



**Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina  
Campus de Botucatu**

**Efeitos da suplementação vitamínica de ácido fólico  
sobre a concentração de homocisteína e marcadores  
de inflamação em indivíduos portadores de doença  
arterial periférica**

**Luciene de Souza Venâncio**

Botucatu

2006



**Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina  
Campus de Botucatu**

**Efeitos da suplementação vitamínica de ácido fólico sobre  
a concentração de homocisteína e marcadores de  
inflamação em indivíduos portadores de doença arterial  
periférica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia -Área de Concentração Isquemia, Reperusão e Trombose, da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista-Unesp, para obtenção do título de Doutor.

**Orientador: Prof. Adjunto Winston Bonetti Yoshida**

Botucatu

2006

**Dedico este trabalho,**

Aos meus pais, **Maria Inês e Iedo**, meus maiores exemplos de vida, coragem, inteligência e integridade e que sempre zelaram pela minha formação. Obrigada por me darem sustentação para enfrentar os desafios e vencer cada obstáculo e, assim, alcançar mais um objetivo.

Aos meus irmãos, **Fabiane e Iedo**, pelo apoio, confiança, companheirismo (mesmo que à distância) e incentivo carinhoso, por se orgulharem com mais uma conquista e ensinando-me que as grandes conquistas são possíveis e só dependem de nosso empenho e ousadia.

Ao querido **Márcio**, companheiro amável, carinhoso e de extrema sensibilidade e que tanto me faz crescer pessoal e profissionalmente.

Ao Professor Adjunto **Winston Bonetti Yoshida**, um pesquisador nato, um médico exemplar, que tanto contribuiu na realização deste trabalho e na minha formação acadêmica. Agradeço imensamente o respeito, a oportunidade e a confiança que sempre demonstrou, e pelos conselhos sempre sábios. Foi uma satisfação compartilhar momentos enriquecedores ao longo desses anos de convivência.

Ao **Professor Titular Roberto Carlos Burini**, pela vida dedicada à pesquisa, pelo incentivo e oportunidade constante e incansável de formar novos pesquisadores e principalmente pelos valiosos conhecimentos transmitidos ao longo desses anos de convivência. Serei sempre grata.

Ao **Professor Emérito Francisco Humberto de Abreu Maffei**, exemplo a ser seguido como pessoa, médico e pesquisador. Agradeço imensamente o incentivo e colaboração que sempre demonstrou, e por ter me conduzido ao caminho da pesquisa.

Aos meus **familiares**, e aos velhos e novos queridos **amigos**, que mesmo distantes, me incentivaram em mais uma etapa de vida.

A **UNESP- Universidade Estadual Paulista**, ao **Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu** e ao **CeMENutri**, pela oportunidade da realização deste trabalho;

Ao **Coordenador do Programa de Pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia**, Prof. Dr. Antônio José Maria Cataneo, pela atenção e apoio nos momentos oportunos;

Aos **Professores da Disciplina de Cirurgia Vascular** Dr. Sidnei Lastória, Dr. Hamilton Almeida Rollo, Dra. Regina Moura, Dra. Mariângela Giannini, Dr. Marcone Lima Sobreira pelo fundamental apoio, amizade, carinho, respeito e colaboração nestes anos de convivência. A todos sou muito grata;

Aos **Residentes da Cirurgia Vascular** da UNESP pelo valioso apoio e colaboração na execução deste trabalho;

Aos **Queridos pacientes** que aceitaram participar deste estudo, por colaborarem com a ciência e pela confiança depositada. Vocês fazem parte da minha vida;

Aos **Biomédicos do CeMENutri** Maria Dorotéia Borges dos Santos e Fernando Moreto, pela convivência agradável e pelo auxílio nas análises da homocisteína, PCR us e folato;

A **Funcionária do Laboratório de Análises Clínicas do Setor de Sorologia** do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), bióloga Dra. Nádia dos Reis Carvalho, pelo auxílio na realização das análises de LDL-oxidada;

Ao **Professor Doutor** José Ernesto dos Santos, associado da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP) pelo apoio e oportunidade na identificação dos genótipos da enzima MTHFR;

A **Funcionária do Laboratório de Nutrição** do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), farmacêutica-bioquímica e bióloga Júlia Keiko Sakamoto Hotta, pelo auxílio na identificação dos genótipos da enzima MTHFR;

Ao **Professor Doutor** José Eduardo Corrente do Grupo de Apoio à Pesquisa (GAP), pela criteriosa e paciente ajuda na realização dos testes estatísticos;

Aos **Funcionários da Seção de Pós-graduação**, Janete, Lílian, Natanael e Regina pela responsabilidade, carinho e, sobretudo, pela paciência, competência e cordialidade com que sempre me atenderam;

Aos **Funcionários do Departamento de Cirurgia e Ortopedia**, Eduardo, Mara, Mari e Simone, pela convivência agradável e por serem sempre afetuosos, atenciosos e prestativos comigo, além de serem muito competentes;

Aos **Funcionários do Laboratório Vascular**, Neide, Valéria e à biomédica Ana Paula pela convivência agradável e descontraída, auxílio, prontidão e atenção em todos os momentos;

Aos **Funcionários do CeMENutri**, e em especial ao Nelson pela amizade e coleta do sangue dos pacientes;

A todos os **amigos do CeMENutri**, e em especial a amiga nutricionista Viviane Sakzenian e ao Dr. Franz Homero P. Burini pela amizade, incentivo, apoio e auxílio na seleção do grupo controle;

Aos **Bibliotecários da UNESP**, pelo auxílio e atenção em todos os momentos solicitados;

Aos **técnicos e funcionários** dos laboratórios de **Análises Clínicas** e do **Hemocentro** pela atenção dispensada e realização dos exames necessários;

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES** e a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP** que forneceram suporte financeiro para a realização deste trabalho.

**Meus sinceros agradecimentos!**

***“Ninguém ignora tudo.  
Ninguém sabe tudo.  
Todos nós sabemos alguma coisa.  
Todos nós ignoramos alguma coisa.  
Por isso aprendemos sempre”.***

Paulo Freire

Esta tese de doutorado foi elaborada em novo formato, de acordo com a recomendação do Coordenador do Curso de Pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, visando facilitar futuras publicações e consultas a esse material. Está subdividida em dois capítulos redigidos como trabalhos independentes, de acordo com as normas internacionais de publicações em periódicos, porém, com conteúdos intimamente relacionados, estando o primeiro na forma de Artigo de Revisão (Capítulo I), e o segundo na forma de Artigo Original (Capítulo II).

O Capítulo I “Tratamento nutricional da hiper-homocisteinemia na doença arterial periférica”, aborda o metabolismo da homocisteína e sua relação como fator de risco na doença arterial periférica, os mecanismos patogênicos da hiper-homocisteinemia, a utilização do tratamento vitamínico, principalmente com ácido fólico no tratamento da hiper-homocisteinemia e os efeitos deste tratamento sobre a morbi-mortalidade por doenças vasculares.

O Capítulo II “Efeitos da suplementação de ácido fólico sobre a concentração de homocisteína e marcadores de inflamação em indivíduos portadores de doença arterial periférica”, relata os resultados do tratamento com ácido fólico sobre a homocisteinemia e indicadores inflamatórios na isquemia crônica de membros de pacientes acompanhados no Ambulatório de Claudicação do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

## **Capítulo I - Tratamento nutricional da hiper-homocisteinemia na doença arterial periférica**

Resumo.....	01
Abstract.....	02
Metabolismo da homocisteína e hiper-homocisteinemia na doença arterial periférica.....	04
Mecanismos patogênicos da hiper-homocisteinemia.....	11
Tratamento nutricional da hiper-homocisteinemia.....	14
Efeitos do tratamento da hiper-homocisteinemia sobre a morbidade e mortalidade por doenças vasculares.....	27
Considerações finais.....	29
Referências Bibliográficas.....	30

## **Capítulo II - Efeitos da suplementação de ácido fólico sobre a concentração de homocisteína e marcadores de inflamação em indivíduos portadores de doença arterial periférica**

Resumo.....	44
Abstract.....	45
Introdução.....	46
Objetivo.....	49
Casuística e Métodos.....	50
Aspectos éticos.....	50
Amostra.....	50
Desenho do estudo.....	51
Análises laboratoriais.....	53
Análise estatística.....	55
Resultados.....	57
Comparação basal entre os grupos estudados: Grupo Controle, Grupo ICM Placebo e Grupo ICM Ácido Fólico.....	57
Comparação entre os grupos antes e após os tratamentos placebo ou ácido fólico.....	65
Discussão.....	68
Amostra.....	68
Hiper-homocisteinemia e doença arterial periférica.....	69
Tratamento nutricional da hiper-homocisteinemia.....	72
Tratamento da hiper-homocisteinemia e polimorfismo 677C→T da enzima MTHFR.....	76

Considerações finais.....	77
Conclusão.....	79
Referências Bibliográficas.....	80
Anexos.....	87
Apêndice.....	93

**Tratamento nutricional da hiper-  
homocisteinemia na doença arterial  
periférica.**

## **Resumo**

---

Venancio LS. Tratamento nutricional da hiper-homocisteinemia na doença arterial periférica. (tese). Botucatu/SP: UNESP - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu; 2006.

Estudos epidemiológicos mostraram que a prevalência de doença arterial periférica (DAP) é alta e tem como fator etiológico principal a aterosclerose. Os fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose são bastante conhecidos, e nos últimos anos, foi identificado, além destes, a homocisteína. Diversos estudos clínicos e experimentais, nacionais e internacionais, indicam que a homocisteína está envolvida na gênese da aterosclerose e, assim, é considerada um importante e prevalente fator de risco para doenças vasculares, inclusive na doença arterial periférica. A homocisteína é um aminoácido sulfurado utilizado em diversas vias metabólicas. A hiper-homocisteinemia pode ser atribuída principalmente ao estado nutricional vitamínico deficiente das vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e em especial do folato, ou ainda à ocorrência de mutações genéticas de algumas enzimas do metabolismo da homocisteína, como a heterozigose e a homozigose para a enzima metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR). Os mecanismos pelos quais a hiper-homocisteinemia contribui para a aterogênese são parcialmente compreendidos e multifatoriais, como a disfunção endotelial provocada pela redução do óxido nítrico, assim como por mecanismos oxidativos (aumento na produção de espécies reativas do metabolismo de oxigênio, oxidação da LDL -*low density lipoprotein*) e inflamatórios (indução na expressão de moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias). Embora ainda não haja consenso sobre a dose exata e a forma de utilização, principalmente do folato na forma de suplementos, adequação alimentar, fortificação de cereais, para o tratamento da hiper-homocisteinemia, diversos estudos realizados em pacientes com doença vascular coronariana, cerebral e periférica, mostraram que o folato, isoladamente ou em combinação com a vitamina B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> pode reduzir as concentrações sanguíneas homocisteína e também diminuir a concentração de alguns marcadores de biológicos do processo de aterosclerose. No entanto, estudos recentes não comprovaram este benefício sobre o processo inflamatório associado à hiper-homocisteinemia. Portanto, a suplementação ou, a fortificação, ou a adequação dietética isolada do folato é uma terapêutica custo-efetiva na prevenção e no controle da homocisteinemia, mas ainda persiste inconclusiva quanto ao impacto sobre a evolução das doenças vasculares.

Palavras-chave: Homocisteína; doença arterial periférica; suplementação vitamínica; ácido fólico; aterosclerose.

## **Abstract**

---

Venancio LS. Nutritional treatment in hiperhomocysteinemia in peripheral arterial disease. (thesis). Botucatu/SP: UNESP – São Paulo State University, Botucatu Medical School; 2006.

Epidemiological studies have shown that the prevalence of peripheral arterial disease (PAD) is high and has atherosclerosis as its etiological factor. Risk factors for the development of atherosclerosis are widely known, and, for the past years, homocysteine has been identified as one of them. Several clinical and experimental, national and international studies indicate that homocysteine plays a role in the genesis of atherosclerosis and, thus, is considered an important and prevalent risk factor for vascular diseases, including peripheral arterial disease. Homocysteine is a sulfur amino acid used in several metabolic paths. Hyperhomocysteinemia may be mainly attributed to the deficient vitamin nutritional status of vitamins B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub> and especially folate, or still to the occurrence of genetic mutations in some enzymes in homocysteine metabolism, such as heterozygosis and homozygosis for methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) enzyme. The mechanisms through which hyperhomocysteine contributes to atherogenesis are partially understood and multifactorial, such as endothelial dysfunction caused by nitric oxide reduction as well as oxidative mechanisms (increase in the production of reactive species of oxygen metabolism, low density lipoprotein oxidation and inflammatories (induction in the expression of adherence molecules and proinflammatory cytokines). Although there is still no consensus as to the exact dose and manner of use, mainly of folate in the form of supplements, eating adjustment, cereal strengthening, for the treatment of hyperhomocysteinemia, several studies done in coronary, cerebral and peripheral vascular disease patients have shown that folate, isolatedly or in combination with vitamins B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub>, may reduce blood concentrations of homocysteine as well as the concentration of some biological markers in the process of atherosclerosis. However, recent studies have not corroborated this benefit for the inflammatory process associated with hyperhomocysteinemia. Consequently, supplementation, strengthening and diet adjustment devoid of folate are not cost-effective therapies in the prevention and control of homocysteine, but it is still inconclusive regarding the impact on the evolution of vascular diseases.

Key words: Homocysteine; peripheral artery disease; vitamin supplementation; folic acid; atherosclerosis.

A doença arterial periférica (DAP) é definida como uma doença arterial obstrutiva de extremidades que reduz o fluxo sanguíneo durante o exercício ou, em estágios avançados, em repouso<sup>1</sup>. A apresentação clínica da DAP pode variar desde doença assintomática, com resultados anormais de testes não invasivos, até sintomática com a presença de claudicação intermitente clássica ou atípica, ou isquemia crítica de membros. Mais de 50% dos pacientes com DAP são assintomáticos ou tem sintomas atípicos, um terço tem sintomas clássicos de claudicação intermitente, e 10% desenvolvem isquemia crítica de membros<sup>1</sup>. Estudos epidemiológicos mostram que a prevalência de DAP varia de 1,6% a 12%<sup>2</sup>. Outros estudos nos quais se utilizaram testes não invasivos para detecção objetiva da DAP, apontaram prevalência de 3,8% a 33%<sup>2</sup>. Além disso, as doenças isquêmicas crônicas de membros, apresentam manifestações clínicas crescentes com a idade, principalmente entre a quinta e a sétima décadas de vida<sup>3</sup>, sendo a sua prevalência definida por testes não invasivos de 2,5% entre 40 e 59 anos de idade, 8,3% entre 60 e 69 anos e 18,8% entre 70 e 79 anos<sup>1</sup>. Em nosso meio, não se conhecem dados epidemiológicos referentes à sua incidência, mas estima-se que não deva ser diferente de outros países. Acredita-se que a prevalência de DAP na população em geral seja subestimada por permanecer assintomática por longo tempo<sup>3</sup>.

As doenças do aparelho circulatório foram as principais causas de morte entre os brasileiros em 2004 (27,8%)<sup>4</sup> e na população mundial (18 milhões)<sup>5</sup>, e dentre as várias etiologias, a aterosclerose foi a causa mais comum. A aterosclerose é responsável por 85% dos casos de DAP, 95% das coronariopatias, e 75% dos acidentes vasculares cerebrais. Entre os pacientes com doença aterosclerótica

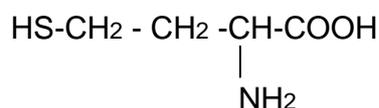
sintomática, 15,9% tem doença polivascular sintomática (doença arterial periférica, cardiovascular e cerebrovascular)<sup>6</sup>. Além disso, na fase de claudicação intermitente, cerca de 60% dos indivíduos apresentam comprometimento simultâneo e importante dos setores coronariano e cerebrovascular, e 30% dos pacientes com doença vascular coronariana ou cerebral apresentam doença arterial periférica<sup>7</sup>. Deste modo, a DAP está associada a um aumento da morbi-mortalidade por doenças cardiovasculares (aproximadamente 30%) e cerebrovasculares<sup>8</sup>, sendo um importante preditor das mesmas.

Alguns fatores de risco para o desenvolvimento da doença aterosclerótica são bastante conhecidos, como idade, sexo masculino, dislipidemia, hábito tabágico, hipertensão arterial, diabetes melito, obesidade, sedentarismo e fatores genéticos ou história familiar de doença aterosclerótica<sup>6</sup>. Nos últimos anos, foram identificados outros fatores de risco, como a homocisteína, cujo estudo pode ampliar o entendimento sobre os mecanismos fisiopatológicos da aterosclerose e possibilitar o desenvolvimento de novas medidas preventivas ou terapêuticas.

### ***Metabolismo da homocisteína e hiper-homocisteinemia na doença arterial periférica***

A homocisteína é um aminoácido sulfurado não protéico, que apresenta um grupo sulfidril (SH) em sua estrutura (Figura 1). Este aminoácido não é um constituinte da dieta e não é formador de proteínas, mas é produzido exclusivamente

como um produto intermediário do metabolismo intracelular do aminoácido essencial metionina<sup>9</sup>.



**Figura 1.** Representação da molécula de homocisteína<sup>10</sup>.

A homocisteína foi descoberta por Vincent Du Vigneaud em 1932, que publicou um trabalho pioneiro sobre a importância desse aminoácido na bioquímica e na nutrição. Estudos posteriores em crianças com homocisteinúria mostraram associação entre a elevação da homocisteína sanguínea e fenômenos ateroscleróticos e tromboembólicos como infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, e morte precoce<sup>11</sup>. Nos tecidos animais, a homocisteína apresenta-se na forma reduzida, ou seja, com um grupo sulfidril livre, embora em pequena quantidade. A maior parte ocorre no estado oxidado, sob a forma de homocistina (dissulfeto da homocisteína), dissulfeto misto homocisteína-cisteína e homocisteína ligada a proteínas (principalmente albumina) por ligações dissulfeto. Todas essas espécies de homocisteína são chamadas conjuntamente de homocisteína total. Mais de 70% da homocisteína total se encontra ligada à albumina, 30% está na forma de dissulfetos, e aproximadamente 1% apresenta-se na forma livre<sup>9</sup>.

O metabolismo intracelular da homocisteína ocorre por meio de duas vias de remetilação, responsáveis pela conversão da homocisteína em metionina, e uma via

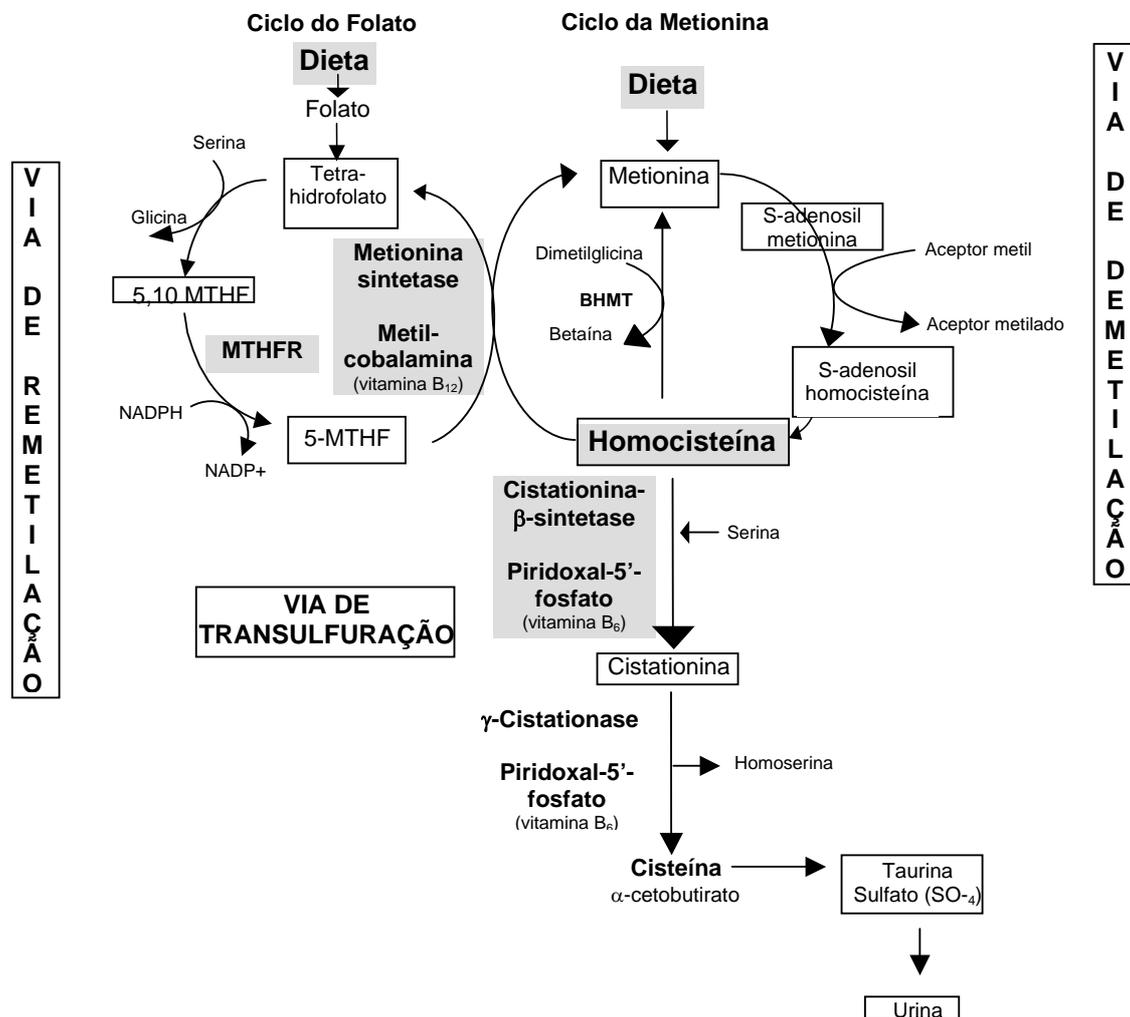
de transulfuração que converte a homocisteína em cisteína (Figura 2). Estas vias são dependentes das vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e folato que atuam como co-enzimas ou co-substratos. Em uma das vias de remetilação, o doador do grupo metil é o 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), forma principal do folato no plasma, produzido a partir da redução do 5,10-metilenotetrahidrofolato pela enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR). A transferência do grupo metil para a homocisteína é feita mediante ação da enzima metionina sintetase (MS), que tem como cofator a metilcobalamina (MCOB), que é uma coenzima derivada da cobalamina (vitamina B<sub>12</sub>). Subseqüentemente, uma nova molécula de 5-MTHF é sintetizada pela transferência de um átomo de carbono de uma fonte de carbono como serina, para uma molécula de tetrahidrofolato, produzindo metilenotetrahidrofolato e glicina<sup>12</sup>.

Na outra via de remetilação (demetilação), que acontece principalmente no fígado, o doador do grupo metil, para a conversão da homocisteína em metionina, é a betaína. Esta reação é catalisada pela enzima betaína-homocisteína metiltransferase (BHMT), e a betaína é convertida em dimetilglicina. A betaína é um derivado da colina, que por sua vez é originada da dieta e de sucessivas metilações de moléculas de fosfatidiletanolamina. Uma vez formada, a metionina é ativada pelo ATP formando S-adenosil-metionina, que funciona como doador de grupo metil para uma diversidade de receptores. O produto destas reações de metilação é a S-adenosil-homocisteína, a qual é hidrolisada regenerando a homocisteína, que se torna disponível para iniciar um novo ciclo de transferência de grupos metil<sup>13</sup>.

Na via de transulfuração, inicialmente, a homocisteína condensa-se com uma molécula de serina para formar cistationina, em reação irreversível que é catalisada

pela enzima cistationina- $\beta$ -sintetase (CBS) e que tem como cofator o piridoxal-5'-fosfato, um derivado da piridoxina ou vitamina B<sub>6</sub>. Posteriormente, a cistationina é hidrolisada em cisteína e ácido  $\alpha$ -cetobutirato, reação esta que também requer vitamina B<sub>6</sub> e é catalisada pela enzima  $\gamma$ -cistationase. O excesso de cisteína é oxidado em taurina e sulfatos inorgânicos. Desta forma, além da produção de cisteína, a via de transulfuração é responsável pelo catabolismo da homocisteína tóxica, que não é necessária no ciclo de transferência de grupos metil. Portanto, esta via de metabolização visa a excreção renal da homocisteína diminuindo a concentração sérica deste aminoácido. Esta via metabólica ocorre somente no fígado, rins, intestino delgado e pâncreas. Em condições metabólicas normais, a metabolização da homocisteína é distribuída igualmente entre estas duas vias que são coordenadas e competem pela utilização da homocisteína disponível<sup>13</sup>.

A concentração normal de homocisteína no plasma quando analisada em jejum é de aproximadamente 10  $\mu\text{mol/L}$ , devido ao mecanismo de exportação celular, com variação entre 5 a 15  $\mu\text{mol/L}$ , e acima destes valores caracteriza-se a hiperhomocisteinemia<sup>14</sup>. Kang et al.<sup>15</sup> classificaram arbitrariamente a hiperhomocisteinemia nas formas grave, para concentrações maiores que 100  $\mu\text{mol/L}$ , moderada para concentrações entre 31 e 100  $\mu\text{mol/L}$  e leve para concentrações entre 15 e 30  $\mu\text{mol/L}$ .



**Figura 2.** Representação esquemática das vias de metabolização da homocisteína<sup>16</sup>.

Desde a descoberta da homocisteína, diversos e importantes estudos prospectivos e caso-controle mostraram que a hiper-homocisteinemia é um fator de risco para doenças vasculares e é prevalente em pacientes com doença arterial periférica (DAP) (28 a 60%)<sup>17,18</sup>, comparado com 1% na população geral<sup>7</sup>. As concentrações médias de homocisteína em pacientes com diversas manifestações de DAP, como na claudicação intermitente<sup>19</sup>, nas lesões íleo-femorais<sup>20</sup>, na síndrome

de Leriche<sup>21</sup>, na estenose de carótida<sup>22</sup> e no aneurisma de aorta abdominal<sup>23</sup>, mostraram-se significativamente superiores aos encontrados nos controles. Estudos nacionais em pacientes com doença arterial coronariana<sup>24-26</sup> e periférica<sup>18, 27,28</sup> confirmaram a alta prevalência de hiper-homocisteinemia (20 a 60%) e concentração elevada de homocisteína nos doentes em relação aos controles. Um estudo de meta-análise com amostra de aproximadamente 4.000 sujeitos, concluiu que um aumento de 5 µmol/L nas concentrações plasmáticas de homocisteína, está associada com desenvolvimento doença cardiovascular na razão de risco (*odds ratio*) de 1,6 para homens e 1,8 para mulheres, comparado a 6,8 para pacientes com DAP<sup>17</sup>. Além disso, estudos prospectivos, evidenciaram que a hiper-homocisteinemia está associada ao aumento do risco de morte precoce por doença cardiovascular<sup>29</sup>, progressão da DAP<sup>30,31</sup> e da doença arterial coronariana não-fatal em pacientes com DAP sintomática<sup>32</sup>.

As causas mais comuns de hiper-homocisteinemia na população em geral, estão relacionadas aos defeitos genéticos na codificação de enzimas ou, à deficiência de vitaminas que estão envolvidas no metabolismo da homocisteína. A deficiência nutricional é altamente prevalente e pode acometer muitos casos de hiper-homocisteinemia. A concentração plasmática de homocisteína está inversamente associada às concentrações sanguíneas de folato, vitamina B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> e a ingestão dessas vitaminas, principalmente em idosos<sup>33</sup>.

A hiper-homocisteinemia genética é freqüentemente resultado de alterações moleculares associadas a heterozigose da MTHFR e CBS, que causam redução de 50% na atividade da enzima correspondente e provocam hiper-homocisteinemia leve

e moderada. Estima-se que 5 a 10% dos casos de hiper-homocisteinemia grave são causados por defeitos nas vias de remetilação, sendo a deficiência homozigótica de MTHFR (677C→T) a mais comum e menos grave quando comparada à causada pela deficiência de CBS, mas ao mesmo tempo tem pior prognóstico, porque não responde bem aos tratamentos disponíveis<sup>34</sup>. A base molecular da variante homozigótica está na substituição C→T no nucleotídeo 677 no exon 4 do gene da MTHFR. Esta substituição causa na enzima a troca de alanina por valina. Indivíduos homozigotos mutantes apresentam apenas 30% da atividade observada nos indivíduos com genótipo normal, valor este que é de 65% para o genótipo heterozigoto<sup>35</sup>. A homozigose para a enzima MTHFR está presente em 5 a 20% na população geral e foi verificada em 16,7% dos pacientes com DAP, os quais tinham homocisteína moderadamente aumentada<sup>36</sup>. No Brasil, foi verificado que 19% de 191 indivíduos com doença arterial eram homozigotos para a variante termolábil da enzima MTHFR, mas nenhuma correlação com a homocisteinemia foi estudada<sup>37</sup>. Elevações moderadas na concentração de homocisteína não são encontradas em todos os portadores deste polimorfismo, o que sugere que o fenótipo deve ser influenciado por outros fatores, como estado nutricional vitamínico, hormônios, algumas doenças e medicamentos<sup>38</sup>. Existe grande influência das concentrações séricas de folato no polimorfismo da enzima MTHFR, e a hiper-homocisteinemia em indivíduos homozigotos só é observada quando existe deficiência de folato (valores inferiores a 15,4 nmol/L)<sup>39</sup>.

### ***Mecanismos patogênicos da hiper-homocisteinemia***

Apesar da grande quantidade de dados epidemiológicos estabelecendo a correlação entre hiper-homocisteinemia e aumento do risco para doenças vasculares, os mecanismos pelos quais a hiper-homocisteinemia contribui para a aterogênese e trombogênese são apenas parcialmente compreendidos. A agressão ao endotélio parece ser um dos mecanismos pelo qual a homocisteína leva à lesão vascular. Trabalhos pioneiros *in vivo* realizados por Harker et al. em 1974<sup>40</sup> e 1976<sup>41</sup>, com primatas não humanos (babuínos), mostraram que a injeção intravenosa de L-homocisteína durante 5 dias provocou lesão endotelial caracterizada pela descamação endotelial, proliferação de células musculares lisas e espessamento da camada íntima vascular, mediada pela redução da meia vida plaquetária, com a rápida formação das lesões vasculares, similares a lesões ateroscleróticas precoces em humanos. O grau de lesão endotelial provocado pela hiper-homocisteinemia era semelhante ao observado em outros fatores de risco como na hipercolesterolemia e na hipertensão arterial.

Pesquisas experimentais nacionais e recentes reforçaram o papel da hiper-homocisteinemia, induzida pela sobrecarga de metionina, na formação de placa aterosclerótica de aorta de suínos<sup>42</sup> e artéria ilíaca de coelhos<sup>43</sup>. Após período de 30 ou 60 dias de dieta rica em metionina, houve aumento significativo nas concentrações de homocisteína e a formação de placas ateroscleróticas por macrófagos espumosos, mas não foram observadas células musculares lisas, cristais de colesterol ou células inflamatórias.

Um dos principais mecanismos de disfunção endotelial induzido pela hiper-homocisteinemia estaria relacionado à diminuição da biodisponibilidade do fator de relaxamento do endotélio, o óxido nítrico, sintetizado a partir de L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico-sintase. O óxido nítrico é um potente vasodilatador endógeno, inibidor de agregação plaquetária, migração de leucócitos, além de inibir a proliferação e a migração da célula muscular lisa, de restringir a ativação e a expressão de moléculas de adesão e a produção de ânions superóxido<sup>44</sup>. Estudos prévios em animais hiper-homocisteinêmicos, mostraram que a homocisteína reduziu a biodisponibilidade do óxido nítrico em cultura de células endoteliais, provavelmente por indução do estresse oxidativo que inativa o óxido nítrico, ou por inibição da síntese da óxido nítrico-sintase, ou ainda por aumentar as concentrações de dimetilarginina assimétrica que contribui para redução da biodisponibilidade do óxido nítrico. A dimetilarginina assimétrica é produzida a partir do catabolismo de proteínas que contêm resíduos arginina metilados e que são liberados à medida que as proteínas são hidrolisadas. A dimetilarginina assimétrica é transportada na membrana da célula endotelial e pode competir com a arginina, levando à redução significativa da produção de óxido nítrico por inibição da óxido nítrico-sintase<sup>45</sup>.

Especula-se, também, que a hiper-homocisteinemia exerceria um papel importante na disfunção endotelial através de mecanismos oxidativos e inflamatórios. O grupo sulfidríla (SH) presente na homocisteína é altamente reativo, por ser doador de elétrons nos sistemas de oxidação, sendo oxidado rapidamente em dissulfeto (SS). A homocisteína é prontamente oxidada quando chega ao plasma, principalmente em consequência de sua auto-oxidação para formar dissulfetos,

incluindo a homocistina, dissulfetos derivados de homocisteína e a homocisteína tiolactona, sendo esta última a forma mais reativa da homocisteína. O grupo sulfidrílico dos dissulfetos e da homocisteína tiolactona reagiria com o oxigênio produzindo o peróxido de hidrogênio e o superóxido, os quais iniciariam a peroxidação lipídica, tanto na superfície endotelial como nas lipoproteínas de baixa densidade (*low density lipoprotein*)<sup>46</sup>. A oxidação da LDL, favorecida principalmente pela homocisteína tiolactona, formaria agregados que seriam captados por macrófagos na camada íntima das artérias, os quais estimulariam uma resposta pró-inflamatória vascular por meio da expressão de moléculas de adesão, proteínas quimiotáticas e fatores de crescimento para formar as células espumosas, e conseqüentemente as lesões ateromatosas<sup>47</sup>. Além disso, a auto-oxidação da homocisteína no plasma poderia favorecer a redução na expressão e atividade da glutathione peroxidase e, assim, inibir o potencial antioxidante das células endoteliais<sup>47</sup>. Em culturas de células endoteliais, células musculares lisas e monócitos humanos, a hiperhomocisteinemia induziu a expressão da proteína quimiotática de monócitos (*monocyte chemoattractant protein 1-MCP-1*) e da interleucina 8 (IL-8) por ativação do fator nuclear Kappa B (*nuclear factor kB-NF-kB*) e indução da proteína C reativa (PCR) de fase aguda positiva. A MCP-1 estimula o recrutamento de macrófagos para o espaço subendotelial, a IL-8 por sua vez promove quimiotaxia de neutrófilos, e o NF-kB, um fator de transcrição, estimula a produção de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão do leucócito, e a PCR aumenta a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas. Desta maneira, essas substâncias ampliariam a resposta

inflamatória vascular e contribuiriam para o início e a progressão da aterosclerose<sup>48</sup>.

Outros efeitos da homocisteína seriam alterações nas propriedades antitrombóticas do endotélio vascular. Estudos *in vitro* em células expostas à homocisteína demonstraram um aumento da atividade dos fatores de coagulação XII e V, redução da ativação da proteína C, inibição do ativador de plasminogênio tecidual, redução da biodisponibilidade do óxido nítrico e prostaciclina, inibição da agregação plaquetária, aumento da atividade do fator de von Willebrand, inibição da expressão da trombosmodulina, indução da expressão do fator tecidual e supressão da expressão do *heparan* sulfato na parede vascular<sup>49</sup>. Todas essas alterações gerariam um ambiente trombogênico vascular com a ativação da cascata de coagulação e modificação do tônus vascular.

A variabilidade de ações da homocisteína apontada por estes estudos demonstra que ainda não há uma hipótese única explicativa para os efeitos aterotrombogênicos da homocisteína.

### ***Tratamento nutricional da hiper-homocisteinemia***

Fatores nutricionais, em particular, o consumo e a concentração sérica de folato, vitamina B<sub>12</sub> e B<sub>6</sub> parecem ser os parâmetros mais importantes na metabolização da homocisteína. As deficiências, isoladas ou combinadas, dessas vitaminas do complexo B envolvidas nas diversas vias do metabolismo da homocisteína, seriam importantes marcadores hiper-homocisteinemia<sup>50</sup>. Em idosos

norte-americanos, dois terços (67%) dos casos de hiper-homocisteinemia foram atribuídos a hábitos dietéticos inadequados em relação a uma ou mais vitaminas do complexo B<sup>51</sup>. Em indivíduos portadores de DAP, em nosso meio, a frequência de hiper-homocisteinemia naqueles com ingestão insuficiente de duas ou três vitaminas do complexo B (52,5%) foi significativamente maior em relação a aqueles com ingestão insuficiente de uma vitamina (7,5%), o que confirma a relação entre hiper-homocisteinemia e estado nutricional vitamínico<sup>18</sup>. De acordo com estudo prospectivo de 12 anos de seguimento e com 46.036 participantes do sexo masculino<sup>52</sup> o consumo de folato alimentar e suplementos contendo ácido fólico estariam associados inversamente com a ocorrência de DAP e poderiam contribuir para a prevenção desta doença vascular.

A deficiência dietética de folato provocaria a formação insuficiente da 5-MTHF, o qual é necessário como um grupo doador de radical metil na remetilação da homocisteína para metionina. A deficiência da vitamina B<sub>12</sub>, por sua vez, levaria a um prejuízo na transferência do radical metil da 5-MTHF para a homocisteína na via de remetilação através da metionina sintetase. Logo, a deficiência da vitamina B<sub>6</sub> prejudicaria a conversão da homocisteína em cisteína pelas enzimas CBS e  $\gamma$ -cistationase, as quais são ativadas pela vitamina B<sub>6</sub> na via da transulfuração. Estas condições favoreceriam o acúmulo de homocisteína intracelular, a qual seria transportada para o compartimento extracelular, e conseqüentemente provocaria aumento das concentrações circulantes de homocisteína. Esse processo restringiria a toxicidade intracelular, mas, por outro lado, poderia expor o meio vascular aos efeitos deletérios do excesso de homocisteína<sup>53</sup>. Dentre essas vitaminas, o folato

seria o determinante dietético mais importante da concentração de homocisteína, pois sua deficiência poderia restringir a via de remetilação da homocisteína a metionina e favorecer o seu acúmulo no meio extracelular<sup>50</sup>.

Folato é um termo genérico utilizado para denominar esta vitamina essencial e hidrossolúvel do complexo B, o qual apresenta-se sob a forma ativa de ácido tetrahidrofólico e tem função de co-enzima para reações de transferência de unidades de carbono necessárias em várias vias metabólicas, incluindo o metabolismo de purinas e pirimidinas, bem como interconversões de aminoácidos. O ácido fólico (ácido pteroil**monog**lutamato), forma oxidada e estável do folato, embora seja raramente encontrada nos alimentos, é a forma utilizada em suplementos vitamínicos e em produtos alimentícios fortificados, representando 20% do folato da dieta. Nos alimentos naturais, o chamado folato alimentar, é encontrado na forma de pteroil**poli**glutamato que representa aproximadamente 80% do folato da dieta (Quadro 1).

O consumo ideal das vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> e folato é definido pela *Recommended Dietary Allowance* (RDA) ou Recomendações de Cotas Alimentares preconizadas pela *Dietary Reference Intakes*<sup>54</sup>, definidas como nível de consumo alimentar suficiente para satisfazer as necessidades de quase todo indivíduo saudável (entre 97 e 98%) compreendido num determinado grupo, faixa etária e estágio da vida (Quadro 2).

<b>Alimento</b>	<b>Folato (µg/100g)</b>
Fígado de galinha grelhado	560
Farinha de soja	303
Fígado bovino grelhado	253
Feijão cozido	149
Espinafre cozido	73
Brócolis cru	71
Farinha de aveia	52
Farelo de trigo	44
Ovo cozido	44
Laranja	30
Couve crua	29
Pão branco	25
Banana	20
Tomate cru	15
Batata cozida	9
<b>Alimento</b>	<b>Vitamina B<sub>12</sub> (µg/100g)</b>
Fígado bovino grelhado	70,5
Fígado de galinha grelhado	16,8
Peixe grelhado	2,8
Carne bovina	2,4
Queijo tipo mozzarella	2,2
Camarão cozido	1,8
Ovo cozido	1,3
Leite de vaca integral	0,4
<b>Alimento</b>	<b>Vitamina B<sub>6</sub> (mg/100g)</b>
Fígado bovino grelhado	1,00
Fígado de galinha grelhado	0,87
Farinha de aveia	0,16
Farelo de trigo	0,34
Banana	0,36
Abacate	0,25
Batata cozida	0,26
Brócolis cozido	0,20
Oleaginosas	0,27
Feijão cozido	0,06

**Quadro 1.** Conteúdo de folato, vitamina B<sub>12</sub> e B<sub>6</sub> em diversos alimentos<sup>55</sup>.

<b>Sexo/ Faixa etária (anos)</b>	<b>Folato (<math>\mu\text{g}/\text{dia}</math>)</b>	<b>Vitamina B<sub>6</sub> (mg/dia)</b>	<b>Vitamina B<sub>12</sub> (<math>\mu\text{g}/\text{dia}</math>)</b>
<b>Homens</b>			
19-30	400	1,3	2,4
31-50	400	1,3	2,4
51-70	400	1,7	2,4
71 ou mais	400	1,7	2,4
<b>Mulheres</b>			
19-30	400	1,3	2,4
31-50	400	1,3	2,4
51-70	400	1,5	2,4
71 ou mais	400	1,5	2,4

**Quadro 2.** Recomendações de Cotas Alimentares (*Recommended Dietary Allowance -RDA*) preconizadas pela *Dietary Reference Intakes*<sup>54</sup>.

Em 1996 a *Food and Drug Administration* (FDA) regulamentou a fortificação de cereais como farinha, arroz, massas e milho com 140  $\mu\text{g}$  de ácido fólico por 100 g de produto com o objetivo de reduzir o risco de defeitos do tubo neural em recém-nascidos. Após esta regulamentação foi observado um aumento significativo nas concentrações de folato sérico e redução significativa nas concentrações de homocisteína em 350 adultos e idosos participantes do *Framingham Offspring Study*<sup>56</sup>. A fortificação com 499 e 665  $\mu\text{g}$  de ácido fólico para 30 g de cereais matinais foi igualmente eficaz em reduzir a homocisteinemia e aumentar o folato sérico em pacientes com doença arterial coronariana, entretanto, a fortificação com 127  $\mu\text{g}$ , quantidade que se aproxima daquela proposta pela FDA, foi insuficiente para reduzir significativamente a homocisteinemia e induzir um aumento moderado de folato sérico. Portanto, a homocisteinemia reduziu e o folato sérico aumentou linearmente com o aumento de ácido fólico contido no cereal. Diante desses resultados, os autores sugeriram que um nível de fortificação superior

(aproximadamente 350 µg) ao proposto pela FDA deveria ser assegurado<sup>57</sup>. O Brasil não dispõe de informações recentes, de representatividade nacional, sobre carências de micronutrientes entre adultos. Mesmo assim, houve decisão governamental da fortificação universal das farinhas de trigo e milho produzidas no País com ácido fólico<sup>58</sup>, com base em estudos de abrangência local, realizados por diferentes instituições em várias regiões geográficas. A resolução tornou obrigatória a fortificação dos cereais como farinha de trigo e milho com 150 µg de ácido fólico por 100 g de cereal, o que representa 37% da RDA para adultos, com o objetivo de prevenir defeitos do tubo neural em recém-nascidos e carência em crianças e adultos<sup>59</sup>.

Considerando-se que a hiper-homocisteinemia é comum em indivíduos que apresentam comprometimento nutricional das vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e principalmente do folato, e pela significativa participação dessas vitaminas sobre a homocisteinemia, diversos estudos utilizaram com sucesso essas vitaminas para reduzir as concentrações sanguíneas deste aminoácido. O folato, isoladamente ou em combinação com a vitamina B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>, pode reduzir a homocisteína plasmática, inclusive na ausência de deficiências. Ainda não há consenso sobre a dose exata dessas vitaminas para o tratamento da hiper-homocisteinemia, sendo que diferentes doses foram utilizadas em muitos estudos. A contribuição da terapia vitamínica, em especial do ácido fólico, na hiper-homocisteinemia é muito estudada em indivíduos saudáveis e na doença arterial coronariana, mas ainda é escassa na DAP (Quadro 3).

Meta-análise de 11 estudos realizada por Boushey et al.<sup>17</sup> em 1995 mostrou resultados pioneiros do efeito do tratamento com ácido fólico sobre a homocisteinemia nas doenças vasculares coronariana, cerebral e periférica. Nove estudos de intervenção mostraram redução da homocisteína e normalização do folato sérico após suplementação isolada de ácido fólico (mais que 400 µg/dia) e concluíram que o consumo de aproximadamente 200 µg de folato dietético (3 porções ou mais de frutas e vegetais ao dia) reduziria em 4 µmol/L as concentrações de homocisteína na doença cardiovascular, cerebrovascular e arterial periférica. Entretanto, os autores ressaltaram que nem todas doenças vasculares associadas à hiper-homocisteinemia seriam prevenidas com a suplementação de ácido fólico, e que a fortificação ou aumento no consumo de alimentos com folato poderia ter um impacto preventivo maior.

Em outra meta-análise com 12 estudos randomizados e 1114 indivíduos<sup>60</sup>, os efeitos redutores do ácido fólico sobre a homocisteína na doença vascular também foram verificados. A utilização diária de 50 a 500 µg de ácido fólico entre 3 e 12 semanas reduziu em 25% a concentração de homocisteína, e a redução foi maior em indivíduos hiperhomocisteinêmicos (maior que 12 µmol/L) e com deficiência sérica de folato (menor que 12 nmol/L) antes do tratamento com ácido fólico. Os autores relataram ainda que a suplementação com vitamina B<sub>12</sub> potencializou a redução da homocisteína em 7% e a vitamina B<sub>6</sub> não teve efeito adicional na redução da homocisteína.

Estudos realizados em nosso meio, confirmaram esses achados . Um estudo caso-controle com a suplementação de ácido fólico (500 µg) associado à vitamina

B<sub>12</sub> (40 mg) em 40 pacientes com DAP sintomática mostrou eficiência na normalização da homocisteinemia em 4 semanas de tratamento (antes  $18,80 \pm 7,73$   $\mu\text{mol/L}$  e após  $11,34$   $\mu\text{mol/L}$   $p < 0,001$ ), ao contrário da suplementação com vitamina B<sub>6</sub> (250 mg) que não alterou a homocisteinemia<sup>61</sup>. Da mesma forma, outro estudo do tipo cruzado realizado com indivíduos adultos hipertensos praticantes de exercício físico supervisionado, mostrou redução significativa das concentrações médias de homocisteína após 2 meses de tratamento com ácido fólico (500  $\mu\text{g}$ ) na ausência do uso de diurético<sup>62</sup>.

Qual seria a melhor forma de fazer a suplementação? Estudo comparativo de 3 formas de suplementação com ácido fólico sobre a homocisteinemia mostraram que: 1- o consumo diário de cereais matinais fortificados e, 2- o uso de suplementos pareceram ser os métodos mais eficientes para aumentar os níveis de folato e reduzir a homocisteína sanguínea; 3- que o aumento no consumo de alimentos ricos em folato, não seria, propriamente, uma estratégia eficiente para reduzir a homocisteinemia, provavelmente pelas variações na biodisponibilidade do folato nas frutas e vegetais e pela ingestão pouco freqüente desses alimentos<sup>63</sup>. Outros autores sugeriram ser improvável que a dieta isoladamente fosse suficiente para aumentar a concentração de folato circulante e reduzir a homocisteinemia, uma vez que o folato alimentar (pteroilpoliglutamato) apresentaria metade da biodisponibilidade do ácido fólico proveniente de suplementos (pteroilmonoglutamato)<sup>64</sup>. A maior parte dos folatos presentes nos alimentos embora bastante estável à luz, é lábil e termosensível. Essas características levam a perdas consideráveis do folato no processamento de alimentos em temperaturas elevadas. Desta forma, 50 a 90% do

conteúdo desta vitamina podem ser destruídos pela cocção ou por outros processos tais como de envaze e refinamento<sup>54</sup>.

O consumo de alimentos fortificados ou suplementos com vitamina B<sub>12</sub> também são recomendados na hiper-homocisteinemia em idosos, pois de 10 a 30% destes podem apresentar má-absorção desta vitamina pela redução do fator intrínseco, e os suplementos garantem absorção adequada por difusão passiva e, portanto, sem a presença de fator intrínseco<sup>64</sup>.

Apesar da existência de estudos demonstrando que a ingestão de alimentos ricos em folato não foi suficiente para reduzir a homocisteína plasmática, outros estudos mostraram que após a ingestão de aproximadamente 600µg de folato alimentar presente em alimentos de origem vegetal (hortaliças, legumes e frutas) houve redução da homocisteinemia, além de benefícios adicionais de redução no consumo de gordura saturada e aumento no consumo de fibras, ferro, tiamina, vitamina C e B<sub>6</sub>. Vale relatar que ao contrário dos suplementos ou alimentos fortificados, a quantificação do consumo de folato alimentar é imprecisa pela variação das tabelas de composição, e necessita de diversos períodos de observação<sup>65,66</sup>.

Autor/ Desenho do estudo	População estudada	Número de pacientes	Período do tratamento (semanas)	Tratamento	Resultados
Boushey et al. (1995) <sup>17</sup> Meta-análise	Coronariana Cerebrovascular Arterial periférica	-	-	Mais que 400µg de ácido fólico	↓ de 4 µmol/L de Hct
Homocysteine Lowering Collaboration, 1998 <sup>60</sup> Meta-análise	-	1.114	3 e 12	50 a 500 µg de ácido fólico 0,5 mg de vitamina B <sub>12</sub> 16,5 mg de vitamina B <sub>6</sub>	↓ 25% Hct ↓ adicional de 7% Hct sem alteração
Malinow et al. (1998) <sup>57</sup> Duplo-cego Cruzado	Arterial coronariana	75	5	Fortificação de cereais 127 µg/30g 499 µg/30g 665 µg/30g	↓ 3,7% Hct (p=0,24) ↓ 11% Hct (p<0,001) ↓ 14% Hct (p=0,001)
Brouwer et al. (1999) <sup>65</sup> Caso-controle	Adultos saudáveis	66	4	560 µg folato alimentar 210 µg folato alimentar + 500 µg suplemento de ácido fólico 250 µg suplemento de ácido fólico	↓ 11,0 para 9,5 µmol/L de Hct (p<0,001) ↓ 10,8 para 9,0 µmol/L de Hct (p< 0,001) sem alteração
Riddell et al. (2000) <sup>63</sup> Caso-controle	Adultos e idosos saudáveis	65	12	Ácido fólico 437 µg suplemento 298 µg cereal fortificado 418 µg folato alimentar	↓ 21% da Hct (p<0,001) ↓ 24% da Hct (p<0,001) sem alteração
Venn et al. (2002) <sup>66</sup> Caso-controle	Adultos e idosos saudáveis	34	17	628 µg folato alimentar	↓ 12,0 para 9,7 µmol/L de Hct (p<0,05)
Venâncio (2003) <sup>61</sup> Caso-controle	Arterial periférica	40	4	500 µg de ácido fólico + 40 mg de cobalamina 250 mg de piridoxina	↓ 39,6% Hct (p<0,001) sem alteração
Pereira (2004) <sup>62</sup> Cruzado	Hipertensão arterial	69	8	500 µg de ácido fólico	↓ 11 a 19% Hct (p<0,05)

Hct: homocisteína plasmática; ↓: redução

**Quadro 3.** Resultados obtidos em estudos de intervenção para redução da concentração de homocisteína plasmática.

Outros efeitos terapêuticos da utilização de vitaminas, em especial do folato, foram investigados na hiper-homocisteinemia, sobretudo em alguns marcadores biológicos do processo de aterosclerose possivelmente associados à hiper-homocisteinemia, como a disfunção endotelial, coagulabilidade, proliferação de células musculares, atividade de espécies reativas do metabolismo de oxigênio<sup>45</sup>, resposta pró-inflamatória<sup>67,68</sup> e a oxidação da fração LDL<sup>46</sup>. Vale ressaltar que pela variabilidade dos mecanismos pelos quais a hiper-homocisteinemia contribui para a aterogênese e trombogênese, ainda não há uma hipótese conclusiva para esses mecanismos.

Neste sentido, alguns estudos realizados na área de cardiologia<sup>69-71</sup> e em indivíduos saudáveis<sup>72-74</sup>, adultos e idosos, hiper-homocisteinêmicos ou não, mostraram redução da disfunção endotelial pelo aumento significativo na resposta vasodilatadora dependente ou independente do endotélio da artéria braquial com altas doses de ácido fólico (500 a 1.000 µg), em 6 a 12 semanas de tratamento. Nestes estudos, a avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio foi realizada por comparação em resposta a um período de isquemia (torniquete), e a resposta vasodilatadora independente do endotélio, ou seja, por ação direta sobre as células musculares lisas, foi avaliada após administração de agentes vasoativos como a nitroglicerina sublingual. Através dessas técnicas foi possível analisar o diâmetro e as mudanças do fluxo sanguíneo na artéria braquial através do Doppler ultrassom e da pletismografia. O mecanismo pelo qual o ácido fólico melhora a resposta vasodilatadora é desconhecido, mas especula-se que com a redução da

homocisteína circulante há uma maior biodisponibilidade de óxido nítrico pelo estímulo da óxido nítrico-sintase endotelial, o que favorece a vasodilatação<sup>73</sup>.

A utilização de ácido fólico por 2 meses em modelo experimental de ratos hiper-homocisteinêmicos submetidos a endarterectomia de carótida foi eficiente em reduzir a concentração de homocisteína e a hiperplasia intimal, avaliada através percentagem de estenose luminal. Os achados deste estudo sustentam a teoria de que a hiper-homocisteinemia aumenta o estímulo mitogênico das células musculares lisas produzindo uma ampla hiperplasia intimal em resposta ao modelo de endarterectomia de carótida. Com base nesses resultados, os autores sugeriram a análise da homocisteína plasmática no pré-operatório de endarterectomia, e se for constatada a hiper-homocisteinemia, os pacientes poderiam iniciar a terapia com ácido fólico e evitar a restenose pós-endarterectomia<sup>75</sup>. Em outro estudo experimental com ratos, a indução da hiper-homocisteinemia aumentou a percentagem de lesão endotelial em vasos cerebrais visualizada por microscopia eletrônica, que segundo os autores foi provocada por alterações no metabolismo oxidativo intracelular. As lesões endoteliais encontradas nos ratos hiper-homocisteinêmicos eram semelhantes às lesões tipicamente encontradas em doenças cerebrais degenerativas como o *Alzheimer* e o *Parkinson*. Em contrapartida, a inclusão de doses moderadas de ácido fólico na dieta por 8 semanas, resultaram em mudanças morfológicas e, conseqüentemente reduziram significativamente essas lesões endoteliais<sup>76</sup>. Em 250 pacientes submetidos à angioplastia coronariana, a terapia combinada de ácido fólico (1.000µg), vitamina B<sub>12</sub> (400µg) e B<sub>6</sub> (10 mg) utilizada por 6 meses, pode ser utilizada como terapia adjuvante na angioplastia

coronariana, pois promoveu redução significativa da homocisteinemia e da taxa de restenose pós-angioplastia<sup>77</sup>.

A influência da terapia com ácido fólico sobre marcadores inflamatórios sistêmicos da aterosclerose como a PCR e a LDL-oxidada, ainda é controversa. Resultados observados em um recente estudo com homens e mulheres saudáveis que receberam 800 µg de ácido fólico (n=264) ou placebo (n=266) diariamente por 12 meses, indicaram que houve aumento de 400% na concentração de folato sérico, redução significativa nas concentrações de homocisteína (28%) e manutenção das concentrações de PCR us e LDL-oxidada<sup>78</sup>. Em estudo controlado duplo-cego semelhante ao anterior, com 65 pacientes hiperhomocisteinêmicos portadores de DAP sintomática recebendo placebo, ou combinação de vitaminas do complexo B (B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>), ou ácido fólico (500 µg) por 6 meses, observou-se que o tratamento para redução da homocisteína não alterou os marcadores de homeostase (fator tissular-TF e inibidor da via do fator tissular-TFPI), de inflamação crônica como a PCR us, interleucinas (6, 8 e 18) e proteína quimiotática de monócito (MCP-1)<sup>79</sup>. Os autores concluíram que o tratamento para redução da homocisteína em pacientes com DAP sintomática é questionável quanto ao controle do processo inflamatório crônico inerente a aterosclerose e interrogaram sobre o efeito da hiperhomocisteinemia na inflamação crônica e na coagulação de pacientes com DAP sintomática. A utilização de vitaminas antioxidantes como o alfa-tocoferol, ácido ascórbico, beta-caroteno, associadas ao ácido fólico e à vitamina B<sub>12</sub> por 15 dias, foi mais efetiva em reduzir significativamente a oxidação da LDL *in vitro* em pacientes com doença arterial coronariana<sup>80</sup>.

Tendo em vista o conjunto destes trabalhos, para se combater formas leves de hiper-homocisteinemia, a adequação dietética ou a utilização de alimentos fortificados com ácido fólico seria a maneira mais indicada, e nos casos de hiper-homocisteinemia moderada, a suplementação medicamentosa com ácido fólico seria a mais recomendada por ser mais eficiente em reduzir a homocisteinemia.

### ***Efeitos do tratamento da hiper-homocisteinemia sobre a morbidade e mortalidade por doenças vasculares***

Atualmente, diversos estudos prospectivos foram realizados para avaliar os efeitos da suplementação com as vitaminas envolvidas no metabolismo da homocisteína, sobre a prevalência e/ou a progressão das lesões ateroscleróticas nos diversos setores vasculares.

Em estudo pioneiro, 232 pacientes adultos portadores de DAP sintomática, sendo 30% com hiper-homocisteinemia ( $17,8 \pm 12,7 \mu\text{mol/L}$ ), foram estes tratados com 500  $\mu\text{g}$  de ácido fólico associado à vitamina B<sub>6</sub> (250 mg) por 2 anos. Houve redução significativa da concentração de homocisteína ( $17,8 \pm 12,7$  para  $8,2 \pm 2,2 \mu\text{mol/L}$ ) e da frequência da progressão da DAP, mas não da incidência de novos eventos cerebrais ou coronarianos nos pacientes hiper-homocisteinêmicos após o tratamento vitamínico em comparação com os normo-homocisteinêmicos não tratados. Neste estudo, os diagnósticos de progressão foram: 1- sintomatologia juntamente com a redução do índice de pressão tornozelo-braço e/ou por angiografia para DAP; 2- presença de ataque isquêmico transitório ou acidente vascular cerebral,

para doença cerebral ; 3- presença do infarto agudo do miocárdio ou progressão da angina *pectoris* para doença arterial coronariana<sup>81</sup>. Em outro estudo, pacientes com doença vascular periférica, coronariana ou cerebral, a suplementação com ácido fólico (500 µg) associada à vitamina B<sub>6</sub> (250 mg) quando comparado com o grupo placebo, mostrou somente redução da taxa anormal do teste eletrocardiográfico no exercício, mas nenhum efeito sobre o índice de pressão tornozelo-braço ou na regressão de lesões ateroscleróticas na carótida e artéria femoral<sup>82</sup>.

Em concordância com o estudo anterior, a suplementação com 500 µg de ácido fólico por 2 anos, não reduziu a recorrência de eventos cardiovasculares em 300 pacientes<sup>83</sup>.

Com o objetivo de verificar a recorrência de acidente vascular cerebral (AVC), novos eventos coronarianos e morte, foi realizado um estudo multicêntrico duplo-cego randomizado controlado denominado VISP (*The Vitamin Intervention for Stroke Prevention*) que avaliou 3.680 adultos e idosos com diagnóstico prévio de AVC. Os participantes que apresentavam homocisteína plasmática abaixo de 10 µmol/L foram distribuídos em dois grupos distintos, um recebendo altas doses de ácido fólico, vitamina B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> (2.500 µg, 25 mg e 400 µg, respectivamente) e outro recebendo baixas doses (20 µg, 0,2mg e 6 µg, respectivamente). Após 2 anos de seguimento, a suplementação com baixas doses das vitaminas foi mais eficiente em reduzir a homocisteína, o risco de AVC (10% p=0,05), de eventos coronarianos (26% p< 0,001) e de morte (16% p=0,001). Uma provável explicação para o tratamento com altas doses não ter sido eficiente, estaria associado a homocisteinemia no pré-

tratamento, uma vez que a resposta ao tratamento vitamínico sabidamente é mais eficiente em indivíduos hiper-homocisteinêmicos<sup>84</sup>.

A fortificação de cereais com ácido fólico, bem como o uso de suplementos reduziu o risco relativo de doença coronariana de 8% a 23% em mulheres com idade acima de 55 anos e 11 a 13% em homens com mais de 45 anos<sup>85,86</sup>, e de acordo com os autores, pode ser uma estratégia benéfica, não onerosa somente nos casos de hiper-homocisteinemia.

Diante dos resultados conflitantes desses estudos prospectivos, uma recente revisão sistemática da *Cochrane Library*<sup>87</sup> concluiu que estudos bem desenhados deveriam ser realizados urgentemente para avaliar o impacto do tratamento da hiper-homocisteinemia sobre a progressão da DAP. Os autores enfatizaram que a homocisteína é fácil de ser avaliada, e mais importante, fácil e barata de ser tratada.

### **Considerações finais**

As informações atualmente disponíveis evidenciam que a suplementação combinada de folato, vitamina B<sub>12</sub> e B<sub>6</sub> pode ser utilizada no tratamento da hiper-homocisteinemia. De fato a suplementação ou, a fortificação, ou a adequação dietética isolada do folato promove redução eficiente da homocisteína plasmática e configura-se um procedimento custo-efetivo que apresenta eficácia, sem reações adversas tratando-se, portanto, de um coadjuvante terapêutico com uma relação risco/benefício bastante favorável no controle da homocisteinemia. Quanto ao impacto da suplementação sobre a morbi-mortalidade por doenças vasculares, os estudos mostraram-se divergentes e inconclusivos.

## **Referências Bibliográficas**

---

1. Stoyioglou A, Jaff MR. Medical treatment of peripheral arterial disease: A comprehensive review. *J Vasc Interv Radiol* 2004; 15:1197-1207.
2. Hiatt WR. Medical Treatment of peripheral arterial disease and claudication. *N Engl J Med* 2001; 344:1608-21.
3. Lastória S, Maffei FHA. Aterosclerose obliterante periférica: Epidemiologia, fisiopatologia, quadro clínico e diagnóstico. In: Maffei FHA, Lastória S, Yoshida WB, Rollo HA (Eds.) *Doenças vasculares periféricas*. Rio de Janeiro: MEDSI. 2002, p.1007-1024.
4. Ministério da Saúde (Brasil). DATASUS. SIM- Sistema de Informação sobre Mortalidade. Brasília, 2006. Disponível em : <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obtuf.def>. Acesso em : 06 de out. 2006.
5. WHO. World Health Organization. Core Health Indicators 2002. Disponível em [http://www3.who.int/whosis/core/core\\_select\\_process.cfm](http://www3.who.int/whosis/core/core_select_process.cfm). Acesso em: 06 de out. 2006.
6. Bhatt DL, Steg PG, Ohman EM et al. International prevalence, recognition, and treatment of cardiovascular risk factors in outpatients with atherothrombosis. *JAMA* 2006; 295:180-9.
7. TransAtlantic Intersociety Consensus (TASC) Working Group. Management of peripheral arterial disease (PAD). *Int Angiol* 2000; 19:5-34.

8. Hirch AT, Criqui MH, Treat-jacobson D, Regensteiner JG, Creager MA, Olin JW, Krook SH et al. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA* 2001; 286:1317-24.
9. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Brattström L, Ueland PM. Total homocysteine and cardiovascular disease. *J Intern Med* 1999; 246:425-54.
10. Malinow MR. Homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases. *J Intern med* 1994; 236:603-17.
11. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56:111-28.
12. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999; 19:217-46.
13. Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia:interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 131-8.
14. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993; 39:1764-79.
15. Kang SS, Wong PWK, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr* 1992; 12:279-98.
16. Rassoul F, Richter V, Janke C, Purschwitz K, Klötzer B, Geisel J, Herrman W. Plasma homocysteine and lipoprotein profile in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Angiology* 2000 ; 51:189-96.

17. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA* 1995; 274:1049-57.
18. Venancio LS. Indicadores nutricionais e níveis de homocisteína em pacientes com doença arterial periférica. 2002. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).
19. Mølgaard J, Malinow MR, Lassvik C, Holm AC, Upson B, Olsson AG. Hyperhomocyst(e)inaemia: an independent risk factor for intermittent claudication. *J Intern Med* 1992; 231:273-9.
20. Malinow MR, Kang SS, Taylor LM, et al. Prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1989; 79:1180-8.
21. Brattström L, Israelson B, Norrving B, et al. Impaired homocysteine metabolism in early-onset cerebral and peripheral occlusive arterial disease. *Atherosclerosis* 1990; 81: 51-60.
22. Tsai MY, Arnett DK, Eckfeldt JH, Willians RR, Ellison RC. Plasma homocysteine and its association with carotid intimal-medial wall thickness and prevalent coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2000; 151: 519-24.
23. Brunelli T, Prisco D, Fedi S, et al. High prevalence of mild hyperhomocysteinemia in patients with abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2000; 32: 531-6.
24. Tavares JR, D´Almeida V, Diniz DC et al. Analysis of plasma homocysteine levels in patients with unstable angina. *Arq Bras Cardiol* 2002; 79:167-72.

25. Taddei CFG, Batlouni M, Sarteschi C et al. Hiper-homocisteinemia como fator de risco para doença aterosclerótica coronariana em idosos. *Arq Bras Cardiol* 2005; 85:166-73.
26. Faria-Neto JR, Chagas ACP, Bydlowski SP et al. Hyperhomocysteinemia in patients with coronary artery disease. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39:435-63.
27. Garófolo L, Barros JR N, Ferreira SRG, Sanudo A, Miranda JR F. Moderate hyperhomocysteinemia in atherosclerotic peripheral arterial disease in the diabetics nipo-brazilian population in the city of Bauru. *J Vasc Br* 2003; 02- supl.1: S82.
28. Miranda JR F, Garófolo L, Barros JR N, Ferreira SRG, Sanudo A. Influence of gender in a association between moderate hyperhomocysteinemia and peripheral arterial disease in diabetics nipo-brazilian in the city of Bauru. *J Vasc Br* 2003; 02- supl.1: S82.
29. Graham IM, Daly LE, Refsum H, et al. Homocisteína plasmática como fator de risco para doença cardiovascular. *JAMA* 1997; 277: 1775-81.
30. Nicoloff AD, Taylor LM, Sexton GJ, et al. Relationship between site of initial symptoms and subsequent progression of disease in a prospective study of atherosclerosis progression in patients receiving long-term treatment for symptomatic peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 2002; 35: 38-47.
31. Taylor LM, De Frang RD, Harris Jr EJ, Porter JM. The association of elevated plasma homocyst(e)ine with progression of symptomatic peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 1991; 13:128-36.

32. Taylor LM, Moneta GL, Sexton GJ, Schuff RA, Porter JM. Prospective blinded study of the relationship between plasma homocysteine and progression of symptomatic peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 1999; 29: 8-21.
33. Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF, Rush D, ROSENBERG IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993; 270:2693-8.
34. Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 81: 165-76.
35. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10:111-3.
36. Verhoeff BJ, Trip MD, Prins MH, Kastelein JJP, Reitsma PH. The effect of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation on levels of homocysteine, folate, vitamin B12 and on the risk of premature atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998; 141:161-6.
37. Arruda VR, Von Zuben PM, Chiaparini LC, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF. The mutation ala 677→val in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 77:818-21.
38. Muniz MTC. Avaliação do polimorfismo genético para MTHFR (metilenotetrahidrofolato reductase) e sua correlação com os níveis de homocisteína em pacientes com doença arterial coronariana- Recife-Brasil. 2002. Tese (Doutorado)- Biologia Molecular- Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

39. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 93:7-9.
40. Harker LA, Slichter SJ, Scott CR, Ross R. Homocysteinemia, vascular injury and arterial thrombosis. *N Engl J Med* 1974; 291: 537-43.
41. Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR. Homocystine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 1976; 58: 731-41.
42. França LHG, Pereira AH, Perini SC et al. Aterogênese em artéria ilíaca comum de suínos submetidos à homocisteinemia induzida pela ingestão de metionina. *J Vasc Br* 2006; 5:11-6.
43. Stahlke Júnior HJ, França LHG, Stahlke PH, Stalhke PS. Hiper-homocisteinemia causando aterogênese na aorta de coelhos-modelo experimental. *J Vasc Br* 2004; 3:20-30.
44. Cerqueira NF, Yoshida WB. Óxido nítrico.Revisão. *Acta Cir Bras* 2002; 17: 417-23.
45. Lentz SR. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. *J Thromb Haemost* 2005; 8:1646-54.
46. Blom HJ. Consequences of homocysteine export and oxidation in the vascular system. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26:227-32.
47. Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death Diff* 2004; 11: S56–S64.

48. Poddar R, Sivasubramanian N, Dibello PM, Robinson K, Jacobsen DW. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells. Implications for vascular disease. *Circulation* 2001; 103:2717-23.
49. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 1042-9.
50. Graham IM, O'Callaghan P. Vitamins, homocysteine and cardiovascular risk. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002; 16:383-9.
51. Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993; 270:2693-8.
52. Durand P, Prost M, Loreau N, Lussier-Cacan A, Blache D. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest* 2001; 81:645-72.
53. Merchant AT, Hu FB, Spiegelman D, Willet WC, Rimm EB, Ascherio A. The use of B vitamin supplements and peripheral arterial disease risk in men are inversely related. *J Nutr* 2003; 133:2863-7.
54. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes (DRI) for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B<sub>6</sub>, folate, vitamin B<sub>12</sub>, pantothenic acid, biotin, and coline. Washington (DC): National Academy Press; 2000.
55. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2001. USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 11. Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>.

56. Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PWF, Rosenberg IH. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 1999; 340:1449-54.
57. Malinow MR, Duell PB, Hess DL, Anderson PH, Kruger WD, Phillipson BE, Gluckman RA et al. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary heart disease. *N Engl J Med* 1998; 338:1009-15.
58. Ministério da Saúde (Brasil)- Secretaria de Atenção à Saúde- Coordenação-geral da política de alimentação e nutrição. Guia alimentar para a população brasileira- Promovendo a alimentação saudável. Referencial teórico- Deficiências nutricionais. Brasília-DF. 2005, p. 20.
59. ANVISA (Brasil). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária- Divulga-Informes Técnicos. Farinha terá ácido fólico para combater anencefalia em bebês. 2002 (acesso 23/07/2006 em <https://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2002>).
60. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomized trials. *BMJ* 1998; 316: 894-8.
61. Venâncio LS, Santos MDB, Yoshida WB. Efeitos da suplementação vitamínica de ácido fólico, vitamina B12 e vitamina B6 sobre a concentração de homocisteína em indivíduos portadores de doença arterial periférica. *J Vasc Br* 2003; 2 (supl. 1) S83.
62. Pereira AF. Efeito da suplementação de ácido fólico e do exercício físico sobre as concentrações de homocisteína plasmática em indivíduos portadores de hipertensão

arterial essencial. 2004. Tese (Doutorado)- Ciências dos Alimentos, Universidade de São Paulo (USP).

63. Riddell LI, Chisholm A, Williams S, Mann JI. Dietary strategies for lowering homocysteine concentrations. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1448-54.

64. Omenn GS, Beresford SAA, Motulsky AG. Preventing coronary heart disease: B vitamins and homocysteine. *Circulation* 1998; 97:421-4.

65. Brouwer IA, van Dusseldorp M, West CE, et al. Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. *J Nutr* 1999;129:1135–9.

66. Venn BJ, Mann JI, Williams SM, Riddell LJ, Chisholm A, Harper MJ, Aitken W. Dietary counseling to increase natural folate intake: a randomized, placebo-controlled trial in free-living subjects to assess effects on serum folate and plasma total homocysteine. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 758-65.

67. Kuller LH, Evans RW. Homocysteine, vitamins and cardiovascular disease. *Circulation* 1998; 98:196-9.

68. Brevetti G, Silvestro A, Di Giacomo S, Burcur R, Di Donato A, Schiano V, Scopacasa F. Endotelial dysfunction in peripheral arterial disease is related to increase in plasma markers of inflammation and severity of peripheral circulatory impairment but not to classic risk factors and atherosclerotic burden. *J Vasc Surg* 2003; 38:374-9.

69. Chambers JC, Ueland PM, Obeid OA, Wrigley J, Refsum H, Kooner JS. Improved vascular endothelial function after oral B vitamins-An effect mediated through reduced concentrations of free plasma homocysteine. *Circulation* 2000; 120:2479-83.

70. Title LM, Cummings PM, Giddens K, Genest JJ, Nassar BA. Effect of folic acid and antioxidant vitamins on endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:758-65.
71. Thambyrajah J, Landray MJ, Jones HJ, McGlynn FJ, Wheeler DD, Townsend JN. A randomized double-blind placebo-controlled trial of the effect of homocysteine-lowering therapy with folic acid on endothelial function in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37:1858-63.
72. Bellamy MF, McDowell IFW, Ramsey NM, Brownlee M, Newcombe RG, Lewis MJ. Oral folate enhances endothelial function in hyperhomocystaemic subjects. *Eur J Clin Invest* 1999; 29:659-62.
73. Usui M, Matsuoka H, Miyzaki H, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endothelial dysfunction by acute hyperhomocyst(e)inaemia: restoration by folic acid. *Clinical Science* 1999; 96:235-9.
74. Woo KS, Chook P, Lolin YI, Sanderson JE, Metreweli C, Celermajer DS. Folic acid improves arterial endothelial function in adults with hyperhomocysteinemia. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:2002-6.
75. Smith TP, Cruz CP, Brown AT, Eidt JF, Moursi MM. Folate supplementation inhibits intimal hyperplasia induced by a high-homocysteine diet in a rat carotid endarterectomy model. *J Vasc Surg* 2001; 34:474-81.
76. Lee H, Kim J, Kim HJ, Lee I, Chang N. Folic acid supplementation can reduce the endothelial damage in rat brain microvasculature due to hyperhomocysteinemia. *J Nutr* 2005; 135: 544-8.

77. Schnyder G, Roffi M, Pin R, Flammer Y, Lange H, Eberli FR, Meier B et al. Decreased rate of coronary restenosis after lowering of plasma homocysteine levels. *N Engl J Med* 2001; 345:1593-600.
78. Durga J, van Tits LJH, Schooten EG et al. Effect of lowering of homocysteine levels on inflammatory markers. A randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 2005; 165:1388-94.
79. Schernthaner GH, Plank C, Minar E et al. No effect of homocysteine-lowering therapy on vascular inflammation and haemostasis in peripheral arterial occlusive disease. *Eur j Clin Invest* 2006; 36:333-39.
80. Bunout D, Garrido A, Suazo M et al. Effects of supplementation with folic acid and antioxidant vitamins on homocysteine levels and LDL oxidation in coronary patients. *Nutrition* 2000; 16:107-110.
81. De Jong SC, Stehouwer CDA, Van Den Berg M, Geurts TW, Bouter LM, Rauwerda JA. Normohomocysteinaemia and vitamin-treated hyperhomocysteinaemia are associated similar risks of cardiovascular events in patients with premature peripheral arterial occlusive disease. A prospective cohort study. *J Intern Med* 1999; 246:87-96.
82. Vermeulen EGJ, Stehouwer CDA, Twisk JWR, van den Berg, De Jong, Mackaay AJC, van Campen CMC et al. Effect of homocysteine-lowering treatment with folic acid plus vitamin B6 on progression of subclinical atherosclerosis: a randomized, placebo-controlled trial. *Lancet* 2000; 355:517-22.

83. Liem A, Reynierse-Buitenwerf GH, Zwinderman AH, Jukema JW, van Veldhuisen DJ. Secondary prevention with folic acid: Effects on clinical outcomes. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:2105-13.
84. Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, Spence JD, Pettigrew LG, Howard VJ, Sides EG et al. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death. The vitamins intervention for stroke prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291:565-75.
85. Nallamothu BK, Fendrick AM, Rubenfire M, Saint S, Bandekar RR, Omenn GS. Potential clinical and economic effects of homocysteine lowering. *Arch Intern Med* 2000; 160:3406-12.
86. Tice JA, Ross E, Coxson PG, Rosenberg I, Weinstein MC, Hunik MGM, Goldman PA et al. Cost-effectiveness of vitamin therapy to lower plasma homocysteine levels for the prevention of coronary heart disease. Effect of grain fortification and beyond. *JAMA* 2001; 286:936-43.
87. Hansrani M, Stansby G. Homocysteine lowering interventions for peripheral arterial disease and bypass grafts (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, 1, 2006. Oxford: Update Software.

**Efeitos da suplementação vitamínica de ácido fólico sobre a concentração de homocisteína e marcadores de inflamação em indivíduos portadores de doença arterial periférica.**

---

## Resumo

---

Venancio LS. Efeitos da suplementação vitamínica de ácido fólico sobre a concentração de homocisteína e marcadores de inflamação em indivíduos portadores de doença arterial periférica. (tese). Botucatu/SP: UNESP - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu; 2006.

Diversos estudos, indicam que a homocisteína está envolvida na gênese da aterosclerose, sendo considerada um importante e prevalente fator de risco para doenças vasculares, inclusive na doença arterial periférica. A hiper-homocisteinemia é devida principalmente à deficiência nutricional das vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e em especial do folato, envolvidas no metabolismo deste aminoácido. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da suplementação medicamentosa de ácido fólico sobre a concentração de homocisteína em indivíduos portadores de doença arterial periférica (Isquemia Crônica de Membros-ICM), observando também os efeitos desta suplementação sobre marcadores inflamatórios, como a proteína C reativa ultra-sensível (PCR us) e LDL-oxidada. **Casuística e Métodos:** Foi realizado um ensaio clínico prospectivo controlado casualizado duplo cego no Serviço de Cirurgia Vasculardo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP. Os indivíduos do estudo foram submetidos a um protocolo de suplementação vitamínica medicamentosa por 2 meses, e foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos: Grupo Controle (sem ICM e sem suplementação-n=20), Grupo ICM tratado com ácido fólico (400 µg/dia- n=20) e Grupo ICM tratado com placebo (n=20). Todas as análises foram obtidas antes e após os tratamentos (ácido fólico ou placebo). **Resultados:** A homocisteína plasmática, a frequência de hiper-homocisteinemia e a concentração de homocisteína nos portadores do genótipo heterozigotos (C/T) da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), foram significativamente superiores nos sub-grupos ICM tratados com ácido fólico ou placebo, e a concentração sérica de folato e o consumo das vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> foram significativamente inferiores nos sub-grupos ICM tratados com ácido fólico ou placebo. Com relação às outras variáveis estudadas, os grupos foram semelhantes. Após 2 meses de tratamento, foi observada redução significativa (18%) e normalização dos valores médios de homocisteína plasmática (p= 0,0193) e aumento significativo na concentração média de folato sérico (54%; p <0,0001) somente no sub-grupo ICM tratado com ácido fólico. As médias das concentrações de LDL-oxidada se mantiveram constantes após os tratamentos nos grupos controle e no sub-grupo ICM tratado com ácido fólico. As concentrações séricas médias de PCR us não se alteram com os tratamentos. A presença do polimorfismo 677C→T da enzima MTHFR, não influenciou a resposta aos tratamentos realizados nos grupos estudados. **Conclusão:** Em pacientes portadores de ICM, a suplementação vitamínica de ácido fólico (400 µg) por 2 meses mostrou-se eficiente em reduzir e normalizar a homocisteinemia, independente da presença do polimorfismo 677C→T da enzima MTHFR e, por outro lado, mostrou-se ineficiente em reduzir a concentração sérica dos marcadores inflamatórios crônicos da aterosclerose.

Palavras-chave: Homocisteína; doença arterial periférica; suplementação vitamínica; ácido fólico; marcadores de inflamação.

---

**Abstract**

---

Venancio LS. The effects of folic acid vitamin supplementation on homocysteine concentration and marker of vascular inflammation in peripheral arterial disease. (Thesis) Botucatu/SP: UNESP – São Paulo State University, Botucatu Medical School; 2006.

Many studies indicate that homocysteine is involved in the genesis of atherosclerosis and therefore is considered an important and prevalent risk factor for vascular diseases including the peripheral arterial disease. The hiper-homocystinemia can be specially attributed to the nutritional vitamin condition which is a deficient of vitamins B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub> and especially of folate involved in the metabolism of this amino acid. **Objective:** To evaluate the effects of a medical supplementation of folic acid on the homocysteine concentration on patients with peripheral arterial disease (Chronic Limb Ischemia - CLI), observing as wheel the effects of this supplement on the inflammatory markers of the ultra-sensitive reactive C protein (PCR us) and LDL oxidized. **Casuistic and Methods:** A clinical prospective double blind, placebo-controlled in the Vascular Surgery Center at the Hospital of the Clinics of Botucatu Medical School - UNESP. The individuals participating in the study were submitted to a protocol of medical vitamin supplementation for two months, divided in the following groups: Control Group (without CLI and without supplements n=20), CLI Group treated with folic acid (400 µg/day n=20) and CLI Group treated with placebo (n=20). All of the analyses were obtained before and after the treatments with folic acid and placebo. **Results:** The plasmatic homocysteine, the frequency of hiper-homocystinemia and the concentration of homocysteine in the patients with the genotype heterozygote (C/T) of the enzyme methylenetetrahydrofolate redutase (MTHFR) were significantly higher on the sub groups CLI treated with folic acid or placebo, and the concentration of folate and the consumption of vitamins B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub> were significant lower in the sub groups CLI treated with folic acid or placebo. After two months of treatment only in the sub group CLI treated with folic acid a significant decrease (18%) was observed and the normalization of normal values of plasmatic homocysteine (p=0,0193) and a significant increase in the regular concentration of folate (54%) (p<0,0001). The measurements of concentration of LDL-oxidized were unchanged after the treatments in the control groups and on the sub group CLI treated with folic acid. The average concentrations of PCR us were not altered with the treatments. The presence of polymorphism 677C→T of the enzyme MTHFR did not influence the results of the treatments that took place in the studied groups. **Conclusion:** Patients with CLI, the vitamin supplement of folic acid (400 µg) for two months was efficient in reducing and normalizing the homocystinemia regardless the presence of polymorphism 677C→T of the enzyme MTHFR, but was inefficient in reducing the concentration of the chronic inflammatory markers of atherosclerosis.

Keywords: Homocysteine; peripheral arterial disease; vitamin supplementation; folic acid; markers of inflammation.

## **Introdução**

---

A doença arterial periférica (DAP) que atinge a aorta, seus ramos e artérias dos membros, é definida como uma doença arterial obstrutiva de extremidades que reduz o fluxo sanguíneo durante o exercício ou, em estágios avançados, em repouso, e apresenta uma alta prevalência<sup>1</sup>. Estudos epidemiológicos apontam prevalência de DAP entre 1,6% e 12%. Outros estudos que utilizaram testes não invasivos para detecção objetiva da DAP, mostraram prevalência de 3,8% a 33<sup>1</sup>. Em nosso meio, não se conhecem dados epidemiológicos referentes à sua incidência, mas estima-se que não deva ser diferente de outros países. Acredita-se que a prevalência de DAP na população em geral seja subestimada por permanecer assintomática por longo tempo<sup>2</sup>.

As lesões ateroscleróticas são responsáveis por 85% dos casos de DAP, 95% das coronariopatias, e 75% dos acidentes vasculares cerebrais. Entre os pacientes com doença aterosclerótica sintomática, 15,9% tem doença polivascular sintomática (doença arterial periférica, cardiovascular e cerebrovascular)<sup>3</sup>. Além disso, na fase de claudicação intermitente, cerca de 60% dos indivíduos apresentam comprometimento simultâneo e importante dos setores coronariano e cerebrovascular, e aproximadamente 30% dos pacientes com doença vascular coronariana ou cerebral apresentam doença arterial periférica<sup>4</sup>. Deste modo, a DAP é um preditor importante de morbi-mortalidade por doenças cardiovasculares e cerebrovasculares<sup>5</sup>.

Dentre os fatores de risco mais tradicionais para a doença aterosclerótica destacam-se a idade, sexo masculino, dislipidemia, hábito tabágico, hipertensão arterial, diabetes melito, obesidade, sedentarismo e fatores genéticos ou história familiar de doença aterosclerótica<sup>3</sup>. Muitos estudos clínicos e experimentais, nacionais e internacionais, mostraram que homocisteína, um aminoácido sulfurado, está envolvido na gênese da aterosclerose e, assim, é considerado um fator de risco para a DAP<sup>6</sup> e atinge cerca de 60% dos pacientes com esta enfermidade<sup>7</sup>.

Dentre as causas de hiper-homocisteinemia, o estado nutricional relacionado às deficiências das vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> e principalmente de folato, além de altamente prevalente, parece ser também o fator mais importante na regulação da concentração da homocisteína na DAP. A adequação no consumo ou a suplementação vitamínica medicamentosa, em especial com ácido fólico, é benéfica, é custo-efetiva e pode ser adotada como uma terapia adjuvante em pacientes com doença aterosclerótica sintomática ou não, bem como na prevenção do aparecimento da DAP<sup>8</sup>. Considera-se que a dose diária mínima de folato que apresenta eficácia máxima na redução da homocisteína plasmática seja de aproximadamente 400 µg<sup>9</sup>. Em nosso meio, em particular, a carência de recursos, como reflexo de fatores socioeconômicos e culturais, favorece a deficiência de folatos na dieta e ocorrência de hiper-homocisteinemia, conforme demonstrado em estudo prévio<sup>7</sup>.

Outro aspecto a ser observado quanto à elevação da concentração de homocisteína é a influência das mutações genéticas na codificação de enzimas envolvidas no metabolismo da homocisteína, sobretudo o polimorfismo 677C→T no

gene da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), o qual acomete aproximadamente 5 a 20% da população geral e reduz a atividade da enzima em até 30% nos casos de homozigose<sup>10</sup>.

Atualmente, aterosclerose é definida como um processo crônico, progressivo e sistêmico, conseqüente a uma resposta inflamatória e fibroploriferativa causada por agressão à superfície arterial<sup>11</sup>. A importância do processo inflamatório na sua gênese pode ser avaliada inclusive na DAP<sup>12</sup>, pela elevação da proteína C reativa (PCR), considerada como um dos marcadores mais importantes do processo inflamatório. Além disso, há evidências de que a concentração de homocisteína correlaciona-se positivamente com marcadores inflamatórios como a PCR<sup>13</sup> e a LDL (*low density lipoprotein*)-oxidada<sup>14</sup>, embora o possível mecanismo desta associação ainda não tenha sido inteiramente elucidado.

Considerando que a prevalência de hiper-homocisteinemia é alta e constitui-se em fator de risco para aterosclerose, este estudo visa estudar a contribuição da suplementação vitamínica medicamentosa de ácido fólico no controle da homocisteína, e sua influência sobre alguns marcadores inflamatórios em pacientes com DAP em nosso meio, tendo em vista as peculiaridades culturais, sócio-econômicas e alimentares desses pacientes em relação aos de outros países.

## **Objetivo**

---

---

O propósito do presente trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação medicamentosa de ácido fólico na concentração de homocisteína em indivíduos portadores de doença arterial periférica (Isquemia Crônica de Membros), observando também os efeitos desta suplementação sobre marcadores inflamatórios, como a proteína C reativa ultra-sensível (PCR us) e LDL-oxidada.

## ***Casuística e Métodos***

---

---

### ***Aspectos Éticos***

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP-SP) e pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (Anexo 1). Todos os sujeitos que participaram do presente estudo foram informados em detalhes sobre os procedimentos a que seriam submetidos e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice).

### ***Amostra***

No período de março de 2004 a dezembro de 2005, foram recrutados seqüencialmente, à medida que chegavam para consulta, 40 pacientes adultos, com Isquemia Crônica de Membros (Grupo ICM) do Ambulatório de Claudicação da Disciplina de Cirurgia Vascular do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), todos com grau de isquemia I (categorias 1 a 3) segundo Rutherford<sup>15</sup> e Índice de Pressão Tornozelo-Braço (IPTB) igual ou inferior a 0,90, constituindo, portanto uma amostra não probabilística. O grupo controle (Grupo Controle) constituiu-se de 20 indivíduos adultos, de ambos os sexos, sem ICM (com IPTB maior que 0,90), procedentes da mesma região geográfica, participantes voluntários do Projeto de Extensão Universitária “Mexa-se Pró-Saúde” desenvolvido pelo Centro de Metabolismo em Exercício e Nutrição (CeMENutri) do Departamento de Saúde Pública da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP). Os sujeitos do Grupo Controle foram selecionados seqüencialmente, de modo a proporcionarem pareamento por sexo e idade em

relação ao Grupo ICM, por meio de consulta aos prontuários do projeto de extensão, constituindo também amostra não probabilística.

### **Desenho do Estudo**

Foi realizado um ensaio clínico prospectivo controlado casualizado duplo cego, em que se comparou a eficiência da administração de ácido fólico ou placebo orais na redução da homocisteinemia e de marcadores inflamatórios em indivíduos com Isquemia Crônica de Membros. Os participantes do estudo foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: Grupo Controle (sem ICM), Grupo ICM tratado com ácido fólico e Grupo ICM tratado com placebo.

Os critérios de inclusão para o Grupo ICM foram: idade superior a 18 anos, assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, grau de isquemia (categorias 1 a 3) segundo Rutherford<sup>15</sup> e Índice de Pressão Tornozelo-Braço (IPTB) igual ou inferior a 0,90. Os critérios de inclusão para o Grupo Controle foram: idade superior a 18 anos, assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, IPTB maior que 0,90, ausência de outras doenças clinicamente manifestas e pareamento por sexo e idade em relação ao outro grupo.

Os critérios de exclusão adotados para os grupos (Controle e ICM) foram: cirurgia planejada durante o período do estudo, portadores de amputações prévias, presença de alteração laboratorial hepática ou renal, gestação, diagnóstico de HIV, câncer, ou enfermidades com proliferação celular, insuficiência cardíaca e/ou respiratória, presença de doença infecciosa e/ou inflamatória (hepatite A ou B, pneumonia, bronquite, úlcera péptica, periodontites e gengivites), uso de terapia

nutricional via parenteral ou enteral, uso crônico de antiinflamatórios, uso crônico de suplementos de ácido fólico, polivitamínicos e/ou de medicamentos que pudessem interferir no metabolismo da homocisteína.

Pacientes com Isquemia Crônica de Membros foram tratados aleatoriamente com 400 µg/dia de ácido fólico ou placebo por um período de 2 meses. O ácido fólico foi adquirido do laboratório farmacêutico Purifarma (Alemanha) (Anexo 2) e a lactose monohidratada do laboratório Galena (Argentina) (Anexo 3) e foram preparados por manipulação por profissional farmacêutico (Anexo 4).

A ocultação da aleatorização foi feita mediante 2 códigos numéricos secretos impressos nos frascos, sendo um correspondente ao conteúdo de ácido fólico e o outro ao placebo (lactose), mas de conhecimento exclusivo do farmacêutico responsável pela preparação das matérias-primas. De acordo com a entrada dos pacientes no estudo era fornecido alternadamente e consecutivamente aos sujeitos, um frasco com um código ou outro.

Os desfechos primários avaliados foram: redução das concentrações séricas de homocisteína e aumento nas concentrações de folato sérico, após 2 meses de tratamento. Os desfechos secundários foram: redução das concentrações séricas de PCR us, LDL-oxidada e influência dos genótipos 677C→T da enzima MTHFR sobre a concentração sérica de homocisteína após 2 meses de tratamento.

Possíveis reações adversas são desconhecidas com a ministração do ácido fólico.

### **Análises Laboratoriais**

Antes e após 2 meses de estudo foi colhido de sangue (20 ml) em veia periférica, com punção única, no sistema fechado a vácuo (Vacutainer®) pela manhã, após período de repouso e jejum de 8 a 12 horas. Com essa amostra de sangue, foram dosadas no Laboratório de Bioquímica e Sorologia do Setor de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) as concentrações séricas de glicose, colesterol total, triacilglicerol,  $\gamma$ -glutamil transferase e creatinina pelo método de química seca. A fração LDL-colesterol foi calculada segundo a fórmula de Friedewald et al.<sup>16</sup>: LDL-colesterol = Colesterol Total – (triacilglicerol/5 + HDL (*high density lipoprotein*)-colesterol), para valores de triacilglicerol até 300 mg/dL. A HDL-colesterol foi analisada pelo método de química seca-magnético. A concentração sérica da proteína C reativa ultrasensível (PCR us) foi analisada pelo método da quimioluminescência (DPC-MEDLAB), com valores de normalidade indicados pelo *kit* (0,0 a 1,0 mg/dL). O folato sérico foi determinado pelo método da quimioluminescência (DPC-MEDLAB), com valor de normalidade indicado pelo método variando entre 3 a 17 ng/mL para ambos os sexos. A dosagem de PCR ultrasensível e do folato sérico foi realizada no CeMENutri da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP-SP). A quantificação da LDL-oxidada foi analisada no Laboratório de Bioquímica e Sorologia do setor de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) pelo método ELISA (IMMCO), com valor positivo acima de 25 EU/mL.

As concentrações de homocisteína plasmática total de jejum foram dosadas no CeMENutri da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP-SP) por

Cromatografia Líquida de Alta Precisão (*High Performance Liquid Chromatography-HPLC*- Shimadzu-LC-10AD), através de derivatização pré-coluna com SBD-F e posterior detecção por fluorescência, segundo padronização proposta por Araki & Sako<sup>17</sup> modificada por Ubbink et al.<sup>18</sup>. Os níveis normais de homocisteína total foram definidos entre 5 e 15µmol/L, conforme Ueland et al.<sup>19</sup>.

A identificação do polimorfismo 677C→T variante termolábil no gene da enzima MTHFR foi realizada no Laboratório de Nutrição do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP) por meio de extração do DNA de sangue periférico venoso com EDTA, utilizando-se a técnica de extração *Super Quick Gene (DNA Isolation Kit – Analytical Genetic Testing Center. INC, USA)*. A reação em cadeia da polimerase, a ampliação e a identificação dos genótipos foi realizada segundo as seqüências preconizadas por Frosst et al.<sup>10</sup>. Foram identificados os três possíveis genótipos para este polimorfismo: C/C (genótipo homocigoto normal), C/T (genótipo heterocigoto- 65% da atividade da enzima) e T/T (genótipo homocigoto mutante- 30% da atividade da enzima).

Para obter informações quantitativas do consumo alimentar foi utilizado o método do recordatório de 24 horas antes e após 2 meses de estudo. As medidas caseiras foram convertidas em grama ou mL para o cálculo da metionina, vitamina B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> e folato, através do programa de computador *NutWin* (Programa de Apoio à Nutrição) do Departamento de Informática em Saúde da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os valores obtidos foram comparados posteriormente, com as cotas diárias de ingestão preconizadas pela *Dietary Reference Intakes*<sup>20</sup>. Durante

o período do estudo, os participantes foram orientados a manter a alimentação habitual.

O Índice de Pressão Tornozelo-Braço (IPTB) foi realizado com Doppler ultrassom (*Imbracios-Direcional-DD 702*-portátil) e aparelho de pressão de mercúrio (Oftec). O cálculo do IPTB foi obtido da relação entre a maior pressão sistólica da artéria-alvo (tibial, poplítea, pediosa) e a maior pressão sistólica da artéria braquial<sup>4</sup>. O Índice de Massa Corporal (IMC) foi obtido da relação entre o peso corporal atual (Kg) e a estatura (m<sup>2</sup>)<sup>21</sup>. A medida da circunferência da cintura foi realizada com uma fita métrica flexível na altura da cicatriz umbilical<sup>22</sup>.

### **Análise Estatística**

A análise de poder do teste (5%), considerando a variável homocisteína para os três grupos estudados (Controle, ICM Ácido fólico e ICM Placebo), forneceu tamanho mínimo de amostra de 33 indivíduos, e foram apresentados 60, com 87% de poder para detectar diferença entre os grupos.

Os dados sócio-demográficos, clínicos, bioquímicos, medidas antropométricas, concentração sanguínea de homocisteína, LDL-oxidada, folato, PCR us, consumo das vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, folato e metionina, e genótipos da enzima MTHFR foram comparados entre o Grupo Controle, Grupo ICM Ácido Fólico e Grupo ICM Placebo no momento inicial do estudo para verificar diferenças significantes entre os grupos. Para comparação das variáveis qualitativas como sexo, raça/cor, ocupação, procedência, hábito tabágico, presença de hipertensão arterial e diabetes melito, frequência de hiper-homocisteinemia, genótipos da enzima MTHFR e

características clínicas dos pacientes com ICM foram utilizados os testes do Qui-Quadrado e Exato de Fisher. Para a comparação das variáveis quantitativas como idade, IPTB, medidas antropométricas, exames bioquímicos, concentração sanguínea de homocisteína, LDL-oxidada, folato, PCR us, consumo das vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, folato e metionina foram utilizados os testes F (Anova) e *Tukey* no nível de 5% de significância.

Para a comparação antes e após dois meses de suplementação ou placebo, as variáveis homocisteína, folato sérico e alimentar, LDL-oxidada e PCR us, foram analisadas pelo Teste *t* pareado. A comparação entre os grupos Controle, ICM Ácido fólico e ICM Placebo para as variáveis homocisteína, folato sérico e alimentar, LDL-oxidada e PCR us após o tratamento, foram analisadas pelo Teste de *Tukey* no nível de 5% de significância. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância adotado foi de 5%. Empregou-se, para as análises, o programa estatístico SAS (*Statistical Analyses System*) Versão 8.02.

## Resultados

### Comparação basal entre os grupos estudados: Grupo Controle, Grupo ICM Placebo e Grupo ICM Ácido Fólico

Nas Tabelas 1 e 2 são apresentadas as características sócio-demográficas, clínicas, laboratoriais e de medidas antropométricas comparativas entre os grupos Controle, ICM Placebo e ICM Ácido Fólico.

**Tabela 1.** Distribuição percentual e valores médios das características sócio-demográficas dos grupos estudados (Controle, ICM Placebo e ICM Ácido Fólico).

Características	Grupo Controle n=20		Grupo ICM Placebo n=20		Grupo ICM Ácido Fólico n=20		Teste estatístico p
	n	%	n	%	n	%	
<b>Sexo</b>							
Masculino	12	60	11	55	13	65	0,8119
Feminino	8	40	9	45	7	35	
<b>Idade</b> (anos)	61,00 (50 – 71)		62,65 (48 – 76)		65,50 (47 – 77)		0,1507
<b>Raça/Cor</b>							
Branca	20	100	18	90	19	95	0,7662
Não branca	-	-	2	10	1	5	
<b>Ocupação</b>							
Aposentados	11	55	10	50	14	70	0,5111
Ativos	9	45	10	50	6	30	
<b>Procedência</b>							
Botucatu	20	100	5	25	7	35	< 0,0001*
Outras cidades	-	-	15	75	13	65	

ICM: Isquemia Crônica de Membros; \* = valor de p indica diferença estatística significativa entre os grupos; Sexo: Teste do Qui-quadrado; raça/cor, ocupação, procedência: Teste Exato de Fisher, Idade: Teste F (Anova)

Os indivíduos do Grupo Controle apresentaram valores médios de IPTB significativamente superiores em relação aos Grupos ICM Placebo e Ácido Fólico, e

menor freqüência de indivíduos fumantes e ex-fumantes, com hipertensão arterial e diabetes melito (Tabela 2).

**Tabela 2.** Valores médios, desvio-padrão e distribuição percentual das características clínicas, laboratoriais e de medidas antropométricas dos grupos estudados (Controle, ICM Placebo e ICM Ácido Fólico).

Características	Grupo Controle n=20	Grupo ICM Placebo n=20	Grupo ICM Ácido Fólico n=20	Teste estatístico p
IPTB	0,99 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,16 <sup>b</sup>	0,60 ± 0,23 <sup>b</sup>	< 0,0001*
[≥ 0,90] IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	26,91 ± 3,52	27,70 ± 5,47	25,49 ± 3,48	0,2593
[18,5 – 24,9] CC (cm)	93,79 ± 9,36	96,25 ± 12,20	96,23 ± 9,11	0,6901
[< 80 mulheres e < 94 homens] Creatinina (mg%)	0,64 ± 0,15	1,02 ± 0,22	1,07 ± 0,24	0,1657
[0,7–1,2 mulheres e 0,8–1,5 homens] GGT (mg%)	30,15 ± 23,19	32,55 ± 16,56	39,58 ± 13,77	0,2594
[12-43 mulheres e 15-73 homens] Colesterol total (mg%)	193,40 ± 33,43	209,00 ± 53,33	225,95 ± 44,59	0,0777
[< 200] LDL-C (mg%)	137,16 ± 31,73	123,65 ± 42,55	132,39 ± 30,64	0,4608
[< 130 saudáveis e < 100 aterosclerose] HDL-C (mg%)	50,25 ± 15,06	49,55 ± 14,19	47,95 ± 14,90	0,8799
[>40] Triacilglicerol (mg%)	138,55 ± 63,19	172,45 ± 87,65	188,60±107,66	0,1950
[< 150] Glicemia (mg%)	107,35 ± 22,41	124,15 ± 64,67	138,45 ± 57,93	0,1732
[70 – 110] Hábito tabágico				
Não-fumantes	17 (85%)	1 (5%)	5 (25%)	
Ex-fumantes e fumantes	3 (15%)	19 (95%)	15 (75%)	< 0,001*
Hipertensão Arterial	8 (40%)	14 (70%)	11 (55%)	0,1623
Diabetes Melito	-	6 (30%)	12 (60%)	< 0,001*

ICM: Isquemia Crônica de Membros; IPTB: Índice de Pressão Tornozelo-Braço; IMC: Índice de massa corporal; CC: circunferência da cintura; GGT: gama glutaril transpeptidase; LDL-C: *Low density lipoprotein*; HDL-C: *High density lipoprotein*; \* = valor de p indica diferença estatística significativa entre os grupos; IPTB, IMC, CC, creatinina, GGT, colesterol total, LDL-C, HDL-C, triacilglicerol, glicemia: Teste F (Anova); Hábito tabágico, hipertensão arterial, diabetes melito: Teste Exato de Fisher; [ ] = valores de normalidade. Médias seguidas de mesma letra minúscula (**linhas**) não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.

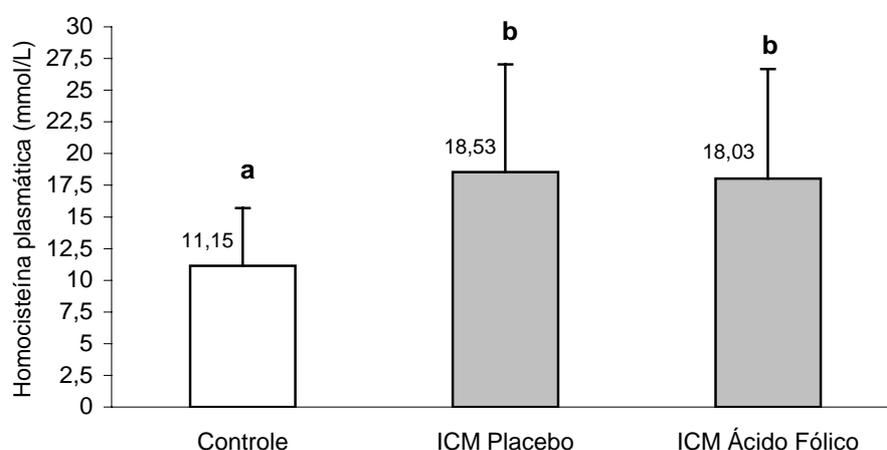
A Tabela 3 mostra a distribuição das características clínicas do Grupo ICM Placebo e Ácido Fólico. Todos os indivíduos apresentaram grau de isquemia I e a maioria dos pacientes tinha categoria de isquemia 1 e 2 (77,5%), o que correspondeu a frequência similar de indivíduos com claudicação moderada e leve e não limitante (77,5%). O tempo de diagnóstico do processo isquêmico variou de 6 meses a 24 anos. Treze (32,5%) indivíduos foram submetidos a algum tipo de cirurgia vascular restauradora antes do estudo. Deste modo, os grupos estudados apresentaram condições clínicas semelhantes de Isquemia Crônica de Membros.

**Tabela 3.** Distribuição percentual das características clínicas dos Grupos ICM Placebo e Ácido Fólico.

Dados Clínicos	Grupo ICM Placebo n=20		Grupo ICM Ácido Fólico n=20		Grupo ICM Total n=40		Teste Exato de Fisher
	n	%	n	%	n	%	
<b>Claudicação*</b>							
Leve (> 100 metros)	8	40	7	35	15	37,5	0,3678
Moderada (100 a 500 metros)	6	30	10	50	16	40,0	
Grave (< 100 metros)	6	30	3	15	9	22,5	
<b>Limitação da Claudicação**</b>							
Não limitante	14	70	17	85	31	77,5	0,4506
Limitante	6	30	3	15	9	22,5	
<b>Categoria de Isquemia*</b>							
1	8	40	7	35	15	37,5	0,3678
2	6	30	10	50	16	40,0	
3	6	30	3	15	9	22,5	
<b>Membro Acometido</b>							
Membro Inferior Direito	11	55	5	25	16	40,0	0,1082
Membro Inferior Esquerdo	4	20	10	50	14	35,0	
Bilateral	5	25	5	25	10	25,0	
<b>Cirurgia Vascular Prévia</b>							
Sim	6	30	7	35	13	32,5	1,000
Não	14	70	13	65	27	67,5	

ICM= Isquemia Crônica de membros; n= total de pacientes; %= porcentagem absoluta (em relação ao número total de pacientes); \* Rutherford<sup>15</sup> \*\* Van Bellen<sup>23</sup>.

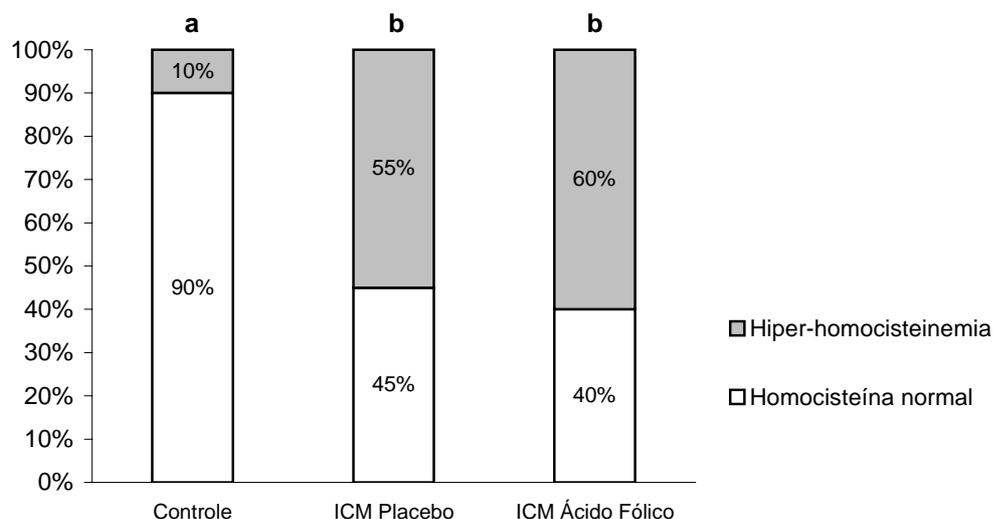
No Grupo Controle a concentração média de homocisteína foi normal e significativamente inferior aos valores médios de homocisteína nos pacientes com ICM (Placebo e Ácido Fólico) (Figura 1). As concentrações de homocisteína variaram de 4,18 a 33,22  $\mu\text{mol/L}$  no grupo ICM Ácido Fólico, de 6,74 a 32,22  $\mu\text{mol/L}$  no grupo ICM Placebo e de 4,88 a 21,56  $\mu\text{mol/L}$  no grupo Controle.



Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de *Tukey* (5%)

**Figura 1.** Distribuição dos valores médios de homocisteína plasmática no momento basal nos grupos estudados (Controle, ICM Placebo e ICM Ácido Fólico).

Quanto à distribuição de indivíduos com hiper-homocisteinemia, observou-se frequência significativamente maior no Grupo ICM em relação ao Grupo Controle (Controle *versus* ICM Placebo  $p= 0,0069$ ; Controle *versus* ICM Ácido Fólico  $p= 0,0028$  pelo teste do Qui-quadrado) (Figura 2).



Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste do Qui-quadrado ( $p=0,7491$ )

**Figura 2.** Distribuição da frequência de hiper-homocisteinemia (definida como maior que  $15 \mu\text{mol/L}$ ) nos grupos estudados (Controle, ICM Placebo e ICM Ácido Fólico).

Em relação a PCR us, verificou-se concentrações séricas semelhantes nos grupos estudados ( $p=0,1209$ ), sendo que as concentrações médias de PCR us foram normais nos controles e nos pacientes com ICM do sub-grupo placebo, e acima da normalidade nos pacientes do com ICM do sub-grupo Ácido Fólico.

Quanto ao folato sérico, encontrou-se valores médios normais nos três grupos, mas significativamente superiores nos controles ( $p<0,0001$ ). Não foram encontradas diferenças nas concentrações médias de LDL-oxidada entre os grupos ( $p=0,2631$ ). Os valores médios de consumo das vitaminas B<sub>6</sub> ( $p=0,0345$ ) e B<sub>12</sub> ( $p=0,0071$ ) foram significativamente maiores no Grupo Controle, e de folato ( $p=0,2617$ ) e metionina ( $p=0,1694$ ) não foram diferentes entre os grupos. Verificou-se consumo médio insuficiente de folato em todos os grupos estudados (Tabela 4).

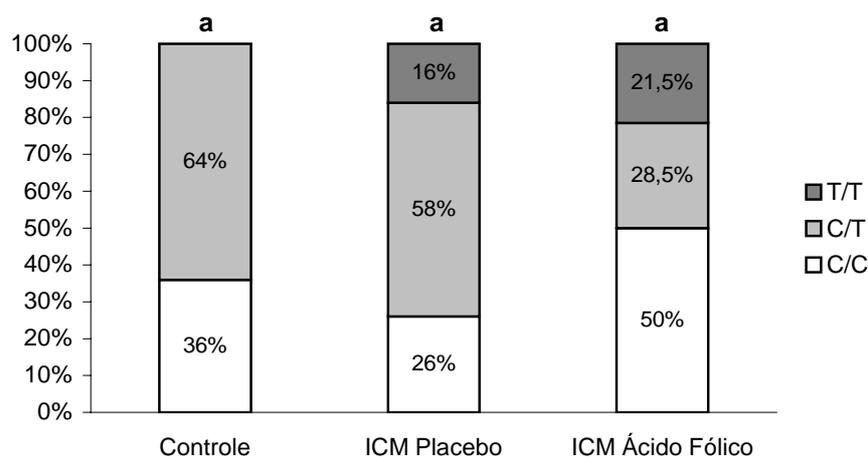
**Tabela 4.** Valores séricos médios, desvio-padrão e distribuição percentual acima da normalidade de PCR us, LDL-oxidada e folato e valores médios e desvio-padrão de consumo de folato, vitamina B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e metionina alimentar dos grupos estudados (Controle, ICM Placebo e ICM Ácido Fólico).

Características	Grupo Controle n=20		Grupo ICM Placebo n=20		Grupo ICM Ácido Fólico n=20		Teste F (Anova) p
	Média ± desvio- padrão	% acima do normal	Média ± desvio- padrão	% acima do normal	Média ± desvio- padrão	% acima do normal	
PCR us (mg/dL) [0 - 1,00]	0,20 ± 0,32	1 (5%)	0,97 ± 1,93	5 (25%)	1,26 ± 2,06	5 (25%)	0,1209
LDL-oxidada (EU/mL) [< 25]	47,55 ± 62,55	9 (45%)	67,01 ± 83,51	12 (60%)	31,64 ± 53,55	7 (35%)	0,2631
Folato sérico (ng/mL) [3 - 17]	16,57 ± 5,95 <sup>a</sup>	8 (40%)	9,50 ± 3,27 <sup>b</sup>	-	11,45 ± 4,54 <sup>b</sup>	2 (10%)	<0,0001*
Folato alimentar (µg) [400]	293,87 ±156,37	4 (20%)	239,71 ±141,94	3 (15%)	229,96 ± 85,00	-	0,2617
Vitamina B <sub>6</sub> alimentar (mg) [1,7 homens e 1,5 mulheres]	1,65 ± 0,87 <sup>a</sup>	7 (35%)	1,09 ± 0,52 <sup>b</sup>	2 (10%)	1,04 ± 0,49 <sup>b</sup>	2 (10%)	0,0345*
Vitamina B <sub>12</sub> alimentar (µg) [2,4]	3,88 ± 1,99 <sup>a</sup>	15 (75%)	2,51 ± 1,69 <sup>b</sup>	10 (50%)	2,87 ± 1,24 <sup>ab</sup>	14 (70%)	0,0071*
Metionina alimentar (mg/Kg de peso) [19]	20,00 ± 10,00	18 (90%)	20,00 ± 10,00	13 (65%)	20,00 ± 10,00	14 (70%)	0,1694

PCR us: Proteína C reativa ultra-sensível; LDL-C oxidada: *Low density lipoprotein* oxidada analisada na base log; [ ] = valores de normalidade; \* = valor de p indica diferença estatística significativa entre os grupos. Médias seguidas de mesma letra minúscula (**linhas**) não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.

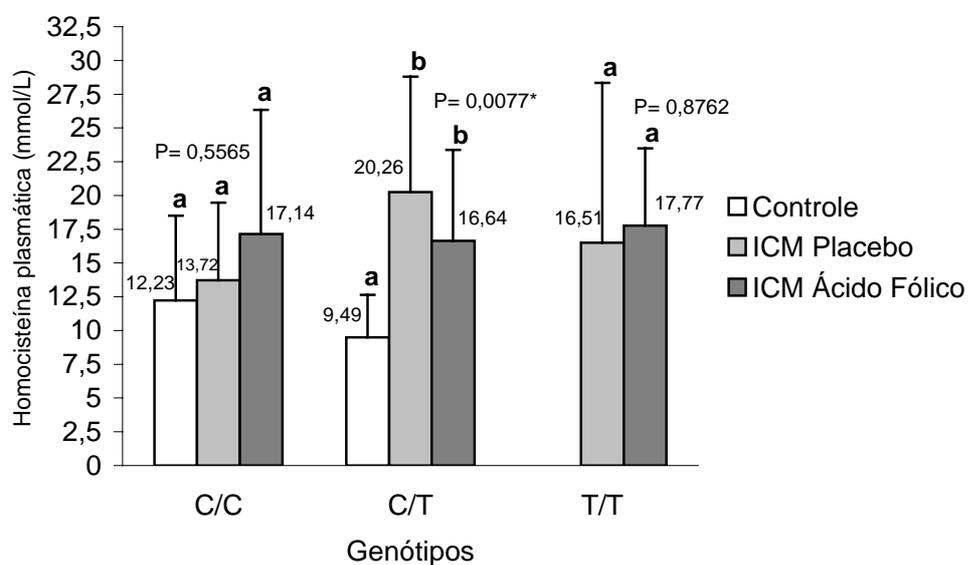
Entre os pacientes com ICM tratados com placebo, 74% tinham o alelo mutante da enzima MTHFR, sendo 58% heterozigotos e 16% homozigotos. No sub-grupo ICM tratado com ácido fólico, 50% tinha o alelo mutante, sendo 28,5% heterozigotos e 21,5% homozigotos. Entre os controles, 64% eram portadores do alelo mutante heterozigoto. Não foram encontradas diferenças quanto à distribuição dos genótipos entre os grupos (p=0,1804). A mutação homozigótica T/T foi identificada somente nos pacientes com ICM (Figura 3). Os valores médios de

homocisteína foram significativamente superiores nos pacientes dos sub-grupos com ICM (Placebo e Ácido Fólico) portadores do alelo mutante heterozigoto (C/T) da enzima MTHFR ( $p=0,0077$ ) (Figura 4).



Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste Exato de Fisher ( $p=0,1804$ )

**Figura 3.** Distribuição da frequência dos genótipos (677C→T) da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) nos grupos estudados (Controle, ICM Placebo e ICM Ácido Fólico).



Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de *Tukey* (5%)

**Figura 4.** Valores médios de homocisteína plasmática de acordo com os genótipos (677C→T) da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) nos grupos estudados (Controle, ICM Placebo e ICM Ácido Fólico).

### **Comparação entre os grupos antes e após os tratamentos placebo ou ácido fólico**

Na Tabela 5 encontram-se os resultados das análises laboratoriais e de consumo de folato após os tratamentos. No grupo Controle, bem como nos pacientes com ICM tratados com placebo, a concentração média de homocisteína se manteve sem diferença significativa ao longo do tratamento. Somente no sub-grupo de pacientes com ICM tratados com ácido fólico foi observada redução significativa dos valores médios de homocisteína plasmática ( $p= 0,0193$ ) no mesmo período. Por outro lado, observou-se que as concentrações médias finais de homocisteína após os tratamentos, não diferiram estatisticamente entre os grupos ICM Placebo e ICM Ácido Fólico, mas a concentração média de folato sérico aumentou significativamente no grupo ICM após o tratamento com ácido fólico ( $p < 0,0001$ ). Observou-se redução significativa do consumo médio de folato entre os controles ( $p=0,0029$ ) e nos pacientes com ICM no sub-grupo tratados com placebo ( $p=0,0249$ ) ao longo do tratamento, e no sub-grupo ICM tratado com ácido fólico o consumo médio de folato se manteve. Porém, observou-se que o consumo médio final de folato após os tratamentos, não diferiu estatisticamente entre os três grupos estudados.

As médias das concentrações de LDL-oxidada se mantiveram constantes após os tratamentos nos grupos controle e no sub-grupo ICM tratado com ácido fólico, e reduziram no sub-grupo ICM placebo ( $p=0,0151$ ). As concentrações séricas médias de PCR us não se alteram com os tratamentos (placebo ou ácido fólico), no entanto, ao final do período observacional, ocorreu um aumento médio significativo desta variável no grupo Controle ( $p=0,0157$ ).

**Tabela 5.** Valores sanguíneos médios de homocisteína, folato, LDL-oxidada e PCR us e valores médios e desvio-padrão de consumo de folato antes e após a suplementação com ácido fólico ou placebo dos grupos estudados (Grupo Controle, Grupo ICM Placebo e Grupo ICM Ácido Fólico).

Análises	Grupos	Basal	Após	Teste <i>t</i> de Student pareado
		Média ± desvio-padrão	Média ± desvio-padrão	
<b>Homocisteína (μmol/L)</b>				
[5 – 15]	Controle	11,15 ± 4,54 <sup>aA</sup>	10,47 ± 2,52 <sup>aA</sup>	0,1108
	ICM Placebo	18,53 ± 8,51 <sup>aB</sup>	16,08 ± 7,20 <sup>aB</sup>	0,1203
	ICM Ácido fólico	18,03 ± 8,63 <sup>aB</sup>	14,85 ± 7,02 <sup>bB</sup>	<b>0,0193*</b>
<b>Folato (ng/mL)</b>				
[3 – 17]	Controle	16,56 ± 5,95 <sup>aA</sup>	15,77 ± 5,16 <sup>aAB</sup>	0,7915
	ICM Placebo	9,50 ± 3,27 <sup>aB</sup>	12,24 ± 5,75 <sup>aA</sup>	0,0501
	ICM Ácido fólico	11,45 ± 4,54 <sup>aB</sup>	17,61 ± 5,37 <sup>bB</sup>	<b>&lt; 0,0001*</b>
<b>Folato alimentar (μg)</b>				
[400]	Controle	293,87±156,37 <sup>aA</sup>	217,19 ± 128,64 <sup>bA</sup>	<b>0,0029*</b>
	ICM Placebo	239,71±141,94 <sup>aA</sup>	189,54 ± 124,10 <sup>bA</sup>	<b>0,0249*</b>
	ICM Ácido fólico	229,95 ± 85,00 <sup>aA</sup>	270,27 ± 140,13 <sup>aA</sup>	0,1279
<b>LDL-oxidada (EU/mL)</b>				
[< 25]	Controle	47,55 ± 62,65 <sup>aA</sup>	26,87 ± 44,60 <sup>aA</sup>	0,2057
	ICM Placebo	67,00 ± 83,51 <sup>aA</sup>	13,16 ± 19,25 <sup>bA</sup>	<b>0,0151*</b>
	ICM Ácido fólico	31,64 ± 53,55 <sup>aA</sup>	13,86 ± 18,64 <sup>aA</sup>	0,1520
<b>PCR us (mg/dL)</b>				
[0 – 1,00]	Controle	0,20 ± 0,32 <sup>aA</sup>	0,40 ± 0,59 <sup>bA</sup>	<b>0,0157*</b>
	ICM Placebo	0,97 ± 1,93 <sup>aA</sup>	0,52 ± 0,41 <sup>aAB</sup>	0,2607
	ICM Ácido fólico	1,25 ± 2,06 <sup>aA</sup>	0,92 ± 0,69 <sup>aB</sup>	0,4393

PCR: Proteína C reativa; LDL-C oxidada: *Low density lipoprotein* oxidada analisada na base *log*; \* = valor de p indica diferença estatística significante entre o momento basal e após a suplementação ou placebo. Médias seguidas de mesma letra minúscula (**linhas**) não diferem significativamente pelo Teste *t* de Student pareado ao nível de 5%. Médias seguidas de mesma letra maiúscula (**coluna**) não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.

O polimorfismo 677C→T da enzima MTHFR estava presente em igual frequência nos grupos estudados, tanto em homozigose como em heterozigose, e sua presença não influenciou a resposta aos tratamentos realizados nos grupos estudados (Tabela 6).

**Tabela 6.** Valores médios de homocisteína plasmática de acordo com os genótipos (677C→T) da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) antes e após a suplementação de ácido fólico ou placebo nos grupos estudados (Grupo Controle, Grupo ICM Placebo e Grupo ICM Ácido Fólico).

Genótipos	Grupos	Homocisteína (μmol/L)		Teste <i>t</i> de Student pareado
		Basal	Após	
		Média ± desvio-padrão	Média ± desvio-padrão	
C/C	Controle	12,23 ± 6,28 <sup>aA</sup>	10,13 ± 3,02 <sup>aA</sup>	0,5616
	ICM Placebo	13,72 ± 5,74 <sup>aA</sup>	9,16 ± 2,70 <sup>aA</sup>	0,2003
	ICM Ácido fólico	17,14 ± 9,19 <sup>aA</sup>	14,43 ± 8,90 <sup>aA</sup>	0,6152
C/T	Controle	9,49 ± 3,14 <sup>aA</sup>	9,87 ± 2,17 <sup>aA</sup>	0,7900
	ICM Placebo	20,26 ± 8,55 <sup>aA</sup>	16,72 ± 7,13 <sup>aA</sup>	0,3294
	ICM Ácido fólico	19,06 ± 7,32 <sup>aA</sup>	13,61 ± 5,22 <sup>aA</sup>	0,2712
T/T	Controle			
	ICM Placebo	16,51 ± 11,83 <sup>aA</sup>	17,58 ± 4,35 <sup>aA</sup>	0,8903
	ICM Ácido fólico	17,77 ± 5,72 <sup>aA</sup>	12,98 ± 7,75 <sup>aA</sup>	0,4383

C/C: genótipo homozigoto normal; C/T: genótipo heterozigoto mutante; T/T: genótipo homozigoto mutante. Médias seguidas de mesma letra minúscula (**linhas**) não diferem significativamente pelo Teste *t* de Student pareado ao nível de 5%. Médias seguidas de mesma letra maiúscula (**coluna**) não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.

## **Discussão**

---

### **Amostra**

A DAP sintomática na forma de isquemia crônica de membros com claudicação intermitente, investigada no presente estudo, é uma doença grave e prevalente, a qual deve ser analisada quanto aos fatores relacionados ao seu aparecimento, progressão e tratamento. Os pacientes com isquemia crônica de membros recrutados ambulatorialmente para este estudo apresentavam a claudicação intermitente como principal sintoma, portanto estágio de menor gravidade isquêmica. Nenhum paciente referiu dor em repouso (isquemia crítica) ou apresentou lesões tróficas características de um processo isquêmico mais intenso.

Esta investigação com indivíduos portadores de DAP (isquemia crônica de membros) usuários do sistema de saúde pública do Brasil (Sistema Único de Saúde-SUS) é importante uma vez que, em sua maioria, possuem condições peculiares socioeconômicas e de escolaridade com hábitos alimentares e de vida próprios da região onde residem, e portanto, poderiam apresentar um comportamento distinto de outros contingentes nacionais e internacionais, quanto aos fatores de risco para aterosclerose relacionada como a homocisteína e marcadores inflamatórios, além da resposta ao tratamento proposto para o controle dos fatores de risco. Os indivíduos com ICM que participaram do presente estudo eram em sua maioria do sexo masculino, da raça/cor branca, idosos (com idade igual ou superior a 60 anos de idade), com excesso de peso e gordura corporal, dislipidemia, com história de tabagismo pregressa ou atual e portadores de hipertensão arterial e/ou diabetes

melito. Deste modo configurou-se uma população com múltiplos fatores que determinam o aparecimento e a progressão da doença vascular aterosclerótica.

### ***Hiper-homocisteinemia e doença arterial periférica***

As evidências científicas disponíveis mostram que a hiper-homocisteinemia é um fator de risco para doenças vasculares e é prevalente em pacientes com doença arterial periférica (DAP) (28 a 60%)<sup>7,24</sup>. As concentrações médias de homocisteína em pacientes com diversas manifestações de DAP mostraram-se significativamente superiores aos encontrados nos controles<sup>1</sup>. No Brasil, estudos com pacientes portadores de doença arterial coronariana<sup>25-27</sup> e periférica<sup>7,28,29</sup> mostraram alta prevalência de hiper-homocisteinemia (20 a 60%) e concentração elevada de homocisteína nos doentes em relação aos controles. Portanto, a alta prevalência de hiper-homocisteinemia e concentração elevada de homocisteína em pacientes com isquemia crônica de membros observados no presente estudo, concorda com os resultados publicados na literatura internacional e nacional. Portanto, é provável que, fatores culturais e sócio-econômicos cogitados e peculiares da presente amostra não tenham influenciado diferentemente os níveis de homocisteinemia, em comparação à outras populações estudadas, inclusive internacionais.

A agressão ao endotélio é um dos mecanismos pelo qual a homocisteína leva à lesão vascular, sendo o mais provável a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade. O grupo sulfidrila (SH) presente na homocisteína reagiria com o oxigênio produzindo espécies reativas do metabolismo de oxigênio (superóxido e peróxido de hidrogênio), as quais iniciam a peroxidação lipídica, tanto na superfície endotelial

como nas partículas de LDL. Uma vez oxidada dentro do tecido arterial, essa LDL induziria um acúmulo de monócitos, os quais penetrariam na parede da artéria onde se diferenciariam em macrófagos, que contêm receptores nas membranas para a LDL, principalmente para as LDL oxidadas. Esses receptores *scavenger* presentes nos macrófagos seriam capazes de captar pequenas quantidades de LDL, mas quando excesso de LDL é oferecido, os macrófagos na camada íntima da artéria fagocitariam as LDL oxidadas que se acumulariam no seu citoplasma sob a forma de vacúolos, transformando-os em células espumosas e, conseqüentemente, em estrias gordurosas, características de lesões ateroscleróticas<sup>30</sup>. No entanto, estudos atuais mostraram o papel dúbio dos macrófagos, de um lado limitando a oxidação da LDL pela fagocitose e, de outro, favorecendo o processo de oxidação juntamente com as células musculares lisas e endoteliais, disponibilizando espécies reativas do oxigênio. O processo de fagocitose da LDL-oxidada com liberação de espécies reativas de oxigênio induziria a produção de grandes quantidades de proteases digestivas pelos macrófagos, como a mieloperoxidase, as quais sairiam da matriz extracelular aumentando ainda mais a síntese de muitas espécies reativas de oxigênio, que amplificariam o processo de recrutamento de células musculares lisas da camada média do vaso, para a camada íntima<sup>31</sup>.

Pesquisas experimentais recentes reforçaram o papel da hiperhomocisteinemia (no caso, induzida pelo alto consumo de metionina), na formação de placa aterosclerótica de aorta de suínos e artéria íliaca de coelhos. Após período de 30 ou 60 dias de dieta rica em metionina, houve aumento significativo nas concentrações de homocisteína e a formação de placas ateroscleróticas por

macrófagos espumosos, mas não foram observadas células musculares lisas, cristais de colesterol ou células inflamatórias<sup>32,33</sup>.

Um estudo realizado em homens idosos portadores de claudicação intermitente moderada procedentes do mesmo serviço de cirurgia vascular do presente estudo, demonstrou aumento significativo de concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias (interleucina 6-IL-6, fator de necrose tumoral-alfa-TNF- $\alpha$ , interferon-gama-IFN- $\gamma$ ), anti-inflamatórias (interleucina 10-IL-10 e fator transformador de crescimento beta-TGF- $\beta$ ) e PCR us quando comparados aos controles. No entanto, foi observada uma associação inversa entre as citocinas pró-inflamatórias e ativação de monócitos, revelando um processo de hipoatividade dos monócitos nos pacientes com claudicação intermitente<sup>34</sup>.

Embora a oxidação da fração LDL através da homocisteína seja um dos mecanismos mais aceitos para a formação da placa aterosclerótica, no presente estudo observou-se que as concentrações basais de LDL-oxidada foram semelhantes nos controles e nos pacientes com ICM. Após 2 meses de tratamento, o grupo ICM tratado com placebo apresentou inexplicavelmente uma redução significativa de LDL-oxidada circulante, porém as concentrações médias finais de LDL-oxidada não diferiram estatisticamente entre os grupos controle, ICM tratado com ácido fólico e ICM tratado com placebo. Talvez nos indivíduos com ICM, outros fatores possam ter interferido na avaliação final da LDL-oxidada, como o sistema de defesa antioxidante, mas este aspecto deve ser objeto de outros estudos, de preferência em grandes amostras da população.

### **Tratamento nutricional da hiper-homocisteinemia**

O tempo, o suplemento vitamínico e a dose de tratamento utilizados nos diversos estudos que objetivaram a redução da homocisteína foram muito variáveis e, no presente estudo, 400 µg de ácido fólico administrado por dois meses pareceram ser suficientes para a redução homocisteína, mas insuficientes para alterar as concentrações de LDL-oxidada.

O processo aterosclerótico é sistêmico e de caráter inflamatório<sup>11</sup>. Estudos recentes sugerem que indivíduos com doença aterotrombótica coronariana, cerebral ou periférica ou, em risco de desenvolverem tais enfermidades, apresentam níveis plasmáticos elevados de alguns marcadores sistêmicos da resposta inflamatória crônica, especialmente a PCR<sup>12</sup>. A influência da elevação (ou redução) da concentração de homocisteína sobre marcadores inflamatórios sistêmicos da aterosclerose como a PCR, ainda é controversa na doença arterial periférica. Os resultados do presente estudo, obtidos após 2 meses de tratamento com 400 µg/dia de ácido fólico em pacientes com isquemia crônica de membros mostraram redução da homocisteína, mas sem alteração das concentrações de PCR. Resultados semelhantes foram observados em um recente estudo com homens e mulheres saudáveis com idade entre 50 e 70 anos que receberam 800 µg de ácido fólico (n=264) ou placebo (n=266) diariamente por 12 meses. Houve aumento de 400% na concentração de folato sérico, redução significativa nas concentrações de homocisteína (28%) e manutenção das concentrações de PCR us e LDL-oxidada<sup>35</sup>. Em outro estudo controlado duplo-cego, semelhante ao anterior, com 65 pacientes hiperhomocisteinêmicos portadores de DAP sintomática recebendo placebo, ou

combinação de vitaminas do complexo B (B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>), ou ácido fólico (500 µg) por 6 meses, observou-se que o tratamento para redução da homocisteína não alterou os marcadores de hemostasia (fator tissular-TF e inibidor da via do fator tissular-TFPI) e inflamação crônica como a PCR us, interleucinas (6,8 e 18) e proteína quimiotática de monócito (MCP-1)<sup>36</sup>. Os autores questionaram se o tratamento para redução da homocisteína em pacientes com DAP sintomática controlaria o processo inflamatório crônico inerente a aterosclerose e também se haveria efeito da hiper-homocisteinemia na inflamação crônica e na coagulação de pacientes com DAP sintomática. Por outro lado, em outro estudo, a associação de vitaminas antioxidantes como o alfa-tocoferol, ácido ascórbico, beta-caroteno, com o ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub> por 15 dias, foi mais efetiva em reduzir significativamente a oxidação da LDL *in vitro* em pacientes com doença arterial coronariana<sup>37</sup>.

Uma recente revisão sistemática da *Cochrane Library* concluiu que estudos bem desenhados deveriam ser realizados urgentemente para avaliar o impacto do tratamento da hiper-homocisteinemia sobre a progressão da DAP. Os autores enfatizaram que a homocisteína é fácil de ser avaliada, e mais importante, fácil e barata de ser tratada<sup>38</sup>.

O presente ensaio clínico, em pacientes com ICM, mostrou redução (18%) e normalização da homocisteína plasmática e aumento do folato sérico (54%) com a suplementação medicamentosa diária de 400 µg de ácido fólico em apenas 2 meses de tratamento. Uma possível limitação do mesmo poderia ser o fato de todos os pacientes com ICM terem sido tratados com ácido fólico ou placebo, independentemente da sua condição de homocisteinemia basal, prévia ao

tratamento. No entanto, tendo em vista a escassez desta intervenção em indivíduos portadores de DAP em nosso meio, este estudo contribuiu para sugerir essa conduta terapêutica frente à hiper-homocisteinemia nesses pacientes.

Desde que a hiper-homocisteinemia foi apontada como fator de risco para doenças vasculares, diversos estudos utilizaram o ácido fólico para reduzir as concentrações sanguíneas deste aminoácido em várias situações. Uma meta-análise realizada por Boushey et al.<sup>24</sup> em 1995 mostrou resultados pioneiros do efeito do tratamento com ácido fólico sobre a homocisteinemia. Nesta meta-análise, nove estudos de intervenção apontaram redução da homocisteína e normalização do folato sérico após suplementação isolada de ácido fólico (mais que 400 µg/dia) e concluíram que o consumo de aproximadamente 200 µg de folato dietético (3 porções ou mais de frutas e vegetais ao dia) reduziria em 4 µmol/L as concentrações de homocisteína na doença cardiovascular, cerebrovascular e arterial periférica. Entretanto, nem todas doenças vasculares associadas à hiper-homocisteinemia seriam prevenidas com a suplementação de ácido fólico, e a fortificação ou aumento no consumo de alimentos com folato teria provavelmente um impacto preventivo maior. Em outra meta-análise com 12 estudos randomizados e 1114 indivíduos<sup>39</sup>, os efeitos redutores do ácido fólico sobre a homocisteína na doença vascular também foram verificados. A utilização diária de 50 a 500 µg de ácido fólico entre 3 e 12 semanas reduziu em 25% a concentração de homocisteína, e a redução foi maior em indivíduos hiperhomocisteinêmicos (maior que 12 µmol/L) e com deficiência sérica de folato (menor que 12 nmol/L) antes do tratamento com ácido fólico. Os autores relataram ainda que a suplementação com vitamina B<sub>12</sub> potencializou a redução da

homocisteína em 7% e a vitamina B<sub>6</sub> não teve efeito adicional na redução da homocisteína. Pelo menos dois estudos prévios em indivíduos procedentes da mesma região do presente estudo, confirmaram estes achados (ref|) . Em um estudo caso-controle com a suplementação de ácido fólico (500 µg) associado à vitamina B<sub>12</sub> (40 mg) em 40 pacientes com DAP sintomática acompanhados no serviço de cirurgia vascular do presente estudo, mostrou eficiência na normalização da homocisteinemia em 4 semanas de tratamento (antes  $18,80 \pm 7,73$  µmol/L e após  $11,34$  µmol/L  $p < 0,001$ ), ao contrário da suplementação com vitamina B<sub>6</sub> (250 mg) que não alterou a homocisteinemia<sup>40</sup>. Da mesma forma, outro estudo do tipo cruzado realizado com indivíduos adultos hipertensos praticantes de exercício físico supervisionado (n=69), mostrou redução significativa das concentrações médias de homocisteína após 2 meses de tratamento com ácido fólico (500 µg) na ausência do uso de diurético<sup>41</sup>. Esses resultados reforçam a indicação de adequado suprimento dietético do folato, como adjuvante terapêutico nas doenças vasculares, pelo menos quanto à redução da homocisteinemia.

A dose de 400 µg de ácido fólico utilizada no tratamento da hiperhomocisteinemia no presente estudo está de acordo com a *Recommended Dietary Allowance* (RDA) ou Recomendações de Cotas Alimentares preconizadas pela *Dietary Reference Intakes*<sup>20</sup>, definidas como nível de consumo alimentar suficiente para satisfazer as necessidades de quase todo indivíduo saudável (entre 97 e 98%) compreendido num determinado grupo, faixa etária e estágio da vida. No Brasil desde 2004, entrou em vigor uma resolução que torna obrigatória a fortificação de cereais como farinha de trigo e milho com 150 µg de ácido fólico por 100 g de cereal,

o que representa 37% da RDA para adultos, com o objetivo de prevenir defeitos do tubo neural em recém-nascidos<sup>42</sup>. Entretanto, a dieta da maioria da população mundial não atinge as recomendações nutricionais de folato<sup>43</sup>. Desse modo, é importante o aumento da ingestão de alimentos fontes de folato (vísceras, cereais integrais, soja, feijão, vegetais de folhas verdes, laranja, banana, batata) bem como de vitamina B<sub>6</sub> (banana, abacate, vísceras, oleaginosas, cereais integrais) e vitamina B<sub>12</sub> (vísceras, carnes em geral, ovos, leite e queijos), embora a relação entre consumo e concentração sérica destas vitaminas ainda seja imprecisa. Em um estudo nacional com 40 idosos, os autores usaram instrumentos de investigação alimentar para estimar o consumo de folato e vitamina B<sub>12</sub>, através do recordatório de 24 horas e do questionário semiquantitativo de frequência alimentar, e não mostraram associação entre a estimativa de consumo aos níveis séricos destas vitaminas<sup>44</sup>. Confirmou-se no presente estudo, no grupo ICM tratado com placebo, que o consumo de folato, estimado pelo recordatório de 24 horas, não foi compatível com a concentração sérica de folato após o tratamento.

### ***Tratamento da hiper-homocisteinemia e polimorfismo 677C→T da enzima MTHFR***

Embora o estado nutricional das vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> e principalmente de folato, seja um dos parâmetros mais importantes na regulação da homocisteinemia, a influência das mutações genéticas deve ser considerada e foi investigada neste estudo. As mutações genéticas associadas com hiper-homocisteinemia leve e moderada (15 a 100 µmol/L) causam redução de 50% na atividade da enzima

correspondente. Dentre essas mutações, as mais comuns são decorrentes de heterozigose para alterações moleculares associadas com deficiência das enzimas MTHFR e cistationina  $\beta$  sintetase (CBS)<sup>45</sup>. Entretanto, elevações moderadas na concentração de homocisteína não são encontradas em todos os portadores destas variações genéticas<sup>46</sup>, como observado no presente estudo, o que sugere que o fenótipo deve ser influenciado por fatores não genéticos, extrínsecos, como estado vitamínico, medicamentos, hormônios e algumas doenças, que podem modificar a expressão dos defeitos genéticos. Portanto, a investigação da causa da hiperhomocisteinemia moderada, deve sempre incluir os diversos fatores externos que afetam o metabolismo da homocisteína<sup>47</sup>. Adicionalmente, uma interação entre o genótipo para o polimorfismo e concentração reduzida de folato e cobalamina poderia determinar a homocisteinemia<sup>48</sup>. Indivíduos com a mutação para 677 C→T, especialmente o genótipo homozigoto, necessitam de doses diárias de folato acima de 250  $\mu\text{g}/\text{dia}$  para reduzir satisfatoriamente a homocisteinemia<sup>49</sup>. Em indivíduos saudáveis portadores e não portadores do alelo mutante para MTHFR 677C→T a presença da mutação genética não alterou a resposta aos tratamentos aplicados. A suplementação com L-5-MTHF, forma ativa do folato (113  $\mu\text{g}$ ), ou ácido fólico (100  $\mu\text{g}$ ) em 24 semanas foi igualmente efetiva em reduzir a homocisteinemia<sup>50</sup>.

### **Considerações finais**

A análise conjunta dos dados obtidos no presente estudo reforça a necessidade de determinar os níveis de homocisteína plasmática na ICM, bem como a adequação da ingestão de folato, seja com a fortificação de alimentos com ácido

fólico, seja a suplementação medicamentosa com ácido fólico na hiperhomocisteinemia. Ambos são procedimentos custo-efetivos que apresentam eficácia e ausência de reações adversas, com uma relação risco/benefício bastante favorável na prevenção e no controle da homocisteinemia associados à ICM. Considerando a diversidade de resultados encontrados em estudos prospectivos quanto a influência dos vários tratamentos vitamínicos sobre a incidência, progressão e morte por lesões ateroscleróticas e sobre alguns marcadores do processo inflamatório crônico da aterosclerose, a realização de estudos adicionais nesta área serão de extrema importância para esclarecer se a suplementação com ácido fólico, nestas ou em quantidades superiores, por períodos mais extensos ou não, associados a outras condutas nutricionais complementares, seriam mais eficientes no combate à progressão da DAP e no aparecimento de complicações inerentes à mesma.

## **Conclusão**

---

O presente estudo verificou redução e normalização da homocisteína plasmática em pacientes com ICM após 2 meses de tratamento medicamentoso com 400 µg de ácido fólico, mas não verificou alteração dos marcadores inflamatórios crônicos da aterosclerose. A presença do polimorfismo 677C→T da enzima MTHFR não influenciou a resposta aos tratamentos nos pacientes com ICM.

## **Referências Bibliográficas**

---

1. Stoyioglou A, Jaff MR. Medical treatment of peripheral arterial disease: A comprehensive review. *J Vasc Interv Radiol* 2004; 15:1197-1207.
2. Lastória S, Maffei FHA. Aterosclerose obliterante periférica: Epidemiologia, fisiopatologia, quadro clínico e diagnóstico. In: Maffei FHA, Lastória S, Yoshida WB, Rollo HA (Eds.) *Doenças vasculares periféricas*. Rio de Janeiro: MEDSI. 2002, p.1007-1024.
3. Bhatt DL, Steg PG, Ohman EM et al. International prevalence, recognition, and treatment of cardiovascular risk factors in outpatients with atherothrombosis. *JAMA* 2006; 295:180-9.
4. TransAtlantic Intersociety Consensus (TASC) Working Group. Management of peripheral arterial disease (PAD). *Int Angiol* 2000; 19:5-34.
5. Hirch AT, Criqui MH, Treat-jacobson D, Regensteiner JG, Creager MA, Olin JW, Krook SH et al. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA* 2001; 286:1317-24.
6. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattström LE, Ueland PM, Palma-Reis RJ. et al. Homocisteína plasmática como fator de risco para doença cardiovascular *JAMA* 1997; 277:1775-81.
7. Venancio LS. Indicadores nutricionais e níveis de homocisteína em pacientes com doença arterial periférica. 2002. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

8. Merchant AT, Hu FB, Spiegelman D, Willett WC, Rimm EB, Ascherio A. The use of vitamin supplement and peripheral arterial disease risk in men are inversely related. *J Nutr* 2003; 133:263-7.
9. Malinow MR, Duel PB, Hess DL, Anderson PH, Kruger WD, Phillipson BE, et al. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary heart disease. *N Engl J Med* 1998; 338: 1009-15.
10. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10:111-3.
11. Ross R. Atherosclerosis-An inflammatory disease. *N Engl J Méd* 1999; 340:115-126.
12. Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis. A comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein (a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA* 2001; 285:2481-5.
13. Kuller LH, Evans RW. Homocysteine, vitamins and cardiovascular disease. *Circulation* 1998; 98:196-9.
14. Brevetti G, Silvestro A, Di Giacomo S, Burcur R, Di Donato A, Schiano V, Scopacasa F. Endotelial dysfunction in peripheral arterial disease is related to increase in plasma markers of inflammation and severity of peripheral circulatory impairment but not to classic risk factors and atherosclerotic burden. *J Vasc Surg* 2003; 38:374-9.

15. Rutherford, R.B. Recommended standards for reports on vascular disease and its management. In: Callow, A.D., Ernest, C.B. (Eds.). *Surgery: Theory and practice*. Stamford: Appleton & Lange, 1995. p.1145-59.
16. Friedewald W, Levy R, Fredrickson D. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.
17. Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1987; 422:43-52.
18. Ubbink JB, Vermaak WJH, Bissbort S. Rapid high performance chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum. *J Chromatogr* 1991; 565:441-6.
19. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993; 39:1764-79.
20. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. *Dietary Reference Intakes (DRI) for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B<sub>6</sub>, folate, vitamin B<sub>12</sub>, pantothenic acid, biotin, and coline*. Washington (DC): National Academy Press; 2000.
21. World Health Organization. *Report of WHO Consultation on Obesity. Obesity, preventing and management the Global Epidemic*. Geneve, 2000.
22. Han TS, van Leer EM, Seidell JC, Lean ME. Waist circumference action levels in the identification of cardiovascular risk factors prevalence study in a random sample. *Br Med J* 1995; 311: 1401-5.

23. Van Bellen B. Doppler ultra-som, índice de pressão e prova de esforço na avaliação de doenças arteriais. In: Maffei FHA, Lastória S, Yoshida WB, Rollo HA (Eds.) Doenças vasculares periféricas. Rio de Janeiro: MEDSI. 2002, p. 319-27.
24. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. JAMA 1995; 274:1049-57.
25. Tavares JR, D'Almeida V, Diniz DC et al. Analysis of plasma homocysteine levels in patients with unstable angina. Arq Bras Cardiol 2002; 79:167-72.
26. Taddei CFG, Batlouni M, Sarteschi C et al. Hiper-homocisteinemia como fator de risco para doença aterosclerótica coronariana em idosos. Arq Bras Cardiol 2005; 85:166-73.
27. Faria-Neto JR, Chagas ACP, Bydlowski SP et al. Hyperhomocysteinemia in patients with coronary artery disease. Braz J Med Biol Res 2006; 39:435-63.
28. Garófolo L, Barros JR N, Ferreira SRG, Sanudo A, Miranda JR F. Moderate hyperhomocysteinemia in atherosclerotic peripheral arterial disease in the diabetics nipo-brazilian population in the city of Bauru. J Vasc Br 2003; 02- suppl.1: S82.
29. Miranda JR F, Garófolo L, Barros JR N, Ferreira SRG, Sanudo A. Influence of gender in a association between moderate hyperhomocysteinemia and peripheral arterial disease in diabetics nipo-brazilian in the city of Bauru. J Vasc Br 2003; 02-supl.1: S82.
30. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. J Clin Invest 1996; 98:5-7.

31. Hulthe J. Antibodies to oxidized LDL in atherosclerosis development- clinical and animal studies. *Clin Chim Acta* 2004; 348:1-8.
32. Stahlke Júnior HJ, França LHG, Stahlke PH, Stahlke PS. Hiper-homocisteinemia causando aterogênese na aorta de coelhos-modelo experimental. *J Vasc Br* 2004; 3:20-30.
33. França LHG, Pereira AH, Perini SC et al. Aterogênese em artéria ilíaca comum de suínos submetidos à homocisteinemia induzida pela ingestão de metionina. *J Vasc Br* 2006; 5:11-6.
34. Corrêa-Camacho CR. Estudo da ativação de monócitos e produção de citocinas em pacientes com aterosclerose obliterante periférica. 2006. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).
35. Durga J, van Tits LJH, Schooten EG et al. Effect of lowering of homocysteine levels on inflammatory markers. A randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 2005; 165:1388-94.
36. Schernthaner GH, Plank C, Minar E et al. No effect of homocysteine-lowering therapy on vascular inflammation and haemostasis in peripheral arterial occlusive disease. *Eur j Clin Invest* 2006; 36:333-39.
37. Bunout D, Garrido A, Suazo M et al. Effects of supplementation with folic acid and antioxidant vitamins on homocysteine levels and LDL oxidation in coronary patients. *Nutrition* 2000; 16:107-110.
38. Hansrani M, Stansby G. Homocysteine lowering interventions for peripheral arterial disease and bypass grafts (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, 1, 2006. Oxford: Update Software.

39. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomized trials. *BMJ* 1998; 316: 894-8.
40. Venâncio LS, Santos MDB, Yoshida WB. Efeitos da suplementação vitamínica de ácido fólico, vitamina B12 e vitamina B6 sobre a concentração de homocisteína em indivíduos portadores de doença arterial periférica. *J Vasc Br* 2003; 2 (supl. 1) S83.
41. Pereira AF. Efeito da suplementação de ácido fólico e do exercício físico sobre as concentrações de homocisteína plasmática em indivíduos portadores de hipertensão arterial essencial. 2004. Tese (Doutorado)- Ciências dos Alimentos, Universidade de São Paulo (USP).
42. ANVISA (Brasil). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária- Divulga-Informes Técnicos. Farinha terá ácido fólico para combater anencefalia em bebês. 2002 (acesso 23/07/2006 em <https://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2002>).
43. Malinow MR, Bostom AG, Krauss RM. Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart association. *Circulation* 1999; 99:178-82.
44. El Kik RM. Avaliação da associação entre a estimativa de consumo e os níveis séricos de folato e de vitamina B12 no idoso. 2002. Dissertação (Mestrado)- Gerontologia Biomédica, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).
45. Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 81: 165-76.

46. Muniz MTC. Avaliação do polimorfismo genético para MTHFR (metilenotetrahidrofolato redutase) e sua correlação com os níveis de homocisteína em pacientes com doença arterial coronariana- Recife-Brasil. 2002. Tese (Doutorado)- Biologia Molecular- Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).
47. Kang SS. Critical points for determining moderate hyperhomocyst(e)anemia. *Eur J Clin Invest* 1995; 25:806-8.
48. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 93:7-9.
49. De Bree A, Verschuren M, Bjorke AL, van der Put N, Heil SG, Trijbels F, Blom H. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample. *Am J Clin Nutr* 2003; 77:687-93.
50. Venn BJ, Green TJ, Moser R, Mann JI. Comparison of the effect of low-dose supplementation with L-5-methyltetrahydrofolate or folic acid on plasma homocysteine: a randomized placebo-controlled study *Am J Clin Nutr* 2003; 77:658-62.



**Anexo 1**



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

**PARECER Nº 1132/2003**

**Registro CONEP = 7806** ( Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto )

**Registro CEP = 1228-2003**

**Processo nº 25000.054658/2003-13**

**Projeto de Pesquisa:** " *Efeitos da suplementação vitamínica de ácido fólico sobre a homocisteína em indivíduos portadores de doenças arterial periférica.* "

**Pesquisador Responsável:** Luciene de Souza Venâncio

**Instituição :** Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

**Área Temática Especial :** Genética Humana

Ao se proceder a análise das respostas ao Parecer 1040/2003, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

a) foram atendidas as solicitações do referido parecer. Entretanto, a linguagem do TCLE continua de difícil compreensão para os usuários dos serviços de saúde pública. Recomenda-se que o processo de obtenção do consentimento seja bastante cuidadoso.

b) o projeto preenche, de modo geral, os requisitos fundamentais da Resolução CNS 196/96 sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;

c) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada .

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, com a recomendação explicitada no item a) , a ser acompanhada pelo CEP

**Situação :** Projeto aprovado com recomendação

Brasília, 25 de julho de 2003

WILLIAM SAAD HOSSNE

Coordenador da CONEP/CNS/MS



Anexo 3



**Verdadeiramente!**  
**ISO 9001**  
**Galena**  
Sistema de Qualidade certificado pelo DQS nº 040017 001

**Produto: LACTOSE MONOHIDRATADA 200 MESH**

Data de Fabricação: 17/07/03      País de Origem: ARGENTINA  
 Data de Validade: 17/07/05      Lote de Fabricação: 2899  
 Nota Fiscal: 0536006      CIQ: 7031103835      133372-5  
 Volumes: 04 /05 /06

**CERTIFICADO DE ANÁLISE**

FC00003353

006  
Seq.036-000

---

FÓRMULA MOLECULAR: C12 H22 O11 . H2O  
 PESO MOLECULAR: 342,3  
 CAS: 10039-26-6  
 FUNÇÃO: Excipiente

ARMazenamento: À temperatura ambiente, em recipiente perfeitamente fechado, protegido de luz e umidade.

Exame/Componentes	Especificação	Resultado dos exames
<b>CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS</b>		
- Aparência*	Pó branco de boa fluidez.	Pó branco de boa fluidez.
<b>SOLUBILIDADE</b>		
- Água*	Fácil, porém lentamente solúvel. Praticamente insolúvel.	Fácil, porém lentamente solúvel. Praticamente insolúvel.
<b>PROVA DE OSMOSMOMETRIA</b>		
- 1 ml. 10% em 10 ml. de água*	No máximo 0,5%	0,0%
<b>IDENTIFICAÇÃO</b>		
- Difusão em membrana*	Positivo	Positivo
<b>CLÍZAN SULFATADA</b>		
- Clízina sulfatada	No máximo 0,1%	0,1%
<b>AVANÇO REFE 19 (C)</b>		
- Rotação específica***	+54,4% a +55,9%	+55,5%
<b>ALCALINIDADE</b>		
- pH, a 20°C	No máximo 0,04	0,02
<b>PROVA DE ESTAB. PROT.</b>		
- Menor que 5 ppm.	No máximo 5 ppm.	Menor que 5 ppm.
<b>DENSIDADE APROXIMADA</b>		
- Sem água de cristalização*	Informativo	0,5 g/mL
<b>ACT. DE ALCALINIDADE</b>		
- Ácidos	No máximo 0,4 ml de NaOH 0,1N/0g.	0,2 ml
<b>DISCORRÊNCIA</b>		
- 210 nm a 220 nm	No máximo 0,25	0,15
- 270 nm a 300 nm	No máximo 0,07	0,04
<b>PROTEÍNA</b>		
- (M x 0,3% Bialalab)	No máximo 0,10%	0,01%
<b>CONTROLE MICROBIOLÓGICO</b>		
- Fungos e leveduras	No máximo 50 ufc/g	10 ufc/g
- Coliformes totais	Ausente	Ausente
- Mesófilos aeróbios	No máximo 100 ufc/g	20 ufc/g

**55 931 836/0001-00**

**FARMACIA FARMALAS LTDA.**

RUA GENÉRAL TELLES N.º 1275  
 JARDIM SÃO CARLOS - F.º 18.602  
 RONDONÓPOLIS - SP

**OBSERVAÇÃO**

(\*) Testes realizados no Laboratório de Controle da Qualidade Galena.  
 (\*\*\*) Testes realizados no Oswaldo Cruz Labservice.  
 (\*\*\*\*) Testes realizados na T&E Analítica. Os demais estão em conformidade com o certificado de análise do fornecedor.  
 Referência: USP 21



Rua Pedro Stancato, 860 - Campos dos Amarais - CEP 13082-560 - Campinas/SP - DDG 0800-7014311 - www.galena.com.br

G A R A N T I D A D E

**Anexo 3**

 <b>Verdadeiramente!</b> <b>ISO 9001:2000</b> <b>Valera</b> <small>Sistema de Qualidade certificado pelo DQS nº 00487-03M</small>	<b>Produto: LACTOSE MONOHIDRATADA 200 MESH</b>		<b>006</b> Seq.037-000
	<b>Data de Fabricação: 17/07/03</b>	<b>Pais de Origem: ARGENTINA</b>	
	<b>Data de Validade: 17/07/05</b>	<b>Lote de Fabricação: 2899</b>	
	<b>Nota Fiscal: 0536006</b>	<b>CIQ: 7031103835</b>	133372-5
	<b>Volumes: 04 /05 /06</b>		
(Continuação...)	<b>CERTIFICADO DE ANÁLISE</b>		FCQ0003353
<b>Resultado: ( X ) Aprovado</b>	<b>Data da Análise: 30/09/2003</b>	<b>55 931 836 / 0001-00</b>	
		<b>FARMACIA FARMALAS LTDA.</b>	
<b>Theóphilo Marinho Neto</b> Farmacêutico Responsável CRF-SP: 18.016		<b>RUA GENERAL TELLES N.º 1275</b> CENTRO - CEP 18.602-120 BOTUCATU - SP	

U  
L  
A  
L  
I  
D  
A  
D  
E

## Anexo 4



Botucatu, 13 de abril de 2006.

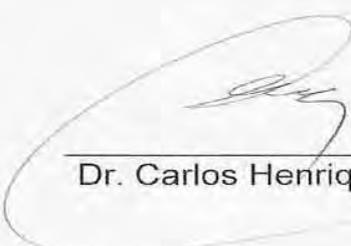
A quem interessar possa:

Através deste comprovar os laudos originais (cópias), em anexo, das matérias-primas utilizadas para a manipulação da fórmula registrada sob nº 140407 (ácido fólico 400mcg).

55 931 836/0001-00

FARMACIA FARMALAS LTDA.

RUA GENERAL TELLES Nº 1275  
CENTRO - CEP 18.602-120  
BOTUCATU - SP



Dr. Carlos Henrique Portes Malatrasi  
Farmacêutico  
CRF-SP 11786

Dr. Carlos Henrique  
Portes Malatrasi  
CRF-SP 11.886

*Farmácia Medicinal*  
R. Gal. Telles, 1275 - Centro - Botucatu - SP  
Tel/Fax: (14) 3882-5857 - [www.farmaciamedicinal.com.br](http://www.farmaciamedicinal.com.br)

Drª. Greicy Mara Mengue  
Feniman De Stefano  
CRF-SP 29.755

***APÊNDICE***

---

---

## Apêndice

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título:** Efeitos da suplementação vitamínica de ácido fólico sobre a homocisteína em indivíduos portadores de doença arterial periférica.

**Objetivo:** Avaliar os efeitos da suplementação de ácido fólico no controle da concentração de homocisteína em indivíduos portadores de doença arterial periférica.

**Amostra:** Indivíduos portadores de doença arterial periférica (Isquemia Crônica de Membros) atendidos no Ambulatório de Claudicação do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP).

Indivíduos não portadores de doença arterial periférica participantes do Projeto de Extensão “Mexa-se pró Saúde” do Centro de Metabolismo em Exercício e Nutrição (CeMENutri) da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP).

**Orientador:** Prof. Adjunto Winston Bonetti Yoshida

**Autora da Pesquisa:** Luciene de Souza Venâncio - aluna da pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia - Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP).

Prezado colaborador

Esse termo de consentimento que você deverá assinar foi elaborado de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde, sobre Pesquisa Envolvendo Seres Humanos. Neste estudo você será submetido aos procedimentos listados abaixo:

- Avaliação da composição corporal com determinação do peso, estatura, dobras cutâneas, circunferência do braço, circunferência muscular do braço e cálculo do Índice de Massa Corporal, através da antropometria e impedância bioelétrica;
- Aplicação de questionário contendo perguntas sobre o hábito alimentar recente.
- Dosagens laboratoriais, de homocisteína de jejum, além de outros exames bioquímicos como glicemia, lipídeos plasmáticos, provas de função hepática e renal, folato, proteína C reativa (PCR), LDL oxidada e genótipo da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR).
- Para obtenção dos dados laboratoriais serão necessários 20 ml de sangue.
- Suplementação vitamínica com a oferta de 400µg/dia de ácido fólico ou placebo por um período de 2 meses, ou sem suplementação.

Para seu esclarecimento informamos ainda, os resultados obtidos em análise serão arquivados e mantidos em sigilo conforme normas da ética.

Ciente do teor e implicações desta pesquisa, assino abaixo, meu consentimento em participar da mesma, com a liberdade de sair desse protocolo em qualquer momento da execução desse projeto sem penalização.

Botucatu (SP), \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

#### Assinatura do paciente

Pesquisador: Luciene de Souza Venâncio  
Endereço: Rua Chico Padre, 44/31  
Centro- Botucatu (SP)-CEP. 18611-310  
Telefone: (14) 3882-6570 / 9798-2711  
e-mail: lucienenutri@yahoo.com.br

#### Assinatura do pesquisador

Orientador: Prof. Adj. Winston Bonetti Yoshida  
Endereço: Rua Dr. Domingos Minicucci Filho, 231  
Vila Sônia- Botucatu (SP)- CEP. 18607-030  
Telefone: (14) 3882-4118  
e-mail: winston@fmb.unesp.br

Autorizo a reprodução deste trabalho.

Botucatu, 15 de dezembro de 2006.

**LUCIENE DE SOUZA VENANCIO**