

**UNIVERSIDADE DO PORTO  
2º CURSO DE MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA  
ESPECIALIZAÇÃO EM BIOESTATÍSTICA**

**HIPERHOMOCISTEINEMIA NO TRANSPLANTE RENAL  
PREVALÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO E DETERMINANTES**

**ISABEL MARIA DA SILVA FONSECA**

**PORTO, 1999**

**UNIVERSIDADE DO PORTO**  
**2º CURSO DE MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA**  
**ESPECIALIZAÇÃO EM BIOESTATÍSTICA**

**HIPERHOMOCISTEINEMIA NO TRANSPLANTE RENAL**  
**PREVALÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO E DETERMINANTES**

**ISABEL MARIA DA SILVA FONSECA**

**PORTO, 1999**



**HIPERHOMOCISTEINEMIA NO TRANSPLANTE RENAL**  
**Prevalência, Distribuição e Determinantes**

*Dissertação de Mestrado em Saúde Pública,  
Área de Especialização em Bioestatística,  
apresentada à Universidade do Porto.*

**Discente:** Isabel Maria da Silva Fonseca

**Orientador:** Professora Doutora Denisa Mendonça

**Co-Orientador:** Dr. António Castro Henriques

**Porto, 1999**

*Aos meu pais que me deram a vida, o carinho e todo o apoio para caminhar.*

*Aos meus irmãos, Rui, Tita e Susana, que são os maiores amigos e confidentes de toda a minha vida.*

*Aos meus familiares e amigos que partilharam comigo as dificuldades e compreenderam a minha ausência em compromissos familiares e sociais.*



## PRÓLOGO

A Dissertação de Mestrado que a seguir se apresenta é resultado de muito trabalho, inúmeras dificuldades e algumas desilusões. Compreendo agora que a elaboração de uma dissertação vai muito além da concepção de um projecto, da recolha e análise de dados, da interpretação e discussão dos resultados, da apresentação de conclusões. Mais importante que tudo isso é conseguir aceitar as limitações e dificuldades não planeadas. É persistir e não desiludir. É conseguir não desistir.

Este estudo não foi baseado num projecto pré definido. Os dados não foram analisados a partir de uma base pré concebida. Tudo foi efectuado propositadamente para apresentar este trabalho como Dissertação de Mestrado.

Idealizei um tema, elaborei um projecto, planeei um estudo e dediquei-lhe a maior atenção. Não planeei, no entanto, as dificuldades e os obstáculos que poderiam surgir. Não planeei o desinteresse e a falta de motivação de muitos. Não planeei que o decorrer do estudo não fosse ser a "perfeição" que eu imaginara. Tive dificuldade em aceitar essas "imperfeições".

A título de conforto, logo que as primeiras dificuldades surgiram, foi-me dito: "*É demasiado nova. Ainda não está habituada a estas coisas*". Mas não creio que alguma vez me vá habituar. Tenho consciência que o estudo não decorreu num local especificamente dedicado à Investigação. E deste modo as coisas que poderiam ser simples tornaram-se difíceis e, por vezes, desgastantes. Principalmente quando todas as fases do estudo, incluindo a parte curricular preparatória, foi realizada adicionalmente à actividade profissional de cerca de 45 horas semanais, num regime profissional instável e sem qualquer redução do horário de trabalho. Mas...

Nem tudo foi cinzento. Porque, apesar de tudo, valeu a pena. Tive a sorte de trabalhar com pessoas de quem gosto. Tive a sorte de contar com o apoio de pessoas de quem gosto muito. E isso permitiu, e conseguiu, esbater muitas das dificuldades.

Foram muitos os que, ao longo de todo o Mestrado, me apoiaram, ensinaram e estimularam. Um milhão de obrigados não chegaria para agradecer a todos que, de algum modo, o tornaram possível. Não poderei, no entanto, deixar de reconhecer e destacar algumas pessoas, sem as quais este trabalho dificilmente se concretizaria...

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Doutora Denisa Mendonça, minha orientadora, que aceitou assumir comigo o desafio que a actual pesquisa se propõe, pela sua disponibilidade, paciência, incentivo e segurança transmitidos.

Ao Dr. Castro Henriques, meu Co-Orientador, pelo apoio, colaboração e estímulo na orientação deste trabalho.

Ao Dr. Queirós, meu amigo e companheiro de armas, pela ajuda, ensinamento e amizade. Pelos esclarecimentos e sugestões. Por ter aceite colaborar neste trabalho e realmente ter colaborado. E por tudo.

Ao Dr. Mário João, pela disponibilidade que sempre demonstrou e pela boa disposição com que sempre me recebeu.

Ao Dr. Manuel Campos, Dr.<sup>a</sup> Irene Pereira e Dr. Cabêda, pela colaboração.

Ao Prof. Doutor Serafim Guimarães, Dr. Carvalho dos Santos e Dr. Benvindo Justiça, respectivamente, Directores de Serviço de Nefrologia, Química Clínica e Hematologia Clínica do Hospital Geral de Santo António, por terem permitido a realização deste estudo.

Aos Drs. Morais Sarmiento, Castro Henriques, Leonídeo Dias, Conceição Mota, Luísa Lobato, Idalina Beirão, Serafim Miguel e La Salette Martins pela colaboração e por atentarem pacientemente, e durante sete meses, as minhas mensagens diárias nos processos clínicos.

À enfermeira Maria José e todos os enfermeiros da Sala de Colheitas do Edifício da Consulta Externa do Hospital Geral de Santo António, em especial à enfermeira Deolinda, pela imensa simpatia, receptibilidade e cooperação, indispensáveis no trabalho realizado.

Às funcionárias administrativas Dores, Helena, Isaura, Noémia e Sílvia, pelo carinho e auxílio sempre prestado.

À Roche e Biblioteca do Hospital Geral de Santo António, pela disponibilidade e apoio facultados durante a fase de levantamento bibliográfico.

Ao Hospital Geral de Santo António por ter autorizado a reorganização do meu horário de trabalho durante a parte curricular do Mestrado e por ter permitido a realização do estudo que apresento nesta Dissertação.

Ao Serviço de Nefrologia do Hospital Geral de Santo António, pela amizade, colaboração e encorajamento.

A todos os professores do Mestrado, mas muito muito especialmente às Professoras Doutoras Alda de Sousa e Denisa Mendonça, pelos conhecimentos e experiências transmitidos. Pela receptividade e disponibilidade sempre demonstradas. E por me terem transmitido o entusiasmo pela Bioestatística e o terem aumentado de uma forma *exponencial*.

A todos os colegas de Mestrado pela amizade e convivência cultivadas no decorrer destes três últimos anos.

À minha colega e amiga Maria Menezes, que sempre acreditou em mim e desencadeou tudo isto. Pela sua amizade e encorajamento. Por estar sempre presente. E por tamanho auxílio no desempenho das minhas funções hospitalares. Sem ela a realização deste trabalho não teria sido possível.

Ao Dr. Mário de Oliveira, pela amizade, pelo frenesim das discussões criativas e por ter tolerado as minhas reclamações e rebeldias. Por ter acreditado em mim desde o início. Por nunca me ter desiludido por mais de cinco minutos. E por ter permitido a flexibilidade do meu horário de trabalho, em benefício das exigências do Mestrado, ao longo destes três anos.

Aos meus irmãos, amigos e companheiros de todos os dias, um agradecimento especial pelo apoio, afecto, paciência e por terem aturado todas as minhas dificuldades e crises momentâneas.

A todos os que me ajudaram a concretizar este trabalho, me animaram e incentivaram nas horas mais difíceis, nomeadamente naquelas em que me apeteceu desistir...

A todos aqueles que acreditaram em mim por instinto...

O meu agradecimento sincero e de gratidão.

## RESUMO

**Introdução:** A doença cardiovascular é uma complicação major do transplante renal (TR). A hiperhomocisteinemia (HHC) é considerada actualmente, como um factor de risco independente da aterosclerose. Apenas um número limitado de estudos analisou este "novo" factor de risco na população com TR. Do nosso conhecimento, nenhum deles português.

**Objectivos:** A realização deste estudo pretendeu: a) determinar a prevalência de HHC basal; b) analisar a distribuição dos valores plasmáticos de homocisteína basal total (HC) e de vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico; c) identificar, por análise univariada e multivariável, os determinantes da concentração de HC e os factores preditores da HHC numa amostra de transplantados renais.

**Participantes e Métodos:** Foi efectuado o doseamento analítico da HC e vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico (sérico e eritrocitário) em 202 indivíduos com TR (89 Mulheres; 113 Homens), com tempo de TR superior a 6 meses. Foram também determinadas outras variáveis analíticas potencialmente relevantes e recolhidos factores demográficos e associados ao pré e ao pós TR, nomeadamente a função renal, terapêutica actual e outros factores de risco para a aterosclerose. Considerou-se a presença de HHC quando os valores excederam os 15 µmol/L.

**Resultados:** A percentagem de HHC foi de 48.7%, atingindo maioritariamente o sexo masculino, que apresentou valores de HC 22% mais elevados que o sexo feminino. A HC correlacionou-se inversa e significativamente com a concentração de vitaminas B<sub>12</sub> ( $r=-0.27$ ,  $p<0.001$ ) e ácido fólico sérico ( $r=-0.36$ ,  $p<0.001$ ) e eritrocitário ( $r=-0.25$ ,  $p<0.01$ ). A correlação entre a HC e a creatinina, ureia e ácido úrico séricos foi positiva e significativa ( $r=0.55$ ,  $p<0.001$ ;  $r=0.49$ ;  $p<0.001$  e  $r=0.51$ ,  $p<0.001$ , respectivamente). Os valores de HC aumentaram significativamente com o tempo de TR ( $r=0.21$ ,  $p=0.003$ ) e com o número de dias de internamento após o TR ( $r=0.25$ ,  $p<0.001$ ). Não foi obtida correlação entre a idade e a HC. Por análise de regressão linear múltipla, o ácido úrico e creatinina séricos, antecedentes de doença vascular, sexo, terapêutica com antiadrenérgicos de acção central e ácido fólico eritrocitário foram os determinantes independentes e significativos ( $p<0.05$ ) da concentração de HC, permitindo explicar 46.7% da sua variação. Nenhum dos factores de risco para a aterosclerose considerados se associou significativamente com a presença de hiperhomocisteinemia, quer por análise univariada quer multivariável. Após ajuste, por regressão logística, a vitamina B<sub>12</sub>, ácido fólico eritrocitário, creatinina sérica e número de anti-hipertensores foram os factores preditores significativos da ocorrência de HHC.

**Conclusão:** A HHC ocorreu em quase metade da nossa amostra, atingindo maioritariamente o sexo masculino. A concentração da HC tende a aumentar com a deterioração da função renal e com a diminuição dos valores de vitamina B<sub>12</sub> e ácido fólico, apesar da ausência de défices significativos das vitaminas doseadas. Ao contrário da população geral, não foi obtida uma correlação entre a idade e a HC. A ocorrência de HHC foi independente de qualquer outro factor de risco para a aterosclerose. O ácido fólico foi um determinante significativo na concentração HC e um preditor importante da ocorrência de HHC, juntamente com a vitamina B<sub>12</sub>, o que permite sugerir a possibilidade de intervenção neste factor de risco.

## ABSTRACT

**Introduction:** Cardiovascular disease is a major cause of morbidity and mortality after renal transplantation (RT). Elevated plasma homocysteine is emerging as an important risk factor for cardiovascular disease both in general population and in renal transplantation. Only a small number of studies are available on the prevalence and determinants of hyperhomocysteinemia (HHcy) in renal transplant recipients. None of those published studies is Portuguese.

**Objectives:** We undertook this study to: a) estimate the prevalence of HHcy in RT recipients; b) analyse the distribution of plasma total homocysteine (tHcy) and vitamin B<sub>6</sub>, vitamin B<sub>12</sub> and folic acid levels; c) identify independent determinants of tHcy and predictors of HHcy in RT recipients.

**Subjects and Methods:** Fasting tHcy, vitamin B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> and folic acid were measured in 202 stable RT recipients (113 male, 89 female), with time since RT of at least 6 months. Other potential determinants were also evaluated, such as some analytical and demographic variables, along with other factors associated to pre and post-RT, namely renal function, actual therapeutic and other risk factors to atherosclerosis. HHcy was defined as tHcy higher than 15  $\mu\text{mol/L}$ .

**Results:** Prevalence of fasting hyperhomocysteinemia was 48.7%, and it was significantly higher in male patients, whose levels were 22% higher than female. A negative statistically significant correlation between tHcy and plasma folate ( $r=-0.36$ ;  $p<0.001$ ), erythrocyte folate ( $r=-0.25$ ;  $p=0.001$ ) and vitamin B<sub>12</sub> ( $r=-0.27$ ;  $p<0.001$ ) was found. Significant correlations were also found between tHcy and plasma creatinine ( $r=0.55$ ;  $p<0.001$ ), urea ( $r=0.49$ ;  $p<0.001$ ) and uric acid ( $r=0.51$ ;  $p<0.001$ ). Time since RT ( $r=0.21$ ,  $p=0.003$ ) and length of stay in hospital after RT ( $r=0.25$ ,  $p<0.001$ ) were also statistically correlated with tHcy. No significant correlation was found between tHcy and age. A multivariate analysis was conducted and serum uric acid and creatinine, previous vascular disease, gender, erythrocyte folate and therapy with central  $\alpha$ -adrenergic receptor blockers were significant independent determinants of tHcy, and explained 46.7% of the change in tHcy. None of the evaluated risk factors for atherosclerosis were significantly associated with HHcy, either by univariate or multivariate analysis. Erythrocyte folate, vitamin B<sub>12</sub>, serum creatinine and number of anti-hypertensive drugs were the significant and independent predictors identified by logistic regression.

**Conclusions:** In this study we found that hyperhomocysteinemia is common in RT patients, mainly in male gender, and occurs despite of normal concentrations of folate and vitamin B<sub>12</sub> and B<sub>6</sub>. As in general population, folic acid and B<sub>12</sub> were significant determinants of fasting tHcy. Serum creatinine, urea and uric acid were also important determinants of tHcy. Unlike general population, no linear correlation was found between tHcy and age. HHcy was independent of other risk factors for atherosclerosis. Folic acid was a significant determinant of tHcy and it was also an important predictor of HHcy, as well as vitamin B<sub>12</sub>, which suggest the possibility of intervention in this risk factor.

# ÍNDICE

Pág.

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
Homocisteína	
. O que é? .....	24
. Metabolismo .....	25
Hiperhomocisteinemia	
. Definição .....	28
. Diagnóstico .....	29
. Porque surge? .....	31
. Tratamento .....	39
Hiperhomocisteinemia, Aterosclerose e Aterotrombose: Que mecanismo? .....	43
Hiperhomocisteinemia e outros factores de risco para a aterosclerose: Que relação? .....	46
Hiperhomocisteinemia na Insuficiência Renal Crónica.....	49
Hiperhomocisteinemia no Transplante Renal .....	55
Importância do estudo .....	58
Objectivos do Estudo .....	61
<b>PARTICIPANTES E MÉTODOS</b> .....	63
Amostra	
. Critérios de exclusão .....	64
. Características dos participantes .....	64
Variáveis em estudo	
. Identificação das variáveis .....	66
. Recolha de dados .....	70
. Definição das variáveis .....	74
Análise estatística .....	76
<b>RESULTADOS</b> .....	79
Características dos participantes .....	80
Estudo da distribuição das variáveis .....	86
Concordância entre doseamentos analíticos .....	89
Análise descritiva das variáveis .....	90
Homocisteína	
. Comparação intra quartis de vitaminas .....	96
. Comparação entre grupos específicos de transplantados renais .....	99
. Correlação com outras variáveis .....	101
. Determinantes .....	107

Vitaminas B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> e ácido fólico	
. Comparação entre grupos específicos de transplantados renais .....	111
. Correlação com outras variáveis .....	113
Hiperhomocisteinemia	
. Comparação entre grupos específicos de transplantados renais .....	116
. Factores preditores .....	118
<b>DISCUSSÃO</b> .....	122
<b>CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	145
Conclusões .....	146
Considerações finais .....	149
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	151
<b>ANEXOS</b>	

**LISTA DE FIGURAS**

Pág.

<b>Figura 1 -</b>	<b>Homocisteína total</b>	<b>25</b>
<b>Figura 2 -</b>	<b>Homocisteína oxidada</b>	<b>25</b>
<b>Figura 3 -</b>	<b>Metabolismo da homocisteína</b>	<b>27</b>
<b>Figura 4 -</b>	<b>Mecanismos possíveis de aterosclerose e aterotrombose</b>	<b>45</b>
<b>Figura 5 -</b>	<b>Tipo de terapêutica dialítica efectuada</b>	<b>81</b>
<b>Figura 6 -</b>	<b>Frequência de consumo de tabaco, álcool e café, segundo o sexo</b>	<b>84</b>
<b>Figura 7 -</b>	<b>Distribuição das idades dos participantes</b>	<b>85</b>
<b>Figura 8 -</b>	<b>Distribuição dos valores e dos logaritmos dos valores da homocisteína</b>	<b>86</b>
<b>Figura 9 -</b>	<b>Distribuição dos valores e dos logaritmos dos valores da vitamina B<sub>6</sub></b>	<b>87</b>
<b>Figura 10 -</b>	<b>Distribuição dos valores e dos logaritmos dos valores da vitamina B<sub>12</sub></b>	<b>87</b>
<b>Figura 11 -</b>	<b>Distribuição dos valores e dos logaritmos dos valores do ácido fólico sérico</b>	<b>88</b>
<b>Figura 12 -</b>	<b>Distribuição dos valores e dos logaritmos dos valores do ácido fólico eritrocitário</b>	<b>88</b>
<b>Figura 13 -</b>	<b>Comparação dos valores médios de creatinina entre os sexos</b>	<b>90</b>
<b>Figura 14 -</b>	<b>Distribuição dos tempos de transplante</b>	<b>91</b>
<b>Figura 15 -</b>	<b>Frequência de hiperhomocisteinemia, segundo o sexo</b>	<b>93</b>
<b>Figura 16 -</b>	<b>Distribuição dos valores de homocisteína (ln) segundo os quartis de vitamina B<sub>12</sub></b>	<b>98</b>
<b>Figura 17 -</b>	<b>Distribuição dos valores de homocisteína (ln) segundo os quartis de ácido fólico sérico</b>	<b>98</b>
<b>Figura 18 -</b>	<b>Distribuição dos valores de homocisteína (ln) segundo os quartis de ácido fólico eritrocitário</b>	<b>98</b>
<b>Figura 19 -</b>	<b>Correlação linear entre os logaritmos da homocisteína e da vitamina B<sub>12</sub></b>	<b>102</b>
<b>Figura 20 -</b>	<b>Correlação linear entre os logaritmos da homocisteína e do ácido fólico sérico</b>	<b>102</b>
<b>Figura 21 -</b>	<b>Correlação linear entre os logaritmos da homocisteína e do ácido fólico eritrocitário</b>	<b>102</b>
<b>Figura 22 -</b>	<b>Correlação entre os valores (ln) de homocisteína e ureia sérica</b>	<b>104</b>
<b>Figura 23 -</b>	<b>Correlação entre os valores (ln) de homocisteína e creatinina sérica</b>	<b>104</b>
<b>Figura 24 -</b>	<b>Correlação entre a idade e a concentração plasmática de homocisteína (ln)</b>	<b>106</b>



## LISTA DE QUADROS

Pág.

<b>Quadro 1</b> - Factores que aumentam a concentração plasmática de homocisteína	38
<b>Quadro 2</b> - Factores de risco da aterosclerose	48
<b>Quadro 3</b> - Causas possíveis da hiperhomocisteinemia na insuficiência renal	53
<b>Quadro 4</b> - Protocolos imunossupressores de indução	65
<b>Quadro 5</b> - Variáveis em estudo associadas ao pré-transplante	67
<b>Quadro 6</b> - Variáveis em estudo associadas ao transplante	67
<b>Quadro 7</b> - Variáveis em estudo associadas ao pós-transplante imediato	67
<b>Quadro 8</b> - Variáveis em estudo associadas ao transplante actual	68
<b>Quadro 9</b> - Variáveis em estudo associadas ao transplante actual - Parâmetros analíticos	69
<b>Quadro 10</b> - Etiologia da insuficiência renal	80
<b>Quadro 11</b> - Protocolo imunossupressor actual	81
<b>Quadro 12</b> - Distribuição dos valores analíticos das vitaminas doseadas, segundo os intervalos de referência	95
<b>Quadro 13</b> - Categorização das variáveis creatinina, vitamina B <sub>12</sub> e ácido fólico eritrocitário	118
<b>Quadro 14</b> - Especificação da classe de referência da creatinina, vitamina B <sub>12</sub> , ácido fólico eritrocitário e nº de anti-hipertensores	119
<b>Quadro 15</b> - Principais factores preditores para a ocorrência de hiperhomocisteinemia, pelo método Backward (LR)	120
<b>Quadro 16</b> - Factores preditores de hiperhomocisteinemia (análise multivariável)	121

## LISTA DE TABELAS

Pág.

<b>Tabela 1 -</b>	Características clínicas e demográficas dos participantes	82
<b>Tabela 2 -</b>	Terapêutica actual, hábitos e estilos de vida dos participantes	83
<b>Tabela 3 -</b>	Distribuição da idade dos participantes, segundo o sexo	85
<b>Tabela 4 -</b>	Concordância entre os dois doseamentos analíticos da homocisteína, vitamina B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> e ácido fólico (sérico e eritrocitário)	89
<b>Tabela 5 -</b>	Distribuição dos valores de creatinina sérica por sexo	90
<b>Tabela 6 -</b>	Caracterização dos valores dos lípidos plasmáticos	92
<b>Tabela 7 -</b>	Caracterização dos valores analíticos do fibrinogénio, PAI-1, tempo de protrombina e de tromboplastina	92
<b>Tabela 8 -</b>	Distribuição da concentração plasmática de homocisteína, segundo o sexo	93
<b>Tabela 9 -</b>	Distribuição dos valores analíticos das vitaminas doseadas, segundo o sexo	94
<b>Tabela 10 -</b>	Comparação das concentrações médias de homocisteína intra quartis de vitamina B <sub>12</sub>	96
<b>Tabela 11 -</b>	Comparação das concentrações médias de homocisteína intra quartis de ácido fólico sérico e eritrocitário	97
<b>Tabela 12 -</b>	Comparação dos valores médios de homocisteína (ln) entre grupos	100
<b>Tabela 13 -</b>	Correlações significativas entre a concentração plasmática de homocisteína (ln) e algumas variáveis analíticas	101
<b>Tabela 14 -</b>	Correlações significativas entre a concentração plasmática de homocisteína (ln) e algumas variáveis não analíticas	103
<b>Tabela 15 -</b>	Variáveis não correlacionadas com os valores de homocisteína (ln)	103
<b>Tabela 16 -</b>	Correlação entre a concentração plasmática de homocisteína (ln) e o hematócrito, o VGM e o número de eritrócitos	105
<b>Tabela 17 -</b>	Correlação entre a idade e a homocisteína plasmática (ln), em cada um dos quartis de idade	106
<b>Tabelas 18-A e 18-B -</b>	Análise de regressão linear múltipla: determinantes major da homocisteinemia, de acordo com a ordem de entrada das variáveis no modelo pelo método de Stepwise.	108 109
<b>Tabelas 19-A e 19-B -</b>	Análise de regressão linear múltipla: determinantes da homocisteinemia (sem incluir a creatinina e ácido úrico), de acordo com a ordem de entrada das variáveis no modelo pelo método de Stepwise	109 110

<b>Tabela 20</b> -	Comparação dos valores médios de vitaminas (ln) entre os sexos	111
<b>Tabela 21</b> -	Comparação dos valores médios de vitaminas (ln) entre os fumadores e não fumadores	112
<b>Tabela 22</b> -	Comparação dos valores médios (ln) de vitaminas entre os participantes com e sem acompanhamento regular na Consulta de Nutrição	112
<b>Tabelas 23, 24 e 25</b> -	Correlação linear entre as vitaminas B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> e ácido fólico sérico e eritrocitário e algumas variáveis analíticas.	114 115
<b>Tabela 26</b>	Variáveis associadas à ocorrência de hiperhomocisteinemia (análise univariada)	117

## ABREVIATURAS UTILIZADAS NA DISSERTAÇÃO

AAACentral	- Antiadrenérgicos de acção central
Apo A	- Apolipoproteína A
Apo B	- Apolipoproteína B <sub>100</sub>
DP	- Desvio padrão
CsA	- Ciclosporina
RBP	- Proteína de transporte do retinol
IC 95%	- Intervalo de confiança a 95%
IECA	- Inibidores da enzima de conversão da angiotensina
IMC	- Índice de massa corporal
IRC	- Insuficiência renal crónica
Ln	- Logaritmo natural
Lp(a)	- Lipoproteína (a)
MG	- Média geométrica
MMF	- Micofenolato Mofetil
MTHFR	- N <sup>5</sup> -N <sup>10</sup> -metilenotetrahidrofolato reductase
OR	- Odds ratio
PAI -1	- Inibidor do activador do plasminogénio
TR	- Transplante renal

## **INTRODUÇÃO**

- **Introdução**
- **Homocisteína**
  - . O que é?
  - . Metabolismo
- **Hiperhomocisteinemia**
  - . Definição
  - . Diagnóstico
  - . Porque surge?
  - . Tratamento
- **Hiperhomocisteinemia, aterosclerose e aterotrombose**
  - . Que mecanismo?
- **Homocisteína e outros factores de risco da aterosclerose**
  - . Que relação?
- **Hiperhomocisteinemia na insuficiência renal**
- **Hiperhomocisteinemia no transplante renal**
- **Importância do estudo**
- **Objectivos do estudo**

## INTRODUÇÃO

As necessidades criadas e exigidas pelo desenvolvimento da sociedade humana obrigam a Medicina a perder o carácter individualista e curativo dos dias passados, para se tornar, cada vez, mais preventiva e social. Como é evidente, o controle das doenças que dominam o contexto social actual só é possível com o conhecimento da sua epidemiologia e com a presença de esforços bem coordenados a nível da prevenção, diagnóstico precoce, tratamento, vigilância e cuidados de reabilitação, que diferem das medidas simples das terapêuticas médicas, uma vez que dependem de uma orgânica de serviços médicos, sociais, educativos e profissionais, de custo elevado para a comunidade. A grande parte das doenças referidas incluem-se no grupo das chamadas doenças crónicas, sendo algumas delas causas de morte importantes e outras, apesar de não constituírem a principal causa de morte, serem responsáveis por incapacidades de ordem física e psicológica de gravidade variável.<sup>(1)</sup> Como é do conhecimento geral, à medida que o progresso se acentua, as doenças crónicas tendem a tornar-se proporcionalmente mais importantes que as infecciosas, de tal modo que, as afecções respiratórias responsáveis por inúmeras mortes há uns tempos atrás, foram sendo gradualmente substituídas pelas doenças cardiovasculares, que constituem actualmente a principal causa de morte na população dos países desenvolvidos, superando a morte por neoplasias e acidentes de viação. No Canadá, por exemplo, a doença cardiovascular constitui a principal causa de morbilidade e mortalidade, contribuindo com cerca de 40% para a mortalidade geral.<sup>(2)</sup> Nos Estados Unidos as complicações da aterosclerose contribuem com cerca de 1/3 do total de mortes dos indivíduos com idades compreendidas entre os 35 e os 65 anos, das quais 75% são devidas, especificamente, a complicações cérebro e cardiovasculares.<sup>(1,3,4)</sup> Em Portugal e segundo o último relatório do Ministério da Saúde (1996), as doenças cérebro e cardiovasculares constituem, respectivamente, a primeira e terceira causas de morte. Em 1997, e segundo dados do Instituto Nacional de Estatística, a situação mantém-se.<sup>(5)</sup>

No entanto, e tal como referido, apesar das doenças cardiovasculares constituírem, actualmente, a principal causa de morte nos países desenvolvidos, a taxa de mortalidade por essa causa de morte tem vindo a diminuir gradualmente nos Estados Unidos, Canadá, Austrália e alguns outros países.<sup>(2)</sup> Efectivamente, a taxa de mortalidade por doença cardiovascular atingiu o valor máximo na década de 60, tendo vindo a decrescer progressivamente; em 1985 desceu cerca de 30% relativamente à

taxa verificada nos anos 60. Uma explicação possível deste declínio baseia-se, indubitavelmente, no progresso na Medicina Preventiva, o que, por sua vez, incita a procura das razões porque essa mesma taxa de mortalidade não diminuiu em países como a Grã-Bretanha, Noruega e Suíça, países que aparentemente se encontram expostos aos mesmos factores de risco que os Estados Unidos, Canadá e Austrália.<sup>(1-3,6-10)</sup> São factos como estes que nos permitem depreender que, efectivamente têm sido tomadas medidas preventivas válidas e eficazes, mas que há muitos aspectos que continuam por descobrir e explicar e que se associam, muito provavelmente, às características individuais de cada população e de grupos populacionais específicos, de que são exemplo os transplantados renais.

O primeiro transplante renal (TR), com êxito, no Homem foi efectuado com dador vivo de gémeos homozigóticos a 23 de Dezembro de 1954 no Hospital Peter Bent Brigham em Boston. Marcou decisivamente o início de uma nova etapa no tratamento da insuficiência renal, de tal modo que a transplantação renal é, hoje em dia, um tratamento de escolha para milhares de insuficientes renais crónicos, uma vez que oferece a possibilidade de retomar a vida normal e uma reabilitação quase completa. Um conhecimento mais amplo e profundo da área da imunologia e a introdução em 1979 de um novo fármaco imunossupressor, a ciclosporina, melhorou significativamente os resultados da transplantação renal, com redução significativa da morbilidade e mortalidade.<sup>(11)</sup> Face ao aumento da taxa de transplantes renais com êxito e a menor incidência de infecções, também uma patologia crónica, se tornou na principal causa de morte neste grupo específico da população - a doença cardiovascular.<sup>(12-15)</sup>

São muitos os investigadores que se dedicaram, nas últimas décadas, ao estudo dos potenciais factores de risco da aterosclerose. Estudos de coorte bem conhecidos, como o estudo de Framingham, e inúmeras investigações clínicas e laboratoriais demonstraram que alguns hábitos e estilos de vida, nomeadamente o tabagismo, o sedentarismo e uma alimentação pouco saudável, aumentam de forma considerável o risco de morte por doença cardiovascular aterosclerótica.<sup>(1,9)</sup> Outras tornaram claro o papel importante de mais alguns factores de risco no desenvolvimento da aterosclerose e da aterotrombose, nomeadamente os lípidos. Inicialmente por correlação entre os lípidos plasmáticos e as lesões de aterosclerose e, posteriormente, por confirmação da relação causal entre a dislipidemia e a doença vascular aterosclerótica. No entanto, e após longos anos de pesquisa, se existem factores de risco bem identificados, conclusivos e consensualmente reconhecidos,

como a idade avançada, o sexo masculino, o tabagismo, a hipertensão arterial (HTA), a hipercolesterolemia e a história familiar de doença vascular, outros há, muito menos estudados e, conseqüentemente, conhecidos, e de que é exemplo a hiperhomocisteinemia.

A relação entre os níveis séricos elevados de homocisteína e a doença vascular aterosclerótica foi sugerida em 1969 por Kilmer McCully, quando observou, por autópsia, a presença de aterosclerose e trombose arterial extensa em duas crianças que, em vida, apresentavam hiperhomocisteinemia e homocistinúria.<sup>(16)</sup> McCully considerou a possibilidade de ter sido essa a causa da doença vascular aterosclerótica prematura encontrada em ambos os casos.<sup>(16)</sup> A sugestão de que, as concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína pudessem constituir um novo factor de risco da aterosclerose não foi muito bem aceite na comunidade científica da altura, o que lhe custou o emprego na Universidade de Harvard.<sup>(17,18)</sup>

Investigações subsequentes vieram, efectivamente, confirmar a sua hipótese, e em 1975 McCully e Wilson desenvolvem e publicam a teoria da aterosclerose, que alega que a elevação moderada de homocisteína no plasma pode, de facto, aumentar o risco cardiovascular na população em geral.<sup>(19,20)</sup>

Actualmente, mais de 75 estudos clínicos, experimentais e epidemiológicos consideram a hiperhomocisteinemia como um factor de risco independente e clinicamente significativo no desenvolvimento da aterosclerose e aterotrombose, contribuindo com um efeito multiplicativo no risco vascular, à semelhança do tabaco e da hipercolesterolemia.<sup>(21-25)</sup> Estudos transversais e retrospectivos, demonstram a associação entre a hiperhomocisteinemia e o risco de doença vascular aterosclerótica, tanto a nível cardíaco, como cerebral e periférico.<sup>(23,26-35)</sup> Estudos prospectivos vieram confirmar a referida associação.<sup>(24,36-44)</sup>

Numa meta-análise recente, com 27 estudos observacionais (23 transversais e caso-controlo retrospectivos e quatro caso-controlo prospectivos) publicados entre 1976 e 1995, Boushey e colaboradores sugerem que cerca de 10% do risco de doença arterial coronária da população se deve ao efeito da hiperhomocisteinemia.<sup>(25)</sup> Neste estudo verificou-se que as concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína se associam ao aumento do risco de doença vascular aterosclerótica, fatal ou não, a nível coronário (OR=1.7; IC 95% [1.5-1.9]), cerebral (OR=2.5; IC 95% [2.0-3.0]) e periférico (OR=6.8; IC 95% [2.9-15.8]).<sup>(25,45)</sup> Os autores acrescentam também que a relação entre os valores de homocisteína e o risco de doença vascular aterosclerótica é linear (ou log-linear), à semelhança do que ocorre para a tensão arterial e para o



colesterol. A partir de 10  $\mu\text{mol/L}$ , o acréscimo de cada 5  $\mu\text{mol/L}$  na concentração plasmática de homocisteína aumenta o risco de doença coronária numa proporção similar à verificada com um aumento plasmático de 20 mg/dl de colesterol total, ou seja, em cerca de 60% (IC 95% [1.4-1.7]) e de 80% (IC 95% [1.4-2.3]) para o sexo masculino e feminino, respectivamente. Relativamente à doença cerebrovascular o aumento do risco provocado pelos mesmos 5  $\mu\text{mol/L}$  foi estimado em 50% (IC 95% [1.3-1.9]) para ambos os sexos.<sup>(25)</sup> Desde essa meta-análise, em 1995, mais de 40 estudos foram publicados e a maioria deles corrobora as conclusões de Boushey e colaboradores.<sup>(2,21,45)</sup>

### *Estudos retrospectivos e transversais*

Graham e colaboradores, num estudo caso-controlo intitulado "European Concerted Action Project", realizado em 750 doentes vasculares e 800 controlos, confirmam a associação entre a hiperhomocisteinemia e a doença cardiovascular (OR=1.9, IC 95% [1.4-2.4], ajustado para os factores de risco não convencionais), sustentando as estimativas obtidas por Boushey, embora os riscos correspondentes sejam mais baixos: o aumento de 5  $\mu\text{mol/L}$  na homocisteína basal, considerada como variável contínua, associa-se a um aumento no risco de doença vascular aterosclerótica de 35% e 42% para o sexo masculino e feminino, respectivamente.<sup>(23)</sup> O estudo demonstra também que os níveis elevados de homocisteína interagem significativamente com os factores de risco convencionais para a aterosclerose, nomeadamente a HTA, a hipercolesterolemia e o tabagismo, o que pode aumentar o risco de ocorrência de doença vascular.<sup>(23)</sup>

Clarke e colaboradores, num estudo realizado numa coorte de indivíduos com doença vascular prematura e num grupo controlo proveniente da população geral, verificaram que 30% dos indivíduos com doença coronária e 42% e 28% dos indivíduos com doença vascular cerebral e periférica, respectivamente, apresentaram hiperhomocisteinemia.<sup>(46)</sup> Adicionalmente, e após ter sido encontrada uma associação significativa entre a hiperhomocisteinemia e outros factores de risco classicamente associados à aterosclerose, como a hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, HTA e a presença de hábitos tabágicos, a hipótese da hiperhomocisteinemia ser um factor de risco independente da doença vascular aterosclerótica foi confirmada por análise multivariada.<sup>(46)</sup>

Palma Reis e colaboradores, num estudo realizado na população portuguesa, demonstram que a hiperhomocisteinemia é um factor de risco de doença vascular cerebral (OR = 5.7;  $p < 0.05$ ), principalmente nos grupos etários mais jovens (até aos

50 anos).<sup>(27,47)</sup> Estudos subsequentes dos mesmos autores demonstram que além da doença cerebrovascular, a hiperhomocisteinemia é também factor de risco de doença coronária e enfarte do miocárdio.<sup>(48,49)</sup> E à semelhança da colesterolemia, os autores sugerem que a homocisteinemia, apresenta um perfil de risco vascular contínuo, ou seja, valores elevados constituem um factor de risco e aumentam o risco de doença vascular, enquanto que valores baixos protegem e funcionam como factor protector.<sup>(47,49)</sup>

Relativamente à trombose venosa, a maioria dos estudos transversais e caso-controlo demonstra também a associação significativa entre a hiperhomocisteinemia e o risco aumentado de ocorrência de trombose venosa.<sup>(50-57)</sup> Ray e colaboradores encontraram um risco relativo de 2.95 (IC 95% [2.08-4.17]).<sup>(50)</sup> Ridker e colaboradores obtiveram estimativas semelhantes (RR=3.38 IC 95% [1.57-7.25]), revelando ainda que o risco de tromboembolismo profundo idiopático é 3.4 vezes superior nos indivíduos com a presença simultânea do factor V Leiden, comparativamente aos indivíduos com o referido factor, mas sem valores aumentados de homocisteína.<sup>(51)</sup> Den Heijer e colaboradores demonstram que a hiperhomocisteinemia, mesmo ligeira, é um factor de risco independente para o tromboembolismo venoso e que uma concentração plasmática de homocisteína superior a 22  $\mu\text{mol/l}$  aumenta o risco de trombose venosa profunda cerca de quatro vezes.<sup>(52)</sup> No mesmo trabalho os autores sugerem que os mecanismos de associação entre a hiperhomocisteinemia e a trombose venosa são similares aos verificados com a doença vascular arterial, havendo, aparentemente, um valor acima do qual a homocisteína tem um efeito trombogénico.<sup>(52)</sup> Den Heijer e colaboradores verificaram ainda que no sexo feminino o risco de trombose venosa associado à hiperhomocisteinemia é cerca de duas vezes superior ao do sexo masculino, apesar deste apresentar valores mais elevados de homocisteína. Isso permitiu sugerir a maior susceptibilidade do sexo feminino aos efeitos patológicos dos níveis elevados de homocisteína.<sup>(52)</sup>

### *Estudos prospectivos*

A confirmação epidemiológica da associação entre a hiperhomocisteinemia e a aterosclerose deve ser obtida através de grandes estudos de coorte, prospectivos e observacionais. Actualmente, existem já alguns resultados de estudos de coorte prospectiva que demonstram a associação significativa entre a hiperhomocisteinemia e a doença cardiovascular.

Um estudo prospectivo intitulado "Physicians' Health Study" permitiu demonstrar, após 5 anos de *follow-up*, que o risco relativo, ajustado para outros factores de risco, de

enfarte de miocárdio, fatal ou não, foi de 3.4 (IC 95% [1.3-8.8]) nos indivíduos com valores de homocisteína acima do percentil 95 comparativamente aos indivíduos com homocisteinemias consideradas normais, ou seja, até ao percentil 90.<sup>(36)</sup> Também um estudo da British United Provident Association obteve um risco de doença coronária fatal de 2.9 (IC 95% [2.04-4.12]) nos indivíduos do sexo masculino com valores de homocisteína incluídos no quarto quartil relativamente aos do primeiro quartil.<sup>(41)</sup> De igual forma, Bots e colaboradores no "Rotterdam Study" verificaram que os indivíduos com valores mais elevados de homocisteína apresentaram risco aumentado de enfarte do miocárdio (OR=2.43, IC 95% [1.11-5.35]) e de doença cerebrovascular (OR=2.53, IC 95% [1.19-5.35]).<sup>(58)</sup>

O "British Regional Heart Study"<sup>(37)</sup> encontrou uma associação positiva, gradual e independente entre a homocisteinemia e o risco de doença cerebrovascular, enquanto que um estudo realizado na Noruega<sup>(38)</sup> com 21 826 participantes, confirmou a relação gradual e linear entre a homocisteína e o risco vascular. Neste estudo, o risco relativo de doença coronária, atribuído a cada aumento de 4  $\mu\text{mol/L}$  na concentração plasmática de homocisteína, foi de 1.41 (IC 95% [1.16-1.71]), ou 1.32 (IC 95% [1.05-1.65]) depois de ajustado para os factores de risco clássicos da aterosclerose.<sup>(38)</sup> Também Taylor e colaboradores, num estudo realizado em indivíduos com sintomatologia de doença vascular cerebral ou periférica, confirmam que a homocisteína é um factor de risco independente para a aterosclerose e que, na doença vascular periférica, os valores mais elevados de homocisteína se associam a uma progressão mais rápida da doença.<sup>(39)</sup>

Por outro lado, Nygard e colaboradores constataram uma correlação bastante forte entre o aumento plasmático da homocisteína e a taxa de mortalidade geral, nos indivíduos com doença coronária confirmada angiograficamente. A correlação foi significativamente mais forte quando os valores excederam os 15  $\mu\text{mol/L}$ . A presença de hiperhomocisteinemia ligeira a moderada aumentou três a cinco vezes o risco de mortalidade, por causa cardiovascular ou outra. Ou seja, a hiperhomocisteinemia foi considerada, por estes autores, como um factor de risco independente não só da morbidade e mortalidade cardiovascular, mas também da morbidade e mortalidade geral.<sup>(24)</sup> Este resultado foi fortalecido por dois outros estudos: um realizado em diabéticos não insulino dependentes;<sup>(59)</sup> outro realizado em indivíduos com idade superior a 50 anos provenientes da população geral.<sup>(43)</sup> Recentemente, Bostom e colaboradores,<sup>(42)</sup> num trabalho publicado este ano e que envolveu 1947 participantes do conhecido estudo de Framingham, demonstraram mais uma vez que a homocisteinemia basal total é um factor de risco independente para a incidência de

doença cerebrovascular, o mesmo acontecendo com Petri e colaboradores,<sup>(44)</sup> num estudo realizado em indivíduos com lúpus eritematoso disseminado, que confirmam a associação entre hiperhomocisteinemia e a ocorrência de episódios aterotrombóticos. Mas nem todos os estudos são consensuais e os resultados acima descritos não foram confirmados por outros estudos prospectivos. No último relatório do estudo "Physicians' Health Study"<sup>(60)</sup> não foi demonstrada a associação significativa entre a hiperhomocisteinemia e a ocorrência de enfarte do miocárdio (RR=1.7; IC 95% [0.9-3.3]) quando o *follow up* atingiu os sete anos e meio, o mesmo acontecendo com a angina pectoris<sup>(61)</sup> e o acidente vascular cerebral<sup>(62)</sup>. De igual forma, um estudo igualmente prospectivo realizado na Finlândia<sup>(63)</sup> e outros dois intitulados "Multiple Risk Factor Intervention Trial"<sup>(64)</sup> e "Atherosclerosis Risk in Communities Study"<sup>(65)</sup> também não encontraram associação significativa entre a hiperhomocisteinemia e a doença vascular aterosclerótica.

Em resumo e apesar dos resultados controversos de alguns estudos, a grande maioria demonstra que a hiperhomocisteinemia é, efectivamente, um factor de risco independente para a ocorrência de doença vascular aterosclerótica na população em geral.<sup>(22-33,34,36-41,46,66)</sup>

Resultados similares foram obtidos em populações mais específicas, nomeadamente em crianças e adolescentes<sup>(67-70)</sup> e em idosos<sup>(42,43,58,71)</sup>. A associação revelou-se positiva e significativa tanto para a doença coronária,<sup>(23,25,36,38,39)</sup> como para a doença vascular cerebral<sup>(25,39,42,46,48,49,72-74)</sup> e periférica,<sup>(25,39,46,57,75)</sup> e para o tromboembolismo venoso.<sup>(50-57)</sup> Tudo parece apontar para que a relação entre a homocisteína e o risco de aterosclerose e aterotrombose seja positiva, significativa, dose-dependente e independente de outros factores associados à ocorrência de aterosclerose, nomeadamente a idade avançada, o sexo masculino, o tabaco, a HTA, a diabetes mellitus e o aumento do colesterol LDL.<sup>(24,25,31-33,36-39,66,74-76)</sup>

## HOMOCISTEÍNA

### O que é?

A homocisteína é um ácido aminado sulfurado não essencial, que não existe nos alimentos, e que resulta do metabolismo da metionina. Por um processo químico de transmetilação (transferência de grupos metílicos), a metionina é convertida em homocisteína que, sendo um aminoácido metabolicamente intermediário, pode ser novamente transformada em metionina, por remetilação, ou convertida em cisteína ou cistina, por transsulfuração (transferência intermolecular de enxofre). Tanto a síntese como o restante metabolismo da homocisteína ocorrem maioritariamente no rim e no fígado.

A metionina é, pelo contrário, um ácido aminado essencial, absolutamente indispensável ao desenvolvimento tecidual e à manutenção da vida, uma vez que está envolvida em inúmeras reacções enzimáticas indispensáveis ao organismo, nomeadamente a desintoxicação por conjugação e a síntese de proteínas específicas e de compostos com capacidade óxido-redutora. Apesar de sintetizada a partir da metionina, a homocisteína é, como referido, um ácido aminado intermediário, sendo, conseqüentemente, incapaz de substituir a metionina nas suas funções.

No plasma a homocisteína existe maioritariamente na forma oxidada (98%). Os restantes 2% constituem a forma reduzida (sulfidril). **(Figura 1)** A maior parte da homocisteína oxidada (70 a 80%) encontra-se associada às proteínas plasmáticas, principalmente à albumina, através de uma ligação dissulfídica. A homocisteína oxidada remanescente (20 a 30%) designa-se por homocisteína livre, uma vez que não está combinada com as proteínas, podendo juntar-se a outra molécula de homocisteína e formar um dímero, denominado homocistina, ou associar-se a outras moléculas com grupo tiol, nomeadamente a cisteína, e formar bissulfitos mistos. **(Figura 2)** O somatório de todas as formas de homocisteína no plasma (reduzida, combinada e livre) denomina-se por homocisteína total.<sup>(2,21,77)</sup> Por curiosidade, a homocisteína plasmática total é designada nos Estados Unidos por *homocyst(e)ine* enquanto que na Europa é mais comum a utilização do termo *tHcy*.<sup>(2)</sup>

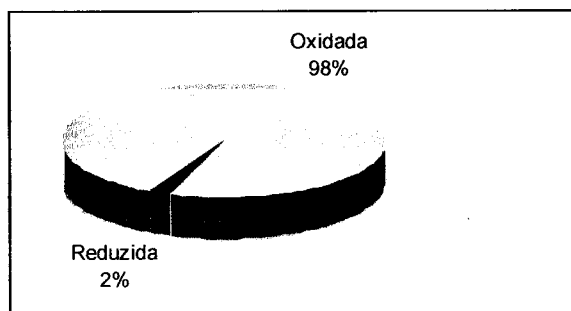


Fig. 1 - Homocisteína Total

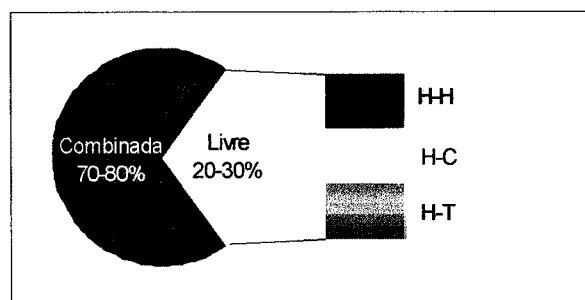


Fig. 2 - Homocisteína Oxidada.

H-H: homocisteína-homocisteína; H-C: homocisteína-cisteína;  
 H-T: homocisteína-tiolactona

### Metabolismo

Como referido, a metionina, após transferir os grupos metilo, é convertida em homocisteína, que, uma vez sintetizada, pode entrar no ciclo da remetilação ou na via da transsulfuração. (Figura 3)

#### *Via metabólica da remetilação:*

Na via metabólica da remetilação, a metionina é recuperada quando a homocisteína adquire um grupo metilo através de uma reacção catalisada pela betaína-homocisteína metiltransferase ou pela metionina-sintetase:

- no fígado a homocisteína é remetilada pela betaína-homocisteína metiltransferase, sendo a betaína o dador dos radicais metilo (substrato),<sup>(45,78)</sup>
- na maior parte dos outros tecidos a homocisteína é remetilada pela acção da metionina sintetase e o N<sup>5</sup>-metiltetrahydrofolato funciona como dador de grupos metilo (substrato). Este dador de grupos metilo resulta do N<sup>5</sup>-N<sup>10</sup>-metilenotetrahydrofolato, derivado do folato da alimentação, numa reacção catalisada pela enzima N<sup>5</sup>-N<sup>10</sup>-metilenotetrahydrofolato reductase (MTHFR) e dependente da vitamina B<sub>12</sub> (co-factor). Nesta via metabólica a forma activa da vitamina B<sub>12</sub>, a metilcobalamina, funciona como co-factor essencial para a síntese de metionina e o ácido fólico como substrato.<sup>(21,45,79)</sup>

*Via metabólica da transsulfuração*

Na presença de quantidades aumentadas, ou excessivas, de metionina, ou perante a necessidade de sintetizar cisteína, a homocisteína segue a via metabólica irreversível da transsulfuração. Nesta via, a homocisteína associa-se à serina para formar a cistationina, numa reacção catalisada pela cistationina  $\beta$ -sintetase, uma enzima cuja actividade depende da forma activa da vitamina B<sub>6</sub> (5-fosfato de piridoxal), que funciona como cofactor. Subsequentemente, e pela acção da cistationina  $\gamma$ -liase, a cistationina é hidrolisada em cisteína, que, por sua vez, pode ser incorporada no glutatião ou metabolizada em sulfato, através de outra reacção dependente da vitamina B<sub>6</sub>, sendo posteriormente excretada pela urina.<sup>(45)</sup>

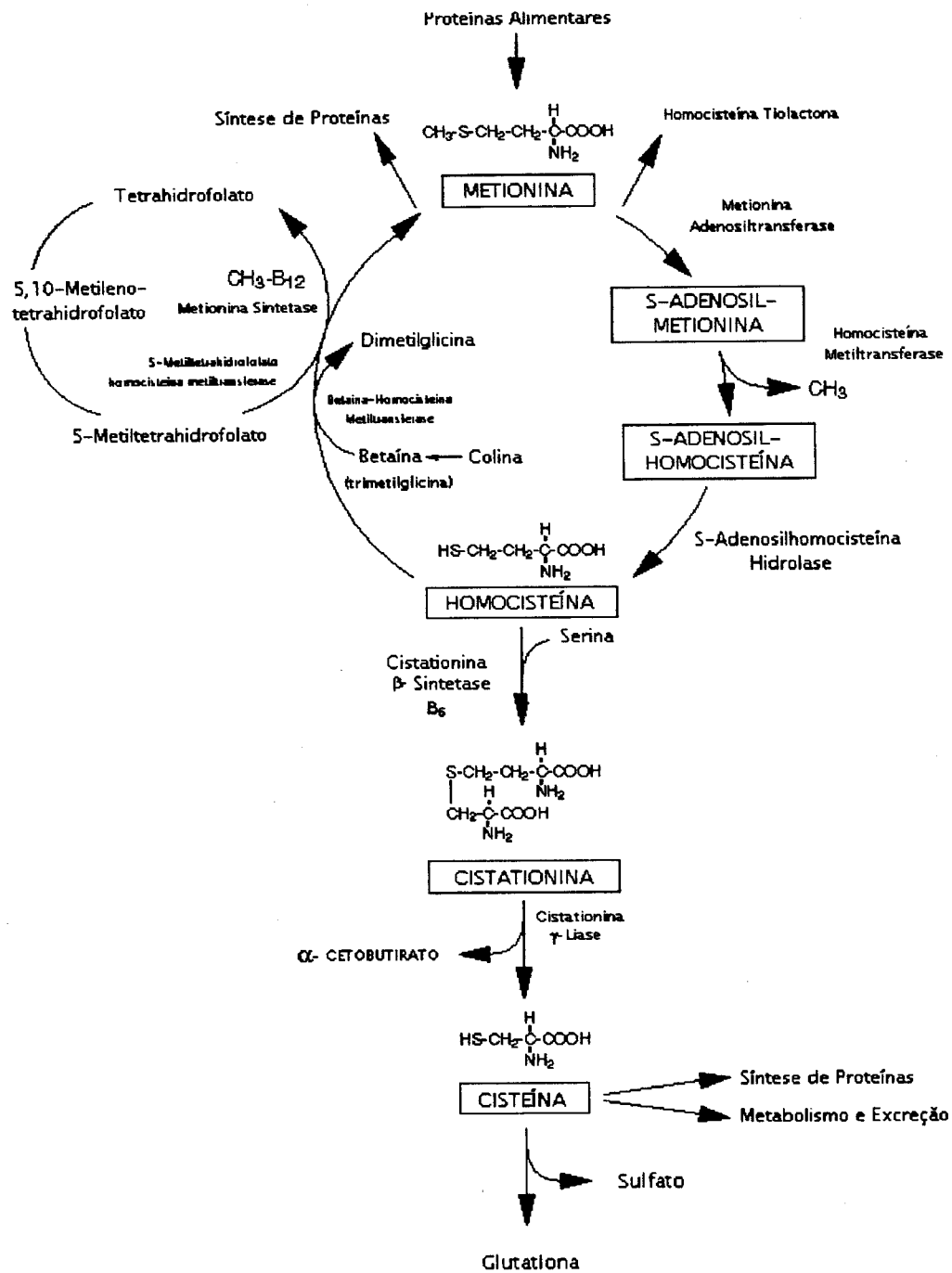


Fig.3 - Metabolismo da homocisteína.



## HIPERHOMOCISTEINEMIA

### Definição

A hiperhomocisteinemia é definida da mesma forma que a hipertensão e a hipercolesterolemia, ou seja, de acordo com a distribuição das concentrações de homocisteína na população geral. O intervalo de referência considerado normal para a homocisteína contém, geralmente, 95% das referidas concentrações, o que equivale a dizer que a hiperhomocisteinemia, basal ou após sobrecarga com metionina, é considerada quando a concentração de homocisteína excede dois desvios padrão acima da média encontrada.<sup>(2,45,80)</sup>

De um modo geral, a concentração plasmática de homocisteína considerada normal ronda os 5 a 15  $\mu\text{mol/L}$ .<sup>(2,45,77,80-84)</sup> Concentrações mais elevadas são classificadas como hiperhomocisteinemia ligeira (entre 16 e 30  $\mu\text{mol/L}$ ), moderada (entre 31 a 100  $\mu\text{mol/L}$ ) e grave ( $>100 \mu\text{mol/L}$ ).<sup>(2,45,77,80,84)</sup>

Apesar da hiperhomocisteinemia grave ser rara, a forma ligeira atinge 5 a 7% da população.<sup>(21,45)</sup> Geralmente, os indivíduos com hiperhomocisteinemia ligeira não apresentam sintomatologia clínica característica da forma grave e mantêm-se geralmente assintomáticos até à terceira ou quarta década de vida, altura em que surge a doença coronária arterial e a trombose venosa e arterial recorrente.<sup>(21)</sup>

Alguns autores referem que a associação entre a concentração plasmática de homocisteína e o desenvolvimento de aterosclerose, quer a nível coronário, cerebral ou periférico só ocorre se a hiperhomocisteinemia for moderada ou severa, ou seja, com concentrações plasmáticas de homocisteína inequivocamente aumentadas.<sup>(36,39,56)</sup>

Outros<sup>(21,25,48,49,66,77,83,85,86)</sup> consideram que a hiperhomocisteinemia ligeira é já um factor de risco clinicamente significativo de aterosclerose e aterotrombose, tanto no sexo feminino como no masculino, e que o risco vascular se inicia com valores ainda mais baixos, nomeadamente a partir dos 8.3<sup>(87)</sup> e 10 dos  $\mu\text{mol/L}$ .<sup>(25,49,77,83)</sup> Ou seja, a relação entre a homocisteína e o risco vascular é considerada, por estes autores, como linear a partir de um determinado valor, desconhecendo-se se existe algum limite abaixo do qual a homocisteína não se associa a risco vascular, o que dificulta a definição de intervalos de referência.<sup>(26,33,36,37,77,87,88)</sup>

## Diagnóstico

A homocisteína plasmática total engloba toda a homocisteína metabolicamente activa, quer directa quer indirectamente, incluindo os bissulfitos mistos, ou seja, a homocisteína livre e a combinada. A determinação da homocisteinemia total é bastante fidedigna, uma vez que não é influenciada pela rápida oxidação e redistribuição das restantes formas de homocisteína que se encontram na corrente sanguínea.<sup>(21,45,89)</sup> Até há relativamente pouco tempo, a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) era o método mais usado para o seu doseamento.<sup>(77,90)</sup> Actualmente, os métodos utilizados, nomeadamente o imunoensaio de fluorescência polarizada, são mais simples, mais rápidos, menos dispendiosos e igualmente fiáveis, o que facilita a quantificação da homocisteína plasmática total.<sup>(45,77,90-92)</sup>

O doseamento da homocisteína é, geralmente, efectuado em jejum ou após sobrecarga com metionina. As amostras de sangue devem ser centrifugadas de imediato ou, na sua impossibilidade, colocadas em gelo até que o plasma seja separado. O não cumprimento destas normas implica o falseamento dos resultados, uma vez que, se a amostra não for imediatamente arrefecida, a homocisteína intracelular das células sanguíneas é libertada, numa percentagem dependente do tempo que decorre até à centrifugação e da temperatura a que a amostra se sujeita até à separação do plasma.<sup>(77,82)</sup>

Muitos estudos clínicos que envolvem a homocisteína regulam-se e confiam na determinação da concentração plasmática de homocisteína total em jejum – homocisteinemia basal.<sup>(21,23,24,89)</sup> O jejum de cerca de 12 horas permite anular os aumentos variáveis e transitórios da homocisteína após uma refeição, mesmo que muito rica em metionina, o que torna fiável o doseamento da homocisteína basal.<sup>(93)</sup>

Em indivíduos com suspeita de alterações no metabolismo da homocisteína, mas com homocisteinemia basal normal, pode ser necessário realizar a prova de sobrecarga com metionina, uma vez que esta permite denunciar a presença de uma deficiência latente, nomeadamente de vitamina B<sub>6</sub> e de cistationina β-sintetase. Neste tipo de análise, teoricamente muito semelhante à prova de tolerância da glicose, administra-se, por via oral, uma dose adaptada de metionina (0.1 g/Kg peso) e determina-se a concentração plasmática da homocisteína quatro a seis horas após a ingestão. Os indivíduos sem alterações no metabolismo da homocisteína apresentam, após sobrecarga com metionina, uma elevação transitória da homocisteinemia. Concentrações exageradamente aumentadas após a referida prova, denunciam, geralmente, a existência de irregularidades nesse metabolismo.<sup>(2,21,45)</sup> Este método apresenta alguns inconvenientes, não só para o doente como para o profissional de

saúde, devido ao sabor desagradável da metionina, à morosidade do método e à indefinição dos valores considerados normais para a homocisteína após sobrecarga com metionina.<sup>(45)</sup> Além disso, o valor preditivo do teste de sobrecarga com metionina foi recentemente censurado, devido à presença possível da variante termolábil da MTHFR.<sup>(84,94)</sup> A MTHFR é, como referido, uma enzima que regula a concentração basal de homocisteína, de modo que a sua actividade não pode ser avaliada de forma adequada pelo teste de sobrecarga com metionina, ao contrário das enzimas envolvidas no metabolismo da transsulfuração. Estas sim, são responsáveis por reverter os aumentos pós-prandiais transitórios da homocisteína plasmática, de modo que a sua actividade pode e deve ser correctamente avaliada pelo teste da sobrecarga com metionina.<sup>(94)</sup>

No que se refere ao risco de doença vascular, Palma Reis e colaboradores consideram o doseamento da homocisteína após sobrecarga com metionina mais discriminativo e preditivo que a sua determinação analítica em jejum. Os autores defendem que o doseamento da homocisteína após sobrecarga com metionina permite testar a capacidade de metabolização da metionina e eliminação da homocisteína, quer por remetilação quer por transsulfuração, enquanto que a homocisteinemia basal depende fundamentalmente da quantidade de metionina ingerida pela dieta.<sup>(27,47)</sup> Como os valores elevados de homocisteína são tóxicos para o endotélio e induzem o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, Palma Reis e colaboradores<sup>(47)</sup> consideram que são as concentrações mais elevadas obtidas que constituem um factor fisiopatológico mais importante que as concentrações mais baixas encontradas em jejum.

Outros autores<sup>(23,95)</sup> afirmam que a hiperhomocisteinemia, após sobrecarga com metionina, é efectivamente um factor de risco para a doença vascular, mas que a sua magnitude é semelhante e independente da hiperhomocisteinemia basal. A realização dessa prova só se justifica quando, após um doseamento analítico normal em jejum, se mantêm suspeitas de irregularidades no metabolismo da homocisteína, ou quando se pretende um prognóstico mais exacto do risco vascular do indivíduo.<sup>(23)</sup>

## Porque surge?

A eliminação da homocisteína da circulação sanguínea pode efectuar-se, tal como foi referido, através de duas vias metabólicas: por remetilação, que origina novamente a metionina e que depende da presença do ácido fólico e da vitamina B<sub>12</sub>; por transsulfuração, que origina a cisteína e para a qual é indispensável a vitamina B<sub>6</sub>. Qualquer factor genético, fisiológico, patológico ou nutricional que interfira em qualquer uma das vias metabólicas vai ser responsável pela acumulação excessiva de homocisteína na circulação sanguínea e, conseqüentemente, pela hiperhomocisteinemia. (Quadro 1) As causas mais frequentes são referidas em seguida.<sup>(2,21)</sup>

### 1. Defeitos Genéticos

A hiperhomocisteinemia pode ser causada por defeitos genéticos das enzimas envolvidas no metabolismo da homocisteína. Efectivamente, e embora raros, alguns erros inatos do metabolismo promovem a acumulação plasmática excessiva de homocisteína e a sua excreção aumentada através urina, ou seja, a hiperhomocisteinemia e a homocistinúria, respectivamente.<sup>(21)</sup>

#### 1.1. Deficiência de Cistationina β-Sintetase

A deficiência de cistationina β-sintetase é o defeito genético mais comum da hiperhomocisteinemia grave.<sup>(21,96)</sup> A forma homozigótica desta deficiência, denominada homocistinúria congénita, associa-se a concentrações plasmáticas de homocisteína em jejum superiores a 100 μmol/L, podendo mesmo atingir valores superiores a 400 μmol/L. Estas elevadas concentrações induzem a excreção urinária de quantidades significativas de homocistina, que justificam a denominação desta patologia, ou seja, homocistinúria.<sup>(2,21,96)</sup> Os casos de homozigotia são raros (um em cada 200 000 nascimentos) e as manifestações clínicas incluem lesões oculares (*ectopia lentis*), alterações esqueléticas, atraso mental, trombose arterial e venosa e aterosclerose grave e prematura.<sup>(85)</sup>

As crianças homozigóticas com homocistinúria apresentam, muito precocemente, complicações tromboembólicas graves.<sup>(21,45,84,85)</sup> Nos adultos homozigóticos jovens as complicações aterotrombóticas são igualmente frequentes e, na maior parte das vezes, fatais, como foi demonstrado pela primeira vez em 1968, por Carey e colaboradores.<sup>(97)</sup> Posteriormente, Mudd e colaboradores estimaram que metade dos indivíduos com homocistinúria não corrigida apresenta complicações tromboembólicas

antes dos 30 anos e a mortalidade associada se aproxima dos 20%. Os restantes 50% respondem favoravelmente à terapêutica com doses farmacológicas de vitamina B<sub>6</sub>, que funciona como precursor do co-factor da cistationina β-sintetase, como foi confirmado recentemente por Kluijtmans e colaboradores.<sup>(98,99)</sup>

Os heterozigóticos (um em cada 150 nascimentos) apresentam tipicamente uma hiperhomocisteinemia menos marcada, com concentrações plasmáticas de homocisteína entre os 20 e os 40 μmol/l, ou seja, duas a quatro vezes superiores às consideradas normais. Nestes casos a evolução da doença é mais lenta e permanece assintomática até à meia idade, altura em que a aterosclerose se detecta.<sup>(16,21,45)</sup>

### 1.2. Deficiência de N<sup>5</sup>-N<sup>10</sup>-Metilenotetrahidrofolato Reductase

A deficiência homozigótica de MTHFR, uma enzima envolvida na remetilação da homocisteína em metionina, pode também originar hiperhomocisteinemia grave. A MTHFR possibilita a obtenção do N<sup>5</sup>-metiltetrahidrofolato, a forma activa do folato, necessária como dador de radicais metilo na remetilação da homocisteína. Os indivíduos homozigóticos para esta mutação apresentam geralmente uma resposta hiperhomocisteinémica exagerada perante o défice de ácido fólico, de forma que nestes casos a carência desta vitamina aumenta significativamente o risco de doença vascular.<sup>(21,45,77,84)</sup>

Recentemente, descobriu-se a existência de uma mutação no gene da enzima MTHFR, explicada pela troca de uma citosina por uma timina no nucleotídeo 677, e consequente substituição da alanina pela valina, que é responsável pelo aparecimento de uma variante termolábil da enzima, caracterizada por cerca de metade da actividade da enzima normal. Em consequência desta mutação, a quantidade de folato activo disponível vai ser menor, face à actividade reduzida da enzima MTHFR, o que diminui a remetilação e promove a acumulação plasmática de homocisteína, principalmente se a ingestão alimentar reduzida de ácido fólico coexistir.<sup>(2,29,45,79,94,100,101)</sup> Aproximadamente 10 a 15% da população geral, cerca de 17% da população com doença coronária e 28% dos indivíduos com doença vascular prematura apresentam homozigotia para esta mutação (valina/valina; genótipo TT).<sup>(2,45,102)</sup> Jacques e colaboradores verificaram que na presença de défice de ácido fólico, os indivíduos homozigóticos com mutação termolábil da MTHFR apresentavam valores de homocisteinemia basal 24% mais elevados que os indivíduos com genótipo normal (alanina/alanina). Perante esta constatação os autores concluem que os indivíduos com a referida mutação genética necessitam de doses superiores de ácido fólico, para conseguir normalizar o metabolismo da homocisteína e prevenir situações de

hiperhomocisteinemia. Ou seja, a presença ou não de hiperhomocisteinemia vai depender dos valores de ácido fólico.<sup>(94,102,103)</sup> Os mesmos autores não encontraram associação entre o genótipo mutante da MTHFR termolábil e a hiperhomocisteinemia após sobrecarga com metionina, o que reforça a teoria de que a hiperhomocisteinemia destes indivíduos é causada fundamentalmente por defeitos na via metabólica da remetilação.<sup>(102)</sup>

Além do polimorfismo C677T da MTHFR, que é indubitavelmente um determinante genético importante na concentração de homocisteína, podem ocorrer outras alterações no ciclo da remetilação, nomeadamente a deficiência de algumas enzimas envolvidas nesse ciclo, como a homocisteína metiltransferase, a betaína-homocisteína metiltransferase e a metionina sintetase, a carência do substrato N<sup>5</sup>-N<sup>10</sup>-metilenotetrahidrofolato e a existência de irregularidades no metabolismo da vitamina B<sub>12</sub>.<sup>(21,45)</sup>

## 2. Carências Nutricionais

Como referido, alguns erros inatos raros do metabolismo são responsáveis pelo aparecimento de hiperhomocisteinemia e homocistinúria. Posteriormente, outras causas foram implicadas, nomeadamente carências nutricionais.

A carência nutricional das vitaminas utilizadas como substratos e/ou co-factores no metabolismo da homocisteína, ou seja, o ácido fólico e as vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>, cujas concentrações têm sido correlacionadas negativa e significativamente com a homocisteinemia basal.<sup>(31,45,69,85)</sup> Por outro lado, os indivíduos com hiperhomocisteinemia apresentam frequentemente valores baixos das referidas vitaminas.<sup>(23,82,104)</sup> Num estudo realizado em 1993, Selhub e colaboradores advertem que 40 a 50% da população idosa dos Estados Unidos não ingere uma quantidade suficiente de folatos e vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>.<sup>(105)</sup> Consequentemente, essa ingestão vitamínica diminuída vai implicar a carência de alguns cofactores vitamínicos importantes no metabolismo da homocisteína, sendo responsável por cerca de  $\frac{2}{3}$  do total de casos de hiperhomocisteinemia.<sup>(105,106)</sup> Como conclusão deste estudo os autores afirmam que as vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> e ácido fólico são os determinantes mais importantes da homocisteinemia da população em geral. Esta afirmação ajusta-se com a opinião de outros autores, que complementam que a deficiência de ácido fólico constitui a principal causa nutricional isolada de hiperhomocisteinemia, uma vez que implica um menor número de dadores do grupo metilo para a remetilação normal da homocisteína.<sup>(107,108,109)</sup>

Assim sendo, os indivíduos com concentrações vitamínicas baixas, principalmente de ácido fólico, apresentam um risco aumentado de hiperhomocisteinemia e, conseqüentemente de doença vascular aterosclerótica.<sup>(26,32,45,60,105,108,110-113)</sup> De um modo geral, as concentrações de ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub> correlacionam-se negativamente à homocisteinemia basal, enquanto que os valores de vitamina B<sub>6</sub> se correlacionam, também de forma negativa, com o aumento da concentração plasmática da homocisteína total após sobrecarga com metionina,<sup>(114,115)</sup> mas não com a homocisteinemia basal<sup>(116)</sup>. Este facto parece resultar do próprio metabolismo da homocisteína: alterações no ciclo da remetilação, por deficiência de ácido fólico e/ou vitamina B<sub>12</sub>, implicam o aparecimento de concentrações elevadas de homocisteína total em jejum; enquanto que irregularidades na via metabólica da transsulfuração se caracterizam por elevação substancial da homocisteína após a administração de um dose de metionina (0,1 g/Kg peso), apesar da homocisteinemia basal normal ou ligeiramente aumentada.<sup>(21,115)</sup>

Permanece por demonstrar se a carência nutricional destas vitaminas condiciona, por si só, a elevação da homocisteína ou se isso ocorre apenas nos indivíduos com predisposição genética para a hiperhomocisteinemia.<sup>(8)</sup> Convém, no entanto, salientar que os défices dos referidos substractos e co-factores vitamínicos são exacerbados quando a dieta é rica em proteínas animais, uma vez que são a principal fonte de metionina.<sup>(2,17,85,105)</sup>

### 3. Outras Causas

Para além das alterações genéticas e das carências nutricionais, outros factores interferem no metabolismo da homocisteína, nomeadamente determinadas situações clínicas, alguns fármacos e certos hábitos e estilos de vida.

#### 3.1. Insuficiência Renal Crónica

A homocisteinemia basal aumenta com a elevação da creatinina sérica.<sup>(45,117,118)</sup> A hiperhomocisteinemia verifica-se logo nas primeiras fases da insuficiência renal, tendendo a agravar de acordo com a progressão da falência renal e atingindo concentrações quatro vezes superiores à considerada normal. Os insuficientes renais em tratamento dialítico regular e os transplantados renais apresentam valores igualmente aumentados de homocisteinemia.<sup>(117,118)</sup> Os mecanismos responsáveis por esta situação permanecem por esclarecer, no entanto, este tema será desenvolvido e analisado num subcapítulo próprio.

### 3.2. Hipotireoidismo

Alguns trabalhos associam a hiperhomocisteinemia ao hipotireoidismo, sugerindo mais um mecanismo explicativo possível para a elevada incidência de doença vascular observada nesta patologia.<sup>(20,21,119)</sup>

### 3.3. Anemia Perniciosa

A hiperhomocisteinemia tem sido também observada em doentes com anemia perniciosa, logicamente em consequência da absorção diminuída de vitamina B<sub>12</sub>. Curiosamente, a detecção das concentrações elevadas de homocisteína, permite, muitas vezes, diagnosticar este tipo de anemia.<sup>(21,45,82,120)</sup>

### 3.4. Carcinomas

Alterações induzidas no metabolismo da metionina e a utilização de alguns agentes anti-neoplásicos parecem ser responsáveis pela hiperhomocisteinemia associada a diversos tipos de neoplasias malignas, nomeadamente da mama, do ovário e do pâncreas.<sup>(21,85)</sup>

### 3.5. Fármacos

O aumento da concentração plasmática de homocisteína pode também ser induzido por determinados fármacos, nomeadamente:

- o metotrexato, um anti-neoplásico que inibe a dihidrofolato reductase e que, conseqüentemente, diminui o metiltetrahydrofolato intracelular, um dos substractos da remetilização da homocisteína;<sup>(20,21,85,92,121,122)</sup>
- os anticonvulsivantes, como a fenitoína, o fenobarbital e a primidona, visto que interferem na absorção e no metabolismo do folato e da vitamina B<sub>12</sub>;<sup>(20,21,85,92,121,122)</sup>
- a sulfasalazina, que diminui a absorção do ácido fólico;<sup>(121)</sup>
- os sequestrantes dos ácido biliares, nomeadamente a colestiramina e o colestipol, uma vez que interferem na absorção das vitaminas, principalmente do ácido fólico;<sup>(92,123)</sup>
- a teofilina, e outros broncodilatadores da classe dos inibidores da fosfodiesterase, porque inibem a síntese da forma activa do fosfato de piridoxal;<sup>(21,84,85)</sup>
- a terapêutica prolongada com isoniazida e a utilização farmacológica de hidralazina e penicilamina podem induzir a deficiência de vitamina B<sub>6</sub>, por um mecanismo desconhecido;<sup>(84,122,124)</sup>
- a colchicina (antigotoso) e a cimetidina (antiulceroso), principalmente quando utilizadas por longos períodos de tempo, uma vez que dificultam a absorção da



vitamina B<sub>12</sub> e interferem na actividade de algumas enzimas intervenientes no metabolismo homocisteína,<sup>(121,122)</sup>

- alguns anti-hipertensores, nomeadamente a metildopa e o triamtereno, que diminuem a absorção da vitamina B<sub>12</sub> e do ácido fólico,<sup>(121,122)</sup>
- os anticoncepcionais orais, que se associam também à elevação dos valores séricos de homocisteína, aparentemente porque antagonizam as funções da vitamina B<sub>6</sub> no organismo.<sup>(20,21,84,125)</sup>

### 3.6. Idade, Sexo e Raça

A homocisteinemia aumenta progressivamente com a idade e é geralmente mais elevada no sexo masculino.<sup>(20,45,68,69,71,76,105,110,126)</sup> As crianças apresentam normalmente valores de homocisteína mais baixos que os adultos, cerca de 30%.<sup>(92)</sup> O aumento progressivo dos valores de homocisteína com a idade parece relacionar-se fundamentalmente com a deficiência das vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e folatos, nomeadamente nos idosos, que apresentam com frequência uma diminuição da ingestão e absorção das referidas vitaminas.<sup>(20,85)</sup> Relativamente ao sexo, a concentração plasmática de homocisteína é, de facto, mais baixa no sexo feminino, especificamente na mulher pré-menopausica e, em especial, na mulher grávida.<sup>(20,92,127)</sup> As razões deste facto incluem a menor percentagem de massa muscular da mulher e os efeitos benéficos dos estrogénios.<sup>(20)</sup> No entanto, o efeito favorável dos estrogénios no metabolismo da homocisteína parece anular-se se a mulher fumar e/ou tomar contraceptivos orais.<sup>(20)</sup> A mulher pós-menopausica apresenta níveis mais elevados de homocisteinemia, o que pode constituir uma razão adicional para a elevada incidência de doença vascular que caracteriza a mulher após a menopausa.<sup>(20,92,128)</sup>

Aparentemente, e em relação à raça branca, a raça negra parece associar-se a valores plasmáticos mais elevados de homocisteína,<sup>(126)</sup> no entanto, um estudo<sup>(68)</sup> recente não encontrou diferenças significativas.

### 3.7. Tabaco, Álcool, Café e Sedentarismo

Mais uma vez, alguns hábitos e estilos de vida menos saudáveis influenciam de forma negativa um factor de risco associado à aterosclerose. O tabaco interfere na síntese do fosfato de piridoxal e antagoniza a actividade de algumas enzimas envolvidas no ciclo da remetilação, nomeadamente a metionina sintetase, o que poderá ser a causa das concentrações de homocisteína significativamente mais elevada apresentada pelos fumadores.<sup>(20,21,76,129,130)</sup> O álcool dificulta a utilização do folato em muitas reacções do organismo, podendo, conseqüentemente, interferir no metabolismo da

homocisteína.<sup>(131,132)</sup> O café e a inactividade física também se associam a aumentos substanciais da homocisteinemia, embora se desconheçam quais os mecanismos.<sup>(21,76,129,130,133)</sup>

### 3.8. Ingestão Proteica

Os alimentos hiperproteicos apresentam, geralmente, teores elevados de metionina. Assim, seria de esperar que uma ingestão proteica elevada se associasse a hiperhomocisteinemia. No entanto, alguns estudos demonstraram que a ingestão proteica se correlaciona negativa e significativamente com a concentração plasmática de homocisteína, o que parece, à primeira vista, um contra-senso.<sup>(26,133)</sup> As razões que explicam esta correlação são meramente especulativas. Pancharuniti e colaboradores sugerem que a carne e os ovos, as principais fontes proteicas da alimentação dos americanos, apesar da quantidade elevada de metionina são igualmente ricos em vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>, que, como se sabe, são co-factores importantes do metabolismo da homocisteína e induzem a rápida depuração da homocisteína.<sup>(26)</sup> Stolzenberg-Solomon e colaboradores encontraram um resultado similar e justificam que, uma dieta com teor elevado em metionina permite activar as enzimas envolvidas no metabolismo da homocisteína, o que promove o seu catabolismo mais eficiente, tal como acontece nos animais. Efectivamente, estudos experimentais, realizados em animais, permitiram verificar que a administração de um dieta rica em metionina aumenta significativamente o catabolismo hepático da homocisteína por transsulfuração e, em menor grau, por remetilação.<sup>(134,135)</sup> É possível que algo semelhante ocorra no Homem, visto que uma dieta hiperproteica, além de fornecer metionina em quantidades consideráveis, fornece também dois outros aminoácidos muito importantes no metabolismo da homocisteína: a colina (remetilação) e a serina (transsulfuração).<sup>(133)</sup>

**Quadro 1****Factores Associados ao Aumento da Concentração Plasmática de Homocisteína****Defeitos Genéticos**

- ↳ Cistationina  $\beta$ -Sintetase
- ↳ N<sup>5</sup>-N<sup>10</sup>-Metilenotetrahidrofolato Reductase
- ↳ Metionina sintetase

**Carências Nutricionais**

- ↳ Vitamina B<sub>6</sub>
- ↳ Ácido fólico
- ↳ Vitamina B<sub>12</sub>

**Patologias**

- ↳ Insuficiência renal
- ↳ Hipotireoidismo
- ↳ Anemia perniciosa
- ↳ Neoplasias malignas (ovário, pâncreas, mama...)
- ↳ Psoríase grave

**Fármacos**

- ↳ Antagonistas do ácido fólico (metotrexato, fenitoína, contraceptivos orais)
- ↳ Antagonistas da vitamina B<sub>6</sub> (teofilina, isoniazida, hidralazina)
- ↳ Antagonistas da vitamina B<sub>12</sub> (fenitoína, metildopa, colchicina)
- ↳ Fármacos hipolipemiantes (colestiramina, colestipol, ácido nicotínico)
- ↳ Diuréticos tiazídicos

**Idade/Sexo**

- ↳ Evolução da idade
- ↳ Sexo masculino
- ↳ Menopausa e pós-menopausa

**Hábitos e Estilos de vida**

- ↳ Tabaco
- ↳ Álcool
- ↳ Café
- ↳ Sedentarismo
- ↳ Ingestão Proteica

## Tratamento

Os níveis aumentados de homocisteína podem ser diminuídos, ou mesmo normalizados, através da administração de suplementos vitamínicos com ácido fólico e vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>, uma vez que estas vitaminas desempenham um papel fundamental na regularização do metabolismo da homocisteína.<sup>(45,101,136,137)</sup> Na população geral, mais de 90% dos casos de hiperhomocisteinemia responde favoravelmente à terapêutica vitamínica, num curto período de tempo (entre duas a seis semanas), mesmo na ausência de deficiências vitamínicas.<sup>(2,45,53,77,101,137,138)</sup> As doses de vitaminas administradas divergem de estudo para estudo, variando de 0.4 a 5 mg no que se refere ao ácido fólico, de 5 a 50 mg relativamente à vitamina B<sub>6</sub> e de 0.2 a 0.5 mg em relação à vitamina B<sub>12</sub>.<sup>(53,92,101,139-142)</sup> Doses vitamínicas superiores não são mais eficazes, excepto nos insuficientes renais.<sup>(25,45,82,138,143)</sup> Na maioria dos estudos, ao fim de cerca de oito semanas, as reduções da homocisteinemia rondaram os 30%, não tendo sido conseguidos melhores resultados, quando se associaram vitaminas antioxidantes (ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno) aos suplementos vitamínicos de ácido fólico e vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>.<sup>(53,141)</sup> Curiosamente, Glueck e colaboradores obtiveram uma descida de cerca de 70% nos valores plasmáticos de homocisteína, quando submeteram indivíduos hiperlipidémicos, com valores de homocisteinemia superiores a 16.2  $\mu\text{mol/L}$ , a uma terapêutica vitamínica com 5 mg de ácido fólico e 100 mg/dia de piridoxina.<sup>(35)</sup> Clarke e colaboradores, numa meta-análise recente sobre os efeitos terapêuticos do ácido fólico nos valores plasmáticos de homocisteína, evidenciam que as maiores reduções de homocisteína são conseguidas quando os valores de ácido fólico antes do tratamento estão baixos.<sup>(138)</sup> No mesmo estudo, a suplementação com ácido fólico (0.5 a 5 mg/dia) permitiu diminuir a homocisteinemia basal em cerca de 25% e a introdução de vitamina B<sub>12</sub> (0.5 mg/dia) associou-se a uma redução adicional de 7%. A adição de vitamina B<sub>6</sub> (16.5 mg/dia) não obteve decréscimos adicionais significativos, no entanto, não foram avaliados os efeitos desta terapêutica vitamínica na homocisteinemia após sobrecarga com metionina, a qual está mais dependente da vitamina B<sub>6</sub>.<sup>(138)</sup>

O ácido fólico parece ser a terapêutica isolada mais eficaz na hiperhomocisteinemia, no entanto, quando os níveis de homocisteína excedem os 34  $\mu\text{mol/L}$  os resultados da suplementação com ácido fólico são menos evidentes.<sup>(25,101,117,137,138)</sup> A dose óptima e a duração da terapêutica com ácido fólico não estão bem definidas. Como a resposta à terapêutica destinada à redução dos níveis séricos de homocisteína não é uniforme e depende de inúmeros factores, nomeadamente do genótipo das enzimas envolvidas

no metabolismo da homocisteína, dos co-factores e substractos do mesmo metabolismo, do estado nutricional e de características individuais, as doses de vitamínicas deverão ser adaptadas às necessidades e resposta individual de cada um.<sup>(2,45,82,109)</sup> No entanto, e apesar de um estudo<sup>(137)</sup> publicado este ano referir que a redução dos valores plasmáticos de homocisteína é possível com 0.25 mg/dia de ácido fólico, a maioria dos autores recomenda uma dose diária mínima de 0.4 mg/dia.<sup>(2,25,71,140,144)</sup>

A suplementação com ácido fólico pode ser efectuada por fármacos ou através da alimentação. A suplementação farmacológica é geralmente preferida, uma vez que o ácido pteroilmonoglutâmico, que constitui o ácido fólico sintético, é mais facilmente absorvido e apresenta uma biodisponibilidade duas vezes superior à do folato, termo genérico dado ao ácido fólico que existe naturalmente nos alimentos.<sup>(103,108,145,146)</sup> Na alimentação as maiores fontes de folato incluem os frutos e alguns vegetais verdes não cozinhados. Actualmente, nos Estados Unidos, o pão e os cereais destinados ao pequeno-almoço constituem outra fonte importante, uma vez que são suplementados com ácido fólico sintético desde Março de 1998.<sup>(45)</sup>

A progressão silenciosa da lesão neurológica em indivíduos com deficiência subclínica de vitamina B<sub>12</sub> é um perigo potencial da terapêutica com ácido fólico, principalmente quando as doses de ácido fólico são elevadas.<sup>(45,82,104,125)</sup> Um relatório publicado recentemente (1999) pelo Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes (RDI) esclarece que a ingestão de 5 mg/dia de folato, ou de ácido fólico, é perfeitamente segura e não se associa a efeitos secundários, qualquer que seja o grupo populacional, e que, mesmo na presença de deficiência de vitamina B<sub>12</sub>, a ingestão de folato inferior a doses farmacológicas de 20 mg/dia não consegue "camuflar" essa deficiência.<sup>(147)</sup> No entanto, para evitar a possível exacerbação das lesões neurológicas é fundamental excluir a deficiência de vitamina B<sub>12</sub> antes do início da terapêutica com ácido fólico, ou administrar concomitantemente o ácido fólico e a vitamina B<sub>12</sub>, à semelhança do aconselhado por William B. Castle, um professor na Faculdade de Medicina de Harvard: "nunca suplementar com ácido fólico sem administrar previamente vitamina B<sub>12</sub>".<sup>(45,53,86,125)</sup>

Apesar das doses diárias recomendadas (RDA) de vitamina B<sub>12</sub> serem de 2 µg/dia, é necessário um suplemento oral de cerca de 400 a 1000 µg/dia (0.4 a 1 mg/dia), uma vez que apenas 1 a 3% será absorvido.<sup>(8,53,86,148)</sup> De um modo geral, a administração isolada de vitamina B<sub>12</sub> é menos eficaz que a terapêutica com ácido fólico, excepto nos indivíduos com deficiência de vitamina B<sub>12</sub>.<sup>(8,53)</sup>

No que se refere à vitamina B<sub>6</sub>, a neuropatia periférica sensitiva constitui um risco do

tratamento a longo prazo com esta vitamina. No entanto, o desenvolvimento desta situação implica terapêuticas com doses diárias elevadas de vitamina B<sub>6</sub>, da ordem dos 400 mg/dia, durante longos períodos de tempo, enquanto que na hiperhomocisteinemia se utilizam doses mais baixas, que variam entre os 10 e os 50 mg/dia e que são consideradas seguras para a maioria dos indivíduos.<sup>(2,45,53,149,150)</sup>

A N-acetilcisteína e a betaína, constituem terapêuticas alternativas nos indivíduos resistentes à terapêutica com vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico.<sup>(83,151)</sup> No entanto estudos efectuados não demonstraram resultados promissores.<sup>(152)</sup>

Nos Estados Unidos e no Canadá, respectivamente desde Janeiro e Novembro de 1998, os cereais e a farinha passaram a ser fortificados com 140 µg de ácido fólico por 100 g de farinha, com o objectivo de prevenir malformações do tubo neural. Malinow e colaboradores revelaram que os cereais destinados ao pequeno-almoço enriquecidos com 127 µg/dia de ácido fólico conseguem reduzir os valores plasmáticos de homocisteína em cerca de 3.7%.<sup>(144)</sup> Um outro estudo muito recente confirma a redução dos valores de homocisteinemia e divulga que, a prevalência de hiperhomocisteinemia e da deficiência em ácido fólico, definida por valores inferiores a 6.8 nmol/L, diminuiu 48 e 92%, respectivamente.<sup>(153)</sup>

No entanto, nem todos são apologistas desta suplementação. A fortificação dos alimentos implica uma exposição de toda a população, o que pode implicar riscos para a saúde, especialmente da população mais idosa que apresenta, frequentemente, dificuldades de absorção de vitamina B<sub>12</sub>.<sup>(86,154)</sup>

As RDI para o ácido fólico e vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> são, respectivamente, de 0.4 mg, 2.0 mg e 2 µg para adultos do sexo masculino.<sup>(155)</sup> Para o sexo feminino as recomendações diárias de ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub> mantêm-se para e as de vitamina B<sub>6</sub> são diminuem para 1.6 mg.<sup>(155)</sup> Se grande parte da população, pelo menos nos Estados Unidos, não ingere folatos de acordo com as RDA, então a primeira recomendação deve ser o aumento da ingestão das referidas vitaminas através de uma alimentação mais correcta e equilibrada.<sup>(83,86,145,156)</sup> Como defendem alguns autores,<sup>(83,86,157)</sup> todos os indivíduos com valores plasmáticos de homocisteína superiores a 10 µmol/L devem seguir estas recomendações, uma vez que Boushey e colaboradores estimaram que um aumento na ingestão alimentar de ácido fólico da ordem dos 200 µg /dia permite reduzir a homocisteinemia em cerca de 4 µmol/L.<sup>(25)</sup> Malinow e colaboradores recomendam o início da suplementação farmacológica com ácido fólico, vitamina B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>, quando após intervenção alimentar se mantêm valores

plasmáticos elevados de homocisteína.<sup>(83)</sup> No entanto, esta indicação é controversa, uma vez que alguns autores não concordam com a suplementação farmacológica generalizada de vitaminas, pelo menos até que a relação causal entre a homocisteína e a aterosclerose seja claramente demonstrada.<sup>(158-161)</sup>

Efectivamente, a relação causal entre a homocisteína e a doença vascular não foi ainda demonstrada, apesar dos resultados publicados por alguns estudos de intervenção. Stampfer e colaboradores verificaram que a suplementação vitamínica com diminuição da concentração plasmática de homocisteína permitiu atrasar a progressão da aterosclerose.<sup>(162)</sup> Apesar de ser difícil diferenciar o que é induzido pelas próprias vitaminas ou pela redução da homocisteína, os resultados positivos da intervenção fortalecem a relação da causalidade.<sup>(162)</sup> De igual modo, Peterson e colaboradores<sup>(139)</sup> demonstraram a redução da placa de aterosclerose das carótidas após diminuição dos valores de homocisteína por suplementação vitamínica. Após suplementação diária com ácido fólico, Verhaar e colaboradores<sup>(163)</sup> verificaram uma melhoria na função endotelial de indivíduos com hipercolesterolemia familiar e, conseqüentemente, com risco elevado de aterosclerose. Rimm e colaboradores constataram que um aumento de 100 µg/dia na ingestão de ácido fólico permite reduzir o risco coronário em 5.8%, o que está de acordo com a estimativa de 5% divulgada anteriormente por Boushey.<sup>(25,113)</sup>

## HIPERHOMOCISTEINEMIA, ATEROSCLEROSE E ATEROTROMBOSE QUE MECANISMO?

Aparentemente, tanto os factores de risco clássicos (dislipidemia, tabaco, HTA) para a aterosclerose, como os não clássicos (hiperhomocisteinemia, stress oxidativo e inflamação, entre outros) iniciam o processo aterosclerótico pela lesão endotelial.<sup>(164-166)</sup> Posteriormente, o processo de aterosclerose evolui através da proliferação das células musculares lisas, deposição lipídica na camada íntima das artérias de grande e médio calibre, e acumulação de componentes da matriz extracelular, nomeadamente, colagénico, fibras elásticas e proteoglicanos, constituindo três das principais alterações que ocorrem durante a formação da placa aterosclerótica e que condicionam a fibrose, a calcificação e a redução do lúmen arterial.<sup>(164,165,167)</sup>

A homocisteína é considerada, por muito autores, como um ácido aminado com actividade pró-aterogénica e pró-trombogénica (**Figura 4**).<sup>(3,6,8,166-170)</sup> Estudos experimentais demonstram que a homocisteína provoca lesão vascular, participa no processo de formação da placa de ateroma, induz a progressão da aterosclerose e promove a trombose venosa e arterial.<sup>(92,171)</sup> No entanto, apesar das associações encontradas, a relação existente entre a hiperhomocisteinemia, o stress oxidativo e a disfunção endotelial, assim como os mecanismos implicados na génese da aterotrombose ainda não foram totalmente demonstrados e clarificados.<sup>(45)</sup> Alguns estudos realizados<sup>(21,45,85,166,171-174)</sup> propõem hipóteses explicativas, nomeadamente:

- lesão vascular directa: a homocisteína promove o destacamento das células endoteliais, o que predispõe a adesão e a activação plaquetária, e, subsequentemente, a trombose. Neste caso o efeito pró-trombótico da homocisteína será provocado pela lesão, ou disfunção, endotelial directa;<sup>(21,85)</sup>
- lesão oxidativa: o efeito citotóxico primário parece resultar da auto-oxidação da homocisteína, donde resultam derivados reactivos oxigenados, o superóxido e o peróxido de hidrogénio, que se associam à toxicidade endotelial;<sup>(85,172)</sup>
- indução da peroxidação dos lípidos e auto-oxidação das LDL: o superóxido produzido durante a auto-oxidação da homocisteína inicia a peroxidação dos lípidos na superfície endotelial e induz a auto-oxidação das LDL. Estas, uma vez oxidadas, são rapidamente captadas pelos macrófagos e depositam-se inevitavelmente na parede endotelial, iniciando assim o processo aterosclerótico;<sup>(21)</sup>
- aumento da afinidade entre a lipoproteína (a) e a fibrina: a homocisteína induz e promove a ligação entre a lipoproteína (a) e a fibrina, o que permite confirmar as



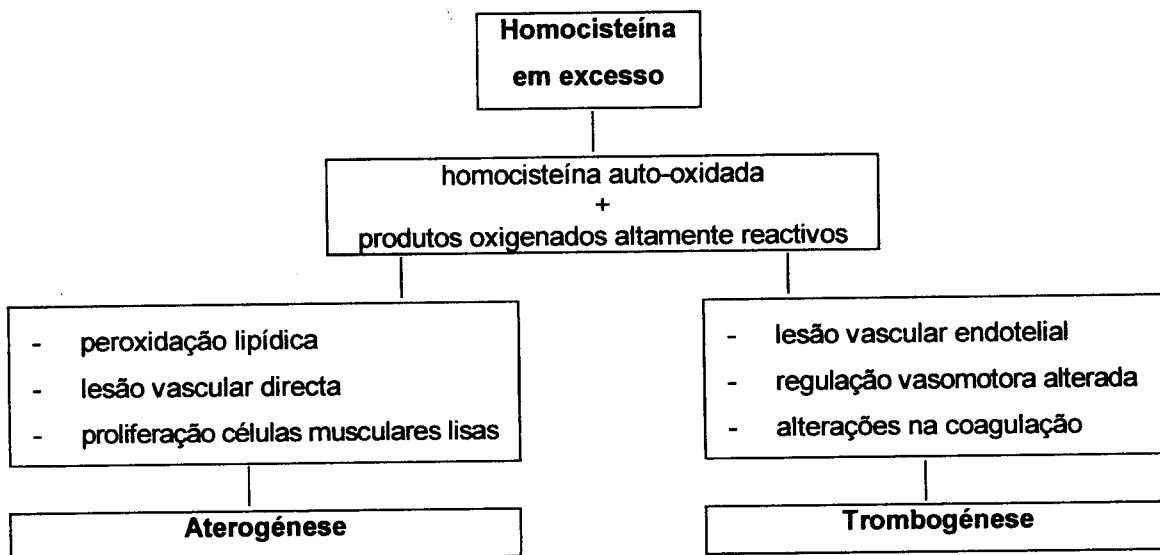
- sua propriedades pro-aterogénicas e pro-trombogénica;<sup>(92)</sup>
- activação da coagulação: a homocisteína induz alterações complexas no sistema da coagulação e da fibrinólise, nomeadamente por aumento da actividade dos factores de coagulação V, X, XI, e XII; por diminuição da actividade do factor VII e da proteína C; e por inibição da ligação do activador do plasminogénio tecidual ao seu receptor na célula endotelial.<sup>(166,171,173,174)</sup> Adicionalmente, a homocisteína induz um estado pró-trombótico ao inibir a produção do factor von Willebrand e a expressão do sulfato de heparano e da trombosmodulina, o que contribui para o aumento da produção de trombina que, promove, consequentemente, o desenvolvimento de trombose.<sup>(174)</sup>

Recentemente têm sido propostas novas teorias sobre o papel da homocisteína na aterotrombose. Jakubowski e colaboradores demonstraram que na presença de quantidades excessivas de homocisteína, a homocisteína tiolactona, um dos principais produtos intermediários do metabolismo da homocisteína, reage com as LDL, originando agregados de LDL e homocisteína tiolactona.<sup>(175)</sup> Estes agregados são captados pelos macrófagos, sendo, posteriormente, incorporados nas células espumosas que caracterizam a fase inicial do processo de formação das placas de aterosclerose. Aqui, a homocisteína tiolactona induz a acetilação das proteínas e modifica o processo oxidativo do vaso sanguíneo, promovendo a formação de ateromas e de trombos. Uma outra teoria, exposta por Lentz e colaboradores, refere que a acumulação plasmática de homocisteína altera a função vascular por diminuição da vasodilatação dependente do endotélio, o que contribui para progressão da aterosclerose e trombose.<sup>(176)</sup> Inicialmente, Welch e colaboradores, sugeriram que o endotélio normal consegue anular o efeito tóxico da homocisteína através da libertação do óxido nítrico.<sup>(85)</sup> Posteriormente, verificaram que, a longo prazo, o excesso de homocisteína lesa o endotélio de tal forma, que a produção de óxido nítrico diminui significativamente.<sup>(85)</sup> Isto foi confirmado por outros autores que demonstram que a homocisteína afecta o sistema da coagulação e a resistência do endotélio à trombose, interferindo nas funções antitrombóticas e vasodilatadoras do óxido nítrico.<sup>(24)</sup>

Apesar das inúmeras teorias, a hipótese etiológica, mais provável e menos controversa, da lesão vascular provocada pela homocisteína relaciona-se com a produção de radicais livres de oxigénio, que induzem lesão vascular oxidativa, proliferação das células musculares lisas, alteração da estrutura e da função endotelial e aumento da trombogenicidade que, implicando, posteriormente, a

aterotrombose.<sup>(85)</sup>

Convém, no entanto, salientar que os estudos experimentais são realizados com concentrações de homocisteína, pelo menos, 10 vezes superiores às encontradas nos indivíduos com hiperhomocisteinemia moderada. Assim, os resultados deste tipo de estudos devem ser interpretados com precaução. E a comprovar este facto, Cattaneo e colaboradores,<sup>(177)</sup> num estudo recente realizado *in vivo*, contrariam a teoria exposta por Lentz e colaboradores,<sup>(174)</sup> que refere que a homocisteína induz um efeito protrombótico através do aumento da produção de trombina. Cattaneo e colaboradores não encontraram qualquer associação entre os valores de homocisteína e a produção de trombina, sugerindo que, em condições fisiológicas, a homocisteína não interfere na activação da proteína C.<sup>(177)</sup>



**Fig 4.** Mecanismos possíveis de aterosclerose e aterotrombose.

(Adaptado de Hankey G.J., Elkelboom J.W.: Lancet 1999; 354:407-413.)

## HOMOCISTEÍNA E OUTROS FACTORES DE RISCO DA ATEROSCLEROSE: QUE RELAÇÃO?

O efeito de cada um dos factores de risco cardiovascular é marcadamente influenciado pelos outros factores, que estão geralmente presentes. Nos últimos anos vários estudos têm chamado a atenção para o facto de os principais factores de risco cardiovascular - HTA, dislipidemia e diabetes mellitus se encontrarem associados no mesmo indivíduo. Esta agregação de factores de risco tem sido confirmada em várias populações.<sup>(178)</sup> Relativamente à hiperhomocisteinemia permanecem dúvidas se este "novo" factor de risco se agrega com outros factores de risco da aterosclerose, e se sim com quais, ou se surge de forma isolada e não se associa a nenhum dos outros factores.

### ***Factores de risco clássicos***

A HTA, o colesterol LDL elevado e os hábitos tabágicos são os principais factores de risco clássicos e independentes para a aterosclerose. O colesterol HDL diminuído, a diabetes mellitus e a idade avançada são outros factores de risco clássicos. **(Quadro 2)** Tal como referido, apesar de alguns autores não terem conseguido estabelecer na população geral, uma ligação consistente entre a hiperhomocisteinemia e os factores de risco classicamente associados à aterosclerose, outros verificaram uma associação significativa entre a hiperhomocisteinemia e alguns factores nomeadamente, a hipercolesterolemia, HTA e a presença de hábitos tabágicos.<sup>(46)</sup>

### ***Factores de risco não tradicionais***

Cerca de 25% dos indivíduos com episódios cardiovasculares não apresenta qualquer um dos factores de risco clássicos ou estabelecidos.<sup>(8,170)</sup> A procura constante de causas que expliquem essas situações é responsável pelo conhecimento actual de mais de 300 factores de risco para a aterosclerose. Os valores aumentados de fibrinogénio, lipoproteína (a) e homocisteína são exemplos de alguns dos "novos" factores de risco, recentemente incluídos na lista dos factores de risco major para a aterosclerose **(Quadro 2)**.<sup>(3,6,8,167-170,179,180)</sup>

Os efeitos procoagulantes e antifibrinolíticos induzidos por alguns factores e mecanismos hematológicos, mesmo normais, podem predispor os indivíduos com hiperhomocisteinemia a doença oclusiva venosa e arterial.<sup>(56)</sup> Alguns autores referem que a homocisteína induz, por si só, alterações hemostáticas e um consequente estado de hipercoagulação, que aumenta de forma significativa o risco de

aterotrombose.<sup>(55,98)</sup> Outros referem que o risco de trombose associado à presença de hiperhomocisteinemia é pequeno, a não ser que coexista outro factor capaz de contribuir para um estado de hipercoagulação, nomeadamente a variante termolábil da MTHFR, mutações no gene do factor V Leiden (A1691G) e/ou da protrombina (G20210A) e valores aumentados de fibrinogénio e de inibidor do activador do plasminogénio (PAI-1).<sup>(51,55)</sup>

A mutação do gene da protrombina G20210A foi recentemente considerada um factor de risco para a trombose venosa,<sup>(52,54,57)</sup> doença vascular arterial e doença cerebrovascular isquémica,<sup>(181-184)</sup> embora essa associação não tenha sido encontrada num estudo recente realizado em crianças com acidente vascular cerebral prematuro.<sup>(185)</sup> A referida mutação promove um estado de hipercoagulação, uma vez que, directa ou indirectamente, induz a síntese de protrombina, aumenta a taxa de conversão do fibrinogénio em fibrina, que por sua vez activa a agregação plaquetária.<sup>(107)</sup> A frequência desta mutação ocorre em cerca de 1% da população geral, em 4 a 6% dos indivíduos com trombose venosa e em 18% dos indivíduos com história familiar de tromboembolismo familiar.<sup>(55,181)</sup> Recentemente a mesma mutação foi associada a níveis aumentados de homocisteína, o que poderia contribuir para o desenvolvimento e a ocorrência de trombose venosa.<sup>(181,183)</sup>

O fibrinogénio e o PAI-1 são outros factores envolvidos no processo da coagulação e da fibrinólise e, conseqüentemente, na etiologia de episódios aterotrombóticos.<sup>(8,167,188)</sup>

Os valores elevados de fibrinogénio e de PAI-1 constituem um factor de risco significativo de aterotrombose na população geral, tendo sido encontrados valores igualmente aumentados de fibrinogénio e de PAI-1 nos insuficientes renais.<sup>(167,168)</sup>

Acrescidamente, parece haver uma relação entre os valores de homocisteína e de fibrinogénio, que sendo confirmada aumentará o risco de aterosclerose de forma significativa.<sup>(187)</sup>

A Lp(a), uma lipoproteína estruturalmente semelhante à LDL e ao plasminogénio, é outro dos "novos" factores de risco da doença vascular aterosclerótica.<sup>(188,189)</sup>

Aparentemente, não existe associação entre a Lp(a) e a homocisteína.<sup>(39,40,63,69,190-192)</sup>

### **Outros factores de risco**

A presença de história familiar e os antecedentes de doença vascular aterosclerótica associam-se geralmente a valores elevados de homocisteína.<sup>(26,28,30,35,38,47)</sup> A inactividade física associa-se também, e como referido anteriormente, a concentrações plasmáticas aumentadas de homocisteína,<sup>(6,21,129)</sup> no entanto isso não se verificou para a obesidade na maior parte dos estudos.<sup>(39,40,63,69,190-192)</sup> Relativamente

às características étnicas e factores psicossociais desconhecem-se estudos relacionados com a homocisteína.

## Quadro 2

### Factores de Risco da Aterosclerose

#### ***Factores de risco clássicos e independentes***

- Hipertensão Arterial
- Hábitos Tabágicos
- Colesterol LDL elevado
- Colesterol HDL baixo
- Diabetes Mellitus
- Idade avançada

#### ***Factores de risco não convencionais***

- Concentração aumentada de homocisteína
- Concentração elevada de Lp(a)
- Valores elevados de fibrinogénio
- Hipertrigliceridemia
- Agentes infecciosos (ex: *Chlamydia pneumoniae*)
- Marcadores de inflamação (proteína C reactiva...)
- Substâncias procoagulantes (PAI-1, Gene G20210A...)

#### ***Outros factores de risco***

- Obesidade
- Sedentarismo
- História familiar de doença coronária prematura
- Antecedentes de doença vascular
- Características étnicas
- Factores psicossociais

(Adaptado de Harjai K.J.: Ann Intern Med 1999; 131: 376-386 e de Grundy S.M., Pasternak R., Greenland P., et al: Circulation 1999; 100: 1481-1492.

## HIPERHOMOCISTEINEMIA NA INSUFICIÊNCIA RENAL CRÓNICA

Os insuficientes renais crónicos constituem um dos grupos populacionais com maior risco de doença vascular aterosclerótica, principalmente cardiovascular.<sup>(153,193-195)</sup> Este risco elevado é devido à prevalência aumentada não só dos factores de risco clássicos para a aterosclerose, nomeadamente HTA, diabetes e dislipidemia, mas também de alguns factores de risco específicos desta população, como o hiperparatiroidismo, a anemia e a uremia, e dos "novos" factores de risco, nomeadamente os níveis aumentados de Lp(a), de fibrinogénio e de homocisteína.<sup>(7,152,170,193,195,196)</sup>

A presença de hiperhomocisteinemia, ligeira e moderada, ocorre em cerca de 75 a 100% dos doentes com insuficiência renal crónica terminal (IRCT).<sup>(33,152,196-200)</sup> Alguns autores sugerem que a hiperhomocisteinemia é mais comum que qualquer outro factor de risco tradicionalmente encontrado nos insuficientes renais.<sup>(196)</sup> Este facto é extremamente importante, uma vez que, à semelhança do que ocorre na população geral, os valores plasmáticos elevados de homocisteína constituem um factor de risco independente no desenvolvimento de aterosclerose e aterotrombose também nos insuficientes renais.<sup>(117,142,193,198,200-204)</sup> A associação entre a hiperhomocisteinemia e a ocorrência de episódios cardiovasculares é demonstrada em estudos retrospectivos<sup>(33,171)</sup> e confirmada por alguns estudos observacionais prospectivos.<sup>(96,171,193,201,202,205)</sup>

Um estudo prospectivo recente, realizado em insuficientes renais em diálise, revela que, por cada  $\mu\text{mol/L}$  de aumento na concentração plasmática de homocisteína o risco relativo de morte e de ocorrência de episódios cardiovasculares aumenta cerca de 1%.<sup>(201)</sup> Bostom e colaboradores, num estudo igualmente prospectivo, advertem que os indivíduos em terapêutica dialítica regular com concentrações elevadas de homocisteinemia apresentam um risco três a quatro vezes aumentado para a ocorrência de episódios cardiovasculares, fatais ou não.<sup>(193)</sup> Apesar de não se associar ao aumento da taxa de progressão da deterioração renal,<sup>(206)</sup> a hiperhomocisteinemia surge logo nas fases iniciais da insuficiência renal, o que implica uma exposição persistente, e durante um longo período de tempo, a esse factor de risco.<sup>(171,200,201,203,207-210)</sup> Efectivamente, a hiperhomocisteinemia verifica-se em indivíduos com graus distintos de insuficiência renal crónica<sup>(96,200,210,211)</sup>, nos insuficientes renais com terapêutica dialítica regular, em hemodiálise<sup>(147,208,210,212-215)</sup> ou em diálise peritoneal<sup>(208,210,216)</sup>, e nos transplantados renais<sup>(12,14,202,217-222)</sup>. Comparativamente a controlos saudáveis os insuficientes renais apresentam valores

de homocisteína consideravelmente superiores, podendo atingir o dobro ou o quádruplo se a insuficiência renal for, respectivamente, ligeira ou grave.<sup>(96,210-215)</sup>

O tratamento hemodialítico consegue reduzir, mas não normalizar, os valores pré-dialíticos de homocisteína, numa percentagem variável de estudo para estudo, cerca de 11%<sup>(215)</sup>, 23%<sup>(213)</sup> ou 30%<sup>(212,223)</sup>. A título comparativo, a remoção da creatinina atinge os 50%.<sup>(210)</sup> A razão provável da pequena fracção removida parece estar relacionada com a forma como a homocisteína circula maioritariamente na corrente sanguínea, ou seja, associada às proteínas. A elevada variabilidade entre as percentagens de remoção de homocisteína obtidas nos diversos estudos pode ser explicada por diversos factores, nomeadamente pelo tipo de homocisteína doseada (total, livre ou combinada), uma vez que a depuração da homocisteína livre é significativamente superior à da sua forma combinada.<sup>(171,210,213)</sup> Por outro lado, o tipo de membranas dialíticas interfere na percentagem de homocisteína removida. Os filtros de diálise de alto fluxo são bastante mais permeáveis, permitindo obter uma remoção de homocisteína combinada de cerca de 50%.<sup>(96,171)</sup>

#### *Causas da hiperhomocisteinemia na insuficiência renal*

Na insuficiência renal as causas da hiperhomocisteinemia incluem carências vitamínicas, excreção renal diminuída e metabolismo renal e extra-renal alterados (**Quadro 3**).

À partida as carências vitamínicas, nomeadamente de vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico, induzidas pelo tipo de alimentação e/ou pela terapêutica farmacológica realizada pelos insuficientes renais crónicos constituem uma explicação possível para a elevada prevalência de hiperhomocisteinemia destes indivíduos. No entanto, uma vez que a suplementação vitamínica é efectuada, por rotina, a todos os indivíduos com grau moderado a grave de insuficiência renal ou quando se submetem a tratamento dialítico regular, é pouco provável que a deficiência das referidas vitaminas seja a causa da hiperhomocisteinemia.<sup>(117,196)</sup> A comprovar esta suposição foram encontrados valores plasmáticos normais das referidas vitaminas nos insuficientes renais em terapêutica dialítica regular.<sup>(224)</sup>

Normalmente, e como foi referido, 70 a 80% da homocisteína circulante está combinada com as proteínas, de modo que a quantidade de homocisteína excretada pela urina é muito pequena, 3 a 10  $\mu\text{mol}/24\text{h}$ , ou seja, cerca de 0.1% da produção diária de homocisteína.<sup>(196,225,226)</sup> Assim sendo, a perda, ou diminuição, da excreção renal também não é razão suficiente para explicar a acumulação plasmática excessiva de homocisteína nos insuficientes renais.<sup>(196,199,209,225,227)</sup>

No entanto, a homocisteinemia correlaciona-se de forma negativa com a função renal,

o que sugere que a perda progressiva da função renal se associa a alterações no metabolismo da homocisteína.<sup>(96,142,228,225,226,229)</sup> A redução ou perda do catabolismo da homocisteína no rim, em resultado do comprometimento da sua capacidade metabólica, é outra explicação possível.<sup>(142,225)</sup> Bostom e colaboradores<sup>(209)</sup> confirmam esta hipótese através de um estudo experimental realizado em ratos com função renal normal. Este estudo comprovou a remoção substancial de homocisteína do plasma por filtração glomerular, seguida da sua quase total reabsorção nos capilares renais peritubulares e degradação no parênquima renal por remetilação e transsulfuração com, conseqüente, excreção urinária reduzida.<sup>(209,225)</sup> Extrapolando os resultados obtidos para o Homem, os autores sugerem que o metabolismo e a depuração renal da homocisteína possam contribuir com cerca de 70% da eliminação diária da homocisteína plasmática. Assim sendo, na insuficiência renal, a reduzida capacidade metabólica do rim limita, de forma significativa, a depuração renal da homocisteína, que não sendo compensada pelo aumento do catabolismo extra-renal desse aminoácido, pode constituir uma das causas possíveis da elevada prevalência de hiperhomocisteinemia que caracteriza esta população.<sup>(203,209,225,229)</sup> No entanto, como os resultados encontrados são também compatíveis com irregularidades no metabolismo extra-renal da homocisteína, não é ainda possível estabelecer uma relação causal entre o decréscimo da depuração renal da homocisteína e a diminuição da sua remoção plasmática.<sup>(203,225)</sup> Guttormsen e colaboradores corroboram a teoria da perda da capacidade renal de metabolização da homocisteína, como a causa etiológica provável da hiperhomocisteinemia na insuficiência renal.<sup>(230)</sup> Num estudo realizado em oito insuficientes renais, estes autores comprovaram que a eliminação plasmática da homocisteína estava significativamente diminuída nos insuficientes renais, uma vez que a depuração da homocisteína foi 70% mais baixa que a obtida em indivíduos normais, o que permite reforçar a importância da função renal na homeostasia da homocisteína.<sup>(230)</sup>

Por seu lado, van Guldener e colaboradores discordam das teorias que defendem o papel preponderante do rim no metabolismo da homocisteína e, conseqüentemente, na sua concentração sérica.<sup>(231)</sup> Num estudo realizado em 20 indivíduos com valores séricos normais de creatinina e homocisteína, os autores verificaram não haver uma depuração renal significativa de homocisteína, tanto livre como combinada.<sup>(231)</sup> Os autores referem que, desconhecem se a depuração renal da homocisteína aumenta na presença de concentrações plasmáticas elevadas desse aminoácido, no entanto, quando a hiperhomocisteinemia existe sem comprometimento renal, o rim não consegue normalizar os valores plasmáticos da homocisteína, apesar de



desempenhar um papel importante na sua depuração plasmática, como sugerem alguns autores. Van Guldener e colaboradores concluem, conseqüentemente, que a disfunção renal pode agravar, mas não causar hiperhomocisteinemia.<sup>(231)</sup> Alterações do metabolismo extra-renal da homocisteína constituem a hipótese etiológica defendida por estes autores, no que se refere à hiperhomocisteinemia associada à insuficiência renal. Essas alterações são induzidas, provavelmente, por factores relacionados com a uremia, como por exemplo as toxinas urémicas, eventualmente responsáveis por inibir enzimas envolvidas na metabolização da homocisteína e/ou interferir no metabolismo do ácido fólico, nomeadamente a nível do seu transporte transmembranário.<sup>(231-234)</sup> Esta hipótese é apoiada por outros autores, que afirmam que determinados factores associados à uremia, nomeadamente os níveis aumentados de sulfato, podem causar hiperhomocisteinemia.<sup>(235)</sup> Livant e colaboradores demonstram que a actividade da conjugase plasmática do folato (enzima que hidroliza a forma poliglutamil do folato em monoglutamil) é sensível ao sulfato, de modo que, é possível que os valores aumentados de sulfato possam inibir a referida enzima.<sup>(235)</sup> Assim, adicionalmente ao metabolismo renal alterado da homocisteína, os níveis aumentados de sulfato, característicos da insuficiência renal, podem também ser responsáveis por alterações no metabolismo extra-renal da homocisteína, nomeadamente a nível hepático.<sup>(235)</sup> Por outro lado, o fígado é o local onde ocorre a maior parte do metabolismo proteico e dos ácidos aminados e onde foram descritas inúmeras alterações metabólicas na presença de insuficiência renal crónica, nomeadamente a nível do metabolismo dos ácidos aminados sulfurados, de que é exemplo a homocisteína.<sup>(236)</sup>

A insuficiência renal é também caracterizada por múltiplas alterações metabólicas induzidas pela uremia.<sup>(236,237)</sup> Estas alterações originam um aminograma típico, caracterizado pelo aumento significativo da concentração de ácidos aminados sulfurados, e diminuição dos não sulfurados, e pela redução dos aminoácidos essenciais associado ao aumento dos não essenciais.<sup>(232,236-240)</sup> A serina é um dos aminoácidos cuja concentração plasmática está geralmente reduzida nos insuficientes renais, uma vez que grande parte da serina circulante é sintetizada no rim a partir da glicina. A serina desempenha um papel fundamental no metabolismo da homocisteína, uma vez que funciona como dador de radicais metílicos nas duas vias metabólicas, de forma que a sua carência pode contribuir para a acumulação excessiva de homocisteína no plasma.<sup>(142, 196, 212, 218, 232, 239)</sup>

Wilcken e colaboradores<sup>(142)</sup> realizaram um estudo em que suplementaram com ácido fólico 21 indivíduos com hiperhomocisteinemia e diferentes graus de insuficiência

renal, tendo verificado a redução dos níveis de homocisteína em todos os participantes.<sup>(142)</sup> Curiosamente, a concentração plasmática de serina diminuiu, enquanto que a de glicina aumentou, o que permite sugerir que a diminuída massa renal activa dos insuficientes renais não permitiu a conversão da glicina em serina. Esta seria outra hipótese a corroborar a teoria do comprometimento do metabolismo renal da homocisteína provocado pela insuficiência renal.<sup>(142)</sup>

Embora alguns autores<sup>(226,229)</sup> demonstrem que a remetilação está diminuída em cerca de 30% na insuficiência renal, outros<sup>(210,234,241)</sup> consideram que esta situação patológica é compatível com perturbações na via metabólica da transsulfuração, uma vez que a uremia se associa à diminuição significativa da concentração de vitamina B<sub>6</sub>, um dos co-factores determinantes no metabolismo da homocisteína, nomeadamente a nível da transsulfuração.

Outros mecanismos envolvidos na génese da hiperhomocisteinemia dos insuficientes renais incluem a produção de homocisteína pelo rim na presença de insuficiência renal e o aumento do catabolismo renal das proteínas, em que o excesso da metionina libertada seria convertida em homocisteína no fígado.<sup>(231)</sup>

### Quadro 3

#### Causas Possíveis da Hiperhomocisteinemia na Insuficiência Renal

- × Diminuição da excreção renal;<sup>(117)</sup>
- × Metabolismo renal da homocisteína comprometido;<sup>(117,209)</sup>
- × Perda de parênquima renal, principalmente função das células tubulares renais;<sup>(118)</sup>
- × Alterações no metabolismo extrarenal da homocisteína provocadas pela uremia, nomeadamente;<sup>(117,118,231)</sup>
  - tóxicas urémicas;
  - níveis aumentos de sulfato
  - deficiência de serina
- × Presença de deficiências enzimáticas não diagnosticadas nomeadamente de cistationina β-sintetase ou N<sup>5</sup>-N<sup>10</sup>-metilenotetrahidrofolato reductase;<sup>(118)</sup>
- × Factores relacionados com a diálise, nomeadamente membranas de diálise;<sup>(118)</sup>
- × Carências vitamínicas, induzidas por fármacos ou pela alimentação deficiente;<sup>(118)</sup>

*Terapêutica*

Tal como na população geral, estudos realizados em insuficientes renais destacam a relação negativa existente entre as concentrações de homocisteína e de vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico.<sup>(33,96,105,117,147,171,142,196,216,223,231,242-245)</sup> Por outro lado, inúmeras investigações confirmam que a hiperhomocisteinemia na insuficiência renal pode ser atenuada por esquemas terapêuticos com ácido fólico.<sup>(96,142,143,152,196,197,223,230,231,243-246)</sup> No entanto, nenhuma destas terapêuticas conseguiu normalizar a concentração plasmática de homocisteína. Aparentemente, a resposta máxima da suplementação vitamínica na redução da homocisteinemia e na disfunção endotelial é conseguida ao fim de duas semanas.<sup>(197)</sup>

Parece haver consenso relativamente ao papel determinante do ácido fólico na regulação do metabolismo e da concentração plasmática de homocisteína, no entanto, os resultados da maior parte dos estudos permitem concluir que a suplementação de ácido fólico, mesmo em doses elevadas, não consegue normalizar a homocisteinemia na maioria dos doentes.<sup>(117,196,207,208,223,242,243)</sup> Este facto sugere que a suplementação vitamínica não consegue compensar a perda ou diminuição da depuração e do metabolismo renal da homocisteína que ocorre na presença de insuficiência renal crónica.<sup>(208,243,247)</sup>

Por outro lado, Guttormsen e colaboradores defendem que a terapêutica vitamínica só é eficaz se a hiperhomocisteinemia se associar ao défice de ácido fólico.<sup>(230)</sup> Este pressuposto é contradito por outros estudos que esclarecem que, mesmo com valores plasmáticos de ácido fólico considerados normais, a suplementação com ácido fólico permite reduzir os valores de homocisteína.<sup>(117,244)</sup>

Tal como ocorre na população geral, num estudo realizado por Dierkes e colaboradores, não foi observado o efeito dose-resposta entre a suplementação com ácido fólico e a concentração plasmática de homocisteína, a partir de 2.5 mg/dia de ácido fólico.<sup>(208)</sup> Ou seja, a dose diária de 2.5 mg de ácido fólico tem o efeito máximo na redução dos níveis séricos da homocisteína; doses superiores não permitiram reduções maiores.<sup>(208)</sup> No entanto, estas afirmações são contestadas por outros estudos, que revelam que a percentagem de redução dos níveis plasmáticos de homocisteína é directamente proporcional à dose de ácido fólico utilizada.<sup>(147,152,207)</sup>

Tal como na população geral, exceptuando um estudo realizado por Wilcken e colaboradores,<sup>(248)</sup> as terapêuticas alternativas com N-acetilcisteína, betaina e serina foram também ineficazes na redução da homocisteinemia dos insuficientes renais.<sup>(196,245,249)</sup>

## HIPERHOMOCISTEINEMIA NO TRANSPLANTE RENAL

Tal como os insuficientes renais crónicos, os transplantados renais apresentam taxas elevadas de aterosclerose, de tal modo que a doença cardiovascular constitui a sua principal causa de morbilidade e mortalidade.<sup>(12-14,195,217)</sup> Relativamente aos insuficientes renais em diálise, o transplante renal permite atenuar a elevada incidência de doença cardiovascular. Mesmo assim, os transplantados renais são caracterizados por elevado risco de ocorrência de episódios aterotrombóticos.<sup>(13)</sup> Comparativamente à população geral, o risco de ocorrência de episódios cardiovasculares de origem aterosclerótica é cerca de quatro vezes superior nos transplantados renais. O risco de mortalidade pela mesma causa atinge, pelo menos, o dobro.<sup>(12,14,250)</sup> O risco aumentado de aterosclerose desta população resulta da prevalência elevada dos convencionais e não convencionais factores de risco para a aterosclerose e aterotrombose, acrescida das dificuldades causadas pela terapêutica imunossupressora na atenuação e tratamento de alguns desses factores, nomeadamente da dislipidemia, HTA e obesidade.<sup>(12,14,250)</sup>

Se muitas investigações caracterizam, no transplante renal, os factores de risco clássicos para a aterosclerose no que se refere à sua prevalência, distribuição, determinantes, o mesmo não acontece com outros factores de risco, nomeadamente com a hiperhomocisteinemia. Os estudos que associam a homocisteína ao transplante renal são reduzidos, mas todos revelam que os transplantados renais clinicamente estáveis apresentam concentrações de homocisteína mais elevadas que a população normal, tanto em jejum como após administração de uma dose de metionina, o que pode contribuir, de forma significativa, para o risco aumentado de doença vascular aterosclerótica destes indivíduos.<sup>(114,202,217-219,251)</sup>

Wilcken e colaboradores<sup>(218)</sup> foram os primeiros investigadores a analisar a concentração plasmática de homocisteína nos transplantados renais, tendo verificado a sua elevação relativamente aos valores considerados normais. Posteriormente, outros estudos confirmaram esse facto.<sup>(202,217-219,251,252)</sup> No que se refere à homocisteinemia após sobrecarga com metionina apenas um estudo efectuou essa prova, verificando também valores de homocisteína, após sobrecarga com metionina, significativamente mais elevados que controlos saudáveis.<sup>(219)</sup>

Alguns autores demonstram que, apesar de mais elevados que na população geral, os valores plasmáticos de homocisteína diminuem após o transplante renal. Num estudo realizado por Arnadottir e colaboradores, a homocisteinemia diminuiu apenas 14%, apesar de ser esperada uma redução maior após um transplante renal bem sucedido,

uma vez que a função renal melhora significativamente. Este resultado permite questionar todas as teorias referentes ao papel do rim no metabolismo da homocisteína, visto que a melhoria, ou a normalização, da função renal após o transplante renal implicou apenas uma descida ligeira na homocisteinemia basal, verificando-se mesmo uma subida em 16 dos 55 dos participantes (29%).<sup>(222)</sup> Em sintonia com este resultado, alguns autores classificam a hiperhomocisteinemia como um factor de risco importante e significativo no desenvolvimento da doença cardiovascular dos transplantados renais, mas independente da função renal.<sup>(253)</sup>

A contrariar estas suposições, Kim e colaboradores realizaram um estudo com oito transplantados renais, em que foi determinada a homocisteinemia basal nos 1º, 3º, 7º e 21º dias após o transplante renal, tendo-se verificado que os valores plasmáticos de homocisteína diminuíram e normalizaram após o transplante renal. Os autores explicam a redução marcada da homocisteinemia após o transplante renal pelo aumento da excreção urinária de homocisteína, ao invés da recuperação da função tubular conseguida pelo enxerto.<sup>(252)</sup> Obviamente que o reduzido tamanho da amostra tem de ser salientado.

Se não há certezas relativamente aos mecanismos implicados na génese da hiperhomocisteinemia que caracteriza os insuficientes renais crónicos, a situação mantém-se ou piora para os transplantados renais. No transplante renal não há, sequer, uniformidade de conclusões no que se refere à existência ou não de hiperhomocisteinemia: alguns autores<sup>(202,217-219,222,251,254,255)</sup> demonstram a manutenção de valores plasmáticos elevados de homocisteína, outros<sup>(252)</sup> revelam a normalização da sua concentração após transplante renal.

Os autores que verificam a manutenção de valores plasmáticos aumentados de homocisteína após o transplante apontam algumas hipóteses etiológicas. Alguns estudos referem que os transplantados renais têm défices de ácido fólico e vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>, possivelmente em resposta à terapêutica imunossupressora ou à presença de toxinas urémicas.<sup>(218,254,255)</sup> Uma alimentação carenciada em ácido fólico, absorção diminuída e perdas aumentadas podem ser outras causas possíveis dos défices de ácido fólico.<sup>(131,254)</sup> Lacour e colaboradores, num estudo efectuado em transplantados renais, comprovaram a presença de deficiência de vitamina B<sub>6</sub> em 65% dos indivíduos estudados.<sup>(255)</sup> Este é, sem dúvida, um resultado a considerar, uma vez que o défice de vitamina B<sub>6</sub> é importante, não só devido ao seu papel no metabolismo da homocisteína, mas também porque tem um efeito anti-trombótico a nível plaquetário.<sup>(32,111,256)</sup>

Por outro lado, se o transplante renal não implicar o restabelecimento total da função renal, ou seja, se o enxerto renal não permitir a recuperação total da função renal, então as hipóteses etiológicas da hiperhomocisteinemia incluem todas as referidas para a insuficiência renal, exceptuando-se os factores relacionados com a diálise e acrescentando-se a terapêutica imunossupressora.<sup>(96,209,225)</sup> (Quadro 3).

Relativamente à possibilidade de alterações genéticas, apenas um estudo abordou essa questão.<sup>(257)</sup> Födingger e colaboradores pesquisaram o poliformismo C677T da enzima MTHFR em 536 transplantados, tendo encontrado verificado 63 (9.9%) mutantes homozigóticos (TT) e 272 (42.7%) heterozigóticos (CT), o que está de acordo com a prevalência verificada na população geral.<sup>(21,257)</sup> Comparativamente aos indivíduos heterozigóticos ou sem mutação, os transplantados homozigóticos associaram-se a valores de homocisteína significativamente mais elevados e, como esperado, a concentrações plasmáticas de ácido fólico mais baixas.<sup>(257)</sup>

### *Terapêutica*

Relativamente ao efeito da terapêutica vitamínica na hiperhomocisteinemia dos transplantados renais, apenas dois estudos foram realizados. Amadottir e colaboradores administraram 5 mg de ácido fólico a nove transplantados com concentrações aumentadas de homocisteína, tendo verificado um decréscimo médio de 28%.<sup>(258)</sup> Bostom e colaboradores realizaram um estudo em 29 transplantados renais, com o objectivo de avaliar a eficácia da suplementação das vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico no tratamento da hiperhomocisteinemia basal (>20 µmol/L) e após sobrecarga com metionina (>30 µmol/L).<sup>(114)</sup> Tal como ocorreu em estudos efectuados na população geral, a terapêutica com ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub> permitiu reduzir os níveis de homocisteinemia basal, enquanto que a suplementação com vitamina B<sub>6</sub> diminuiu os valores séricos de homocisteína após sobrecarga com metionina.<sup>(114)</sup> Este estudo recomenda a adição de 50 mg/dia de piridoxina a uma combinação de 5 mg/dia de ácido fólico e 0.4 mg/dia de vitamina B<sub>12</sub> para reduzir a concentração plasmática de homocisteína dos transplantados renais com hiperhomocisteinemia.<sup>(114)</sup>

## IMPORTÂNCIA DO ESTUDO

Como foi referido, as doenças cerebro e cardiovascular constituem, respectivamente, a primeira e terceira causas de morte em Portugal.<sup>(5)</sup> Apesar do progresso conseguido nos conhecimentos acerca da aterosclerose, não é ainda possível explicar completamente a sua ocorrência na população. A sua evolução é contínua e, muitas vezes, silenciosa até ocorrer um enfarte do miocárdio, um acidente vascular cerebral ou mesmo a morte súbita. E é relativamente frequente a ocorrência destes episódios, não ser acompanhada de um perfil de risco "pesado" em termos de factores de risco clássicos, particularmente nos indivíduos de meia idade.<sup>(104)</sup> Quantas vezes ocorre um enfarte do miocárdio sem qualquer factor de risco clássico associado? Segundo estudos clínicos, epidemiológicos e experimentais, os factores de risco clássicos explicam apenas 50 a 75% do desenvolvimento da aterosclerose e do risco de ocorrência de doença vascular aterosclerótica.<sup>(2)</sup> Outros factores de risco têm sido procurados e investigados. A elevação do fibrinogénio, de alguns factores da coagulação, da lipoproteína (a) e da homocisteína são alguns desses exemplos e encontram-se frequentemente presentes na população com TR.<sup>(168, 170)</sup>

A doença vascular aterosclerótica tem, indubitavelmente, uma importância crescente, não só do ponto de vista clínico mas também do ponto de vista de Saúde Pública.<sup>(259)</sup> Os cuidados e os gastos efectuados com insuficientes renais crónicos e transplantados renais utilizam uma grande proporção dos recursos do nosso país destinados aos cuidados de saúde.<sup>(260)</sup> Quando a insuficiência renal e a doença vascular aterosclerótica se associam, os custos deste síndrome clínico são incontroláveis. Assim, têm sido desenvolvidos esforços para identificar e estudar os factores clínicos e sócio-demográficos que colocam os indivíduos num risco aumentado de desenvolver aterotrombose.<sup>(259)</sup> Os indivíduos sem factores de risco major, para a doença vascular aterosclerótica, caracterizam-se por menor morbidade e mortalidade que os indivíduos com perfis de risco desfavoráveis. Estes apresentam despesas de saúde médias significativamente superiores, custando muito mais ao Estado.<sup>(259)</sup> Assim, um perfil favorável no que se refere à doença vascular, implica não só a diminuição da morbidade e aumento na longevidade, mas também a menores custos nos cuidados de saúde e melhoria significativa da qualidade de vida. E isto também é válido para os transplantados renais face ao risco aumentado de aterosclerose que apresentam.

Estudos efectuados nas últimas décadas sobre a doença vascular aterosclerótica no transplante renal possibilitaram o conhecimento das características epidemiológicas

desta patologia. Possibilitaram também a descoberta e o estudo de factores de risco envolvidos no desenvolvimento inicial e no reaparecimento subsequente desta patologia, assim como a aplicação de algumas intervenções promissoras, tanto a nível da prevenção, como da terapêutica. <sup>(10,259,261)</sup>

A obtenção de informação relativamente à orientação dos transplantados renais com hiperhomocisteinemia é imprescindível, só assim será possível incluir mais este factor de risco na definição de estratégias de prevenção primária e secundária da doença vascular aterosclerótica, uma vez que a sua modificação pode alterar o curso da doença e reduzir a elevada morbidade e mortalidade que caracteriza estes indivíduos. O conhecimento da frequência e distribuição da hiperhomocisteinemia pode contribuir para identificar e actuar sobre os factores predisponentes mais importantes. Isso é necessário, não só pelo interesse científico, mas também pelas implicações socio-económicas associadas. Apesar da crescente compreensão dos factores precipitantes e dos mecanismos fisiopatológicos da aterosclerose que caracteriza os transplantados renais, as medidas terapêuticas não têm impedido que a morbidade e a mortalidade sejam elevadas e, por vezes, crescentes. O estudo das suas vertentes epidemiológicas é considerado indispensável para o desenvolvimento de programas de investigação e prevenção subsequentes. E só é possível delinear planos exequíveis e eficazes de prevenção, e de tratamento depois de conhecer a frequência e principais determinantes da hiperhomocisteinemia.

Como foi referido, a concentração plasmática elevada de homocisteína é considerada, na população geral, um factor de risco independente para o desenvolvimento e ocorrência de aterosclerose e aterotrombose. Muitos autores confirmam essa associação em populações com patologias renais. É possível que a hiperhomocisteinemia consiga explicar, pelo menos parcialmente, a aterogénese acelerada que caracteriza a insuficiência renal crónica terminal e o transplante renal. <sup>(7,12,21,118,195)</sup>

Embora a relação causal entre a hiperhomocisteinemia e a doença vascular aterosclerótica não tenha ainda sido demonstrada, a prevalência, distribuição e principais determinantes da concentração plasmática elevada de homocisteína estão relativamente bem estudados na população geral. Isso não acontece nos transplantados renais.

Apesar dos inúmeros estudos publicados sobre a homocisteína, nomeadamente na população geral e, mesmo, na população com insuficiência renal, tivemos aceso



apenas a 13 estudos publicados sobre a homocisteína e o TR.<sup>(12,202,217-222,251,257,262-265)</sup>  
 Nenhum deles é português. No nosso país, com excepção dos estudos realizados por Palma Reis e colaboradores,<sup>(27,47-49,128)</sup> não se conhecem outras investigações nacionais, pelo menos publicadas, referentes a este factor de risco.

Assim, a ausência de estudos na população portuguesa justifica plenamente a realização de um estudo que pretenda avaliar e analisar a frequência, distribuição e principais determinantes da hiperhomocisteinemia num grupo de transplantados renais portugueses. Como foi referido, não existem em Portugal dados publicados relativamente à prevalência e distribuição dos valores de homocisteína neste grupo populacional. Aliás, nem sequer se sabe se esse factor de risco existe na população transplantada portuguesa, uma vez que, como é referido por alguns estudos, os valores plasmáticos de homocisteína variam de população para população.<sup>(34,63,84,266)</sup>

O número limitado de estudos internacionais realizados sobre a prevalência, determinantes e importância da hiperhomocisteinemia no TR apresentam resultados e conclusões contraditórias e inconsistentes. O que é que distingue os indivíduos com e sem hiperhomocisteinemia? A terapêutica? A presença de défices vitamínicos? Variáveis demográficas? Coexistência com outros factores de risco da aterosclerose? Na tentativa de clarificar e esclarecer algumas destas questões desenvolvemos um estudo transversal numa amostra de 220 transplantados renais com o intuito de determinar a frequência de hiperhomocisteinemia basal, descrever a distribuição dos valores plasmáticos de homocisteína e analisar a sua associação e relação com algumas variáveis demográficas, fisiológicas, patológicas e comportamentais.

## OBJECTIVOS DO ESTUDO

O presente estudo foi realizado no Serviço de Nefrologia do Hospital Geral de Santo António do Porto, com a colaboração dos Serviços de Química e Hematologia Clínicas, pretendendo a consecução dos seguintes objectivos:

### Objectivo geral

- Determinar a frequência de hiperhomocisteinemia basal, analisar a distribuição dos valores plasmáticos de homocisteína e identificar os principais determinantes da homocisteinemia e hiperhomocisteinemia basal no transplante renal.

### Objectivos específicos

- Determinar a frequência e grau de hiperhomocisteinemia basal;
- Analisar a distribuição dos valores plasmáticos de homocisteína;
- Analisar a distribuição dos valores analíticos de vitamina B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico (sérico e eritrocitário) e pesquisar a existência de défices vitamínicos;
- Comparar os valores plasmáticos de homocisteína entre os quartis de cada uma das vitaminas doseadas;
- Comparar a homocisteinemia entre grupos específicos de transplantados renais (nomeadamente sexo masculino/feminino; com/sem rejeição; com/sem terapêutica com Csa, prednisolona, azatioprina; com/sem terapêutica anti-hipertensora, entre outros);
- Analisar a relação entre a concentração plasmática de homocisteína e os valores analíticos das vitaminas que modulam essa concentração (vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>, ácido fólico sérico e eritrocitário);
- Examinar a relação entre a homocisteinemia e a função renal, variáveis analíticas relevantes, factores demográficos e associados ao transplante renal e terapêutica actual;
- Identificar os principais determinantes da concentração plasmática de homocisteína basal total;
- Comparar os valores analíticos de vitamina B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico (sérico e eritrocitário) entre alguns grupos específicos de transplantados renais (sexo masculino/feminino; com/sem rejeição; com/sem terapêutica com Csa, prednisolona, azatioprina; com/sem terapêutica anti-hipertensora, entre outros);

- Analisar a relação entre os valores analíticos de vitamina B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico (sérico e eritrocitário) e a função renal, algumas variáveis analíticas relevantes, terapêutica actual, entre outros;
- Comparar a percentagem de hiperhomocisteinemia entre alguns grupos de transplantados renais (sexo masculino/feminino; com/sem rejeição; com/sem terapêutica com Csa, prednisolona, azatioprina; com/sem terapêutica anti-hipertensora, entre outros);
- Analisar a associação entre a hiperhomocisteinemia e os factores de risco convencionais e não convencionais da doença vascular aterosclerótica (dislipidemia, diabetes mellitus, HTA, obesidade, tabagismo, Lp(a), fibrinogénio, PAI-1);
- Identificar os factores preditores mais importantes para a ocorrência de hiperhomocisteinemia.

## **PARTICIPANTES E MÉTODOS**

- **Amostra**
  - . Critérios de exclusão
  - . Características dos participantes
- **Variáveis em estudo**
  - . Identificação das variáveis
  - . Recolha de dados
  - . Definição das variáveis
- **Análise estatística**

## AMOSTRA

### Critérios de Exclusão

Os transplantados renais participantes no estudo foram seleccionados da Unidade de Transplante Renal do Hospital Geral de Santo António. Do total de 633 receptores de rim de cadáver com enxerto funcionante desta Unidade, excluíram-se os transplantados renais com idade inferior a 18 anos, tempo de transplante renal inferior a 6 meses, receptores de 2º transplante renal, variação significativa da creatinina plasmática no período de observação preliminar de 3 meses, diagnóstico de qualquer tipo de carcinoma, história de alcoolismo crónico, clínica ou valores laboratoriais sugestivos de doença hepática e os transplantados renais medicados com vitaminas do complexo B, pelo menos nas seis semanas que antecederam o estudo. Foram igualmente excluídos os transplantados renais cuja observação clínica é, actualmente, efectuada no Hospital de S. Pedro (Vila Real).

Cumpridos os critérios de exclusão referidos, do total de 413 transplantados remanescente, foi definida uma amostra aleatória sistemática de 220, por selecção sequencial de dois em dois indivíduos, a partir da base de dados da referida Unidade. Todos os seleccionados foram transplantados na Unidade de Transplante Renal do Hospital Geral de Santo António entre Junho de 1983 e Abril de 1997 e são seguidos actualmente pelo Serviço de Nefrologia do mesmo hospital.

### Características dos Participantes

A amostra seleccionada foi constituída por 124 (56%) indivíduos do sexo masculino e 96 (44%) do sexo feminino, com idade média ( $\pm$ desvio padrão) de  $44.1 \pm 11.2$  anos (máx.=71.4; min.=20.4) e mediana de 42.7 anos.

A patologia primária que conduziu à insuficiência renal crónica nos transplantados renais seleccionados incluiu: glomerulonefrite crónica (16), glomerulonefrite crescêntica (3), glomeruloesclerose segmentar e focal (4), nefrite intersticial (23), doença renal poliquística autossómica dominante (14), nefropatia diabética (9), nefropatia IgA (24), nefropatia por analgésicos (3), nefroesclerose hipertensiva (5), nefropatia vasculopática secundária a estenose da artéria renal (2), nefropatia hereditária (10), amiloidose (1), Lúpus Eritematoso Disseminado (4), síndrome hemolítico urémico (1), tuberculose renal (2), perda traumática ou cirúrgica dos rins (1), displasia renal congénita (3), etiologia indeterminada (95).

O tempo médio ( $\pm$ desvio padrão) de diálise foi de  $42.6 \pm 37.0$  meses, sendo a hemodiálise o tipo de terapêutica dialítica maioritariamente utilizado. Onze dos 220

seleccionados foram submetidos a diálise peritoneal e apenas um não efectuou qualquer tratamento dialítico.

A terapêutica dupla de indução com prednisolona e azatioprina foi usada em quatro transplantados, com prednisolona associada à ciclosporina em 71 transplantados e prednisolona associada à globulina anti-linfocítica (ATG) apenas num doente. A terapêutica de indução com prednisolona e ciclosporina associada ao ATG ou à azatioprina foi utilizada em 87 e 12 transplantados, respectivamente. O protocolo quádruplo de indução, usado em doentes de alto risco imunológico, foi administrado a 24 transplantados. Nos restantes 21 o esquema terapêutico utilizado foi diferente de qualquer um dos anteriores, incluindo, por exemplo OKT<sub>3</sub> ou micofenolato de mofetil (MMF). (Quadro 4)

**Quadro 4**

**Protocolos Imunossupressores de Indução**

<b>Fármacos Imunossupressores</b>	<b>n</b>
Prednisolona + Azatioprina	4
Prednisolona + Ciclosporina	71
Prednisolona + ATG	1
Prednisolona + Ciclosporina + ATG	87
Prednisolona + Ciclosporina + Azatioprina	12
Prednisolona + Ciclosporina + Azatioprina + ATG	24
Outro	21

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Geral de Santo António, tendo sido obtido o consentimento informado, escrito e voluntário de todos os participantes após informação sobre a natureza e objectivos do estudo, de acordo com as regras de conduta expressas na declaração de Helsínquia e a legislação nacional em vigor. A protecção e confidencialidade das informações pessoais foi garantida e todos os registos foram tratados separadamente da identificação.

## VARIÁVEIS EM ESTUDO

### Identificação das variáveis

As variáveis em estudo enunciam-se nos quadros que se seguem, tendo sido divididas em variáveis associadas ao pré-transplante (período dialítico), transplante, pós-transplante imediato (durante o período de internamento logo após o transplante) e pós-transplante actual para maior facilidade na definição das variáveis e tratamento dos dados. (Quadros 5, 6, 7, 8 e 9)

#### *Pré-Transplante*

As variáveis pré-transplante incluíram dados demográficos (sexo e idade à data do TR) e clínicos (causa da insuficiência renal, tempo em diálise, tipo de terapêutica dialítica, presença de diabetes, hábitos tabágicos e número de cigarros/dia). (Quadro 5)

#### *Transplante*

As variáveis associadas ao transplante incluíram a idade e sexo do dador, número de *match* e tempo de isquemia fria. (Quadro 6)

#### *Pós-Transplante Imediato*

Como variáveis clínicas associadas ao pós-transplante imediato consideraram-se a presença e a duração da necrose tubular aguda (NTA) e de rejeição aguda do enxerto, o número de dias de internamento após o transplante renal e a incidência de diabetes pós-TR. (Quadro 7)

#### *Pós-Transplante Actual*

Relativamente às variáveis associadas ao pós-transplante actual (considerando o "actual" como a data do segundo doseamento de homocisteína, uma vez que foi nessa altura que foram doseados todos os restantes parâmetros analíticos), incluiu-se a idade, tempo de TR (meses), parâmetros antropométricos (peso, índice de massa corporal, aumento ponderal desde a data do TR), tipo e dose de medicação actual (imunossupressora, anti-hipertensora, antilipidémica, hipoglicémica, anticoncepcionais orais, fármacos substitutos de estrogénios, suplementos vitamínicos ou qualquer outro tipo de fármaco capaz de interferir no metabolismo da homocisteína), presença de factores de risco convencionais para a aterosclerose (dislipidemia, HTA, diabetes, obesidade). Incluídas neste grupo de variáveis consideraram-se ainda a presença de antecedentes de doença vascular (cardiovascular, cerebrovascular e vascular periférica) e alguns hábitos associados ao estilo de vida, nomeadamente consumo de café, tabagismo e prática de exercício físico. Como o tipo de alimentação de alguns dos

participantes poderia estar relacionado com o aconselhamento alimentar pós-TR efectuado no internamento ou na consulta externa, considerou-se ainda a existência ou não desse aconselhamento através da variável denominada Consulta de Nutrição (Sim/Não e número total de consultas). (Quadro 8) Incluem-se também neste grupo de variáveis todos os parâmetros analíticos indicados no (Quadro 9). De salientar que, todas as variáveis incluídas neste ítem, nomeadamente terapêutica actual e factores de risco da doença vascular considerados, foram avaliados em relação à data em que foi efectuado o segundo doseamento analítico, como será explicado mais adiante.

#### Quadro 5

Variáveis em estudo associadas ao pré-transplante

Variáveis Pré-Transplante
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Factores demográficos (sexo, idade à data do TR);</li> <li>• Perfil clínico pré-TR (dados históricos):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- causa da insuficiência renal crónica;</li> <li>- tempo em diálise (meses);</li> <li>- tipo de terapêutica dialítica;</li> <li>- presença de diabetes;</li> <li>- presença de hábitos tabágicos e número de cigarros/dia.</li> </ul> </li> </ul>

#### Quadro 6

Variáveis em estudo associadas ao transplante

Variáveis Transplante
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Idade e sexo do dador</li> <li>• Concentração plasmática de ureia e creatinina do dador</li> <li>• Número de <i>match</i></li> <li>• Tempo de isquemia fria</li> </ul>

#### Quadro 7

Variáveis em estudo associadas ao pós-transplante imediato

Variáveis Pós-Transplante Imediato
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Perfil clínico pós TR imediato:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- ocorrência e duração da necrose tubular aguda</li> <li>- ocorrência e duração da rejeição aguda do enxerto</li> <li>- dias de internamento pós TR</li> </ul> </li> </ul>



**Quadro 8**

Variáveis em estudo associadas ao transplante actual

**Variáveis Pós-Transplante Actuais**

- Idade
- Tempo de TR (meses)
- Parâmetros antropométricos (peso, IMC, aumento ponderal desde o TR);
- Tipo e dose de medicação actual:
  - imunossupressora (ciclosporina, prednisolona, azatioprina, micofenolato de mofetil (MMF))
  - anti-hipertensora (inibidores da enzima de conversão (IECA), diuréticos, bloqueadores dos canais de cálcio...)
  - antidislipidémica (inibidores da hidroximetilglutaril Coenzima A reductase...);
  - hipoglicémica (antidiabéticos orais, insulina);
  - contraceptivos orais;
  - fármacos substitutos de estrogénios;
  - suplementos vitamínicos (farmacêuticos e de ervanária);
  - qualquer outro tipo de fármaco capaz de interferir no metabolismo da homocisteína
- Factores de risco convencionais (dislipidemia, HTA, diabetes, obesidade)
- Antecedentes de doença vascular:
  - cardiovascular (enfarte de miocárdio, angina pectoris...)
  - cerebrovascular (enfarte cerebral...)
  - vascular periférica (trombose arterial periférica...)
- História familiar de aterosclerose prematura
- Consumo de café (Sim/Não)
- Presença de hábitos tabágicos (Sim/Não); número de cigarros por dia
- Acompanhamento na Consulta de Nutrição (Sim/Não)
- Prática de exercício físico (Sim/Não)
- Parâmetros analíticos

### Quadro 9

Variáveis em estudo associadas ao transplante actual (cont.)

#### Variáveis Analíticas Pós-Transplante Actual (cont.)

##### Parâmetros Analíticos

- Hemograma
- Bioquímica:
  - . glicose
  - . ionograma (sódio, cloro, potássio)
  - . cálcio e fósforo
  - . ureia e creatinina
  - . perfil lipídico (colesterol total, triglicérideos, colesterol LDL, HDL e VLDL, Lp(a), apolipoproteínas A<sub>1</sub> e B<sub>100</sub> (apo A e apo B, respectivamente))
  - . transaminases (TGO e TGP) e GGT
  - . vitamina B<sub>6</sub> (5-fosfato piridoxina plasmática), B<sub>12</sub> (cobalamina plasmática) e ácido fólico (sérico e eritrocitário);
  - . cinética do ferro (ferro, ferritina, transferrina, capacidade de fixação do ferro);
  - . proteínas plasmáticas (proteínas totais, albumina, pré-albumina);
  - . fosfatase alcalina
  - . bilirrubina total
  - . paratormona (PTH)
  - . proteína de transporte do retinol (RBP)
- Estudo da Coagulação:
  - . tempo de protrombina
  - . tempo de tromboplastina parcial
  - . fibrinogénio
  - . inibidor do activador do plasminogénio (PAI)
  - . gene da mutação da protrombina (G20210A)
- Urina:
  - . ureia, creatinina e proteínas nas 24 horas
  - . depuração da creatinina.

## RECOLHA DE DADOS

A recolha de dados relativa às variáveis associadas ao pré-transplante, transplante, pós-transplante imediato e algumas das variáveis associadas ao pós-transplante actual foi conseguida através da análise retrospectiva dos processos clínicos e da base de dados do TR do Serviço de Nefrologia do Hospital Geral de Santo António. A informação relativa aos **Hábitos e Estilos de Vida**, nomeadamente consumo de álcool e café, hábitos tabágicos e prática de exercício físico, foi obtida através de um questionário aplicado a cada participante pela enfermeira responsável pela Consulta Externa de Transplante Renal. O questionário era constituído por perguntas fechadas e abertas para as quatro variáveis referidas. A variável hábitos tabágicos, por exemplo, foi estudada com uma pergunta mista em que era perguntado se o participante era fumador e em caso afirmativo o número de cigarros por dia.

### *Manual de procedimentos para a recolha de dados*

Todos os participantes no estudo eram seguidos em ambulatório, vindo regularmente à Consulta de Transplante Renal, com uma periodicidade dependente do seu estado clínico, mas em média de 3 em 3 meses. Por rotina todos os transplantados fazem análises sempre que vêm à consulta, de modo que nessa colheita de sangue foram incluídos os parâmetros extra pretendidos para este estudo, nomeadamente a homocisteína e as vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico. Assim a realização do estudo não implicou deslocamentos propositados ou faltas adicionais ao trabalho pelos participantes no estudo. Foram explicados ao pessoal de enfermagem do Edifício da Consulta Externa do Hospital Geral de Santo António os cuidados a ter com a conservação das amostras de sangue até à sua chegada ao Serviço de Química Clínica.

Não tendo sido facultada pelo Hospital a listagem das datas das consultas dos participantes, só era possível saber de véspera se algum dos transplantados seleccionados tinha consulta marcada para o dia seguinte. Se sim, procedia-se à consulta do processo clínico e recolha das informações pretendidas, anexavam-se posteriormente as requisições das análises, preenchidas e assinadas, referentes ao segundo doseamento (Anexo 1) e o pedido de consentimento informado e escrito (Anexo 2).

Foi pedida a colaboração de todos os Nefrologistas que realizavam Consulta de Transplante Renal, tendo-lhes sido previamente explicado como deveriam agir

perante um transplantado cujo processo fosse acompanhado das referidas requisições: apresentar o estudo, esclarecer dúvidas e pedir o seu consentimento por escrito. Em caso afirmativo, eram incluídos na colheita desse mesmo dia os parâmetros referentes ao primeiro doseamento, ou seja, a homocisteína e as vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, ácido fólico sérico e eritrocitário. A lista dos participantes com consulta e, conseqüentemente, com colheita nesse dia era deixada (ainda de manhã) no Serviço de Química Clínica.

No mesmo dia era efectuado, pela enfermeira responsável da Consulta de Transplante Renal, o questionário relativo aos hábitos e estilos de vida.

À tarde, ou à hora de almoço, o circuito recomeçava e permaneceu assim durante sete meses, uma vez que depois de efectuadas as análises era preciso recolher os resultados analíticos, enviados para os respectivos processos clínicos para que estivessem disponíveis na próxima Consulta de Transplante Renal.

#### *Análise Laboratorial*

As amostras de sangue foram colhidas, após um período de jejum de cerca de 12 horas, por punção venosa, com um período mínimo de garrotagem, na posição sentado e por sistema Vacutainer (Becton Dickinson). A colheita das amostras foi realizada na sala de colheitas do Edifício da Consulta Externa do Hospital Geral de Santo António e todo o estudo analítico foi efectuado no Serviço de Química Clínica do mesmo Hospital. O pessoal de enfermagem foi informado relativamente aos procedimentos a efectuar face ao pedido de parâmetros analíticos menos frequentes, ou mesmo, desconhecidos até aí.

Na impossibilidade de centrifugar as amostras de sangue imediatamente a seguir à colheita, as que se destinaram ao doseamento da homocisteína e da PTH foram conservadas em recipiente refrigerado, até à centrifugação e separação do plasma e soro, duas a quatro horas depois.<sup>(90)</sup> As amostras destinada à determinação das vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico sérico foram conservadas ao abrigo da luz até serem processadas.

Todas as determinações foram realizadas segundo as recomendações do fabricante e, com excepção do ácido fólico eritrocitário, todas os doseamentos foram efectuados em soro. As amostras que não foram processadas de imediato foram separadas e conservadas a -20° C até serem analisadas.<sup>(90)</sup>

O doseamento das vitaminas B<sub>12</sub>, ácido fólico sérico e eritrocitário foi efectuado por quimioluminescência, no analisador automático ACS: Centaur (Chiron Diagnostics). A

determinação da vitamina B<sub>6</sub> foi realizada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Os valores considerados de referência foram respectivamente 211 a 911 pg/ml para a vitamina B<sub>12</sub>, 2.6 a 20 ng/ml para o ácido fólico sérico, 130 a 1102 ng/ml para o ácido fólico eritrocitário e 3.6 a 18 µg/L para a vitamina B<sub>6</sub>.

A determinação da homocisteína basal total foi efectuada por imunoensaio de fluorescência polarizada (FPIA) no analisador IMX (Abbott): a homocisteína combinada é convertida à sua forma livre, sendo em seguida convertida enzimaticamente em S-adenosil-L-homocisteína (SAH), que é quantificada por imunofluorescência polarizada no analisador automático IMX (Abbott).<sup>(90)</sup>

A variação de dia para dia da homocisteína basal total nos indivíduos saudáveis é pequena (coeficiente de variação de 7%),<sup>(267)</sup> de modo que um só doseamento seria razoável, no entanto, para evitar possíveis erros associados a uma determinação analítica única e porque não estávamos perante uma população normal, optámos por dois doseamentos. Estas razões são igualmente válidas para os dois doseamentos das vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, ácido fólico sérico e eritrocitário. O facto da determinação analítica da vitamina B<sub>6</sub> ter sido inaugural no laboratório do Hospital, uma vez que foi efectuada propositadamente para este estudo, constituiu uma razão adicional a realização das duas determinações.

As concentrações obtidas nas duas determinações não diferiram significativamente no que se refere à homocisteína, vitamina B<sub>6</sub>, ácido fólico sérico e eritrocitário. No que se refere à vitamina B<sub>12</sub>, a média geométrica das diferenças entre o primeiro e segundo doseamento foi significativa (análise estatística apresentada no capítulo dos resultados) e correspondeu, neste caso, a uma média aritmética de 53 pg/ml. No entanto, numa variável muito dependente do tipo de alimentação e do estado nutricional e com um intervalo de referência bastante amplo, entre 211 e 911 pg/ml, não achamos clinicamente relevante essa variação e considerámos o valor obtido no segundo doseamento, tal como aconteceu para a homocisteína, creatinina, vitaminas e restantes parâmetros analíticos, como referido anteriormente.

Relativamente aos restantes doseamentos analíticos as glicemias foram determinadas por métodos enzimáticos. Os doseamentos da ureia e da creatinina foram efectuados, respectivamente, pelos métodos da urease UV e de Jaffé cinético (Olympus).

O colesterol total e triglicédeos foram doseados por métodos enzimáticos colorimétricos (Olympus). O colesterol HDL foi igualmente doseado por um método enzimático colorimétrico directo, através da quantificação selectiva do colesterol das

HDL (Olympus). O colesterol LDL foi calculado por aplicação da fórmula de Friedwald, enquanto que o colesterol VLDL resultou do valor sérico de triglicéridos dividido por 5. As determinações das apolipoproteínas A<sub>1</sub> e B foram efectuadas por método imunoturbidimétrico (Olympus). A Lp(a) foi quantificada pelo método imunoturbidimétrico da Boeringer-Mannheim, aplicado ao analisador automático Olympus AU 800.

As determinações de albumina e proteínas totais foram efectuadas por métodos colorimétricos, respectivamente, verde de bromocresol e biureto, no analisador automático Olympus AU 800. A pré-albumina foi quantificada, no mesmo analisador automático, por método imunoturbidimétrico e a proteína de ligação ao retinol (RBP) foi determinada por método imunoenzimático (ELISA) (Randox).

A paratormona (PTH) foi doseada por método quimioluminométrico, no analisador automático, IMMULITE 2000 (DPC).

Os valores plasmáticos de fibrinogénio e de PAI-1 foram quantificados, respectivamente, pelos métodos de Clauss e de ELISA. A determinação da mutação no gene da protrombina (G20210A) foi efectuada por PCR (polymerase chain reaction).

## DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS

### *Disfunção primária do enxerto*

Disfunção primária do enxerto foi considerada na presença de anúria ou oligúria após o transplante, com necessidade de terapêutica de suporte renal, ou na ausência de melhoria significativa da função renal, avaliada pela creatinina sérica.

### *Necrose tubular aguda*

A disfunção primária do enxerto, com recuperação da função renal apenas com terapêutica de suporte renal, foi definida como necrose tubular aguda.

### *Rejeição aguda*

A rejeição aguda foi considerada na presença de sinais e sintomatologia clássica de rejeição, associados a agravamento da função renal, com ou sem biópsia, com recuperação da função renal com terapêutica anti-rejeição.

### *Índice de Massa Corporal*

O índice de massa corporal (IMC) foi calculado dividindo o peso (kg) pelo quadrado da altura (m<sup>2</sup>) e a obesidade foi classificada segundo Garrow<sup>(268)</sup>, com base nos seguintes intervalos do IMC: abaixo de 20; entre 20 e 24.9, 25 e 29.9; 30 e 39.9; e acima de 40 kg/m<sup>2</sup>.

### *Hipertensão Arterial*

O diagnóstico de hipertensão arterial (HTA) foi efectuado de acordo com as recomendações do quinto Joint National Committee,<sup>(269)</sup> considerando-se os valores limite de 140 mm Hg para a pressão arterial sistólica e 90 mm Hg para a pressão arterial diastólica, ou pelo facto do participante estar medicado com anti-hipertensores.

### *Diabetes Mellitus*

A presença de diabetes foi considerada se a glicemia em jejum excedia os 140 mg/dl, segundo os critérios da OMS,<sup>(270)</sup> ou se o participante se encontrava sob terapêutica hipoglicémica com antidiabéticos orais ou insulina.

### *Hipercolesterolemia, Hipertrigliceridemia, Dislipidemia*

Os diagnósticos de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia foram considerados de acordo com o perfil lipídico actual, ou seja, se os valores de colesterol total plasmático

excediam os 200 mg/dl e 160 mg/dl, respectivamente. A presença de qualquer uma destas situações ou de terapêutica antilipídica considerou-se como dislipidemia.

#### *Hiperhomocisteinemia*

O diagnóstico de hiperhomocisteinemia foi efectuado quando a concentração sérica de homocisteinemia total em jejum foi superior a 15  $\mu\text{mol/L}$ .

#### *Antecedentes de doença vascular antes e após o TR*

A existência de antecedentes de doença vascular antes e após o TR foi considerada sempre que tivesse ocorrido qualquer um dos seguintes episódios vasculares: enfarte do miocárdio, angina de peito, acidente vascular cerebral, doença vascular periférica sintomática. Esta informação foi obtida através dos registos médicos do processo clínico de cada participante.

#### *História familiar de aterosclerose prematura*

A presença de história familiar de aterosclerose prematura foi considerada se o participante possuía algum familiar do primeiro grau, do sexo masculino ou feminino, em que tivesse ocorrido doença coronária ou cerebrovascular antes dos 50 e 55 anos, respectivamente. Esta informação foi igualmente obtida através dos registos médicos do processo clínico de cada participante.



## ANÁLISE ESTATÍSTICA

O estudo das distribuições das variáveis foi efectuado pela análise da assimetria (valor de *Skewness*) e o afastamento significativo da distribuição Normal foi efectuado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Como a distribuição da concentração plasmática de homocisteína, vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico (sérico e eritrocitário) apresentou uma assimetria positiva significativa, procedeu-se à transformação logarítmica natural (ln) dos valores das variáveis, com o objectivo de obter uma distribuição que se aproxime da distribuição Normal. O estudo da distribuição foi igualmente efectuado para as restantes variáveis, que foram transformadas logaritmicamente sempre que a assimetria foi positiva e significativa.

Sempre que a análise estatística efectuada utilizou testes paramétricos foram considerados: os valores das variáveis, se os valores seguissem uma distribuição Normal; a sua transformação logarítmica, se a distribuição se caracterizava por assimetria significativa, motivo pelo qual os resultados são apresentados e interpretados em termos de médias geométricas e seus quocientes (razões). Note-se que as médias aritméticas na escala logarítmica correspondem, após considerar o anti-logaritmo (neste caso exponencial de base *e*) a médias geométricas na escala original. De igual modo, diferenças de médias aritméticas na escala logarítmica representam, após considerar o anti-logaritmo, razões de médias geométricas na escala original.

### *Análise Descritiva*

As estatísticas descritivas incluíram as médias  $\pm$  desvios padrão, médias geométricas (quando a assimetria era significativa), medianas, intervalos de variação (mínimo e máximo). Para algumas variáveis, nomeadamente a homocisteína e vitaminas, apresentam-se ainda os quartis e os percentis 5 e 95 para os níveis plasmáticos.

Os valores de PAI-1, vitamina B<sub>12</sub> e ácido fólico sérico que, num número reduzido de doentes, excederam o limite superior do intervalo de referência (>50 UI/ml, >2100 pg/ml e >20 ng/ml) foram convertidos, respectivamente, em 51 UI/ml, 2101 pg/ml e 21 ng/ml, e englobados na análise. Face à assimetria da distribuição dos valores de ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub> e PAI-1, procedeu-se, como já descrito, à transformação logarítmica de modo que a referida conversão não altera substancialmente os valores da variável transformada, tal como foi efectuado noutros estudos<sup>(271)</sup>.

### *Análise Univariada*

Utilizou-se o teste paramétrico teste *t* de Student para amostras emparelhadas para avaliar diferenças entre os dois doseamentos analíticos (ln) de homocisteína, vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, ácido fólico (sérico e eritrocitário) e creatinina. As diferenças entre os logaritmos dos valores do 1º e do 2º doseamento representa o logaritmo da razão dos valores na escala original. A média destes valores dá origem (depois considerar o anti-logaritmo) à razão de médias geométricas.

A comparação de médias das variáveis contínuas entre grupos foi efectuada pelo teste para amostras independentes, paramétrico (teste *t* de Student) ou não paramétrico (Mann-Whitney), conforme indicado. A comparação de médias entre mais de dois grupos foi efectuada por análise de variância (ANOVA), tendo sido utilizado o teste de Scheffé para as comparações múltiplas à *posteriori*.

Diferenças de proporções foram analisadas pelo teste não paramétrico de  $\chi^2$ , com a respectiva correcção de Yates para a continuidade. Sempre que a frequência esperada em alguma célula foi inferior a 5, considerou-se o teste exacto de Fisher.

A correlação entre duas variáveis contínuas foi estimada pelo coeficiente de correlação de Pearson, ou de Spearman quando indicado.

### *Análise Multivariável*

A análise da variação da concentração plasmática de homocisteína foi efectuada por regressão linear múltipla, com o logaritmo dos valores plasmáticos de homocisteína (ln) como variável dependente e consideraram-se como variáveis independentes as variáveis clinicamente relevantes. Variáveis 'dummy' foram criadas para indicar subgrupos das variáveis categóricas e os resultados são expressos como médias e razões de médias geométricas na escala original, ajustadas para as restantes variáveis englobadas no modelo.

A análise da proporção de hiperhomocisteinemia, relativamente aos possíveis factores preditores, nomeadamente as vitaminas, função renal e outros, foi efectuada usando a análise de regressão logística. A variável dependente nesta análise foi o *logit* da proporção de hiperhomocisteinemia e os efeitos principais para cada factor (obtidos pelo método de máxima verosimilhança) foram ajustados para as restantes variáveis incluídas. Os riscos relativos referidos foram estimados através da aproximação pela odds-ratio. A construção dos modelos foi realizada pelos métodos Stepwise na regressão linear múltipla e Backward na regressão logística. Considerou-se um  $p < 0.05$  como critério de entrada das variáveis.

Todos os testes utilizados foram bilaterais e valores de *p* inferiores a 0.05 foram

considerados como indicando significância estatística. Todas as análises efectuadas utilizaram o package de software estatístico SPSS para Windows, versão 9.0.

## **RESULTADOS**

- Características dos participantes
- Estudo da distribuição das variáveis
- Concordância entre doseamentos analíticos
- Análise descritiva das variáveis
- Homocisteína
  - . Comparação intra quartis de vitaminas
  - . Comparação entre grupos de transplantados renais
  - . Correlação com outras variáveis
  - . Determinantes
- Vitaminas
  - . Comparação entre grupos de transplantados renais
  - . Correlação com outras variáveis
- Hiperhomocisteinemia
  - . Comparação entre grupos de transplantados renais
  - . Factores preditores

## 1. CARACTERÍSTICAS DOS PARTICIPANTES

Do total de 220 TR seleccionados, apenas 202 foram incluídos na análise. Os restantes 18 foram excluídos por: morte (3); transferência para o Hospital de Vila Real (9); início de terapêutica dialítica (2); início de suplementação vitamínica (3); não comparência na colheita de análises (1).

As características dos 202 participantes, nomeadamente, etiologia da insuficiência renal, protocolo imunossupressor de manutenção, características clínicas e demográficas, terapêutica actual, hábitos e estilos de vida, apresentam-se nos Quadros 10 e 11, na Figura 5 e nas Tabelas 1 e 2.

**Quadro 10**

### Etiologia da Insuficiência Renal

CAUSA DA INSUFICIÊNCIA RENAL	Total n=202 (%)	Masculino n=113 (%)	Feminino n=89 (%)
Etiologia indeterminada	87 (43.0)	51 (45.1)	36 (40.4)
Nefrite intersticial	22 (10.9)	14 (12.4)	8 (9.0)
Nefropatia IgA	21 (10.4)	17 (15.0)	4 (4.5)
Glomerulonefrite crónica	16 (7.9)	5 (4.4)	11 (12.4)
Doença renal poliquística	14 (6.9)	5 (4.4)	9 (10.1)
Nefropatia diabética	9 (4.5)	5 (4.4)	4 (4.5)
Nefropatia hereditária	9 (4.5)	6 (5.3)	3 (3.4)
Lúpus Eritematoso Disseminado	4 (2.0)	1 (0.9)	3 (3.4)
Glomeruloesclerose segmentar e focal	4 (2.0)	2 (1.8)	2 (2.2)
Nefropatia por analgésicos	3 (1.5)	1 (0.9)	2 (2.2)
Nefroesclerose hipertensiva	3 (1.5)	2 (1.8)	1 (1.1)
Tuberculose renal	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (2.2)
Nefropatia vasculopática (estenose da artéria renal)	2 (1.0)	2 (1.8)	0 (0.0)
Displasia renal congénita	2 (1.0)	1 (0.9)	1 (1.1)
Amiloidose	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (1.1)
Glomerulonefrite cresçêntica	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (1.1)
Síndrome hemolítico urémico	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (1.1)
Perda traumática ou cirúrgica dos rins	1 (0.5)	1 (0.9)	0 (0.0)

## Quadro 11

## Protocolo Imunossupressor Actual

Imunossupressão de Manutenção	Total <i>n</i> =202 (%)	Masculino <i>n</i> =113 (44.1%)	Feminino <i>n</i> =89 (55.9%)
Prednisolona + Azatioprina	1 (0.5)	-	1 (0.5)
Prednisolona + Ciclosporina	86 (42.6)	53 (46.9)	33 (37.1)
Prednisolona + Ciclosporina + Azatioprina	71 (35.1)	39 (34.5)	32 (36.0)
Prednisolona + Ciclosporina + MMF	25 (12.4)	14 (12.4)	11 (12.4)
Prednisolona + Tacrolimus	3 (1.5)	1 (0.9)	2 (2.2)
Prednisolona + Tacrolimus + MMF	1 (0.5)	-	1 (1.1)
Ciclosporina	4 (2.0)	1 (0.9)	3 (3.4)
Ciclosporina + Azatioprina	10 (5.0)	5 (4.4)	5 (5.6)
Ciclosporina + MMF	1 (0.5)	-	1 (1.1)

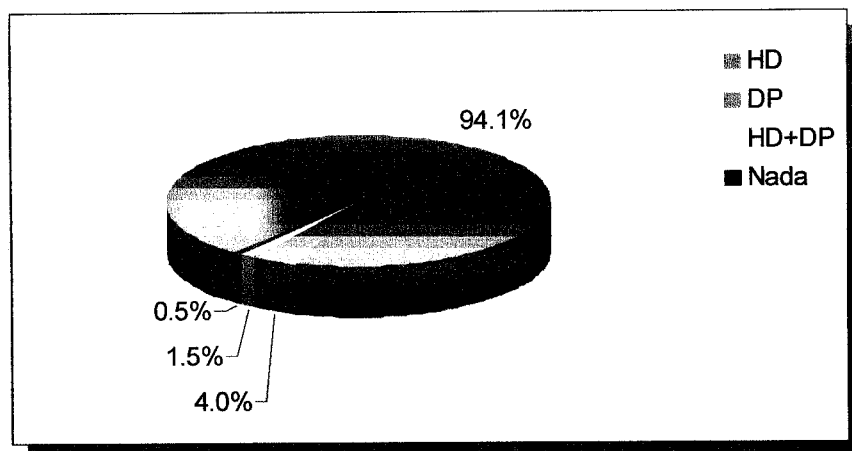


Fig 5. Tipo de terapêutica dialítica efectuada  
(HD: hemodiálise; DP: diálise peritoneal)

**Tabela 1**  
Características clínicas e demográficas dos participantes

CARACTERÍSTICAS	Total	Masculino	Feminino	p <sup>(1)</sup>
	n=202	n=113 (44.1%)	n=89 (55.9%)	
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	
Tempo de diálise (meses)	42.7 (37.5)	41.4 (36.7)	44.4 (38.8)	n.s. <sup>(2)</sup>
Idade à data do TR (anos)	39.8 (11.1)	39.3 (10.9)	40.4 (11.3)	n.s.
IMC à data do TR (Kg/m <sup>2</sup> )	22.7 (3.3)	23.1 (3.3)	22.4 (3.2)	n.s.
IMC actual (Kg/m <sup>2</sup> )	25.4 (3.8)	25.2 (3.7)	25.6 (4.1)	n.s.
Tempo de TR (meses)	58.5 (37.2)	56.5 (33.6)	61.1 (41.4)	n.s. <sup>(2)</sup>
Idade actual (anos)	44.4 (11.0)	43.8 (11.2)	45.3 (10.8)	n.s.
Aumento ponderal desde o TR (Kg)	6.9 (7.4)	6.0 (7.6)	8.0 (6.8)	n.s.
Tensão arterial sistólica (mm Hg)	143.7 (21.4)	143.9 (17.7)	143.5 (25.4)	n.s.
Tensão arterial diastólica (mm Hg)	80.5 (10.8)	79.9 (9.9)	81.2 (11.8)	n.s.
	n (%)	n (%)	n (%)	
História familiar de aterosclerose prematura	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
Antecedentes doença vascular após TR	10 (5.0)	7 (6.2)	3 (3.4)	n.s.
Diabetes Mellitus	21 (10.4)	12 (10.6)	9 (10.1)	n.s.
Hipertensão Arterial	187 (92.6)	109 (96.5)	78 (87.6)	n.s.
Dislipidemia	162 (80.2)	88 (77.9)	74 (83.1)	n.s.
Hipercolesterolemia	139 (68.8)	73 (64.6)	66 (74.2)	n.s.
Hipertrigliceridemia	81 (40.1)	41 (36.3)	40 (44.9)	n.s.
Obesidade	107 (53.0)	58 (51.3)	49 (55.1)	n.s.
IMC				
Baixo Peso (< 20)	8 (4.0)	3 (2.7)	5 (5.6)	
Normoponderal (≥ 20 e < 25)	87 (43.1)	52 (46.0)	35 (39.3)	n.s.
Obesidade Grau I (≥ 25 e < 30)	84 (41.6)	47 (41.6)	37 (41.6)	
Obesidade Grau II (≥ 30 e < 35)	23 (11.4)	11 (9.7)	12 (13.5)	

DP = desvio padrão. <sup>(1)</sup>Comparação de médias entre os sexos efectuada pelo teste *t* de Student para amostras independentes; comparação de proporções entre os sexos efectuada pelo  $\chi^2$  de Pearson, com correcção para a continuidade ou teste exacto de Fisher, quando apropriado. <sup>(2)</sup>A comparação de médias entre os sexos relativamente aos tempos de diálise e de TR foi efectuada por teste não paramétrico (Mann-Whitney) e por teste paramétrico (teste *t* de Student) após transformação logarítmica, tendo-se obtido um resultado similar. n.s. = não significativo (p>0.05).

Tabela 2

Terapêutica actual, hábitos e estilos de vida dos participantes

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>Total</b> <i>n</i> =202 (%)	<b>Masculino</b> <i>n</i> =113 (44.1%)	<b>Feminino</b> <i>n</i> =89 (55.9%)	<b><i>p</i><sup>(1)</sup></b>
<b>Terapêutica actual</b>	<b><i>n</i> (%)</b>	<b><i>n</i> (%)</b>	<b><i>n</i> (%)</b>	
<b>Imunossupressores</b>				
Ciclosporina	197 (97.5)	112 (99.1)	85 (95.5)	n.s.
Tacrolimus	4 (2.0)	1 (0.9)	3 (3.4)	-
Azatioprina	82 (40.6)	44 (38.9)	38 (42.7)	n.s.
Prednisolona	187 (92.6)	107 (94.7)	80 (89.9)	n.s.
Micofenolato Mofetil	27 (13.4)	14 (12.4)	13 (14.6)	n.s.
<b>Anti-hipertensores</b>				
IECA	98 (48.5)	57 (50.4)	41 (46.1)	n.s.
Bloqueadores Canais de Cálcio	110 (54.5)	70 (61.9)	40 (44.9)	0.023
Antiadrenérgicos Acção Central	20 (9.9)	9 (8.0)	11 (12.4)	n.s.
β-bloqueadores	78 (38.6)	41 (36.3)	37 (41.6)	n.s.
Diuréticos	27 (13.3)	9 (8.0)	18 (20.2)	0.020
<b>Antidislipidémicos</b>				
Simvastatina	58 (28.7)	34 (30.1)	24 (27.0)	n.s.
Lovastatina	2 (1.0)	1 (0.9)	1 (1.1)	-
Óleo de peixe	3 (1.5)	1 (0.9)	2 (2.2)	-
Outro	2 (1.0)	1 (0.9)	1 (1.1)	-
<b>Antigotosos</b>	14 (6.9)	8 (7.1)	6 (6.7)	n.s.
Alopurinol	9 (4.5)	6 (5.3)	3 (3.4)	-
Colchichina	5 (2.5)	2 (1.8)	3 (3.4)	-
<b>Antidiabéticos Oraís</b>	6 (28.6)	5 (41.7)	1 (11.1)	-
Insulina	15 (71.4)	7 (58.3)	8 (88.9)	n.s.
<b>Antiácidos/Antiulcerosos</b>	41 (20.3)	21 (18.6)	20 (22.5)	n.s.
<b>Anticoagulantes/Antitrombóticos</b>	22 (10.9)	12 (10.6)	10 (11.2)	n.s.
<b>Contraceptivos Oraís</b>	-	-	8 (9.0)	-
<b>Substitutos de Estrogénios</b>	-	-	2 (2.2)	-
<b>Hábitos e Estilos de Vida</b>	<b><i>n</i> (%)</b>	<b><i>n</i> (%)</b>	<b><i>n</i> (%)</b>	<b><i>p</i><sup>(1)</sup></b>
Álcool	48 (30.4)	42 (48.3)	6 (8.5)	<0.001
Tabaco	27 (13.4)	22 (19.5)	5 (5.6)	0.008
Exercício Físico	20 (9.9)	14 (12.4)	6 (6.7)	n.s.
Café	101 (50.0)	64 (56.6)	37 (41.6)	0.013

<sup>(1)</sup>  $\chi^2$  de Pearson, com correcção para a continuidade, ou teste exacto de Fisher, quando apropriado.  
n.s. = não significativo ( $p > 0.05$ )



Não se encontraram, entre o sexo feminino e masculino, variações estatisticamente significativas nas médias e frequências da maioria das variáveis, excepto para:

- a terapêutica com bloqueadores dos canais de cálcio e diuréticos: a percentagem de participantes medicados com bloqueadores dos canais de cálcio e diuréticos foi significativamente mais elevada no sexo masculino e feminino, respectivamente; **(Tabela 1)**
- os hábitos tabágicos, ingestão de álcool e café: o consumo de tabaco, álcool e café foi significativamente mais frequente no sexo masculino. **(Tabela 2 e Figura 6)**

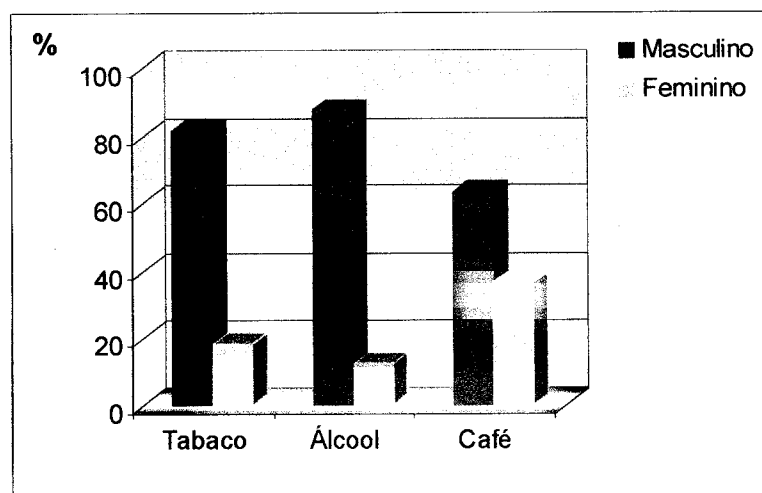


Fig. 6 - Frequência de consumo de tabaco, álcool e café, segundo o sexo.

### Idade

A idade actual dos participantes variou entre 20.7 e 71.6 anos, e a média situou-se nos 44.4 anos. A distribuição da idade dos participantes encontra-se representada na **Figura 7**. A distribuição da idade dos participantes, segundo o sexo descreve-se na **Tabela 3**. Como anteriormente referido, a média de idades não variou significativamente entre os sexos.

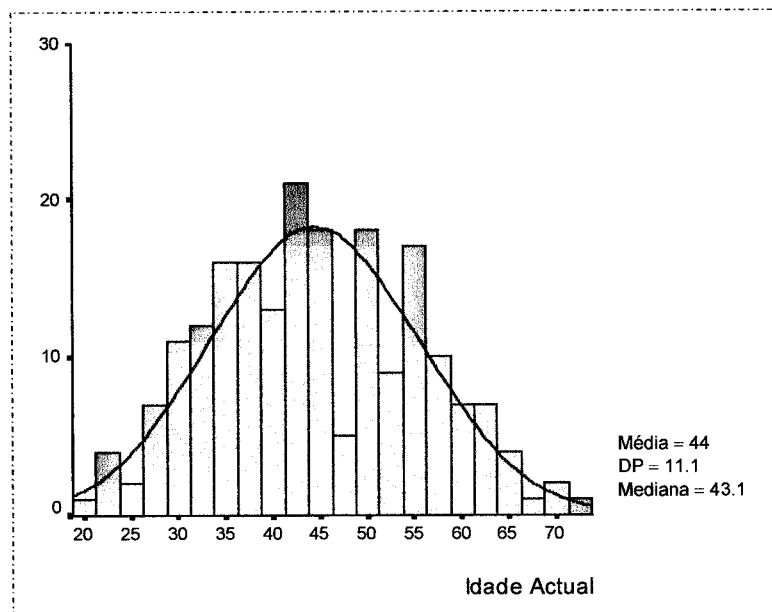


Fig. 7 - Distribuição das idades dos participantes.

**Tabela 3**

Distribuição da idade dos participantes, segundo o sexo

	Média ± DP	Min	Max	Percentis				
				Pc 5	Pc 25	Pc 50	Pc 75	Pc 95
<b>Total</b>	44.4 ± 11.1	20.7	71.6	27.2	35.8	43.1	53.4	62.8
<b>Sexo</b>								
<b>Masc.</b>	43.8 ± 11.2	20.7	68.9	25.2	35.6	42.5	52.7	63.7
<b>Fem.</b>	45.3 ± 10.8	22.1	71.6	28.2	36.4	44.1	53.6	62.7

## 2. ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DAS VARIÁVEIS

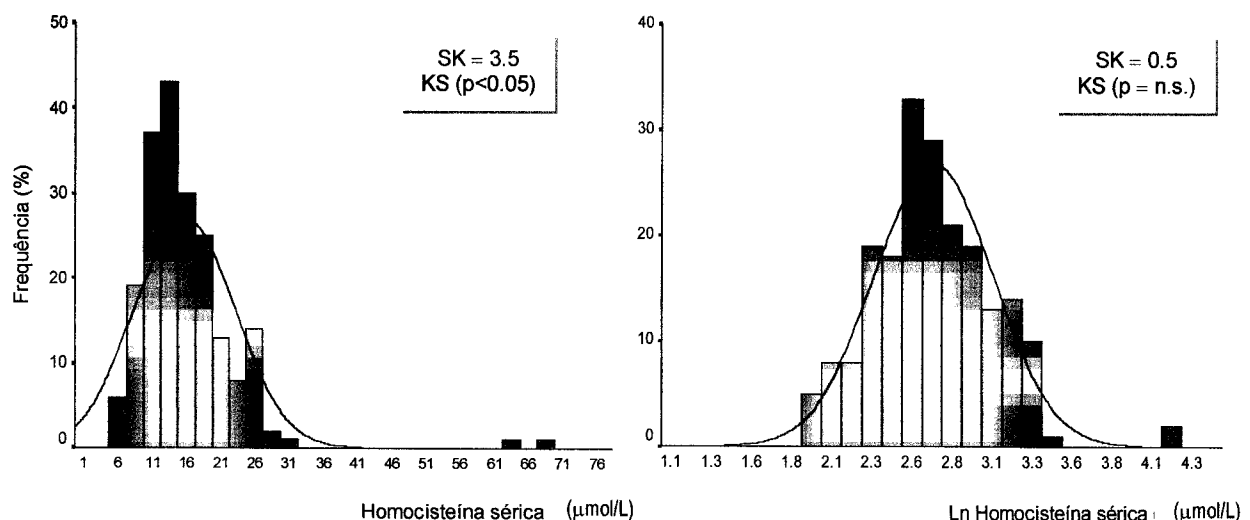
### *Homocisteína e vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e Ácido fólico (sérico e eritrocitário)*

A distribuição da homocisteína, vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico (sérico e eritrocitário) foi significativamente diferente da Normal (valor de Skewness e aplicação do teste de Kolmogorov-Smirnov), caracterizando-se por uma assimetria positiva significativa, pelo que se procedeu à transformação logarítmica (natural) dos valores das referidas variáveis, com o objectivo de obter uma distribuição que se aproxima da distribuição Normal, como foi explicado no capítulo anterior. (Figuras 8, 9, 10, 11 e 12)

### *Restantes Variáveis Analíticas*

A distribuição dos restantes resultados analíticos revelou uma assimetria igualmente positiva e significativa para a creatinina, ureia, triglicerídeos, VLDL, lipoproteína (a), ferritina, albumina, RBP, paratormona, tempo de protrombina e de tromboplastina, PAI-1, fibrinogénio, tempos de diálise e de transplante, dias de NTA e de internamento após TR e tensão arterial e sistólica.

Estas variáveis foram também transformadas logaritmicamente, sendo utilizado o logaritmo natural do valor da variável (ln) sempre que se usarem testes paramétricos.



**Fig. 8** - Distribuição dos valores e dos logaritmos dos valores da homocisteína  
SK = valor de Skewness; KS = teste Kolmogorov-Smirnov

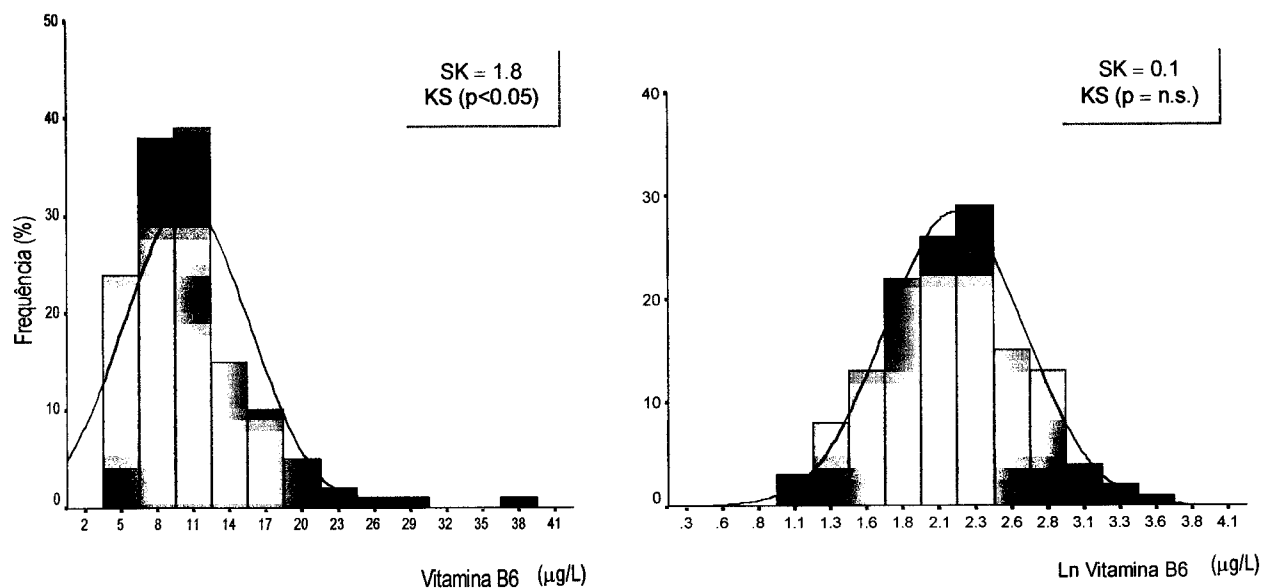


Fig. 9 - Distribuição dos valores e dos logaritmos dos valores da vitamina B<sub>6</sub>.  
SK = valor de Skewness; KS = teste Kolmogorov-Smirnov

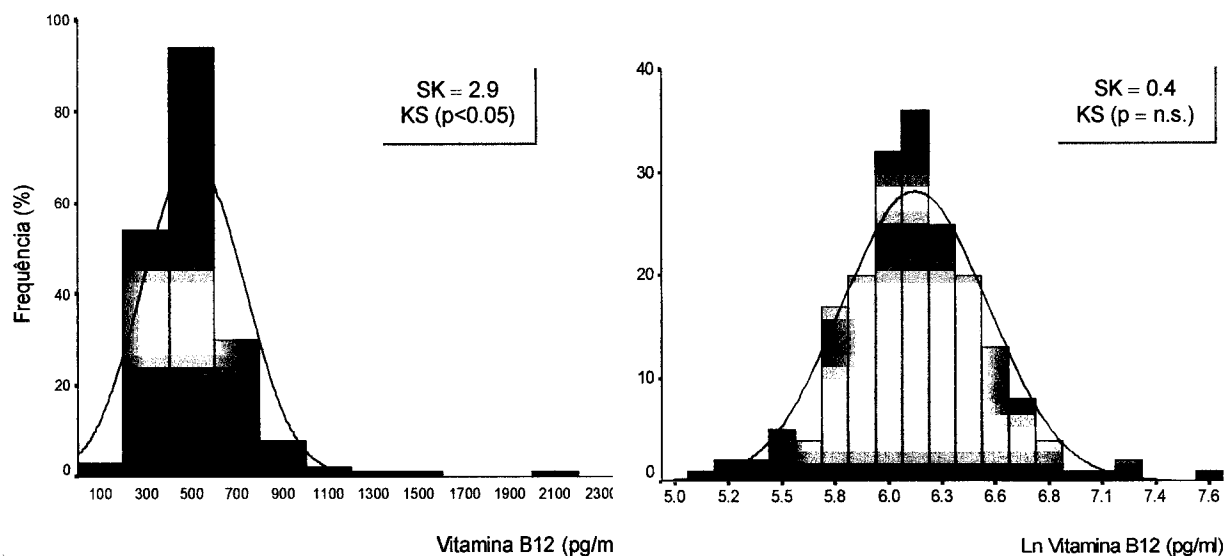


Fig. 10 - Distribuição dos valores e dos logaritmos dos valores da vitamina B<sub>12</sub>.  
SK = valor de Skewness; KS = teste Kolmogorov-Smirnov

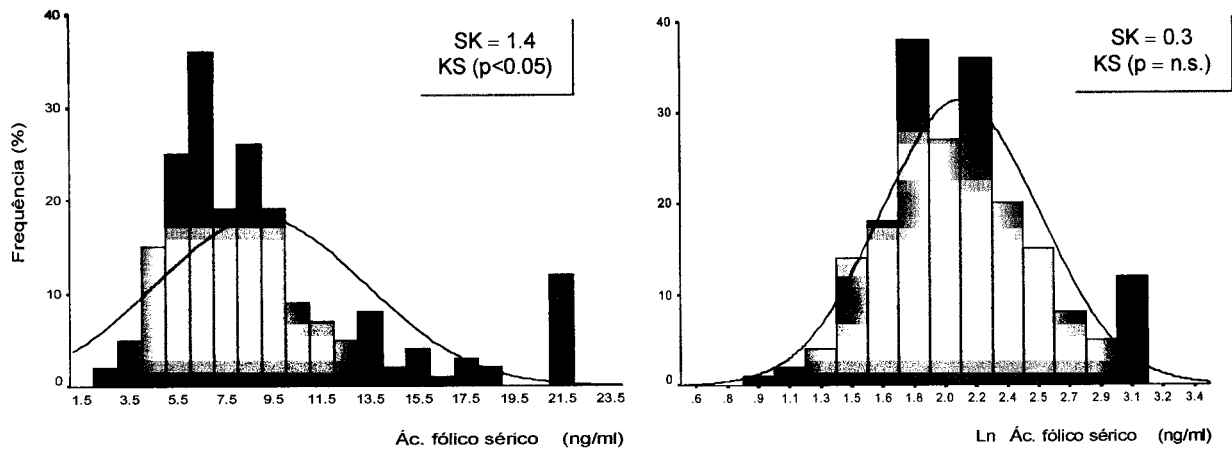


Fig. 11 - Distribuição dos valores e dos logaritmos dos valores de ácido fólico sérico.  
SK = valor de Skewness; KS = teste Kolmogorov-Smirnov

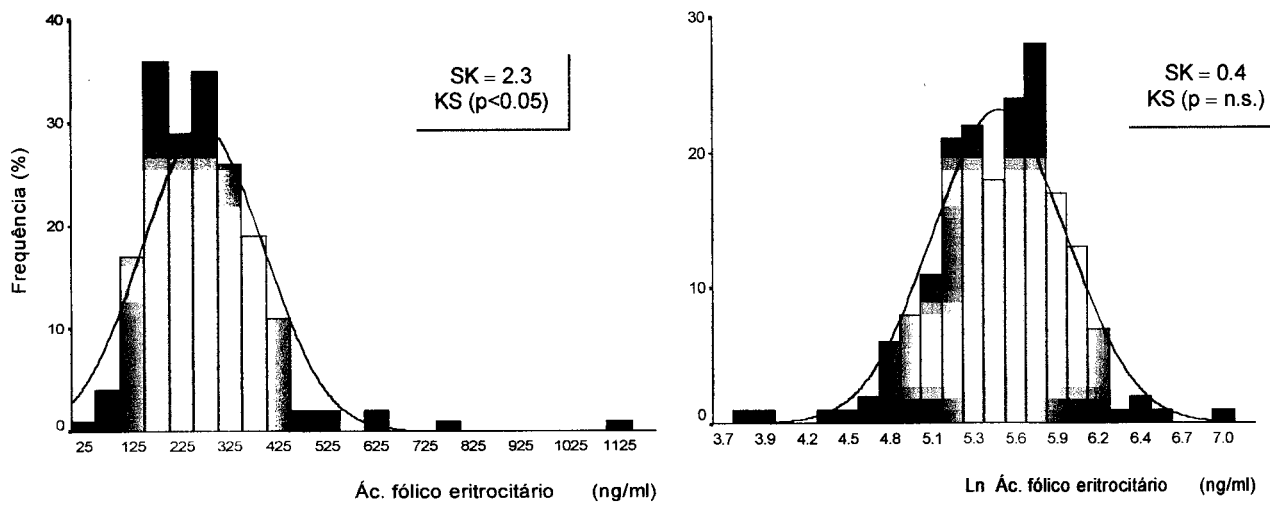


Fig. 12 - Distribuição dos valores e dos logaritmos dos valores do ácido fólico eritrocitário.  
SK = valor de Skewness; KS = teste Kolmogorov-Smirnov

### 3. CONCORDÂNCIA ENTRE DOSEAMENTOS ANALÍTICOS

#### *Homocisteína, vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, ácido fólico (sérico e eritrocitário) e creatinina*

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os logaritmos dos valores de homocisteína e das vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico (sérico e eritrocitário) obtidos nos dois doseamentos analíticos, excepto para a vitamina B<sub>12</sub>. A creatinina sérica também não variou significativamente entre as duas avaliações analíticas. (Tabela 4)

A média das diferenças dos logaritmos da vitamina B<sub>12</sub> entre o primeiro e segundo doseamento foi de 0.096, o que equivale a dizer que os valores do primeiro doseamento foram, em média (geométrica), 10% mais elevados que o segundo doseamento. Neste caso, isso corresponde a uma diferença média (aritmética) de 53 pg/ml na concentração de vitamina B<sub>12</sub>, que, tal como referimos, não considerámos clinicamente relevante numa variável cujo intervalo de referência é bastante amplo e varia entre 211 e 911 pg/ml.

**Tabela 4**

Concordância entre os dois doseamentos analíticos de homocisteína e vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico (sérico e eritrocitário)

	Média ± DP		1º-2º  <sup>(1)</sup>	Erro Padrão	p <sup>(2)</sup>
	1º doseamento	2º doseamento			
Ln homocisteína	2.69 ± 0.37	2.70 ± 0.37	0.018	0.013	n.s.
Ln B <sub>6</sub>	2.12 ± 0.52	2.18 ± 0.50	0.061	0.076	n.s.
Ln B <sub>12</sub>	6.25 ± 0.36	6.15 ± 0.35	0.096	0.020	<0.001
Ln ác. fólico sérico	2.10 ± 0.40	2.07 ± 0.44	0.033	0.024	n.s.
Ln ác. fólico eritrocitário	5.45 ± 0.37	5.49 ± 0.42	0.039	0.094	n.s.
Ln creatinina	0.38 ± 0.30	0.36 ± 0.33	0.017	0.095	n.s.

<sup>(1)</sup> |1º-2º| Diferença absoluta entre o 1º e 2º doseamento

<sup>(2)</sup> Comparação de médias efectuada pelo teste t de Student para amostras emparelhadas. n.s.=não significativo (p>0.05)

#### 4. ANÁLISE DESCRITIVA DAS VARIÁVEIS

##### *Creatinina sérica*

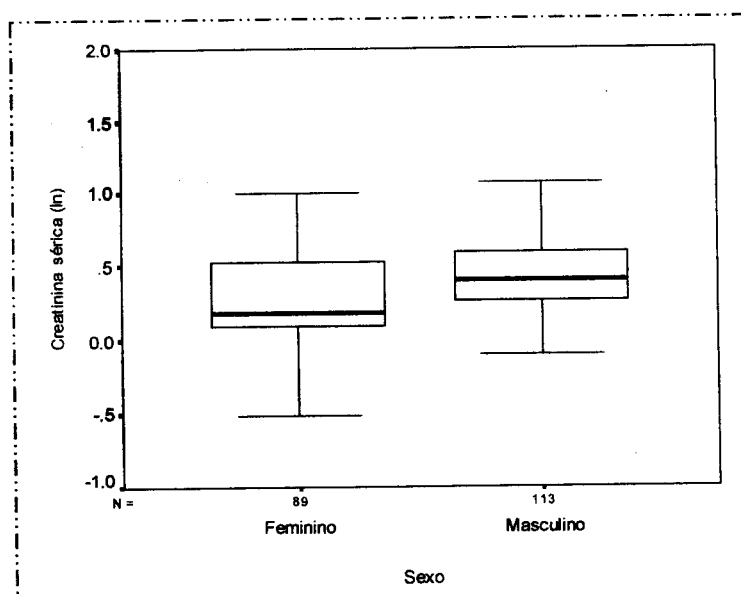
A creatinina sérica variou entre 0.6 e 4.7 mg/dl e a média  $\pm$  desvio padrão (DP) foi de  $1.5 \pm 0.6$  mg/dl. Apesar do valor de creatinina máximo atingido, metade dos participantes apresentou valores iguais ou inferiores a 1.4 mg/dl. A distribuição da concentração sérica da creatinina, segundo o sexo, descreve-se na **Tabela 5** e na **Figura 13**. A média (geométrica) da creatinina foi significativamente mais elevada no sexo masculino ( $p=0.008$ ).

**Tabela 5**

Distribuição dos valores de creatinina sérica por sexo

	Média $\pm$ DP	MG <sup>(1)</sup>	Min	Max	Percentis		
					Pc 25	Pc 50	Pc 75
<b>Total</b>	1.5 $\pm$ 0.6	1.4	0.6	4.7	1.1	1.4	1.8
<b>Sexo</b>							
<b>Masc.</b>	1.6 $\pm$ 0.6	1.5	0.9	4.7	1.3	1.5	1.8
<b>Fem.</b>	1.4 $\pm$ 0.6	1.3	0.6	3.5	1.1	1.2	1.7

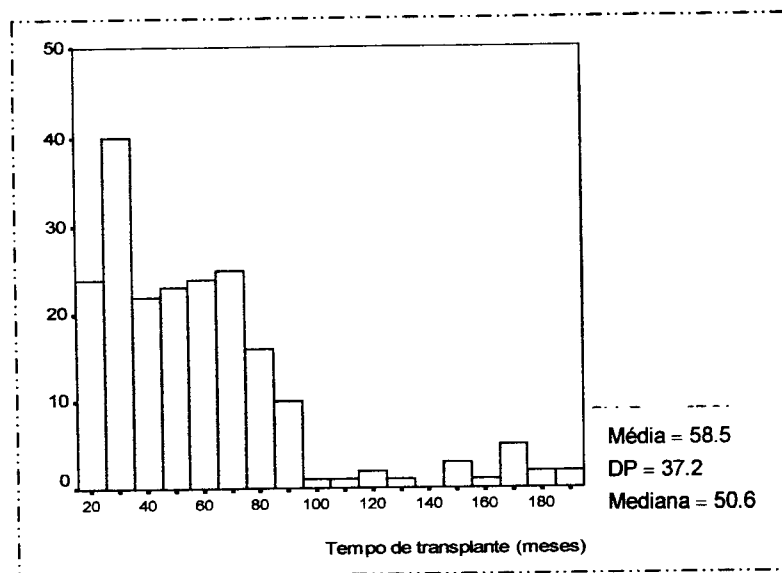
\* todos os resultados são apresentados em mg/dl  
<sup>(1)</sup> média geométrica



**Fig. 13** - Distribuição dos valores de creatinina segundo o sexo.  
 (gráfico de caixa e fio, que descreve os percentis 2.5, 25, 50, 75 e 97.5)

### Tempo de transplante

O tempo médio de transplante foi de  $58.5 \pm 37.2$  meses, tendo variado entre os 17 e os 192 meses. Apesar do valor máximo atingido, metade dos participantes apresentou tempos de transplante inferiores a 50.6 meses. A distribuição dos tempos de transplante descreve-se na **Figura 14**.



**Fig. 14** - Distribuição dos tempos de transplante

### Perfil lipídico

O perfil lipídico dos participantes no estudo descreve-se na **Tabela 6**. Os valores médios de colesterol total encontram-se acima do valor admitido internacionalmente como ideal, ou seja, 200 mg/dl. Do total de participantes, 139 (69.8%) apresentaram valores de colesterol total superiores ao limite referido. Relativamente aos restantes parâmetros, 52.2% dos participantes apresentaram valores de triglicérides superiores a 135 mg/dl (média geométrica =145.4 mg/dl); 44.7% caracterizou-se por níveis de LDL mais elevados que 130 mg/dl e 50.2% por valores de Lp(a) superiores a 30 mg/dl (média geométrica =29.8 mg/dl). O valor médio do colesterol HDL foi de 59.8 mg/dl, mas 34 dos participantes (17%) apresentaram concentrações mais baixas que o limite inferior de referência do laboratório, ou seja, 45 mg/dl.

De salientar que, em todos os parâmetros considerados o intervalo de variação foi bastante amplo, tendo atingido valores máximos considerados de alto risco, nomeadamente um valor de triglicérides igual a 1042 mg/dl e um colesterol LDL de 261 mg/dl. Isso também ocorreu com a razão entre a apo A e a apo B e entre o colesterol total e HDL, uma vez que os valores máximos atingido foram respectivamente 7.04 e 8.23.



**Tabela 6**  
Caracterização dos valores dos lípidos plasmáticos

	Intervalo de Referência <sup>(1)</sup>	Min	Max	Média (DP)	Mediana
Col. Total (mg/dl)	< 200	100	349	220.0 (41.7)	219
HDL (mg/dl)	45 - 65	24	106	59.8 (16.3)	58
LDL (mg/dl)	< 130	74	261	127.6 (34.2)	125
TG (mg/dl)	35 - 135	44	1042	165.8 (105.6)	138
Lp(a) (mg/dl)	< 30	5	210	44.3 (40.8)	30.1
Apo A (mg/dl)	110 - 205	70	238	153.2 (30.9)	148.5
Apo B (mg/dl)	50 - 130	40	212	112.6 (24.9)	109
ApoB/ApoA	0.45 - 1.25	0.3	7.04	0.8 (0.5)	0.7
Col T/HDL	< 3.4	1.8	8.23	3.9 (1.2)	3.6

<sup>(1)</sup> Intervalo de referência considerado normal pelo laboratório de Química Clínica do Hospital Geral de Santo António, onde foram realizados os doseamentos.

#### Factores pro-trombóticos

O valor médio de fibrinogénio foi de 387.7 mg/dl, tendo 68 dos participantes (35.4%) apresentado valores superiores ao limite máximo do intervalo de referência, ou seja, a 400 mg/dl. Relativamente ao PAI-1, o valor médio situou-se nas 13.7 UI/ml e 64 indivíduos (32.6%) caracterizaram-se por níveis mais elevados que o limite superior de referência, ou seja, 15 UI/ml. (Tabela 7) Relativamente ao estudo genético realizado apenas 6 participantes (3.6%) revelaram heterozigotia para a mutação do gene da protrombina (G20210A). Todos os restantes apresentaram pesquisa negativa (96.4%).

**Tabela 7**  
Caracterização dos valores analíticos do fibrinogénio, PAI-1,  
tempo de protrombina e de tromboplastina

	n	Min	Max	Média ± DP	MG <sup>(1)</sup>
Fibrinogénio (mg/L)	192	176.9	769.0	387.7 ± 98.9	376.6
PAI-1 (UI/ml)	196	1	> 50	13.7 ± 12.9	8.6
T Protrombina (seg)	192	9.3	27.0	10.9 ± 2.6	10.8
T_Tromboplastina (seg)	194	19.9	36.5	25.4 ± 2.6	25.3

<sup>(1)</sup> Média Geométrica

*Homocisteína sérica*

A distribuição dos níveis de homocisteína variou entre 6.9 e 69  $\mu\text{mol/L}$  e a média situou-se nos 16  $\mu\text{mol/L}$  (média geométrica de 14.9  $\mu\text{mol/L}$ ). Analisando a distribuição da concentração de homocisteína plasmática, segundo o sexo, verifica-se que os valores de homocisteína são mais elevados no sexo masculino. (Tabela 8)

**Tabela 8**

Distribuição da concentração plasmática de homocisteína, segundo o sexo

	Média $\pm$ DP	Média G. <sup>(1)</sup>	Min	Max	Percentis				
					Pc 5	Pc 25	Pc 50	Pc 75	Pc 95
<b>Total</b>	16.0 $\pm$ 7.3	14.9	6.9	69	8.1	11.6	14.5	18.8	26.5
<b>Sexo</b>									
<b>Masc.</b>	17.5 $\pm$ 8.4	16.2	7.7	69.0	9.5	12.9	15.7	20.4	26.8
<b>Fem.</b>	14.2 $\pm$ 5.1	13.4	6.9	29.1	7.2	10.4	13.5	17.1	25.7

\* todos os resultados são apresentados em  $\mu\text{mol/L}$  <sup>(1)</sup> média geométrica

*Hiperhomocisteinemia*

O número de participantes com hiperhomocisteinemia (valor sérico de homocisteína superior a 15  $\mu\text{mol/L}$ ) na amostra foi de 96 (48.7%), dos quais 63 (31.9%) do sexo masculino e 33 (16.8%) do sexo feminino (Figura 15). Os restantes 51.3% apresentaram valores de homocisteína dentro do intervalo de referência, considerado normal pelo laboratório.

A hiperhomocisteinemia foi ligeira ( $\leq 30$   $\mu\text{mol/L}$ ) em 93 indivíduos (96.9%) e moderada (entre 31 e 100  $\mu\text{mol/L}$ ) em apenas três dos participantes (3%). Na amostra considerada não houve nenhum caso de hiperhomocisteinemia grave ( $>100$   $\mu\text{mol/L}$ ).

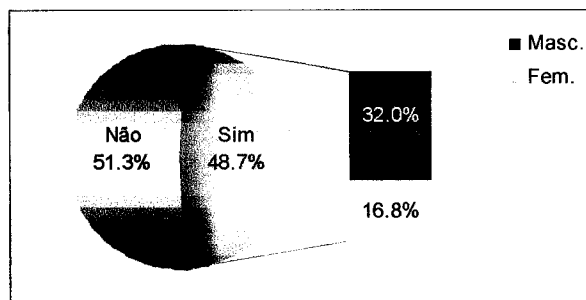


Fig. 15 - Percentagem de hiperhomocisteinemia, segundo o sexo

*Vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico sérico e eritrocitário*

Os valores séricos da vitamina B<sub>6</sub> variaram entre 3 e 36 µg/L, com a média geométrica de 8.9 µg/L. (Tabela 9) Na vitamina B<sub>12</sub> o valor sérico mais baixo foi de 174 pg/ml, enquanto que o valor mais elevado excedeu o limite máximo de detecção do laboratório num dos participantes. Da mesma forma, o valor mínimo obtido para o ácido fólico sérico foi de 2.6 ng/ml e o valor máximo excedeu o limite superior do intervalo de referência em 10 dos participantes. Relativamente ao ácido fólico eritrocitário os valores de variaram entre 46 e 649 ng/ml e a média geométrica foi de 244 ng/ml.

**Tabela 9**

Distribuição dos valores analíticos das vitaminas doseadas,  
segundo o sexo

	Média ± DP	Média G. <sup>(1)</sup>	Min	Max	Percentis				
					Pc 5	Pc 25	Pc 50	Pc 75	Pc 95
<b>Vitamina B<sub>6</sub> (µg/L)</b>									
<b>Total</b>	9.9 ± 5.2	8.9	3.0	36.0	4.0	7.0	9.0	12.0	20.0
<b>Sexo</b>									
<b>Masc.</b>	9.2 ± 5.1	9.5	3.0	36.0	4.0	6.0	8.0	11.0	17.9
<b>Fem.</b>	10.6 ± 5.1	8.2	3.0	29.0	4.0	7.0	10.0	13.0	21.5
<b>Vitamina B<sub>12</sub> (pg/ml)</b>									
<b>Total</b>	507 ± 219	473	174	2101	255	382	461	586	861
<b>Sexo</b>									
<b>Masc.</b>	551 ± 226	445	174	1438	251	396	511	636	1012
<b>Fem.</b>	473 ± 209	510	212	2101	253	367	442	525	745
<b>Ácido fólico sérico (ng/ml)</b>									
<b>Total</b>	8.8 ± 4.3	8.0	2.6	21	4.0	6.0	7.8	10.3	21
<b>Sexo</b>									
<b>Masc.</b>	9.3 ± 4.2	7.6	2.9	21	4.4	6.2	8.3	11.3	21
<b>Fem.</b>	8.5 ± 4.3	8.5	2.6	21	3.8	5.8	7.2	9.8	19.9
<b>Ácido fólico eritrocitário (ng/ml)</b>									
<b>Total</b>	264 ± 102	244	46	649	125	187	259	324	444
<b>Sexo</b>									
<b>Masc.</b>	283 ± 101	228	109	534	137	197	282	362	453
<b>Fem.</b>	14.2 ± 5.1	265	46	649	115	179	241	302	409

<sup>(1)</sup> média geométrica

Mais de 90% da população seleccionada apresentou, para as quatro vitaminas doseadas, valores considerados normais pelo laboratório. Apenas três dos participantes apresentaram valores de vitamina B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> inferiores ao valor mínimo de referência, o mesmo acontecendo com 12 participantes em relação ao ácido fólico eritrocitário. No que se refere ao ácido fólico sérico, nenhum dos participantes apresentou um valor foi mais baixo que o limite inferior de referência. (Quadro 12)

### Quadro 12

Distribuição dos valores analíticos das vitaminas doseadas,  
segundo os intervalos de referência

	Intervalo de referência <sup>(1)</sup>	< limite inferior (%) <sup>*</sup>	no intervalo de referência (%) <sup>*</sup>	> limite superior (%) <sup>*</sup>
B <sub>6</sub> (n=136)	3.6 - 18	2.2	91.2	6.6
B <sub>12</sub> (n=194)	211 - 911	1.5	93.8	4.6
Ác. fólico sérico (n=197)	2.6 - 20	-	94.9	5.1
Ác. fólico eritrocitário (n=183)	130 - 1102	6.6	93.4	-

<sup>(1)</sup> Intervalo de valores considerados normais

\* Percentagens calculadas depois de excluídos os resultados desconhecidos.

## 5. HOMOCISTEÍNA

### 5.1 Comparação dos valores médios de homocisteína intra quartis de vitaminas

Compararam-se, a exemplo de outros estudos,<sup>(31,71)</sup> as médias (geométricas) da homocisteína entre os quartis de cada uma das vitaminas. Verificou-se que os valores de homocisteína tendem a aumentar à medida que as concentrações de vitaminas diminuem. Constatou-se que para todas as vitaminas doseadas, excepto para a vitamina B<sub>6</sub>, o intervalo constituído por valores mais baixos de vitaminas, correspondente ao 1º quartil, apresentou sempre médias geométricas de homocisteína significativamente mais elevadas que o 4º quartil. (Tabelas 10 e 11) e Figuras 16, 17, e 18) Relativamente à vitamina B<sub>6</sub>, as médias geométricas da homocisteína não variaram significativamente entre os quatro quartis de vitamina B<sub>6</sub>.

**Tabela 10**

Comparação das concentrações médias de homocisteína (ln)  
intra quartis de vitamina B<sub>12</sub>

Vitamina B <sub>12</sub>	Quartil	Média	Sig. <sup>(1)</sup>
<b>1º Quartil</b> (≤ 382 pg/ml)	2º (383-462)	2.70	n.s.
	3º (463-586)	2.69	n.s.
	4º (> 586)	2.57	0.001
<b>2º Quartil</b> (383-462 pg/ml)	1º (≤ 382)	2.87	n.s.
	3º (463-586)	2.69	n.s.
	4º (> 586)	2.57	n.s.
<b>3º Quartil</b> (463-586 pg/ml)	1º (≤ 382)	2.87	n.s.
	2º (383-462)	2.70	n.s.
	4º (> 586)	2.57	n.s.
<b>4º Quartil</b> (>586 pg/ml)	1º (≤ 382)	2.87	0.001
	2º (383-462)	2.70	n.s.
	3º (463-586)	2.69	n.s.

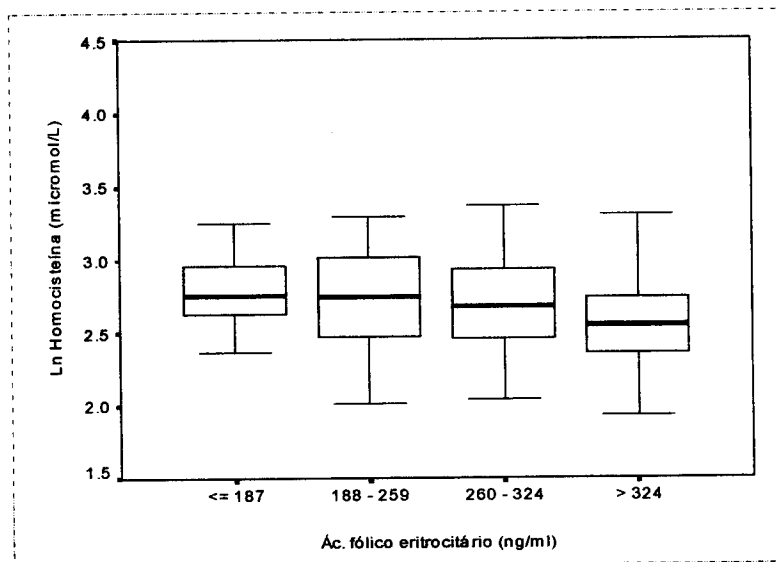
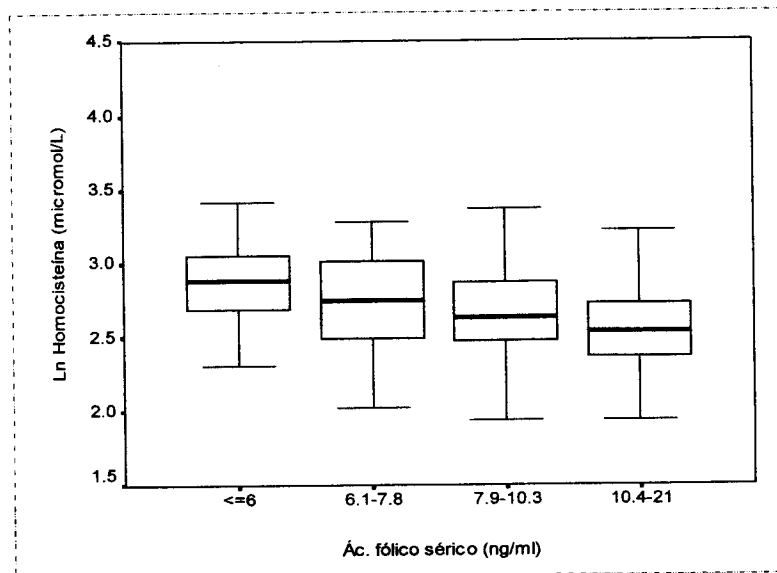
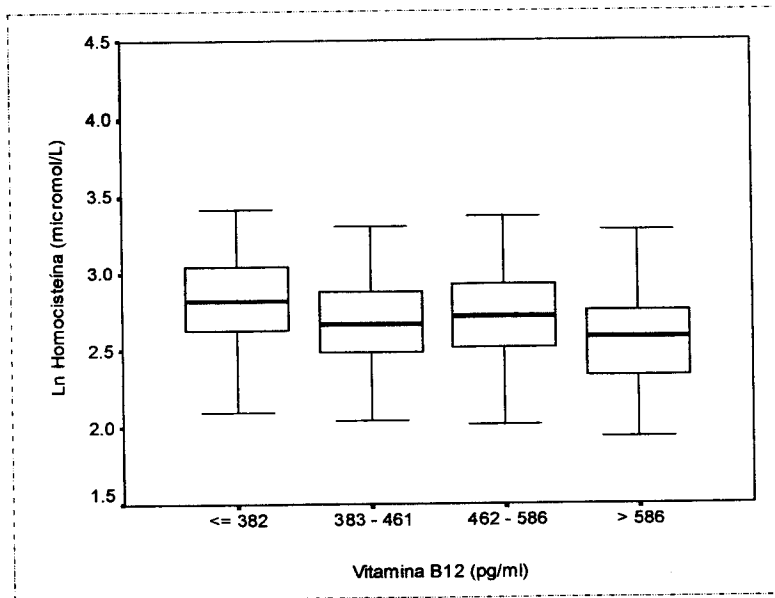
<sup>(1)</sup> Comparação de médias efectuada por análise de variância (ANOVA) e teste de Scheffé para comparações múltiplas *à posteriori*. n.s.: não significativo (p>0.05)

Tabela 11

Comparação das concentrações médias de homocisteína (ln) intra quartis do ácido fólico sérico e eritrocitário

Ác. fólico sérico	Quartil	Média	Sig. <sup>(1)</sup>
1º Quartil (≤6 ng/ml)	2º (6.1-7.8)	2.73	n.s.
	3º (7.9-10.3)	2.64	0.002
	4º (>10.4)	2.73	<0.001
2º Quartil (6.1-7.8 ng/ml)	1º (≤6)	2.92	0.055
	3º (7.9-10.3)	2.64	n.s.
	4º (>10.4)	2.55	n.s.
3º Quartil (7.9-10.3 ng/ml)	1º (≤6)	2.92	0.002
	2º (6.1-7.8)	2.73	n.s.
	4º (>10.4)	2.55	n.s.
4º Quartil (>10.4 ng/ml)	1º (≤6)	2.92	<0.001
	2º (6.1-7.8)	2.73	n.s.
	3º (7.9-10.3)	2.64	n.s.
<b>Ác. fólico eritrocitário</b>			
1º Quartil (≤ 187 ng/ml)	2º (188-259)	2.72	n.s.
	3º (260-324)	2.70	n.s.
	4º (> 324)	2.56	0.014
2º Quartil (188-259 ng/ml)	1º (≤ 187)	2.81	n.s.
	3º (260-324)	2.70	n.s.
	4º (> 324)	2.56	n.s.
3º Quartil (260-324 ng/ml)	1º (≤ 187)	2.81	n.s.
	2º (188-259)	2.73	n.s.
	4º (> 324)	2.56	n.s.
4º Quartil (>324 ng/ml)	1º (≤ 187)	2.81	0.014
	2º (188-259)	2.72	n.s.
	3º (260-324)	2.70	n.s.

<sup>(1)</sup> Comparação de médias efectuada por análise de variância (ANOVA) e teste de Scheffé para comparações múltiplas *à posteriori*.  
n.s.: não significativo ( $p > 0.05$ )



**Figuras 16,17 e 18:** Distribuição dos valores de homocisteína (Ln) segundo os quartis da vitamina B<sub>12</sub> e do ácido fólico sérico e eritrocitário. (gráfico de caixa e fio, que descreve os percentis 2.5, 25, 50, 75 e 97.5)

## 5.2 Comparação dos valores médios de homocisteína entre grupos específicos de transplantados renais

A média (geométrica) dos valores de homocisteína foi significativamente diferente entre os sexos ( $p < 0.001$ ), entre os diabéticos e não diabéticos ( $p < 0.05$ ) e entre os transplantados renais com e sem antecedentes de doença vascular ( $p < 0.05$ ). Os valores médios foram mais baixos no sexo feminino, nos diabéticos e nos transplantados renais sem antecedentes de doença vascular após o TR. No que se refere à variável sexo, por exemplo, a média geométrica de homocisteína no sexo masculino foi 22% mais elevada que no sexo feminino (MG:MG=1.22). (Tabela 12) Os valores médios de homocisteína foram também significativamente diferentes entre os transplantados renais com e sem terapêutica com prednisolona, antiadrenérgicos de acção central (AAACentral) e diuréticos, sendo mais elevados nos indivíduos com estas terapêuticas. (Tabela 12)

Com um valor de  $p$  muito próximo do nível de significância estatística considerado ( $\alpha = 0.05$ ), os participantes medicados com  $\beta$ -bloqueadores apresentaram níveis superiores de homocisteína ( $p = 0.053$ ), enquanto que os transplantados renais cuja terapêutica imunossupressora incluía o micofenolato de mofetil (MMF) apresentaram valores mais baixos ( $p = 0.084$ ). De igual modo, parece haver uma tendência para que os indivíduos com rejeição aguda após o TR apresentem valores mais elevados de homocisteína ( $p = 0.059$ ).

Os heterozigotos para a transição G20210A ( $n = 6$ ) no gene da protrombina apresentaram valores de homocisteína superiores aos indivíduos sem mutação (média geométrica de 15.8 e 14.8  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente), no entanto a diferença não foi estatisticamente significativa ( $p > 0.05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney).

Os indivíduos com obesidade, HTA, dislipidemia, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia não apresentaram valores médios de homocisteína significativamente diferentes, assim como aqueles com resposta afirmativa ao consumo de tabaco, álcool e café. A prática de exercício físico e o acompanhamento na consulta de Nutrição também não originou diferenças de médias significativas.

Relativamente à terapêutica, a concentração média de homocisteína não variou significativamente entre os participantes medicados ou não com azatioprina, bloqueadores dos canais de cálcio e IECA, simvastatina, antigotosos, antiácidos/antiulcerosos e anticoagulantes/antitrombóticos.



Tabela 12

Comparação dos valores médios de homocisteína (ln) entre grupos

Variável	Grupos	Média (DP)	MG:MG (IC 95%) <sup>(1)</sup>	p
Sexo	F (n=88)	2.59 (0.35)	1.22 (1.10-1.34)	<0.001
	M (n=110)	2.79 (0.36)		
Ant. doença vascular (pós TR)	N (n=188)	2.68 (0.35)	1.43 (1.14-1.79)	0.021*
	S (n=10)	3.04 (0.49)		
Diabetes	N (n=177)	2.72 (0.36)	0.81 (0.69-0.96)	0.016
	S (n=21)	2.52 (0.36)		
Hiperuricemia	N (n=51)	2.56 (0.31)	1.27 (1.13-1.43)	<0.001
	S (n=80)	2.80 (0.34)		
Prednisolona	N (n=15)	2.46 (0.28)	1.30 (1.07-1.57)	0.005*
	S (n=183)	2.72 (0.37)		
AAACentral	N (n=178)	2.68 (0.37)	1.22 (1.03-1.45)	0.019
	S (n=20)	2.88 (0.29)		
Diuréticos	N (n=171)	2.68 (0.36)	1.20 (1.03-1.39)	0.017
	S (n=27)	2.86 (0.38)		
β- bloqueadores	N (n=122)	2.66 (0.39)	1.11 (1.00-1.22)	0.053
	S (n=76)	2.77 (0.33)		
MMF	N (n=173)	2.72 (0.36)	0.87 (0.74-1.02)	0.084
	S (n=25)	2.58 (0.38)		
Rejeição	N (n=145)	2.67 (0.38)	1.11 (1.00-1.26)	0.059
	S (n=53)	2.78 (0.33)		

<sup>(1)</sup> Quociente das médias geométricas de cada um dos grupos e respectivo intervalo de confiança a 95%.

F= sexo feminino; M= sexo masculino; N= não; S= sim.

\* teste não paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes.

Apesar dos indivíduos do sexo masculino apresentarem médias de homocisteína significativamente mais elevadas, a diferença de médias não foi significativa para o sexo do dador. As médias da homocisteína também não variaram significativamente com o tipo de tratamento dialítico efectuado (hemodiálise ou diálise peritoneal) e entre os participantes com e sem ocorrência de NTA.

O número reduzido de participantes sem ciclosporina (n=5) e com tacrolimus (n=4) não permitiu avaliar as diferenças de homocisteína nestes grupos. De igual modo, o número limitado de mulheres a fazer contraceptivos orais (n=8) ou sob terapêutica hormonal de substituição (n=2), também não permitiu tirar conclusões relevantes da comparação de médias.

### 5.3. Correlação entre a homocisteína e as variáveis recolhidas

As variáveis analíticas que se correlacionaram linear e significativamente com a homocisteína sérica expressam-se na **Tabela 13**. Nas **figuras 19, 20 e 21** podem visualizar-se os diagramas de dispersão e as correlações lineares entre os logaritmos dos valores de homocisteína e de vitamina B<sub>12</sub>, ácido fólico sérico e eritrocitário.

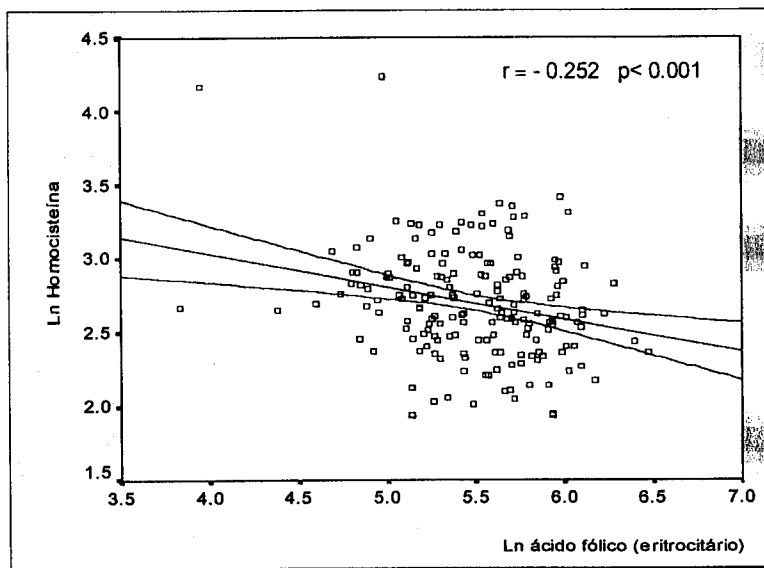
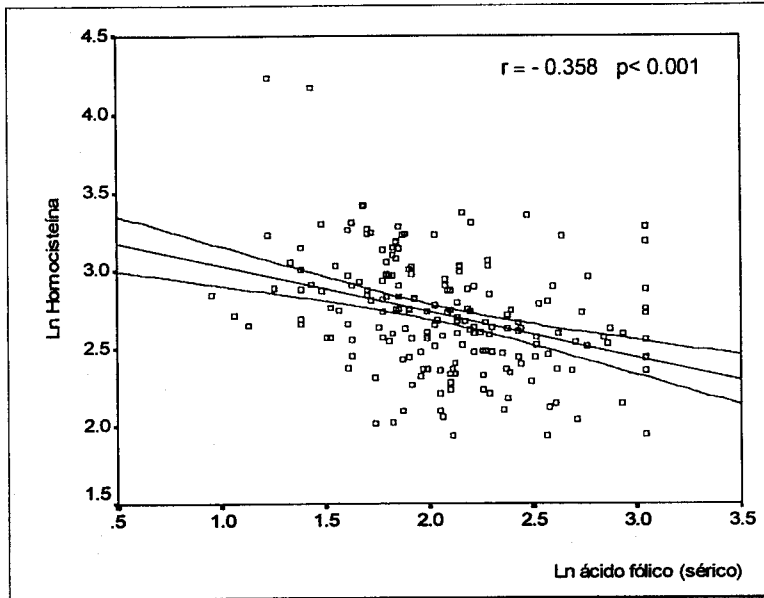
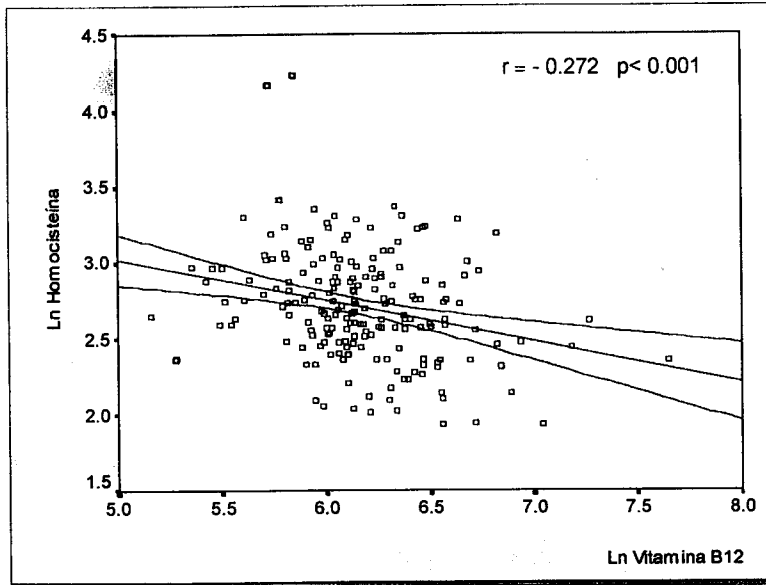
No que se refere aos dois indivíduos que apresentam valores muito elevados de homocisteína (*outliers*), que se visualizam nos diagramas, depois de confirmar que não eram resultado de erro de introdução de dados, efectuou-se a análise com e sem os referidos indivíduos. Como não se verificaram diferenças significativas nessa análise e porque não havia nenhum motivo clínico que justificasse a sua exclusão do estudo, os dois participantes foram englobados em toda a análise estatística.

**Tabela 13**

Correlações entre a concentração plasmática de homocisteína (ln) e algumas variáveis analíticas

	$r^{(1)}$	$p$
Ln vitamina B <sub>12</sub>	-0.272	<0.001
Ln ác. fólico sérico	-0.358	<0.001
Ln ác. fólico eritrocitário	-0.252	<0.001
Ln creatinina	0.549	<0.001
Ln ureia	0.492	<0.001
Ác. úrico	0.506	<0.001
Creatinina urinária	0.765	<0.001
Clearance creatinina	-0.357	<0.001
Glicose	-0.151	0.035
Pré-Albumina	0.254	<0.001
Ln RBP	0.294	<0.001
HDL	-0.202	0.005
Apo A	-0.253	<0.001
Ln PTH	0.339	<0.001
Transferrina	-0.197	0.006
Ferritina	0.227	0.002
CFFTotal	-0.261	<0.001
CFFLatente	-0.189	0.011
Eritrócitos	-0.223	0.008
Hematócrito	-0.249	<0.001
VGM	0.146	0.040

<sup>(1)</sup> Correlação de Pearson.



Figs 19, 20, 21 - Correlação linear entre os valores de homocisteína (ln) e de vitamina B<sub>12</sub> e ácido fólico sérico e eritrocitário.

Na Tabela 14 expressam-se as correlações obtidas entre os valores da homocisteína (ln) e algumas variáveis não analíticas.

**Tabela 14**

Correlações significativas entre a concentração plasmática de homocisteína (ln) e algumas variáveis não analíticas

	$r^{(1)}$	$p$
Tempo diálise (ln)	0.151	0.034
Dias internamento pós TR (ln)	0.251	<0.001
Tempo de TR (ln)	0.212	0.003
MMF	-0.441 <sup>(2)</sup>	0.027
TA Sistólica (ln)	0.209	0.003
TA Diastólica (ln)	0.147	0.039
Nº de anti-hipertensores	0.239	<0.001

<sup>(1)</sup> Correlação de Pearson. <sup>(2)</sup> Correlação de Spearman

Não foi encontrada correlação linear significativa ( $p > 0.05$ ) entre os valores de homocisteína (ln) e as variáveis expressas na Tabela 15.

**Tabela 15**

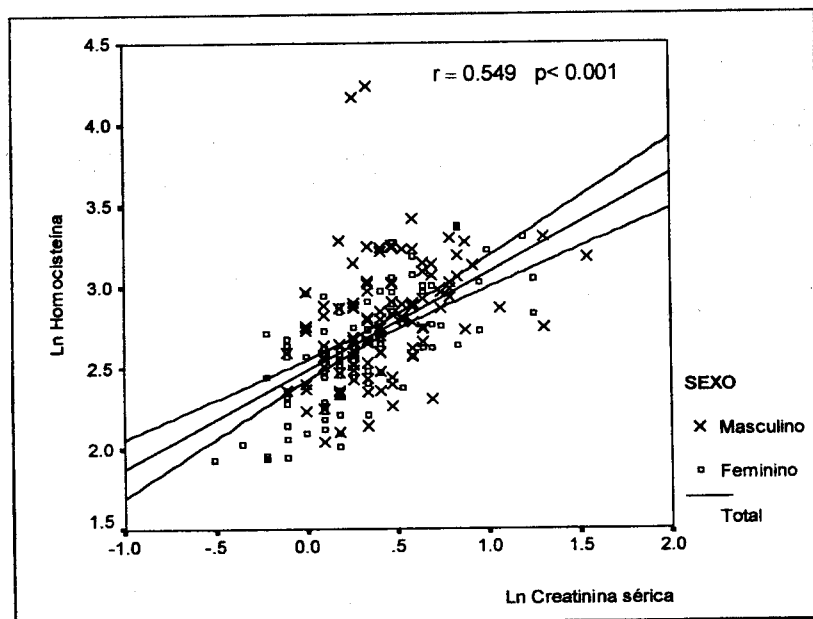
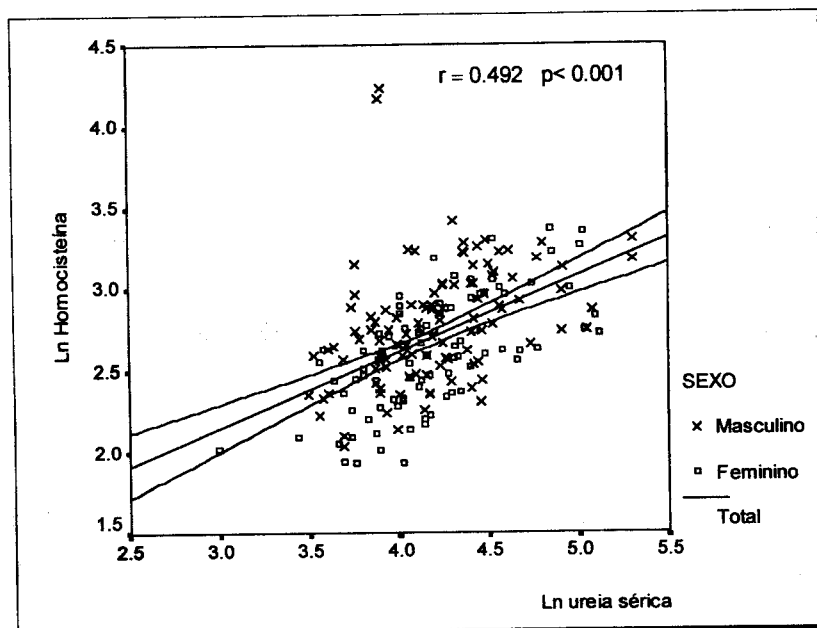
Variáveis não correlacionadas com os valores de homocisteína (ln)

<b>Variáveis analíticas</b>		
Vitamina B <sub>6</sub>	Proteinúria	Sat. Transf
Colesterol Total	Ureia urinária	Linfócitos
Triglicerídeos	Sódio	Leucócitos
Colesterol VLDL	Fósforo	Plaquetas
Colesterol LDL	Cálcio	Fibrinogénio
Lp (a)	Fosfatase Alcalina	Tempo de protrombina
Apo B	TGO e TGP	Tempo de tromboplastina
Albumina	GGT	PAI
Proteínas totais	Ferro	Csa sérica
<b>Variáveis transplante e pós-transplante (imediato e actual)</b>		
Nº de <i>match</i>	Nº cigarros/dia	Idade à data do TR
Tempo de isquemia frio	Álcool (g/dia)	Idade do dador
Creatinina do dador	CsA (dose)	Idade actual
Ureia do dador	Prednisolona (dose)	IMC à data do TR
Rejeição (dias)	Azatioprina (dose)	IMC actual
NTA (dias)	Tacrolimus (dose)	Aumento ponderal (Kg)

### Pormenorização da correlação da homocisteína com algumas variáveis

#### Ureia e Creatinina

A correlação da ureia e creatinina com a homocisteína foi, como referido, positiva e significativa ( $r=0.49$ ,  $p<0.001$  e  $r=0.55$ ,  $p<0.001$ , respectivamente) para ambos os sexos. (Figuras 22 e 23) O tipo de correlação manteve-se mesmo nos indivíduos com valores de ureia e creatinina considerados normais, ou seja, inferiores a 50 mg/dl ( $r=0.54$ ,  $p<0.001$ ) e 1 mg/dl ( $r=0.33$ ,  $p<0.05$ ), respectivamente.



Figs 22 e 23 - Correlação entre os valores (ln) de homocisteína e de ureia e creatinina séricas.

*Glicose*

A glicemia deixou de ter correlação significativa com os valores de homocisteína, depois de excluir os participantes diabéticos.

*Factores pró-trombóticos*

A falta de correlação linear entre os factores de coagulação (fibrinogénio, PAI-1, tempo de protrombina e de tromboplastina) e a homocisteína manteve-se após estratificar a amostra segundo a presença, ou não, de terapêutica anticoagulante e antitrombótica.

*Hematócrito, VGM e Eritrócitos*

Tendo verificado uma correlação linear negativa e significativa entre a homocisteína e o hematócrito e o número de eritrócitos e uma correlação positiva e significativa entre a homocisteína e o VGM, procedeu-se à estratificação da amostra segundo o hematócrito em menor ou igual a 40% e maior que 40%. Constatámos que quando o hematócrito excede os 40% não existe qualquer tipo de correlação entre a homocisteína e os três parâmetros referidos. No entanto, quando o valor de hematócrito diminui para menos de 40% passa a haver uma correlação negativa e significativa entre a homocisteína e o hematócrito, assim como com o número de eritrócitos, e uma correlação positiva e significativa com o VGM. (Tabela 16)

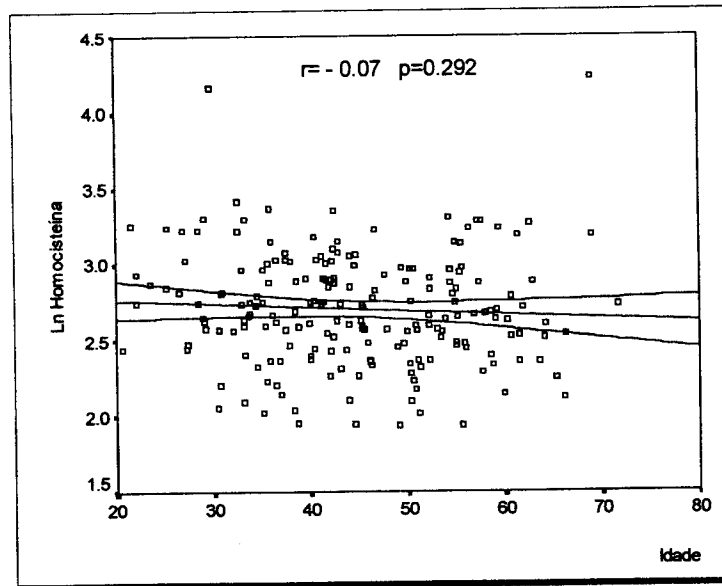
**Tabela 16**

Correlação entre a concentração plasmática de homocisteína (ln)  
e o hematócrito, o VGM e o número de eritrócitos

<b>Hematócrito &gt; 40</b> (n=90)	<b>r</b>	<b>p</b>
Hematócrito	0.112	n.s.
VGM	-0.075	n.s.
Eritrócitos	0.163	n.s.
<b>Hematócrito ≤ 40</b> (n=107)		
Hematócrito	-0.224	0.020
VGM	0.283	0.003
Eritrócitos	-0.282	0.013

*Idade*

Não tendo sido encontrada, como noutros estudos, correlação entre a concentração sérica de homocisteína e a idade (**Figura 22**), mesmo depois da estratificação por sexo, consideraram-se os quartis desta variável, tendo sido analisado a sua relação com a homocisteína, em cada um dos quartis. Foi obtida uma correlação significativa apenas no 2º quartil, ou seja, dos 36 aos 43 anos (**Tabela 17**).



**Fig. 24** - Correlação entre a idade e a concentração plasmática de homocisteína (ln).

**Tabela 17**

Correlação entre a idade e a homocisteína plasmática (ln), em cada um dos quartis de idade

Idade (quartis)	r	p
1º quartil (< 36 anos)	- 0.150	.298
2º quartil (≥ 36 e < 43 anos)	0.352	<b>.016*</b>
3º quartil (≥ 43 e < 53 anos)	- 0.097	.501
4º quartil (≥ 53 anos)	0.074	.601

\* p<0.05, pela correlação de Pearson

#### 5.4. DETERMINANTES DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE HOMOCISTEÍNA (ANÁLISE MULTIVARIÁVEL)

Com o objectivo de identificar as variáveis que contribuem significativamente para explicar a variação da concentração de homocisteína, procedeu-se à análise de regressão linear múltipla, tendo sido avaliados vários modelos pelo método Stepwise, considerando-se o logaritmo da homocisteinemia basal como variável dependente (ln\_Hcy).

Depois de incluir as variáveis mais relevantes, do ponto de vista clínico e estatístico, o modelo final considerado revelou que só o ácido úrico, os antecedentes de doença vascular posterior ao TR, creatinemia, sexo, terapêutica com antiadrenérgicos de acção central e ácido fólico eritrocitário foram preditores independentes e significativos para a homocisteinemia basal. Depois das seis variáveis terem sido incluídas no modelo mais nenhuma contribuiu de forma significativa para a explicar a variação da concentração plasmática de homocisteína, nomeadamente as interacções entre a creatinina e o sexo e entre a creatinina e o ácido úrico. Os coeficientes padronizados da regressão dos seis preditores independentes descrevem-se na **Tabela 18-A**, destacando-se que das seis variáveis incluídas no modelo final o ácido úrico foi a variável que, relativamente às restantes variáveis, teve maior poder explanatório ( $\beta=0.320$ ;  $p<0.001$  e  $t=3.99$ ). Este modelo, constituído pelas seis variáveis referidas, permitiu "explicar" 46.7% da variação dos valores de homocisteinemia basal (**Tabela 18-B**). A razão das médias geométricas de homocisteína no sexo masculino relativamente ao feminino, apesar de ligeiramente mais baixa, não foi profundamente alterada depois de ajustada para as restantes variáveis incluídas no modelo (não ajustada: 1.22 versus ajustada: 1.14). Também não se verificaram alterações substanciais quando se analisaram os quocientes das médias geométricas relativamente aos transplantados com e sem antecedentes de doença vascular (não ajustado: 1.43 versus ajustado: 1.48) e relativamente aos transplantados com e sem terapêutica com antiadrenérgicos de acção central (não ajustada: 1.22 versus ajustada: 1.25).

De salientar que a introdução da variável ácido fólico eritrocitário diminuiu significativamente a influência adicional do ácido fólico sérico e da vitamina B<sub>12</sub>. Da mesma forma a inclusão da creatinina sérica no modelo retirou a significância à creatinina urinária, o mesmo acontecendo à entrada do ácido úrico relativamente à ureia sérica e ao fibrinogénio. A vitamina B<sub>6</sub>, IMC, idade, albumina, pré-albumina, RBP, colesterol total, triglicédeos, Lp(a), PAI-1, tempo de protrombina e tromboplastina, tempo de diálise e de TR, prednisolona (sim/não e dose), Csa



(sim/não e dose), MMF, AAperiféricos, simvastatina, rejeição (sim/não e nº de dias), HTA, a diabetes não contribuíram, de forma significativa, para explicar a variação da homocisteinemia basal (ln).

**Tabela 18-A**

Análise de regressão linear múltipla: determinantes major da homocisteinemia, de acordo com a ordem de entrada das variáveis no modelo pelo método de Stepwise

Modelo		Coeficientes não padronizados		Coeficientes padronizados	t	Sig.
		B	erro padrão	$\beta$		
1	(Constante)	1.984	.116		17.165	.000
	Ác. úrico	0.092	.015	0.506	6.324	.000
2	(Constante)	1.992	.109		18.258	.000
	Ác. úrico	0.088	.014	0.483	6.379	.000
	Ant.vasculares	0.472	.121	0.296	3.903	.000
3	(Constante)	2.049	.107		19.111	.000
	Ác. úrico	0.067	.015	0.368	4.435	.000
	Ant.vasculares	0.432	.118	0.271	3.670	.000
	Ln Creat.	0.296	.099	0.250	2.994	.003
4	(Constante)	2.030	.105		19.312	.000
	Ác. úrico	0.060	.015	0.329	3.989	.000
	Ant.vasculares	0.410	.116	0.256	3.544	.001
	Ln Creat.	0.275	.097	0.232	2.835	.005
	Sexo	0.134	.054	0.186	2.497	.014
5	(Constante)	2.004	.104		19.259	.000
	Ác. úrico	0.060	.015	0.331	4.085	.000
	Ant.vasculares	0.422	.114	0.264	3.709	.000
	Ln Creat.	0.273	.095	0.231	2.867	.005
	Sexo	0.148	.053	0.205	2.784	.006
	AAACentral	0.219	.099	0.157	2.216	.029
6	(Constante)	2.710	.368		7.365	.000
	Ác. úrico	0.058	.015	0.320	3.990	.000
	Ant.vasculares	0.389	.113	0.244	3.429	.001
	Ln Creat.	0.286	.094	0.242	3.034	.003
	Sexo	0.135	.053	0.187	2.549	.012
	AAACentral	0.226	.098	0.162	2.313	.023
	Ln Foli_eritro	-0.124	.062	-0.142	-1.998	.048

Variável dependente: logaritmo natural da homocisteína (ln Hcy)

Ln Creat. e Ln Foli\_eritro: Logaritmo natural da creatinina e ácido fólico eritrocitário; Ác. úrico: ácido urico sérico; AAACentral: antiadrenérgicos de ação central; Ant. vascular: antecedentes de doença vascular.

A construção do modelo de regressão múltipla foi efectuada pelo método Stepwise. O modelo final incluiu o ácido úrico, antecedentes de doença vascular pós-TR, creatinina, sexo, terapêutica com AAACentral e ácido fólico eritrocitário como preditores independentes e significativos ( $p < 0.05$ ) para a homocisteinemia basal.

**Tabela 18-B**

Análise de regressão linear múltipla: determinantes major da homocisteinemia, de acordo com a ordem de entrada das variáveis no modelo pelo método de Stepwise

Modelo	F	Sig.	R	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Ajustado
1	39.998	.000	.506	.256	.250
2	30.067	.000	.586	.343	.332
3	24.422	.000	.625	.391	.375
4	20.717	.000	.650	.423	.403
5	18.130	.000	.669	.447	.423
6	16.177	.000	.683	.467	.438

Preditores:

1. (Constante), Ác. úrico
2. (Constante), Ác. úrico, Ant. vasculares
3. (Constante), Ác. úrico, Ant. vasculares, Ln Creat
4. (Constante), Ác. úrico, Ant. vasculares, Ln Creat, Sexo
5. (Constante), Ác. úrico, Ant. vasculares, Ln Creat, Sexo, AAACentral
6. (Constante), Ác. úrico, Ant. vasculares, Ln Creat, Sexo, AAACentral, Ln Foli\_eritro

Tendo a noção de que a função renal tem um elevado poder preditor neste tipo de população pretendeu-se determinar os factores preditores da concentração plasmática de homocisteína na ausência da creatinina sérica e ácido úrico. E verificámos que, na ausência destes parâmetros, cerca de 25% da variação dos valores da homocisteinemia são explicados pelas variáveis: vitamina B<sub>12</sub>, tensão arterial sistólica, ácido fólico eritrocitário, número de anti-hipertensores, colesterol HDL e sexo. (Tabela 19-A e 19-B)

**Tabela 19-A**

Análise de regressão linear múltipla: determinantes da homocisteinemia (sem incluir a creatinina e ácido úrico), de acordo com a ordem de entrada das variáveis no modelo pelo método de Stepwise

Modelo	F	Sig.	R	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Ajustado
1	16.461	.000	.295	.087	.082
2	15.015	.000	.386	.149	.139
3	13.501	.000	.438	.192	.177
4	12.469	.000	.476	.227	.209
5	11.740	.000	.508	.258	.236
6	10.646	.000	.525	.275	.250

Preditores:

1. (Constante), Ln B<sub>12</sub>
2. (Constante), Ln B<sub>12</sub>, TAS
3. (Constante), Ln B<sub>12</sub>, TAS, Ln Foli\_eritro
4. (Constante), Ln B<sub>12</sub>, TAS, Ln Foli\_eritro, N<sup>o</sup> AntiHT
5. (Constante), Ln B<sub>12</sub>, TAS, Ln Foli\_eritro, N<sup>o</sup> AntiHT, HDL
6. (Constante), Ln B<sub>12</sub>, TAS, Ln Foli\_eritro, N<sup>o</sup> AntiHT, HDL, Sexo

Tabela 19-B

Análise de regressão linear múltipla: determinantes da homocisteinemia (sem incluir a creatinina e ácido úrico), de acordo com a ordem de entrada das variáveis no modelo pelo método de Stepwise

Modelo		Coeficientes não padronizados		Coeficientes padronizados	t	Sig.
		B	erro padrão	$\beta$		
1	(Constante)	4.458	.434		10.269	.000
	Ln B <sub>12</sub>	-0.285	.070	-0.295	-4.057	.000
2	(Constante)	3.929	.446		8.805	.000
	Ln B <sub>12</sub>	-0.294	.068	-0.304	-4.324	.000
	TAS	4.1×10 <sup>-3</sup>	.001	0.249	3.532	.001
3	(Constante)	4.638	.496		9.359	.000
	Ln B <sub>12</sub>	-0.251	.068	-0.259	-3.684	.000
	TAS	4.2×10 <sup>-3</sup>	.001	0.258	3.741	.000
	Ln Foli_erito	-0.181	.060	-0.212	-3.011	.003
4	(Constante)	4.652	.486		9.571	.000
	Ln B <sub>12</sub>	-0.268	.067	-0.277	-3.999	.000
	TA_S	3.9×10 <sup>-3</sup>	.001	0.240	3.531	.001
	Ln Foli_eritro	-0.176	.059	-0.206	-2.973	.003
	Nº_AntiHT	0.065	.023	0.190	2.787	.006
5	(Constante)	4.771	.480		9.945	.000
	Ln B <sub>12</sub>	-0.246	.066	-0.254	-3.696	.000
	TA_S	3.6×10 <sup>-3</sup>	.001	0.219	3.263	.001
	Ln Foli_eritro	-0.169	.058	-0.198	-2.907	.004
	Nº_AntiHT	0.061	.023	0.179	2.666	.008
	HDL	-4.0×10 <sup>-3</sup>	.002	-0.179	-2.655	.009
6	(Constante)	4.486	.496		9.048	.000
	Ln B <sub>12</sub>	-0.230	.066	-0.238	-3.468	.001
	TAS	3.6×10 <sup>-3</sup>	.001	0.219	3.286	.001
	Ln Foli_eritro	-0.153	.058	-0.179	-2.632	.009
	Nº_AntiHT	0.064	.023	0.183	2.752	.007
	HDL	-3.3×10 <sup>-3</sup>	.002	-0.147	-2.133	.034
	Sexo	0.102	.050	0.140	2.024	.045

Variável dependente: logaritmo natural da homocisteína (Ln Hcy)

Ln B<sub>12</sub> e Ln Foli\_eritro: Logaritmo natural da vitamina B<sub>12</sub> e ácido fólico eritrocitário; TAS: tensão arterial sistólica; Nº\_AntiHT: nº de anti-hipertensores; HDL: colesterol HDL.

A construção do modelo de regressão múltipla foi efectuada pelo método Stepwise. O modelo final incluiu a vitamina B<sub>12</sub>, a tensão arterial sistólica, o ácido fólico eritrocitário, o nº de agentes anti-hipertensores, o colesterol HDL e o sexo como preditores independentes e significativos (p<0.05) para a homocisteinemia basal.

## 6. VITAMINAS B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> E ÁCIDO FÓLICO

### 6.1 Comparação dos valores médios de vitaminas entre grupos específicos de transplantados renais

#### Sexo

Excepto para a vitamina B<sub>6</sub> as concentrações de vitaminas foram sempre superiores no sexo feminino. (Tabela 20)

**Tabela 20**

Comparação dos valores médios de vitaminas (ln) entre os sexos

Vitaminas	Sexo		p <sup>(1)</sup>
	Masculino	Feminino	
Ln vitamina B <sub>6</sub>	2.25 ± 0.46	2.09 ± 0.48	.056
Ln vitamina B <sub>12</sub>	6.09 ± 0.33	6.24 ± 0.39	.009
Ln ác. fólico sérico	2.03 ± 0.45	2.14 ± 0.42	n.s.
Ln ác. fólico eritrocitário	5.43 ± 0.44	5.58 ± 0.37	.016

<sup>(1)</sup> teste t de Student para amostras independentes. n.s.: não significativo (p>0.05)

#### *Antecedentes de doença vascular após o TR*

Os grupos de indivíduos com e sem antecedentes de doença vascular apresentaram valores de ácido fólico sérico e eritrocitário significativamente diferentes (p=0.044 e p=0.042, respectivamente), sendo mais baixos na presença de antecedentes de doença vascular após o TR.

#### *Terapêutica*

As concentrações vitamínicas não variaram significativamente nos grupos com e sem prednisolona, AAACentral e diuréticos. O valor médio de ácido fólico foi significativamente diferente nos indivíduos com e sem terapêutica com β-bloqueadores (p=0.012), sendo mais baixo nos transplantados com este tipo de terapêutica. Por outro lado os valores médios de vitamina B<sub>12</sub> foram significativamente diferentes nos transplantados medicados ou não com MMF (p=0.029), sendo mais elevados nos indivíduos com MMF.

*Tabaco*

Apesar das médias geométricas dos valores de homocisteína não variarem de forma significativa entre os fumadores e não fumadores, como foi anteriormente referido, a concentração de vitaminas foi sempre mais elevada nos não fumadores, sendo significativamente diferente para a vitamina B<sub>12</sub>, ácido fólico sérico e eritrocitário. (Tabela 21)

**Tabela 21**

Comparação dos valores médios de vitaminas (ln) entre os fumadores e não fumadores

Ln das vitaminas	Fumadores	Não Fumadores	p <sup>(1)</sup>
Ln vitamina B <sub>6</sub>	2.15 ± 0.52	2.19 ± 0.49	n.s.
Ln vitamina B <sub>12</sub>	5.97 ± 0.40	6.18 ± 0.35	.006
Ln ác. fólico sérico	1.77 ± 0.28	2.13 ± 0.44	<0.001
Ln ác. fólico eritrocitário	5.33 ± 0.47	5.52 ± 0.40	.037

<sup>(1)</sup> teste t de Student para amostras independentes. n.s.: não significativo (p>0.05)

*Consulta de Nutrição*

Da mesma forma e tal como referido, os valores de homocisteína não variaram significativamente entre os grupos com e sem seguimento na Consulta de Nutrição, no entanto, a comparação entre os valores das vitaminas permitiu verificar que as suas concentrações médias foram mais elevadas no grupo com acompanhamento regular na Consulta de Nutrição. (Tabela 22)

**Tabela 22**

Comparação dos valores médios de vitaminas (ln) entre os participantes com e sem acompanhamento regular na Consulta de Nutrição

Vitaminas	Consulta de Nutrição				p <sup>(1)</sup>
	n	Sim	n	Não	
Ln vitamina B <sub>6</sub>	37	2.26 ± 0.45	43	2.14 ± 0.46	n.s.
Ln vitamina B <sub>12</sub>	71	6.19 ± 0.38	123	6.14 ± 0.35	n.s.
Ln ác. fólico sérico	72	2.17 ± 0.44	125	2.03 ± 0.43	.028
Ln ác. fólico eritrocitário	67	5.63 ± 0.35	116	5.42 ± 0.43	.001

<sup>(1)</sup> teste t de Student para amostras independentes. n.s.: não significativo (p>0.05)

Nos restantes grupos de transplantados renais considerados não se verificaram diferenças de médias significativas.

## 6.2 Correlação entre as vitaminas e restantes variáveis

Verificou-se uma associação positiva e significativa entre três das vitaminas doseadas: B<sub>12</sub> e ácido fólico sérico e eritrocitário. (Tabelas 23, 24 e 25) A vitamina B<sub>6</sub> não se associou com as restantes vitaminas, nem com a homocisteína, nem com as variáveis associadas à função renal. As únicas correlações significativas da vitamina B<sub>6</sub> foram com o VGM ( $r=0.185$ ;  $p<0.05$ ), com a albumina ( $r=-0.212$ ;  $p<0.05$ ) e com a PTH ( $r=-0.236$ ;  $p<0.05$ ). As vitaminas B<sub>12</sub> e ácido fólico sérico, mas não o eritrocitário, associaram-se negativa e significativamente à creatinina sérica ( $r=-0.179$ ;  $p<0.05$  e  $r=-0.257$ ;  $p<0.001$ , respectivamente). Só o ácido fólico sérico se correlacionou de forma significativa com a depuração da creatinina ( $r=0.224$ ;  $p<0.05$ ) e nenhuma das vitaminas se correlacionou com o nível sérico de ureia.

No que se refere à associação entre as referidas vitaminas e as proteínas séricas: o ácido fólico sérico revelou uma correlação positiva e significativa com a albumina ( $r=0.147$ ;  $p<0.05$ ) e proteínas totais ( $r=0.166$ ;  $p<0.05$ ); a vitamina B<sub>12</sub> correlacionou-se significativamente com as proteínas totais ( $r=-0.167$ ;  $p<0.05$ ), mas não com a albumina; a vitamina B<sub>6</sub> associou-se significativamente à albumina ( $r=-0.212$ ;  $p<0.05$ ), como já foi referido.

Relativamente à terapêutica imunossupressora efectuada, todas as vitaminas, excepto a vitamina B<sub>6</sub>, se correlacionaram negativa e significativamente com a dose de prednisolona (B<sub>12</sub>:  $r=-0.215$ ,  $p<0.05$ ; fólico sérico:  $r=-0.218$ ;  $p<0.05$ ; fólico eritrocitário:  $r=-0.186$ ;  $p<0.05$ ), mas só o ácido fólico sérico se associou à dose de ciclosporina ( $r=-0.239$ ;  $p<0.05$ ). Nenhuma das vitaminas se correlacionou com a dose de MMF e com a concentração plasmática de ciclosporina.

Em relação aos parâmetros lipídicos: nenhuma das vitaminas se associou ao colesterol total, enquanto que com os triglicérideos se correlacionou negativamente a vitamina B<sub>12</sub> ( $r=-0.202$ ;  $p<0.05$ ), que, por sua vez, se correlacionou positiva e significativamente, assim como o ácido fólico sérico, com o colesterol HDL ( $r=0.142$ ;  $p<0.05$  e  $r=-0.188$ ;  $p<0.05$ , respectivamente).

A associação das vitaminas com os factores pró-trombóticos revelou apenas duas correlações significativas: uma positiva da vitamina B<sub>12</sub> com o fibrinogénio e uma negativa do PAI com o ácido fólico.

Finalmente, nenhuma das vitaminas se associou à creatinina do dador, número de dias de NTA e de rejeição, tempo de TR (ln) e de diálise (ln), tensão sistólica (ln) e diastólica (ln).

## Tabelas 23 e 24

Correlação linear entre as vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico sérico e eritrocitário e algumas variáveis

r (p)	LnB <sub>6</sub>	LnB <sub>12</sub>	LnFol	LnFol_e	LnHcy	LnCreat	LnUreia	ClCreat	Ác. Úrico	Tempo de TR (ln)
LnB <sub>6</sub>	-									
LnB <sub>12</sub>	N.S.	-								
LnFol	N.S.	0.294 ( <b>&lt;0.001</b> )	-							
LnFol_e	N.S.	0.212 (.004)	0.351 ( <b>&lt;0.001</b> )	-						
LnHcy	N.S.	-0.272 ( <b>&lt;0.001</b> )	-0.358 ( <b>&lt;0.001</b> )	-0.252 ( <b>&lt;0.001</b> )	-					
LnCreat	N.S.	-0.179 (.013)	-0.257 ( <b>&lt;0.001</b> )	N.S.	0.549 ( <b>&lt;0.001</b> )	-				
LnUreia	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0.492 ( <b>&lt;0.001</b> )	0.790 (.000)	-			
ClCreat	N.S.	N.S.	0.224 (.012)	N.S.	-0.357 ( <b>&lt;0.001</b> )	-0.618 ( <b>&lt;0.001</b> )	-0.585 ( <b>&lt;0.001</b> )	-		
Ác. úrico	N.S.	N.S.	-0.253 (.004)	N.S.	0.506 ( <b>&lt;0.001</b> )	0.453 ( <b>&lt;0.001</b> )	0.515 ( <b>&lt;0.001</b> )	-0.359 (.001)	-	
Tempo de TR (ln)	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0.212 (.003)	0.321 ( <b>&lt;0.001</b> )	0.296 ( <b>&lt;0.001</b> )	-0.291 (.001)	N.S.	-

Ln B<sub>6</sub>, LnB<sub>12</sub>, LnFol, LnFol\_e, LnHcy, LnCreat, LnUreia, tempo TR (ln): logaritmo natural das vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, ácido fólico (sérico e eritrocitário), creatinina, ureia e tempo de transplante. Cl Creat = depuração da creatinina.

r (p)	LnB <sub>6</sub>	LnB <sub>12</sub>	LnFol	LnFol_e	LnAlb	Prot T	LnPTH	MMF dose	Csa dose	Csa sérica	Pred dose
LnB <sub>6</sub>	-										
LnB <sub>12</sub>	N.S.	-									
LnFol	N.S.	0.294 ( <b>&lt;0.001</b> )	-								
LnFol_e	N.S.	0.212 (.004)	0.351 ( <b>&lt;0.001</b> )	-							
LnAlb	0.212 (.015)	N.S.	0.147 (.041)	N.S.	-						
Prot T	N.S.	0.167 (.021)	0.166 (.021)	N.S.	0.394 ( <b>&lt;0.001</b> )	-					
LnPTH	-0.236 (.009)	N.S.	-0.160 (.033)	N.S.	-0.167 ( <b>&lt;0.001</b> )	-0.251 (.001)	-				
MMF dose	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-			
Csa dose	N.S.	-0.239 (.001)	N.S.	N.S.	0.253 ( <b>&lt;0.001</b> )	N.S.	N.S.	N.S.	-		
Csa sérica	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	
Pred dose	N.S.	-0.215 (.004)	-0.218 (.003)	-0.186 (.016)	-0.211 (.005)	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-

Ln B<sub>6</sub>, LnB<sub>12</sub>, LnFol, LnFol\_e, LnAlb, LnPTH : logaritmo natural das vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, ácido fólico sérico e eritrocitário, albumina e PTH. Prot T = Proteínas totais

Tabelas 25

Correlação linear entre as vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico sérico e eritrocitário e algumas variáveis

r (p)	LnB <sub>6</sub>	LnB <sub>12</sub>	LnFol	LnFol_e	CoIT	LnTG	HDL	LnFib	LnPAI	VGM
LnB <sub>6</sub>	-									
LnB <sub>12</sub>	N.S.	-								
LnFol	N.S.	0.294 ( <b>&lt;0.001</b> )	-							
LnFol_e	N.S.	0.212 (.004)	0.351 ( <b>&lt;0.001</b> )	-						
CoIT	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-					
LnTG	N.S.	-0.202 (.005)	N.S.	N.S.	0.443 ( <b>&lt;0.001</b> )	-				
HDL	N.S.	0.142 (.049)	0.188 (.009)	N.S.	0.223 (.002)	-0.386 ( <b>&lt;0.001</b> )	-			
LnFib	N.S.	0.231 (.002)	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-		
LnPAI	N.S.	N.S.	-0.143 (.048)	N.S.	N.S.	0.210 (.004)	-0.142 (.050)	N.S.	-	
VGM	0.185 (.032)	-0.168 (.019)	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-

Ln B<sub>6</sub>, LnB<sub>12</sub>, LnFol, LnFol\_e, LnTG, LnFib, LnPAI: logaritmo natural das vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, ácido fólico (sérico e eritrocitário), triglicérides, fibrinogénio e PAI. CoIT = colesterol total.



## 7. HIPERHOMOCISTEINEMIA

### 7.1. Comparação da proporção de hiperhomocisteinemia entre grupos específicos de transplantados renais

A utilização do teste do  $\chi^2$ , ou teste exacto de Fisher quando apropriado, para analisar a associação entre a presença de hiperhomocisteinemia e as variáveis dicotómicas e contínuas dicotomizadas, permitiu concluir que (Tabela 26):

- a proporção de indivíduos do sexo masculino com hiperhomocisteinemia foi significativamente superior à do sexo feminino (57.8% vs 37.5%;  $p=0.007$ , OR=2.28);
- a percentagem de indivíduos com hiperhomocisteinemia foi significativamente mais elevada na presença de hiperuricemia (59.5% vs 33.3%;  $p=0.004$ , OR=2.94);
- os indivíduos medicados com prednisolona (51.1% vs 20.0%;  $p=0.041$ , OR= 4.18) apresentaram uma proporção de hiperhomocisteinemia significativamente superior;
- a proporção de indivíduos com hiperhomocisteinemia foi significativamente mais elevada nos medicados com antiadrenérgicos de acção central (75.0% vs 45.8%;  $p=0.025$ ; OR=3.56);  $\beta$ -bloqueadores (60.5% vs 41.3%;  $p=0.013$ , OR= 2.18) e diuréticos (70.4% vs 45.3%;  $p=0.027$ , OR= 2.87);
- a presença de rejeição aguda após o TR associou-se de forma significativa a uma percentagem mais elevada de hiperhomocisteinemia (63.5% vs 43.4%;  $p=0.021$ , OR= 2.26);
- a proporção de indivíduos com hiperhomocisteinemia foi significativamente superior na presença de antecedentes de doença vascular após o TR (80% vs 47.1%;  $p=0.042$ , OR= 4.50).

A presença de hiperhomocisteinemia não se associou significativamente:

- à presença de antecedentes de episódios cardio e cerebrovasculares antes do transplante, ao sexo do dador e à ocorrência de NTA;
- à existência de outros factores de risco vascular nomeadamente, diabetes, obesidade, HTA, dislipidemia e hipercolesterolemia;
- à heterozigotia para o gene G20210A;
- a valores de fibrinogénio e PAI superiores a 200 mg/dl e 15 UI/L, respectivamente;
- à terapêutica com CsA, azatioprina, MMF, bloqueadores dos canais de cálcio, IECA, insulina, simvastatina, antiácidos/antiulcerosos e antigotosos;
- à ingestão de álcool e café, hábitos tabágicos e sedentarismo.

Tabela 26

Variáveis associadas à ocorrência de hiperhomocisteinemia

	OR não ajustado (IC 95%)
<b>Sexo (feminino)</b>	
masculino	2.28 (1.28-4.06)
<b>Hiperuricemia (sem)</b>	
com hiperuricemia	2.94 (1.41-6.13)
<b>Rejeição aguda (sem)</b>	
com rejeição aguda	2.26 (1.18-4.34)
<b>Antecedentes vasculares (sem)</b>	
com antec. vasculares	4.50 (0.93-21.8)
<b>Terapêutica (sem):</b>	
com prednisolona	4.18 (1.14-15.31)
com AAACentral	3.56 (1.21-3.90)
com $\beta$ -bloqueadores	2.18 (1.24-10.20)
com diuréticos	2.87 (1.19-6.91)

A classe de referência expressa-se em *itálico*.

## 5.2. Factores preditores da hiperhomocisteinemia

Com o objectivo de avaliar o papel de alguns factores na ocorrência de hiperhomocisteinemia e identificar os factores preditores mais importantes, utilizou-se um modelo de regressão logística e foram testadas as seguintes variáveis categorizadas: idade actual, tempo de TR, tempo de diálise, fibrinogénio, PAI-1, gene G20210A, colesterol HDL, Lp(a), ácido úrico, terapêutica com antiadrenérgicos de acção central, IECA,  $\beta$ -bloqueadores, bloqueadores dos canais de cálcio, ciclosporina, prednisolona, MMF, azatioprina, antigotosos, antiácidos/antiulcerosos e anticoagulantes/antitrombóticos, a ocorrência de NTA e rejeição, a presença de hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, obesidade e diabetes, ingestão de álcool e de café, hábitos tabágicos e exercício físico. Apenas a creatinina, o número de anti-hipertensores, o ácido fólico eritrocitário e a vitamina B<sub>12</sub> foram preditores significativos. Mais uma vez, o ácido fólico sérico deixou de ter uma influência significativa depois de ter sido introduzido no modelo o ácido fólico eritrocitário. A variável sexo deixou de ser um preditor significativo depois do número de anti-hipertensores entrar no modelo (já com a creatinina sérica, vitamina B<sub>12</sub> e ácido fólico eritrocitário). Interações entre variáveis, nomeadamente entre sexo e creatinina não se revelaram estatisticamente significativas.

As variáveis creatinina, ácido fólico eritrocitário e vitamina B<sub>12</sub> foram categorizada segundo os quartis (**Quadro 13**). O número de anti-hipertensores foi categorizado em 3 subgrupos: sem anti-hipertensores; com um ou dois anti-hipertensores e com mais de dois anti-hipertensores.

**Quadro 13**

Categorização das variáveis creatinina, vitamina B<sub>12</sub> e ácido fólico eritrocitário

Creatinina (mg/dl)	Ác. fólico eritrocitário (ng/dl)	Vitamina B <sub>12</sub> (pg/ml)
1º quartil ≤ 1.1	1º quartil ≤ 187	1º quartil ≤ 382
2º quartil ]1.1 - 1.4]	2º quartil ]187 - 259]	2º quartil ]382 - 461]
3º quartil ]1.4- 1.8 ]	3º quartil ]259 - 324]	3º quartil ]461 - 586]
4º quartil > 1.8	4º quartil > 324	4º quartil > 586

Considerámos como classe de referência o 1º quartil para a creatinina, o 4º quartil para a vitamina B<sub>12</sub> e ácido fólico eritrocitário e a ausência de terapêutica anti-

hipertensora na variável denominada número de anti-hipertensores. (Quadro 14)

**Quadro 14**

Especificação da classe de referência da creatinina, vitamina B<sub>12</sub>, ácido fólico eritrocitário e nº de anti-hipertensores

		(1)	(2)	(3)
<b>Vitamina B<sub>12</sub> (pg/dl)</b>				
≤382	1º quartil	36	1.000	.000
383-461	2º quartil	42	.000	1.000
462-586	3º quartil	42	.000	.000
>586	4º quartil	42	.000	.000
<b>Ácido fólico eritrocitário (ng/dl)</b>				
≤187	1º quartil	40	1.000	.000
188-259	2º quartil	43	.000	1.000
260-324	3º quartil	40	.000	.000
>324	4º quartil	39	.000	.000
<b>Creatinina (mg/dl)</b>				
≤1.1	1º quartil	45	.000	.000
1.1-1.4	2º quartil	41	1.000	.000
1.4-1.8	3º quartil	41	.000	1.000
>1.8	4º quartil	35	.000	.000
<b>Nº de anti-hipertensores</b>				
0		28	.000	.000
1-2		102	1.000	.000
≥3		32	.000	1.000

Ajustando para as variáveis incluídas no modelo (vitamina B<sub>12</sub>, ácido fólico eritrocitário, creatinina e número de anti-hipertensores), verificamos que os indivíduos com concentrações de vitamina B<sub>12</sub> inferiores a 382 pg/dl (correspondentes ao 1º quartil) têm um risco significativamente superior de desenvolver uma situação de hiperhomocisteinemia, relativamente aos indivíduos com valores situados no 4º quartil (OR=6.8). (Quadro 15) No que se refere ao ácido fólico eritrocitário e em relação aos indivíduos com valores superiores a 324 ng/dl (correspondentes ao 4º quartil) o risco de ocorrer hiperhomocisteinemia é sempre significativamente superior nos restantes quartis: OR=12.8 no 1º quartil; OR=6.5 no 2º quartil e OR=4.3 no 3º quartil. Relativamente aos indivíduos com creatinemia inferior a 1.1 mg/dl, os indivíduos com creatininas compreendidas entre 1.1 e 1.4 mg/dl não apresentam risco acrescido significativo para desenvolver hiperhomocisteinemia, no entanto os indivíduos com creatininas entre 1.4 e 1.8 mg/dl apresentaram um risco de hiperhomocisteinemia superior OR=16, enquanto que creatininas superiores a 1.8 mg/dl se associaram a um risco ainda mais elevado OR=58.5. Relativamente ao número de anti-hipertensores,

verificou-se que os indivíduos medicados com mais de dois anti-hipertensores têm um risco significativamente mais elevado de apresentar hiperhomocisteinemia (OR=6.2) comparativamente aos indivíduos sem terapêutica anti-hipertensora.

### Quadro 15

Principais factores preditores para a ocorrência de hiperhomocisteinemia, pelo método Backward (LR)

Variáveis	B	Erro Padrão	Wald	df	Sig	R	OR Ajustado	IC OR a 95%
Vitamina B12			9.3823	3	.0246	.1228		
<b>Vit.B12 (1) 1°Q</b>	1.9246	.6932	7.7094	1	<b>.0055</b>	.1595	<b>6.8527</b>	1.76-26.66
Vit.B12 (2) 2°Q	-.0244	.6181	.0016	1	.9685	.0000	.9759	0.29-3.28
Vit.B12 (3) 3°Q	.6565	.6159	1.1360	1	.2865	.0000	1.9280	0.58-6.45
Ác.Fólico eritrocitário			13.0023	3	.0046	.1767		
<b>Foli_e (1) 1°Q</b>	2.5487	.7203	12.5203	1	<b>.0004</b>	.2165	<b>12.7902</b>	3.12-52.48
<b>Foli_e (2) 2°Q</b>	1.8677	.6966	7.1883	1	<b>.0073</b>	.1521	<b>6.4736</b>	1.65-25.36
<b>Foli_e (3) 3°Q</b>	1.4557	.7067	4.2422	1	<b>.0394</b>	.1000	<b>4.2873</b>	1.07-17.13
Creatinina			36.5428	3	.0000	.3690		
Creat. (1) 2°Q	.3891	.6204	.3933	1	.5306	.0000	1.4756	0.44-4.98
<b>Creat. (2) 3°Q</b>	2.7748	.6515	18.1393	1	<b>.0000</b>	.2682	<b>16.0353</b>	4.47-57.49
<b>Creat. (3) 4°Q</b>	4.0691	.8271	24.2024	1	<b>.0000</b>	.3146	<b>58.5014</b>	11.56-295.94
N° Anti-hipertensores			7.1146	2	.0285	.1178		
N°AntiHTA (1) 1-2	.2707	.6485	.1742	1	.6764	.0000	1.3109	0.37-4.67
<b>N°AntiHTA (2) ≥3</b>	1.8323	.8326	4.8426	1	<b>.0278</b>	.1126	<b>6.2480</b>	1.22-31.95
Constante	-4.3325	.9939	19.0013	1	.0000			

Variável dependente: logit da proporção da hiperhomocisteinemia (ln p/1-p)

Vit. B<sub>12</sub> e Foli\_e: vitamina B<sub>12</sub> e ácido fólico eritrocitário; N° AntiHTA: n° de fármacos anti-hipertensores 1°Q, 2°Q, 3°Q e 4°Q, respectivamente, 1°, 2°, 3° e 4° quartil.

A construção do modelo de regressão logística foi efectuada pelo método Backward (LR). O modelo final incluiu a vitamina B<sub>12</sub>, o ácido fólico eritrocitário, a creatinina e o número de fármacos anti-hipertensores como preditores independentes e significativos ( $p < 0.05$ ) para a ocorrência de hiperhomocisteinemia.

No Quadro 15 descrevem-se os OR ajustados e não ajustados dos principais factores preditores da hiperhomocisteinemia, ou seja, dos quartis de vitamina B<sub>12</sub>, ácido fólico eritrocitário e creatinina sérica e número de anti-hipertensores.

## Quadro 16

## Factores preditores da hiperhomocisteinemia

	OR não ajustado (IC)	OR ajustado (IC)
<b>Vitamina B<sub>12</sub> (4º Quartil)</b>		
1º Quartil	4.3 (1.8-10.1)	6.9 (1.8-26.7)
2º Quartil	1.6 (0.7-3.6)	0.9 (0.3-3.3)
3º Quartil	1.9 (0.8-4.5)	1.9 (0.6-6.4)
<b>Ácido fólico eritrocitário (4º Quartil)</b>		
1º Quartil	4.1 (1.7-9.8)	12.8 (3.1-52.5)
2º Quartil	2.8 (1.2-6.6)	6.5 (1.7-25.4)
3º Quartil	2.1 (0.9-5.2)	4.3 (1.1-17.1)
<b>Creatinina sérica (1º Quartil)</b>		
2º Quartil	1.1 (0.4-2.9)	1.5 (0.4-4.9)
3º Quartil	6.6 (2.7-16.4)	16.0 (4.5-57.5)
4º Quartil	31.9 (9.3-109.3)	58.5 (11.5-295.9)
<b>Nº de anti-hipertensores (nenhum anti-hipertensor)</b>		
1-2	1.5 (0.6-3.3)	1.3 (0.4-4.7)
≥ 3	5.1 (1.8-14.3)	6.3 (1.2-31.9)

A classe de referência expressa-se em *itálico*.

## **DISCUSSÃO**

## DISCUSSÃO

A recuperação da função renal pelo transplante associa-se a uma melhoria significativa das alterações analíticas observadas no insuficiente renal crónico. O transplante renal é, actualmente, um tratamento reconhecido para a IRC terminal. No entanto, a sobrevivência a longo prazo destes indivíduos, mesmo com função renal normalizada, tem sido negativamente influenciada pela ocorrência de lesões e episódios vasculares de origem aterosclerótica, de tal forma que a doença cardiovascular representa a principal causa de morbilidade e mortalidade nos transplantados renais.<sup>(12-15,257,272)</sup>

Muitos dos factores de risco clássicos da aterosclerose são frequentemente encontrados na população com transplante renal, atingindo prevalências bastante elevadas. Os resultados do nosso estudo confirmam essas conclusões. Constatámos, na nossa amostra, uma prevalência de 92.6% de HTA, de 80.2% de dislipidemia, de 53% de obesidade, de 10.4% de diabetes mellitus e de 13.4% de tabagismo. No entanto, a certeza de que, apesar da sua importância, os factores clássicos não conseguem explicar a totalidade das doenças vasculares ateroscleróticas, têm sido sugeridos e investigados "novos" factores de risco, cuja pesquisa permite identificar os indivíduos em maior risco, com o objectivo de prevenir futuros episódios vasculares. A hiperhomocisteinemia é um desses exemplos.<sup>(3,6-8,167-170,195)</sup>

Na população em geral, a hiperhomocisteinemia constitui um factor de risco independente para a aterosclerose e aterotrombose.<sup>(25,34,36,38,39,46,66)</sup> Nos transplantados renais apenas um número reduzido de estudos demonstrou a associação entre a hiperhomocisteinemia e o aumento do risco de desenvolvimento e ocorrência de doença cardiovascular.<sup>(202,217,219,221)</sup>

O primeiro estudo a constatar a presença de valores elevados de homocisteína em transplantados renais com função renal estável foi efectuado por Arnadottir e colaboradores em 1981.<sup>(217)</sup> Posteriormente, outras investigações confirmaram esse facto, não só no transplante renal,<sup>(202,218-220,222,251)</sup> mas também no cardíaco,<sup>(271,273)</sup> no hepático e no pulmonar (dados não publicados por Gupta e colaboradores<sup>273</sup>). O nosso estudo corrobora esses resultados. A hiperhomocisteinemia não só existe, como atingiu quase metade (48.7%) dos transplantados renais da nossa amostra (66% do sexo masculino e 34% do feminino). Convém salientar que, a prevalência encontrada se refere apenas e unicamente à hiperhomocisteinemia basal, não contabilizando os indivíduos que possam ter, exclusivamente, alterações no metabolismo da transsulfuração, que, conseqüentemente, só apresentarão valores



elevados de homocisteína após sobrecarga com metionina. É possível que em resultado da realização deste teste a prevalência de hiperhomocisteinemia aumente. Nos estudos realizados com transplantados renais as prevalências de hiperhomocisteinemia basal encontradas variaram entre 59 e 88%,<sup>(219,220,251,264)</sup> embora não exista essa informação na maior parte dos estudos.<sup>(202,217,218,221,262,273)</sup> A variabilidade das prevalências apresentadas pode explicar-se pela diversidade de métodos utilizados no doseamento da homocisteína, mas fundamentalmente porque o limite superior do intervalo de referência varia de estudo para estudo, nomeadamente dos 12 aos 15  $\mu\text{mol/L}$ .<sup>(23,219-221)</sup> De facto, não existe consenso relativamente à definição do limite superior admissível para a concentração plasmática "normal" de homocisteína. E isso ocorre, não só nos estudos realizados com transplantados renais, mas também noutros tipos de população. Se considerarmos, no nosso estudo, o valor de 12, 13 ou 14  $\mu\text{mol/L}$  como limite superior admissível, a prevalência de hiperhomocisteinemia basal será, respectivamente, de 71.7%, 64.6% e 54%, sempre superior no sexo masculino. No entanto, como o intervalo de valores considerado de referência pelo método de doseamento da homocisteína no nosso estudo é de 5 a 15  $\mu\text{mol/L}$ ,<sup>(90)</sup> considerámos a presença de hiperhomocisteinemia basal quando a concentração plasmática de homocisteína excedeu os 15  $\mu\text{mol/L}$ , o que está de acordo com muitos estudos realizados.<sup>(72,77,81,90,221,257,262,271)</sup> Não podemos, no entanto, deixar de referir que este intervalo de referência foi obtido a partir da distribuição das concentrações de homocisteína de uma população não portuguesa. Idealmente, os valores de referência devem ser estabelecidos a partir de uma amostra representativa nacional, ou de populações com características similares, o que ainda não aconteceu no nosso país, pelo menos que tenhamos conhecimento. Apesar de ter sido realizado um estudo na população nacional, com 204 indivíduos sem doença vascular, em que o diagnóstico de hiperhomocisteinemia foi considerada quando os valores de homocisteinemia basal ultrapassavam a média encontrada em mais de dois desvios-padrão, ou seja, sempre que excedessem os 13.1  $\mu\text{mol/L}$ , o método de doseamento utilizado foi diferente do utilizado neste estudo, o que nos impediu de considerar esse valor como limite máximo admissível.<sup>(15)</sup>

No nosso estudo, os valores de homocisteína foram significativamente mais elevados no sexo masculino (mais 22% relativamente ao sexo feminino), tal como ocorreu noutros estudos efectuados na população geral<sup>(30,31,35,42,58,67,68,71,76,81,105,106,190)</sup> e nos transplantados renais,<sup>(202,217)</sup> sendo, conseqüentemente, a prevalência da hiperhomocisteinemia mais elevada no sexo masculino. No nosso estudo, verificámos

que os valores de vitamina B<sub>12</sub> e ácido fólico, sérico e eritrocitário, foram significativamente diferentes segundo o sexo, sendo mais elevados no sexo feminino. Desconhece-se a razão desta diferença, no entanto, é possível que os níveis mais baixos das referidas vitaminas possam contribuir para explicar as concentrações significativamente mais elevadas de homocisteína, apresentadas pelos indivíduos do sexo masculino da nossa amostra. Muitos autores atribuem as diferenças da homocisteinemia entre os sexos a vários factores, nomeadamente à massa muscular e aos estrogénios.<sup>(69,71,92,127,196,274,275)</sup> Em consequência da transferência de grupos metilo durante o metabolismo da homocisteína e da creatina-creatinina, cerca de 75% da homocisteína plasmática total é sintetizada em conjugação com a síntese da creatina e da creatinina. Face à maior percentagem de massa muscular, os indivíduos do sexo masculino produzem maior quantidade de creatina-creatinina e, conseqüentemente, de homocisteína, em comparação com o sexo feminino, o que permite explicar o facto bem conhecido da concentração sérica de creatinina (e possivelmente da concentração plasmática de homocisteína) ser mais elevada nos homens do que nas mulheres.<sup>(71,69,92,127,196,274,275)</sup> Por outro lado, os estrogénios têm um efeito benéfico nos níveis de homocisteína da mulher, o que pode contribuir para explicar os valores mais baixos.<sup>(69,92)</sup> Estes factos reforçam o significado das diferenças biológicas entre os sexos e corroboram a hipótese do sexo masculino apresentar valores de referência de homocisteína mais elevados que o sexo feminino. Isso permite sugerir a estratificação do intervalo de referência por sexo, uma vez que as conclusões retiradas de alguns resultados analíticos podem ser incorrectamente aplicadas a homens e mulheres.

### **Idade**

Se relativamente ao sexo, os nossos resultados estão de acordo com a maioria dos estudos realizados na população geral, o mesmo não sucedeu com a idade. Na população geral verifica-se um aumento gradual de homocisteinemia basal com a idade,<sup>(32,35,39,40,67,68,71,76,105,106,133,190)</sup> No global, essa relação não foi encontrada no nosso estudo, nem noutros realizados na população transplantada.<sup>(217,219,220,251,271,273)</sup> Apenas Massy e colaboradores<sup>(202)</sup> encontraram uma correlação positiva e significativa entre a idade e a concentração plasmática de homocisteína, mas só no sexo masculino. No nosso estudo e como foi referido, não foi encontrada correlação quando foram considerados todos os participantes, mesmo depois dos valores terem sido estratificados por sexo. E quando dividimos as idades por quartis, verificámos uma correlação positiva significativa apenas no 2º quartil (dos 36 aos 43 anos).

Desconhece-se a razão da ausência de relação verificada na globalidade dos participantes e nenhuma hipótese foi sugerida pelos estudos anteriores. No entanto, é possível que no transplantado renal a importância da idade como determinante da homocisteína se dilua na presença de outros factores, nomeadamente com o comprometimento da função renal, tipo de terapêutica e elevado número de factores de risco para a aterosclerose que caracteriza esta população.

### **Função renal**

Relativamente à função renal, tanto a creatinina ( $r=0.55$ ) como a ureia ( $r=0.49$ ) séricas se associaram de forma positiva e significativa à concentração plasmática de homocisteína, à semelhança do que ocorreu noutros estudos.<sup>(218-220,222,251)</sup> A creatinina urinária foi a variável que obteve a correlação mais forte com a homocisteinemia basal ( $r=0.77$ ,  $p<0.001$ ), enquanto que noutros estudos isso ocorreu com a creatinina sérica, uma vez que a creatinina urinária não foi analisada.<sup>(219,220)</sup> Com a depuração da creatinina obtivemos, como seria de esperar, uma correlação inversa e significativa, o que está de acordo com os resultados obtidos noutros estudos e que reforça o papel determinante do grau da insuficiência renal na concentração de homocisteína.<sup>(96,196,202,210,211,217,218,220,222,251,265,276)</sup> Os nossos resultados ajustam-se à teoria de que o rim é responsável por grande parte do metabolismo da homocisteína e pela eliminação de uma elevada percentagem de homocisteína do plasma.<sup>(209,230)</sup> Obviamente que o metabolismo comprometido da homocisteína na insuficiência renal, mesmo que ligeira, pode contribuir para explicar a acumulação plasmática da homocisteína, tal como acontece com outros aminoácidos sulfurados.<sup>(218,236)</sup> No entanto, verificámos que neste e noutros estudos,<sup>(40,218,265)</sup> esta associação ocorre mesmo com valores de ureia e creatinina normais, estando também descrita na população sem patologia renal.<sup>(26,35,71,133,190,273)</sup> Por outro lado, a manutenção de alterações, mesmo que ligeiras, na função renal dos transplantados renais não pode ser o responsável total pela acumulação excessiva de homocisteína, uma vez que esta situação também ocorre noutros tipos de transplante, que geralmente não se associam a disfunção renal.<sup>(271,273)</sup> Ou seja, parece existir um mecanismo semelhante a alterar o metabolismo e a concentração plasmática de homocisteína nos diferentes tipos de transplantes. Perante este facto, a terapêutica imunossupressora tem sido apontada como uma das hipóteses etiológicas possíveis da hiperhomocisteinemia após o transplante.<sup>(222,251)</sup>

### **Terapêutica imunossupressora**

A utilização de fármacos imunossupressores que reduzem a taxa de filtração glomerular, como a ciclosporina e o tacrolimus, pode prenunciar a elevação dos valores plasmáticos da homocisteína, podendo constituir a causa da hiperhomocisteinemia dos vários tipos de transplante. A interferência da terapêutica imunossupressora no metabolismo extra-renal da homocisteína, nomeadamente a nível hepático, constitui outra possibilidade etiológica, uma vez que a metabolização dos fármacos imunossupressores é efectuada maioritariamente no fígado. A ciclosporina é um desses exemplos. Amadottir e colaboradores, num estudo realizado em 1996, ao verificarem que os transplantados renais medicados com ciclosporina apresentavam valores de homocisteína significativamente mais elevados e não tendo encontrado correlação entre o ácido fólico eritrocitário e a homocisteína, concluem que a ciclosporina interfere no metabolismo do ácido fólico e, conseqüentemente, no processo de remetilização da homocisteína.<sup>(217)</sup> Não foi, no entanto, encontrada correlação entre as concentrações de homocisteína e de ciclosporina e nem foram controlados outros factores, nomeadamente a função renal e fármacos utilizados. No nosso e noutros estudos<sup>(219-222,251,257,262)</sup> não foi encontrada qualquer tipo de relação entre a homocisteína e a dose ou concentração plasmática de ciclosporina, tanto por análise univariada como multivariável depois de controlar para os possíveis confundidores. Também não encontramos qualquer tipo de correlação entre a ciclosporina e o ácido fólico, sendo a vitamina B<sub>12</sub> a única vitamina que se correlacionou inversa e significativamente com a ciclosporina.

Na nossa amostra o número reduzido de transplantados sem ciclosporina (n=4) impediu a análise comparativa entre os grupos com e sem ciclosporina. No entanto Ducloux e colaboradores,<sup>(221,262)</sup> no que se refere às concentrações de homocisteína e de vitaminas, não encontraram diferenças significativas entre os dois grupos de transplantados renais (com e sem ciclosporina). Além disso, verificaram a correlação inversa e significativa entre a homocisteína e o ácido fólico tanto nos indivíduos medicados com ciclosporina, como nos indivíduos sem ciclosporina.<sup>(221,262)</sup> Face aos resultados apresentados por Ducloux, a hipótese de que, a ausência de correlação entre a homocisteína e o ácido fólico eritrocitário num grupo de transplantados renais com ciclosporina, possa indicar um defeito na remetilização induzido pela ciclosporina não parece provável. Por outro lado, a metabolização hepática da ciclosporina, por hidroxilação e N-demetilação, permite aumentar o número de radicais metilo disponíveis para a remetilização da homocisteína, de modo que se a ciclosporina interfere no metabolismo da homocisteína, é improvável que seja a nível da

remetilação.<sup>(277)</sup> Além disso, a principal conclusão do estudo de Arnadottir e colaboradores, ou seja, que a ciclosporina interfere no metabolismo da homocisteína, resulta da comparação de dois grupos de transplantados, com ciclosporina (n=67) e sem ciclosporina (n=17), apesar do reduzido número de indivíduos deste último grupo. Por outro lado, os dois grupos de transplantados considerados (com e sem ciclosporina) eram comparáveis relativamente à idade, sexo, taxa de filtração glomerular, ácido fólico eritrocitário e vitamina B<sub>12</sub>, no entanto não foram controlados outros factores que podem influir no metabolismo da homocisteína, nomeadamente a terapêutica com alguns fármacos, nomeadamente colchicina e alguns tipos de anti-hipertensores. Assim, é possível que a ciclosporina interfira no metabolismo do ácido fólico e da homocisteína, no entanto a base dessa teoria é, como referido, muito frágil e não foi demonstrada por nenhum outro estudo, pelos menos do nosso conhecimento.

Como a azatioprina reage com os grupos tiol da cisteína e da glutatona para libertar a 6-mercatopurina, pode colocar-se a hipótese deste fármaco ser responsável por alterações significativas no metabolismo hepático da cisteína e, conseqüentemente, da homocisteína, principalmente quando são utilizadas doses elevadas.<sup>(218)</sup> No entanto, isso não é muito plausível neste estudo, uma vez que a dose de azatioprina utilizada não se associou a alterações hepáticas significativas, conforme verificado pela normalidade dos resultados analíticos obtidos, tanto a nível das enzimas hepáticas como da bilirrubina total. A ausência de diferenças significativas entre os valores de homocisteína dos indivíduos com e sem azatioprina do nosso estudo, parece confirmar também esse facto. Por outro lado, não foi encontrada qualquer tipo de relação, tanto por análise univariada como multivariável, entre a concentração de homocisteína e a dose de azatioprina, o que está de acordo com outros estudos realizados.<sup>(202,222)</sup> Curiosamente, Woodside e colaboradores<sup>(251)</sup> encontraram uma correlação inversa e significativa entre a homocisteína e a dose de azatioprina, que é um resultado discutível, e que deve ser explorado num futuro estudo, face ao número reduzido de participantes do estudo medicados com azatioprina (n=16) e ao método de análise estatística utilizado para determinar essa relação (correlação de Pearson). No que se refere à corticoterapia, sabe-se que os glucocorticóides se associam a alguns efeitos metabólicos secundários, nomeadamente aumento do catabolismo proteico e alteração do metabolismo e concentração dos aminoácidos circulantes. Esta é uma hipótese possível e pode constituir uma explicação, pelo menos, parcial, da elevada prevalência de hiperhomocisteinemia verificada.<sup>(202,218,278)</sup> Efectivamente, verificámos que os transplantados medicados com prednisolona apresentaram

valores de homocisteína significativamente mais elevados (média geométrica igual a 15.2 versus 11.7  $\mu\text{mol/L}$ ) e, por análise univariada, o risco de ocorrência de hiperhomocisteinemia foi 4.18 vezes superior nestes indivíduos ( $p=0.041$ ). Não encontramos, no entanto, correlação entre a dose de prednisolona e os níveis séricos de homocisteína. A dose uniforme de 10 mg de prednisolona de 161 dos 187 transplantados com corticoterapia (86%), pode ter sido a razão da ausência de correlação, também verificada noutros estudos.<sup>(222,262)</sup> Massy e colaboradores<sup>(202)</sup> constataram uma correlação positiva e significativa entre a homocisteína e a dose de corticosteróides, no entanto a dose utilizada foi mais variável (0.25 mg/Kg/dia), o que parece confirmar a hipótese que referimos. Por outro lado, Wise e colaboradores demonstraram que a interferência da prednisolona, a nível dos ácido aminados, só ocorre com a alanina, uma vez que constitui o substracto primordial dos glucocorticóides.<sup>(279)</sup> No entanto, não podemos sonegar que este estudo foi realizado com o objectivo de avaliar a intervenção isolada de um fármaco, neste caso a prednisolona, no metabolismo dos ácidos aminados, não tendo sido analisada a sua actuação quando associado a outros fármacos imunossuppressores. Por outro lado, o estudo foi realizado em três grupos de participantes não transplantados (um primeiro grupo com 14 indivíduos saudáveis, um segundo grupo com cinco obesos e um terceiro com seis indivíduos com síndrome de Cushing), o que pode alterar significativamente os efeitos da terapêutica com glucocorticóides. Por outro lado, tal como Woodside e colaboradores,<sup>(251)</sup> encontramos uma correlação inversa e significativa entre a dose de prednisolona e as vitaminas B<sub>12</sub> e ácido fólico sérico e eritrocitário. É possível que esta correlação possa contribuir para a explicação dos valores mais elevados de homocisteína, verificados nos transplantados renais medicados com prednisolona.

No nosso estudo, e relativamente à terapêutica imunossupressora, apenas a dose de MMF se correlacionou negativa e significativamente à concentração de homocisteína. Acrescidamente, verificámos que os transplantados com MMF apresentaram valores de vitamina B<sub>12</sub> significativamente mais elevados. Desconhece-se a razão desse facto, uma vez que a interferência deste fármaco a nível do metabolismo da homocisteína, do ácido fólico e da vitamina B<sub>12</sub> não está descrita na literatura. É possível que os valores mais elevados de vitaminas B<sub>12</sub> expliquem, pelo menos em parte, a relação inversa entre a homocisteína e a dose de MMF verificada na nossa amostra. Não temos conhecimento de qualquer outra investigação que tenha analisado a associação entre este fármaco imunossupressor e a homocisteína, de modo que este resultado deverá ser futuramente explorado e investigado,

principalmente porque temos noção da limitação do nosso estudo em relação a esta variável, uma vez que apenas 25 transplantados renais se encontravam medicados com MMF.

### **Vitaminas**

Relativamente às vitaminas doseadas, a concentração de homocisteína correlacionou-se inversa e significativamente com o valor sérico de ácido fólico e de vitamina B<sub>12</sub> tal como ocorreu noutros estudos realizados na população geral<sup>(23,26,60,67,69,71,76,105,127,190)</sup> e transplantada<sup>(219,220,222,251,273)</sup>. O ácido fólico eritrocitário não foi doseado na maior parte dos estudos e, no que se refere à vitamina B<sub>6</sub>, as correlações são menos uniformes. Bostom e colaboradores, num estudo realizado em transplantados renais publicado este ano, encontraram uma correlação negativa e significativa entre a concentração de homocisteína em jejum e a vitamina B<sub>6</sub>,<sup>(220)</sup> tendo sido encontrados resultados similares na população geral.<sup>(23)</sup> No nosso estudo, não encontramos correlação significativa entre a homocisteinemia basal e a vitamina B<sub>6</sub>, tal como ocorreu noutros estudos efectuados com transplantados renais<sup>(219)</sup> e cardíacos<sup>(273)</sup> e na população geral.<sup>(67,190)</sup> Uma das hipóteses explicativas possíveis da ausência de correlação entre a homocisteinemia basal e a vitamina B<sub>6</sub> relaciona-se com a quantificação da vitamina B<sub>6</sub>, uma vez que a sua determinação quantitativa é sempre problemática, face à multiplicidade de formas desta vitamina na corrente sanguínea.<sup>(255)</sup> Por outro lado a hiperhomocisteinemia que caracteriza os transplantados renais pode ser causada por alterações a nível da remetilação e não da transsulfuração. Neste caso a ausência de correlação seria facilmente explicada, uma vez que a vitamina B<sub>6</sub> não actua a nível da remetilação, mas sim da transsulfuração, sendo, conseqüentemente, um determinante importante da homocisteinemia após sobrecarga com metionina e não da homocisteinemia basal.<sup>(116)</sup> De facto, a correlação negativa e significativa verifica-se, geralmente, entre a vitamina B<sub>6</sub> e a homocisteinemia após sobrecarga com metionina, uma vez que é na presença de excesso deste aminoácido que a via metabólica da transsulfuração é activada.<sup>(116)</sup>

Como a maioria dos estudos realizados com transplantados renais encontrou uma correlação inversa entre a homocisteinemia e as vitaminas B<sub>12</sub> e ácido fólico, a existência de défices vitamínicos na população transplantada foi sugerida como uma hipótese etiológica da hiperhomocisteinemia, uma vez que, na população geral, mais de 60% da concentração elevada de homocisteína se deve à deficiência em ácido fólico, coexistente ou não com o défice de vitamina B<sub>12</sub>, em resultado de carências

alimentares.<sup>(32,106,254,256)</sup> A existência eventual desses défices seria resultado da terapêutica com imunossuppressores ou com qualquer outro fármaco, capaz de interferir na absorção, metabolismo e excreção das vitaminas envolvidas no metabolismo da homocisteína, uma vez que é pouco provável que a ingestão alimentar vitamínica seja deficiente, dado que os transplantados renais podem fazer um tipo de alimentação normal, ou seja, sem as restrições características do período dialítico. Alguns estudos verificaram, efectivamente, a presença de deficiências de B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico nos transplantados renais.<sup>(219,220,254,255,273)</sup> Bostom e colaboradores detectaram a presença de défices de ácido fólico sérico e vitamina B<sub>6</sub>, atribuindo-lhes os valores aumentados de homocisteína (em jejum e após sobrecarga com metionina). É possível que uma alimentação escassa em frutos e outros vegetais contribua ou seja a causa principal dessas deficiências, uma vez que alguns desses estudos são realizados nos Estados Unidos, onde os hábitos alimentares são pouco saudáveis e antes da suplementação dos cereais com ácido fólico.<sup>(220,271)</sup>

No nosso estudo, apesar das correlações similares verificadas entre a homocisteína e as vitaminas não encontramos défices vitamínicos significativos. Apenas 2.2%, 1.5% e 6.6% apresentaram, respectivamente, valores de vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico eritrocitário mais baixos que o limite inferior do intervalo de referência considerado e nenhum dos participantes apresentou défice de ácido fólico sérico. Ou seja, mais de 90% da nossa amostra foi caracterizada por níveis vitamínicos dentro dos limites considerados normais para a população geral, o que está de acordo com os resultados apresentados por estudos realizados na população transplantada<sup>(217,218,220)</sup> e noutros tipos de populações.<sup>(48)</sup> Não temos dados relativamente à ingestão alimentar vitamínica destes indivíduos, no entanto, os nossos resultados ajustam-se ao facto dos transplantados não terem razões, do ponto de vista alimentar, para apresentarem défices vitamínicos, uma vez que, tal como referido, podem fazer uma alimentação equilibrada e diversificada, sem as restrições de frutos e vegetais verdes que caracterizam o período dialítico. Muito pelo contrário, o consumo destes alimentos é estimulado após o transplante renal, principalmente na Consulta de Nutrição do Serviço de Nefrologia, face à elevada prevalência de dislipidemia e obesidade que caracteriza esta população. Curiosamente, as concentrações médias de vitamina B<sub>12</sub> e de ácido fólico, sérico e eritrocitário, foram significativamente mais elevadas nos transplantados com acompanhamento regular na Consulta de Nutrição. Isso permite considerar a hipótese de intervenção na hiperhomocisteinemia, tanto a nível preventivo como terapêutico, através da modificação benéfica de alguns hábitos alimentares.



Apesar de, praticamente, não termos verificado deficiências vitamínicas na nossa amostra, constatámos, tal como referido, a correlação inversa e significativa entre a homocisteína e as vitaminas doseadas, exceptuando a vitamina B<sub>6</sub>. Por outro lado, depois de dividirmos as concentrações do ácido fólico (sérico e eritrocitário) e da vitamina B<sub>12</sub> por quartis, quando comparamos os valores de homocisteína entre o 1º e o 4º quartil de cada uma das vitaminas, verificamos que os valores de homocisteína são sempre significativamente mais elevados no 1º quartil, apesar da quase totalidade dos valores incluídos nesse quartil ser considerada "normal". Estes resultados estão de acordo com os de outros estudos.<sup>(31,71)</sup> Podemos, por isso, depreender que, mesmo normais, os valores mais baixos de vitaminas não permitem manter a concentração plasmática de homocisteína dentro dos intervalos de referência. Isso sugere que os valores de referência das referidas vitaminas são inadequados e insuficientes para o metabolismo da homocisteína, levantando a hipótese da eventual necessidade de rever esses intervalos de referência, pelo menos para populações deste tipo. O limite inferior do intervalo de referência das vitaminas, nomeadamente do ácido fólico, parece ser demasiado baixo. A Organização Mundial de Saúde aconselha que o limite inferior do intervalo de referência do ácido fólico sérico seja de 13.6 nmol/L.<sup>(130)</sup> No entanto, nos Estados Unidos esse valor é de 6.8 nmol/L,<sup>(26)</sup> enquanto que no nosso estudo o limite inferior do intervalo de referência foi de 2.6 ng/ml, o que corresponde a 5.9 nmol/L.

### **Outras terapêuticas**

Uma outra hipótese etiológica da hiperhomocisteinemia que caracteriza esta população prende-se com a utilização de outros fármacos, para além dos imunossuppressores, que possam interferir na absorção, metabolismo e excreção das vitaminas referidas, nomeadamente a colchicina, a cimetidina, os contraceptivos orais, a metildopa, o triamtereno, a colestiramina, entre outros.

Os indivíduos com gastrite e/ou úlcera gástrica podem apresentar défice de vitamina B<sub>12</sub> e, conseqüentemente, aumento dos valores plasmáticos da homocisteína. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas nos valores de homocisteína entre os indivíduos com e sem terapêutica com antiácidos e antiulcerosos. De igual forma não foi encontrada qualquer associação entre a homocisteína e a terapêutica com antigotosos. Não temos conhecimento de algum estudo que tenha efectuada esta análise.

O número de mulheres com contraceptivos orais era demasiado pequeno, pelo que não foi possível retirar conclusões relevantes da análise desta variável. Da mesma

forma, o reduzido número de mulheres com terapêutica hormonal de substituição não permitiu avaliar a influência desta variável na homocisteinemia.

Relativamente à terapêutica anti-hipertensora, os indivíduos medicados com antiadrenérgicos de acção central, diuréticos e  $\beta$ -bloqueadores apresentaram valores de homocisteinemia significativamente diferentes (mais elevados), tendo-se verificado, por análise univariada, a associação significativa entre a hiperhomocisteinemia e a utilização dos referidos fármacos (OR=3.56; OR=2.87; OR=2.18, respectivamente). Ou seja, os indivíduos medicados com diuréticos e  $\beta$ -bloqueadores têm mais do dobro do risco de apresentar valores de homocisteína superiores a 15  $\mu\text{mol/L}$ , enquanto que, o risco aumenta para mais do triplo na presença de terapêutica com antiadrenérgicos de acção central. A utilização de diuréticos e  $\beta$ -bloqueadores associa-se à elevação dos lípidos plasmáticos, desconhecendo-se o mecanismo.<sup>(280)</sup> É possível que ocorra uma reacção similar com a homocisteína. Taylor e colaboradores, num estudo realizado em indivíduos sintomáticos com doença vascular cerebral ou periférica, constataram também que os valores elevados de homocisteína se associaram à terapêutica com diuréticos, mas não com  $\beta$ -bloqueadores, IECA, bloqueadores  $\alpha$ -adrenérgicos e dos canais de cálcio.<sup>(39)</sup> Não temos conhecimento de outros estudos com este tipo de análise.

A terapêutica antilipidémica tem, como se sabe, efeitos benéficos no risco de doença cardiovascular, tanto na população em geral como na população transplantada.<sup>(13,281,282)</sup> No entanto, ao interferir no mecanismo e valores dos lípidos sanguíneos, a medicação hipolipidémica pode afectar outros factores de risco: a atorvastatina aumenta as concentrações de fibrinogénio, enquanto que o ácido nicotínico, a colestiramina e possivelmente o clofibrato aumentam as concentrações de homocisteína.<sup>(123)</sup> Num estudo realizado por Lorgeril e colaboradores, um grupo de indivíduos medicados com fenofibrato durante 3 meses revelaram um aumento substancial da metionina, cisteína e homocisteína. Num outro grupo sob terapêutica com simvastatina verificou-se apenas um aumento ligeiro na metionina, de modo que ao contrário de outros fármacos hipolipemiantes a simvastatina parece não interferir na homocisteína.<sup>(123)</sup> Este resultado foi confirmado pelo nosso estudo, uma vez que não encontramos associação entre a hiperhomocisteinemia e a simvastatina, o fármaco hipolipemiante mais utilizado nos participantes deste estudo.

**Factores de risco clássicos para a aterosclerose**

Na presença de outros factores de risco, nomeadamente HTA, diabetes mellitus e tabaco, a concentração elevada de homocisteína pode aumentar substancialmente o risco de aterosclerose.<sup>(23,76,283)</sup> É possível que a coexistência de outros factores de risco nos indivíduos com transplante renal possa implicar algum tipo de interacção, de tal modo que os valores aumentados de homocisteína sejam mais deletérios para uns do que para outros. No nosso estudo testou-se a hipótese dos principais factores de risco cardiovascular se associarem à hiperhomocisteinemia na população com transplante renal, o que iria certamente implicar orientações particulares na prevenção da aterosclerose. No entanto, a presença de hiperhomocisteinemia não se associou, quer por análise univariada quer multivariável, a qualquer outro factor de risco clássico para a aterosclerose, nomeadamente a dislipidemia (tanto hipertrigliceridemia como hipercolesterolemia), a obesidade, a diabetes e a HTA. Este facto está de acordo com outros estudos que parecem confirmar a teoria de que a hiperhomocisteinemia é um factor de risco independente para a doença vascular aterosclerótica.<sup>(31,32,39,46,71,75,76)</sup>

Quando consideramos os parâmetros lipídicos e o IMC como variáveis contínuas, também não encontramos correlação significativa entre a homocisteinemia e a concentração plasmática de colesterol total, triglicéridos, colesterol LDL e VLDL, apo B e Lp(a), nem com o IMC. Os estudos efectuados em indivíduos transplantados não fazem este tipo de análise, mas investigações realizadas na população saudável corroboram estes resultados.<sup>(39,40,63,69,190-192)</sup> De igual forma, e considerando a glicemia como variável contínua, verificámos a ausência de correlação com a homocisteína, depois de excluídos os indivíduos diabéticos.

A presença de diabetes mellitus também não se associou a maior proporção de hiperhomocisteinemia. Curiosamente, a comparação de médias de homocisteína entre diabéticos e não diabéticos permitiu constatar que os transplantados diabéticos apresentaram médias de homocisteína significativamente mais baixas, o que parece controverso, à primeira vista. No entanto, este resultado foi também verificado noutros estudos realizados em populações não transplantadas.<sup>(276)</sup> A taxa de filtração glomerular dos diabéticos pode variar entre a hiperfiltração e a hipofiltração que ocorre, por exemplo, na nefropatia diabética. Sendo a taxa de filtração glomerular um determinante importante na homocisteinemia, é possível que a hiperfiltração que caracteriza os diabéticos sem nefropatia, seja responsável pela diminuição dos valores de homocisteína. Ou seja, os valores mais baixos de homocisteína seriam resultado da hiperfiltração relativa, que aumentariam com o declínio da taxa de

filtração glomerular.<sup>(276)</sup> Isso foi confirmado por um estudo que constatou a elevação dos valores de homocisteína nos diabéticos, quando a nefropatia coexiste e se associa a mau controle metabólico.<sup>(284)</sup>

Relativamente à HTA, apesar de não termos verificado associação entre a hiperhomocisteinemia e a HTA, constatámos, tal como noutros estudos uma correlação positiva e significativa com a tensão arterial sistólica<sup>(34,38,40,63,71,191)</sup> e diastólica.<sup>(191,285)</sup> No entanto, convém salientar que, no transplante renal os resultados que envolvam a variável HTA devem ser sempre interpretados com precaução. O diagnóstico de HTA foi considerado de acordo com os valores limite de 140 mm Hg para a pressão arterial sistólica e 90 mm Hg para a pressão arterial diastólica, ou pelo facto do participante estar medicado com anti-hipertensores. No entanto, a presença de terapêutica anti-hipertensora no transplante renal pode não ser sinónimo de HTA. A terapêutica com IECA pode, por exemplo, ser utilizada com o objectivo de atrasar a progressão da rejeição crónica e os bloqueadores dos canais de cálcio podem usar-se com o intuito de reduzir as doses diárias de ciclosporina e/ou antagonizar sua acção na arteríola aferente.<sup>(280)</sup>

### ***Colesterol HDL***

À semelhança de estudos realizados na população geral,<sup>(35,40,285)</sup> verificámos uma correlação inversa e significativa entre a homocisteinemia basal e o colesterol HDL e a sua apolipoproteína major, a apo A. Ou seja, relativamente a este factor protector da aterosclerose, a diminuição dos seus valores acompanha-se de aumento da concentração de homocisteína no plasma. É possível que isso ocorra em consequência da acção de outros factores, nomeadamente de alguns tipos de terapêutica e determinados hábitos e estilos de vida, que induzem a diminuição das HDL e o aumento concomitante da homocisteína, sem que haja uma ligação directa entre estas duas partículas. Adicionalmente, constatámos a correlação positiva entre o colesterol HDL e as vitaminas B<sub>12</sub> e ácido fólico sérico. É possível que esta relação resulte de hábitos e estilos de vida mais saudáveis, nomeadamente de uma alimentação mais correcta.

### ***Factores de risco não convencionais para a aterosclerose***

No que se refere aos considerados "novos" ou não convencionais factores de risco da aterosclerose e aterotrombose, nomeadamente o fibrinogénio e o PAI-1, não verificámos qualquer tipo de correlação com a concentração de homocisteína. Da mesma forma, não foi encontrada associação entre a presença de

hiperhomocisteinemia e a concentração de fibrinogénio (dicotomizado em maior e menor 400 mg/dl) e o PAI-1 (dicotomizado em valores superiores e inferiores a 15 UI/L). O fibrinogénio é, na população geral, um factor de risco para a aterosclerose e têm sido encontrados níveis elevados de fibrinogénio nos insuficientes renais.<sup>(168)</sup> Nos transplantados renais foram encontrados valores igualmente elevados na presença de disfunção do enxerto<sup>(272)</sup> e nos transplantados sob terapêutica com ciclosporina, comparativamente aos medicados com prednisolona e azatioprina.<sup>(285)</sup> Como a homocisteína exerce um efeito procoagulante, nomeadamente por alterações na actividade do fibrinogénio e do PAI-1, foi nosso objectivo estudar a associação entre a homocisteína e alguns factores de coagulação e antifibrinolíticos e. Não foi, no entanto, obtida qualquer tipo de correlação ou de associação e, mais uma vez, não temos conhecimento de outros estudos realizados em transplantados renais onde esta análise tenha sido efectuada. Ubbink e colaboradores,<sup>(285)</sup> num estudo prospectivo realizado na população geral, também não encontraram qualquer correlação entre o fibrinogénio e a homocisteinemia basal, enquanto que Kristensen e colaboradores,<sup>(192)</sup> num estudo realizado em indivíduos jovens com acidente vascular cerebral, verificaram uma correlação positiva e significativa entre o fibrinogénio e a homocisteinemia após sobrecarga com metionina, mas não com a basal. Por outro lado, o incremento de homocisteína após sobrecarga com metionina associou-se significativamente à actividade aumentada do PAI-1, que também não se correlacionou com a homocisteinemia basal. Estes resultados parecem confirmar que a hiperhomocisteinemia, após sobrecarga com metionina, se associa a um estado de hipofibrinólise.<sup>(192)</sup> E é possível que essa associação não ocorra com a hiperhomocisteinemia basal, uma vez que as concentrações de homocisteína em jejum não atingem valores tão elevados quanto os atingidos após uma toma de metionina.<sup>(192)</sup>

Verhoef e colaboradores verificaram que a utilização de medicação antitrombótica diminui os valores de homocisteína.<sup>(287)</sup> Não verificámos isso no nosso estudo, uma vez que os valores de homocisteína não variaram significativamente entre os indivíduos com e sem a referida medicação, nem encontramos qualquer tipo de associação entre as duas variáveis. Isto também ocorreu no estudo realizado por Taylor e colaboradores.<sup>(39)</sup>

Relativamente à mutação genética G20210A da protrombina, responsável pelo aumento considerável dos níveis de protrombina, constatámos apenas a presença de um número muito reduzido de heterozigotos (n=6; 3.6%), não tendo sido encontrado nenhum homozigoto. O número diminuto de indivíduos positivos para a referida

mutação não permitiu efectuar uma análise aprofundada, no entanto, apesar dos heterozigóticos para a transição G20210A apresentarem valores de homocisteína mais elevados, a diferença de médias não foi significativa. Desconhecemos estudos efectuados na população transplantada relativamente a esta mutação.

### ***Outros factores de risco para a aterosclerose***

Os níveis elevados de ácido úrico têm sido considerados como factor de risco para a doença coronária.<sup>(191)</sup> A hiperuricemia é, além das alterações lipídicas, outro efeito secundário da terapêutica anti-hipertensora e imunossupressora, nomeadamente da ciclosporina.<sup>(272,288)</sup> À semelhança de estudos efectuados na população saudável,<sup>(190,191)</sup> verificámos uma correlação significativa e bastante forte entre a concentração de homocisteína e de ácido úrico. É possível que exista algum tipo de associação entre o metabolismo da homocisteína e do ácido úrico, desconhece-se, no entanto, qual.<sup>(191)</sup>

O valor elevado do hematócrito é considerado com um factor de risco para a doença cardio e cerebrovascular face à maior viscosidade sanguínea.<sup>(14,191)</sup> Malinow e colaboradores verificaram, na população geral, uma correlação positiva e significativa entre a homocisteinemia e o hematócrito.<sup>(191)</sup> Isso não ocorreu no nosso estudo, uma vez que, no global constatámos uma correlação negativa e significativa. Face ao resultado discrepante verificado no nosso estudo, estratificamos o valor de hematócrito em maior e menor ou igual que 40%. Não obtivemos correlação significativa com a concentração de homocisteína quando o hematócrito excedeu os 40%. No entanto, quando o valor de hematócrito foi igual ou inferior a 40%, constatámos: uma correlação inversa e significativa entre a concentração plasmática de homocisteína e o hematócrito e o número de eritrócitos; uma correlação positiva e significativa com o VGM. É possível que isso seja resultado da deterioração da função renal, uma vez que os indivíduos com um valor de hematócrito inferior a 40% apresentaram valores de creatinina significativamente superiores (resultados não apresentados). A concentração de ácido fólico significativamente mais baixa apresentada por estes indivíduos é também outra hipótese possível (resultados não apresentados).

### ***Hábitos e Estilos de vida***

Como foi anteriormente referido, alguns hábitos e estilos de vida, como o sedentarismo, o tabaco, o consumo de álcool e café associam-se a concentrações

mais elevadas de homocisteína e, conseqüentemente, a maior risco vascular. No que se refere ao sedentarismo e, apesar da dificuldade em avaliar e medir a actividade física de um indivíduo, constatámos que apenas 20 (9.9%) dos transplantados renais participantes no estudo confirmaram a prática regular de exercício físico, o que está de acordo com as características sedentárias desta população. No entanto, neste estudo, a prática de exercício físico não se associou a concentrações significativamente diferentes de homocisteína. Os resultados foram similares para os três outros factores, tabagismo, ingestão de álcool e de café, tal como ocorreu em alguns estudos realizados na população saudável.<sup>(46,190,191)</sup> É possível que mais uma vez a função renal dilua os efeitos destes factores na homocisteinemia.

Os nossos resultados confirmam a independência da hiperhomocisteinemia relativamente a outros factores de risco para a aterosclerose, sejam eles clássicos ou não. É possível que a presença concomitante de hiperhomocisteinemia e os outros factores de risco induza um efeito sinérgico para o desenvolvimento da aterosclerose e ocorrência de doença vascular, no entanto, não é possível retirar essa conclusão deste estudo.

### ***Albumina***

Uma vez que cerca de 70 a 80% da homocisteína plasmática total circula associada às proteínas, e maioritariamente à albumina, seria de esperar de uma correlação positiva e significativa entre a homocisteína e a albumina, o que não ocorreu. Curiosamente essa correlação foi conseguida com a pré-albumina e com o RBP. A ausência de correlação entre a homocisteinemia e a albumina foi também um resultado obtido por outros estudos realizados nos transplantados renais<sup>(219,222,271)</sup> e na população geral<sup>(190)</sup>. É possível que essa correlação ocorra unicamente com a homocisteína combinada e não com a homocisteína total.

### ***Antecedentes de doença vascular***

A presença de antecedentes de doença vascular após o transplante renal só ocorreu em 10 dos participantes da nossa amostra, o que sugere uma prevalência muito pequena de complicações cardiovasculares. Não podemos, no entanto, deixar de referir que este número está certamente subestimado, uma vez que inclui apenas os episódios vasculares sintomáticos, não considerando nem as complicações assintomáticas nem os casos fatais. Mesmo assim, os valores de homocisteína foram significativamente mais elevados nos transplantados renais com antecedentes de

doença vascular após o transplante renal como ocorreu noutros estudos,<sup>(26,217,202,221,262,273)</sup> apesar disso não se ter verificado quando as complicações vasculares ocorreram antes do transplante renal.

Dado o número reduzido de transplantados com antecedentes de doença vascular, não foi possível avaliar se a hiperhomocisteinemia constituiu, nesta população, um factor de risco para a ocorrência dessa patologia.

### ***Variáveis associadas ao transplante renal***

Procurámos também a associação entre a homocisteína e outros factores, potencialmente etiológicos da doença cardiovascular, e que influenciam o sucesso do transplante renal, nomeadamente a idade do dador e do receptor, tempo de isquemia fria, número de *match*, ocorrência de NTA e de rejeição.<sup>(289)</sup> Não encontramos qualquer tipo de correlação entre os valores de homocisteína e a idade do dador e do receptor, o tempo de isquemia fria e o número de *match*, o que está de acordo com um estudo realizado por Dimény e colaboradores.<sup>(263)</sup> No entanto, verificámos que parece haver uma tendência para a ocorrência de rejeição aguda após o transplante renal se associar a valores mais elevados de homocisteína ( $p=0.059$ ), sendo o risco de hiperhomocisteinemia significativamente superior ( $OR=2.26$ ), por análise univariada. A ocorrência de rejeição aguda pós transplante renal implica a utilização de terapêutica anti-rejeição, uma terapêutica imunossupressora mais agressiva, nomeadamente doses maiores de corticosteróides. Isso pode implicar maiores complicações a longo prazo, nomeadamente HTA e necessidade de terapêutica anti-hipertensora que, por sua vez, pode interferir na concentração de homocisteína.<sup>(290)</sup> Por outro lado, a recuperação da função renal após rejeição pode não ser total e o comprometimento renal pode implicar a longo prazo a acumulação plasmática de homocisteína. A correlação positiva e significativa encontrada entre a homocisteinemia e o número de dias de internamento pode ter um explicação similar. Verificámos a existência de uma correlação positiva e significativa entre os valores de homocisteína e o tempo de terapêutica dialítica, o mesmo acontecendo com o tempo de transplante, o que está conformidade com alguns autores<sup>(271)</sup> mas em discordância com outros.<sup>(202, 217)</sup>

Apesar do número limitado de estudos sobre a homocisteína e o transplante renal, os resultados apresentados são discutíveis e muito pouco uniformes. São muitas as razões a que se deve esta falta de uniformidade nos resultados, nomeadamente, amostras demasiado pequenas, diferentes formas de colheita e conservação das



amostras de sangue, variabilidade dos métodos utilizados no doseamento da homocisteína, intervalos de referência baseados na população geral, definição inconsistente do valor a partir do qual se considera a existência de hiperhomocisteinemia, definição inconstante ou desconhecida dos restantes factores de risco e dos episódios vasculares ocorrentes, estudos pouco rigorosos, mal desenhados e não ajustados para os possíveis confundidores, análise estatística pouco elaborada.

A análise estatística é sem dúvida um dos pontos em que muitos estudos apresentam falhas. A distribuição dos valores plasmáticos de homocisteína segue uma distribuição significativamente diferente da Normal. A assimetria é positiva e significativa não só da distribuição da homocisteína, mas também das vitaminas associadas e de um número considerável de outras variáveis, face ao tipo de população em estudo. Alguns estudos optam pela utilização de testes não paramétricos. No entanto, e como se sabe, estes testes têm menos eficiência/poder que os correspondentes testes paramétricos, desde que sejam cumpridos os pressupostos e requisitos subjacentes a uma correcta aplicação dos mesmos. Com base no teorema do limite central, muitos estudos utilizam os testes paramétricos, apesar da assimetria da distribuição.<sup>(291)</sup> Outra alternativa consiste na transformação dos valores das variáveis que se distribuem assimetricamente, o que permite obter uma distribuição que se aproxima da distribuição Normal, possibilitando uma correcta utilização dos testes paramétricos na análise dos dados. A forma mais comum de conseguir essa aproximação à Normal é a transformação logarítmica.<sup>(291)</sup>

Apesar da nossa amostra ter dimensões razoáveis ( $n=202$ ), razão suficiente para que muitos estudos assumam a distribuição dos valores das variáveis como distribuição Normal, procedemos à transformação logarítmica das variáveis cujos valores apresentaram uma distribuição assimétrica porque:

- a assimetria era significativa e inequívoca para algumas variáveis;<sup>(292)</sup>
- pretendíamos diminuir a influência dos valores extremos (*outliers*) nos resultados da análise, sem os excluir, uma vez que isso implicaria perda de informação;<sup>(292)</sup>
- tencionávamos utilizar métodos de análise multivariável cuja aplicação não está adaptada à não normalidade.<sup>(292)</sup>

Relativamente a este último ponto, a realização da análise multivariável era fundamental, uma vez que, a identificação dos factores preditores mais importantes da concentração plasmática de homocisteína, tendo em consideração a sua associação a outros factores, e o desenvolvimento de um modelo de prognóstico, para orientar futuras intervenções preventivas e terapêuticas, foram dois dos

objectivos do nosso estudo.

Quando são muitas as variáveis candidatas à entrada no modelo preditivo final, muitos investigadores utilizam os resultados da análise univariada para limitar os candidatos. Ou seja, na análise multivariável são consideradas unicamente as variáveis que obtiveram significância estatística na análise univariada. No entanto, como é possível que uma variável sem relação significativa na análise univariada possa influenciar, de forma significativa, a variável dependente numa análise multivariável, considerámos, neste estudo, como candidatas ao modelo de regressão todas as variáveis estudadas que nos pareceram relevantes nesta análise.<sup>(291)</sup> Por outro lado, como o nosso estudo pretendeu identificar os determinantes da homocisteinemia basal e da hiperhomocisteinemia, considerámos um valor de  $p$  inferior 0.05 como critério de inclusão das variáveis no modelo e não um valor mais baixo.<sup>(291)</sup>

No nosso estudo encontramos como determinantes independentes da homocisteinemia basal o ácido úrico sérico, os antecedentes de doença vascular após o transplante renal, a creatinina sérica, o sexo, a terapêutica com anti-adrenérgicos de acção central e o ácido fólico eritrocitário. Bostom e colaboradores verificaram que depois de ajustado para o uso de ciclosporina, a presença de clínica sugestiva de doença cardiovascular, o sexo, o peso corporal e os valores de albumina, foram preditores significativos da homocisteinemia basal a creatinina, a idade, o ácido fólico e a vitamina B<sub>12</sub>.<sup>(220)</sup> Convém, no entanto, salientar que este estudo não doseou o ácido fólico eritrocitário, que é considerado um indicador mais fidedigno das concentrações celulares metabolicamente activas do ácido fólico e das reservas de ácido fólico do organismo.<sup>(109,117,170,293)</sup> E como referimos anteriormente, a entrada no modelo do ácido fólico eritrocitário retirou, no nosso estudo, a adicional significância ao ácido fólico e à vitamina B<sub>12</sub>. Num outro estudo, Amadottir e colaboradores apresentaram um modelo de análise multivariável final em que incluíram a ácido fólico sérico, a albumina, a depuração da creatinina e a concentração plasmática de ciclosporina.<sup>(222)</sup> Testámos na nossa amostra um modelo com essas variáveis e verificámos que o ácido fólico foi a variável com maior poder explanatório, seguido da depuração de creatinina e da albumina, enquanto que a ciclosporina não foi incluída no modelo. Testámos depois duas variáveis que no nosso modelo final tiveram um poder explicativo significativo: o sexo e o ácido úrico. A variável sexo entrou no modelo e as três variáveis que já lá estavam permaneceram. No entanto, quando testámos a variável ácido úrico verificámos uma alteração total do modelo, ou seja, verificámos que o ácido úrico contribuía

significativamente para explicar os valores de homocisteinemia, tal como o ácido fólico eritrocitário e o sexo, enquanto que a albumina e a depuração da creatinina deixaram de ter influência adicional significativa. Födinger e colaboradores verificaram que, por regressão linear múltipla, o sexo, a idade, o IMC, a taxa de filtração glomerular, o genótipo MTHFR (TT), o valor sérico de ácido fólico e de vitamina B<sub>12</sub> contribuíam significativamente para explicar a variação da concentração plasmática de homocisteína. O tempo de transplante renal e a terapêutica com azatioprina foram também testados, no entanto, não foram preditores significativos pelo que não foram introduzidos no modelo final.<sup>(257)</sup> Não foram, no entanto, testadas outras variáveis, nomeadamente o ácido úrico, a terapêutica anti-hipertensora e a presença de antecedentes vasculares, que no nosso estudo foram preditores significativos. Massy e colaboradores verificaram que apenas a creatinina e a dose de corticosteróides contribuíram significativamente para a variação da homocisteinemia basal, enquanto que, num estudo realizado com transplantados cardíacos, Cole e colaboradores constataram que o tempo de transplante e os valores séricos de creatinina, ciclosporina e ácido fólico sérico foram as únicas variáveis que permaneceram no modelo de regressão múltipla final.<sup>(202,271)</sup> Desconhecem-se, no entanto, quais as restantes variáveis testadas tanto num como noutro estudo.

A construção de um modelo de regressão é relativamente simples e rápida se soubermos exactamente quais as variáveis a incluir. As dificuldades surgem quando pretendemos identificar as principais variáveis preditoras a partir de um conjunto grande de variáveis, das quais não sabemos quais incluir, quer por falta de informação, quer porque os resultados conseguidos, pelos escassos estudos disponíveis, não são uniformes. Neste caso, a construção de um modelo preditivo, adaptado à população, em estudo, torna-se morosa e menos fácil, uma vez que o modelo final vai depender muito das variáveis introduzidas. No nosso modelo final verificámos que o ácido úrico, a presença de antecedentes de doença vascular pós-transplante renal, a creatinina sérica, o sexo, a terapêutica com antiadrenérgicos da acção central e o ácido fólico eritrocitário contribuem de forma significativa para a variação da concentração de homocisteína. Neste modelo o ácido úrico foi o principal determinante dos valores de homocisteína e o ácido fólico eritrocitário foi o único preditor com coeficiente negativo, o que quer dizer que a concentração de homocisteína aumenta com a diminuição dos valores de ácido fólico eritrocitário.

Quando excluímos a creatinina e o ácido úrico do modelo, com o intuito de avaliar os principais preditores da concentração de homocisteína sem a função renal, verificámos que a vitamina B<sub>12</sub> passou a ser o principal determinante, relativamente

às restantes variáveis consideradas. Embora tenha havido influência de outras variáveis, nomeadamente da tensão arterial sistólica, ácido fólico eritrocitário, número de anti-hipertensores, colesterol HDL e sexo, a sua influência nos valores de homocisteína foi de menor magnitude. A tensão arterial sistólica, o número de anti-hipertensores e o sexo foram preditores independentes "positivos", enquanto a vitamina B<sub>12</sub>, o ácido fólico eritrocitário e o colesterol HDL foram preditores "negativos" significativos. Este modelo permitiu explicar apenas 25.7% da concentração de homocisteína, enquanto que o modelo anterior, com creatinina e ácido úrico, consegue explicar 46.7% da homocisteinemia basal.

Podemos concluir que o ácido úrico, a creatinina, os antecedentes vasculares após o transplante renal, a terapêutica com antiadrenérgicos de acção central, o sexo e a vitamina B<sub>12</sub> associam-se efectivamente à homocisteinemia basal.<sup>(291)</sup> Isso quer dizer que, por exemplo, um transplantado renal do sexo masculino, com valores aumentados de creatinina e de ácido úrico tem elevada probabilidade de vir a apresentar valores elevados de homocisteína, se já não for esse o caso. E essa probabilidade aumenta se o referido transplantado apresentar, concomitantemente, antecedentes de doença vascular e estiver medicado com antiadrenérgicos de acção central, mesmo sem dosear o ácido fólico eritrocitário, que neste caso se prevê estar baixo.

Com o objectivo de avaliar o papel de alguns factores na ocorrência de hiperhomocisteinemia, utilizamos um modelo de regressão logística e após terem sido testadas muitas variáveis, só a creatinina, o número de anti-hipertensores, o ácido fólico eritrocitário e a vitamina B<sub>12</sub> foram preditores significativos. Ou seja, apesar de não termos detectado défices vitamínicos significativos, o ácido fólico eritrocitário e a vitamina B<sub>12</sub> são variáveis predictoras importantes na ocorrência de hiperhomocisteinemia.

### **Limitações do estudo**

Não comparámos, no nosso estudo, os valores de homocisteína com os de uma amostra controlo sem patologia renal e procedente da população portuguesa. No entanto, já foi demonstrado em muitos outros estudos que a população com transplante renal apresenta concentrações de homocisteína significativamente superiores à população geral.<sup>(202,217,219,251,271,273)</sup>

Não conseguimos explicar as causas da hiperhomocisteinemia neste tipo de população, embora não tenha sido esse o objectivo deste estudo. A presença de défices vitamínicos sugerida por alguns autores não ocorreu na nossa amostra. Mais

de 90% da amostra estudada apresentou valores de vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico sérico e eritrocitário, dentro dos parâmetros considerados normais. No entanto, o que pode acontecer é que os intervalos de referência foram determinados de modo a evitar carências vitamínicas, mas podem não estar adaptados a evitar situações de hiperhomocisteinemia.

No nosso estudo não foi possível pesquisar a mutação no gene da enzima MTHFR. É possível que a elevada prevalência de hiperhomocisteinemia esteja relacionada com a existência da forma termolábil dessa enzima. Na presença desta enzima, com cerca de metade da actividade normal, o ácido fólico não é utilizado na remetilação, que está diminuída, verificando-se concomitantemente valores aumentados de homocisteína e ácido fólico. No entanto, isso não nos parece provável, uma vez que verificámos que os indivíduos com concentrações de ácido fólico mais elevadas apresentaram valores de homocisteína significativamente mais baixos. Por outro lado, mesmo que essa mutação ocorra, não nos parece que possa explicar a hiperhomocisteinemia que ocorreu em cerca de metade da nossa amostra.

Convém ainda referir que os valores normais de homocisteinemia basal não são sinónimo de metabolismo normal de homocisteína. Como referido, irregularidades no metabolismo da homocisteína podem coexistir com valores "normais" em jejum. O teste da sobrecarga da metionina permite denunciar algumas dessas irregularidades e realizar um diagnóstico mais correcto e fidedigno da hiperhomocisteinemia. Isso não foi possível no nosso estudo. Podemos, no entanto, especular que, se a realização desse teste tivesse sido possível, a percentagem de hiperhomocisteinemia teria, certamente, sido superior aos 48.7% encontrados nesta amostra.

Finalmente, reforçamos que todas as conclusões retiradas deste estudo se referem única e exclusivamente aos transplantados renais com características similares, ou seja, de acordo com os nossos critérios de inclusão. Ao constatarmos, por exemplo, que a hiperhomocisteinemia é frequente nos transplantados renais, não podemos deixar de referir que isso se reporta apenas aos indivíduos com tempo de transplante superior a seis meses. Assim sendo, não é possível assumir, a partir deste estudo, que a mesma situação ocorra nos primeiros seis meses após o transplante renal.

## **CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no nosso estudo podemos concluir que:

### ***Concentração plasmática de homocisteína***

- os valores de homocisteína tendem a diminuir à medida que as concentrações de vitamina B<sub>12</sub> e ácido fólico aumentam: os indivíduos cujas concentrações vitamínicas se incluem no 1º quartil caracterizaram-se por valores de homocisteína significativamente mais elevados que o 4º quartil
- as concentrações plasmáticas de homocisteína foram significativamente diferentes segundo o sexo, sendo superiores no sexo masculino (21%), possivelmente por razões não patológicas, o que permite sugerir a estratificação do intervalo de referência segundo o sexo;
- os diabéticos apresentaram valores de homocisteína basal significativamente mais baixos que os não diabéticos;
- a homocisteinemia foi significativamente diferente (mais elevada) nos indivíduos com hiperuricemia e com antecedentes de doença vascular e nos medicados com prednisolona, antiadrenérgicos de acção central e diuréticos;
- os participantes com rejeição aguda após o TR e os transplantados sob terapêutica com  $\beta$ -bloqueadores e com MMF apresentaram valores mais elevados de homocisteína, com um valor de *p* muito próximo da significância estatística;
- a homocisteinemia basal correlacionou-se negativa e significativamente, tal como na população geral, com as concentrações de vitamina de B<sub>12</sub> e de ácido fólico (sérico e eritrocitário);
- a correlação obtida entre os valores de homocisteína e a função renal, avaliada pela creatinina sérica e depuração da creatinina, foi negativa e significativa;
- a correlação entre a homocisteinemia e a concentração de ácido úrico é positiva, significativa e bastante forte;
- a homocisteinemia correlacionou-se negativa e significativamente com o colesterol HDL e com a sua apoproteína característica;
- a concentração plasmática de homocisteína aumenta com o número de dias de internamento após o transplante, com o tempo de TR e de diálise previamente efectuado, com a tensão arterial sistólica e diastólica e com o número de anti-hipertensores,

- o MMF foi o único imunossupressor que se correlacionou significativamente com os valores de homocisteína, sendo negativa a correlação obtida;
- a homocisteinemia, ao contrário da população geral, não se correlacionou positivamente com a idade;
- não foi encontrada correlação linear entre a homocisteína e a ciclosporina;
- o ácido úrico, os antecedentes de doença vascular, a creatinina sérica, o sexo e a terapêutica com antiadrenérgicos de acção central e o ácido fólico eritrocitário, foram as variáveis que contribuíram significativamente para explicar a variação da concentração plasmática de homocisteína, por análise multivariável;

### ***Vitaminas***

- não existem deficiências vitamínicas significativas nesta população: apenas 2.2%, 1.5% e 6.6% dos indivíduos apresentaram, respectivamente, valores de vitamina B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico eritrocitário mais baixos que os valores inferiores de referência;
- os indivíduos do sexo masculino, os fumadores e os que não tiveram acompanhamento regular na Consulta de Nutrição apresentaram concentrações vitamínicas mais baixas;
- os indivíduos medicados com  $\beta$ -bloqueadores caracterizaram-se por valores significativamente diferentes (mais baixos) de ácido fólico, comparativamente aos indivíduos sem esta terapêutica;
- os indivíduos sob terapêutica com MMF apresentaram concentrações plasmáticas significativamente mais elevadas de vitamina B<sub>12</sub>;

### ***Hiperhomocisteinemia***

- a percentagem de hiperhomocisteinemia atingiu 48.7% dos transplantados renais, sendo maioritariamente ligeira (96.9%);
- os indivíduos do sexo masculino, com hiperuricemia, com antecedentes de doença vascular aterosclerótica e de rejeição aguda após o transplante, apresentaram uma percentagem de hiperhomocisteinemia significativamente superior (análise univariada);
- a terapêutica com prednisolona, antiadrenérgicos de acção central,  $\beta$ -bloqueadores e diuréticos se associou significativamente à presença de hiperhomocisteinemia (análise univariada);



- não se verificou qualquer tipo de associação, quer por análise univariada quer multivariável, entre a hiperhomocisteinemia e os factores de risco para a aterosclerose considerados, nomeadamente HTA, diabetes mellitus, dislipidemia, obesidade, hábitos tabágicos, valores elevados de fibrinogénio, Lp(a) e PAI-1, mutação do gene G20210A positiva;
- a vitamina B<sub>12</sub>, o ácido fólico eritrocitário, a creatinina sérica e o número de anti-hipertensores foram factores preditivos significativamente importantes na ocorrência de hiperhomocisteinemia (análise multivariável).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

São muitos os estudos que demonstram a associação entre o risco de doença vascular aterosclerótica e as concentrações aumentadas de homocisteína. Embora esta associação seja forte, dose-dependente, biologicamente plausível e independente de outros factores de risco, nem todos os estudos são consistentes e permanece por demonstrar se a redução dos valores de homocisteína implicará uma diminuição do risco vascular. Actualmente, encontram-se a decorrer alguns estudos prospectivos, randomizados e de grandes dimensões, com o intuito de confirmar, ou não, essa hipótese. Se a relação causal entre a homocisteína e a aterosclerose for confirmada, ou se a associação for, pelo menos, parcialmente causal, o benefício de uma simples intervenção alimentar, como o aumento da ingestão de frutos e alguns vegetais verdes não cozinhados ou farmacológica, através da suplementação vitamínica, pode ter grande impacto na Saúde Pública.

Os transplantados renais constituem um grupo populacional responsável por uma grande fatia dos gastos da Saúde em Portugal, principalmente quando se associam a morbilidade cardiovascular. Mais de 40% da morbilidade e mortalidade dos transplantados renais resulta de complicações cardiovasculares, originadas pela aterosclerose. É, por isso, fundamental desenvolver estratégias de prevenção eficazes neste grupo de indivíduos, identificando e intervindo sobre os factores de risco exógenos, nomeadamente alguns estilos de vida, e endógenos, obviamente os controláveis e potencialmente reversíveis, de que é exemplo a hiperhomocisteinemia. A razão da identificação de mais este factor de risco para a aterosclerose, especificamente neste tipo de população, é a suposição de que a modificação desse factor possa implicar um benefício consistente na prevenção, na redução da sintomatologia e na progressão da doença vascular aterosclerótica.

Estudos realizados revelam que é possível reduzir o risco de morbilidade e mortalidade cardiovascular associado ao TR através da diminuição da frequência de alguns factores de risco. Alguns factores potencialmente reversíveis na população geral, como a dislipidemia e a HTA, são de intervenção e resolução mais difícil na população transplantada, nomeadamente devido à terapêutica imunossupressora. Existem, no entanto, outros factores potencialmente modificáveis e passíveis de prevenção. É sobre estes que é necessário e é possível intervir. E é neste grupo que se inclui a hiperhomocisteinemia.

No nosso estudo, apesar de não termos detectado défices vitamínicos significativos, os quartis mais baixos de ácido fólico e de vitamina B<sub>12</sub> associaram-se de forma significativa a valores mais elevados de homocisteína, independentemente da presença de outros factores de risco para a aterosclerose. Muitos estudos demonstraram que, mesmo na ausência de défices vitamínicos, as concentrações plasmáticas de homocisteína, tanto na população geral, como na população com TR, podem ser reduzidas através da administração de ácido fólico e outras vitaminas de inocuidade similar.<sup>(114,258)</sup> Como foi referido, a terapêutica com ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub> é segura, eficaz e pode prevenir a ocorrência de episódios cardiovasculares a um baixo custo e com poucos (se alguns) efeitos secundários. Desconhece-se se a normalização dos valores de homocisteína diminui a sintomatologia e a taxa da progressão da aterosclerose. Não há, ainda, resultados conclusivos dos estudos de intervenção em curso, indispensáveis para provar essa relação causal. No entanto, enquanto se esperam resultados conclusivos, e porque a população com transplante renal se caracteriza por um perfil de risco cardiovascular "pesado", porque não iniciar a suplementação vitamínica com ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub>, com fins preventivos e/ou terapêuticos, nestes indivíduos?

*"I've always felt that doctors today should be congratulated for the illnesses they prevent rather than for the ones they cure."*

Robert C. Atkins

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Last J.M.: Social and behavioral determinants of health. *In* Public Health and Human Ecology. Connecticut: Appleton & Lange. 1987.
2. Eikelboom J.W., Lonn E., Genest J., et al: Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med* 1999; 131: 363-375.
3. Wilson P.W.F., Culleton B.F.: Epidemiology of cardiovascular disease in the United States. *Am J Kid Dis* 1998; 32(Suppl 3):S56-S65.
4. Pongverin N.: Stroke in the developing world. *Lancet* 1998; 352: (Suppl III) 19-22.
5. Instituto Nacional de Estatística - Portugal Óbitos: Principais causas de morte (CID-9) em 1997.
6. Pahor M., Elam M.B., Garrison R.J., et al: Emerging noninvasive biochemical measure to predict cardiovascular risk. *Arch Intern Med* 1999; 159: 237-45.
7. Levey A., Eknoyan G.: Cardiovascular disease in chronic renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 828-833.
8. Harjai K.J.: Potential new cardiovascular risk factors: left ventricular hypertrophy, homocysteine, lipoprotein(a), triglycerides, oxidative stress and fibrinogen. *Ann Intern Med* 1999; 131: 376-386.
9. Grundy S.M., Pasternak R., Greenland P., et al: Assessment of cardiovascular risk by use of Multiple-Risk-Factor Assessment Equations - A statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation* 1999; 100: 1481-1492.
10. Goldman L., Cook F.: The decline in ischemic heart disease mortality rates - an analysis of the comparative effects of medical interventions and changes in lifestyle. *Ann Intern Med* 1984; 101: 825-836.
11. The Canadian Multicentre Transplant Study Group: A randomized clinical trial of cyclosporine in cadaveric renal transplantation.- Analysis at three years. *N Eng J Med* 1986; 314: 1219-25.
12. Lindholm A., Albrechtsen D., Frodin L., et al: Ischemic heart disease - major cause of death and graft loss after renal transplantation in Scandinavia. *Transplantation* 1995; 60: 451-457.
13. Kasiske B., Guijarro C., Massy Z., et al: Cardiovascular disease after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 158-165.
14. Kasiske B.L.: Risk factors for accelerated atherosclerosis in renal transplant recipients. *Am J Med* 1988; 84: 985-992.

15. Lobato L., Almeida A., Maximino J., et al: Causas de morte num programa de transplante renal. *Rev Port Nefrol Hipert* 1994;8: 113-121.
16. McCully K.S.: Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathology* 1969; 56: 111-128.
17. Larkin M.: Kilmer McCully: pioneer of the homocysteine theory. *Lancet* 1998; 352: 1364.
18. McCully K.: Reaction, resistance and acceptance of the homocysteine theory. *In* McCully K. ed. *The Homocysteine Revolution*. Connecticut: Keats Publishing, Inc; 1997: 106-135.
19. McCully K.S., Wilson R.B.: Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis* 1975; 22: 215-227.
20. McCully K.: Beyond cholesterol: the homocysteine theory of arteriosclerosis. *In* McCully K. ed. *The Homocysteine Revolution*. Connecticut: Keats Publishing, Inc; 1997: 57-105.
21. Epstein F.H., Welch G.N., Loscalzo J.: Homocysteine and atherothrombosis. *N Eng J Med* 1998; 338: 1042-1050.
22. Berwanger C.S., Jeremy J.Y., Stansby G.: Homocysteine and vascular disease. *Br J Surg* 1995; 82: 726-731.
23. Graham I.M., Daly L.E., Refsum H. M., et al: Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: The European Concerted Action project. *JAMA* 1997; 277: 1775-1781.
24. Nygard O., Nordrehaug J.E., Refsum H., et al: Plasma homocysteinemia levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Eng J Med* 1997; 337: 230-236.
25. Boushey C., Beresford S., Omenn G., et al: A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease – Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995; 274: 1049-1057.
26. Pancharutini N., Lewis C.A., Sauberlich H.E., et al: Plasma homocyst(e)ine, folate, and vitamin B<sub>12</sub> concentrations and risk for early-onset coronary artery disease. *Am J Clin Nutr* 1994; 59:940-8.
27. Palma Reis R., Azinheira J., Palma Reis H., et al: A homocisteinemia como factor de risco de doença cerebrovascular precoce. *Acta Médica Port* 1994; 7: 285-289.
28. Lindgren A., Brattstrom L., Norving B. et al: Plasma homocysteine in the acute and convalescent phases after stroke. *Stroke* 1995; 26: 796-800.

29. Spence J.D., Malinow M.R., Barnett P.A., et al: Plasma homocyst(e)ine concentration, but not MTHFR genotype, is associated with variation in carotid plaque area. *Stroke* 1999; 30: 969-973.
30. Hopkins P.N., Wu L.L., Wu J., et al: Higher plasma homocyst(e)ine and increased susceptibility to adverse effects of low folate in early familial coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1314-1320.
31. Dalery K., Lussier-Cacan S., Selhub J., et al: Homocysteine is and coronary artery disease in French Canadian subjects: relation with vitamins B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub>, pyridoxal phosphate, and folate. *Am J Cardiol* 1995; 75: 1107-1111.
32. Robinson K., Mayer E.L., Miller D.P., et al: Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate - Common and independent reversible risk factors for coronary heart disease. *Circulation* 1995; 92: 2825-2830.
33. Robinson K., Gupta A., Dennis V., et al: Hyperhomocysteinemia confers and independent increased risk of atherosclerosis in end-stage renal disease and is closely linked to plasma folate and pyridoxine concentrations. *Circulation* 1996; 94: 2743-2748.
34. Malinow M.R., Ducimetiere P., Luc G., et al: Plasma homocyst(e)ine levels and graded risk for myocardial infarction: findings in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1997; 126: 27-34.
35. Glueck C.J., Shaw P., Lang J.E., et al: Evidence that homocysteine is an independent risk factor for atherosclerosis in hyperlipidemic patients. *Am J Cardiol* 1995; 75: 132-136.
36. Stampfer M.J., Malinow M.R., Willett W.C.: A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardium infarction in US Physicians. *JAMA* 1992; 268: 877-881.
37. Perry I.J., Refsum H., Morris R.W. et al: Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet* 1995; 346: 1395-8.
38. Arnesen E., Refsum H., Bonna K., et al: Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 1995; 24: 704-709.
39. Taylor L.M., DeFrang R.D., Harris E.J., et al: The association of elevated plasma homocyst(e)ine with progression of symptomatic peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 1991; 13: 128-36.
40. Bostom A.G., Silbershatz H., Rosenberg I.H., et al: Nonfasting plasma total homocysteine levels and all-cause and cardiovascular disease mortality in elderly Framingham men and women. *Arch Intern Med* 1999; 159: 1077-1080.

41. Wald N. J., Watt H.C., Law M.R., et al: Homocysteine and ischemic heart disease: Results of a prospective study with implications regarding prevention. *Arch Intern Med* 1998; 158: 862-867.
42. Bostom A.G., Rosenberg I.H., Silbershatz H., et al: Nonfasting plasma total homocysteine levels and stroke incidence in elderly persons: The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1999; 131: 352-355.
43. Kark J.D., Selhub J., Adler B., et al: Nonfasting plasma total homocysteine level and mortality in middle-aged and elderly men and women in Jerusalem. *Ann Intern Med* 1999; 131: 321-330.
44. Petri M., Roubenoff R., Dallal G.E.: Plasma homocysteine as a risk factor for atherothrombotic events in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1996; 348:1120-24.
45. Hankey G.J., Eikelboom J.W.: Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999; 354: 407-413.
46. Clarke R., Daly L., Robinson K., et al: Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Eng J Med* 1991; 324: 1149-1155.
47. Palma Reis R., Azinheira J., Palma Reis H., et al: A homocisteinemia como factor de risco de doença vascular cerebral: A importância da idade e dos níveis de homocisteinemia. *Acta Médica Port* 1996; 9: 15-20.
48. Palma Reis R., Azinheira J., Palma Reis H., et al: Influência dos níveis de vitaminas B6, B12 e ácido fólico nos valores de homocisteinemia basal e após sobrecarga com metionina. *Rev Port Cardiol* 1998; 17(1): 57-61.
49. Palma Reis R., Azinheira J., Palma Reis H., et al: Homocisteinemia como factor de risco de doença vascular - Que doentes intervencionar? *Rev Port Cardiol* 1998; 17(1): 63-66.
50. Ray J.G.: Meta-analysis of homocysteinemia as a risk factor for venous thromboembolic disease. *Arch Intern Med* 1998; 158: 2101-2106.
51. Ridker P.M., Hennekens C.H., Selhub J., et al: Interrelation of hyperhomocyst(e)inemia, factor V Leiden and risk of future venous thromboembolism. *Circulation* 1997; 95: 1777-1782.
52. Den Heijer M., Koster T., Blom H.J., et al: Hyperhomocysteinemia as risk factor for deep-vein thrombosis. *N Eng J Med* 1996; 334: 759-62.
53. Den Heijer M., Brouwer I.A., Bos G.M.J., et al: Vitamin supplementation reduces blood homocysteine levels - A controlled trial in patients with venous thrombosis and healthy volunteers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 356-361.



54. Den Heijer M., Rosendaal F.R., Blom H.J., et al: Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 1998; 80: 874-7.
55. Donnelly J., Rock G.: Genetic determinants of heritable venous thrombosis: genotyping methods for Factor V Leiden A1691G, methylenetetrahydrofolate reductase C677T, prothrombin G20210A mutation, and algorithms for venous thrombosis investigations. *Clin Biochem* 1999; 32: 223-228.
56. Fermo I., D'Angelo S V, Paroni R., et al: Prevalence of moderate hyperhomocysteinemia in patients with early-onset and arterial occlusive disease. *Ann Intern Med* 1995; 123: 747-753.
57. Provan D., O'Shaughnessy D.F.: Recent advances in haematology. *BMJ* 1999; 318: 991-994.
58. Bots M.L., Launer L.J., Linderman J., et al: Homocysteine and short-term risk of myocardial infarction and stroke in the elderly - The Rotterdam Study. *Arch Intern Med* 1999; 159: 38-44
59. Stehouwer C., Gall M-A., Hougaard P., et al: Plasma homocysteine concentration predicts mortality in non-insulin-dependent diabetic patients with and without albuminuria. *Kidney Int* 1999; 55: 308-314.
60. Chasan-Taber L., Selhub J., Rosenberg I.H.: A prospective study of folate and vitamin B<sub>6</sub> and risk of myocardial infarction in US physicians. *J Am Coll Nutr* 1996; 15: 136-143
61. Verhoef P., Hennekens C.H., Malinow M.R., et al: A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of ischemic stroke. *Stroke* 1994; 25: 1924-1930.
62. Verhoef P., Hennekens C., Allen R., et al: Plasma total homocysteine and risk of angina pectoris with subsequent coronary artery bypass surgery. *Am J Cardiol* 1997; 79(6): 799-801.
63. 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* 1994; 106(1): 9-19.
64. Evans R.W., Shaten J., Hempel J.D., et al: Homocyst(e)ine and risk of cardiovascular disease in the multiple risk factor intervention trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1947-1953.
65. Folsom A.R., Nieto F.J., McGovern P.G., et al: Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms and B vitamins - The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* 1998; 98(3): 204-210.

66. Sehlab J., Jacques P.F., Bostom A.G., et al: Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Eng J Med* 1995; 332: 286-91.
67. Osganian S.K., Stampfer M.J, Spiegelman D., et al: Distribution of and factors associated with serum homocysteine levels in children: Child and Adolescent Trial for Cardiovascular Health. *JAMA* 1999; 281: 1189-1196.
68. Jacques P.F., Rosenberg I.H., Rogers G., et al: Serum total homocysteine concentrations in adolescent and adult Americans: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 482-9.
69. De Laet C., Wautrecht J.C., Brasseur D., et al: Plasma homocysteine concentrations in a Belgian school-age population. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 968-72.
70. Lilien M.R., Duran M., Poll-The B., et al: Hyperhomocysteinemia in children with chronic renal failure. *Abstracts book of EDTA 1998*;151.
71. Brattstrom L., Lindgren A., Israelsson B., et al: Homocysteine and cysteine: determinants of plasma levels in middle-aged and elderly subjects. *J Intern Med* 1994; 236: 633-641.
72. Fabbender K., Mielke O., Bertsch T., et al: Homocysteine in cerebral macroangiography and microangiopathy. *Lancet* 1999; 353: 1586-1587.
73. Sacco R., Roberts J.K., Jacobs B.S.: Homocysteine as a risk factor for ischemic stroke: an epidemiological story in evolution. *Neuroepidemiology* 1998; 17: 167-173.
74. Kittner S.J., Giles W.H., Macko R.F., et al: Homocyst(e)ine and risk of cerebral infarction in a biracial population - The stroke prevention in young women study. *Stroke* 1999; 30: 1554-60.
75. Malinow M.R., Kang S.S., Taylor L.M., et al: Prevalence of hiperhomocyst(e)inemia in patients with peripheral artery occlusive disease. *Circulation* 1989; 79: 1180-1188.
76. Nygard O., Vollset. S.E., Refsum H., et al: Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile – The Hordaland homocysteine study. *JAMA* 1995; 274: 1526-1533.
77. Still R.A., McDowell I.F.W.: Clinical implications of plasma homocysteine measurement in cardiovascular disease. *J Clin Pathol* 1998; 51: 183-188.

78. McKeever M.P., Weir D.G., Molloy A. et al: Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat. *Clin Science* 1991; 81: 551-556.
79. Tamura T., Bergman S.M., Morgan S.L.: Homocysteine, B vitamins and vascular-access thrombosis in patients treated with hemodialysis. *Am J Kid Dis* 1998; 32: 475-481.
80. Kang S.S., Wong P.W., Malinow R.F., et al: Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Ann Rev Nutr* 1992; 12: 279-98.
81. Ueland P.M., Refsum H., Stabler S., et al: Total homocysteine in plasma or serum methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993; 39: 1764-1779.
82. Stein J.H., McBride P.E.: Hyperhomocysteinemia and atherosclerotic vascular disease: Pathophysiology, screening and treatment. *Arch Intern Med* 1998; 158: 1301-1306.
83. Malinow M.R., Bostom A.G., Krauss R.M.: Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases: a statement for healthcare professionals. *Circulation* 1999; 99: 178-182.
84. Cattaneo M.: Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 81: 165-76.
85. Welch G.N., Upchurch G., Loscalzo J.: Hyperhomocyst(e)ine and atherothrombosis. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 811: 48-58.
86. Omenn G.S., Beresford S.A.A., Motulsky A.G., et al: Preventing coronary heart disease: B vitamins and homocysteine (editorial). *Circulation* 1998; 97: 421-424.
87. Malinow M.R., Nieto F.J., Szklo M., et al: Carotid artery intimal-medial wall thickening and plasma homocyst(e)ine on asymptomatic adults - The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation* 1993; 87: 1107-1113.
88. Winder A.F.: Homocysteine and cardiovascular disease. *J Clin Pathol* 1998; 51: 713.
89. Ueland M.: Homocysteine species as components of plasma thiol status. *Clin Chem* 1995; 41: 340-342.
90. Frantzen F., Faaren A.L., Alfheim I., et al: Enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum. *Clin Chem* 1998; 44: 311-316.
91. Refsum H., Ueland P.M., Svardal A.M.: Fully automated fluorescence assay for determining total homocysteine in plasma. *Clin Chem* 1989; 35: 1921-1927.

92. Malinow M.R.: Homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases. *J Intern Med* 1994; 236: 603-617.
93. Guttormsen A.B., Schneede J., Fiskerstrand T., et al: Plasma concentrations of homocysteine and other aminothiol compounds are related to food intake in healthy human subjects. *J Nutr* 1994; 124: 1934-41.
94. Gallagher P.M., Raymond M., Shields D., et al: Homocysteine and risk of premature coronary heart disease - Evidence for a common gene mutation. *Circulation* 1996; 94: 2154-2158.
95. Hanratty C.G., McAuley D.F., McGurk C., Young I.S.: Homocysteine and endothelial vascular function. *Lancet* 1998; 351: 1288-1289.
96. Chauveau P., Chadeaux B., Coudé M., et al: Hyperhomocysteinemia, a risk factor for atherosclerosis in chronic uremic patients. *Kidney Int* 1993; 43 (Supp.41): S72-S77.
97. Carey M.C., Donovan D.E., FitzGerald O., et al: Homocystinuria. I. A clinical and pathological study of nine subjects in six families. *Am J Med* 1968; 45: 7-25.
98. Mudd S.H., Skovby F., Levy H.L., et al: The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-sintetase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 1-31.
99. Kluijtmans L., Boers G., Stevens E., et al: Defective cystathionine beta-sintetase regulation by S-adenosylmethionine in a partially pyridoxine responsive homocystinuria patient. *J Clin Invest* 1996; 98: 285-289.
100. Assanelli D., Ferrari R., Bollani G., et al: Factor V G1691A, apo E4 allele, hyperhomocysteinemia and MTHFR C677T in a young patient with myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1196.
101. Guttormsen A.B., Ueland P.M., Nesthus I., et al: Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia ( $\geq 40 \mu\text{mol/L}$ ): The Hordaland Homocysteine Study. *J Clin Invest* 1996; 98: 2174-2183.
102. Jacques P.F., Bostom A.G., Williams R.R., et al: Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 96: 7-9.
103. Eskes T., et al: Open or closed? A world of difference: a history of homocysteine research. *Nutr Rev* 1998; 56(8): 236-244.
104. Stampfer M.J., Malinow M.R.: Can lowering homocysteine levels reduce cardiovascular risk? *N Eng J Med* 1995; 332: 328-329.

105. Selhub J., Jacques P.F., Wilson P.W., et al: Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteine in an elderly population. *JAMA* 1993; 270: 2693-8.
106. Selhub J., Jacques P.F., Rosenberg I.H., et al: Serum total homocysteine concentrations in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1991-1994): population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentrations. *Ann Intern Med* 1999; 131: 331-339.
107. Neufeld E.J.: Update on genetic risk factors for thrombosis and atherosclerotic vascular disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12: 1193-1209.
108. Morrison H. I., Schaubel D., Desmeules M., et al: Serum folate and risk of fatal coronary heart disease. *JAMA* 1996; 275: 1823-1896.
109. Jacob R.A.: Individual variability in homocysteine response to folate depletion: an unusual case. *Nutr Rev* 1998; 56(7): 212-217.
110. Nygard O., Refsum H., Ueland P.M., et al: Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: the Horland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 263-270.
111. Robinson K., Arheart K., Refsum H., et al: Low circulating folate and vitamin B6 concentrations - Risk factors for stroke, peripheral disease and coronary artery disease. *Circulation* 1998; 97: 437-443.
112. Mohan I.V., Stansby G.: Nutritional hyperhomocysteinemia. *BMJ* 1999; 318: 1569-70.
113. Rimm E.B., Willet W.C., Hu F.B., et al: Folate and vitamin B<sub>6</sub> from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *JAMA* 1998; 279: 359-364.
114. Bostom A., Gohn R., Beaulieu A.J., et al: Treatment of hyperhomocysteinemia in renal transplant recipients: a randomized, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1997; 127: 1089-1092.
115. Ubbink J.B., van der Merwe A., Delport R., et al: The effect of a subnormal vitamin B<sub>6</sub> status on homocysteine metabolism. *J Clin Invest* 1996; 98: 177-184.
116. Miller J.W., Ribaya-Mercado J.D., Russell R.M., et al: Effect of vitamin B<sub>6</sub> deficiency on fasting plasma homocysteine concentrations. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 1154-60.
117. Tamura T., Johnston K.E., Bergman S.M.: Homocysteine and folate concentrations in blood from patients treated with hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 2414-2418.

118. Massy Z.A.: Hiperhomocyst(e)inaemia in renal failure - What are the implications? *Nephrol Dial Transplant* 1996 Dec; 11(12): 2392-3.
119. Hussein W.I., Green R., Jacobsen D.W., et al: Normalization of hyperhomocysteinemia with L-thyroxine in hypothyroidism. *Ann Intern Med* 1999; 131: 348-351.
120. Savage D.G., Lindenbaum J., Stabler S.P., et al: Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *Am J Med* 1994; 96: 239-246.
121. Thomson C.A., Rollins C.J.: Nutrient-Drug Interactions. *In* Rombeau J.L., Rolandelli R.H. eds. *Enteral and Tube Feeding*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1997: 523-539.
122. Hirschberg R.: Drug-nutrient interactions in renal failure. *In* Kopple J.D., Massry S.G. eds: *Nutritional Management of Renal Disease*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997: 799-815.
123. Lorgier M., Salen P., Paillard F., et al: Lipid-lowering drugs and homocysteine. *Lancet* 1999; 353: 209-210.
124. Knapp H.R.: Nutrient-Drug Interactions. *In* Ziegler E.E., Filer L.J. eds. *Present Knowledge in Nutrition*. 7th ed. Washington, DC: ILSI Press; 1996: 540-546.
125. Hipólito-Reis C.: *Ácido fólico: uma vitamina a reconsiderar*. Porto: Edição dos Laboratórios Bial; 1998.
126. Gerhard G.T., Malinow M., R., DeLoughery T.G., et al: Higher total homocysteine concentrations and lower folate concentrations in premenopausal black women than in premenopausal white women. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 252-60.
127. Andersson A., Brattstrom L., Israelsson B., et al: Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender and menopausal status. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 79-87.
128. Palma Reis R., Azinheira J., Palma Reis H., et al: Influência do sexo e da menopausa nos níveis de homocisteinemia basal e após sobrecarga com metionina. *Rev Port Cardiol* 1999; 18(2): 155-159.
129. Blom H.J.: Determinants of plasma homocysteine - editorial. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 188-189.
130. Nygard O., Refsum H., Ueland P.M., et al: Coffee consumption and plasma total homocysteine: The Horland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 136-43.

131. Herbert V., Das K.C.: Folic acid and vitamin B<sub>12</sub>: *In* Shills M.E., Olson J.A., Shike M. eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 8th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1994:402-425.
132. Cravo M.L., Glória L.M., Selhub J., et al.: Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B<sub>12</sub>, and vitamin B<sub>6</sub> status. *Am J Clin Nutr* 1996; 65: 136-43.
133. Stolzenberg-Solomon R.Z., Miller III E.R., Maguire M.G., et al: Association of dietary protein intake and coffee consumption with serum homocysteine concentrations in an older population. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 467-75.
134. Finkelstein J.D., Martin J.J.: Methionine metabolism in mammals: adaptation to excess. *J Biol Chem* 1986; 261: 1582-7.
135. Finkelstein J.D.: Methionine-sparing effect of cystine in human subjects. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 224-5.
136. Makoff R., Dwyer J., Rocco M.: Folic acid, pyridoxine, cobalamin and homocysteine and their relationship to cardiovascular disease in end-stage renal disease. *J Renal Nutrition* 1996; 6: 2-11.
137. Brouwer I., van Dusseldorp M., Thomas C., et al: Low-dose folic acid supplementation decreases plasma homocysteine concentrations: a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 99-104.
138. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration: Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *BMJ* 1998; 316: 894-898.
139. Peterson J.C., Spence J.D.: Vitamins and progression of atherosclerosis in hyperhomocyst(e)inaemia. *Lancet* 1998; 351: 263.
140. Lobo A., Naso A., Arheart K., et al: Reduction of homocysteine levels in coronary artery disease by low-dose folic acid combined with vitamin B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub>. *Am J Cardiol* 1999; 83: 821-825.
141. Woodside J.V., Yarnell J.W.G., McMaster D., et al: Effect of B-group vitamins and antioxidant vitamins on hyperhomocysteinemia: a double-blind, randomized, factorial-design, controlled trial. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 858-66.
142. Wilcken D., Dudman N., Tyrrel P., et al: Folic acid lowers elevated plasma homocysteine in chronic renal insufficiency: possible implications for prevention of vascular disease. *Metabolism* 1988; 37(7): 697-701.
143. Bostom A.G., Shemin D., Lapane K.L., et al: High dose B-vitamin treatment of hyperhomocysteinemia in dialysis patients. *Kidney Int* 1996; 49: 147-152.

144. Malinow M.R., Duell P.B., Hess D.L., et al: Reduction of plasma homocysteine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary heart disease. *N Eng J Med* 1998; 338: 1009-1017.
145. Oakley G.P.: Eat right and take a multivitamin. *N Eng J Med* 1998; 338: 1060-1061.
146. Selhub J., Rosenberg I.H.: Folic Acid. *In* Ziegler E.E., Filer L.J., Jr. eds. *Present Knowledge in Nutrition*. 7th ed. Washington DC: ILSI Press; 1996: 206-219.
147. Glade M.J.: Workshop on folate, B<sub>12</sub> and choline. *Nutrition* 1999; 15: 92-96.
148. Herbert V.: Vitamin B<sub>12</sub>. *In* Ziegler E.E., Filer L.J., Jr. eds. *Present Knowledge in Nutrition*. 7th ed. Washington DC: ILSI Press; 1996: 191-205.
149. Leklem J.E.: Vitamin B<sub>6</sub>. *In* Ziegler E.E., Filer L.J., Jr. eds. *Present Knowledge in Nutrition*. 7th ed. Washington DC: ILSI Press; 1996: 174-183.
150. Collier J.: Vitamin B<sub>6</sub>: food or medicine? *BMJ* 1996; 317: 92-3.
151. Canty D.: Determinants of plasma homocysteine - letter. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 919-21.
152. Perna A., Inghrosso D., Castaldo P., et al: Homocysteine, a new crucial element in the pathogenesis of uremic cardiovascular complications. *Miner Electrolyte Metab* 1999; 25:95-99.
153. Jacques P.F., Selhub J., Bostom A.G., et al: The effect of folic acid and fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Eng J Med* 1999; 340: 1449-54.
154. Lewis C.J., Crane N.T., Wilson D.B., et al: Estimated folate intakes: data updated to reflect food fortification, increased bioavailability, and dietary supplement use. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 198-207.
155. National Research Council: *Recommended Dietary Allowances*. 10<sup>th</sup> ed. Washington, DC: National Academy Press; 1989.
156. McCully K.S.: Homocysteine, folate, vitamin B<sub>6</sub> and cardiovascular disease. *JAMA* 1998; 279: 392-393.
157. Roos R.: Homocysteine and heart disease: a culprit, or just a suspect? *Phys Sports Med* 1999; 27: 13-16.
158. Pérez-Escamilla R.: Plasma Homocyst(e)ine levels and folic acid supplementation (letters). *N Eng J Med* 1998; 339: 475-6.
159. Grunwald H.W., Rosner F.: Plasma Homocyst(e)ine levels and folic acid supplementation (letters). *N Eng J Med* 1998; 339: 476.



160. Bostom A.G., Selhub J.: Homocysteine and Arteriosclerosis - Subclinical and clinical disease associations. *Circulation* 1999; 99: 2361-2363.
161. Appel L.J.: Folic acid fortification of food (letters). *JAMA* 1996; 275: 681-2.
162. Stampfer M.J., Rimm E.B.: Folate and cardiovascular disease - Why we need a trial now. *JAMA* 1996; 275: 1929-30.
163. Verhaar M.C., Wever R., Kastelein J., et al: Effects of oral folic acid supplementation on endothelial function in familial hypercholesterolemia - a randomized placebo-controlled trial. *Circulation* 1999; 100: 335-338.
164. Ross R.: The pathogenesis of atherosclerosis - an update. *N Eng J Med* 1986; 314: 488-500.
165. Ross R.: Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Eng J Med* 1999; 340: 115-126.
166. Nappo F., De Rosa N., Marfella R., et al: Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. *JAMA* 1999; 281: 2113-2118.
167. Oparil S., Oberman A.: Nontraditional cardiovascular risk factors. *Am J Med Sci* 1999; 317(3): 193-207.
168. Kronenberg F.: Homocysteine, lipoprotein(a) and fibrinogen: metabolic risk factors for cardiovascular complications of chronic renal disease. *Curr Opin Nephrol Hyertens* 1998; 7; 271-278.
169. Ballantyne C.M.: Current thinking in lipid lowering. *Am J Med* 1998; 104(6A): 33S-41S.
170. Ridker P.M.: Evaluating novel cardiovascular risk factors: can we better predict heart attacks? *Ann Intern Med* 1999; 130: 933-937.
171. Bachmann J., Tepel M., Raidt H., et al: Hyperhomocysteinemia and the risk for vascular disease in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6: 121-125
172. Hulberg B., Andersson A., Arnadottir M., et al: Reduced, free and total fractions of homocysteine and other thiol compounds in plasma from patients with renal failure. *Nephron* 1995; 70: 62-67.
173. Rodgers G.M., Conn M.T.: Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood* 1990; 75: 895-901.
174. Lentz S.R., Sadler J.E.: Homocysteine inhibits von Willebrand factor processing and secretion by preventing transport from the endoplasmic reticulum. *Blood* 1993; 81: 683-689.

175. Jakubowski H.: Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. *J Biol Chem* 1997; 272: 1935-1942.
176. Lentz S.R., Sobey C.G., Piegors D.J., et al: Vascular dysfunction in monkeys with diet induced hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996; 98: 24-29.
177. Cattaneo M., Franchi F., Zighetti M.L., et al: Plasma levels of activated protein C in healthy subjects and patients with previous venous thromboembolism - Relationship with plasma homocysteine levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1371-1375.
178. von Hafe P., Lopes C.Maciél M.J., Barros H., et al: Agregação dos factores de risco cardiovascular numa população urbana do Porto. *Acta Médica Port* 1998; 11: 1059-1064.
179. Frishman W.H.: Biologic markers as predictors of cardiovascular disease. *Am J Med* 1998; 104(6A): 18S-27S.
180. Beto J., Bansal V.: Interventions for other risk factors: tobacco use, physical inactivity, menopause and homocysteine. *Am J Kid Dis* 1998; 32(Suppl 3):S172-S184.
181. Arkel Y.S., Ku D.H., Gibson D., et al: Ischemic stroke in a young patient with protein C deficiency and prothrombin gene mutation G20210A. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1998; 9: 757-760.
182. Gardemann A., Arsic T., Katz N., et al: The factor II G20210A and factor V G1691A gene transitions and coronary heart disease. *Thromb Haemost* 1999; 81: 208-13.
183. Balasa V.V., Gruppa R.A., Glueck C.J., et al: The relationship of mutations in the MTHFR, prothrombin, and PAI-1 genes to plasma levels of homocysteine, prothrombin, and PAI-1 in children and adults. *Thromb Haemost* 1999; 81: 739-44.
184. Hessner M.J., Luhm R.A., Pearson S.L., et al: Prevalence of prothrombin G20210A, factor V G1691A (Leiden), and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T in seven different populations determined by multiplex allele-specific PCR. *Thromb Haemost* 1999; 81: 733-8.
185. McColl M.D., Chalmers E.A., Thomas A., et al: Factor V Leiden, prothrombin 20210G-A and the MTHFR C677T mutations in childhood stroke. *Thromb Haemost* 1999; 81: 690-4.
186. Smith E.B., Thompson W.D.: Fibrin as a factor in atherogenesis. *Thromb Res* 1994; 73: 1-19.

187. von Eckardstein A., Malinow M.R., Upson B., et al.: Effects of age, lipoproteins and hemostatic parameters on the role of homocysteine as a cardiovascular risk factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994; 14: 460-464.
188. Stein J.H., Rosenson R.S.: Lipoprotein Lp(a) excess and coronary heart disease. *Arch Intern Med* 1997; 157: 1170-1176.
189. Scanu A.M.: Lipoprotein(a) and atherosclerosis. *Ann Intern Med* 1991; 115: 209-218.
190. Lussier-Cacan S., Xhignesse M., Piolot A., et al: Plasma total plasma homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological traits. *Am J Clin Nutr* 1996; 64: 587-93.
191. Malinow M.R., Levenson J., Giral P., et al: Role of blood pressure, uric acid and hemorheological parameters on plasma homocyst(e)ine concentration. *Atherosclerosis* 1995; 114: 175-183.
192. Kristensen B., Malm J., Nilsson T.K., et al: Hyperhomocysteinemia and hypofibrinolysis in young adults with ischemic stroke. *Stroke* 1999; 30: 974-980.
193. Bostom A.G., Shemin D., Verhoef P., et al: Elevated fasting total plasma homocysteine levels and cardiovascular disease outcomes in maintenance dialysis patients: a prospective study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2554-2558.
194. Foley R.N., Parfrey P.S., Sarnak M.J., et al: Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kid Dis* 1998; 32(Suppl 3):S112-S119.
195. Wheeler D.: Cardiovascular risk factors in patients with chronic renal failure. *J Renal Nutrition* 1997; 7: 182-186.
196. Bostom A.G., Shemin D., Lapane K.L., et al: Hyperhomocysteinemia and traditional cardiovascular disease risk factors in end-stage renal disease patients on dialysis: a case-control study. *Atherosclerosis* 1995; 114: 93-103.
197. van Guldener C., Janssen M., Lambert J., et al: No change in impaired endothelial function after long-term folic acid therapy of hyperhomocysteinaemia in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 106-112.
198. Dennis V.W., Robinson K.: Hyperhomocysteinemia and vascular disease in end-stage renal disease. *Kidney Int* 1996; 50 (Supp.57): S11-S17.

199. Stabler S.P., Marcell P.D., Podell E.R., et al: Quantification of total homocysteine, total cysteine and methionine in normal serum and urine using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1988; 162: 186-196.
200. Chaveau P., Chadeaux B., Coudé M., et al: Hyperhomocysteinemia, a risk factor for atherosclerosis in chronic uremic patients. *Kidney Int* 1993; 49: 147-152.
201. Moustapha A., Naso A., Nahlawi M., et al: Prospective study hyperhomocysteinemia as an adverse cardiovascular risk factor in end-stage renal disease. *Circulation* 1998; 97: 138-141.
202. Massy Z.A., Chadeaux-Vekemans B., Chevalier A., et al: Hyperhomocysteinemia: a significant risk factor for cardiovascular disease in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9: 1103-8.
203. Bostom A.G., Lathrop L.: Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int* 1997; 52: 10-20.
204. Shemin D., Lapane K.L., Bausserman L., et al: Plasma total homocysteine and hemodialysis access thrombosis: a prospective study. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1095-1099.
205. Jungers P., Chaveau P., Bandin O., et al: Hyperhomocysteinemia is associated with atherosclerotic occlusive arterial accidents in predialysis chronic renal failure patients. *Miner Electrolyte Metab* 1997; 23:170-173.
206. Samuelsson O., Lee D.M., Attman P.O., et al: The plasma levels of homocysteine are elevated in moderate renal insufficiency but do not predict the rate of progression. *Nephron* 1999; 82: 306-311.
207. Chaveau P., Chadeaux B., Coudé M., et al: Long term folic acid (but not pyridoxine) supplementation lowers elevated plasma homocysteine level in chronic renal failure. *Miner Electrolyte Metab* 1996; 22:106-109.
208. Dierkes J., Domrose U., Ambrosch A., et al: Response of hyperhomocysteinemia to folic acid supplementation in patients with end-stage renal disease. *Clin Nephrol* 1999; 51; 108-115.
209. Bostom A.G., Brosnan J.T., Hall B., et al: Net uptake of plasma homocysteine by the rat kidney in vivo. *Atherosclerosis* 1995; 116: 59-62.
210. Hultberg B., Andersson A., Sterner G., et al: Plasma homocysteine in renal failure. *Clin Nephrol* 1993; 40; 230-234.
211. Soria C., Chadeaux B., Coudé M., et al: Concentrations of total homocysteine in plasma in chronic renal failure. *Clin Chem* 1990; 36: 2137-2138.

212. Wilcken D., Gupta V.J., Reddu S.G.: Accumulation of sulphur-containing amino acids including cysteine-homocysteine in patients on maintenance haemodialysis. *Clin Science* 1980; 58: 427-430.
213. Kang S., Wong P.W.K., Bidani A., et al: Plasma protein-bound homocyst(e)ine in patients requiring haemodialysis. *Clin Science* 1983; 65: 335-336.
214. Perna A.F., Ingrosso D., De Santo N.G., et al: Mechanism of erythrocyte accumulation of methylation inhibitor S-adenosylhomocysteine in uremia. *Kidney Int* 1995; 47: 247-253.
215. Smolin L.A., Laidlaw S.A., Kopple J.D., et al: Altered plasma free and protein-bound sulphur amino acids levels in patients undergoing maintenance hemodialysis. *Am J Clin Nutr* 1987; 45: 737-743.
216. Vychytil A., Fodinger M., Wolpl G., et al: Major determinants of hyperhomocysteinemia in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int* 1998; 53: 1775-1782.
217. Arnadottir M., Hultberg B., Vladov V., et al: Hyperhomocysteinemia in cyclosporine-treated renal transplant recipients. *Transplantation* 1996; 61: 509-512.
218. Wilcken D., Vatsala J., Betts A.: Homocysteine in the plasma of renal transplant recipients: effects of cofactors for methionine metabolism. *Clin Science* 1981; 61: 743-749.
219. Bostom A.G., Gohh R.Y., Tsai M.Y., et al: Excess prevalence of fasting and postmethionine-loading hyperhomocysteinemia in stable renal transplant recipients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1894-1900.
220. Bostom A.G., Gohh R.Y., Beaulieu A.J., et al: Determinants of fasting plasma homocysteine levels among chronic stable renal transplant recipients. *Transplantation* 1999; 68: 257-261.
221. Ducloux D., Fournier V., Rebibou J.M., et al: Hyperhomocyst(e)inemia in renal transplant recipients with and without cyclosporine. *Clin Nephrol* 1998; 49: 232-235.
222. Arnadottir M., Hultberg B., Whalberg J., et al: Serum total homocysteine concentration before and after renal transplantation. *Kidney Int* 1998; 54: 1380-1384.
223. Janssen M., van Guldener C., de Jong G. et al: Folic acid treatment of hyperhomocysteinemia in dialysis patients. *Miner Electrolyte Metab* 1996; 22:110-114.

224. Swainson C.P., Winney R.J.: Do dialysis patients need extra folate? *Lancet* 1983; 1: 239.
225. House J.D., Brosnan M.E., Brosnan J.T. et al: Renal uptake and excretion of homocysteine in rats with acute hyperhomocysteinemia: *Kidney Int* 1998; 54: 1601-1607.
226. Guttormsen A.B., Schneede J., Ueland P.M., et al: Kinetics of total plasma homocysteine in subjects with hyperhomocysteinemia due to folate or cobalamin deficiency. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 194-202.
227. Refsum H., Helland S., Ueland P.M.: Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin Chem* 1985; 31: 624-628.
228. Arnadottir M., Hultberg B., Nilsson-Ehle P., et al: The effect of reduced glomerular filtration rate on plasma total homocysteine concentration. *Scand J Clin Lab Invest* 1996; 56: 41-46.
229. Loeher F., Angst C., Brunner F., et al: Evidence for disturbed S-adenosylmethionine: S-adenosylhomocysteine methylation reactions? *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 656-661.
230. Guttormsen A.B., Ueland P.M., Svarstad E., et al: Kinetic basis of hyperhomocysteinemia in patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 1997; 52: 495-502.
231. van Guldenberg C., Donker J.M., Jakobs C., et al: No net renal extraction of homocysteine in fasting humans. *Kidney Int* 1998; 54: 166-169.
232. Laidlaw S.A., Smolin L.A., Warren D.D., et al: Sulfur amino acids in maintenance hemodialysis patients. *Kidney Int* 1987; 22: S191-S196.
233. van Guldener C., Kulik W., Berger R., et al: Homocysteine and methionine metabolism in ERSD: a stable isotope study. *Kidney Int* 1999; 56: 1064-1071.
234. Rocco M, Makoff R.: Appropriate vitamin therapy for dialysis patients. *Sem Dialysis* 1997; 10: 272-277.
235. Livant E.J., Tamura T., Jonhston K.E., et al: Plasma folate conjugase activities and folate concentrations in patients receiving hemodialysis. *J Nutr Biochem* 1994; 5: 504-508.
236. Asagi K., Nakayama M., Kobayashi M., et al: Content of sulfur amino acids and vitamin B6 and related enzyme activities in rats with chronic renal failure fed a high methionine diet. *Nephron* 1996; 74: 175-182.
237. Hong S.Y., Yang D.H., Chang S.K.: The relationship between plasma homocysteine and amino acid concentrations in patients with end-stage renal disease. *J Renal Nutrition* 1998; 8: 34-39.

238. Alvestrand A., Furst P., Bergstrom J.: Plasma and muscle free amino acids in uremia: influence of nutrition with amino acids. *Clin Nephrol* 1982; 18: 297-305
239. Tizianello A., De Ferrari G., Garibotto G., et al: Renal metabolism of amino acids and ammonia in subjects with normal renal function and in patients with chronic renal insufficiency. *J Clin Invest* 1980; 65: 1162-1173.
240. Druml W., Fisher M., Fiebisch B., et al: Elimination of amino acids in renal failure. *Am J Clin Nutr* 1994; 60: 418-423.
241. Kopple J.D., Mercurio K., Blumenkrantz M.J., et al: Daily requirements for pyridoxine supplements in chronic renal failure. *Kidney Int* 1981; 19: 694-704.
242. Perna A.F., Ingrosso D., De Santo N.G., et al: Metabolic consequences of folate-induced reduction of hyperhomocysteinemia in uremia. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1899-1905.
243. van Guldener C., Janssen M., de Meer K., et al: Effect of folic acid and betaine on fasting and postmethionine-loading plasma homocysteine and methionine levels in chronic haemodialysis patients. *J Intern Med* 1999; 245(2): 175-183.
244. Janssen M., van der Berg M., van Guldener C., et al: Withdrawal of folic acid supplementation in maintenance hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 1994; 42: 136-137.
245. Bostom A.G., Shemin D., Nadeau M.R., et al: Short term betaine therapy fails to lower elevated fasting total plasma homocysteine concentrations in hemodialysis patients maintained on chronic folic acid supplementation. *Atherosclerosis* 1995; 113: 129-132.
246. Arnadottir M., Brattstrom L., Simonsen O., et al: The effect of high-dose pyridoxine and folic acid supplementation on serum lipid and plasma homocysteine concentrations in dialysis patients. *Clin Nephrol* 1993; 40: 236-240.
247. Suliman M.E., Divino Filho J.C., Bàràny P., et al: Effects of high-dose folic acid and pyridoxine on plasma erythrocyte sulfur amino acids in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1287-1296.
248. Wilcken D., Wilcken B., Dudman N., et al: Homocystinuria - The effects of betaine in the treatment of patients not responsive to pyridoxine. *N Eng J Med* 1983; 309: 448-453.
249. Bostom A.G., Shemin D., Yoburn D., et al: Lack of effect of oral N-acetylcysteine on the acute dialysis related lowering of total plasma homocysteine in hemodialysis patients. *Atherosclerosis* 1996; 120: 241-244.

250. Bostom A.G., Culleton B.: Hyperhomocysteinemia in chronic renal disease: potential relevance to atherosclerosis. *Sem Dialysis* 1999; 12: 103-111.
251. Woodside J., Fogarty D., Lightbody J., et al: Homocysteine and B-group vitamins in renal transplant patients. *Clin Chim Acta* 1999; 282: 157-166.
252. Kim B., Y-H. Lee, Huh W., D.J. Kim, et al: Change of plasma total homocysteine in renal transplant recipients immediately after renal transplantation. *Abstracts book of EDTA 1998*;368.
253. Mazouz H., Westeel P.F., Pruna A., et al: Mild hyperhomocysteinemia is a cardiovascular risk factor independent of renal function in the renal transplanted population. *Abstracts book of EDTA 1998*: 367.
254. Zazgornik J., Druml W., Balcke P., et al: Diminished serum folic acid levels in renal transplant recipients. *Clin Nephrol* 1982; 18: 306-310.
255. Lacour B., Parry C., Druke T., et al: Pyridoxal 5'-phosphate deficiency in uremic undialyzed, hemodialyzed and non-uremic kidney transplant patients. *Clin Chim Acta* 1983; 127: 205-215.
256. Vermaak W.J.H., Barnard H.C., Potgieter G.M., et al: Vitamin B6 and coronary artery disease - Epidemiological observations and case studies. *Atherosclerosis* 1987; 63: 235-38.
257. Fodinger M., Wolf G., Fischer G., et al: Effect of MTHFR 677C>T on plasma total homocysteine levels in renal graft recipients. *Kidney Int* 1999; 55: 1072-1080.
258. Arnadottir M., Hultberg B.: Treatment with high-dose folic acid effectively lowers plasma homocysteine concentration in cyclosporine treated renal transplant recipients. (letter). *Transplantation* 1997; 64: 1087.
259. Goldberg R.J.: Assessing the population burden from heart failure. *Arch Intern Med* 1999; 159: 15-17.
260. Roberts S. D., Maxwell D.R., Gross T.L: Cost-effective care of end-stage renal disease: a billion dollar question. *Ann Intern Med* 1980; 92(Part 1): 243-248.
261. Havranek E.P.: Primary prevention of CHD: nine ways to reduce risk. *Am Fam Physician* 1999; 317: 193-207.
262. Ducloux D., Ruedin C., Gibey R. et al: Prevalence, determinants and clinical significance of hyperhomocyst(e)inaemia in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 2890-2893.
263. Dimény E., Hultberg B., Wahlberg, et al: Serum total homocysteine concentration does not predict outcome in renal transplant recipients. *Clin Transplantation* 1998; 12: 563-568.



264. Braun W.E., Protiva D.A., Gifford Jr R.W., et al: Hyperhomocysteinemia and other coronary risk factors in 20-year renal transplant recipients (Level 5A) with and without coronary heart disease. *Transplant Proc* 1999; 31: 1280-1282.
265. Bostom A.G., Gohh R.Y., Bausserman L., et al: Serum cystatin C as a determinant of fasting total homocysteine levels in renal transplant recipients with normal serum creatinine. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 164-166.
266. Verhoef P., Satmpfer M.J.: Prospective studies of homocysteine and cardiovascular disease. *Nutr Rev* 1995; 53(10): 283-288.
267. Garg U.C., Zheng Z., Folsom A., et al: Short term and long-term variability of plasma homocysteine measurement. *Clin Chem* 1997; 43: 141-145.
268. Garrow J.S.: *Treat obesity seriously*. Churchill-Livingstone.
269. The Fifth Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (JNC V). *Arch Intern Med* 1993; 153: 154-83.
270. Diabetes Mellitus: Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Serv* 1985; 727: 9-17.
271. Cole D., Ross H., Evrovski J. et al: Correlation between total homocysteine and cyclosporine concentrations in cardiac transplant recipients. *Clin Chem* 1998; 44: 2307-2312.
272. Murphy B.G., Brown A.Y.J.H., McNamee P.T., et al: Effect of immunosuppressive drug regime on cardiovascular risk profile following kidney transplantation. *Atherosclerosis* 1995; 116: 241-245.
273. Gupta A., Moustapha A., Jacobsen D.W., et al: High homocysteine, low folate and low vitamin B<sub>6</sub> concentrations - Prevalent risk factors for vascular disease in heart transplant recipients. *Transplantation* 1998; 65: 544-550.
274. Alface J.I.S.: *Metabolismo dos aminoácidos*. In Halpern M.J. ed. *Bioquímica*. Lisboa: Lidel - Edições técnicas, Lda; 1997:511-539.
275. Mudd S.H., Poole J.R., et al: Labile Methylbalances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism* 1975; 24(6): 721-735.
276. Wollesen F., Brattstrom L., Refsum H., et al: Plasma total homocysteine and cysteine in relation to glomerular filtration rate in diabetes mellitus. *Kidney Int* 1999; 55: 1028-1035.
277. Maurer G., Loosli H.R., Schreier E., et al: Disposition of cyclosporine in several animal species and man. I. Structural elucidation of its metabolites. *Drug Metab Dispos* 1984; 12(1); 120-126.

- 278.** Bertolatus J.A., Hunsicker L.: Nutritional requirements of renal transplant patients. *In* Mitch W.E., Klahr S. eds. *Handbook of Nutrition and the Kidney*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998: 294-315.
- 279.** Wise J.K., Hendler R., Felig P., et al: Influence of glucorticoids on glucagon secretion and plasma amino acid concentrations in man. *J Clin Invest* 1973; 52: 2774-2782.
- 280.** Meyer M.M., Norman D.J., Danovitch G. M.: Long-term posttransplant management and complications. *In* Danovitch G.M. eds. *Handbook of Kidney Transplantation*. 3<sup>rd</sup> ed. Boston: Little, Brown and Company; 1992: 173-203.
- 281.** Grover S.A., Coupal L., Paquet S., et al: Cost-effectiveness of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors in the secondary prevention of cardiovascular disease - Forecasting the incremental benefits of preventing coronary and cerebrovascular events. *Arch Intern Med* 1999; 159: 593-600.
- 282.** Perreault S., Hamilton V.H., Lavoie F., et al: Treating hyperlipidemia for primary prevention of coronary disease. *Arch Intern Med* 1997; 157: 375-381.
- 283.** Gupta A., Dennis V., Arheart K., et al: High plasma homocysteine is a risk factor for vascular complications of end stage renal disease and enhances the adverse effects of smoking and diabetes. *J Am Coll Nutr* 1997; 29 (Supl A): 126A.
- 284.** Hultberg B., Agardh C.D., Agardh E., et al: Poor metabolic control, early age at onset, and marginal folate deficiency are associated with increasing levels of plasma homocysteine in insulin-dependent diabetes mellitus. A five-year follow up study. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57: 595-600.
- 285.** Ubbink J.B., Fehily A.M., Pickering J., et al: Homocysteine and ischemic heart disease in the Caerphully cohort. *Atherosclerosis* 1998; 140: 349-356.
- 286.** Hohage H., Arlt M., Bruckner D., et al: Effects of cyclosporine A and FK 506 on lipid metabolism and fibrinogen in kidney transplant recipients. *Clin Transplantation* 1997; 11: 225-230.
- 287.** Verhoef P., Kok F.J., Kruyssen D.A., et al: Plasma total homocysteine, B vitamins and risk of coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 989-95.
- 288.** Jacobs U., Ferber J., Heimbach D., et al: Manifestation of metabolic risk factors after renal transplantation: impact of maintenance therapy. *Transplant Proc* 1995; 27: 2050-2051.

- 289.** Hofmann G.O., Schneeberger H., Land W., et al: Risk factors for chronic transplant failure after kidney transplantation. *Transplant Proc* 1995; 27: 2031-2032.
- 290.** Amend W.J.C., Vincent F., Tomlanovitch S.J.: The first two posttransplant months. *In Danovitch G.M. eds. Handbook of Kidney Transplantation. 3<sup>rd</sup> ed.* Boston: Little, Brown and Company; 1992: 151-171.
- 291.** Altman D.G.: *Practical Statistics for Medical Research. 2<sup>nd</sup> ed.* London: Chapman & Hall; 1991.
- 292.** Norman G.R., Streiner D.L.: *Biostatistics: The Bare Essentials.* Missouri: Mosby Year Book, Inc. 1994.
- 293.** Bamonti-Catena F., Bucciatti G., Porcella A., et al: Folate measurements in patients on regular hemodialysis treatment. *Am J Kid Dis* 1999; 33: 492-497.

**ANEXOS**

**PROTOCOLO ANALÍTICO DO ESTUDO  
"HIPERHOMOCISTEINEMIA NO TRANSPLANTE RENAL"**

**1ª avaliação**

Os doseamentos analíticos a efectuar na 1ª avaliação serão integrados na colheita de análises de rotina dos transplantados renais:

- Hemograma
- Bioquímica sérica:
  - glicose, ureia, creatinina;
  - sódio, potássio, cloretos;
  - cálcio, fósforo;
  - bilirrubina total, TGO, TGP, GGT e fosfatase alcalina;
  - perfil lipídico: colesterol total, triglicérides, colesterol LDL e HDL,  
Lp(a), apolipoproteínas A<sub>1</sub> e B;
  - proteínas totais, albumina, pré-albumina e RBP;
  - ferro, ferritina, transferrina, capacidade de fixação do ferro;
  - paratormona;
  - ácido fólico, vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>;
  - homocisteína.
- Ácido fólico eritrocitário
- Estudo da coagulação
- Urina (amostra de 24 horas):
  - ureia, creatinina, sódio, fosfato, potássio e proteínas;
  - depuração da creatinina.

**2ª avaliação**

Igualmente integrados na colheita de análises de rotina subsequente, nesta 2ª avaliação serão apenas repetidos os doseamentos de:

- homocisteína;
- ácido fólico (sérico e eritrocitário);
- vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>.

**APRESENTAÇÃO E CONSENTIMENTO DO DOENTE****Designação do estudo: "Hiperhomocisteinemia no Transplante Renal"**

Caro transplantado renal:

O Serviço de Nefrologia solicita-lhe a sua participação num estudo de um novo factor de risco da doença cardiovascular, doença esta muito frequente nos transplantados renais. O estudo desse novo factor de risco - a homocisteína - implica que na sua próxima colheita de análises lhe seja colhida uma amostra de sangue ligeiramente maior.

A informação obtida através dessa análise vai permitir actuar no futuro sobre este factor de risco, nomeadamente naqueles doentes que tenham valores elevados de homocisteína.

A sua participação neste estudo é estritamente voluntária e confidencial.

Se tiver algumas dúvidas acerca da sua participação neste estudo, sinta-se à vontade para perguntar.

Se não aceitar participar no estudo isso não irá afectar de forma alguma o seu tratamento e assistência que lhe é prestada.

Se concordar em participar neste estudo ao consentir que lhe sejam feitas as análises referidas, por favor assine esta folha de consentimento no espaço abaixo indicado e muito obrigado por contribuir para o estudo da doença cardiovascular no transplantado renal.

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Assinatura do doente:

---

Assinatura do Médico Assistente ou Nutricionista:

---