

Hiper-homocisteinemia causando aterogênese na aorta de coelhos – modelo experimental

Hyperhomocysteinemia causing atherogenesis in rabbits' aorta – an experimental model

Henrique Jorge Stahlke Júnior¹, Luís Henrique Gil França²,
Paulo Henrique Stahlke³, Paulo Sérgio Stahlke³

Resumo

Objetivo: Este estudo tem por objetivo avaliar os efeitos da homocisteinemia plasmática elevada na formação da placa aterosclerótica na aorta de coelhos.

Material e método: Realizou-se estudo experimental comparativo em dois grupos homogêneos de coelhos durante 60 dias. Foram utilizados 20 coelhos da linhagem New Zealand divididos em dois grupos de 10 animais: grupo controle (C) e grupo metionina (M). Todos os animais receberam a mesma dieta sólida e 500 ml de água. Os animais do grupo M receberam 2 ml de uma solução de metionina na concentração de 200 mg/ml a cada 24 horas. Foram colhidas amostras de sangue para a dosagem de colesterol, triglicerídeos, HDL, LDL e homocisteína após 0, 30 e 60 dias. Os animais foram submetidos a eutanásia por dose letal de anestésico no 60º dia. A aorta torácica e a aorta abdominal foram retiradas para estudo anatomopatológico.

Resultados: Não houve alterações significativas nos níveis de colesterol total, triglicerídeos, HDL e LDL nos dois grupos. No grupo C, não houve alteração para a homocisteína entre os dias 0, 30 e 60. No grupo M, os níveis séricos de homocisteína variaram de um valor médio de 3,65 µmol/l no dia 0 para 11,10 µmol/l no 30º dia e para 16,19 µmol/l no 60º dia ($P < 0,0001$). O exame microscópico das aortas dos coelhos do grupo C não apresentou alterações patológicas e foi semelhante em todas as preparações examinadas, encontrando-se túnica íntima hiperplasiada com endotélio preservado e presença de depósitos subendoteliais. As placas eram formadas por macrófagos espumosos, mas não foram observadas células musculares lisas, cristais de colesterol ou células inflamatórias. A túnica média apresentava-se com lâmina elástica interna íntegra.

Conclusão: Concluiu-se que a homocisteinemia causou aterogênese na aorta de coelhos.

Palavras-chaves: homocisteína, aorta, coelhos, desenho experimental.

Abstract

Objective: This study aims at evaluating the effects of hyperhomocysteinemia in the formation of atherosclerotic plaques in the aortas of rabbits.

Material and method: An experimental comparative study was performed with two homogenous groups of rabbits during 60 days. Twenty New Zealand rabbits were divided into two groups of 10: control group (C) and methionine group (M). All rabbits received the same solid diet and 500 ml of water. Rabbits in group M received 2 ml of a methionine solution at 200 mg/ml every 24 hours. Blood samples were collected for analyses of total cholesterol, triglycerides, HDL, LDL and homocysteine concentrations on the 0, 30th and 60th days. Euthanasia was performed by use of a lethal dose of anesthetic on the 60th day. Thoracic and abdominal aortas were removed for anatomicopathological study.

Results: There was no significant change in total cholesterol, triglycerides, HDL and LDL concentrations in either group. There was no change in plasma homocysteine levels in group C on the 0, 30th and 60th days. In group M, plasma homocysteine levels ranged from an average value of 3.65 µmol/l on the 0 day to 11.10 µmol/l on the 30th day, and 16.19 µmol/l on the 60th day ($P < 0.0001$). Microscopic examinations of the aortas of group C did not evidence any pathological changes, being similar to each other in all stainings, with hyperplastic intima, preserved endothelium and presence of subendothelial deposits. Plaques were formed by foam macrophages, but there were no smooth muscle cells, cholesterol crystals or inflammatory cells. Tunica media presented intact internal elastic lamina.

Conclusion: We concluded that homocysteinemia caused atherogenesis in the aortas of rabbits.

Key words: homocysteine, aorta, rabbits, experimental design.

1. Professor adjunto e coordenador da Disciplina de Cirurgia Vascular, Hospital das Clínicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR.
2. Cirurgião vascular. Pós-graduando em Clínica Cirúrgica, nível Mestrado, Hospital das Clínicas, UFPR, Curitiba, PR.
3. Cirurgião vascular, Hospital das Clínicas, UFPR, Curitiba, PR.

Artigo submetido em 30.04.03, aceito em 18.11.03.

Ao longo do século XX, o controle das doenças infecto-contagiosas e a melhora das condições de vida praticamente duplicaram a expectativa de vida dos indivíduos nos países desenvolvidos¹. Esse aumento da longevidade humana fez com que as doenças degenerativas do sistema circulatório figurassem como o maior problema de saúde pública no final do século passado e início deste². A doença aterosclerótica é a principal causa de morte nos países ocidentais¹. A Organização Mundial da Saúde prevê que as doenças circulatórias se tornarão o principal problema de saúde neste século. Nos Estados Unidos, a cada ano, aproximadamente 5,4 milhões de pessoas são diagnosticadas com coronariopatias, e mais de 550.000 mortes são atribuídas à aterosclerose coronária³. No Brasil, as doenças cardiovasculares também ocupam o primeiro lugar entre as causas de morte, vitimando aproximadamente 300.000 brasileiros por ano. As três capitais que apresentam os maiores coeficientes de mortalidade por doença isquêmica são, em ordem decrescente, Porto Alegre, Rio de Janeiro e Curitiba⁴.

Dentre os fatores de risco mais tradicionais para a aterosclerose, destacam-se hipertensão arterial, diabetes melito, obesidade, sedentarismo, história familiar de coronariopatia, sexo masculino, tabagismo e hipercolesterolemia^{1,5}. Contudo, grande parte dos pacientes que desenvolveram doença clínica não apresenta nenhuma dessas condições⁶. Nos últimos anos, foram identificados outros fatores de risco, tais como as apolipoproteínas AI, AII, B, E e LP (a), o fibrinogênio e, mais recentemente, a homocisteína, os quais podem expandir o entendimento sobre os mecanismos fisiopatológicos da aterosclerose e possibilitar o desenvolvimento de novas medidas preventivas ou terapêuticas.

Em 1969, McCully² relatou o fato de que crianças com homocistinúria faleciam em decorrência do erro inato do metabolismo da cobalamina e da deficiência da enzima cistationina-b-sintetase. Essas crianças apresentavam aterosclerose grave, e a única anormalidade metabólica observada era a concentração elevada de homocisteína no plasma, tendo sido sugerido por McCully que a hiper-homocisteinemia seria responsável pela doença aterosclerótica.

O estudo posterior de Wilcken & Wilcken, em 1976, confirmou que a homocisteína plasmática elevada era fator de risco independente para a doença aterosclerótica⁷. Essa relação também foi confirmada em pacientes com doença carotídea, coronariana

e das artérias dos membros inferiores por Nehler & Taylor em 1997⁸.

Stampfer acompanhou 14.916 médicos pelo período de 5 anos e concluiu que o risco de infarto do miocárdio foi 3,1 vezes maior nos médicos que apresentaram homocisteína mais elevada⁹. Os estudos de Taylor, em 1991 e 1999, demonstraram maior incidência de homocisteína plasmática elevada em pacientes com doença arterial periférica quando comparados com o grupo controle assintomático. Os mesmos estudos evidenciaram a progressão da doença arterial periférica em pacientes com hiper-homocisteinemia numa avaliação prospectiva, com seguimento dos pacientes por 3 anos^{10,11}.

Alguns trabalhos experimentais mostraram que a hiper-homocisteinemia ou perfusão de homocisteína poderiam provocar alterações da parede arterial. Entretanto, em nenhum dos modelos experimentais empregados foi utilizada sobrecarga de metionina como agente indutor de hiper-homocisteinemia.

O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos aterogênicos da elevação de homocisteína plasmática provocada por sobrecarga de metionina na artéria aorta de coelhos.

Material e método

Delineamento experimental

Neste estudo, foram utilizados 20 coelhos albinos sadios da raça New Zealand, com peso médio de 2.000 ± 456 g, os quais foram mantidos no biotério do Laboratório de Pesquisas da Pós-graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná. O biotério é equipado de sistema de exaustão e ventilação com temperatura controlada, permitindo manter o ambiente em torno de 21 °C. Todos os animais foram pesados e examinados por veterinário para confirmar a sanidade dos mesmos. Para fins de adaptação, os animais foram colocados em gaiolas individuais com água e ração para roedores Nutriara durante 7 dias. Os animais foram randomizados por sorteio. Dentre os 20 coelhos, 10 foram separados em dois grupos aleatoriamente. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Bioética de Pesquisa em Animais da Universidade Federal do Paraná.

Descrição do protocolo

Após o período de adaptação, os coelhos foram divididos aleatoriamente em dois grupos, ficando em

gaiolas individuais numeradas de 1 a 10 para o grupo controle (grupo C) e de 11 a 20 para o grupo metionina (grupo M). Os animais do grupo C foram alimentados com ração para coelhos Nutriara e água potável *ad libitum*. Os animais do grupo M receberam a mesma ração e, além disso, 500 ml de água onde foram adicionados 2 ml de solução de metionina na concentração de 200 mg/ml a cada 24 horas. Todos os coelhos (grupo C e M) permaneceram com suas dietas por 60 dias.

Dosagens sanguíneas

Foram colhidas amostras de sangue para dosagem de colesterol, triglicerídeos, HDL, LDL e homocisteína nos dias 0, 30 e 60.

As dosagens do colesterol, triglicerídeos, LDL e HDL foram efetuadas pelo método enzimático-colorimétrico. A homocisteína foi dosada pelo método HPLC (cromatografia líquida de alta performance).

Análise estatística

Para a comparação dos grupos em cada um dos momentos e em relação a cada uma das variáveis, testou-se a hipótese nula de médias iguais *versus* a hipótese alternativa de médias diferentes. Para a verificação dessas hipóteses, adotou-se a análise de covariância, controlando-se os pesos dos coelhos e testando-se a homogeneidade das variâncias por meio do teste de Cochran. Para a comparação dos momentos, testou-se a hipótese nula de médias iguais entre os dois momentos sob comparação *versus* a hipótese de médias diferentes. Para tanto, adotou-se o teste *t* de Student para amostras pareadas. Em todos os testes, considerou-se o nível de significância de 5%¹².

Estudo anatomopatológico

Os animais foram submetidos a eutanásia por dose letal de tiopental sódico (Thionembital[®]) e pancurônio (Pavulon[®]). Foram retiradas a aorta torácica e a aorta abdominal, peças que foram fixadas em solução de formol a 10% e encaminhadas ao estudo anatomopatológico. Foi realizado exame macroscópico, avaliando-se comprimento, diâmetro e espessura máxima da parede da aorta. Enviaram-se para exame microscópico segmentos da porção distal, medial e proximal das aortas.

Preparo técnico

O material foi processado em autotécnico (JUNG, Histokinette, 2000) e então montado em blocos de parafina. Realizaram-se cortes dos blocos de 4-7 µm de espessura em micrótomo (A.O., American Optical 820), sendo colocados em lâminas de vidro tratadas com albumina. As lâminas foram coradas em hematoxilina-eosina, e colorações especiais foram feitas para fibras elásticas pela técnica de Weigert e pelo tricrômio de Mallory; em seguida, as lâminas foram montadas com bálsamo e laminula.

Avaliação histológica

Foram avaliados todos os cortes de aorta, do grupo M e do grupo C, em lâminas coradas por hematoxilina-eosina, preparados histológicos para a avaliação de fibras colagenosas. Analisou-se a túnica íntima quanto a espessura, revestimento endotelial, presença ou ausência de depósitos subendoteliais e tipo de células encontradas. Observou-se a túnica média, sua espessura, proporção de fibras elásticas e colagenosas e a integridade destas. Examinou-se ainda a presença ou ausência de depósitos, alterações arquiteturais e tipos celulares encontrados. Avaliou-se a adventícia quanto à celularidade e alterações arquiteturais.

Resultados

Peso dos animais

Os animais foram pesados na chegada ao biotério e no 60º dia da experimentação. Na primeira avaliação, no dia da chegada ao biotério, os coelhos dos grupos C e M não apresentaram diferença significativa. No 60º dia da pesquisa, também não houve diferença significativa entre os grupos; portanto, em relação ao peso tanto inicial como final, os grupos não diferem entre si. A Tabela 1 demonstra o peso médio dos coelhos juntamente com o desvio padrão desses pesos nos momentos do experimento.

Dosagens bioquímicas

Níveis séricos de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e de baixa densidade (LDL)

As dosagens séricas de HDL e LDL foram realizadas simultaneamente às de colesterol e triglicerídeos. Não se observou diferença significativa dos níveis séricos das lipoproteínas nos dois grupos (Tabelas 2 e 3).

Tabela 1 - Peso dos animais em gramas durante o experimento

Momento	Grupo	Média
0 dia	Controle	2.255,50
	Metionina	2.252,40
30 dias	Controle	2.260,80
	Metionina	2.270,00
60 dias	Controle	2.294,60
	Metionina	2.299,00

Dosagens de colesterol total

Não foi verificada diferença significativa nos níveis de colesterol total nos dois grupos. Em relação ao nível sérico de colesterol, os dois grupos não diferem significativamente entre si (Tabela 4).

Dosagem de triglicerídeos

Não houve diferença estatisticamente significativa no nível sérico de triglicerídeos entre os grupos C e M (Tabela 5).

Tabela 2 - Níveis de HDL (mg/dl)

Momento	Grupo	Média	<i>P</i>	Desvio padrão	<i>P</i>
0 dia	Controle	12,42	0,0029	2,4075	0,3715
	Metionina	15,69		1,7685	
30 dias	Controle	12,51	0,0059	2,3073	0,3290
	Metionina	15,40		1,6465	
60 dias	Controle	13,23	0,0247	2,5939	0,2698
	Metionina	15,74		1,7696	

Tabela 3 - Níveis de LDL (mg/dl)

Momento	Grupo	Média	<i>P</i>	Desvio padrão	<i>P</i>
0 dia	Controle	71,40	0,4160	15,3637	0,2167
	Metionina	76,30		10,0006	
30 dias	Controle	71,30	0,5411	15,3627	0,2266
	Metionina	75,10		10,0935	
60 dias	Controle	73,20	0,6373	14,5511	0,3244
	Metionina	76,00		10,3495	

Tabela 4 - Colesterol sérico (mg/dl)

Momento	Grupo	Média	P	Desvio padrão	P
0 dia	Controle	81,60	0,3341	5,0155	0,4929
	Metionina	79,10		6,3500	
30 dias	Controle	80,50	0,2293	4,0893	0,2694
	Metionina	77,80		5,9963	
60 dias	Controle	81,10	0,4804	3,2128	0,0599
	Metionina	79,50		6,2583	

Tabela 5 - Triglicerídeo sérico (mg/dl)

Momento	Grupo	Média	P	Desvio padrão	P
0 dia	Controle	84,68	0,2836	17,8002	0,2639
	Metionina	76,95		12,0841	
30 dias	Controle	84,90	0,1894	17,3874	0,3376
	Metionina	75,50		12,4833	
60 dias	Controle	86,50	0,1865	17,8216	0,2483
	Metionina	77,10		11,9392	

Níveis de homocisteína ($\mu\text{mol/l}$)

Houve alteração significativa nos níveis de homocisteína entre o grupo com dieta rica em metionina e o grupo controle no período de 2 meses. O aumento da homocisteína plasmática já foi comprovado no 30º dia, com o aumento dos níveis séricos até a última dosagem, no 60º dia.

Ainda não foram estabelecidos níveis normais de homocisteína plasmática para animais de experimentação¹³; entre eles incluem-se os coelhos utilizados neste estudo. Os animais do grupo M e do grupo C receberam a mesma dieta sólida, incluindo vitaminas B6 e B12. Considerou-se como normal a média dos níveis plasmáticos da homocisteína do grupo controle, para serem comparados aos níveis plasmáticos da homocisteína do grupo M. No grupo controle, não houve alteração nos níveis de homocisteína nas 8 semanas do experimento; os animais apresentavam valores médios de 3,67 $\mu\text{mol/l}$ no dia 0, 3,65 $\mu\text{mol/l}$ no dia 30, e 3,70 $\mu\text{mol/l}$ no dia 60. No grupo M,

houve aumento dos níveis séricos da homocisteína, partindo de 3,65 $\mu\text{mol/l}$ no dia 0 para o valor médio de 11,10 $\mu\text{mol/l}$ no 30º dia e 16,19 $\mu\text{mol/l}$ no 60º dia (Tabela 6). No grupo M, a homocisteína sérica atingiu níveis aproximadamente cinco vezes maiores que no grupo controle no período de 60 dias. Nos dois grupos, os níveis de triglicerídeos, colesterol, HDL e LDL não sofreram alterações significativas, mostrando que não tiveram influência nos resultados.

No exame histológico da artéria aorta do grupo controle, predomina camada íntima delgada sem depósitos subendoteliais, lâmina elástica interna bem definida e ausência de células inflamatórias (Figuras 1 e 2).

No grupo M, os cortes histológicos mostram depósitos subendoteliais de macrófagos espumosos, fazendo protrusão na luz do vaso, sem sinais da presença de cálcio, diferentemente de lesões arteriais produzidas por dislipidemia ou a ela relacionadas, confirmando aterogênese produzida pela hiper-homocisteinemia (Figuras 3, 4 e 5).

Tabela 6 - Níveis séricos de homocisteína ($\mu\text{mol/l}$)

Momento	Grupo	Média	P	Desvio padrão	P
0 dia	Controle	3,67	0,1181	0,4347	0,8687
	Metionina	3,65		0,4601	
30 dias	Controle	3,65	< 0,0001	0,4378	0,0326
	Metionina	11,10		1,6633	
60 dias	Controle	3,70	< 0,0001	0,4163	0,9524
	Metionina	16,19		0,9267	

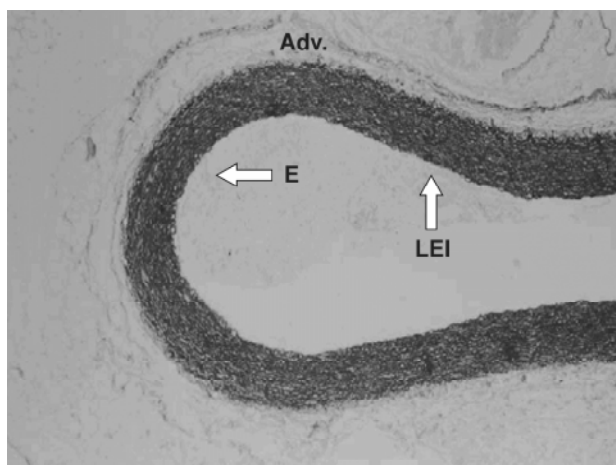


Figura 1 - Fotomicrografia da aorta de coelho do grupo C. Coloração para fibras elásticas pela técnica de Weigert. Aumento de 40 vezes. A figura mostra endotélio (E) e limitante elástica interna (LEI) bem definida, camada muscular sem anormalidades. Adventícia irregular.

Discussão

Nos últimos 50 anos, diversos fatores foram reconhecidos como de risco para doença aterosclerótica^{1,14}. Contudo, pelo menos a metade dos pacientes que desenvolve doença clínica não apresenta nenhum desses fatores⁶. A identificação de outros fatores que aumentariam o risco de doença aterosclerótica pode expandir

o entendimento sobre os seus mecanismos fisiopatológicos e possibilitar o desenvolvimento de novas medidas preventivas ou terapêuticas. Dentre os novos fatores identificados, estão a lipoproteína (a), o fibrinogênio¹⁵, os estados de hipercoagulabilidade sangüinea, conhecidos como trombofilia^{1,14}, e a homocisteinemia.

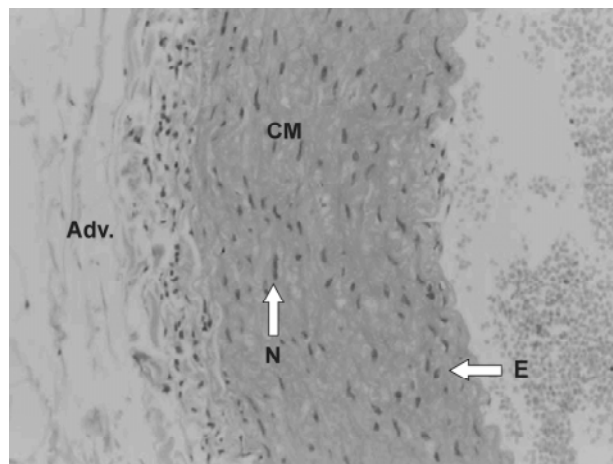


Figura 2 - Fotomicrografia da aorta de coelho do grupo C. Coloração hematoxilina-eosina. Aumento de 200 vezes. A figura mostra endotélio (E) bem definido, células musculares (CM) lisas com núcleo alongado, bordas rombas e citoplasma sem limites precisos. Adventícia com irregularidades.

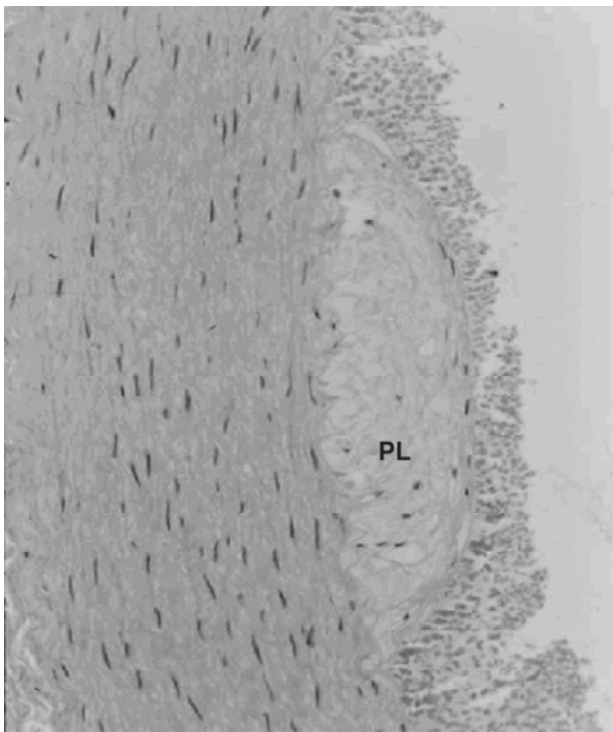


Figura 3 - Fotomicrografia da aorta de coelho do grupo M. Coloração hematoxilina-eosina. Aumento de 200 vezes. A figura mostra placa aterogênica formada de macrófagos (células espumosas), fazendo protrusão na luz arterial.

A teoria da aterosclerose causada pela homocisteína foi primeiramente proposta por McCully & Wilson em 1975. Clarke et al., von Eckardstein et al. e Graham et al. concluíram que a homocisteína é fator de risco independente para doença arterial¹⁶⁻¹⁹.

Desde a descrição original de McCully, em 1969, mediante observações em portadores da rara síndrome de homocisteinemia familiar com implicações ateroscleróticas, começou a delinear-se o possível papel da homocisteína como fator de risco². Posteriormente, observou-se que, mesmo em indivíduos com níveis considerados dentro da faixa da normalidade, à semelhança do que acontecia com o colesterol, aqueles que estavam com os níveis mais elevados tinham maiores riscos de apresentar doença.

Diversos estudos prospectivos, caso-controle e longitudinais demonstraram o seguinte: nos pacientes que desenvolveram complicações ateroscleróticas, os níveis de homocisteína eram consideravelmente mais elevados do que naqueles que não apresentavam a doença²⁰.

Níveis acima de 15 $\mu\text{mol/l}$ duplicaram o risco de doenças cardiovasculares²¹. Os níveis plasmáticos de homocisteína correlacionam-se com idade, sexo masculino, tabagismo, hipertensão arterial, níveis de colesterol e sedentarismo²²; mas, mesmo após ajuste para estes, seu papel como fator de risco permanece²³. Assim como a doença coronária, a doença aterosclerótica da carótida²⁴ e a trombose venosa profunda²⁵ também são mais prevalentes em indivíduos com níveis elevados de homocisteína. Diversos mecanismos explicam os possíveis efeitos aterogênicos da homocisteína. O efeito citotóxico direto da homocisteína sobre as células endoteliais e possivelmente sobre a síntese de prostaciclina já foi descrito²⁶. Tem sido sugerido efeito sobre as plaquetas, aumentando sua adesividade e agregabilidade, favorecendo a trombose. Além disso, alguns estudos também demonstraram efeitos sobre fatores da coagulação, favorecendo a trombofilia com ativação do fator V²³.

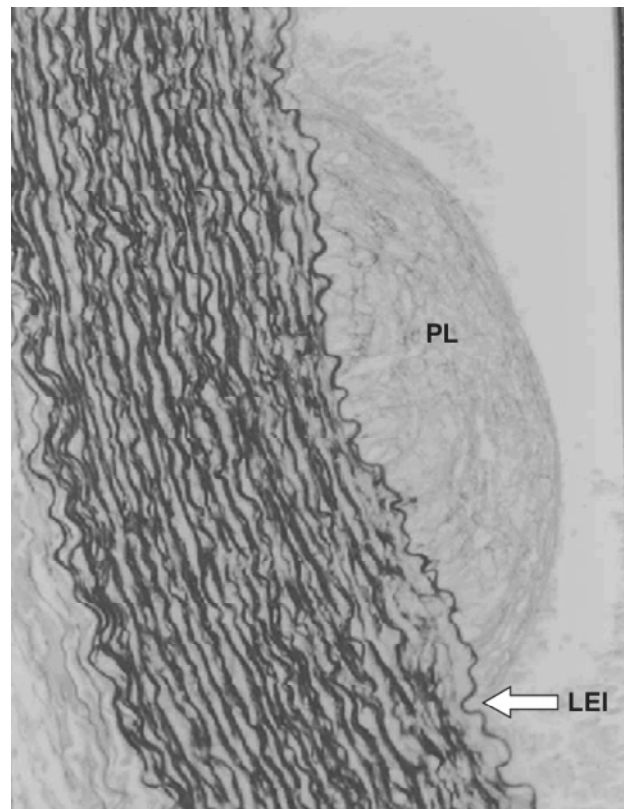


Figura 4 - Fotomicrografia da aorta de coelho do grupo M. Coloração pela técnica de Weigert. Aumento de 200 vezes. A figura mostra placa aterogênica, endotelial, rica em macrófagos (células espumosas). Limitante elástica interna bem definida.

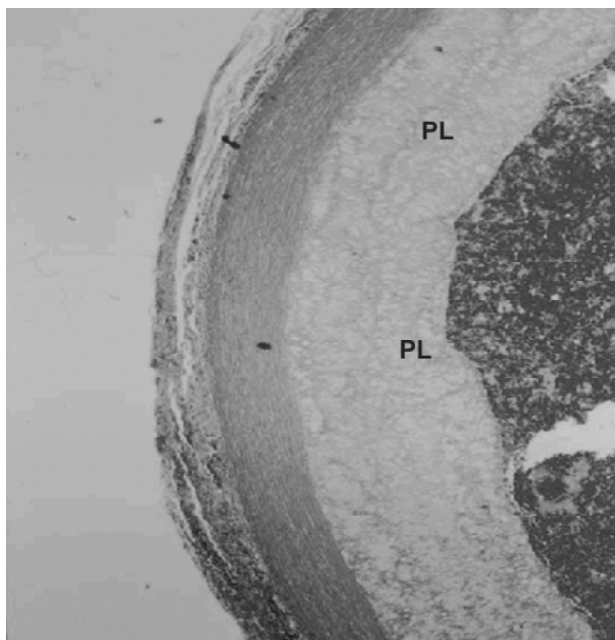


Figura 5 - Fotomicrografia da aorta de coelho do grupo M. Coloração pelo tricrômio de Mallory. Aumento de 40 vezes. A figura mostra extensa placa aterogênica, endotelial, formada por células espumosas com núcleo e citoplasma mal definidos.

A importante questão de como a homocisteína – aminoácido que contém enxofre – afeta os processos bioquímicos das células e tecidos das paredes arteriais para produzir placas ateroscleróticas é, ainda hoje, um campo ativo de investigação. Estudos iniciais com culturas celulares obtidas de crianças com homocistinúria descobriram uma nova via bioquímica pela qual o átomo de enxofre da homocisteína-tiolactona é oxidado e convertido em fosfoadenosina-fosfossulfato, a coenzima que forma as glicosaminoglicanas sulfatadas das placas ateroscleróticas²⁷. Outros experimentos com culturas de células de músculo liso e do endotélio envolveram a homocisteína na formação de peróxido de hidrogênio e no controle do crescimento celular, por seus efeitos sobre o fator de crescimento semelhante à insulina²⁸, o fator de crescimento derivado das plaquetas e a formação de ciclina, levando a degeneração endotelial e hiperplasia das células musculares lisas das placas ateroscleróticas²⁹.

Em animais hiper-homocisteinêmicos, a ativação da elastase da célula aórtica explica a degeneração característica da elastina em placas ateroscleróticas²⁹. Dos vários estudos publicados na literatura e citados neste nosso estudo, pode-se concluir que a associação de

pequenas elevações de homocisteína plasmática à doença cardiovascular é um fenômeno freqüente, e não apenas um raro erro inato do metabolismo da homocisteína. Esse fato pode ser devido principalmente a duas situações: (1) as enzimas que metabolizam a homocisteína dependem de três nutrientes para a sua atividade: folato, vitamina B12 e vitamina B6, os quais podem estar deficientes, propiciando elevações dos níveis de homocisteína; (2) as enzimas são também foco de variantes genéticas anormais, que se têm mostrado muito comuns nas populações estudadas.

Há também correlação entre homocisteinemia e hormônios femininos, pois mulheres na pré-menopausa apresentam níveis de homocisteína 20% menores que os homens, e na menopausa há uma nítida elevação nos níveis de homocisteína. Esse fato é objeto de investigação; mesmo em casos de reposição hormonal em mulheres na menopausa não houve redução significativa dos níveis de homocisteína plasmática^{30,31}. Pacientes com nefropatia apresentam elevação na homocisteína, sugerindo que os rins controlam a homocisteína sanguínea por mecanismo ainda desconhecido. Pacientes diabéticos também apresentam homocisteína elevada em consequência da insuficiência renal^{32,33}. Nas pessoas que fumam, a nicotina antagoniza o piridoxal-fosfato e eleva a homocisteína plasmática, explicando-se seu papel no risco elevado nas doenças cardiovasculares²².

Estudos revelam que dieta rica em frutas e verduras e suplementação de vitaminas B6, B12 e folatos nas dosagens de 10, 0,1 e 1 mg/dia, respectivamente, diminuem a homocisteína circulante³⁴.

Recentemente, o *US Food and Drug Administration* aprovou a adição de folato nos pães nos Estados Unidos, esperando baixar o risco de doença vascular na população mais susceptível²⁹.

Num estudo prospectivo no qual se procurou relacionar os níveis plasmáticos de homocisteína e a progressão dos sintomas da doença arterial periférica, concluiu-se que a hiper-homocisteinemia está associada à mortalidade pós-coronariopatias, a doenças cerebrovasculares e à progressão da doença oclusiva arterial dos membros inferiores¹¹. Numerosos estudos mostraram que os níveis de homocisteína plasmática são inversos aos níveis de folato, vitamina B6 e vitamina B12³⁵⁻³⁷. Não se emprega vitamino-terapia para o tratamento de aterosclerose, pois há diferença entre associação e causa e nem todas as

associações e causas podem ser modificadas com terapia.

Estudos experimentais têm demonstrado o efeito de certas substâncias químicas no desenvolvimento da aterosclerose, como o de Steiner, em 1938, que demonstrou os efeitos da colina que protege a aorta de coelhos contra aterosclerose³⁷; e o de Hartroft, em 1952, demonstrando alterações ateroscleróticas nas artérias aorta, carótidas e coronárias em ratos com dieta deficiente em colina³⁸. Em 1995, Rolland et al.³⁹ já observaram concentrações elevadas de homocisteína plasmática e lesões na lâmina elástica das artérias em suínos com dieta rica em metionina. Recentemente⁴⁰, por meio de modelo de perfusão com homocisteína em carótidas de suínos, foram demonstrados os efeitos mitogênicos e citotóxicos da homocisteína nessas artérias após angioplastia. No trabalho de Stead, verificou-se que, colocando metionina em contato com hepatócitos de ratos, essas células transportavam mais homocisteína, sugerindo que o fígado é o responsável pela regulação dos níveis plasmáticos da homocisteína⁴¹. Em ratos, o efeito da homocisteína elevada no plasma diminui a vasodilatação e contribui para inativar o óxido nítrico no endotélio⁴². Em macacos com deficiência da enzima cistationina-b-sintetase e dieta pobre em folato, a hiper-homocisteinemia alterou a função endotelial⁴³.

Southern, em 1998, foi o primeiro a relacionar endarterectomia carotidiana e hiper-homocisteinemia em ratos. Os ratos eram mantidos com dieta rica em homocisteína e verificou-se hiperplasia intimal pós-endarterectomia carotidiana¹³. Em 1970, McCully administrou 2% de colesterol a um grupo de coelhos submetidos à mesma dieta, mas com ausência de vitamina B6 e injeção de homocisteína subcutânea em outro grupo, demonstrando lesões ateroscleróticas mais intensas no grupo no qual foi injetado homocisteína²⁷.

Como pode ser observado, os trabalhos experimentais utilizam a homocisteína na forma de dieta ou injetável, ou, ainda, nos modelos de perfusão, onde ela age diretamente nas células endoteliais.

A homocisteína, quando aplicada diretamente na célula endotelial, é altamente citotóxica⁴⁰.

No presente estudo, procurou-se evidenciar os efeitos aterogênicos da homocisteína na forma mais natural possível, com dieta rica em metionina, que faz parte da nossa alimentação. A metionina é demetilada no fígado e se transforma em homocisteína, podendo ser dosada no plasma: objetivou-se demonstrar a não-relação entre

a aterogênese produzida pela hiper-homocisteinemia e o processo aterosclerótico relacionado à hiperlipidemia, com depósito de colesterol e cálcio na parede arterial.

Verificou-se experimentalmente que a homocisteína elevada predispõe à aterogênese. É factível pressupor que, modificando-se este fator em seres humanos, poderemos beneficiar os pacientes, diminuindo os sintomas da aterosclerose ou sua progressão. Existem fatores que não podem ser modificados, como sexo masculino e diabetes melito; há outros que podem ser modificados, como a dieta alimentar e o hábito de fumar; ou mediante medicamentos, que podem ter efeitos colaterais indesejados, como os usados no controle da hipertensão arterial e os redutores dos lipídios plasmáticos. Quando decorrente de problemas alimentares, a homocisteinemia pode ser controlada com a administração de folato e dieta de frutas e vegetais, facilmente disponíveis.

Desde o trabalho original de McCully, a pesquisa dos efeitos da hiper-homocisteína em animais de laboratório é realizada com o uso de homocisteína-tiolactona (cujos efeitos citotóxicos⁴⁰ são reconhecidos) na forma injetável e nos modelos de perfusão arterial. A homocisteína é um produto da demetilação da metionina. Assim, se oferecermos uma dieta rica em metionina a um grupo de coelhos poderemos estudar os efeitos da homocisteinemia da maneira mais natural possível, pela ingesta, pois a metionina é um aminoácido essencial fornecido pelo catabolismo diário de proteínas. Portanto, este trabalho é um modelo inédito, pois estuda a aterogênese em aorta de coelhos induzida pela dieta rica em produtos que aumentam os níveis plasmáticos de homocisteína, e original, pois não utiliza aminoácidos injetáveis.

Conclusão

Concluiu-se que a homocisteína plasmática elevada por sobrecarga de metionina produziu consistentemente aterogênese na aorta de coelhos.

Referências

1. Gebara OCE, Wajngarten M, Barreto ACP. Novos fatores de risco da doença arterial coronária. Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo 1997;7(3):340-7.

2. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;56(1):111-28.
3. Ross H. The pathogenesis of atherosclerosis. In: Braunwald E. *Hearth Disease – A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Philadelphia: W. B. Saunders Co; 1997. p. 1105-1125.
4. Lotufo PA. Epidemiologia das doenças cardíacas no Brasil: histórico, situação atual e proposta de modelo teórico. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 1996;6(5):541-7.
5. Levy D, Kannel WB. Cardiovascular risks: new insights from Framingham. *Am Heart J* 1988;116:266-72.
6. Fuster V, Pearson TA. 27th Bethesda Conference: matching the intensity of risk factor management with the hazard for coronary disease events. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:957-1047.
7. Wilcken DE, Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest* 1976;57:1079-82.
8. Nehler MR, Taylor Jr LM. Homocysteinemia as a risk factor for atherosclerosis: a review. *Cardiovasc Surg* 1997;5:559-67.
9. Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, et al. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992;268(7):877-81.
10. Taylor Jr LM, De Frang RD, Harris 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.
11. Taylor LM Jr, Moneta LG, 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;29:8-19.
12. Kirk Roger E. *Experimental design procedures for the behavioral sciences*. California: Brooks/Cole Publishing Co; 1982.
13. Southern FN, Cruz N, Fink LM, et al. Hyperhomocysteinemia increases intimal hyperplasia in a rat carotid endarterectomy model. *J Vasc Surg* 1998;28(5):756-60.
14. Fowkes FGR. Epidemiology of atherosclerotic arterial disease in the lower limbs. *Eur J Vasc Surg* 1988;2:238-91.
15. Rabelo LM, Cotrim FLS, Novazzi JP, Martinez TLR. Fibrinogênio e aterosclerose. In: Martinez TLR, Lourenço DM, editores. *Avaliação e conduta nos riscos tromboaterogênicos*. São Paulo: Art Plus; 1996. p. 31-43.
16. McCully KS, Wilson RB. Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis* 1975;22:215-27.
17. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991;324(17):1149-55.
18. von Eckardstein A, Malinow MR, Upson B, et al. Effects of age, lipoproteins, and hemostatic parameters on the role of homocyst(e)inemia as a cardiovascular risk factor in men. *Arterioscler Thromb* 1994;14:460-4.
19. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA* 1997;277(22):1775-81.
20. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995;274(13):1049-57.
21. Boers GHJ. Mild leyperhorewaysteinemia is an independent risk factor of arterial vascular disease. *Senien Thromb Hemost* 2000;26(3):291-6.
22. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, et al. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* 1995;274:1526-33.
23. Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine and coronary arteriosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1996;27(3):517-27.
24. Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF, Rush D, Rosenberg LH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993;270(22):2693-8.
25. Den Heijer M, Koster T, Blom HJ, et al. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1996;334:759-62.
26. Jones BG, Rose FA, Tudball N. Lipid peroxidation and homocysteine induced toxicity. *Atherosclerosis* 1994;105:165-70.
27. McCully KS, Ragsdale BD. Production of arteriosclerosis by homocysteinemia. *Am J Pathol* 1970;61(1):1-11.
28. Clopath P, Smith VC, McCully KS. Growth promotion by homocysteic acid. *Science* 1976;192:372-4.
29. McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nature Medicine* 1996;2(4):386-9.
30. Berger PB, Herrmann RR, Dumesic DA. The effect of estrogen replacement therapy on total plasma homocysteine in healthy postmenopausal woman. *Mayo Clin Proc* 2000;75(1):188-23.
31. Hak AE, Polderman KH, Westendorp IC, et al. Increased plasma homocysteine after menopause. *Atherosclerosis* 2000;1(149):163-8.
32. Chiarelli F, Pomilio M, Mohn A, et al. Homocysteine levels during fasting and after methionine loading in adolescents with diabetic retinopathy and nephropathy. *J. Pediatr* 2000;137(3):386-92.
33. Brattstrom L, Wilcken DE. Homocysteine and vascular disease: cause or effect? *Am J Clin Nutr* 2000;72(2):315-23.
34. Ubbink JB, Vandermerwe A, Vermaak WJH, Delport R. Homocysteinemia and the response to vitamin supplements. *Clin Investig* 1993;71:993-8.
35. Brattstrom LE. Vitamins as homocysteinemia – lowering agents. *J Nutr* 1996;126:1265-80.
36. Olszewski AJ, Szostak WB, Bialkowska M, Rudnicki S, McCully KS. Reduction of plasma lipid and homocysteinemia levels by pyridoxine folate, choline, riboflavin, and troxerutin in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1989;75:1-6.
37. Steiner A. The effect of choline on the production of experimental atherosclerosis in rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med* 1938;38:231-3.
38. Hartroft WS, Ridout JH, Seller EA, Best CH. Atheromateus changes in aorta, carotid and coronary arteries of choline deficient rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1952;81:384-93.

39. Rolland PH, Friggi A, Barlatier A, et al. Hyperhomocysteinemia-induced vascular damage in the minipig. Captopril – hydrochlorothiazide combination prevents elastic alterations. *Circulation* 1995;91(4):1161-74.
40. Chen C, Halhos ME, Surowiec SM, et al. Effects of homocysteine on smooth muscle cell proliferation in both cell culture and artery perfusion culture models. *J Surg Res* 2000;88(1):26-33.
41. Stead LM, Brosnan ME, Brosnan JT. Characterization of homocysteine metabolism in the rat liver. *Biochem J* 2000;15(350):685-92.
42. Eberhardt RT, Forgione MA, Cap A, et al. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 2000;106(4):483-91.
43. Lentz SR, Erger RA, Dayal S, et al. Folate dependence of hyperhomocysteinemia and vascular dysfunction in cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279(3):970-5.

Correspondência:

Henrique Jorge Stahlke Júnior
Hospital de Clínicas UFPR - Disciplina de Cirurgia Vascular
Rua General Carneiro, 181
CEP 80060-000 - Curitiba - PR
Tel.: (41) 360.1800 R.: 6518

Atualização de endereços

Prezado associado,

Se você mudou de endereço e não comunicou a SBACV, seu exemplar está sendo enviado ao endereço antigo. É fundamental que envie seu novo endereço à Secretaria da SBACV para garantir o recebimento do J Vasc Br.

SBACV - Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular
Av. Tancredo Neves, 1632 salas 501/502
Condomínio Salvador Trade Center
CEP 41820-020 - Salvador, BA
Fone: (71) 271.5368
E-mail: secretaria@sbacv-nac.org.br