteína metiltransferase
B ₆	Piridoxal fosfato
B ₁₂	Cobalamina
CBS	Cistationina Beta-Sintetase
CIS	Centro de Informática em Saúde
CL	Cistationina Gama–Liase ou Gama-Cistationase
CTT	Cistationina
CYS	Cisteína
DCV	Doença cardiovascular
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
Gly	Glicina
Hcy	Homocisteína
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
HSD	Honest Significant Difference
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MAT	Metionina Adenosiltransferase
MET	Metionina
5-metilTHF	N ⁵ -metilenotetrahidrofolato
5,10- metilenoTHF	N ^{5,10} – metilenotetrahidrofolato
MS	Metionina Sintetase
MTHFR	N ^{5,10} – metilenotetrahidrofolato redutase

PAN	Programa de Apoio a nutrição
PBS	Phosphate –buffered saline
R	Rural
RDA	Daily Recomended Allowence
TCEP	tris 2 – carboxyethylphosphine
tHcy	Homocisteina total
TG	Triglicérideos
SAM	S-adenosilmetionina
SAH	S-adenosilhomocisteina
SBD-F	ammonium 7 – fluorobenzo-2-oxa-1.3 diazole – 4 – Sulfonato
SEM	Erro do Desvio Padrão
U	Urbano
VLDL	Lipoproteína de muita baixa densidade

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
ABREVIATURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Aspectos Epidemiológicos.....	1
1.2. Fatores de Risco para DCV.....	2
1.3. Hiperhomocisteinemia	3
1.3.1. Histórico.....	3
1.3.2. Metabolismo de Homocisteína e Sua Regulação.....	6
1.3.3. Anormalidades do Metabolismo de Homocisteína	12
1.3.3.1. Fatores Genéticos que Determinam as Anormalidades no Metabolismo de Hcy.....	13
1.3.3.1.1. Alterações na via de Transulfuração	13
1.3.3.1.2. Alterações na via de Remetilação	14
1.3.3.2. Fatores Nutricionais que Determinam as Anormalidades no Metabolismo de Hcy	16
1.3.3.2. Outros Fatores que Determinam as Anormalidades no Metabolismo de Hcy: Idade, Sexo, Estilo de Vida e Outros	18
1.3.4. Classificação da Hiperhomocisteinemia	20
1.3.5. Determinação da Homocisteína no Plasma ou Soro	21
1.3.6. Mecanismos Fisiopatológicos Implicados na Hiperhomocisteinemia	24
1.3.6.1. Alterações da Tromboresistência Vascular	24
1.3.6.2. Estresse Oxidativo Mediado pela Hiperhomocisteinemia	29
1.3.6.3. Papel Alternativo de Hipometilação	33
1.3.7. Tratamento Vitamínico da Hiperhomocisteinemia	35
2. OBJETIVOS	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1. Seleção de Voluntários para Pesquisa	39
3.2. Metodologia para Estimar Consumo Diário das Vitaminas.....	40
3.2.1. Inquérito Alimentar	40
3.2.1.1. O Inquérito Alimentar e Sua Aplicação	40

3.2.1.2. Cálculo das vitaminas B ₆ e B ₁₂ e de Ácido Fólico	41
3.3. Metodologia para Medir Níveis Plasmáticos das Vitaminas.....	43
3.3.1. Dosagem de Vitamina B ₁₂	43
3.3.2. Dosagem de Vitamina B ₆ e Ácido Fólico.....	44
3.4. Determinação da Concentração da Homocisteína Plasmática.....	47
3.4.1. Obtenção da Amostra	49
3.4.2. Técnica da Dosagem da Homocisteína	50
3.5. Metodologia para Avaliar Níveis Plasmáticos dos Lipídios	53
3.5.1. Dosagem de Triglicerídios	53
3.5.2. Dosagem de Colesterol Total	54
3.5.3. Dosagem de HDL Colesterol	55
3.5.4. Cálculos da concentração de VLDL e LDL	55
3.6. Tratamento Estatístico dos Resultados	55
4. RESULTADOS.....	57
4.1. Ingestão Vitamínica	57
4.2. Parâmetros Plasmáticos e Séricos	58
4.3. Correlação Entre a Ingestão e os Níveis Plasmáticos das Vitaminas	61
4.4. Correlações Entre Os Níveis Vitaminas, Hcy e Lipídios	62
4.5. Distribuição dos Fatores de Risco Entre as Duas Sub-populações estudadas	68
5. DISCUSSÃO.....	70
5.1. Risco de Doença Cardiovascular e a Influência de Metabolismo de Homocisteína.....	70
5.2. LDL-Colesterol, Homocisteína e a Doença Cardiovascular.....	84
6. CONCLUSÕES.....	90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
8. ANEXOS	

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

“Quando medito acerca de uma doença, nunca penso em termos de encontrar um remédio para ela e sim, numa forma de preveni-la” LOUIS PASTEUR, 1884 (PASTEUR,1968)

Apesar dos progressos, a doença cardiovascular é, ainda o mais sério risco à vida e à saúde. Estima-se que um em cada três homens nos Estados Unidos desenvolva algum tipo de doença cardiovascular antes de atingir 60 anos; para as mulheres as probabilidades são de uma em 10. A cardiopatia coronária é a principal causa de morte após os 40 anos entre o sexo masculino e após os 50, entre o sexo feminino (WILLIAM b. KANNEL, M.D. e THOMAS J. THOM, B.A. 1990).

Desde a década de 40, o Brasil vem passando por um processo de inversão das curvas de mortalidade, em que se observa um declínio na mortalidade por doenças infecciosas e um concomitante aumento na mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis e causas externas. Esse processo, chamado “fenômeno de transição epidemiológica”, ocorreu em todos os países hoje desenvolvidos, onde a população de idosos é cada vez mais expressiva (www.saude.gov.br).

Em 1930, as doenças cardiovasculares (DCV) eram responsáveis por apenas 11,8% das mortes nas capitais do país. Em 1996, este percentual era de 27,4%. A alta prevalência das doenças cardiovasculares é hoje observada mundialmente. No Brasil, este grupo de doenças é a principal causa de óbito: foram responsáveis, em 1996, por 249.613 óbitos dos 908.882 óbitos registrados, representado 28% do total (www.saude.gov.br).

Mesmo quando não matam, essas doenças levam, com freqüência, à invalidez parcial ou total do indivíduo, com graves repercussões para este, sua família e a sociedade. Isso mostra que o investimento na prevenção destas doenças é decisivo, não só para garantir qualidade de vida, mas também, para evitar gastos com hospitalização, que a cada dia se torna mais cara em razão do alto grau de sofisticação em que se encontra a medicina moderna.

1.2. FATORES DE RISCO PARA DCV

Não há uma causa única para as DCV mas, sabe-se que existem fatores que aumentam a probabilidade de sua ocorrência. São denominados fatores de risco cardiovascular. Estes fatores de riscos são condições ou hábitos que agredem o coração ou as artérias. Os principais são: hipertensão arterial, dislipidemia, tabagismo, diabetes mellitus, sedentarismo, obesidade e estresse.(www.saude.gov.br).

A hipertensão arterial é, dentre os fatores de risco cardiovascular, o mais importante, afetando de 11 a 20% da população adulta. A relação entre os níveis elevados de colesterol no sangue e a presença de cardiopatia coronária já está bem definida. Vários estudos mostraram que a redução dos níveis de colesterol no sangue reduz o risco de infarto agudo do miocárdio e a mortalidade por doenças cardiovasculares. (www.saude.gov.br).

Entretanto, o risco de mortalidade decorrente das DCV não é totalmente explicado pelos fatores de riscos tradicionais. Cerca de 60 a 70% dos casos de DCV estão relacionados com os principais fatores de risco, mas o restante é atribuído a outros fatores não muito evidentes. Desde a última década, a hiperhomocisteinemia tem sido apontada como um fator de risco independente

para DCV (MOLINOW, 1990; 1994; MOLINOW e cols., 1990; WILLIAMS e cols., 1990; GENEST e cols., 1990; CLARKE e cols., 1991; GENEST e cols., 1991; TAYLOR e cols., 1991; UBBINK e cols. 1991; MOLGAARD e cols., 1992; STAMPFER e cols., 1992; ALFTHAN e cols., 1994; VERHOEF e cols., 1994; 1995; von ECKARDSTEIN e cols., 1994; ARNESEN e cols., 1995; DEN HEIJAR e cols., 1995; FORTIN & GENEST, 1995; FUSTER, 1995; GLUECK e cols., 1995; PERRY e cols., 1995; SELHUB e cols., 1995; BERG & BOERS, 1996).

1.3. HIPERHOMOCISTEINEMIA

1.3.1. Histórico

O aminoácido homocisteína (Hcy) foi primeiramente descrito por BUTZ & DU VIGNEAUD em 1932. No ano seguinte, pesquisadores do Massachusetts General Hospital publicaram no New England Journal of Medicine o relato de um caso referente a um menino de 8 anos, com homocistinúria, o qual foi a óbito após infarto cerebral decorrente de aterotrombose da artéria carótida. Acredita-se que este seja o primeiro caso descrito de homocistinúria. Trinta anos depois duas sobrinhas e um irmão do mesmo menino manifestaram homocistinúria, decorrente de um erro metabólico hereditário raro (McCULLY, 1969).

Casos de homocistinúria em crianças com retardamento mental foram descritos por GERRITSEN e cols (1962). Posteriormente, MUDD e cols. (1985 e 1995) demonstraram que o erro metabólico hereditário era decorrente da deficiência da cistationina β -sintetase. Essa descoberta abriu caminho para o reconhecimento da deficiência de outras enzimas do metabolismo da homocisteína, tais como a metionina sintetase e a metilenotetrahidofolato

redutase, que também determinam homocistinúria. Observações clínicas em pacientes com homocistinúria alertaram quanto ao provável papel da Hcy como agente patogênico das DCV. Neste caso, os pacientes com homocistinúria apresentam alta incidência de problemas cardiovasculares na infância e adolescência, com lesões vasculares que ocorrem independentemente do defeito metabólico, sugerindo que a Hcy é a responsável pela DCV e não o defeito genético em si (SCHIMKE e cols, 1965; McCULLY, 1983; McCULLY, 1997).

A relação entre os níveis plasmáticos de homocisteína e a aterosclerose foi enfatizada por McCULLY (1969) que concluiu que o aumento de Hcy constitui um fator de risco para DCV. Ele salientou, também, que esse risco não está limitado a um pequeno número de crianças com retardamento mental, mas que um número elevado de americanos normocolesterolêmicos estariam sofrendo de DCV decorrente de níveis elevados de Hcy e, ainda, que a cura poderia estar no aumento do consumo de vitaminas do complexo B.

Na época, McCully estava caminhando em sentido contrário ao conceito médico, que tinha o colesterol como causa essencial das DCV, sendo por isso demitido da Universidade de Harvard, onde trabalhava como professor de patologia (McCULLY, 1997).

CHALLEM (1997) relata que um especialista da área de colesterol, quando entrevistado pela Time em 1979, proferiu o seguinte comentário sobre a teoria da Hcy como fator de risco de DCV: “ Administração de vitaminas do complexo B[para arterioesclerose é]..... loucura”.

Após sua demissão, McCully continuou trabalhando com Hcy e vitaminas do complexo B no Veterans Administration Hospital in Providence, R.I.(Rodh Island - USA) sendo que, nos dias de hoje, o uso de vitaminas do

complexo B no tratamento de hiporhomocisteinemia é amplamente aceito pela medicina (CHALLEM, 1997).

O primeiro estudo clínico favorável à teoria de McCULLY foi publicado em 1976 por WILCKEN & WILCKEN, relatando níveis elevados de Hcy em pacientes com doença coronariana, diagnosticada por angiografia. BOUSHEY e cols. (1995) analisando 27 artigos correlacionados ao metabolismo da Hcy e ácido fólico, apontam a hiperhomocisteinemia como sendo um potente fator de risco para a DCV. Atualmente, existem mais de cem estudos clínicos e epidemiológicos relacionados aos níveis de Hcy e DCV, considerando a hiperhomocisteinemia um fator independente de risco de DCV.

Por outro lado, a deficiência de ácido fólico, decorrente da mudança de hábitos alimentares da população em geral, em que os alimentos frescos, ricos em ácido fólico, estão sendo substituídos por alimentos processados ("fast food") pode ser diagnosticada através da dosagem de Hcy no plasma (CHALLEM, 1997). Neste sentido, UBBINK e cols (1993) relatam que 59% dos homens de meia idade apresentam deficiência de ácido fólico e que 30% de homens e mulheres idosas apresentam níveis elevados de Hcy, bem como que, cerca de 30 a 40% dos indivíduos com DCV apresentam níveis elevados de Hcy (SELHUB, 1993). Estes dados deixam clara a dimensão epidêmica das DCV, as quais respondem por cerca de 50% das mortes nos EUA, tendo como causa, em grande parte, um consumo inadequado de vitaminas. Neste sentido, estudando o metabolismo do ácido fólico, FROSST e cols., (1995) bem como MOLLOY e cols., (1997) verificaram a influência dos níveis desta vitamina em indivíduos com erro genético do metabolismo da Hcy, e concluindo que, níveis elevados de ácido fólico compensariam o erro genético do metabolismo da Hcy. Considerando que o

erro genético muitas vezes passa despercebido, CHALLEM (1997) propõe, como solução prática e barata, o consumo adequado de ácido fólico, que, neste caso, envolve um custo menor do que qualquer teste genético.

1.3.2. Metabolismo de Homocisteína e sua Regulação

A Hcy é um aminoácido sulfatado, que não faz parte das proteínas da dieta humana, tendo origem exclusiva como produto intermediário do metabolismo do aminoácido metionina. A metionina é único aminoácido essencial contendo sulfato, sendo encontrado em abundância em proteínas de origem animal.

Em condições normais, os mecanismos de interconversão entre metionina e homocisteína compartilham os mesmos mecanismos regulatórios, com funções metabólicas em comum (FINKELSTEIN, 2000).

Dentre os destinos metabólicos da metionina, a biossíntese de proteínas, de cisteína (aminoácido não essencial) e de S-adenosilmetionina (SAM) são de particular importância. A SAM é formada pela ação da enzima metionina adenosiltransferase (MAT) sendo fonte de grupo metila para vários aceptores em reações de grande importância fisiológica como a produção de creatina, de epinefrina, de melatonina, de nucleotídeos metilados e na metilação de fosfolipídios (figura 1, reação 2) (MARKS e cols., 1996; FOWLER, 1997; MATO e cols., 1997). Essas reações são catalisadas por metiltransferases que demetilam a SAM à S-adenosilhomocisteína (SAH) que é subsequente hidrolisada pela ação da adenosilhomocisteinase ou S-adenosilhomocisteína hidrolase, à Hcy e adenosina.

Uma vez formada, a Hcy pode ser transformada em metionina pelo processo de remetilação ou degradada a cisteína pelo processo de transsulfuração (FRANKELSTEIN, 1990; FRANKELSTEIN e MARTIN, 2000). A remetilação é catalisada pela metionina sintetase (MS) (figura-1, reação 7) utilizando N^5 -metilenotetrahidrofolato (5-metilTHF) como doador de grupo metil e cobalamina (vitamina B_{12}) como cofator. A formação de 5-metilTHF depende da enzima $N^{5,10}$ -metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) (figura-1, reação 10) que catalisa a redução de $N^{5,10}$ -metilenotetrahidrofolato (5,10-metileno THF) obtido a partir de THF.

Este ciclo básico do metabolismo da metionina ocorre em todas as células dos mamíferos. Uma pequena parte da Hcy pode ser remetilada a metionina, independente de folato e cobalamina, mas utilizando, entretanto, a betaína (derivado da colina) pela ação da enzima betaína-homocisteína metiltransferase (BHMT)(figura-1 reação 8) a qual, provavelmente, está confinada ao fígado. Na deficiência de folato e/ou cobalamina, este mecanismo mantém a concentração tecidual da metionina necessária para síntese de SAM (MCKEEVER e cols., 1991; SUNDEN,1997).

A via de transsulfuração remove a Hcy do ciclo da metionina de forma irreversível, convertendo a homocisteína em cisteína e α -cetobutirato. O caminho metabólico da transsulfuração envolve as enzimas cistationina β -sintetase (CBS) e cistationina γ -liase (CL) ambas dependentes de vitamina B_6 (piridoxal fosfato) como cofator. A CBS é uma hemoproteína que catalisa, primeiramente, a transformação irreversível da Hcy em cistationina (CTT) (figura-1, reação 5). Na sequência, a cistationina resultante é convertida em cisteína (CYS) e α -cetobutirato, em reação catalisada pela CL, também conhecida como

γ -cistationase (figura-1, reação 6). A cisteína formada neste processo pode ser utilizada na síntese de proteínas e do tripeptídeo antioxidante, glutatona.

Em contraste com a via de remetilação, a transsulfuração apresenta distribuição tecidual limitada, nos mamíferos. Fígado, rins, intestino delgado e pâncreas são órgãos que apresentam atividade das enzimas de transsulfuração, sendo essenciais para a retirada e metabolização do excesso de Hcy circulante (FRANKELSTEIN, 1990; BLOM, 2000). Tecidos com níveis das enzimas de transsulfuração abaixo do limite de detecção necessitam de cisteína exógena para síntese de glutatona (FRANKELSTEIN e MARTIN, 2000).

A distribuição de substratos entre os processos de transmetilação e remetilação-transsulfuração regulam o metabolismo de Hcy e da metionina nos tecidos humanos. A via de transmetilação corresponde à utilização da metionina no processo de biossíntese de proteínas e de SAM. Por outro lado, o processo de remetilação-transsulfuração compartilha a utilização da Hcy celular, a qual é sintetizada por transmetilação, ocorrendo, desta forma, competição pelo substrato Hcy entre as duas vias. Neste sentido, cabe lembrar que o controle dessas vias metabólicas envolve a competição pelo substrato Hcy, bem como o efeito modulador da SAM sobre enzimas importantes dos sistemas de transmetilação e remetilação-transsulfuração (FRANKELSTEIN, 2000).

SAM regula, simultaneamente, a remetilação e a degradação da Hcy, inibindo as enzimas conversoras de metionina que apresentam K_M baixo, ativando as enzimas catabolisadoras de metionina que apresentam K_M elevado (FRANKELSTEIN, 1990; SELHUB & MILLER, 1992). Desta forma, quando os

Figura – 1. Metabolismo de Homocisteína

- (1) Ativação da metionina (MET) pelo ATP, na presença da enzima metionina adenosil transferase (MAT).
- (2) S-adenosilmetionina (SAM) desmetilada em S-adenosilhomocisteína (SAH) acoplada à metilação do aceitador R a RCH_3 .
- (3) Desmetilação alternativa catalisada por glicina N-metiltransferase, que converte glicina (Gly) em sarcosina (CH_3Gly).
- (4) Hidrólise da SAH em homocisteína (Hcy) e adenosina, catalisada por S-adenosilhomocisteína hidrolase.
- (5) Condensação da serina (Ser) com a Hcy para formar cistationina (CTT) pela ação da enzima cistationina beta sintetase (CBS), que é dependente da vitamina B₆, na forma de piridoxina -5'-fosfato.
- (6) Conversão da CTT em CYS e α -cetobutirato, catalizada pela cistationase (CL), que é dependente da vitamina B₆, na forma de piridoxina-5'-fosfato.
- (7) N-metil tetrahidrofolato (5-metilTHF) é desmetilado a THF e a Hcy é remetida a MET pela metionina sintetase (MS), que é dependente da vitamina B₁₂, derivada da metilcobalamina.
- (8) Remetilação da Hcy pela enzima betaina-homocisteína metiltransferase no fígado, na presença da betaina, derivada da colina.
- (9) Síntese de N 5-10-metilenoTHF a partir de THF, acoplado à conversão da Ser a Gly pela ação da enzima serina hidroximetil transferase, que é dependente da vitamina B₆, na forma de piridoxina -5'-fosfato.
- (10) Redução do 5,10,metilenoTHF em 5-metilTHF catalizada pela enzima N,5-10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR).

níveis de SAM são suficientes para manter as reações de transmetilação, este reduz a taxa de remetilação da Hcy, inibindo a atividade da metilenotetrahidrofolato redutase (figura-1, reação 10) (FOWLER,1997).

SAM também regula a remetilação hepática da Hcy, limitando tanto a atividade como a síntese da BHMT (figura-1, reação 8), inibindo as enzimas com K_M menor, como a MAT tipo I (hepática) e a MAT tipo II presente em tecidos extrahepáticos (figura-1, reação 1). Ao contrário, a SAM estimula a MAT III de K_M elevado, presente no tecido hepático, além de estimular a via alternativa de transmetilação, ativando a glicina transmetilase (figura-1, reação 3) (FRANKELSTEIN, 1990).

Adicionalmente, para evitar o acúmulo de Hcy, que é potencialmente citotóxica, a SAM estimula a transsulfuração, ativando as enzimas CBS e CL (FRANKELSTEIN, 1990; FOWLER,1997). Considerando que as concentrações de SAM variam dentro de uma faixa muito restrita em todos os tecidos exceto tecido hepático, é provável que as propriedades regulatórias de SAM sejam mais significantes nos tecidos extrahepáticos (FRANKELSTEIN, 2000).

Dietas ricas em proteínas animais são ricas em metionina e podem levar a um aumento das concentrações celulares de SAM. Nestas condições, 70% de Hcy é catabolisada pela CBS via transsulfuração (figura-1). Em contraste, sob condições de restrição protéica, a remetilação é favorecida pela aceleração da metilenotetrahidrofolato redutase dependente do folato (figura-1, reação 10). Neste caso, somente 10% da Hcy é catabolisada via transsulfuração (DURAND e cols. 2001)

Todavia, o consumo de altos níveis de metionina a longo prazo pode levar à saturação da via de transsulfuração. Esta saturação, associada à inibição

da remetilação, leva ao acúmulo de Hcy celular e, consequentemente, extravasamento desta para corrente sangüínea. Estudos como o de UELAND & REFSUM (1989) mostram que dietas ricas em metionina, ou uma grande sobrecarga de metionina, levam à saída de Hcy das células, resultando em aumento plasmático dos níveis de Hcy.

O “pool” intracelular de folatos também está envolvido na regulação do metabolismo da Hcy por fornecer 5-metilTHF. Este último é necessário na remetilação da Hcy à metionina. Logo, 5-metilTHF mantém níveis adequados de SAM para os tecidos quando há restrição exógena da doação do grupo metil pela metionina e pela colina. Em condições de consumo de altos níveis de folato, o 5-metilTHF inibe a via alternativa de transmetilação, inativando a glicina metiltransferase (figura-1, reação 3) resultando em aumento tecidual nos níveis de SAM. Este aumento de SAM limita a mobilização intracelular do “pool” de folato na via remetilação da Hcy (figura-1, reação 10) (DURAND e cols., 1997a).

Em contrapartida, um decréscimo na biodisponibilidade de 5-metilTHF gera uma redução de remetilação da Hcy (figura-1, reação 7) e a aceleração da via alternativa de transmetilação (figura-1, reação 3). Uma diminuição nos níveis de SAM, por depleção dos estoques de folato, induz inibição das reações da transsulfuração (figura-1, reação 5) (DURAND e cols., 1997a). Deficiências nutricionais de folato e uso de drogas que interferem com o metabolismo de folato, como metatrexato, agentes anticarcinogênicos que inibem a THFRedutase e dióxido nitroso, um gás anestésico que inibe a atividade da MS, levam ao acúmulo e efluxo celular de Hcy, aumentando os níveis circulatórios de Hcy (UELAND & REFSUM, 1989).

Estudos como os de CHEN & BANERJEE (1998) e TAOKA e cols. (1998) revelaram a sensibilidade oxidativa da MS e CBS e sugeriram uma regulação redox das vias de remetilação e transulfuração. A CBS, uma hemeproteína, é ativa na forma oxidada, enquanto que a MS é inativada com a oxidação e requer uma redução para sua reativação. De acordo com este mecanismo de regulação, o qual deve ter significado fisiológico, o metabolismo de Hcy é desviado para a produção da CYS e da glutathione, via transsulfuração, em células hepáticas expostas a condições oxidativas (MOSHAROV e cols., 2000). Logo, é possível que o estresse oxidativo reduza a remetilação e aumente a transsulfuração para manter um processo de autocorreção e manter o “pool” intracelular de glutathione, essencial para a capacidade regulatória redox da célula.

1.3.3. Anormalidades do Metabolismo de Homocisteína

Disfunções relacionadas aos defeitos congênitos nas enzimas envolvidas no metabolismo de Hcy, deficiências no fornecimento, absorção ou metabolismo das vitaminas ácido fólico, B₆ e B₁₂, e consumo excessivo de metionina, todos são fatores que contribuem para o aumento dos níveis plasmáticos de Hcy (Tabela-1 do DURAND e cols., 2001). É interessante notar que interações gene-nutriente, especialmente entre a mutação C677T no gene da MTHFR e níveis de folato e também, entre a heterogeneidade para o defeito da CBS e folato, podem estar envolvidos no início da hiperhomocisteinemia (LENTZ e cols., 2000).

Outro ponto a verificar é o aumento do transporte da Hcy dos tecidos para o plasma, que é regulado pelo carreador de Hcy na forma reduzida (BLOM, 2000). A hiperhomocisteinemia também pode ser resultante da redução

da função renal, o qual tem papel central na depuração da Hcy plasmática, risco da insuficiência crônica hepática.

1.3.3.1. Fatores Genéticos que Determinam as Anormalidades no Metabolismo de Hcy

1.3.3.1.1. Alterações na Via de Transsulfuração

Uma das alterações clássicas do metabolismo da Hcy é a deficiência do homozigoto da cistationina β sintetase (CBS) (MUDD e cols., 1995). Este defeito autossômico recessivo resulta em homocistinúria, associada a níveis anormalmente altos de Hcy e metionina plasmática. Os indivíduos com esta patologia representam uma fração pequena da população, aproximadamente 1 em 200.000 indivíduos no mundo. Estes indivíduos apresentam hiperhomocisteinemia muito severa, com níveis plasmáticos de Hcy atingindo a 400 $\mu\text{mol/L}$.

Em pacientes com atividade da CBS entre 0 – 2%, que são quase metade dos casos da homocistinúria homozigota, o tratamento com vitamina B₆ pode reduzir a hiperhomocisteinemia. Tratamento com folato tem efeito nos pacientes que não respondem à vitamina B₆ (FRANKEN e cols., 1994). Trinta e três mutações pontuais foram identificadas no gene da CBS, que se localiza no cromossomo 21. Entre as mutações, a G919A, onde a base nitrogenada guanina foi trocada por adenina na posição 919, é freqüentemente encontrada na população irlandesa, enquanto a mutação T833C é freqüente observada na população alemã (LENTZ e cols., 2000).

A freqüência de indivíduos heterozigotas para CBS é de 1/70 a 1/200 na população em geral. 30 a 50% dos casos apresentam Hcy plasmática

normal. O aumento de Hcy nestes indivíduos pode ser atenuado pela suplementação com ácido fólico. O trabalho de LENTZ e cols. (2000) utilizando camundongos transgênicos, sugere que a deficiência de ácido fólico predispõe indivíduos heterozigotos para CBS a apresentarem hiperhomocisteinemia. A deficiência de CBS é o erro mais comum na hiperhomocisteinemia (MUDD & LEVY, 1995). É interessante ressaltar que pacientes com síndrome de Down, que possuem uma cópia adicional do gene da CBS, geralmente apresentam níveis baixos de Hcy, sendo esta condição considerada um “modelo livre de ateromatose” (SCOTT, 1996; MURDOCH e cols., 1977).

1.3.3.1.2. Alterações na Via de Remetilação

A hiperhomocisteinemia resultante de alterações da via de remetilação é rara. Ainda assim, atividade de MTHFR menor que 20% ou deficiência funcional da MS levam ambas à hiperhomocisteinemia severa. Nove mutações termoestáveis para o gene de MTHFR, localizado no cromossomo 1, de herança autossômica recessiva, devem ser responsáveis pela redução da atividade da enzima. Mutações do tipo C599T e G482A são os dois tipos principais e a hiperhomocisteinemia é observada somente em indivíduos homozigotos. Apesar da hiperhomocisteinemia destes pacientes ser menos severa que na deficiência homozigota da CBS, nenhum tratamento com vitaminas foi realmente efetivo, apesar de ser observada uma redução na hiperhomocisteinemia usando ácido fólico ou 5-metilTHF (FENTON & ROSENBERG, 1995; ROSENBLATT, 1995).

Tabela – 1: Causas de Hiperhomocisteinemia

FATORES GENÉTICOS	RELAÇÃO
Defeito da MTHFR (atividade < 20%)	Mutação homozigoto termoestável (raro) Hiperhomocisteinemia severa em Jejum
Defeito da MTHFR (atividade < 50%)	Mutação homozigoto termolabil C677T Hiperhomocisteinemia Moderada
Defeito da CBS (atividade < 2%)	Homozigoto (raro) Hiperhomocisteinemia severa
Deficiência da CBS	Heterozigoto (0.5-1.5%), aumento de Hcy após sobrecarga da metionina
Deficiência funcional da metionina sintetase	Mutação rara, hiperhomocisteinemia intermediária a severa
FATORES FISIOLÓGICOS	RELAÇÃO
Idade	Os níveis plasmáticos de Hcy aumentam com idade
Sexo	Os homens apresentam níveis maiores de Hcy que mulheres
Menopausa	Aumento de níveis plasmáticos de Hcy após menopausa
Raça	Níveis Hcy são menores nos negros que nos brancos
FATORES NUTRICIONAIS	RELAÇÃO
Deficiência de vitamina B ₆	Aumento de Hcy após sobrecarga da metionina
Deficiência de vitamina B ₁₂	Hiperhomocisteinemia moderada a intermediária
Deficiência do ácido fólico	Hiperhomocisteinemia moderada a intermediária
Excesso proteína animal rico em metionina	Hiperhomocisteinemia moderada a intermediária e aumento de Hcy após sobrecarga da metionina
FATORES PATOLÓGICOS	RELAÇÃO
Fumo	Alteração do metabolismo de ácido fólico e deficiência de vitamina B ₆
Alcoolismo	Metabolismo de ácido fólico alterado
Função renal alterada	Redução de depuração da Hcy
Psoríase	Alteração do uso intracelular da Hcy
Câncer	Alteração do uso intracelular da Hcy
FATORES IATROGENICO	RELAÇÃO
Anticoncepcionais	Metabolismo alterado de ácido fólico
Metatrexato	Inibição da dihidrofolato redutase
Óxido nitroso	Inibição da Metionina sintetase
Anticonvulsivos	Metabolismo alterado de ácido fólico

A mutação do tipo C677T do gene MTHFR, a qual leva à síntese de uma MTHFR termolábil, é responsável por 50% da atividade da enzima nos indivíduos homozigotos. Esta mutação aparece com frequência de 30 a 40% na população, de acordo com a distribuição geográfica (D'ANGELO E SELHUB, 1997; FRANCO e cols., 1998). Nos indivíduos homozigotos, esta mutação autossômica recessiva provoca hiperhomocisteinemia moderada, que pode ser tratada com suplemento de ácido fólico, uma vez que o aumento nos níveis de Hcy deixa de ser observado em pacientes com concentrações plasmáticas de ácido fólico maiores que 15,4nmol/L (JACQUES e cols., 1996). A deficiência de ácido fólico pode ser parcialmente responsável pela expressão do genótipo da MTHFR termolábil e a hiperhomocisteinemia observada nestes pacientes com mutação para MTHFR, raramente, resulta de uma maior necessidade do ácido fólico (MOLLOY e cols., 1997).

Cinco mutações conhecidas afetam a síntese de metilcobalamina, que é um cofator essencial para MS. Estas mutações induzem à deficiência funcional da MS, levando a uma hiperhomocisteinemia intermediária. A deficiência funcional da MS pode ser devida a uma mutação tanto no gene que codifica a própria enzima, como no gene que codifica a metionina sintetase redutase, enzima envolvida na ativação da MS (LECLERC e cols., 1998).

1.3.3.2. Fatores Nutricionais que Determinam as Anormalidades No Metabolismo de Hcy

Entre os vários fatores conhecidos que influenciam o metabolismo de Hcy, se destacam as vitaminas B₆ e B₁₂ e o ácido fólico. Como descrito anteriormente (Item 1.3.2) a Hcy é remetilada a metionina pela ação da MS, que

necessita de metilTHF como doador de grupo metila e da vitamina B₁₂ como cofator. A Hcy também pode seguir a via de transsulfuração, onde as reações necessitam de vitamina B₆ como cofator.

Vários trabalhos, conduzidos tanto em animais como no homem, mostram que deficiências alimentares da vitamina B₁₂ e ácido fólico induzem hiperhomocisteinemia moderada ou intermediária, sob condições basais (DURAND e cols 1996, 1997b). Em meta-análise realizada por SELHUB e cols. (1993) no Framingham Heart Study, verifica-se que a elevação da Hcy está associada a níveis séricos baixos de ácido fólico, assim como o baixo consumo alimentar de ácido fólico e vitamina B₆. PANCHARUNITI e cols. (1994) estudando 101 homens de raça branca com idade variando entre 30 e 50 anos, concluem que níveis baixos de folato estão associados com aumento de risco de DCV e que este efeito é mediado, em grande parte, pelas concentrações plasmáticas de Hcy.

JACOB e cols. (1994) estudaram a alteração dos níveis de Hcy em indivíduos saudáveis recebendo dieta restrita em ácido fólico ou dieta suplementada com ácido fólico, por 108 dias. Os autores concluíram que há aumento nos níveis de Hcy durante a depleção de ácido fólico e que este aumento funcionaria como marcador da deficiência desta vitamina.

Em 1995, DALERY e cols. determinaram os níveis plasmáticos de Hcy, das vitaminas B₆, B₁₂ e de ácido fólico em 584 canadenses de origem francesa, concluindo que, os níveis plasmáticos de Hcy, nestes indivíduos, são influenciados pelos níveis de ácido fólico, de vitaminas B₁₂ e B₆.

BROUWER e cols. (1999), APPEL e cols., (2000) e HERRMANN e cols. (2001) estudaram os efeitos da dieta contendo alimentos ricos em vitaminas, como ácido fólico, vitaminas B₆ e B₁₂, sobre os níveis de Hcy, concluindo que, o

aumento no consumo de verduras e frutas cítricas, fontes ricas em ácido fólico, previne a falta deste e diminui a concentração de Hcy, indicando que a dieta apresenta importância na prevenção da DCV.

As deficiências de ácido fólico e cobalamina são as causas mais comuns de hiperhomocistinemia moderada e intermediária. A incidência destas deficiências aumenta com a idade. Na maioria dos casos, a deficiência da cobalamina é resultado da má-absorção, enquanto que a deficiência do ácido fólico é mais freqüente quando do uso de dietas pobres nesta vitamina, do uso de drogas ou de álcool em excesso.

Apesar da vitamina B₆ ser necessária nas reações da via de transsulfuração, sua deficiência isoladamente é rara, sendo a suplementação com esta vitamina sem efeito no controle dos níveis de Hcy (SCHNEEDE e cols., 2000; KOEHLER e cols., 2001).

1.3.3.3. Outros Fatores que Determinam as Anormalidades No Metabolismo da Hcy: Idade, Sexo, Estilo de Vida e outros

A Hcy plasmática aumenta ao longo da vida, tanto no sexo feminino como no masculino; entretanto, concentrações maiores de Hcy são encontrados em homens, quando comparado às mulheres. Na infância, os níveis de Hcy em meninos e meninas é similar, em torno de 5 µmol/L. Nota-se, entretanto, aumento pronunciado nos meninos durante a puberdade, onde os níveis de Hcy chegam a 6 a 7 µmol/L (TONSTAD e cols., 1996; BJORKE-MONSEN e cols., 1998).

Nos adultos, os níveis plasmáticos de Hcy encontrados são 1 a 2 µmol/L, mais altos nos homens do que nas mulheres. No estudo feito por NYGARD e cols. (1995) com 5918 homens e 6348 mulheres sadios com idade

entre 40 a 42 anos, verificou-se uma média de 10,8 $\mu\text{mol/L}$ para homens e 9,1 $\mu\text{mol/L}$ para mulheres. As diferenças relacionadas ao sexo são explicadas pelo efeito dos esteróides sobre a Hcy; nos homens, há uma produção maior de Hcy que pode estar relacionada à síntese da creatina e creatinina (ANDERSSON e cols., 1992; NORLUND e cols., 1992). As diferenças também podem ser parcialmente explicadas por diferenças na transsulfuração e remetilação da Hcy, mais eficientes nas mulheres do que nos homens (SILBERBERG e cols., 1997; FUKAGAWA e cols., 2000). Contudo, após a menopausa nas mulheres, as concentrações de Hcy nos dois sexos se aproximam, sendo que a terapia da reposição hormonal atenua o aumento nos níveis plasmáticos observado após a menopausa (MIJATOVIC e cols., 1998).

Nos idosos, um grande número de indivíduos apresenta hiperhomocisteinemia. Com a idade, o aumento dos níveis de Hcy pode ser atribuído à alterações das funções renais, às deficiências nos níveis de ácido fólico e à deficiência na absorção da cobalamina. Em indivíduos com mais de 70 anos, 30% apresentam níveis de Hcy superiores a 15 $\mu\text{mol/L}$ (UBBINK, 1998; WILCKEN & WILCKEN, 1998; BJORKERGERN & SVARDSUDD, 2001).

Numerosas drogas podem levar ao quadro de hiperhomocisteinemia. Agentes anticancerígenos como metatrexato e anticonvulsivos usados na epilepsia, podem induzir hiperhomocisteinemia secundária por prejudicarem o metabolismo do ácido fólico. O óxido nitroso (N_2O), gás anestésico que inibe a atividade da MS, também induz a hiperhomocisteinemia. Transplantes cardíacos e renais levam à hiperhomocisteinemia devido à deficiência de ácido fólico e vitamina B₆; além disto o quadro pode ser agravado pelo uso de agentes

imunossupressores como a ciclosporina, que interfere na depuração da Hcy plasmática (FRONTIERA e cols., 1994; BOSTOM e cols., 1997).

O estilo de vida com hábitos alimentares não saudáveis, o tabagismo e o consumo excessivo de álcool, podem levar à hiperhomocisteinemia, através da alteração do metabolismo de ácido fólico e depleção de vitamina B₆ (CARVO e cols., 1996; NYGRD e cols., 1998). Adicionalmente, o consumo excessivo de café aumenta os níveis de Hcy, enquanto que o de chá, de suplementos vitamínicos, verduras e frutas, assim como a atividade física, estão relacionados inversamente aos níveis de Hcy (BROUWER e cols., 1999; APPEL e cols., 2000; BROEKMANS e cols., 2000; RASMUSSEN e cols., 2000).

1.3.4. Classificação da Hiperhomocisteinemia

A classificação da hiperhomocisteinemia está baseada nos níveis plasmáticos de Hcy medidos em jejum (DURAND e cols., 2001).

<p>Valores de referência de homocisteína – 5 a 15 µmol/L</p> <p>Hiperhomocisteinemia moderada – 16 a 25 µmol/L</p> <p>Hiperhomocisteinemia intermediária – 26 a 100 µmol/L</p> <p>Hiperhomocisteinemia grave – acima de 100 µmol/L</p>

A importância da hiperhomocisteinemia moderada e de outros fatores convencionais, como sexo e idade, sobre a incidência de patologias vasculares foi estudada por GRAHAM e cols. (1997) que verificam que o nível de

corte para hiperhomocisteína em jejum é de 12 $\mu\text{mol/L}$. Uma declaração feita por profissionais da área da saúde (Nutrition Committee, American Heart Association, 1999) sugere a dosagem dos níveis de Hcy plasmática em indivíduos com histórico familiar de aterosclerose prematura e concorda que os níveis de Hcy em jejum devem ser menores que 10 $\mu\text{mol/L}$ (MALINOW e cols., 1999).

1.3.5. Determinação da Homocisteína no Plasma ou Soro

A concentração da Hcy no plasma ou soro em adultos é, em média, 10 $\mu\text{mol/L}$. A Hcy existe em várias formas (figura-2). Quantidades pequenas (1%) se encontram na forma reduzida; o restante se encontra na forma oxidada, na forma de dissulfeto (UELAND e cols., 1996). Destes, 70 a 80% estão ligados à proteína plasmática albumina (via ponte dissulfeto) enquanto o restante existe na forma dissulfeto livre, sendo maior parte na forma de dissulfeto misto Hcy-Cys (Figura – 2) .

Esta interconversão de diferentes espécies de Hcy explica os problemas analíticos que foram resolvidos após a introdução do novos métodos de dosagem da tHcy nos anos 80 (UELAND e cols., 1993). Homocisteína total (tHcy) é um termo metodológico que se refere à concentração obtida do plasma ou soro submetido ao tratamento de redução para converter todas as formas, ligadas e livres, ao seus compostos sulfidrilas. O termo Hcy é usado para homocisteína e suas espécies oxidadas.

UELAND e cols. (1993) publicaram um trabalho que revisa o histórico e todos os princípios envolvidos em vários métodos de dosagem da Hcy. O princípio comum a todos os métodos de dosagem de Hcy é a utilização de um redutor para clivar todas as pontes dissulfeto entre Hcy e proteínas ou outros tióis,

podendo ser quantificada diretamente, ou depois da derivatização. A maioria dos ensaios estão baseados na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção fluorimétrica. Um ensaio totalmente automatizado, semelhante ao método de enzima-imunoensaio da Bio-Rad, é citado em DONNELLY & PRONOVOST (2000) e YU e cols. (2000) apresentando uma correlação com os resultados obtidos pela técnica de HPLC, sendo, portanto, útil para centros de estudos populacionais.

Algumas precauções são necessárias na detecção da Hcy, como a coleta de sangue em jejum. Para evitar a liberação da Hcy por eritrócitos, a amostra deve ser mantida em gelo logo após a coleta e o plasma deve ser separado rapidamente antes de 4 horas quando a 4°C, ou antes de uma hora, se a temperatura ambiente (ANDERSON e cols., 1992; UELAND e cols., 1993; MALINOW e cols., 1994; NYGARD e cols., 1999).

Dados recentes de O'BROIN e cols. (2000) indicam que o ácido cítrico pode ser usado como anticoagulante, além de EDTA e heparina. CLARKE e cols. (1998) sugerem que a concentração da tHcy em um indivíduo é relativamente constante, podendo ser determinada por uma dosagem única. Quando o manuseio da amostra é padronizado, o método apresenta um coeficiente de variação analítico aceitável.

O teste de sobrecarga de metionina é utilizado para revelar anormalidades adicionais, não detectáveis pela simples dosagem da tHcy plasmática em jejum. Em indivíduos normais, é utilizada a dosagem de 100mg/kg de peso, que induz um aumento nos níveis de Hcy até 27 $\mu\text{mol/L}$; o pico aparece entre 4 a 8 horas após a sobrecarga. Este teste foi originalmente utilizado para

Homocisteína

Cisteína

Homocistina

Homocisteína-cisteína

Figura-2: Formas do Homocisteína presentes no sangue

detectar a deficiência do heterozigoto da cistationa β sintetase (CBS) (GRAHAM e cols., 1997). Apesar do teste ser mais sensível para a via de transsulfuração, a resposta pode ser anormal em indivíduos com defeitos na via de remetilação (CATTANEO,1999). 40% dos indivíduos que apresentam tHcy normal em jejum mostram elevação de Hcy no teste de sobrecarga de metionina.

1.3.6. Mecanismos Fisiopatológicos Implicados na Hiperhomocisteinemia

Apesar da grande quantidade de trabalhos epidemiológicos, mostrando dados que indicam uma relação entre hiperhomocisteinemia e aumento de risco cardiovascular, não há uma hipótese unificada para explicar o mecanismo molecular e celular, de como a Hcy influencia o desenvolvimento de DCV. Alguns eventos, como a lesão das células endoteliais, o aumento da adesão plaquetária, a ativação direta da cascata de coagulação maior deposição de LDL na parede arterial, têm sido emplicados na arterotrombogenicidade da hiperhomocisteinemia.

1.3.6.1. Alterações da Tromborresistência Vascular

O trabalho pioneiro de HARKER e cols. (1976) sugere que a início da alteração vascular, causada pela hiperhomocisteinemia, envolve a redução da sobrevida das plaquetas, associada à lesão das células endoteliais. Esta conclusão deve-se ao fato que lesões endoteliais causadas pela hiperhomocisteinemia, em animais, podem ser prevenidas pela terapia antiplaquetária com dipiridamol. No entanto, a sobrevida reduzida de plaquetas não foi confirmada em pacientes com homocistinúria. Outros trabalhos, *in vitro*,

sobre função anormal das plaquetas mostraram resultados controversos (MALINOW, 1994; STAMLER & SLIVKA, 1996).

Por outro lado, favorecendo a teoria do aumento da atividade plaquetária pela hiperhomocisteinemia, estudos *in vitro* propõem que, além da citotoxicidade direta da Hcy sobre células endoteliais (DUDMAN e cols., 1991; STARKEBAUM & HARLAN, 1986; WALL e cols., 1980) a Hcy alteraria propriedades antitrombóticas do endotélio (HARPEL e cols., 1996).

A prostaciclina (PGI₂) e óxido nítrico são dois fatores importantes no relaxamento vascular e na antiagregação plaquetária. Apesar de resultados controversos em relação à biossíntese de prostaciclina pelas células endoteliais incubadas com Hcy (GRAEBER e cols., 1982; PANGANAMALA e cols., 1986 e WANG e cols., 1993) postula-se que a Hcy estaria impedindo a habilidade das células endoteliais de inibir a agregação plaquetária, provavelmente pela redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (STAMLER e cols., 1993).

Adicionalmente ao exposto acima, a exposição de monócitos à Hcy induz a expressão do fator tecidual (KHAJURIA & HOUSTON, 2000). A exposição das células endoteliais à Hcy também aumenta a expressão do fator tecidual (FRYER e cols., 1993) além da ativação do fator V (RODGERS & CONN, 1990). UNDAS e cols. (2001) indicaram que a tendência pró-trombótica na hiperhomocisteinemia pode ser relacionada à inativação do fator Va pela ativação da proteína C, devido a uma modificação da cisteína livre do cofator na presença da Hcy. Todos os fatores descritos acima favorecem a formação do trombo pela iniciação e propagação da cascata de coagulação.

Além disso, a Hcy pode atuar sobre fatores anticoagulantes, como o sistema trombomodulina/proteína C e antitrombina III (LENTZ & SADLER, 1991,

1993). A ligação da antitrombina III à superfície das células endoteliais pode ser reduzida pela Hcy através da inibição da expressão de heparan-sulfato (NISHINAGA e cols., 1993).

Em relação ao processo de fibrinólise, a ação e ligação do ativador tecidual de plasminogênio (t-PA) na superfície celular do endotélio é prejudicado na presença de Hcy, inibindo a fibrinólise dependente do endotélio (HAJJAR, 1993).

A ligação dissulfeto entre a Hcy e o domínio rico em cisteína da anexina-II é responsável pela inibição da ligação do t-PA à anexina-II na superfície celular, prejudicando, conseqüentemente, a ativação do plasminogênio em plasmina e a degradação da fibrina, afetando o processo da fibrinólise (QI LING & HAJJAR, 2000; HAJJAR e cols., 1998). MIDORIKAWA e cols. (2000) por outro lado, mostram que Hcy aumenta a secreção e expressão do gene inibidor tipo-1 da ativação do plasminogênio das células endoteliais e células do músculo liso, além da alteração na secreção e expressão do RNAm para t-PA.

Em conjunto, os dados acima expostos sugerem que a hiperhomocisteinemia favorece a trombogênese. A fim de confirmar este estado pró-trombótico, estudos clínicos, realizados em pacientes com hiperhomocisteinemia, revelam elevação anormal dos níveis plasmáticos de alguns parâmetros homeostáticos tais como, do fator VIII e do inibidor tipo-1 da ativação do plasminogênio (FERYBURGER e cols., 1997) do fator von Willibrand (VAN DEN BERG e cols., 1995; CONSTANT e cols., 1999) da trombomodulina (VAN DEN BERG e cols., 1995) do fibrinogênio (VON ECKARDSTEIN e cols., 1994) e do complexo III trombina/antitrombina e da proteína C ativa (CATTANEO, 1999; CATTANEO e cols., 1998).

Dados mais encorajadores surgiram de experimentos *in vivo* que forneceram evidências que a hiperhomocisteinemia é responsável pela alteração da tromborresistência vascular. LENTZ (1997) e LENTZ e cols. (1996) demonstraram, na hiperhomocisteinemia experimental em primatas induzida por dieta sem ácido fólico, rica em metionina e sem colina, que a vasodilatação dependente do endotélio está diminuída na hiperhomocisteinemia. Lentz verificou, igualmente, que o aumento da vasoconstrição induzida por colágeno é, provavelmente, devida à redução na resposta vasodilatadora ao ADP gerado pelas plaquetas. A alteração do relaxamento vascular mediado pelo endotélio também foi observada em indivíduos saudáveis, portadores de hiperhomocisteinemia moderada (TAWAKOL e cols., 1997; WOO e cols., 1997).

A diminuição da ativação da proteína C dependente da trombomodulina em primatas com hiperhomocisteinemia, sugere que o aumento moderado nos níveis circulantes de Hcy altera propriedades antitrombóticas do endotélio (LENTZ e cols. 1996). Estudos recentes, tanto em animais de laboratório como em humanos, sugerem fortemente que a hiperhomocisteinemia prejudica a vasodilatação dependente do endotélio (BELLAMY e cols., 1999; CHAMBERS e cols., 1999a, 1999b; KANANI e cols., 1999; UNGVARI e cols., 1999; WOO e cols., 1999)

LENTZ e cols. (1997 e 2001) verificaram que a normalização dos níveis plasmáticos de Hcy, após 6 meses de administração de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆, foi insuficiente para restaurar a função vascular normal em macacos, mantidos por 17 meses com dieta hipercolesterolemica e hiperhomocisteinêmica. Entretanto, dois estudos controlados por placebo demonstraram que a suplementação, durante dois meses, com ácido fólico,

melhora a função endotelial em indivíduos com hiperhomocisteinemia, com diminuição nos níveis de Hcy (BELLAMY e cols., 1999; CHAMBERS e cols., 1999a, 1999b).

A administração conjunta de ácido fólico, vitaminas B₁₂ e B₆ melhora a função do endotélio, comprometida pela hiperhomocisteinemia induzida por sobrecarga de metionina em indivíduos saudáveis (CHAO e cols., 1999a). HOLVEN e cols. (2001) demonstraram que a Hcy tem o efeito aterogênico, em parte, por deprimir a função endotelial, através de mecanismo dependente de óxido nítrico e que este efeito pode ser revertido pela suplementação com ácido fólico.

Apoiando a hipótese do impacto da elevação moderada da Hcy plasmática e o estado de hipercoagulação, DURAND e cols. (1996b) demonstraram que a deficiência alimentar prolongada de ácido fólico em ratos induz estado pró-trombótico, caracterizado pela hiperatividade plaquetária. Adicionalmente, sugerem que os efeitos pró-trombóticos, causados pela deficiência do ácido fólico, depende do aumento da Hcy circulante.

Experimentos com sobrecarga de metionina, em animais controles e animais com deficiência de ácido fólico, indicam que a concentração plasmática de Hcy se correlaciona com a agregação plaquetária e com a biossíntese da tromboxano A₂, que é um potente pró-agregante, junto com a possibilidade de redução do efeito antiplaquetário do óxido nítrico (DURAND e cols., 1997a). Um aumento de tromboxano sintetase foi descrito em pacientes com homocistinúria (DI MINNO e cols., 1993) apoiando os achados acima descritos.

Os trabalhos descritos sugerem que a perda da função antitrombótica das células endoteliais, combinada com a indução do estado pró-coagulante, contribuem para as desordens vasculares relacionadas à

hiperhomocisteinemia moderada. Adicionalmente às citações acima mencionadas, NAPPO e cols. (1999) enfatizam que a elevação moderada de Hcy circulante, relacionada ao metabolismo prejudicado de Hcy (resultante da deficiência de ácido fólico ou excesso de metionina) pode acionar desordens vasculares originadas pelo espasmo vascular ou trombose.

1.3.6.2. Estresse Oxidativo Mediado pela Hiperhomocisteinemia

Numerosos estudos indicam que o estresse oxidativo tem uma função no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas oclusivas, como observado primeiramente em homozigotos com defeito de cistationa β sintetase (MCCULLY, 1983) e, depois, em hiperhomocisteinemia experimental.

O dano celular das células endoteliais expostas à Hcy pode ser prevenido com pré-tratamento das células com catalase, a qual permite a retirada do peróxido de hidrogênio que atravessa livremente a membrana celular (STARKEBAUM & HARLAN, 1986; WALL e cols., 1980). Entretanto esta citotoxicidade não é devida exclusivamente a Hcy. A lesão endotelial descrita também é observada na presença de cisteína (DUDMAN e cols., 1991). O aumento do estresse oxidativo pode ser o principal mecanismo na lesão das células endoteliais induzida pela Hcy (DUAN e cols, 2002).

Além da iniciação da lipoperoxidação na superfície da célula, a auto oxidação da Hcy, com traços de íons metálicos, leva à geração de espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, assim como de radicais tiila (MUNDAY, 1989; SCHONEICH e cols., 1989). Estas espécies podem oxidar diretamente a lipoproteína de baixa

densidade (LDL) (HEINECKE e cols., 1987; HIRANO e cols., 1994; WOOD & GRAHAM, 1995).

A Hcy pode contribuir, também, para modificações oxidativas da LDL, mediadas pelas células endoteliais, macrófagos e células do músculo liso, envolvidos na etapa inicial da aterogênese (HEINECKE e cols., 1987; SPARROW & OLSZEWSKI, 1993; WOOD & GRAHAM, 1995).

Assim, o aumento da Hcy circulante, devido a alterações de seu metabolismo, pode favorecer um aumento no estado pró-oxidante. Nessas condições, os íons metálicos são mantidos na forma reduzida, ideal para a reação de Fenton. Isso pode alterar o potencial de redox dos grupos tióis, intra e extracelulares (MANSOOR e cols. 1993a, 1994, 1995).

Diferente de outros tióis, a incubação das células endoteliais com Hcy induz o aumento da expressão da proteína de estresse GRP78 e reduz a expressão da glutathione peroxidase, importante enzima antioxidante intracelular, por um mecanismo que depende da alteração do potencial redox intracelular (KOKAME e cols., 1996; OUTINEN e cols., 1998). Assim a Hcy, além de aumentar a geração de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e outros peróxidos, reduz a habilidade da célula de remover os peróxidos, especialmente o peróxido de hidrogênio.

Com isso, KOKAME e cols. (1996) sugerem que alterações no estado redox intracelular, causadas por níveis elevados de Hcy, podem alterar a expressão de vários genes envolvidos em outras funções celulares específicas, podendo ser, parcialmente responsável, por desordens vasculares associadas à hiperhomocisteinemia moderada.

LANG e cols. (2000) apontam para uma inibição induzida pela Hcy no relaxamento dependente do endotélio, causada pelo aumento na produção endotelial de ânion superóxido. Os trabalhos de CHEN e cols., (2000) e UPCHURCH e cols. (1997) indicam que a Hcy inibe a glutathione peroxidase plasmática endotelial, prevenindo a retirada do peróxido de hidrogênio pela glutathione peroxidase, de maneira tal que a Hcy contribuiria, indiretamente, para a inativação do óxido nítrico por espécies reativas de oxigênio. De acordo com esta hipótese, a hiperhomocisteinemia moderada induz disfunção endotelial em camundongos heterozigotos para defeito da enzima CBS, que foi recentemente associada a um aumento de estresse oxidativo (EBERHARDT e cols., 2000).

Há forte evidências que o estresse oxidativo tem um papel importante na modificação da tromboresistência vascular, na hiperhomocisteinemia moderada. A disfunção endotelial, incluindo diminuição do relaxamento vascular dependente de células endoteliais, parece ser iniciada pela geração de espécies reativas durante a autooxidação da Hcy (LOSCALZO, 1996).

Além disso, níveis elevados de Hcy têm sido associados com aumento de oxidação dos lipídios e proteínas *in vivo*, em humanos, como foi sugerido pela correlação obtida entre níveis plasmáticos de Hcy e F₂-isoprostanos, um relevante biomarcador da peroxidação não-enzimática (VENTURA e cols., 2000; VOUTILAINEN e cols., 1999).

A hiperhomocisteinemia moderada, causada pela alteração no metabolismo de Hcy (seja pela deficiência de ácido fólico, deficiência de vitamina B₆ ou excesso de metionina) deve ter um efeito pró-oxidante primariamente resultante de uma alteração do potencial de redox intra e extracelular, afetando essencialmente as funções vasculares.

Apesar da Hcy, em baixas concentrações e na sua forma reduzida, agir como pró-oxidante, em altas concentrações, como outros tióis, apresenta atividade seqüestradora de radicais livres (MUNDAY, 1989). Este efeito ambivalente dos aminotióis (pró e antioxidante) confirmado *in vitro* na oxidação da LDL (HALVERSEN e cols., 1996) talvez explique as discrepâncias observadas entre a hiperhomocisteinemia severa e a moderada.

Contrastando com a elevação moderada de Hcy, um grande aumento na Hcy circulante leva à elevação plasmática da razão entre aminotióis reduzidos/totais e entre Hcy e cisteína, deslocando o equilíbrio para o estado antioxidante (ANDERSON e cols., 1995; BOURDON & BLACHE, 2001; UELAND e cols., 1996). Contudo, FERGUSON e cols. (1999) revelaram que a reação entre Hcy tiolactona e LDL gera um aduto de LDL mais resistente à oxidação do que a LDL nativa.

De fato, um mecanismo independente de estresse oxidativo deve estar envolvido na formação da lesão arteroesclerótica fibrosa, observada na hiperhomocisteinemia. Lesões vasculares descritas em estudos de homocistinúria devem ser resultantes do metabolismo oxidativo alternativo de Hcy a Hcy tiolactona (JACUBOWSKI, 1997 e 2000a). Este metabolismo, orientado para síntese de fosfoadenosina fosfossulfatos a partir de átomos de sulfato da Hcy tiolactona, deve levar à sulfatação excessiva de proteoaminoglicana da matriz extracelular, danificando a membrana basal da parede vascular e podendo, desta forma, contribuir ao seqüestro da LDL (MCCULLY, 1996; OLSZEWSKI & MCCULLY, 1993).

Apesar da ativação direta da metaloprotease-2 na matriz (BESCOND e cols., 1999) a lesão vascular deve resultar da alteração da estrutura

quaternária da proteína no tecido conjuntivo. De fato, um defeito na polimerização do colágeno foi demonstrado em pacientes com homocistinúria devido à hiperhomocisteinemia (LUBEC e cols., 1996).

WANG e cols. (1997) descreveram que níveis de Hcy entre 10 e 50µmol/L inibem, especificamente, o crescimento de células endoteliais. TASI e cols. (1994, 1996) descreveram que a Hcy é mitogênica para células musculares lisas em humanos e de ratos, pela indução da expressão da proteína ciclina A. Isto foi demonstrado em estudo *in vivo* no qual, a ingestão de Hcy por ratos estimula, de maneira dose dependente, a transcrição da quinase dependente de ciclina na aorta, necessária para a mitose e subsequente proliferação das células do músculo liso.

Como a cisteína não influencia a transcrição do gene da quinase dependente da ciclina, as alterações vasculares podem ser específicas para Hcy. TYAGI (1998) demonstrou que 10µmol/L de Hcy induz, em humanos, a proliferação das células de músculo liso vascular e a expressão de colágeno.

1.3.6.3. Papel Alternativo de Hipometilação

Uma explicação alternativa para doenças vasculares induzidas pela hiperhomocisteinemia é que níveis elevados de Hcy indicam uma ineficiência na metilação intracelular das reações essenciais, predispondo o organismo a doenças vasculares. Metilações intracelulares ineficientes levam à danificação crônica de inúmeras proteínas, que podem estar envolvidas na aterotrombogênese. Adicionalmente, níveis elevados de Hcy indicam biossíntese ineficiente de proteínas essenciais, causada por anormalidades no metabolismo de ácido fólico (DURAND e cols., 2001).

Alem disso, o envolvimento da hipometilação não pode ser descartado, pelo fato de estudos *in vitro* sugerirem que, baixas concentrações de Hcy inibem, especificamente, a regeneração das células endoteliais e ativam diretamente células dormentes da musculatura vascular, por um mecanismo envolvendo decréscimo de carboximetilação da p21^{ras} (LEE & WANG, 1999, WANG e cols.,1997)

Dados recentes sugerem que elevação crônica dos níveis de Hcy deve, indiretamente, reduzir a metilação do DNA, RNA, proteínas e fosfolipídios através de um concomitante aumento nos níveis de SAH, e que, este aumento é devido a inversão da reação da hidrólise de SAH que é mediada pela Hcy (YI e cols., 2000). Altos níveis de SAH estão efetivamente associados com diminuição de SAM, sendo que a razão SAM/SAH pode afetar negativamente o potencial da metilação celular (FU e cols.,2000; MELNYK e cols., 2000; YI e cols., 2000).

A ligação dissulfeto específica entre a Hcy e o grupo sulfidrila de uma proteína intracelular, pode constituir um outro mecanismo molecular para a disfunção endotelial induzida pela hiperhomocisteinemia. Junto com as proteínas do tecido conjuntivo, várias outras proteínas contêm domínios ricos em cisteína, como o fator de crescimento epidérmico, os quais podem ser sítios preferenciais de homocisteinização (KRUMDIECK & PRINCE, 2000).

Os dados expostos sugerem que a elevação de Hcy resulta em efeitos multifatoriais, interagindo com a estrutura da parede vascular e com o sistema de coagulação, com diferentes resultados, dependendo do tecido e do grau de hiperhomocisteinemia.

1.3.7. Tratamento Vitamínico da Hiperhomocisteinemia

A hiperhomocisteinemia pode ser reduzida significativamente, ou revertida, pelo tratamento de pacientes afetados com vitaminas, exceção feita aos defeitos severos de metionina sintetase ou da mutação termoestável de MTHFR. Nos últimos casos, a suplementação com betaina e/ou metionina deve ser realizada junto com a administração de ácido fólico ou 5-metilTHF (DURAND e cols., 2001).

Um grande número de estudos investiga o efeito benéfico da suplementação vitamínica sobre os níveis de Hcy (BRATTSTROM, 1996; QUINLIVAN e cols, 2002). Dados mostram que a suplementação com ácido fólico reduz a hiperhomocisteinemia em jejum e após a sobrecarga de metionina, incluindo os pacientes com defeitos congênitos parciais de CBS e MTHFR. Os dados indicam, também, que a suplementação com piridoxina só reduz a hiperhomocisteinemia, detectada após sobrecarga oral de metionina, em pacientes com deficiência de vitamina B₆ ou heterozigotos para deficiência de CBS. O tratamento com vitamina B₁₂ seria eficiente, somente, nos casos de deficiência da vitamina.

O papel principal do ácido fólico na redução de níveis plasmáticos de Hcy pode ser explicado pelo fato que o ácido fólico é consumido durante o processo, enquanto que as vitaminas B₆ e B₁₂ funcionam como cofatores (DURAND e cols., 1998a, 1998b).

O consumo de ácido fólico, assim como sua concentração plasmática, apresenta correlação negativa com níveis plasmáticos de Hcy, tanto em indivíduos doentes como em indivíduos sadios (UBBINK, 1994; LUSSIER-CACAN e cols., 1996). A suplementação com ácido fólico é o único tratamento

que efetivamente reduz os níveis plasmáticos de Hcy em indivíduos saudáveis (BARTTSTROM,1996). Além disso, em contraste com a deficiência de vitamina B₆, o aumento de risco aterosclerótico vascular associado à deficiência de ácido fólico é mediado pelo aumento de níveis plasmáticos de Hcy (ROBINSON e cols., 1998).

As doses terapêuticas ideais ainda não estão claramente definidas. Para o ácido fólico, doses de 5 a 10 mg/dia são atualmente utilizadas. Entretanto, alguns dados sugerem que a administração diária de doses menores do que 1mg podem ser adequadas para reverter a hiperhomocisteinemia (BOUSHEY e cols., 1995; BRATTSTROM e cols., 1998; DEN HEIJER e cols., 1998; RIMM e cols.,1998).

Um trabalho de fortificação de grãos, contendo 499 e 665µg de ácido fólico, diariamente, aumentou os níveis plasmáticos de ácido fólico em 64,8% e 105,7%, respectivamente, reduzindo os níveis plasmáticos de Hcy em 11% e 14%, respectivamente (MALINOW e cols.,1998). Por outro lado, a meta-análise de BOUSHEY e cols.(1995) indicou que a suplementação diária com ácido fólico, em doses de 400µg, pode induzir um decréscimo de 6µmol/L nos níveis plasmáticos de Hcy, prevenindo 28.000 mortes/ano de infarto de miocárdio.

Trabalhos recentes indicam que a terapia com ácido fólico, na dose diária de 0,5mg, é o menor nível efetivo para a redução dos níveis de Hcy, em jejum e após sobrecarga de metionina, em indivíduos com hiperhomocisteinemia (CLARKE & ARMITAGE, 2000; VAN DER GRIEND e cols., 2000). A terapia somente com vitamina B₆ não reduz os níveis de Hcy em jejum. Altas doses de vitamina B₆ (30 a 100mg/dia) são necessárias no tratamento de defeitos hereditários como do cistationina β sintetase ou a deficiência severa desta

vitamina. Finalmente, o tratamento com vitamina B₁₂ pode ser necessário somente em situações de deficiência desta vitamina, com doses de 0,4 a 2 mg/dia, dependendo da gravidade da deficiência.

Alguns estudos mostram que a suplementação com ácido fólico melhora a função endotelial em indivíduos com hiperhomocisteinemia (BELLAMY e cols., 1999; WOO e cols., 1999). Dados encorajadores de trabalhos recentes indicam o benefício da terapia de redução de Hcy na prevenção e correção das desordens vasculares, relacionadas a níveis elevados de Hcy. Como foi descrito acima, o tratamento conjunto com ácido fólico e piridoxina deve efetivamente contribuir para redução do risco de aterotrombose (DE JONG e cols., 1999; HACKMAN e cols., 2000; VERMEULEN e cols., 2000; YAP e cols., 2000).

Estudos coerentes e prospectivos, em indivíduos sadios, resultantes de investigações com intervenção controlada por placebo, duplo-cego e multicêntricos, são necessários para definir a eficiência das terapias na redução dos níveis de Hcy e a conseqüente diminuição das patologias associadas, na prevenção e correção das desordens em pacientes com artéria coronária oclusiva, de doenças cerebrovasculares e vasculares periféricas e da trombose relacionada à hiperhomocisteinemia.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1. Avaliar as correlações entre a injeção e os níveis plasmáticos de vitamina B₆, B₁₂ e ácido fólico.
2. Avaliar os níveis plasmáticos de Hcy em duas populações, Uma de residência urbana e outra rural, e sua correlação com níveis plasmáticos das vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico.
3. Verificar a prevalência de Hiperhomocisteinemia e dislipídemia, como fator de risco de doença cardiovascular, nas duas populações.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS PARA PESQUISA

Foram selecionados 171 voluntários saudáveis, sem nenhum problema cardiovascular caracterizado e de vida dentro dos padrões considerados normais.

A idade dos voluntários que participaram neste trabalho foi entre 30 e 60 anos, faixa de idade em que surgem os problemas cardiovasculares (www.saude.gov.br). Indivíduos acima de 70 anos foram excluídos por apresentarem 30% de aumento nos níveis de Hcy (BJORKERGERN & SVARDSUDD, 2001).

Dos 171 voluntários, 85 habitam a região urbana de São José dos Campos, SP, sendo que 28 dos voluntários são do sexo masculino e 57 do sexo feminino. Da região rural de Bragança Paulista, SP, vieram 86 voluntários, sendo 46 do sexo masculino e 39 do sexo feminino. Foi considerado indivíduo urbano aquele que vive na cidade, onde a maioria mora em apartamentos, tem um estilo de vida mais agitado, todos os alimentos têm que ser comprados e estão mais sujeitos a restaurantes do tipo “fast food”. O indivíduo rural é aquele que trabalha na lavoura com a plantação, geralmente vive em casa com horta, come comida caseira na maioria das vezes, tem horários para se alimentar e possui menos disponibilidade de restaurantes do tipo “fast food”.

Todos os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo1). O protocolo de estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco (sob nº, anexo II).

3.2. METODOLOGIA PARA ESTIMAR CONSUMO DIÁRIO DAS VITAMINAS

3.2.1. Inquérito Alimentar

O inquérito alimentar objetiva quantificar a ingestão de vitaminas que atuam como cofatores no metabolismo da homocisteína, permitindo correlacionar o aporte dietário dessas vitaminas, com os níveis de homocisteína no sangue. Considerando que vários fatores interferem com os níveis séricos de homocisteína, dentre as quais fatores genéticos e a disponibilidade de vitaminas do metabolismo da homocisteína. O conhecimento dos hábitos alimentares das populações rurais e urbanas permite correlacionar o consumo dessas vitaminas com os níveis séricos de homocisteína e o risco cardiovascular dessas populações.

3.2.1.1. O Inquérito Alimentar e Sua Aplicação

A montagem do inquérito inicial (anexo III) foi baseada nos alimentos consumidos pela população em geral, que contêm as vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico. A fonte utilizada na montagem deste inquérito foi a forma resumida da RDA (Recommended Dietary Allowances) como descrito por MARKS & MARKS (1996) BETTIN (1994) BLOCK (1982) BLOCK e cols. (1990) ECK & WILLET (1991) e ECK e cols. (1991).

Os resultados da aplicação piloto do inquérito inicial (anexo 3) a 12 indivíduos de residência urbana revelaram que alguns dos alimentos propostos no inquérito inicial eram pouco consumidos e/ou apresentavam baixos teores das vitaminas do metabolismo da homocisteína, como por exemplo, o agrião, evidenciando a necessidade de alteração do inquérito. Novo inquérito foi, então,

organizado, substituindo alguns alimentos por outros mais consumidos e/ou com maior teor de vitaminas, como por exemplo a substituição do agrião por alface.

Como a preservação das vitaminas nos alimentos depende do seu preparo, é de vital importância conhecer a forma de consumo, para que, posteriormente, possamos calcular a quantidade exata dessas vitaminas consumidas pelos indivíduos em estudo. Outro ponto crítico diz respeito à quantidade de alimento consumido, principalmente quando as pessoas argüidas são humildes (rurais ou mesmo urbanos) e habituadas a quantificar alimentos de forma peculiar e regional.

Embora a quantidade de alimentos consumidos e seus métodos de preparo sejam de extrema importância para o inquérito, um cuidado especial foi tomado quanto a não induzir o indivíduo em sua resposta; neste caso em que o inquérito perderia o seu valor como referência para quantificar o consumo das vitaminas. Foi também limitada o número de inquéritos (máximo de 5 por dia), e estabelecendo-se intervalos de meia hora entre os participantes para responder os inquéritos, evitando-se uma possível indução de resposta entre os voluntários, quanto aos seus hábitos alimentares.

Após ponderar sobre todos os pontos descritos acima, a versão revisada que chamamos de inquérito 2 (anexo IV) foi aplicada aos voluntários selecionados das regiões urbana e rural.

3.2.1.2. Cálculo das Vitaminas B₆ e B₁₂ e de Ácido Fólico

Os dados obtidos a partir dos inquéritos foram processados utilizando o Programa de Apoio à Nutrição (PAN) desenvolvido pelo Centro de Informática em Saúde (CIS) da UNIFESP-EPM. O cálculo das quantidades das

vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico consumidas semanalmente pelos participantes, foi realizado como se segue:

1. Utilizando-se o PAN, verificou-se a quantidade de vitaminas contida em 100g de cada alimento, conforme o modo de preparo (Por exemplo, 100g de frango, assado, cozido ou frito, contendo certa quantidade de vitamina B₆, B₁₂ e ácido fólico).
2. Em seguida, transformamos todas as medidas caseiras em gramas. Por exemplo, um copo de requeijão de leite corresponde a 250 g de leite. A transformação das medidas caseiras em gramas também foi feito com o auxílio do PAN.
3. Após a transformação de todas as medidas em gramas, calculou-se a quantidade total de cada alimento ingerido por semana pelo participante,
4. A partir da quantidade total de alimento ingerido, foi então calculada a quantidade de vitaminas consumida através de cada alimento utilizando os dados da etapa 1.
5. A soma da quantidade de vitaminas ingerida através de cada alimento foi somada, resulta no o total de vitaminas consumidas por semana.

Exemplo:

1. De acordo com PAN, cada 100 g de frango frito contem se 0,35µg de B₁₂, 0,39mg de B₆ e 9µg de ácido fólico.
2. Pelo inquérito alimentar, o participante rural #1 consome 2 pedaços (uma asa e uma coxa) de frango frito, 3 vezes por semana. O peso estipulado pelo PAN de uma asa é de 33 g e da coxa é 46 g, calculando totalizando 237gramas de frango frito por semana.

3. Corrigindo a quantidade de vitaminas contida no frango pela quantidade de frango consumido, temos que este participante ingere 0,816mg de vitamina B₆, 21,6µg de ácido fólico e 0,84µg de vitamina B₁₂ em seu consumo semanal de frango.
4. Somados aos valores obtidos de todos outros alimentos listados no inquérito alimentar deste participante, totalizando um consumo semanal de 1.62mg de vitamina B₆, 215,3µg de ácido fólico e 17,8µg de vitamina B₁₂.

3.3. METODOLOGIA PARA MEDIR NÍVEIS PLASMÁTICOS DAS VITAMINAS

3.3.1. Dosagem de Vitamina B₁₂

A cianocobalamina, ou vitamina B₁₂, tem larga distribuição na natureza e exerce importante papel no metabolismo animal. Nem os vegetais, nem os animais conseguem sintetizar a vitamina B₁₂, a qual é produzida apenas por certas bactérias. A maior fonte de vitamina B₁₂ são alimentos protéicos como carne, ovos e leite. A vitamina B₁₂ está envolvida no metabolismo da homocisteína, participando da transferência do grupo metil do tetrahidrofolato para homocisteína, formando metionina, evidenciando sua importância na dieta humana no que diz respeito à manutenção do metabolismo da homocisteína e à prevenção da hiperhomocisteinemia como fator de risco cardiovascular. Neste sentido, a reciclagem da homocisteína a metionina requer a vitamina B₁₂, como descrito por vários autores que relacionaram os baixos níveis plasmáticos das vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico com aumento da homocisteína (PANCHARUNITI, e cols. 1994; GUTHIKONDA & HAYNES, 1999; LANGMAN & COLE, 1999; EIKELBOOM, e cols. 1999; RAY e cols., 2000; CHAMBERS e cols., 2000;

CLARKE & ARMITAGE, 2000; SAW e cols., 2001; BJORKEGERN & SVARDSUDD, 2001; HERRMANN e cols., 2001; FOKKEMA e cols., 2001).

As amostras de sangue foram obtidas dos indivíduos em jejum, com sistema de coleta a vácuo (vacuntainer) em tubo seco e o soro obtido após retração do coágulo e centrifugação. O soro foi armazenado a -70°C até a sua utilização. Todas as etapas descritas foram conduzidas na ausência de luz, utilizando-se eppendorf escuro ou com proteção de papel alumínio, de forma a minimizar a degradação da vitamina.

A dosagem de vitamina B₁₂ foi conduzida pelo método de quimioluminescência direta, onde a vitamina B₁₂ das amostras compete com a vitamina B₁₂ marcada com éster de acridínio, em reagente Lite (vitamina B₁₂ marcada com éster de acridina em solução tamponada com azida sódica 0.1%, estabilizadores de proteína, e conservantes). O ensaio utiliza hidróxido de sódio e ditiotreitól, como agente liberador da vitamina B₁₂ ligada a proteínas endógenas, e cobalamida, para prevenir a religação da vitamina B₁₂ às proteínas. As leituras de quimioluminescência foram levadas a efeito em aparelho Chiron Diagnostics ACS:Centaur (Bayer). Os kits e o uso dos equipamentos necessários às dosagens foram cedidos como cortesia pela Análise Produtos e Serviços para Laboratórios Ltda.

3.3.2. Dosagem de Vitamina B₆ e Ácido Fólico

A vitamina B₆ funciona como coenzima essencial para mais de 50 reações envolvendo o metabolismo de proteínas e síntese, transformação e degradação de aminoácidos, além de contribuir para síntese de neurotransmissores e produtos aminados, como a histamina. Pelo fato da vitamina B₆ contribuir para uma variedade diferente de reações, sua deficiência

resulta em várias alterações patológicas, como problemas motores, anemia e depressão, entre outras, além da hiperhomocisteinemia e aumento do risco de doença cardiovascular (SELHUB e cols., 1993; SAW e cols., 2001; KOEHLERE e cols., 2001).

O ácido fólico atua como cofator de várias reações do metabolismo intermediário e do processo de depressão (ALPERT & FAVA, 1997), além de estar envolvido no metabolismo da homocisteína. O nível de ácido fólico, medido tanto como consumo da dieta ou diretamente do soro, é inversamente associado ao risco de doenças cardiovasculares (BERG & BOERS, 1996; LORIA e cols., 2000; O'LEARY & SHEEHY, 2001; WALD e cols., 2001; KOEHLERET e cols., 2001; CHAMBERS e cols., 2000; CLARKE & ARMITAGE, 2000; SAW e cols., 2001; BJORKEGERN & SVARDSUDD, 2001).

A quantificação da vitamina B₆ e do ácido fólico foi realizada utilizando técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência. Inicialmente, para dosagem de vitamina B₆, seguimos a metodologia descrita por SHARMA E DAKSHINAMURTI (1992) e a proposta inicial para dosagem de ácido fólico era a utilização do método descrito por BELZ e cols. (1994) e KELLY e cols. (1996). Contudo, verificando os trabalhos de GREGORY III e cols. (1994), TELLINGEN & SIPS. (1992), VAHTERISTO e cols. (1997) e VAHTERISTO e cols. (1997), chegamos à conclusão que poderíamos utilizar o mesmo processo de extração e fase cromatográfica para quantificação das duas vitaminas simultaneamente.

As amostras de sangue foram obtidas dos indivíduos em jejum, com sistema de coleta a vácuo (vacuntainer) em tubo heparinizado, foram imediatamente centrifugadas e o plasma obtido foi armazenado a -70°C até a sua utilização. Tanto as amostras como as soluções padrão de ácido fólico (0,5mg/dL)

e de vitamina B₆ (0,5mg/dL) foram submetidas ao processo de extração: 300µL ácido metafosfórico 10% e 100µL de plasma (ou padrão) foram mantidos sob agitação por 30 segundos e centrifugados por 20 minutos a -4°C com 10000rpm. O extrato foi filtrado em sistema eppendorf com filtro (20µ) ("Castor spin-XTM centrifuge filter unit") antes de serem injetados no sistema.

Todas as etapas da extração foram conduzidas em ambiente escuro, utilizando-se tubos eppendorf escuros ou protegidos com papel alumínio, de maneira a minimizar a degradação das vitaminas. Como descrito na literatura, apesar da vitamina B₆ ser estável em meio ácido, SAMPSON O'CONNER (1989) verificou que o padrão de vitamina B₆ em meio ácido metafosfórico 5%, a 4°C, sofre degradação de 0,09%/h durante as primeiras 40 horas e, a seguir, permanece estável por 233 horas. Soluções de padrão de vitamina B₆ e ácido fólico, assim como amostras extraídas, foram mantidas a - 4°C até o momento de injetar no HPLC.

O processo cromatográfico foi conduzido utilizando-se detector UV – visível (UV-100) e bomba modelo P100 isocrática da Thermo Separation Products, com injetor modelo Rheodyne modelo 7725 acoplado a coluna C₁₈ µbondapack da Waters. A coluna foi estabilizada com fase móvel, contendo 18% de acetonitrila e 0,2% de ácido metafosfórico, em água milliQ. A separação e identificação das vitaminas foram conduzidas na fase descrita, com fluxo de 1mL/minuto; o tempo de retenção foi de 2,93 e 4,09 minutos para a vitamina B₆ e o ácido fólico respectivamente.

O perfil cromatográfico dos padrões da vitamina B₆ e ácido fólico na concentração de 1mg/dL separadamente e o perfil cromatográfico da mistura de partes iguais de vitamina B₆ e ácido fólico se encontram, respectivamente, na

figura 3 (a, b e c) . A concentração plasmática das vitaminas foi calculada em relação aos padrões de vitamina B₆ (1mg/dL) e ácido fólico (1mg/dL).

3.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA

A determinação da homocisteína foi introduzida nos laboratórios de diagnóstico clínico em 1962, quando o primeiro paciente com erro genético para homocistinúria foi descrito. O progresso nas pesquisas envolvendo a homocisteína nos últimos anos tem facilitado a introdução de técnicas mais aperfeiçoadas para a medida de Hcy no plasma e soro (ARAKI e SAKO, 1987; UBBINK e cols., 1991; VESTER e cols., 1991; CORNWELL e cols., 1993; JACOBSON e cols., 1994). Estes métodos medem tHcy, que é a soma da Hcy livre e da ligada a proteínas. A principal vantagem destes métodos é que as amostras guardadas podem ser analisadas sem que ocorra alteração na tHcy, mesmo quando as mesmas são congeladas e guardadas por alguns anos (UELAND, 1993; CANDITO e cols., 1997; PERRY, 1999; GRIEND e cols., 2000).

Figura 3- Perfis cromatograficos de soluções padrões de vitaminas B6 1mg/dL (1a), ácido fólico 1mg/dL (1b) e da mistura de partes iguais destas soluções (1c).

3.4.1. Obtenção da Amostra

As amostras de sangue, foram obtidas dos indivíduos em jejum, com sistema de coleta a vácuo (vacuntainer) em tubo heparinizado, centrifugadas imediatamente após e o plasma obtido, armazenado a -70°C até sua utilização. A condição de jejum foi estabelecida uma vez que os estudos sobre a influência do consumo de alimentos sobre os níveis de Hcy são escassos e contêm dados conflitantes. As alterações na Hcy plasmática, induzidas experimentalmente pela dieta em indivíduos saudáveis, variam em um aumento de 8 a 14% (UBBINK e cols., 1992). GRIEND e cols. (2000) investigaram alterações fisiológicas de Hcy em indivíduos saudáveis, com idade média de 33 anos, utilizando amostras de sangue coletadas às 8:00, 11:00, 15:00 e 20:00h, por dois dias consecutivos. Durante estas coletas, os indivíduos não tinham restrição de dieta ou atividades. O valor médio encontrado para Hcy foi de $11,7 \pm 2,2 \mu\text{mol/L}$, com um coeficiente de variação de 19%. BERG e cols. (1999) e GARG e cols. (1997) revelam que a variabilidade interindividual entre tempo e Hcy no jejum vai de 7 a 25%.

A coleta e o processamento das amostras de sangue são etapas críticas na determinação da Hcy. A amostra coletada foi sempre rapidamente centrifugada e o plasma separado dos elementos figurados. A rapidez neste processo é necessária já que a Hcy no plasma pode ser aumentada pela liberação de Hcy dos eritrócitos, que ocorre dependendo do tempo e da temperatura. Os valores de tHcy obtidos do soro sanguíneo, separado a 4°C imediatamente após a coleta, são iguais aos obtidos de amostras coletadas e guardadas por até uma hora, a 4°C, antes da separação. Porém, após um tempo prolongado de incubação a 4°C, de 4 a 24 horas antes da separação, a Hcy aumenta de 61% a 175%, respectivamente; uma média de aumento 15 a 20% por

hora é obtida à temperatura ambiente. Uma vez que o sangue é separado dos eritrócitos, concentrações da Hcy no plasma são estáveis pelo menos até 4 dias a temperatura ambiente, 2 semanas a 0-2°C e vários anos a -20°C (ANDERSON e cols., 1992; UELAND e cols., 1993; MALINOW e cols., 1994; NYGARD e cols., 1999).

3.4.2. Técnica da Dosagem da Homocisteína

Apesar de existirem vários métodos, a dosagem de Hcy por HPLC baseada na derivatização com reagente fluorogênico tiol-específico, o SBD-F (ammonium 7-fluorobenzo-2oxa-1,3 diazole-4-sulfonato), tem sido a mais utilizada. Este método foi primeiramente introduzido por ARAKI e SAKO (1987) que utilizaram tri-n-butilfosfina como agente redutor de tiol e como desacoplador das proteínas. UBBINK (1991), melhorou a técnica, mudando a fase móvel de gradiente de eluição para condições isocráticas. Mais tarde, VESTER e RASMUSSEN (1991) usaram um padrão interno de mercaptopropionil-glicina, que alterou o tempo de análise para 25 min. Este padrão interno foi trocado por N-acetilcisteína, que permitiu a separação rápida (12 min) por DURAND e cols. (1996). Este método foi ainda melhorado com a introdução de um novo agente redutor, a tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP) por GILFIX, em 1997.

Utilizamos a técnica de HPLC com detecção de fluorescência, como descrito por PFEIFFER e cols. (1999) que combina todos fatores desejáveis: a) estabilidade, eficiência e a presença de um agente redutor não tóxico; b) incorporação de padrão interno apropriado; c) rápida separação isocrática do tiol de interesse, usando fase móvel de pH 5,5. O método pode ser usado com

plasma, soro ou outros fluidos biológicos. As principais etapas do processo estão descritos a seguir:

1. **Etapas de Redução:** 50 μ L de plasma heparinizado, de doadores em jejum, foram transferidos para tubo eppendorf e acrescidos de 25 μ L de tampão PBS ("tampão fosfato salino" em pH 7,4), 25 μ L de padrão interno (cistamina 40 μ M/L) e 10 μ L de TCEP (tris2-carboxietil fosfina 10%). O material foi homogeneizado em vórtex por 30 segundos e incubado a temperatura ambiente por 30 minutos.
2. **Etapas de Precipitação:** Em seqüência à etapa de redução, foi adicionado ao mesmo eppendorf, 100 μ L de TCA 10% contendo 1mM de EDTA. O conteúdo do eppendorf foi homogenizado em vórtex por 30 segundos e centrifugado por 10 minutos a 13.000 g.
3. **Etapas de Derivatização:** 50 μ L do sobrenadante da etapa de precipitação foram transferidos para um eppendorf âmbar e acrescidos de 10 μ L de NaOH 1,55M, 125 μ L de tampão borato 0,125M, pH 9,5, contendo EDTA sódico 4mM e 50 μ L de SBD-F (amônia 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonato) 0,4%, diluído em tampão borato pH 9,5. O conteúdo foi homogeneizado em vórtex por 30 segundos e incubado por 60 minutos a 60°C.
4. 10 μ L da etapa de derivatização foi cromatografada em HPLC. A homocisteína foi eluída com tampão ácido acético/acetato 0,1M, pH 5,5, contendo 3% de metanol, com fluxo de 0,7mL/minuto. A homocisteína foi determinada utilizando um detector de fluorescência com λ de excitação = 385 nm e de emissão=515 nm. As dosagens foram conduzidas em Sistema Shimadzu Modelo FIL-10A dvp, com bomba e detector RF-10AXL,

utilizando coluna Prodigy ODS2 de 150 x 3,2mm com micropartículas de 5 μ m (Phenimenex) e pré-coluna Adsorbosphere C₁₈ de 7,5 x 4,6mm, com micropartículas de 5 μ m de Alltech. Dentro das condições cromatográficas descritas, o tempo de retenção de homocisteína é de 3,62 minutos. O perfil cromatográfico da homocisteína da amostra se encontra na figura 4.

5. Para o cálculo da concentração da homocisteína, foi utilizada curva de calibração com concentrações crescentes e conhecidas de homocisteína: 3,125 μ M, 6,25 μ M, 12,5 μ M, 25,0 μ M e 50,0 μ M e com o padrão interno cistamina, na concentração constante de 10 μ M.

Figura 4- Perfil cromatografico da homocisteína na amostra.

3.5. METODOLOGIA PARA AVALIAR NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS LIPÍDEOS

3.5.1. Dosagem de Triglicerídios

A concentração dos triglicerídios é influenciada por hábitos dietéticos. A determinação dos triglicerídios fornece um dado importante e necessário para a classificação das dislipidemias. É também de importância íntima correlação que se observa entre a hipertrigliceridemia e o aumento de risco de doença coronariana.

As amostras de sangue foram coletadas com sistema de coleta a vácuo em tubo seco (vacutainer) e o soro foi obtido após a centrifugação do sangue coagulado. O soro então foi armazenado a -70°C até a sua utilização.

Utilizou-se um sistema enzimático para a determinação dos triglicerídios com reação de ponto final. As reações envolvidos no método são:

A quinonimina produzida na reação catalizada pela peroxidase tem máximo de absorbância em 540nm. A intensidade da cor violeta resultante é diretamente proporcional à concentração dos triglicerídios na amostra. As

dosagens foram realizadas empregando kits da LABTEST Diagnóstica (Triglicérides GPO-ANA) e as leituras, em espectrofotômetro Beckman DU 640.

3.5.2. Dosagem de Colesterol Total

As amostras de sangue foram coletadas utilizando um sistema de coleta a vácuo em tubo seco (vacutainer) e o soro foi obtido após a centrifugação do sangue coagulado. O soro foi armazenado a -70°C até a sua utilização.

Utilizou-se um ensaio enzimático para determinação do colesterol com reação de ponto final, conforme o esquema abaixo:

A antipirilquinonimina produzida na reação catalizada pela peroxidase tem máximo de absorbância em 500nm. A intensidade de cor vermelha resultante da reação final é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra. As dosagens foram realizadas utilizando kits da LABTEST Diagnóstica (Colesterol COD-ANA) e as leituras em espectrofotômetro Beckman DU 640.

3.5.3. Dosagem de HDL Colesterol

As amostras de sangue foram coletados utilizando-se o sistema de coleta a vácuo seco (vacutainer) e o soro foi obtido após a centrifugação do sangue coagulado. O soro foi armazenado a -70°C até a sua utilização. A dosagem foi realizada utilizando um sistema que precipita seletivamente as lipoproteínas LDL e VLDL, com determinação do colesterol HDL no sobrenadante, através de reação de ponto final. As lipoproteínas LDL e VLDL foram quantitativamente precipitadas com ácido fosfotúngstico 1,5mmol/L e cloreto de magnésio 54mmol/L; após a centrifugação, o colesterol HDL foi determinado no sobrenadante utilizando o sistema enzimático para colesterol descrito no item 3.5.2. As dosagem foram realizadas empregando kits da LABTEST Diagnóstica (Colesterol HDL) e (Colesterol COD-ANA) e as leituras realizadas em espectrofotômetro Beckman DU 640.

3.5.4. Cálculos da concentração de VLDL e LDL

O cálculo dos valores de LDL e VLDL no soro dos voluntários rurais e urbanos foi realizado utilizando a equação de Friedewald:

- $\text{VLDL Colesterol} = \text{Triglicerídios} / 5$
- $\text{LDL Colesterol} = \text{Colesterol total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$

3.6. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS

Para examinar a diferença entre as médias dos valores de vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico alimentar e plasmático, bem como a dos níveis plasmáticos da Hcy, TG, colesterol total, LDL, VLDL e HDL, das duas populações urbana e rural foi utilizado o teste t de student para amostras não pareadas.

A correlação entre quaisquer duas variáveis foi computada através de: Correlação de Pearson. Quando a correlação encontrada era significativa ($\rho \leq 0.05$) realizou-se uma análise de regressão uni-multivariada. Toda a análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS(Statistical Package for Social Sciences) 8,0.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. INGESTÃO VITAMÍNICA

A média dos valores individuais, o desvio padrão (DP), o erro padrão da média (EPM) e os valores de *p* obtidos na comparação entre as duas populações das vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico, ingeridos pelas duas populações urbana e rural, estão apresentados no anexo V. Pode-se observar nesta tabela que há diferença significativa no consumo de vitaminas B₆ e ácido fólico entre as duas populações.

A figura 5 mostra a ingestão medida das vitaminas B₆ e B₁₂ e ácido fólico pelas duas populações e os respectivos valores da RDA. As duas populações ingerem quantidades da vitamina B₁₂ de acordo com a recomendada, o mesmo não ocorrendo com a ingestão de ácido fólico, que se encontra bem abaixo do RDA em ambas as populações. Em relação à vitamina B₆, a ingestão da mesma pela população urbana observa o RDA, o que não ocorre com a população da zona rural. Quando os dois grupos populacionais são comparados entre si, observamos que a ingestão de vitamina B₆ e ácido fólico são significativamente mais baixos na população rural que na urbana (figura 4 b e c).

Figura 5. Ingestão diária das vitaminas B₆(a), B₁₂ (b) e ácido fólico (c), na população da zona U (urbana) e R (rural) e os respectivos valores da RDA.

4.2. PARÂMETROS PLASMÁTICOS E SÉRICOS

Os níveis plasmáticos médios das vitaminas B₆ e B₁₂, ácido fólico, Hcy, assim como os valores séricos de TG, colesterol total, VLDL, LDL e HDL encontrados na população rural e urbana estão apresentados no anexo VI. A população urbana apresenta níveis de vitamina B₆ e ácido fólico maiores e estatisticamente significativos que a população rural (figura 6 a e b). O mesmo não ocorre em relação a vitamina B₁₂, que é igual nas duas populações (figura 6 c).

Por outro lado, os valores de Hcy encontrados na população urbana são menores que os da população rural ($p < 0.002$) (figura 7). Os níveis de Hcy no sexo masculino e feminino da população total (urbana e rural) mostra que o sexo masculino apresenta níveis maiores que o sexo feminino ($p < 0.005$) (figura 7a). Não há diferença significativa no níveis de Hcy entre homens urbanos e rurais ($p = 0.12$) (figura 7b), mas a diferença entre as duas populações pode ser observada para o sexo feminino ($p = 0.027$) (figura 7c). Os níveis plasmáticos de Hcy dos sexos feminino e masculino se encontram no anexo VII. Quanto a idade, os voluntários foram agrupados em: voluntários com idade de 30 a 40 anos, 41 a 50 anos e 51 a 60 anos. Não foi verificada nenhuma diferença significativa nos níveis de Hcy nestes três grupos de idade.

O perfil lipídico das duas populações são bastante diferentes. Os níveis de TG são mais altos na população rural que na urbana ($p < 0.000$) (figura 8a) e de colesterol total apresenta um perfil inverso, mais alto na população urbana que na rural ($p < 0.000$) (figura 8b). Diferenças estatisticamente significativas são encontradas também para os níveis de LDL (maior na população

urbana; $p < 0.000$) e VLDL (maior na população rural; $p = 0.000$) (figura 8 c,d). os níveis de HDL é igual nas duas populações (figura 8 e).

Figura 6. Médias dos níveis plasmáticos das vitaminas B₆(a) e B₁₂ (b) e ácido fólico (c), nas populações das zonas urbana (U) e rural (R).

Figura 7. Níveis plasmáticos de homocisteína nas duas populações, urbana (U) e rural (R).

Figura 7a. Níveis plasmáticos de homocisteína no sexo masculino (M) e feminino (F) da população total (urbana e rural).

Figura 7b. Níveis plasmáticos de homocisteína no sexo masculino das duas populações, urbana (U) e rural (R).

Figura 7c. Níveis plasmáticos de homocisteína no sexo feminino das duas populações, urbana (U) e rural (R).

Figura 8. Níveis séricos dos lipídios TG (a), colesterol total (b), VLDL (c), LDL(d) e HDL(e) nas populações das regiões urbana (U) e rural (R).

4.3 CORRELAÇÃO ENTRE A INGESTÃO E OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DAS VITAMINAS

O coeficiente de correlação de Pearson, assim como os níveis de significância, obtidos entre quantidade de vitaminas ingeridas e seus níveis

plasmáticos estão apresentados na tabela 2. Não foram observados correlações significativas entre os parâmetros mencionados.

Tabela 2. Correlação entre a ingestão e os níveis plasmáticos das vitaminas na população urbana (n=85), rural (n=86) e população total (n=171).

Parâmetros estudados		Urbano	Rural	Total
Vitamina B ₆	r	0.024	0.024	0.102
	p	0.831	0.883	0.189
Vitamina B ₁₂	r	0.167	0.058	0.103
	p	0.320	0.593	0.183
Acido fólico	r	0.151	0.058	0.001
	p	0.206	0.629	0.376

4.4. CORRELAÇÕES ENTRE OS NÍVEIS VITAMINAS, HCY E LIPÍDIOS

O coeficiente de correlação de Pearson, obtido entre Hcy e todos os parâmetros plasmáticos (vitamina B₆ e ácido fólico) e séricos (vitamina B₁₂, TG, colesterol total, VLDL, LDL e HDL) juntamente com o nível de significância p, estão descritos nas tabelas 3 e 4, para populações urbana (U) e rural (R), respectivamente. A tabela 5 contém os coeficientes de correlação de Pearson das duas populações (U e R) juntas, com uma totalidade de 171 indivíduos, sendo 85 da zona U e 86 da zona R.

A população urbana, rural e totalidade de indivíduos apresentam uma correlação negativa estatisticamente significativa para a vitamina B₁₂ e ácido fólico ($p=0.000$). Por outro lado, observa-se uma correlação positiva ($p=0.000$) para vitamina B₆. Em relação ao perfil lipídico não foi encontrada nenhuma correlação estatisticamente significativa com os parâmetros estudados

Tabela 3. Correlação entre os níveis plasmáticos das vitaminas B₆ e folato, bem como níveis séricos de B₁₂, TG, colesterol, VLDL, LDL e HDL, com os níveis plasmáticos de homocisteína na população urbana. (Número de indivíduos = 85)

Constituintes Plasmáticos		Hcy no Plasma
		Pearson
B ₆	r	0,411
	p	0,000
B ₁₂	r	-0,437
	p	0,000
Folato	r	-0,375
	p	0,001
Triglicerídios	r	0,047
	p	0,668
Colesterol	r	-0,017
	p	0,877
HDL	r	-0,127
	p	0,247
LDL	r	0,028
	p	0,869
VLDL	r	0,047
	p	0,668

Tabela 4. Correlação entre os níveis das vitaminas plasmáticas B₆ e folato, níveis séricos de B₁₂, TG, colesterol, VLDL, LDL e HDL com os níveis plasmáticos de homocisteína na população rural. (Número de indivíduos = 86)

Constituintes plasmáticos		Hcy no Plasma
		Pearson
B ₆	r	0,230
	p	0,033
B ₁₂	r	-0,319
	p	0,003
Folato	r	-0,343
	p	0,005
Triglicerídeos	r	0,111
	p	0,311
Colesterol	r	0,032
	p	0,772
HDL	r	-0,116
	p	0,286
LDL	r	0,063
	p	0,566
VLDL	r	0,111
	p	0,311

Tabela 5. Correlação de Pearson entre os níveis das vitaminas plasmáticas B₆ e folato, bem como níveis séricos de B₁₂, TG, colesterol, VLDL, LDL e HDL, com os níveis plasmáticos de homocisteína na população total (171 indivíduos)

Constituintes Plasmáticos		Hcy no Plasma
		Pearson
B ₆	r	0,203
	p	0,008
Fólico	r	-0,287
	p	0,000
B ₁₂	r	-0,301
	p	0,000
Triglicerídeos	r	0,159
	p	0,038
Colesterol	r	-0,053
	p	0,488
HDL	r	-0,131
	p	0,047
LDL	r	-0,041
	p	0,590
VLDL	r	0,159
	p	0,038

Uma vez encontradas correlações entre os níveis de Hcy e os das vitaminas estudados, busca-se entender qual o tipo de correlação.

Nos estudos de regressão univariável, a Hcy foi utilizada como fator dependente e as vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico, como variáveis independentes. Também foi realizada a regressão multivariável para estudar o efeito de todas as

vitaminas como fatores independentes e da Hcy como fator dependente. Os resultados da regressão univariável estão nas tabelas 6, 7 e 8, para as populações U, R e população total (U e R), respectivamente.

Tabela 6. Coeficiente de regressão univariável, tendo homocisteína como a variável dependente para o grupo de dados de indivíduos urbanos.

Variável Independente	Coeficientes		r ²
	p		
Constante	5,732	0,002	0,169
B ₆	0,224	0,000	
Constante	22,625	0,000	0,1910
B ₁₂	-0,048	0,000	
Constante	18,156	0,000	0,140
Ácido Fólico	-0,213	0,001	

Tabela 7. Coeficiente de regressão univariável, tendo homocisteína como a variável dependente para o grupo de dados de indivíduos rurais.

Variável Independente	Coeficientes		r²
	p		
Constante	10,032	0,002	0,0530
B₆	0,249	0,033	
Constante	24,160	0,000	0,102
B₁₂	-0,03	0,003	
Constante	24,765	0,000	0,120
Ácido Fólico	-0,317	0,001	

Tabela 8. Coeficientes de regressão univariável tendo homocisteína como a variável dependente do conjunto total de dados.

Variável Independente	Coeficientes		r ²
	p		
Constante	10	0,0000	0,041
B ₆	0,162	0,0080	
Constante	21,730	0,0000	0,090
B ₁₂	-0,038	0,0000	
Constante	20.989	0,0000	0,082
Ácido Fólico	-0,248	0,000	

As tabelas 6, 7 e 8 mostram que os níveis das vitaminas B₆ , B₁₂ e de ácido fólico influenciam linearmente os níveis de Hcy, tanto quanto se estudamos duas populações urbana e rural isoladamente ou na sua totalidade.

As tabelas 9, 10 e 11 mostram os dados da regressão multivariável tendo os níveis de Hcy como fator dependente e os das vitaminas como fatores independentes, para a população urbana, para a rural e para total de indivíduos estudados.

Os níveis de vitaminas B₆ , B₁₂ e de ácido fólico em conjunto são responsáveis por 31% da variabilidade dos níveis de Hcy, tanto na população urbana (tabela 9) quanto na rural (tabela 10). Quando se considera a população inteira o percentual de variabilidade nos níveis de Hcy, influenciada pelas vitaminas, diminui a 18%, sendo, ainda assim significativo (tabela 11).

Tabela 9. Regressão multivariável de homocisteína para o conjunto de dados de indivíduos urbanos.

	Coeficientes	P	r²
Constante	15,141	0,0000	0,317
B ₆	0,178	0,0010	
B ₁₂	-0,0243	0,0000	
Folato	-0,0691	0,0452	

Tabela 10. Regressão multivariável de homocisteína para o conjunto de dados de indivíduos rurais.

	Coeficientes	P	r²
Constantes	19,068	0,0000	0,310
B ₆	0,234	0,168	
B ₁₂	-0,019	0,014	
Folato	-0,289	0,029	

Tabela 11. Regressão multivariável de homocisteína para o conjunto total de dados.

	Coeficientes	P	r ²
Constantes	18,099	0,000	0,183
B ₆	0,158	0,010	
B ₁₂	-0,018	0,000	
Folato	-0,219	0,030	

4.5. DISTRIBUIÇÃO DOS FATORES DE RISCO ENTRE AS DUAS SUB-POPULAÇÕES ESTUDADAS

Considerando o fato que a Hcy é considerado como fator de risco independente para DCV, assim como a LDL-colesterol, procurou-se identificar entre os dois grupos populacionais a prevalência de um deles. Ambos grupos foram divididos conforme o quadro 2.

Quadro 2. Critérios para divisão dos grupos populacionais

1. Homocisteína < 14µmol/L e LDL < 130mg/dL (3,38mmol/L)
2. Homocisteína < 14µmol/L e LDL > 130mg/dL (3,38mmol/L)
3. Homocisteína > 14µmol/L e LDL < 130mg/dL (3,38mmol/L)
4. Homocisteína > 14 µmol/L e LDL > 130mg/dL (3,38mmol/L)

1. Nenhum fator de risco
2. Um fator de risco: LDL
3. Um fator de risco: Homocisteína
4. Dois fatores de risco: LDL e Homocisteína

Figura 9. Distribuição dos fatores de risco nas populações estudada

A figura 9 mostra que o fator de risco prevalecente na população urbana é o nível de LDL. Já na população rural maior porcentagem de população apresenta Hcy como fator de risco para a doença cardiovascular.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1. RISCO DE DOENÇA CARDIOVASCULAR E A INFLUENCIA DE METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA

O risco de DCV está relacionado a um grande número de fatores, dentre os quais as dislipidemias (HOEG, 1997 e CASTELLI, 1996). Neste sentido, existem fortes evidências que apontam para os níveis elevados de Hcy como um fator independente de risco cardiovascular (STAMPFER e cols., 1992), estando associado não apenas ao infarto do miocárdio, mas também ao acidente vascular cerebral e às doenças vasculares periféricas (WELCH & LOSCALZO, 1998 e GRAHAM e cols., 1992).

Vários fatores influenciam o metabolismo da Hcy, dentre os quais o hábito alimentar, onde o consumo reduzido de vitaminas B₆, B₁₂ e de ácido fólico interfere no processo de remetilação e transsulfuração da Hcy. SELHUB e cols. (1993) estudaram, em 1160 indivíduos do Framingham Heart Study, com idade entre 67 e 96 anos, o consumo diário das vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico, utilizando inquérito alimentar, e constataram uma correlação inversa entre o consumo das vitaminas e os níveis de Hcy. O estudo também deixou evidente que a relação entre o consumo de vitaminas e os níveis plasmáticos de Hcy não é linear.

GENEST (1993) estudou 584 Canadenses de origem francesa, de ambos os sexos, com idade média de 38 anos, constatando a existência de níveis elevados de Hcy nos indivíduos com menor consumo das vitaminas B₆, B₁₂ e, em especial, de ácido fólico.

Vários autores sugerem que os níveis plasmáticos de Hcy são modulados pela dieta, principalmente pelo consumo das vitaminas envolvidas no

metabolismo de Hcy. Em 1999, EIKELBOOM e cols. fizeram uma revisão dos estudos epidemiológicos associando os níveis de Hcy e o risco de DCV, e constataram que os níveis plasmáticos moderadamente elevados de Hcy são prevalentes na população em geral, estando, também, associados ao consumo diário das vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico.

O consumo dessas vitaminas está intimamente relacionado aos hábitos alimentares, os quais variam em função da região, educação, nível social e outros. Neste sentido, o nosso trabalho objetivou estudar o consumo das vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico em indivíduos de residência urbanos (U) e rural (R) a quantidade por eles ingerida das vitaminas, seus níveis plasmáticos, assim como os níveis séricos de Hcy e lipídeos e a correlação entre estes parâmetros.

Analisando os dados do inquérito alimentar, apresentados no anexo V e na figura 4, verificamos que a ingestão de vitaminas B₆ e ácido fólico é significativamente maior na população urbana que a na população rural. Vitamina B₆: $p=0,0001$ e ácido fólico: $p=0,0054$. Quanto à ingestão de vitamina B₁₂, não há diferença significativa entre as duas populações estudadas (figura 5).

Neste sentido, BROEKMANS e cols. (2000) submeteram 47 voluntários, entre homens e mulheres, a duas dietas distintas, uma delas contendo 500g/dia de frutas e verduras e a outra, 100g/dia de frutas e verduras, equivalendo a uma quantidade de ácido fólico de 228,1µg e 131,1µg, respectivamente. Realizada a análise dos níveis de Hcy plasmática, os autores verificaram que o grupo que consumiu maior quantidade de frutas e verduras apresentava 11% menos de Hcy plasmática.

De forma semelhante, RIDDEL e cols. (2000), trabalhando com 65 indivíduos, com idade entre 31 e 71 anos, submetidos a dietas contendo

alimentos ricos em ácido fólico e cereais fortificados com ácido fólico, obtiveram resultados similares aos descritos no parágrafo anterior.

Confrontando a média de consumo das vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico com os valores de RDA (figura 5) verificamos que a população urbana apresenta média de consumo das vitaminas B₆ e B₁₂ acima da RDA, enquanto que o consumo de ácido fólico encontra-se abaixo da RDA. Quanto à população rural, verificamos que apenas o consumo de vitamina B₁₂ atinge o valor da RDA.

Comparando o consumo de vitaminas entre as populações urbana e rural (figura 5), verificamos que a população urbana consome 25% mais de ácido fólico que a população rural. Em relação a vitamina B₆ o consumo é 4 vezes superior ao da população rural. O inverso ocorre em relação à vitamina B₁₂, onde a média de consumo da população rural é 15% maior do que a média da população urbana.

Ao longo da aplicação e análise do inquérito alimentar, foi possível constatar que, em média, a população rural prefere consumir alimentos de origem animal e carboidratos derivados da mandioca e do arroz, ao invés de legumes e verduras. O menosprezo pelo consumo de verduras, legumes e frutas encontra-se associado a uma desinformação dietética da importância das vitaminas e oligoelementos, junto a uma valorização do consumo de alimentos de origem animal, como símbolo de poder aquisitivo. Já a população urbana encontra-se mais esclarecida quanto ao valor nutritivo dos alimentos e seu impacto sobre a saúde, ainda que esteja mais sugestionada ao consumo de alimentos do tipo “Fast Food”.

Analisando os dados em relação ao sexo na população total, notamos que o sexo masculino apresenta uma concentração de Hcy 26% maior

que o sexo feminino, com valores de Hcy plasmáticos de 16,63 μ mol/L e 13,20 μ mol/L, respectivamente. Estes dados estão de acordo com JACOBSEN e col, (1994) e LUSSIER-CACAN e cols, (1996), que mostram que homens apresentam níveis de Hcy 25% maiores que mulheres antes de menopausa. Os níveis de Hcy do sexo masculino e feminino da população rural foram de 17,70 μ mol/L e 15,28 μ mol/L, respectivamente. Estes níveis de Hcy são maiores que os da população urbana, que são 14,87 μ mol/L e 11,81 μ mol/L no sexo masculino e feminino, respectivamente.

Analisando os dados referentes à Hcy plasmática, encontramos valores de Hcy plasmática de 16,56 μ mol/L e 12,82 μ mol/L para população rural e urbana, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos do inquérito alimentar, a população urbana consome mais ácido fólico e B₆ do que a população rural, o que resulta níveis de Hcy 29% menores do que os da população rural. Estes resultados estão de acordo com as observações de outros autores (BROEKMANS e cols., 2000; RIDDEL e cols., 2000).

DeROSE e cols. (2000) trabalhando com 40 voluntários submetidos a um programa de vida vegetariana, junto ao American Lifestyle Center in Sulphur, Oklahoma, dosaram a Hcy plasmática durante o período do programa e uma semana após seu término. Os indivíduos que apresentaram Hcy acima de 9,5 μ mol/L antes do programa de vida vegetariana tiveram redução de 19%, comparado ao grupo de indivíduos com Hcy abaixo de 9,5 μ mol/L, os quais tiveram redução de apenas 8%.

Ainda na linha dietética, APPEL e cols. (2000) trabalharam com 118 indivíduos, submetendo-os a 3 tipos de dietas: 1) dieta controle tipicamente americana; 2) dieta controle enriquecida com frutas e verduras e 3) dieta

combinada contendo frutas, verduras e produtos de laticínios, incluindo também peixe, grãos integrais, nozes e conteúdo reduzido de gorduras, carnes vermelhas e doces. A dieta foi mantida ao longo de 8 semanas, tempo após o qual foram determinados os níveis plasmáticos de Hcy. A população que recebeu a dieta combinada apresentou uma redução acentuada dos níveis de Hcy. Os autores sugerem que a redução da Hcy plasmática, decorrente da dieta combinada, confere uma redução do risco cardiovascular de 7 a 9%, quando comparado aos consumidores da dieta tipicamente americana.

Estudando o efeito da vitamina B₁₂ da dieta sobre os níveis plasmáticos de Hcy, HERMANN e cols. (2001) e CHAMBERS e cols. (2000) trabalhando com indivíduos não vegetarianos e indivíduos restritamente vegetarianos, concluíram que a deficiência de vitamina B₁₂, encontrada basicamente em alimentos de origem animal, poderia estar contribuindo para a hiperhomocisteinemia observada na população de indivíduos estritamente vegetarianos.

O efeito da dieta sobre os níveis de vitamina B₁₂ no sangue também foi estudado por KRAJCOVICOVA-KUDLACKOVA e cols. (2000 a e b) que constataram que 78% dos indivíduos submetidos a dietas restritamente vegetarianas e 36% dos indivíduos lacto-vegetarianos, mas nenhum dos indivíduos onívoros, apresentavam baixos níveis de vitamina B₁₂ no sangue.

Analisando os dados relativos a ingesta vitamínica e os níveis plasmáticos (tabela 2), nota-se que a correlação não é estatisticamente significativa, o que corrobora com os dados de DeBREE (2001). O qual indica em seu programa de educação nutricional que preconiza um maior consumo de frutas, verduras e legumes, objetivando atingir, pelo menos, 200µg/dia

(453nmoles/dia) de ácido fólico. No entanto, deve-se considerar que o ácido fólico contido nos alimentos está na forma derivada de poliglutamato, os quais são hidrolisados a monoglutamato no intestino delgado, antes de sua absorção. Logo, a biodisponibilidade de ácido fólico nos alimentos é menor do que a biodisponibilidade da suplementação vitamínica. A biodisponibilidade do ácido fólico nos alimentos é de 50% (BROUWER e cols., 1999) podendo ainda sofrer alterações com o cozimento, onde há perda de 50 a 95%. O mesmo não ocorre com a vitamina B₁₂ e vitamina B₆. Estas modificações alimentares poderiam alterar os níveis de ácido fólico nos indivíduos saudáveis, como mostra o trabalho de BROUWER e cols. (1999) onde indivíduos suplementados com ácido fólico e indivíduos consumindo alimentos ricos em ácido fólico apresentam níveis plasmáticos de ácido fólico aumentados, após de duas semanas.

A suplementação vitamínica mostra-se ideal em casos particulares, como indivíduos com mais de 50 anos, os quais apresentam má absorção de nutrientes com frequência de 10 a 30%. O trabalho de KOEHLER e cols. (2001) realizado com 278 idosos, mostra que a resposta nos níveis de Hcy, associada ao consumo de folato nos alimentos, é comparável à resposta dos suplementados com vitaminas.

A importância do ácido fólico pode ser explicada por seu papel no metabolismo da Hcy. O ácido fólico, na forma de 5metilTHF, é cosubstrato no processo de remetilação da Hcy em metionina. Em contraste, as vitaminas B₁₂ e B₆ servem como cofatores das enzimas na transsulfuração e remetilação, não sendo usadas durante a degradação; logo elas não são, frequentemente, fatores limitantes e, por isso, os níveis de vitaminas B₁₂ e B₆ não apresentam tanta

influência sobre os níveis plasmáticos de Hcy (DURAND e cols., 2001; DeBREE e cols., 2001).

Em nosso estudo, foi possível verificar que, tanto o consumo, como os níveis plasmáticos de ácido fólico, são menores na população rural, comparada à população urbana, resultando em maiores níveis plasmáticos de Hcy. Isto nos leva a considerar interessante uma educação alimentar nesta população da zona rural, já que foi concluído por vários pesquisadores que uma redução de 3 $\mu\text{mol/L}$ de Hcy reduziria em aproximadamente, 30 a 40% o risco para DCV.

A população da zona rural não conhece os fatores de risco para DCV e muito menos a influência das vitaminas na saúde. Esta população não sabe sequer o que é vitamina, de onde ela vem e porque é necessário seu consumo. Apesar de terem a disponibilidade de legumes e verduras, não sabem que estes são excelentes fontes de vitaminas como ácido fólico e vitamina B₆. A idéia geral é a de que comer alimento protéico, de origem animal, é suficiente para saúde. Parece também, interessante futuramente verificar a incidência de DCV nesta população e a influência de uma suplementação vitamínica sobre os níveis plasmáticos de Hcy.

NALLAMOTHU e cols. (2000) analisaram os efeitos econômicos de terapêutica visando diminuir Hcy plasmática. O estudo conclui que a diminuição dos níveis de Hcy com suplementação de ácido fólico e vitamina B₁₂ resulta em um benefício substancial a um custo razoável. Dentre as conclusões, encontra-se que a dosagem da Hcy plasmática, seguida do tratamento pela suplementação, apresenta um custo menor do que um tratamento com suplementação universal.

Desde a publicação dos trabalhos de WILCKEN (1976), mais de 100 estudos epidemiológicos foram levados a efeito, evidenciando a relação entre os níveis moderados de Hcy e o aumento do risco para DCV. Neste caso, as concentrações plasmáticas de Hcy são influenciadas por diversos fatores, dentre eles o fator nutricional, envolvendo as vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico, os quais afetam o metabolismo de Hcy. A correlação negativa entre os níveis plasmáticos de ácido fólico e vitamina B₁₂ com os níveis plasmáticos de Hcy foi demonstrada inicialmente por KANG e cols. (1987), STABLER e cols. (1988), MANSON & MILLER (1992) e UBBINK e cols. (1993).

PANCHARUNITI e cols. (1994) estudaram a influência dos níveis de ácido fólico e vitamina B₁₂ em indivíduos com DCV e indivíduos saudáveis, evidenciando a correlação negativa existente entre os níveis plasmáticos de Hcy e de ácido fólico, bem como em relação à vitamina B₁₂. Também, ficou evidente que a influência do ácido fólico sobre o risco de doença cardiovascular, determinada pelos níveis de Hcy, é maior do que a da vitamina B₁₂ plasmática, provavelmente devido ao fato da população em geral apresentar níveis mais baixos de ácido fólico do que de vitamina B₁₂. O aumento de Hcy, decorrente de baixas concentrações de ácido fólico e vitamina B₁₂, tem sido estimado em 12,5 nmol/L e 225 pmol/L para ácido fólico e vitamina B₁₂, respectivamente. Os autores ainda relatam que 50% dos indivíduos saudáveis apresentavam níveis de folato menores do que 12,5 nmol/L e somente 13% mostram concentrações de vitamina B₁₂ abaixo de 225pmol/L.

O limite mínimo de ácido fólico no sangue de indivíduos em jejum, considerado aceitável nos EUA, é de 6,8nmol/L, sendo que 15% dos americanos apresentam níveis abaixo desse limite. Em contraste, a Organização Mundial da

Saúde (OMS) estabelece o valor de $13,6\text{nmol/L}$ como limite para a concentração plasmática de ácido fólico. Por esse critério, 50% dos americanos estariam abaixo do limite mínimo aceitável em relação ao ácido fólico. Os dados de PANCHARUNTI e cols. (1994) e MORRISON e cols. (1996) concordam com o preconizado pela OMS, mostraram que os indivíduos com níveis plasmáticos de ácido fólico abaixo do limite mínimo da OMS, mas acima de $6,8\text{nmol/L}$, apresentavam níveis aumentados de Hcy e maior risco de DCV.

Os trabalhos de JACOB e cols. (1994) e DARLEY e cols. (1995) estudaram a relação entre níveis plasmáticos de Hcy e níveis plasmáticos das vitaminas B_6 , B_{12} e ácido fólico, concluindo que os níveis de Hcy são influenciados pelo níveis das vitaminas e que a Hcy constitui um fator de risco para DCV. Também ficou evidente que o ácido fólico afeta os níveis de Hcy, sugerindo até que o aumento dos níveis de Hcy poderia ser utilizado como marcador da deficiência de ácido fólico.

Em 1995, BOUSHEY e cols. concluíram que o aumento do consumo de ácido fólico (aproximadamente $200\mu\text{g}/\text{dia}$) reduz em $4\mu\text{mol/L}$ os níveis plasmáticos de Hcy. Assumindo que a redução dos níveis de Hcy reduz o risco de DCV, calculou-se o efeito do consumo de ácido fólico (alimentos, suplementação e grão fortificados) sobre os níveis de Hcy, chegando-se à conclusão que esta medida poderia evitar entre 13.500 a 50.000 mortes ao ano por DCV. Adicionalmente, os autores concluíram que o aumento de $5\mu\text{mol}$ de Hcy no plasma corresponde a um risco de DCV equivalente ao aumento de $0,5\text{mmol/L}$ de colesterol no soro.

Analisando os níveis plasmáticos das vitaminas B_6 , B_{12} e ácido fólico, bem como os níveis plasmáticos encontrados na Hcy da população urbana

estudada, sumarizados no anexo VI, verificamos que os indivíduos urbanos apresentam valores plasmáticos de vitaminas dentro da faixa dos valores de referências (anexo VII) o mesmo ocorrendo com os valores das vitaminas na população rural. Entretanto, enquanto a média de ácido fólico dos indivíduos da região rural é de 8,84nmol/L ou seja, abaixo do limite recomendado pela Organização Mundial de Saúde, o mesmo não ocorrendo com os indivíduos da população urbana, que apresentam 18,62nmol/L de ácido fólico plasmáticos. Comparando os resultados do presente estudo com os dados da literatura citados, podemos concluir que a população rural estaria mais sujeita a apresentar um aumento de Hcy no sangue.

A diferença entre os níveis de ácido fólico no sangue pode ser explicada pelos dados obtidos do inquérito alimentar, onde se demonstrou que a população rural consome cerca de 25% menos ácido fólico do que a população urbana, embora ambas as populações tenha ingesta desta vitamina abaixo do RDA .

Analisando os dados das tabelas 3, 4 e 5, observamos que há uma correlação negativa, e significativa, entre os níveis plasmáticos de Hcy e o da vitamina B₁₂ e de ácido fólico, tanto na população urbana, quanto na rural e no conjunto total de indivíduos estudados.

Analisando os dados obtidos da população urbana e da população total, verifica-se que há uma correlação negativa (-0,43) entre os níveis de vitamina B₁₂ e Hcy e de -0,37 entre os de ácido fólico e Hcy (tabela 3). Essas correlações estão de acordo com os dados da literatura, onde a correlação varia de -0,19 a -0,60 para o ácido fólico, e -0,14 a -0,55 para a vitamina B₁₂ (PANCHARUNITI e cols.,1994; JACOB e cols.,1994; DARELY e cols., 1995;

CHAMBERS e cols., 2000; APPEL e cols., 2000 ; KOEHLER e cols. 2001 e De BREE e cols., 2001).

O fato da população urbana apresentar maior correlação negativa entre vitamina B₁₂ e Hcy do que entre ácido fólico e Hcy, pode ser explicado segundo trabalho de QUINLIVAN e cols (2002) onde os autores relatam uma forte correlação entre os níveis plasmáticos (6,3µg/L ou 6,3ng/mL ou 2.77nmoles/L) ácido fólico e Hcy no período de pré suplementação, a qual, após a suplementação apresentava fraca correlação. Por outro lado, os autores verificaram que após suplementação com ácido fólico acima de 400µg/dia (907nmoles/dia), a correlação negativa decorrente do impacto da vitamina B₁₂ nos níveis plasmáticos de Hcy, torna –se mais evidente. No presente estudo não é possível identificar qual das vitaminas, se o ácido fólico ou vitamina B₁₂, é responsável pelo níveis de altos de Hcy, na população urbana.

A relação entre o ácido fólico e os níveis plasmáticos da Hcy descreve uma curva com declínio inicial acentuado, tornando-se gradualmente um platô nos níveis mais altos de ácido fólico (SELHUB e cols., 1993; NYGARD e cols., 1998 e 1999). Este fato implica em que o aumento do consumo de ácido fólico teria o maior efeito nos níveis plasmáticos de Hcy quando o consumo for menor que 200µg/dia (453nmoles/dia). Adicionalmente, os níveis plasmáticos de Hcy decrescem com o consumo de ácido fólico acima de 200 µg/dia (453nmoles/dia) (DEBREE e cols., 1997). Neste sentido, DEBREE e cols (2001), concluíram que o ácido fólico plasmático dentro de uma certa faixa, teria grande efeito sobre os níveis plasmáticos de Hcy, além de outros fatores como álcool e fumo.

KEEBLER e cols. (2001) concluem que a terapia com vitaminas, particularmente o ácido fólico, reduz os níveis de Hcy, além de melhorar a função endotelial, que é um dos marcadores de doença cardiovascular. A idade é um dos fatores que influencia de forma importante os níveis plasmáticos de Hcy, sendo que esta influência pode estar relacionada à queda nos níveis plasmáticos de ácido fólico por consumo diário inadequado (CHRITODOULAKES e cols., 2001).

A correlação entre a deficiência no consumo diário de ácido fólico e o aumento da Hcy, associado ao aumento de volume corpuscular médio das hemácias e a doença arterial periférica, foi observada por MUELLER e cols. (2001). SANCHEZ e cols. (2001) concluíram em seu trabalho que a hiperhomocisteinemia na gravidez é fator de risco para pré-eclampsia e que baixos níveis plasmáticos de ácido fólico aumentam o risco de pré-eclampsia. VERHAAR e cols. (2002) mencionam que o ácido fólico além da sua influência na redução dos níveis de Hcy, apresenta efeitos benéficos como antioxidante e por sua interação com a enzima óxido nítrico sintase.

Dados recentes da literatura (KLEE, 2000; McKAY e cols., 2000; PAGÁN e cols., 2001; DeBREE e cols., 2001; KOEHLER e cols., 2001) mostram que, das vitaminas envolvidas no metabolismo de homocisteína, a que tem maior efeito como determinante nutricional nos níveis plasmáticos de Hcy é o ácido fólico.

Não só os trabalhos recentes, mas o trabalho de BOUSHELY e cols. (1995) estima a influência de ácido fólico nos níveis plasmáticos de Hcy, sugerindo que o consumo diário de 350µg/dia para homens e 280µg/dia para mulheres poderia, potencialmente, evitar 30500 e 19000 mortes por DCV em

homens e mulheres, respectivamente (50% dos indivíduos cardiopatas apresentam níveis altos de Hcy, além de 10% dos indivíduos normais e 30% dos indivíduos idosos).

Em relação à vitamina B₆, apesar da população rural apresentar consumo menor que o RDA, os dados do nosso estudo não mostraram nenhuma alteração nos níveis plasmáticos de Hcy como consequência do consumo mais baixo.

A análise relativa dos dados deste trabalho em relação aos níveis plasmáticos de vitamina B₆, mostra uma correlação positiva com a Hcy plasmática, contradizendo os dados de ROBINSON (1998) que cita a deficiência de vitamina B₆ como sendo mais freqüente em pacientes com DCV do que nos controles. O autor também cita a deficiência de piridoxina, em animais, como causadora de lesão vascular. Neste sentido, os trabalhos de RYAN e cols. (1993) FRANKEN e cols. (1994) LAKSHMI e cols. (1998) e MANSOOR e cols. (1999) demonstraram que a vitamina B₆ é capaz de promover redução significativa dos níveis plasmáticos de Hcy.

Suplementando a dieta com as vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico, isoladamente, ao longo de 6 semanas, UBBINK e cols. (1994) notaram que a suplementação de vitamina B₆ (10mg/dia) não tinha nenhum efeito sobre concentração de Hcy, enquanto que a suplementação com ácido fólico (0,65mg/dia) e vitamina B₁₂ reduziram em 41,7% e 14,8% os níveis de Hcy, respectivamente. O mesmo é comentado na revisão feita por WOODSIDE e cols., em 1997.

O estudo da correlação entre os dados de suplementação vitamínica, os níveis plasmáticos das vitaminas e a Hcy, apresentado por McKAY

e cols. (2000) deixa claro que a correlação entre a vitamina B₆ e Hcy é positiva, e que a vitamina B₆ não exerce efeito sobre os níveis de Hcy. Já McKINLEY e cols. (2001) concluíram que a vitamina B₆ reduz efetivamente os níveis plasmáticos de Hcy em jejum, quando administrada em doses muito baixas a indivíduos sem DCV e sugere que, os programas de tratamento e prevenção de hiperhomocisteinemia, devam incluir a vitamina B₆. Apesar da vitamina B₆ ter sido utilizada no tratamento de homocistinúria causada pela deficiência de β -cistationina sintetase, seu papel na prevenção ou tratamento de hiperhomocisteinemia moderada ainda não está claro.

Os valores das regressões univariáveis entre Hcy e vitaminas B₆ e B₁₂ e ácido fólico (Tabelas 6, 7 e 8) mostram, na população urbana, que os níveis de Hcy são direta e inversamente proporcionais aos níveis de vitamina B₁₂ e ácido fólico. O mesmo se observa em relação à população rural e ao total de indivíduos estudados. Na população urbana, os níveis de ácido fólico são responsáveis por 19% da variabilidade dos níveis de Hcy, enquanto os níveis de vitamina B₁₂ são responsáveis por 14%. Na população rural, os níveis de ácido fólico e de vitamina B₁₂ são responsáveis, respectivamente, por 12% e 10% da variabilidade de homocisteína, enquanto que na totalidade dos indivíduos, essas porcentagens são de 8% e 9%.

Os valores das regressões multivariáveis entre Hcy e vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico (Tabelas 9, 10 e 11) mostram que os níveis das vitaminas em conjunto são responsáveis por 31% da variabilidade dos níveis de Hcy, tanto na população urbana como na rural. Na totalidade dos indivíduos estudados, o percentual de variabilidade dos níveis de Hcy influenciado pelas vitaminas diminui para 18%.

Nossos dados corroboram os dados obtidos por RIDDEL e cols. (2000) que calcularam, na população por eles estudada, uma influência de 14% do ácido fólico e 9% da vitamina B₁₂, na variabilidade dos níveis plasmáticos de Hcy. A influência destas vitaminas em conjunto foi de 19%. Já PANCHARUNTI e cols. (1996) observaram uma influência maior destas vitaminas na variabilidade da Hcy, chegando a 54%. A discrepância entre estes valores pode ser devida à inclusão de indivíduos potencialmente deficientes em ácido fólico e/ou vitamina B₁₂, indivíduos com Hcy elevado ou outras variáveis adicionais.

Como acima mencionado, a influência das vitaminas na variabilidade dos níveis de Hcy é apenas parcial, havendo outros fatores que podem participar deste processo. Um exemplo é a atividade da MTHFR, considerada um dos fatores determinantes na concentração de Hcy em resposta à intervenção com ácido fólico. Nos indivíduos homozigotos, esta mutação autossômica recessiva provoca hiperhomocistemia moderada, que pode ser tratada com suplemento de ácido fólico (JACQUES e cols., 1996; FOHR e cols, 2002). A deficiência de ácido fólico pode ser parcialmente responsável pela expressão do genótipo da MTHFR termolábil e a hiperhomocistemia observada nestes pacientes com mutação para MTHFR raramente resulta de uma maior necessidade de ácido fólico (MOLLOY e cols., 1997). BOUSHEY (1995) confirma que a redução de 3μmol/L de tHcy pode reduzir 30 a 40% o risco de doenças coronarianas isquêmicas.

5.2. LDL-COLESTEROL, HOMOCISTEÍNA E A DOENÇA CARDIOVASCULAR

Os dados do nosso estudo em relação ao níveis de lipídios séricos (TG, colesterol total, LDL, VLDL e HDL) estão no anexo VI. A comparação dos

níveis dos lipídios entre as populações urbanas e rurais está nas figuras 7 a, b, c e 8 a, b. As duas amostras apresentam diferença significativa entre os níveis de colesterol total, triglicerídios, LDL e VLDL, os mesmos não tendo sido visto para HDL. Adicionalmente, os níveis de LDL colesterol da população urbana está acima dos níveis desejáveis 3,38mmol/L (130mg/dL), na prevenção das doenças cardio vasculares.

Níveis elevados de Hcy estão relacionados com inúmeros processos envolvidos na aterosclerose ou trombose. Os possíveis mecanismos envolvem: disfunção endotelial, endotélio e coagulação, vasodilatação dependente do endotélio, efeito citotóxico a células endoteliais, inflamação, estresse oxidativo, agregação plaquetária, células de músculo liso e colágeno e lipoperoxidação (WU e cols., 1994).

A Hcy pode levar à lesão arterial pela promoção da oxidação da LDL. Vários estudos concluem que aminoácidos contendo sulfato, como na Hcy, podem causar a oxidação da LDL, na presença de metais de transição, como cobre e ferro. Desta forma, a Hcy pode agir iniciando a oxidação da LDL, etapa necessária para o desenvolvimento da aterosclerose. Adicionalmente, OLSZEWSKI e McCULLY (1991) sugerem que o excesso de Hcy seria transportado pela LDL em indivíduos hipercolesterolêmicos. Este excesso de Hcy estaria ligado à apolipoproteína B, causando modificação na LDL. A LDL, modificada ou oxidada, é reconhecida por receptores *scavenger* de macrófagos na parede arterial, levando a formação de células espumosas.

No fígado, altas concentrações de Hcy podem levar à formação de Hcy-tiolactona, que extravasa para a circulação e também promove a oxidação da LDL, levando ao desenvolvimento da arterosclerose (McCULLY e cols., 1990;

OLSZEWSKI e McCULLY, 1993; HIRANO e cols., 1994; McCULLY, 1996; VOUTILAINEN e cols., 1999).

PANCHARUNTI e cols. (1994) e WU e cols. (1994) mostram que há correlação significativa e positiva entre os níveis de Hcy, LDL e o risco da doença cardiovascular. Estes estudos sugerem que indivíduos com níveis normais de LDL estariam desenvolvendo patologias cardiovasculares através do efeito da Hcy sobre a oxidação da LDL.

Por outro lado, BLOM e cols. (1992) e DUDMAN e cols. (1993) concluíram que altos níveis plasmáticos de Hcy não estão associados com aumento de peroxidação de lipídios. BLOM e cols. (1995) informam que a susceptibilidade da LDL à oxidação catalisada pelo cobre é igual em pacientes com hiperhomocisteinemia e indivíduos normais. Os autores ainda discutem o fato de que os estudos *in vitro*, que falam de lesão endotelial, mediada pela formação de espécies reativas de oxigênio, pela ação da Hcy, utilizam concentrações extremamente altas de Hcy na forma reduzida. A Hcy reduzida é a forma livre, que corresponde a menos que 1% da Hcy sangüínea, não sendo, portanto, compatível com as condições fisiológicas normais. Estes argumentos levam à conclusão de que o risco de doença cardiovascular na hiperhomocisteinemia não, seria devido ao aumento na peroxidação de lipídeos causado por Homocisteína.

HALVERSON e cols. (1996) que estudaram o efeito da homocisteína sobre a oxidação da LDL, utilizando três sistemas diferentes de oxidação, concluíram que a Hcy, em concentrações correspondentes às encontradas em indivíduos com homocistinúria, pode na verdade seqüestrar radicais livres, agindo, desta forma, como proteção à oxidação da LDL. Assim, um aumento severo de Hcy plasmática levaria um estado antioxidante. O mesmo foi concluído

por ANDERSON e cols. (1995), UELAND e cols. (1996) e BOURDON E BLACHE (2001).

FERGUSON e cols. (1999) sugerem que a reação entre Hcy-tiolactona e LDL geraria um aduto Hcy-LDL, que seria mais resistente à modificação oxidativa do que a LDL nativa; isto explicaria o porquê da menor susceptibilidade da LDL à oxidação em indivíduos com homocistinúria.

A análise dos dados das populações urbana, rural e na população total, neste trabalho, mostrou não haver correlação significativa entre os níveis de Hcy e LDL, como mostram as tabelas 3 a 5. Nota-se que os níveis de LDL são maiores na população urbana do que na rural; esta mesma população urbana de Hcy menores que os da população rural. Devido às divergências nos estudos sobre o efeito da Hcy sobre LDL, modelos experimentais com diferentes níveis de Hcy são ainda necessários para a avaliação da capacidade da Hcy de promover a oxidação LDL. HALVERSON e cols. (1996) explicam que as diferenças nos dados da literatura entre Hcy moderada e severa podem ser decorrentes do efeito ambivalente dos aminotióis (pró e antioxidante).

Por outro lado, foi observada uma correlação negativa e significativa indicada pela correlação de Pearson, entre os níveis de Hcy e HDL, na população total (tabelas 3.4 e 5), o mesmo não é observado em relação à população urbana e rural. Este achado é corroborado pelos os dados de CHRISTENSEN e cols., (1999) onde os níveis de Hcy e HDL, apoA-I, fumo e ácido fólico de 107 indivíduos com infarto de miocárdio foram correlacionados. Especula-se sobre a correlação inversa entre Hcy e HDL, uma vez que estudos com camundongos transgênicos indicaram que altos níveis de apoA-I devem inibir a oxidação da LDL e baixos níveis de apoA-I facilitariam a oxidação da LDL

(KWITEROVICH,1996). Logo, a redução de apoA-I deve afetar o efeito oxidativo da hiperhomocisteinemia.

A distribuição dos fatores de risco, LDL>130mg/dL (3,38 mmol/L) e Hcy > 14µmol/L, foi calculado nas duas populações (figura 9). No caso de Hcy utilizou-se o valor de 14µmol/L como aquele considerado normal na população. O uso deste valor como corte foi baseado em vários trabalhos, como o de SUPERKO (1995), os quais concluíram que indivíduos com níveis de Hcy acima de 14µmol/L teriam maiores chances de ter estenose da artéria carótida. PETRI e cols. (1996) definem que concentrações plasmáticas de Hcy acima de 14µmol/L são considerados como hiperhomocisteinemia. GRAHAM e cols. (1997) estimam que o limite para definir hiperhomocisteinemia, relacionada com risco para a doença cardiovascular, seria de 12µmol/L. Níveis de homocisteína plasmáticas acima de 14µmol/L foram utilizados como hiperhomocisteinemia para o tratamento com vitaminas em pacientes com placas na carótida (HACKAM e cols., 2000). BISSONNETTE e cols. (2001), verificou aumento de Hcy plasmática depois tratamento com fenofibrato, definem hiperhomocisteinemia como níveis plasmáticos de Hcy acima de 14µmol/L.

A divisão das duas populações estudadas quanto a presença de um ou dois fatores de risco mostra que na população urbana o fator predominante (42%) é o nível de LDL colesterol > 130mg/dL (3.38mmol/L). Já na população rural níveis de homocisteína acima de 14µmol/L são encontrados em 40.7% dos indivíduos. Os dois fatores de risco, a hiperhomocisteinemia e os níveis elevados de LDL-colesterol, estão presentes, em conjunto, em cerca de 17% da população, seja ela urbana ou rural. Tanto a educação alimentar, como a suplementação vitamínica, poderiam reduzir o risco de doença cardiovascular relacionado à

homocisteína, já que se sabe que a suplementação com ácido fólico (0,65mg/dia) leva a uma redução de 41,7% nos níveis plasmáticos de Hcy (WOODSIDE,1996).

O American Heart Association em 1999 (MALINOW e cols, 1999) sugere que os indivíduos com histórico familiar de aterosclerose devem ter níveis de Homocisteína abaixo de 10 μ mol/L e que o tratamento inicial deve ser a alteração alimentar; caso essa medida não seja suficiente, deve-se então intervir com suplementação vitamínica, contendo 400 μ g (906nmols) de ácido fólico e 2mg de B₆ e 6 μ g de B₁₂.

SCHAERFER (2002) conclui que, na prevenção da doença cardiovascular, não é suficiente a recomendação sobre o consumo limitado de gorduras, óleos, alimentos de origem animal, laticínios e ovos isoladamente; deve-se também a orientação a população em relação ao aumento de consumo de verduras, frutas e grãos onde encontramos grande quantidade de vitaminas do complexo B.

O presente estudo mostra diferenças importantes na dieta das duas populações estudadas, que se refletem na presença de um maior percentual de indivíduos da zona urbana com níveis de LDL-colesterol acima dos recomendados e, nos residentes da zona rural a prevalência de indivíduos com homocisteína acima de 14 μ mol/L, este último devido ao consumo inadequado de vitaminas do complexo B.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. O consumo da vitamina B₆ e de ácido fólico é superior na população urbana do que na rural.
2. Os níveis plasmáticos de Hcy na população rural são mais altos do que os da população urbana. Os valores desta última se encontram na faixa dos limites referenciais normais, enquanto a rural se encaixa na faixa de hiperhomocisteinemia moderada. Este fato foi atribuído ao menor consumo de ácido fólico neste grupo.
3. Os níveis plasmáticos das vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico, em conjunto, são responsáveis por 31% da variabilidade nos níveis plasmáticos de Hcy, tanto na população rural como na urbana.
4. Os níveis séricos de LDL-colesterol, na população rural, são menores do que os da população urbana e se encontram na faixa de referência desejável. Em contrapartida, a média dos níveis da população urbana se encontra no limite superior do nível de referência desejável, caracterizando-se como faixa de risco para DCV.
5. O fator de risco de DCV predominante na população rural é a hiperhomocisteinemia, enquanto que na população urbana é o nível sérico elevado de LDL-colesterol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFTHAN, G., PEKKANEN, J., JAUHIAINEN, M. et al. – Relation of serum homocysteine and lipoprotein(a) concentrations to atherosclerotic disease in a prospective Finnish population based study. ***Atherosclerosis***, 106:9-19, 1994.
- ALPERT JE AND FAVA M. Nutrition and depression: the role of folate. ***Nutr. Rev.*** 55(5)145-149, 1997.
- ANDERSON JL, MUHLESTEIN JB, HORNE BD, CARLQUIST JF, BAIR TL, MADSEN TE, AND PEARSON RR. – Plasma homocysteine predicts mortality independently of traditional risk factors and C-reactive protein in patients with angiographically defined coronary artery disease. ***Circulation*** 102:1227–1232. 2000
- ANDERSSON A, BRATTSTRÖM L, ISRAELSSON B, ISAKSSON A, HAMFELTA, AND HULTBERG B. – Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status. ***Eur. J. Clin. Invest.*** 22:79–87., 1992
- ANDERSSON A, LINDGREN A, AND HULTBERG B. – Effect of thiol oxidation and thiol export from erythrocytes on determination of redox status of homocysteine and other thiols in plasma from healthy subjects and patients with cerebral infarction. ***Clin. Chem.*** 41:361–366., 1995
- APPEL LJ, MILLER ER III, JEE SH, STOLZENBERG-SOLOMON R, LIN PH, ERLINGER T, NADEAU MR, AND SELHUB J. – Effect of dietary patterns on serum homocysteine: Results of a randomized, controlled feeding study. ***Circulation*** 102:852–857., 2000

- ARAKI A, SAKO Y. – Determination for free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Chrom.** 122:43-52, 1987.
- ARNESEN, E., REFSUM, H., BONAA, KH., UELAND P.M., FORDE °H., NORDREHAU J.E – Serum total homocysteine and coronary heart disease. **Int. J. Epidemiol.** 24:704-9, 1995.
- BATES CJ, PENTIEVA KD, MATHEWS N, MacDONALD – A simple sensitive reproducible assay for pyridoxal phosphate in human plasma. **Clin. Chim. Act.** 280:101-111, 1999.
- BELEZ S, FRICKEL C, WOLFROM C, NAU H, HENZE G. . – High performance liquid chromatographic determination of methotrexate, 7-hydromethotrexate, 5-methyltetrahydrofolic acid and folinic acid in serum and cerebrospinal fluid. **J. Chrom. B.** 661:109-118, 1994.
- BELLAMY MF, MCDOWELL IFW, RAMSEY MW, BROWNLEE M, BONES C, NEWCOMBE RG, AND LEWIS MJ. – Hyperhomo-cysteinemia after an oral methionine load acutely impairs endothelial function in healthy adults. **Circulation** 98:1848–1852., 1998.
- BELLAMY MF, MCDOWELL IFW, RAMSEY MW, BROWNLEE M, NEWCOMBE RG, AND LEWIS MJ. – Oral folate enhances endothelial function in hyperhomocysteinaemic subjects. **Eur. J. Clin. Invest.** 29:659–662., 1999.
- BENTE HALVORSEN, INGBORG BRUDE, CHRISTIAN A. DREVON, JETTE NYSOM, LEIV OSE, ERLING N. CHRISTIANSEN AND MARIT S. NENSETER. – Effect of homocysteine on copper ion—catalyzed, azo compound-initiated and mononuclear cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. **J. Lipid Res.** 37, 1591-1600, 1996.

- BERG VAN EM M, JONG SC, DEVILLE W et al – Variability of fasting and post-methionine plasma homocysteine levels in normo-and hyperhomocysteinaemic individuals. **Neth. J. Med.** 55: 29-38, 1999.
- BERG M, BOERS GHJ. – Homocystinuria: what about mild hyperhomocysteinaemia? **Postgrad. Med. J.** 72: 513-518, 1996.
- BESCOND A, AUGIER T, CHAREYRE C, GARCON D, HORNEBECK W, AND CHARPIOT P. – Influence of homocysteine on matrix metalloproteinase-2: Activation and activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 263:498–503., 1999
- BETTIN KJ. . – A food frequency questionnaire design for a low literacy population. **Am. J. Clin. Nutr.** 59:492-505, 1982.
- BISSONNETTE R, TREACY E, ROZEN R, BOUCHER B, CHON JS, GENEST J. – Fenofibrate raises plasma homocysteine levels in the fasted and fed states. **Atherosclerosis**, 155:455-462, 2001.
- BJORKEGREN K, SVARDSUDD K. – Serum cobalamin, folate, methylmalonic acid and total homocysteine as vitamin B12 and folate tissue deficiency markers amongst elderly Swedes –a population –based study. **J. Inter. Med.** 249(5): 423-32, 2001.
- BJORKE-MONSEN AL, VOLLSET SE, UELAND PM, REFSUM H. – Plasma total homocysteine, vitamin status and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in children. **Neth. J. Med.** 51:S50-S50, 1998.
- BLEICH S., DEGNER D. – Whole blood folate, homocysteine in serum and risk of first acute myocardial infarction., **Atherosclerosis**, 147:317-326, 1999.
- BLOCK G . – A review of validations of dietary assessment methods. **Am. J. epidem.** 115:492-505, 1990.

- BLOCK G, HARTMAN AM, NAUGHTON DA. . – A reduced dietary questionnaire development and validation. **Epidemiology**, 1:58-64, 1990/
- BLOM, HJ. – Consequences of homocysteine export and oxidation in the vascular system. **Semin. Thromb. Hemost.** 26:227-232, 2000.
- BLOM H.J., D.P.E. ENGELEN, G.H.J.BOERS, A M. STADHOUDERS, R.C.A SENGERS, R. DE ABREU, M.T.W.B. TEOPOELE-POTHOFF AND J.M.F.TRIJBELS – Lipid peroxidation in homocysteinaemia. **J. Inherit. Metab. Dis.** 15:419-422. 1992,
- BLOM H.J., H. KLEINVELD, G.H.J.BOERS, P.N.M.DEMACKER, H.L.M.HAK-LEMMERS, M.T.W.B.TEPOELE-POTOHH AND J.M.F. TRIJBELS. – Lipid peroxidation and susceptibility of low density lipoproteins in vitro oxidation in hyperhomocysteinaemia. **Eur. J. Clin. Invest.** 25:149-154. 1995
- BOOTH GL, WANG EEL. – Preventive health care, 2000 update: screening and management of hyperhomocysteinemia for the prevention of coronary artery disease events. **CMAJ.** 163:21-29, 2000
- BOSTOM AG, GOHH RY, TSAI MY, HOPKINS-GARCIA BJ, NADEAU MR, BIANCHI LA, JACQUES PF, ROSENBERG IH, AND SELHUB J – Excess prevalence of fasting and postmethionine-loading hyperhomocysteinemia in stable renal transplant recipients. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 17:1894–1900., 1997
- BOURDON E AND BLACHE D. – The importance of proteins in defense against oxidation. *Antiox Redox Signal*. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, and Motulsky AG (1995). A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. **JAMA.** 274:1049–1057, 2001.

- BRATTSTRÖM L. – Vitamins as homocysteine-lowering agents. **J. Nutr.** 126:1276S-1280S., 1996
- BRATTSTRÖM L, LANDGREN F, ISRAELSSON B, LINDGREN A, HULTBERG B, ANDERSSON A, CUSKELLY G, MCNULTY H, STRAIN SS, MCPARTLIN J, WEIR DG, SCOTT JM, DEN HEIJER M, BROUWER IA, BLOM HJ, BOS GMJ, SPAANS A, ROSENDAAL FR, THOMAS CMG, HAAK HL, WIJERMANS PW, GERRITS WBJ, NAURATH HJ, AND JOOSTEN E . – Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: Meta-analysis of randomised trials. **Br. Med. J.** 316:894–898., 1998
- BROEKMANS WM, KLOPPING-KETELAARS IA, SCHUURMAN CR, VERHAGEN H, VAN DEN BERG H, KOK FJ, AND VAN POPPEL G – Fruits and vegetables increase plasma carotenoids and vitamins and decrease homocysteine in humans. **J. Nutr.** 130:1578–1583. 2000
- BROUWER IA, VAN DUSSELDORP M, WEST CE, MEYBOOM S, THOMAS CMG, DURAN M, HOF KHV, ESKES TKAB, HAUTVAST JGAJ, STEEGERS-THEUNISSEN RPM. – Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trail **J. Nutr.** 129: 1135-1139, 1999.
- BOUSHEY, C.J., BERESFORD, SAA., OMENN, GS., MOTULSKY, AGA. – Quatitative assessment of plasma homocusteine as a risk factor for vascular disease. **JAMA.** 271(13): 1049-57, 1995.
- BUTZ LW, Du VIGNEAUD V. – The formation of homologue of cystine by decomposition of methionine with sulfuric acid, **J. Biol. Chem.** 99:135-42, 1932.

- Case records of the Massachusetts General Hospital. Marked cerebral symptoms following a limp of three months'duration. **New. Engl. J. Med.** 209:1063-6, 1933.
- CANDITO M, BEDOUCCHA P, MAHAGNE MH, SCAVINI G, CHATEL M. – TOTAL PLASMA HOMOCYSTEINE DETERMINATION BY LIQUID CHROMATOGRAPHY BEFORE AND AFTER METHIONINE LOADING. Results in cerebrovascular diseases. **J. Chromat. B.** 692: 213-216, 1997.
- CARSON NA, NEILL DW. – Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. **Arch. Dis. Child.** 37: 505-13, 1962.
- CASTELLI WP. – Lipids risk factors and ischaemic heart disease. **Atherosclerosis**, 124(Suppl)S1-S9, 1996.
- CATTANEO M. – Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis. **Thromb Haemost** 81:165–176., 1999
- CATTANEO M, FRANCHI F, ZIGHETTI ML, MARITNELLI I, ASTI D, AND MANNUCCI PM – Plasma levels of activated protein C in healthy subjects and patients with previous venous thromboembolism: Relationships with plasma homocysteine levels. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 18:1371–1375., 1998
- CHALLEM. J., DOLBY,V. – ***Homocysteine The Secrect Killer, The real cause of heart disease and stroke***. Keats Publishing, Inc. New Canaan, Connecticut. 1997.
- CHAMBERS JC, UELAND PM, OBEID AO, WRIGLEY J, REFSUM H, KOONER JS. – Improved vascular endothelial funtion after oral B vitamins ; Na effect

mediated through reduced concentrations of free plasma homocysteine.

Circulation. 102(20): 2479-83, 2000.

CHAMBERS JC, MCGREGOR A, JEAN-MARIE J, OBEID OA, AND KOONER JS

. – Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia: An effect reversible with vitamin C therapy.

Circulation, 99:1156– 1160., 1999a

CHAMBERS JC, OBEID OA, AND KOONER JS – Physiological increments in

plasma homocysteine induce vascular endothelial dysfunction in normal human subjects. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 19: 2922–2927. 1999b

CHAMBERS JC, OBEID AO, REFSUM H, UELAND P, HACKETT D, HOOPER J,

TURNER RM, THOMPSON SG, KOONER JS. – Plasma homocysteine concentrations and risk of coronary heart disease in UK Indian Asian and European men. **Lancet**, 355(9203): 523-7, 2000.

CHAO CL, CHIEN KL, AND LEE YT. – Effect of short-term vitamin (folic acid,

vitamins B6 and B12) administration on endothelial dysfunction induced by post-methionine load hyperhomocysteinemia. **Am. J. Cardiol.** 84:1359– 1361., 1999

CHEN Z AND BANERJEE R. – Purification of soluble cytochrome b5 as a

component of the reductive activation of porcine methionine synthase. **J. Biol. Chem.** 273: 26248-55, 1998.

CHEN N, LIU Y, GREINER CD, AND HOLTZMAN JL. – Physiologic

concentrations of homocysteine inhibit the human plasma GSH peroxidase that reduces organic hydroperoxides. **J. Lab. Clin. Med.** 136: 58–65., 2000

CHRISTENSEN B., LANDAAS, S., STENSVOLD I., DJUROVIC ., RETTERSTOL

L, RINGSTAD J, BERG K., THELLE D.S. – Whole blood folate,

- homocysteine in serum, and risk of first acute myocardial infarction. **Atherosclerosis**, 147: 317-326, 1999.
- CHRISTODOULAKOS G, PANOULIS C, RIZOS D, MOUSTAKARIAS T, PHOCAS I, CREATSAD G. – Homocysteine and folate levels in post menopausal women. **Maturitas** 39(2):161-7, 2001.
- CLARKE R, ARMINTAGE J. – Vitamin supplementes and cardiovascular risk: review of the randamized trails of homocysteine-lowering vitamin supplements. **Semin. Thromb. Hemost.** 26(3): 341-8, 2000.
- CLARK R, KHAW KT, WOODHOUSE P et al. – Variability and determinants of plasma total homocysteine in na elderly population. **Clin. Chem.** 44:102-107, 1998.
- CLARKE, R., DALY, L., ROBINSON, K., NAUGHTEN, E., CAHALANE, S., FOWLER, B. – Hyperhomocystinemia: an independente risk factor for vascular disease. **New Engl. J.** 324: 1149-55, 1991.
- CONSTANT J, BLANN AD, RESPLANDY F, PARROT F, SEIGNEUR M, AND RENARD M – Endothelial dysfunction during acute methionine load in hyperhomocysteinaemic patients. **Atherosclerosis** 147: 411–413, 1999
- CORWELL PE, MORGAN SL, VAUGHN WH . – Modification of a high performance liquid chromatographic method for assay of homocysteine in human plasma. **J. Chrom.** 617L: 136-139, 1993.
- CRAVO ML, GLORIA LM, SELHUB J, NADEAU MR, CAMILO ME, RESENDE MP, CARDOSO JN, LEITAO CN, AND MIRA FC. – Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: Correlation with folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status. **Am. J. Clin. Nutr.** 63:220–224., 1996

- D'ANGELO A AND SELHUB J. – Homocysteine and thrombotic disease. **Blood**, 90:1-11, 1997.
- DARLEY K, LUSSIER-CACAN S, SELHUB J, DAVIGNON J., LATOUR Y, GENEST J. – Homocysteine and coronary artery disease in French Canadian subjects: relation with vitamins B12, B6, pyridoxal phosphate, and folate. **Am. J. Cardiol.** 75:1107-1111, 1995.
- DeBREE A, VERSCHUREN WMM, BLOM HJ, KROMHOUT D. – Association between B vitamins intake and plasma homocysteine concentration in the general Dutch population aged 20-65y. **Am. J. Clin. Nutr.**, 73:1027-1033, 2001.
- DeBREE A, van DUSSELDORP N, BROUWER IA, van het HOF, STEEGERS RPM – Folate intake in Europe: recommended, actual and desired intake. **Eur. J. Clin. Nutr.** 51:643-660, 1997.
- de JONG SC, STEHOUWER CD, VAN DEN BERG M, KOSTENSE PJ, ALDERS D, JAKOBS C, PALS G, AND RAUWERDA JA. – Determinants of fasting and post-methionine homocysteine levels in families predisposed to hyperhomocysteinemia and premature vascular disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 19:1316–1324., 1999
- Den HEIJER M, BLOM HJ, GERRITS WBJ, et al. – Is hyperhomocysteinaemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? **Lancet**, 345: 882-5, 1995.
- Den HEIJER, M., KOSTER, T., BLOM, HJ., et al. – Hyperhomocusteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. **N. Engl. J. Med.** 334: 759-62, 1996.
- den HEIJER M, BROUWER IA, BOS GMJ, BLOM HJ, VAN DER PUT NMJ, SPAANS AP, ROSENDAAL FR, THOMAS CMG, HAAK HL, WIJERMANS PW, AND GERRITS WBJ. – Vitamin supplementation reduces blood

- homocysteine levels: A controlled trial in patients with venous thrombosis and healthy volunteers. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 18: 356–361., 1998.
- DeROSE DJ, CHARLES-MARCEL ZL, JAMISON JM, MUSCAT JE, BRAMAN MA, McLANE GD, MULLEN JK. – Vegan diet-based lifestyle program rapidly lowers homocysteine levels. **Preventive Med.** 30:225-233, 2000.
- DI MINNO G, DAVÌ G, MARGAGLIONE M, CIRILLO F, GRANDONE E, CIABATTONI G, CATALANO I, STRISCIUGLIO P, ANDRIA G, PATRONO C, AND MANCINI M. – Abnormally high thromboxane biosynthesis in homozygous homocystinuria. Evidence for platelet involvement and probucol-sensitive mechanism. **J. Clin. Invest.** 92:1400–1406., 1993
- DONNELLY JG, PRONOVOST C. – Evaluation of the AbbottIMx fluorescence polarization immunoassay and bio-rad enzyme immunoassay for homocysteine: Comparison with high performance liquid chromatography. **Ann. Clin. Biochem.** 37:194-198, 2000.
- DUAN W, LADENHEIM B, CUTLER RG, KRAUMAN II, CADET JL, MATTSON MP – Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. **J. Neurochem.** 80(1):101-110, 2002,
- DUDMAN NPB, HICKS C, WANG J, AND WILCKEN DEL. – Human arterial endothelial cell detachment in vitro: Its promotion by homocysteine and cysteine. **Atherosclerosis** 91: 77–83., 1991
- DUDMAN, N.P., D.E. WILCKEN, AND R. STOCKER. – Circulating lipid hydroperoxide levels in human hyperhomocysteinemia. Relevance to development of arteriosclerosis. **Arterioscler. Thromb.** 13: 512-516. 1993

- DURAND P, PROST M, LOREAU N, LUSSIER-CACAN S, DENIS B. – Impaired homocysteine metabolism and Atherothrombotic disease. **Lab. Invest.** 81: 645-672, 2001.
- DURAND P, PROST M, AND BLACHE D. – Pro-thrombotic effects of a folic acid deficient diet in rat platelets and macrophages related to elevated homocysteine and decreased n-3 polyunsaturated fatty acids. **Atherosclerosis**, 121: 231–243, 1996
- DURAND P., LUSSIER-CACAN S., AND BLACHE D. – Acute methionine load-induced hyperhomocysteinemia enhances platelet aggregation, thromboxane biosynthesis and macrophage-derived tissue factor activity in rats. **FASEB J.**, 11:157-1168, 1997a
- DURAND P, PROST M, AND BLACHE D. – Folic acid deficiency enhances oral contraceptive-induced platelet hyperactivity. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 17: 1939-1946, 1997b
- DURAND P, PROST M, AND BLACHE D. – Folate deficiency and cardiovascular pathologies. **Clin. Chem. Lab. Med.** 36: 419–429 , 1998a
- DURAND P, PROST M, AND BLACHE D. – Folate deficiency and cardiovascular pathology. **Rev. Fr. Labo.** 307: 45–54., 1998b.
- “Diet debate. Is cholesterol the culprit?” **Time**, august 6 page 61, 1979
- EBERHARDT RT, FORGIONE MA, CAP A, LEOPOLD JA, RUDD MA, TROLLET M, HEYDRICK S, STARK R, KLINGS ES, MOLDOVAN NI, YAGHOUBI M, GOLDSCHMIDT-CLERMONT PJ, FARBER HW, COHEN R, AND LOSCALZO J. – Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. **J. Clin. Invest.** 106: 483–491., 2000.

- ECK LH, WILLET WC . – Considerations in modifying semiquantitative food frequency questionnaire. **J. Am. Diet. Assoc.** 91(8): 970-973, 1991.
- ECK LH, KLESGES RC, HANSON CL, SLAWSON D, PORTIS L, LAVASQUE ME . – Measuring short-term dietary intake: development and testing of a 1-week food frequency questionnaire. **J. Am. Diet. Assoc.** 91(8): 940-945, 1991.
- EIKELBOOM JW., LONN E, GENEST J., HANKEY G, YUSUF S. – Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. **Ann. Intern. Med.** 131(5): 363-75, 1999.
- FENTON WA, AND ROSENBERG LE. – Inherited disorders of cobalamin transport and metabolism. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, and Valle D, editors, ***The metabolic and molecular bases of inherited disease***. New York, McGraw-Hill, 3129-3149, 1995.
- FERGUSON E, HOGG N, ANTHOLINE WE, JOSEPH J, SINGH RJ, PARTHASARATHY S, AND KALYANARAMAN B. – Characterization of the adduct formed from the reaction between homocysteine thiolactone and low-density lipoprotein: Antioxidant implications. **Free Radic. Biol. Med.** 26: 968–977., 1999.
- FINKELSTEIN,JD. – Metionine metabolism in mammals, **J. Nutr. Biochem.** 1: 228-237,1990.
- FINKELSTEIN,JD. – Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. **Semin. Thromb. Hemost.** 26(3): 219-26, 2000.
- FINKELSTEIN,JD., MARTIN,JJ. – Homocysteine. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 32(4): 385-9, 2000.

- FOHR IP, PRINZ-LANGENOHL R, BRUNSTRUP A, BOHLMANN AM, NAU H, BERTHOLD HK, PIETRZIK K. –5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase genotype determines the plasma homocysteine-lowering effect of supplementation with 5-methyltetrahydrofolate or folic acid in healthy young women. **Am. J. Clin. Nutr.** 75: 275-282, 2002.
- FOKKEMA RM, WEIJER JM, JANNEKE DIJCK-BROUWER DA, VAN DOORMAAL JJ, MUSKIET FAJ. – Influence of Vitamin-optimized Plasma Homocysteine Cutoff Values on the Prevalence of Hyperhomocusteinemia. **Clin. Che.** 47(6): 1001- 1007, 2001.
- FORTIN, L.J. & GENEST, J. Jr. – Measurement of homocyst(e)ine in the prediction of arteriosclerosis. **Clin. Biochem.** 28(2): 155-162, 1995.
- FOWLER B. – Disorders of homocysteine metabolism. **J. Inher. Metab. Dis.**, 20: 270-85, 1997.
- FRANCO RF. ARAUJO AG. GUERREIRO JF. ELION J., ZAGO MA. – Analysis of the 677 C→T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. **Thromb. Haemost.** 79:119-21, 1998.
- FRANKEN DG, BOERS GHJ, BLOM HJ AND TRIJBELS JMH. – Effect of various regimens of vitamin B6 and folic acid on mild hyperhomocysteinaemia in vascular patients. **J. Inherited. Metab. Dis.** 17:159-162, 1994a.
- FRANKEN DG, BOERS GHJ, BLOM HJ AND TRIJBELS JMH, KLOPPENBORT PWE – Treatment of mild hyperhomocysteinemia in vascular disease patients. **Arteriocler. Thromb.** 14: 465-470, 1994b.
- FREYBURGER G, LABROUCHE S, SASSOUST G, ROUANET F, JAVORSCHI S, AND PARROT F. – Mild hyperhomocysteinemia and hemostatic factors in

- patients with arterial vascular diseases. **Thromb. Haemost.** 77: 466–471., 1997.
- FRONTIERA MS, STABLER SP, KOLHOUSE JF, ALLEN RH. – Regulation of methionine metabolism: Effects of nitrous oxide and excess dietary methionine. **J. Nutr. Biochem.** 5: 28-38, 1994.
- FROSST, P., HENK, J., BLOM, R., MILOS, PHILIPPE GOYETTE, CA., SHERPHARD, ROWENA, G., MATTHEWS, GODFRIED, JH., BOERS, MARTIN DEN HEIJAR, LEO, AJK., LAMBERTPWJ., VAN DEN HEUVEL, RIMA ROZEN, – A candidate risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetics** 10:111-13, 1995.
- FROSST P., BLOM HJ., MILOS R. et al. – Identification of a candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation at the methylenetetrahydrofolate reductase locus. **Nat. Genet.** 10:111-3, 1995.
- FRYER RH, WILSON BD, GUBLER DB, FITZGERALD LA, RODGERS GM. – Homocysteine a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. **Arterioscler. Thromb.** 13:1327-1333, 1993.
- FU W, DUDMAN NP, PERRY MA, YOUNG K, AND WANG XL – Interrelations between plasma homocysteine and intracellular S-adenosylhomocysteine. **Biochem. Biophys. Res. Commun** 271: 47–53., 2000
- FUKAGAWA NK, MARTIN JM, WURTHMANN A, PRUE AH, EBENSTEIN D, AND O'ROURKE B. – Sex-related differences in methionine metabolism and plasma homocysteine concentrations. **Am. J. Clin. Nutr.** 72: 22–29., 2000.

- FUSTER V. – Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. **Circulation**, 90:2126-46, 1995
- GARG UC, ZHENG ZJ, FOLSAM AR et al. – Short-term and long term variability of plasma homocysteine measurement. **Clin.Chem.** 43: 141-5, 1997.
- GENEST, JJ., McNAMARA, JR., SALEM, DN., WILSON, PWF., SCHAEFER, EJ., MALINOW, MR. – Plasma homocyst(e)ine in men with premature coronary artery disease. **J. Am. Col. Cardiol.**16:1114-9, 1990.
- GENEST, JJ., McNAMARA, JR., UPSON,B., SALEM, DN., ORDOVAS, JM., SCHAEFER, EJ., MALINOW, MR. – Prevalence of familial hyperhomoc(e)inemia in men with premature coronary artery disease. **Arteriosclerosis Thromb.** 11: 1129-36, 1991.
- GENEST J, LUSSIER-CACAN S, QUI S, DAVIGNON J, LATOUR Y, SELHUB J .
– Homocyst(e)ine and coronary disease in French Canadians: Relationship with vitamins B12, B6, pyridoxal phosphate andd folate. **Can. J. Card.** 9: 81E, 1993.
- GERRITSEN T, VAUGHN JG., WEISMAN HÁ. – The identification of homocysteine in the urine. **Biochem. Biophys. Res. Commum.** 9: 493-6, 1962.
- GILFIX BM, BLANK DW, ROSENBLATT DS. – Novel reductant for determination of total plasma homocysteine. **Clin. Chem.** 43: 687-688, 1997.
- GLUECK, C J., PETER SHAW, LANG,J.E., TARCY,T., LUANN SIEVE-SMITH, YING WANG. – Evidence that homocysteine is na independent risk factor for atherosclerosis in hyperlipidemic patients. **Am. J. cardiol.** 75: 132-136, 1995.

- GRAEBER JE, SLOTT JH, ULANE RE, SCHULMAN JD, STUART MJ. – Effect of homocysteine and homocystine on platelet and vascular arachidonic acid metabolism. **Pediatr. Res.** 16: 490-493, 1982.
- GRAHAM IM, DALY LE, REFSUM HM, ROBINSON K, BRATTSTRÖM LE, UELAND PM, PALMA-REIS RJ, BOERS GHJ, SHEAHAN RG, ISRAELSSON B, UITERWAAL CS, MELEADY R, MCMASTER D, VERHOEF P, WITTEMAN J, RUBBA P, BELLET H, WAUTRECHT JC, DE VALK HW, LÚIS ACS, PARROT-ROULAUD FM, TAN KS, HIGGINS I, AND GARCON D – Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. **JAMA**, 277: 1775–1781., 1997
- GRIEND R, BIESMA DH, BANGA JD. . – Hyperhomocysteinaemia as a cardiovascular risk factor: an update. **The Neth. J. of Med.** 56:119-130, 2000.
- GUTHIKONDA S, HAYNES WG. . – Homocysteine as a novel risk factor for atherosclerosis. **Curr. Opin. Cardiol.** 14(4): 283-911, 199.
- HACKAM DG, PETERSON JC, AND SPENCE JD. – What level of plasma homocyst(e)ine should be treated? Effects of vitamin therapy on progression of carotid atherosclerosis in patients with homocyst(e)ine levels above and below 14 micromol/L. **Am. J. Hypertens.** 13:105–110., 2000
- HAJJAR KA. – Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. **J. Clin. Invest.** 91:2873–2879., 1993
- HAJJAR KA, MAURI L, JACOVINA AT, ZHONG FM, MIRZA UA, PADOVAN JC, AND CHAIT BT. – Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail

- domain. Direct modulation by homocysteine. **J. Biol. Chem.** 273: 9987–9993., 1998
- HALVORSEN B, BRUDE I, DREVON CA, NYSOM J, OSE L, CHRISTIANSEN EN, AND NENSETER MS – Effect of homocysteine on copper ion-catalyzed, azo compound-initiated, and mononuclear cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. **J. Lipid. Res.** 37:1591–1600., 1996.
- HARKER LA, ROSS R, SLICHTER SJ SCOTT CR. – Homocysteine induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. **J.Clin. Invest.** 58: 31-741., 1976.
- HARPEL PC, ZHANG XX AND BORTH W. – Homocysteine and hemostasis: Pathogenetic mechanisms predisposing to thrombosis. **J. Nutr.** 126: 1285S-1289S. 1996.
- HEINECKE JW, ROSEN H, SUZUKI LA, AND CHAIT A. – The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.** 262:10098–10103.,1987
- HERRMANN W, SCHORR H, PURSCHWITZ K, RASSOUL F, RICHTER V. – Total homocysteine, vitamin B(12), and total antioxidant status in vegetarians. **Clin. Chem.** 47 (6): 1094-1101, 2001.
- HIRANO K, OGIHARA T, MIKI M, YASUDA H, TAMAI H, KAWAMURA N, AND MINO M. – Homocysteine induces iron-catalyzed lipid peroxidation of low-density lipoprotein that is prevented by alpha-tocopherol. **Free Radic. Res.** 21: 267–276., 1994
- HOEG JM – Evaluating coronary heart disease risk: tiles in the mosaic. **JAMA**, 277:1387-1390, 1997.

- HOLVEN K.B., HOLM T., AUKRUST P., CHRISTENSEN R., KJEKSHUS J., ANDREASSEN A K., CULLESTAD L., HAGVE T.A, SVILAAS A, OSE L., NENSETER M.S. – Effect of folic acid treatment on endothelium-dependent vasodilation and nitric oxide-derived end products in hyperhomocysteinemic subjects. **Am. J. Med.** 110(7): 536-542, 2001
- HURST JW. – ***Doenças de vasos sanguíneas***. Ed. Guanabara Koogan, 1990.
- IINGEBORG A, DUSSELDORP MV., WEST C.E., MEYBOOM S., THOMAS C.M.G., DURAN M., HOF K.H., ESKES T.K.^aB., HAUTVAST J.G.^aJ. AND STEEGERS-THEUNISSEN R.P.M. – Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trail. **J. Nutri**, 129:1135-1139, 1999.
- Jacob RA, WU M., HENNING SM., AND SWENSEID ME. – Homocysteine Increases as folate decreases in plasma of healthy men during short-term dietary folate and methyl group restriction. **J. Nutr.** 124:1072-1080, 1994.
- JACOBSON DW, GATAUTIS VJ, GREEN R, ROBINSON K, SSAVON SR, SECIC M, JI J, OTTO JM, TAYLOR LM. Rapid HPLC. – Determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma : Sex differences and correlation with cobalamin and flate concentrations in healthy subjects. **Clin. Chem.** 40:873-881, 1994.
- JACQUES PF, BOSTOM AG, WILLIAMS RR, ELLISON RC, ECKFELDT JH, ROSENBERG IH, SELHUB J, ROZEN R – Relation between the folate status a common mutation in methylenetrahydrofolate reducatse and plasma homocysteine concentrations. **Circulation**, 93: 7-9, 1996.

- JAKUBOWSKI H. – Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. **J. Biol. Chem.** 272: 1935–1942., 1997
- JAKUBOWSKI H. – Homocysteine thiolactone: Metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. **J. Nutr.** 130(Suppl): 377S–381S., 2000
- KANANI PM, SINKEY CA, BROWNING RL, ALLAMAN M, KNAPP HR, AND HAYNES WG. – Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. **Circulation**, 100: 1161–1168., 1999.
- KANG SS, WONG PWK, NORUSIS M. – Homocysteinemia due to folate deficiency. **Metabolism**, 36: 458-462, 1987.
- KEEBLER ME, DE SOUZA C, FONSECA V. – Diagnosis and treatment of hyperhomocysteinemia. *Curr. Atheroscler. Rep.* 3(1):54-63, 2001.
- KELLY P, McPARTLIN J, SCOTT J. – A combined high performance liquid chromatographic microbiological assay for serum folic acid. **Anal. Biochem.** 238:179-183, 1996.
- KHAJURIA A AND HOUSTON DS. – Induction of monocyte tissue factor expression by homocysteine: A possible mechanism for thrombosis. **Blood**, 96:966-972, 2000
- KLEE GG. – Cobalamin and folate evaluation: Measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B12 and folate. **Clin. Chem.** 46(8): 1277-1283. 2000.
- KOEHLER KM, BAUMGARTNER RN, GARRY PJ, ALLEN RH, STABLER SP, RIMM EB. – Association of folate intake and serum homocysteine in elderly

- persons according to vitamin supplementation and alcohol use ¹⁻³. **Am. J. Clin. Nutr.** 73: 628-37, 2001.
- KOKAME K, KATO H, AND MIYATA T. – Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. GRP78/BiP and novel genes. **J. Biol. Chem.** 271: 29659–29665., 1996.
- KRAJCOVICOVA-KUDLACKOVA m, BLAICEK P, BABINSKA K, KOPSOVA J, KLVANOVA J, BEDEROVA A, MAGALOVA T. – Traditional and alternative nutrition-levels of homocysteine and lipid parameters in adults. **Scand. J.clin. Lab. Invest.** 60(8): 657-64, Dec 2000.
- KRAJCOVICOVA-KUDLACKOVA M, BLAZICEK P, KOPCOVA J, BEDEROVA A, BAINSKA K. – Homocysteine levels in vegetarians versus omnivores. **Ann. Nutr. Metab.** 44(3):135-138, 2000.
- KRUMDIECK CL AND PRINCE CW. – Mechanisms of homocysteine toxicity on connective tissues: Implications for the morbidity of aging. **J. Nutr.** 130: 365S-368S., 2000.
- KWITEROVICH PO. Jr. – The effect of dietary fat, antioxidants, pro-oxidants on blood lipids, lipoproteins, and atherosclerosis. **Am. Diet. Assoc.** 97(Suppl)S31-41, 1996.
- LAKSHMI AV, RAMALAKSHMI BA. – Effect of pyridoxine or riboflavin supplementation on plasma homocysteine levels in women with oral lesions. **Natl. Med. J. India**, 11:171-172, 1998.
- LANG D, KREDAN MB, MOAT SJ, HUSSAIN AS, POWELL CA, BELLAMY MF, POWERS HJ, LEWIS MJ. – Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta:Role for superoxide anions. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 20: 422-472., 2000

- LANGMAN LJ, COLE DE . – Homocysteine. **Crit. Ver. Clin. Lab. Sci.** 36(4): 365-406, 1999.
- LECLERC D., WILSON ^a, DUMAS R. GAFUIK C., SONG D., WATKINS D., HENG HHK, ROMMEN JM., SCHERER SW, ROSENBLATT DS AND GRAVEL RA.
– Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95: 3059-3064, 1998
- LEE ME AND WANG H. – Homocysteine and hypomethylation. A novel link to vascular disease. **Trends Cardiovasc. Med.** 9: 49–54., 1999
- LENTZ SR AND SADLER JE. – Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombo-genic agent homocysteine. **J. Clin. Invest.** 88: 1906–1914., 1991
- LENTZ SR AND SADLER JE. – Homocysteine inhibits von Willebrand factor processing and secretion by preventing transport from the endoplasmic reticulum. **Blood**, 81: 683–689., 1993
- LENTZ SR, SOBEY CG, PIEGORS DJ, BHOPATKAR MY, FARACI FM, MALINOW MR, HEISTAD DD. – Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. **J. Clin. Invest.** 98: 24-29, 1996.
- LENTZ SR. – Homocysteine and vascular dysfunction. **Life Sci.** 61:1205–1215., 1997
- LENTZ SR, ERGER RA, DAYAL S., MAEDA N., MALINOW MR., HEISTAD DD AND FRACI FM. – Folate dependence of hyperhomocysteinemia and vascular dysfunction in cystathionine beta-synthase-deficient mice. **Am. J. Physiol.** 279: H970-H975, 2000.

- LENTZ S.R., PIEGORS D.J. MALINOW M.R., HEISTAD D.D. – Supplementation of atherogenic diet with B vitamins does not prevent atherosclerosis or vascular dysfunction in monkeys. **Circulation**, 103(7):1006-1011, 2001.,
- LORIA CN, INGRAM DD, FELDMAN JJ, WRIGHT JD, MADANS JH. – Serum folate and cardiovascular disease mortality among US men and women. **Arch. Intern. Med.** 160(21): 3258-62, 2000.
- LOSCALZO J. – The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. **J. Clin. Invest.** 98: 5–7., 1996
- LUBEC B, FANG-KIRCHER S, LUBEC T, BLOM HJ, AND BOERS GHJ. – Evidence for McKusick's hypothesis of deficient collagen cross-linking in patients with homocystinuria. **Biochim. Biophys. Acta.** 1315:159–162., 1996
- LUSSIER-CACAN S, XHIGNESSE M, PIOLOT A, SELHUB J, DAVIGNON J, AND GENEST J JR. – Plasma total homocysteine in healthy subjects: Sex-specific relation with biological traits. **Am. J. Clin. Nutr.** 64: 587–593., 1996
- MALINOW, MR. – Hyperhomocyst(e)inemia. A common and easily reversible risk factor for occlusive atherosclerosis. **Circulation**. 81: 2004-6, 1990.
- MALINOW, MR. – Homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases. **J. Intern. Med.** 236: 603-17, 1994.
- MALINOW, MR., SEXTO, G., AVERBUCH, M., GROSSMAN, M., WILSON, D., UPSON, B. – Homocyst(e)ine in daily practice: levels in coronary artery disease. **Coronary artery dis.** 1:215-20, 1990.
- MALINOW MR, DUELL PB, HESS DL, ANDERSON PH, KRUGER WD, PHILLIPSON BE, GLUCKMAN RA, BLOCK PC AND UPSON BM. – Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with

- folic acid in patients with coronary heart disease. **N. Engl. J. Med**, 338:1009-1015, 1998.
- MALINOW, MR., ANDREW, GB., RONALD, MK. – Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular disease. A statement for healthcare professionals from the nutrition committee, American Heart Association. **Circulation**. 99: 178-182, 1999.
- MALINOW MR, KANG SS, TAYLOR LM. et al. – Prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. **Circulation**, 79:1180-1188, 1989.
- MANSOOR MN, KRISTENSEN O, HERVIG T. et al. – Plasma total homocysteine response to oral doses of folic acid and pyridoxine hydrochloride (vitamin B6) in healthy individuals. Oral doses of vitamin B6 reduce concentrations of serum folate. **Scand. J. Clin. Lab. Invest**. 59:139-146, 1999.
- MANSOOR MA, BERGMARK C, SVARDAL AM, LONNING PE, UELAND PM, – Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease: homocysteine and peripheral vascular disease. **Arterioscler. Thromb**. 15:232-240, 1995
- MANSOOR MA, GUTTORMSEN A, FISKESTRAND T, REFSUM H, UELAND PM AND SVARDAL AM. – Redox status and protein binding of plasma aminothiols during the transient hyperhomocysteinemia that follows homocysteine administration. **Clin. Chem**. 39: 980-985., 1993.
- MANSOOR MA, UELAND PM AND SVARDAL AM – Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with

- hyperhomocysteinemia due to cobalamin deficiency. **Am. J. Clin. Nutr.** 59: 631-635., 1994.
- MARKS DB, MARKS AD, SMITH CM. – ***Basic Medical Biochemistry: a clinical approach.*** Williams and Wilkins, Baltimore MD, 1996.
- MASON J.B., MILLER JW. – The effects of B12, B6 and folate on blood homocysteine levels. In Sauberlich HE, Machlin LJ., eds. ***Beyond deficiency: new views on the function and health effects of vitamins.*** New York: the New York Academy of Sciences, 360-362, 1992.
- MATO JM., ALVAREZ L., ORTIZ P., PAJARES MA. – S-Adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. **Pharmacol. Ther.** 73: 265-80, 1997.
- McCULLY, KS. – ***The Homocysteine Revolution***, Keats Publishing, Inc. New Canaan, Connecticut. 1997.
- McCULLY KS. – Homocysteine and vascular disease. **Nature Med.** 2: 386-389. 1996
- McCULLY KS. – Homocysteine theory of arteriosclerosis:Development and current status. **Atherosclerosis Ver.** 11:157-246, 1983.
- McCULLY KS. – Vascular pathology of homocysteinemia: Implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. **Am. J. Path.** 56:111-28, 1969.
- McCULLY K.S., OLSZEWSKI A J. AND VEZERIDIS.M.P. – Homocysteine and lipid metabolism in atherogenesis: effect of the homocysteine thiolactonyl derivatives. Thioretinaco and thioretinamide. **Atherosclerosis**, 83: 197-206, 1990.
- McKAY DL, PERRONE G, RASMUSSEN H, DALLAL G, BLUMBERG JB., – Multivitamin/Mineral supplementation improves plasma B-vitamin status and

- homocysteine concentration in healthy older adults consuming a folate-fortified diet. **J. Nutr.** 130: 3090-3096, 2000.
- McKEEVER WP, WEIR DG, MOLLOY A, SCOT JM. – Betaine-homocysteine methyltransferase: Organ distributions in man pig and rat subcellular distribution. **Clin. Sci.** 81: 551-556, 1991.
- McKINLEY JC, McNULTY H, McPARTLIN J, STRAIN JJ, PENTIEVA K, WARD M, WEIR DG, SCOTT Mj. – Low-dose vitamin B-6 effectively lowers fasting plasma homocysteine in healthy elderly persons who are folate and riboflavin replete. **Am. J. Clin. Nutr.** 73: 759-764. 2001.
- MELYNK S, POGRIBNA M, POGRIBNY IP, YI P, JAMES SJ. – Measurement of plasma and intracellular S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine utilizing coulometric electrochemical detection: Alterations with plasma homocysteine and pyridoxal 5'-phosphate concentrations. **Clin. Chem.** 46: 265-272. 2000.
- MIDORIKAWA S, SANDA H, HASHIMOTO S AND WATANABE T. – Enhancement by homocysteine of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and secretion from vascular endothelial and smooth muscle cells. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 272: 182-185., 2000.
- MIJATOVIC V, KENEMANS P, JAKOBS C, VAN BALL MV, PETERS-MULLER ER AND VAN DER MOOREN MJ. – A randomized controlled study of the effects of 17 beta-estradiol-dydrogesteron on plasma homocysteine in postmenopausal women, **Obstet. Gynecol.** 91: 432-436, 1998.
- MOLGAARD J., MALINOW MR., LASSVIK C, HOLM AC., UPSON B., OLSSON AG. – Hyperhomocyst(e)inaemia: an independent risk factor for intermittent claudication. **J Intern. Med.** 231: 273-9, 1992.

- MOLLOY AM , DALY S, MILLS JL, KIRKE PH, WHITEHEAD AS, RAMSBOTTOM D., CONLEY MR., WEIR DG AND SCOTT JM. – Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implication for folate intake recommendations:, **Lancet**, 349: 1591-93,1997.
- MORRISON HI, SCHAUBEL D, DESMEULES M AND WIGLE DT. – Serum folate and risk of fatal coronary heart disease. **JAMA**, 275:1893-1896., 1996.
- MORSHAROV E, CRANFORD MR AND BANERJEE R. – The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. **Biochemistry**, 39:13005-13011, 2000.
- MUDD SH., LEVY HL. Et al. – Disorders of transsulfuration: In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS., Valle D. eds. ***The Metabolic and Molecular Bases of Inherited disease***. 1st edn. Vol 1. New York: McGraw-Hill, 1279-327, 1995.
- MUDD SH, SKOVBY F., LEVY HL et al. – The natural history of homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency. **Am. J.Hum. Genet.** 37:1-3, 1985
- MULLER T, HAIDINGER D, LUFT C, HORVATH W, POELZ W,HALTMAYER M. – Associations between erythrocyte mean corpuscular volume and peripheral and arterial disease in male subjects: a case control study. **Angiology**, 52(9): 605-13, 2001.
- MUNDAY R – Toxicity of thiols and disulphides: Involvement of free-radical species. **Free Radic. Biol. Med.** 7: 659-673. 1989.
- MURDOCH JC., RODGER JC., RAO SS. FLETCHER CD, DUNNINGAN MG. – Down's syndrome: an atheroma-free model?. **Br. Med. J.** 2: 26-8, 1977.

- NALLAMTHU BK, FENDRICK AM, RUBENFIRE M, SAINT S, BANDEKAR RR, – OMENN GS. Potential clinical and economic effects of Homocyst(e)ine lowering. **Arc. Internal. Med.** 160(22): 3506-3412, 2000.
- NAPPO F, DeROSA N, MARFELLA R, DeLUCIA D, INGROSSO D., PERNA AG, FARZATI B, AND GIUGLIANO D. – Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. **JAMA**, 281: 2113-2118, 1999.
- NISHINAGA M, OZAWA T, AND SHIMADA K. – Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. **J. Clin. Invest.** 92: 1381–1386., 1993
- NORLUND L, GRUBB A, FEX G. – The increase of plasma homocysteine concentrations with age in part of the deterioration of renal function as determined by plasma cystatin. **Clin. Chem. Lab. Med.** 36:175-178, 1998.
- NYGÅRD O, REFSUM H, UELAND PM, AND VOLLSET SE – Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: The Hordaland Homocysteine Study. **Am. J. Clin. Nutr.** 67: 263–270., 1998
- NYGARD O, VOLLSET SE, REFSUM H, STENSVOLD I., TVERDAL A, NORDREHAUG JE, UELAND PM AND KVALE G. – Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland homocysteine study. **JAMA**, 274:1526-1533.
- NYGARD O., S.E. VOLLSET, H. REFSUM, L.BRATTSTROM AND P.M. UELAND, – total Homocysteine and cardiovascular disease **J. Int. Med.** 246: 425-454. 1999
- O'LEARY K, SHEEHY PJ. – Influence of folic acid-fortified foods on folate status in a folate depletion-repletion rat model **Br. J. Nutr.** 85(40): 441-6, 2001.

- OLSZEWSKI AJ AND MCCULLY KS. – Homocysteine content of lipoproteins in hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, 88:61–69., 1991
- OLSZEWSKI AJ AND MCCULLY KS. – Homocysteine metabolism and the oxidative modification of proteins and lipids. **Free Radic. Biol. Med.** 14: 683–693., 1993
- OUTINEN PA, SOOD SK, LIAW PCY, SARGE KD, MAEDA N, HIRSH J, RIBAU J, PODOR TJ, WEITZ JI, AND AUSTIN RC. – Characterization of the stress-inducing effects of homocysteine. **Biochem. J.** 332: 213–221. 1998.
- PAGAN K, HOU J, GOLDENBERG RL, CLIVER SP, TAMURA T. – Effect of smoking on serum concentrations of total homocysteine and B vitamins in mid pregnancy. **Clinica Chimica. Acta.** 306:103-109, 2001.
- PANCHARUNITI n., LEWIS C.A., SAUBERLICH H.E. PERKINS L.L., GO R.C.P., ALVAREZ J.º, MCALUSO M., ACTON T.T., COPELAND R.B. COUSINS ºL., GORE T.B. CORNWELL P.E. AND ROSEMAN J.M. – Plasma homocyst(eine), folate and vitamin B-12 concentrations and risk for early onset coronary artery disease. **Am. J. Clin. Nutr.** 59: 940-948, 1994.
- PANGANAMALA RV, KARPEN CW AND MEROLA AJ – Peroxide mediated effects of homocysteine on arterial proastacyclin synthesis. **Prostaglandins. Leuk. Med.** 22: 349-356. 1986.
- PASTEUR L – Address to the Fraternal Association of Former Students of Ecole Central de Artes et Manufactures, Paris, Nay 15, 1885 em **Familiar Medical Quotations**, Ed. Strauss MD. Little Brown and Company, Boston, 1968.
- PERRY DJ . – Hyperhomocysteinaemia. **Bailliere's Clin. Haematology**, 12(3): 451-477, 1999.

- PERRY I.J., REFSUM H., MORRIS R.W., EBRAHIM S.B., UELAND P.M., SHAPRE AG. – Prospective study of serum homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. **Lancet**, 346:1395-8, 1995
- PETRI M, ROUBENOFF R, DALLAL GE, NADEAU MR, SELHUB J, AND ROSENBERG IH. – Plasma homocysteine as a risk factor for atherothrombotic events in systematic lupus erythemato-sus. **Lancet**, 348:1120–1124., 1996
- PFEIFFER CM, HUFF DL AND GUNTER EW . – Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. **Clin. Chem.** 45: 290-292, 1999.
- QI LING AND K.A HAJJAR – Inhibition of Endothelial Cell Trhomoboresistance by Homocysteine. **J. Nutr.** 130: 373S-376S, 2000.
- QUINILVAN EP, McPARTLIN J, McNUTTY H, WARE M, STRAIN JJ, WEIR DG, SCOTT JM. – Importance of both folic acid and vitamin B12 in reduction of the risk of vascular disease., **Lancet**, 359: 227-228, 2002.
- RASMUSSEN LB, OVESEN L, BULOW I, KNUDSEN N, LAURBERG P, AND PERRILD H. – Folate intake, lifestyle factors, and homocysteine concentrations in younger and older women. **Am. J. Clin. Nutr.** 72:1156–1163., 2000.
- RAY JG, COLE DEC, BOSS SC – An Ontario-wide study of vitamin B12, Serum folate, and red cell folate levels in relation to plasma homocysteine: is a preventable public health issue on the rise. **Clinical Biochemistry**, 33(5): 337-343, 2000.

- RAYAN M, ROBINSON K, CLARKE R, REFSUM H, UELAND P, GRAHAM I – Vitamin B6 and folate reduce homocysteine concentrations in coronary artery disease. **Ir. J. Med. Sci**, 162: 197, 1993.
- REFSUM H, HELLAND S, UELAND PM. – Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. **Clin. Chem.** 31: 624-8, 1985.
- RIDDEL LJ., CHISHOLM ^a, WILLIAMS S., AND MANN JI. – Dietary strategies for lowering homocysteine concentrations. **Am. J. Clin. Nutr.** 71:1448-54, 2000.
- RIMM EB, WILLETT WC, HU FB, SAMPSON L, COLDITZ GA, MANSON JE, HENNEKENS C, AND STAMPFER MJ. – Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. **JAMA**, 279: 359-364. 1998.
- ROBINSON K, ARHEART K, REFSUM H, BRATTSTRÖM L, BOERS G, UELAND P, RUBBA P, PALMA-REIS R, MELEADY R, DALY L, WITTEMAN J, AND GRAHAM I. – Low circulating folate and vitamin B6 concentrations: Risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. **Circulation**, 97: 437–443., 1998
- ROBINSON K, MAYER EL, MILLER DP, GREEN R, Van LENTE F, GUPTA A, KOTTKE-MARCHANT K, SAVON SR, SELHUB J, NISSEN SE, KUTNER M, TOPOL EJ, JACOBSEN DW. – Hyper homocysteinemia and low pyridoxal phosphate. Common and independent reversible risk factors for coronary artery disease. **Circulation**, 92:,2825-2830, 1995.
- RODGERS GM AND CONN MT – Homocysteine an atherogenic stimulus, reduces protein C activation b arterial and venous endothelial cells. **Blood**, 75:,895-901. 1990

- ROSENBLATT DS – Inherited disorders of folate transport and metabolism. Em Scriver CR, Beaudet AI, Sly WS and Valle D, editors, ***Metabolic basis of inherited disease***. New York, McGraw-Hill, 3111-3128.1995
- SAMPSON DA., O'CONNOR, **Nutr. Res.** 9: 259, 1989.
- SANCHEZ SE, ZHNG C, MALINOW NR, WAREJAUREGUI S, LARABURE G., WILLAMS MA. – Plasma folate, vitamin B12 and homocyst(e)ine concentrations in preeclamptic and normotensive Peruvian women. **Am. J. epidemiol.** 153(5): 474-80, 2001.
- SAW SM, YUAN JM, ONG CN, ARAKAWA K, LEE HP, COETZEE GA, YU MC. – Genetic, dietary, and other lifestyle determinants of plasma homocysteine concentrations in middle- aged and older Chinese men and women in Singapore. **Am. J. Clin. Nutr.** 73(2): 232-9, 2001.
- SCHAEFER EJ . – Lipoproteins, nutrition, and heart disease. **Am. J. Clin. Nutr.** 75(2):191-212, 2002
- SCHIMKE RN., McKUSICK VA., HUANG T., POLLAC AD. – Homocystinuria. Studies of 20 families with 38 affected members. **JAMA**, 193: 87-95, 1965.
- SCHNEEDE J, REFSUM H, UELAND PM – Biological and environmental determinants of plasma homocysteine. **Seminars in Thromobosis and Hemostasis**, vol 26: 263-280, 2000.
- SCHÖNEICH C, ASMUS K-D, DILLINGER U, AND VON BRUCHHAUSEN F – Thiyl radical attack on polyunsaturated fatty acids: A possible route to lipid peroxidation. **Biochem. Biophys. Res. Commun** 161:113–120., 1989
- SCOTT J. WEIR D. – Homocysteine and cardiovascular disease. **QJM**, 89: 561-563, 1996.

- SELHUB J, JACQUES PF, BOSTOM AG., et al. – Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. **New Engl.J.Med.** 332:286-91, 1995.
- SELHUB J., JACQUES PF., WILSON PWF. RUSH D., ROSENBER IH. – vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. **JAMA**, 270:2693-8, 1993.
- SELHUB J AND MILLER JW. – The pathogenesis of homocysteinemia: Interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. **Am. J.Clin. Nutr.** 55:131-138, 1992.
- SILBERBERG J, CROOKS R, FRYER J, WLODARCZYK J, NAIR B, GUO XW, XIE LJ, AND DUDMAN N. – Gender differences and other determinants of the rise in plasma homocysteine after L-methionine loading. **Atherosclerosis**, 133:105–110., 1997
- SIMON MO., ROSOLOVA H – A population study of the influence of beer consumption on folate and homocysteine concentrations. **Eur. J. Clin. Nutr** 55(7):605-9, 2001.
- SMOLIN LA, SCHNEIDER JÁ – Measurement of total plasma cysteamine using high performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Ann. Biochem**, 168:374-379, 1988.
- SPARROW CP AND OLSZEWSKI J – Cellular oxidation of low density lipoprotein is caused by thiol production in media containing transition metal ions. **J. Lipid. Res.** 34:1219-1228. 1993
- STABLER S.P. MARCELL PD.D. POWELL ER. et al. – Evaluation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency

- detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. **J. Clin. Invest.** 81:466-74, 1988.
- STAMFER, MJ., MALINOW, MR., WILLETT, WC., NEWCOMER, LM., UPSON, B., ULLMANN, D., TISHLER, PV., HENNEKENS, CH. – A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US Physicians. **JAMA**, 268: 877-81, 1992.
- STAMLER JS, OSBORNE JÁ, JARAKI O, RABBANI LE, MULLINS M, SINGEL D AND LOSCALZO J – Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. **J. Clin. Invest.** 91: 308-318. 1993.
- STAMLER JS AND SLIVKA A – Biochemical chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. **Nutr. Rev.** 54:1-30, 1996.
- STARKEBAUM G AND HARLAN JM. – Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. **J. Clin. Invest.** 77:1370–1376., 1986
- SUDEN SLF., RENDUCHINTALA MS. PARK EI. MIKLASZ SD. GARRAW TA. – Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. **Arch. Biochem Biophys.** 345:171-4, 1997.
- SUPERKO H.R. – New aspects of risk factor for the development of atherosclerosis, including small low-density lipoprotein, homocyst(e)ine and lipoproteína(a), **Current Science**, 1995, 347-354., 1995
- TAOKA S, OHJA S, SHAN X, KRUGER WD AND BANERJEE R. – Evidence for heme-mediated redox regulation of human cystathionine beta-synthase activity, **J. Biol. Chem.** 273:25179-25184. 1998.

- TAWAKOL A, OMLAND T, GERHARD M, WU JT AND CREAGER MA. – Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. **Circulation**, 95:1119-1121. 1997.
- TAYLOR LM. Jr, DeFRANG RD., HARRIS EJ Jr., PORTER JM. – The association of elevated plasma homocyst(e)ine with progression of symptomatic peripheral arterial disease. **J.Vasc. Surg.** 13:128-36, 1991.
- TELLING OV, SIPS JHM . – Bioanalysis of the investigational antitumor drug 5,10-dideaza-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **J. Chrom.** 576:158-162, 1992.
- TONSTAD S, REFSUM SIVERTSE M – Relation of total homocysteine and lipid levels in children to premature cardiovascular death in male relatives., **Pediatr. Res.** 40: 47-52
- TSAI J-C, PERRELLA MA, YOSHIZUMI M, HSIEH C-M, HABER E, SCHLEGEL R, AND LEE M-E – Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: A link to atherosclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91: 6369–6373., 1994.
- TSAI JC, WANG H, PERRELLA MA, YOSHIZUMI M, SIBINGA NES, TAN LC, HABER E, CHANG THT, SCHLEGEL R, AND LEE ME. – Induction of cyclin a gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. **J. Clin. Invest.** 97:146–153., 1996.
- TYAGI SC. – Homocysteine redox receptor and regulation of extracellular matrix components in vascular cells. **Am. J. Physiol.** 274: C396–C405., 1998.
- UBBINK JB, VERMAAK WJH, BENNETT, JM., BECKER PJ. VAN STADEN, DA. – The prevalence of homocysteinemia and hypercholesterolemia in

- angiographically defined coronary heart disease. **Klin. Wochenschr.** 69: 527-34, 1991a.
- UBBINK JB, VERMAAK WJH, BISSBORT S – rapid high performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum. **J. Chromat.** 565: 441-446, 1991b.
- UBBINK JB, VERMAAK WJH, VAN DER MERWE A, BECKER PJ. – The effect of blood sample aging and food consumption on plasma total homocysteine levels. **Clin. Chim. Acta.** 207:119-28, 1992
- UBBINK JB, VERMAAK WJH, VAN DER MERWE A, BECKER PJ. – Vitamin B12, vitamina B6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia, **American Journal of Clinical Nutrition**, January 57: 47-53, 1993.
- UBBINK JB. – Vitamin nutrition status and homocysteine: An atherogenic risk factor. *Nutr Rev* 52:383–387., 1994.
- UBBINK JB. – Should all elderly people receive folate supplements?. **Drugs Aging**, 13: 415-420, 1998.
- UELAND PM, MANSOOR MA, GUTTORMSEN AB, MÜLLER F, AUKRUST P, REFSUM H, AND SVARDAL AM. – Reduced, oxidized and protein-bound forms of homocysteine and other aminothiols in plasma comprise the redox thiol status – A possible element of the extracellular antioxidant defense system. **J. Nutr.** 126:1281S-1284S., 1996.
- UELAND, PM., REFSUM, H., BRATTSTROM L. – Plasma homocysteine and cardiovascular disease in: Francis RB Jr, ed. **Atherosclerotic cardiovascular disease, hemosrasis, and endothelial funtion**. New York: Marcel Dekkar, 183-236, 1992.

- UELAND PM, REFSUM H, STABLER SP, MALINOW MR, ANDERSSON A, ALLEN RH. – Total homocysteine in plasma or serum: Methods and clinical applications. **Clin. Chem.** 39:1764-1779, 1993.
- UELAND PM AND REFSUM H. – Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: Plasma levels in health, disease and drug therapy. **J. Lab. Clin. Med.** 114:473-501, 1989.
- UNDAS A, WILLIAMS EB, BUTENAS S, ORFEO T, AND MANN KG. – Homocysteine inhibits inactivation of factor Va by activated protein C. **J. Biol. Chem.** 276:4389–4397., 2001
- UNGVARI Z, PACHER P, RISCHÁK K, SZOLLÁR L, AND KOLLER A . – Dysfunction of nitric oxide mediation in isolated rat arterioles with methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 19:1899–1904., 1999.
- UPCHURCH GR JR, WELCH GN, FABIAN AJ, FREEDMAN JE, JOHNSON JL, KEANEY JF JR, AND LOSCALZO J. – Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. **J. Biol. Chem.** 272:17012–17017., 1997
- VAHERISTO LT, OLLILAINEN V, VARO P . – Liquid chromatographic determination of folate monoglutamates in fish, meat, egg and dairy products consumed in Finland. **J. AOAC Inter.** 80(2): 373-378, 1997a.
- VAHTERISTO L, LEHIKONEN K, OLLILAINEN V, VARO P. . – Application of an HPLC assay for the determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland. **Food Chem.** 59(4): 589-597, 1997b
- VAN DEN BERG M, STEHOUWER CDA, BIERDRAGER E, AND RAUW-ERDA JA – Plasma homocysteine and severity of atherosclerosis in young

- patients with lower-limb atherosclerotic disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 16:165–171. 1996
- Van den BERG M, BOERS GHJ, FRANKEN DG, BLOM HJ, Van KEMP GJ, JAKOBS C, RAUWERDA JÁ, KLUFT C, AND STEHOUWERT CDA. – Hyperhomocysteinaemia and endothelial dysfunction in young patients with peripheral arterial occlusive disease. **Eur. J. clin. Invest.** 25:176-181, 1995.
- VAN DER GRIEND R, BIESMA DH, HAAS FJ, FABER JA, DURAN M, MEUWISSEN OJ, AND BANGA JD. – The effect of different treatment regimens in reducing fasting and postmethionine-load homocysteine concentrations. **J. Intern. Med.** 248: 223–229.,2000
- VENTURA P, PANINI R, VERLATO C, SCARPETTA G, AND SALVIOLI G. – Peroxidation indices and total antioxidant capacity in plasma during hyperhomocysteinemia induced by methio-nine oral loading. **Metabolism** 49: 225–228.,2000
- VERHAAR MC, STROES E, RBELINK TJ . – Folates and cardiovascular disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 22(1): 6-13, 2002.
- VERHOEF P, HENNEKENS CH., MALINOW MR., KOK FJ., WILLETT WC., STMPFER MJ. – A propective study of plasma homocyst(e)ine and risk of ischemic stroke. **Stroke**, 25:1924-30, 1994.
- VERHOEF, P., STAMFER, MJ. – Prospective studies of homocysteine and cardiovascular disease. **Nutr. Ver.** 53: 283-8, 1995.
- VERMEULEN EG, STEHOUWER CD, TWISK JW, VAN DEN BM, DE JONG SC, MACKAAY AJ, VAN CAMPEN CM, VISSER FC, JAKOBS CA, BULTERJIS EJ, AND RAUWERDA JA – Effect of homocysteine-lowering treatment with

- folic acid plus vitamin B6 on progression of subclinical atherosclerosis: A randomized, placebo-controlled trial. **Lancet**, 355: 517–522.,2000
- VESTER B, RASMUSSEN K. . – High performance liquid chromatography method for rapid and accurate determination of homocysteine in plasma and serum. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.** 29: 549-554, 1991.
- Von EOCKERDSTEIN,A., MALINOW, MR., UPSON, B., HEINRICH,J., SCHULTE,H., SCHONFELD, R., KOHLER, E., ASSMANN, G. – Effects of age, lipoproteinas, and hemostatic parameters on the role of homocust(e)inemia as a cardiovascular risk factor in men. **Arteriosclerosis. Thromb.** 14: 460-4, 1994.
- VOUTILAINEN S, MORROW JD, ROBERTS LJ II, ALFTHAN G, ALHO H, NYYSSÖNEN K, AND SALONEN JT – Enhanced in vivo lipid peroxidation at elevated plasma total homocysteine levels. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 19:1263–1266., 1999
- VOUTILAINEN S., MORROW J.D., ROBERTS L.J., ALFTHAN G., ALHO H., NYYSSONEN K., SALONEN J.T. – Enhanced in vivo lipid peroxidation at elevated plasm total homocysteine levels., **Arterioscler. Trhomb. Vasc. Biol.** 19:1263-1266., 1999.
- WALD DS, BISHOP L, WALD NJ, LAW M, HENNESSY E, WEIR D, MCPARTLIN J, SCOTT J. – Randomaized trail of folic acid supplimentation and serum homocysteine levels. **Arch. Intern. Med.** 161(5): 695-700, 2001.
- WALL RT, HARLAN JM, HARKER LA AND STRIKER GE. – Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: A model for the study of vascular injury. **Thromb. Res.** 18:113-121. 1980.

- WANG H, YOSHIKUNI M, LAI KH, TSAI JC, PERRELLA MA, HABER E, AND LEE ME. – Inhibition of growth and p21ras methyl-ation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. **J. Biol. Chem.** 272:25380–25385., 1997
- WANG J, DUDMAN NPB AND WILCKEN DEL – Effects of homocysteine and related compounds on prostacyclin production by cultured human vascular endothelial cells. **Thromb. Haemost.** 70:104-1052. 1993.
- WELCH GN LOSCALZO J. – Homocysteine and atherothrombosis. **N. Engl. J. Med.** 338: 1042-1050, 1998.
- WILCKEN DEL, WILCKEN B. – The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. **J. Clin. Invest.** 57:1079-82, 1976.
- WILCKEN DE, WILCKEN B. – B vitamins and homocysteine in cardiovascular disease and gaing. **Ann. NY Acad. Sci.** 854:361-370, 1998.
- WILLIAM B. KANNEL, M.D. E THOMAS J. THOM, B.A. – **The Heart**, 1990
- WILLIAMS, RR., MALINOW, MR., HUNT, SC., UPSON, B., WU, LL., HOPKINS, PM., STULTS, BN., KUIDA, H. – Hyperhomocyst(e)inemia in Utah siblings with early coronary disease. **Coronary Artery. Dis.** 1:681-5, 1990.
- WOO KS, CHOOK P, LOLIN YI, SANDERSON JE, METREWELI C, AND CELERMAJER DS. – Folic acid improves arterial function in adults with hyperhomocysteinemia. **J. Am. Coll. Cardiol.** 34: 2002–2006., 1999
- WOO KS, CHOOK P, LOLIN YI, CHEUNG ASP, CHAN LT, SUN YY, SANDERSON JE, METREWELI C AND CELERMAJER DS – Hyperhomocyst(e)inemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans. **Circulation**, 96:2542-2544. 1997.

WOOD JL AND GRAHAM A – Structural requirements for oxidation of low-density lipoprotein by thiols. **FEBS Lett.** 366: 75-80, 1995.

WOODSIDE JV, YOUNG IS, YARNELL JWG, McMASTER AND EVENS AE. – The effects of oral vitamin supplementation on cardiovascular risk factors. **Proc. Nutr. Soc.** 56: 479-488, 1997.

WU L.L. WU J., HUNT S.C., JAMES B.C., VINCENT G.M. WILLIAMS R.R., AND HOPKINS P.N. – Plasma Homocyst(e)ine as a risk factor for early familial coronary artery disease. **Clin. Chem.** 40(4): 552-561., 1994

www.saude.gov.br

YAP S, NAUGHTEN ER, WILCKEN B, WILCKEN DE, AND BOERS GH. – Vascular complications of severe hyper-homocysteinemia in patients with homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: Effects of homocysteine-lowering therapy. **Semin. Thromb. Hemost.** 26: 335–340, 2000

YI P, MELNYK S, POGRIBNA M, POGRIBNY IP, HINE RJ, AND JAMES SJ – Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. **J. Biol. Chem.** 275: 29318–29323., 2000

YU HH, JOUBRAN R, ASMAI M, LAW T, SPENCER A, JOUMA M, RIFAI N. – Agreement among four homocysteine assays and results in patients with coronary atherosclerosis and controls. **Clin. Chem.** 46: 258-264.

ANEXOS

Anexo I – Termo de Consentimento

Hiperhomocisteinemia e o Risco Cardiovascular

Responsável: Dr. Edson Rodrigues

RG: 6.413.205

Endereço: Av. São Francisco de Assis, 218 - Bragança Paulista

Fone: (011) 7844.8350

O abaixo assinado (nome, idade, RG, endereço)

declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supra-citado, de responsabilidade do Prof. Dr. Edson Rodrigues, sob supervisão dos médicos Newton Carlos Polimeno e José Jaime da Silva Teles Filho do HUSF. O abaixo-assinado está ciente que:

1. O objetivo da pesquisa é verificar os níveis plasmáticos de homocisteína e vitaminas B12, B6 e ácido fólico, e que para tal, serão coletados de 5 a 10 ml de sangue através de punção de veia antecubital.
2. A participação neste estudo não lhe acarretará nenhum benefício terapêutico.
3. Obteve todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a participação da referida pesquisa.
4. Os nome e dados referentes aos voluntários participantes da pesquisa serão mantidos em sigilo, e os autores não os identificarão pôr ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.
5. Poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da USF para apresentar recursos ou reclamações em relação a pesquisa.

Bragança Paulista, de de .

Nome do Voluntário: _____

Assinatura: _____

Anexo II - Carta da Comissão da Ética

UNIVERSIDADE
SÃO FRANCISCO

20 ANOS EDUCANDO PARA PAZ

Bragança Paulista, 03 de dezembro de 1997

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA -USF

Estudo: Hiperhomocisteinemia e o risco cardiovascular

Autores Prof. Dr. Édson Rodrigues

O CEP-USF, em sua reunião ordinária realizada em 28 de novembro de 1997, analisou o projeto supra-citado, não encontrando nele qualquer infração dos códigos de ética em pesquisa

Parecer: o referido projeto está de acordo com as normas que regem a ética em pesquisa

Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior
Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade São Francisco

Anexo III – Avaliação Nutricional Inquérito – 1

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Faculdade de Ciências Médicas

Nome: _____ RG _____ Data _____

Peso: _____ Estatura: _____ IMC: _____

Frequência de Consumo de Alimentos

Alimento	Nunca/ Raramente	1/Sem	2 -4/ Sem	> 4/ Sem	1/Dia	+1/Dia	Quantidade
Carne de Boi/Vaca							
Frango							
Fígado							
Ovo							
Leite - tipo							
Batata							
Couve							
Brócolis							
Escarola							
Espinafre							
Alface							
Aveia							
Observações:							

Anexo V – Valores da ingestão diária de vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico por indivíduos da zona urbana e rural.

Parâmetros Estudados	Urbana			Rural			<i>p</i>
	Média	DP	EPM	Média	DP	EPM	
Vitamina B ₆ (mg/dia)	2,14	3,62	0,39	0,47	0,42	0,046	0,00*
Vitamina B ₁₂ (μg/dia)	5,77	8,25	0,90	6,63	7,25	0,780	0,473
Folato (μg/dia)	73,53	62,32	6,84	58,57	50,48	5,44	0,041*

* $p < 0.05$

Anexo VI - Médias dos níveis plasmáticos das vitaminas B₆ e B₁₂, ácido fólico, Hcy, TG, colesterol total, VLDL, LDL e HDL, dos indivíduos das zonas urbana e rural.

Parâmetros estudados	Urbano		Rural		<i>p</i>
	Média	DP	Média	DP	
Vitamina B ₆ (nmol/L)	0.187	0,06	0.16	0,05	0,000*
Vitamina B ₁₂ (pg/mL)	350,08	87,10	386,01	149,53	0,057
Folato (nmol/L)	18.62	3.60	8.85	4,27	0,000*
Hcy (μmol/L)	12,82	5,58	16,56	9,22	0,002*
TG (mg/dL)	100,86	49,88	141,37	73,96	0,000*
Colesterol (mg/dL)	192,82	30,96	173,96	34,29	0,000*
VLDL(mg/dL)	20,17	9,97	28,27	14,79	0,000*
LDL(mg/dL)	131,53	30,85	107,10	34,81	0,000*
HDL-colesterol (mg/dL)	41,11	12,27	38,58	23,47	0,380

* $p < 0.05$

Anexo VII – Valores de Referências para os níveis plasmáticos das Vitaminas B₆, B₁₂ e Ácido Fólico bem como os níveis desejáveis dos lipídios TG, Colesterol, LDL, e HDL

Vitamina B ₆ (nmol/L)	0,73 - 1,38
Vitamina B ₁₂ (pg/mL)	211 – 911
Ácido Fólico(nmol/L)	2,5 – 45.4
TG(mg/dL)	<200
Colesterol total(mg/dL)	<200
LDL-colesterol(mg/dL)	<130
HDL-colesterol(mg/dL)	>55 (homens) >65(mulheres)