

A HOMOCISTEINEMIA COMO FACTOR DE RISCO DE DOENÇA VASCULAR CEREBRAL

A Importância da Idade e dos Níveis de Homocisteinemia

ROBERTO PALMA REIS, JORGE AZINHEIRA, HELENA P. REIS, MANUEL PEREIRA,
ARLINDO BAPTISTA, MANUELA CREPO, JULIETA ESPERANÇA PINA,
NUNO CORDEIRO FERREIRA E ARMANDO SALES LUIS
Serviços de Medicina e de Laboratório do Hospital S. Francisco Xavier, Serviços de Neurologia dos Hospitais Distrital do Barreiro e de Santa Maria, Serviço de Medicina do Hospital de S. José. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa. Lisboa

RESUMO

OBJECTIVO: avaliar a importância da homocisteinemia como factor de risco de doença cerebrovascular, relacionando-a com a idade e com os níveis de homocisteinemia. **METODOLOGIA:** num grupo de doentes com idade inferior a 55 anos (n=35, 21 do sexo masculino), com acidente vascular cerebral por critérios clínicos e com enfarte cerebral confirmado por tomografia, sem causa provável de doença embólica, fez-se o doseamento da homocisteinemia basal e após sobrecarga de metionina (0,1g/Kg peso) entre 3 meses e 1 ano após a doença aguda. Emparelharam-se os casos com controlos sem patologia vascular de um programa de rastreio, por sexo e idade. Excluíram-se doentes ou controlos que apresentassem história de alcoolismo e clínica ou laboratório sugestivos de doença renal ou hepática, ou tivessem tomado vitaminas do grupo B, por poderem interferir com os níveis de homocisteína. Calcularam-se os odds ratio da hiperhomocisteinemia em termos globais e por grupos etários e os odds ratio para vários níveis de homocisteinemia e seus intervalos de confiança de 95% de Cornfield. **RESULTADOS E CONCLUSÕES:** A hiperhomocisteinemia comportou um caso - controlo odds ratio global de 5,7, sendo mais elevada nas idades mais baixas (8,8 abaixo dos 45 anos e 3,8 acima desta idade). A homocisteinemia como factor de risco de doença cerebrovascular apresentou-se como um factor de risco contínuo, que, se elevado, constitui um factor de risco, se baixo, constitui um factor protector. Nestas circunstâncias, a heterozigotia para a deficiência de cistationina beta sintetase, que tem sido referida como a causa mais importante de hiperhomocisteinemia não pode explicar, pelo menos em grande parte, o risco cerebrovascular da homocisteína.

SUMMARY

Homocysteinemia as a risk factor of Cerebrovascular Disease Importance of Age and Homocysteinemia Levels

PURPOSE: To evaluate importance of homocysteinemia as a risk factor of thrombotic cerebrovascular disease, in terms of age and homocysteinemia levels. **METHODS:** A group of patients under 55 years old (n=35, 21 males) that had suffered a stroke 3 months to 1 year before the study, defined by clinical criteria and the presence of cerebral infarction confirmed by tomography, without history or predisponents to embolic disease. The patients were matched with a group of controls without vascular pathology of a check-up program, in terms of age and sex. Patients and controls with history of alcoholism, signs or laboratory of renal or hepatic insufficiency or with

* Trabalho subsidiado pelo INIC e JNICT e no âmbito do COMAC Project on Homocysteinemia and vascular disease. Agradece-se à Park Davis a cedência gratuita da pentostatina.

history of recent ingestion of vitamins of the group B were excluded since these conditions could influence homocysteinemia levels. We measured to patients and controls the plasmatic basal homocysteinemia and homocysteinemia 6 hours after a methionine overload of 0.1 g/Kg body weigh. We estimated case - control odds ratio of hyperhomocysteinemia globally and by age groups, and odds ratio of different levels of homocysteinemia. RESULTS and CONCLUSIONS: Hyperhomocysteinemia case - control global odds ratio was 5,7, being higher in younger patients (8.8 below and 3.5 after the age of 45 years). Homocysteinemia as a risk factor of cerebrovascular disease presented as a continuous effect: low homocysteinemia was protective, and the higher the homocysteinemia, the higher the cerebrovascular risk proved to be. In these circumstances, heterozygoty of cystathionine beta synthase deficiency, referred as the more important cause of hyperhomocysteinemia, cannot account for most of the cases of hyperhomocysteinemia.

INTRODUÇÃO

A homocistinúria, acompanhada de níveis plasmáticos muito elevados de homocisteína e do aparecimento de homocistina leva frequentemente à doença cerebrovascular trombótica nas crianças e jovens^{1,2}. Se a homocisteinemia não for muito marcada não se formará a homocistina e esta substância não aparecerá na urina³. Desde a teoria da arteriosclerose pela homocisteinemia de McCully que se aceita que a elevação, mesmo ligeira ou moderada da homocisteína poderá, por si só, comportar um risco aumentado de doença vascular aterosclerótica, com destaque para a doença cerebrovascular. Os heterozigotos para a homocistinúria apresentariam, segundo este autor, níveis plasmáticos de homocisteína suficientemente elevados para levar ao aparecimento de doença vascular^{4,5}.

Há vários mecanismos que explicam a ligação entre a homocisteinemia e a doença vascular:

- Por levar directamente à lesão vascular, com arrancamento de células endoteliais, que surgem em circulação⁶⁻⁹;
- Por levar à oxidação das LDL, que, oxidadas, teriam tendência para se depositar irreversivelmente no endotélio, iniciando assim o processo aterosclerótico¹⁰⁻¹²;
- Por alterações complexas no sistema de coagulação e fibrinólise, nomeadamente por activação dos factores de coagulação XII, X e V¹³⁻¹⁵ e inactivação dos factores VII, da proteína C¹⁶⁻¹⁸ e do activador do plasminogénio tecidual¹⁹;
- Pelo eventual aumento de consumo e da adesividade das plaquetas^{20,21}.

Múltiplos estudos caso - controlo, por vezes com números relativamente pequenos de casos e controlos, têm relacionado a homocisteinemia elevada com as doenças cerebrovasculares²²⁻²⁸. Em estudo anterior pudemos confirmar essa relação numa população portuguesa²⁹. Estes estudos pretendem avaliar os níveis de homocisteinemia basal ou após sobrecarga com metionina em doentes vasculares cerebrais e em controlos sem patologia vascular. A sobrecarga com metionina, único precursor da homocisteína, é considerada o método mais correcto para o diagnóstico das situações de hiperhomocisteinemia, independentemente da dieta prévia.

Petra Verhoef, num estudo prospectivo histórico recente, envolvendo 109 doentes vasculares cerebrais e 427 controlos não encontrou diferenças significativas entre os

níveis de homocisteinemia basal dos dois grupos³⁰. Refira-se, no entanto, que a homocisteinemia, a ser um factor de risco de doença vascular cerebral sê-lo-ia de doença precoce, e a média etária dos doentes cerebrovasculares deste estudo ultrapassa os 60 anos. Este conceito é apoiado por no grupo com idade inferior a 60 anos existir maior diferença nos níveis de homocisteinemia entre casos e controlos. Outros estudos, que apresentaram diferenças significativas com amostras muito mais pequenas, referiram-se a doentes mais novos. Citamos, a título de exemplo, o estudo que Battstrom publicou na Stoke, em 1984, em que, com apenas 19 doentes vasculares cerebrais com a idade média de 49 anos e 17 controlos, verificou níveis mais elevados de homocisteinemia nos casos no que nos controlos²³ e o estudo que Boers publica, em 1985, na New England Journal of Medicine, em que, com 25 doentes vasculares cerebrais com a idade média de 41 anos, e 25 controlos, verifica que os doentes cerebrovasculares apresentam níveis de homocisteinemia mais elevados e maior prevalência de hiperhomocisteinemia, que o autor relaciona com heterozigotia para a deficiência de cistationina beta sintetase do que os controlos²².

Podemos, portanto, defender que a idade em que a homocisteinemia é importante como factor de risco de doença vascular cerebral está por estabelecer: tratando-se de um factor de risco com grande agressividade, que poderá, eventualmente, ser congénito, é previsível que a homocisteinemia seja um factor de risco vascular mais importante nas idades mais jovens. Os resultados dos trabalhos publicados corroboram esta hipótese.

Nestas circunstâncias, embora a homocisteinemia seja um factor de risco estabelecido de doença cerebrovascular, justifica-se tentar perceber em que grupos etários a existência de hiperhomocisteinemia comporta maior risco vascular.

Segundo McCully, os heterozigotos para a homocistinúria teriam homocisteinemias elevadas e como tal risco vascular acrescido. Posteriormente vieram a ser encontradas outras causas de homocisteinemia elevada, nomeadamente carências de vitaminas do grupo B - deficiência de vitamina B 6³¹⁻³³, de B 12³³⁻³⁵ e de ácido fólico³⁵⁻³⁷ e algumas patologias, nomeadamente a insuficiência renal³⁸⁻³⁹ e hepática⁴⁰.

Existindo várias causas de homocisteinemia elevada, põe-se a questão de saber qual o padrão de risco vascular ligado à homocisteinemia: um padrão contínuo, de natureza metabólica, ou um padrão de natureza genética, com resposta de tipo sim ou não. No primeiro caso existiria

um aumento progressivo do risco com o aumento dos níveis de homocisteinemia; no segundo existiria um valor crítico, abaixo do qual o risco seria baixo e acima do qual o risco seria muito elevado. Nestas circunstâncias justifica-se tentar relacionar os níveis de homocisteinemia com o risco de doença cerebrovascular.

OBJECTIVOS

Com o presente trabalho pretendemos avaliar a importância da homocisteinemia como factor de risco de doença cerebrovascular, relacionando-a com a idade e com os níveis de homocisteinemia.

METODOLOGIA

Estudo caso - controlo, emparelhado por sexo e idade.

Estudámos um grupo de doentes com idade até 55 anos inclusivé, entre 3 meses e 1 ano após o acidente vascular cerebral isquémico, muito provavelmente trombótico.

Para a definição de acidente vascular cerebral isquémico exigia-se a presença de critérios clínicos, nomeadamente a existência de exame neurológico compatível e a existência de sinais de enfarte cerebral por tomografia axial computadorizada, sendo excluídos os doentes com história de embolias ou factores que tornassem as embolias prováveis: insuficiência cardíaca, fibrilhação auricular ou estenose mitral.

Foram ainda excluídos os doentes e controlos com história de alcoolismo e clínica ou laboratório sugestivos de doença renal ou hepática, ou que tivessem tomado vitaminas do grupo B, por poderem interferir com os níveis plasmáticos de homocisteína.

Cada doente foi emparelhado com um controlo sem antecedentes de doença vascular, escolhido a partir de um programa de rastreio clínico e laboratorial. Os controlos seriam excluídos se apresentassem história de qualquer patologia nos últimos seis meses, quaisquer antecedentes pessoais de patologia vascular, sinais, sintomas ou alterações laboratoriais sugestivas de qualquer patologia no momento do presente estudo. Os controlos apresentavam proveniência geográfica próxima da dos casos.

Em jejum fez-se o estudo laboratorial básico e colheita para o doseamento da homocisteinemia basal.

Após consentimento esclarecido os doentes e controlos ingeriam uma dose de metionina de 0,1g por kilograma de peso e tomavam uma pequena refeição pobre em metionina. Entre cinco e seis horas após a ingestão da metionina, sem que tivessem comido qualquer outra refeição, fez-se a colheita para o doseamento da homocisteinemia após sobrecarga à metionina.

Sendo a homocisteína plasmática instável após a colheita foram tomadas as medidas necessárias para assegurar a obtenção de resultados fidedignos: o sangue foi colocado em gelo imediatamente pós a colheita e centrifugado de 2 a 4 horas depois. O plasma foi mantido desde então a uma temperatura inferior a 20° negativos.

O doseamento das homocisteinemias foi feito por método radioenzimático com separação por cromatogra-

fia em papel, segundo o método de Kamoun e Chadefaux⁴¹. Antes de efectuar o doseamento fez-se a redução do plasma com DTE para se dosear a homocisteinemia total e não apenas a homocisteína livre. Comprovou-se que com esta técnica o laboratório português envolvido no estudo apresentava resultados sobreponíveis aos do de Bergen, centro de referência europeu para a realização desta análise⁴².

Definiu-se existência de hiperhomocisteinemia quando os valores observados ultrapassavam em mais de dois desvios-padrão a média encontrada numa população portuguesa de 204 controlos sem doença vascular. Nestas circunstâncias, considerámos existir hiperhomocisteinemia em casos ou controlos se os valores observados de homocisteinemia basal excedessem os 13,1 $\mu\text{mol/L}$ ou de homocisteinemia após sobrecarga oral com metionina ultrapassassem os 34,7 $\mu\text{mol/L}$.

A definição de hiperhomocisteinemia como o valor que ultrapassa em mais de dois desvios-padrão a média dos indivíduos sem patologia tem sido um critério amplamente aceite e utilizado por múltiplos autores^{3,22,24,28}. Refira-se que, num importante artigo publicado por Clarke, em 1991, na *New England Journal of Medicine*, homocisteinemias após sobrecarga que ultrapassassem o valor-limite de 24 $\mu\text{mol/L}$ apresentavam uma sensibilidade de 92% e uma especificidade de 100% no diagnóstico dos heterozigotos obrigatórios para a deficiência de cistationina beta sintetase⁴³.

As médias dos valores de homocisteinemia basal e após sobrecarga com metionina observados no grupo com acidente vascular cerebral e no grupo controlo foram avaliadas estatisticamente por intermédio do teste de *Mann Whitney* (distribuições não normais). Para a comparação entre o número de indivíduos com hiperhomocisteinemia nos casos e controlos utilizou-se o teste da probabilidade exacta de Fisher.

Calcularam-se ainda os odds ratio da hiperhomocisteinemia em termos globais e por grupos etários. Finalmente calcularam-se os odds ratio para vários níveis de homocisteinemia e seus intervalos de confiança de 95% de Cornfield.

RESULTADOS

Estudámos 35 doentes e 35 controlos, emparelhados por sexo e idade.

A idade média dos casos e controlos era de 46,4 anos. 21 doentes e controlos eram do sexo masculino.

Há a destacar que os doentes cerebrovasculares apresentaram homocisteinemias basais e após sobrecarga com metionina significativamente mais elevadas do que os controlos. A diferença foi mais significativa em relação às homocisteinemias após sobrecarga com metionina.

Os doentes cerebrovasculares apresentaram ainda uma prevalência significativamente maior de hiperhomocisteinemia.

Verifica-se que o odds ratio da hiperhomocisteinemia na doença cerebrovascular tem tendência a ser tanto maior quanto mais novos são os doentes. Dados os números relativamente reduzidos que se atingem quando se divi-

dem os doentes por grupos etários não se atinge a significância estatística nos sub-grupos.

Valores baixos de homocisteinemia após sobrecarga apresentam odds ratio inferior a um, com significado estatístico, valores intermédios de homocisteinemia apresentam odds ratio intermédios, sem significância estatística e valores elevados de homocisteinemia apresentam odds ratio elevados, de novo com significado estatístico.

DISCUSSÃO

Tal como tem acontecido com outros trabalhos anteriores, igualmente com casuísticas não muito elevadas, podemos chegar, neste trabalho, a conclusões apoiadas em significância estatística. Apresentam-se no *Quadro 1* as homocisteinemias basais e após sobrecarga com metionina nos doentes e controlos. As homocisteinemias basais e após sobrecarga foram ambas significativas como factores de risco de doença cerebrovascular, com destaque para a última, que apresentou um alto grau de significância estatística. Também em termos discretos, o facto de se ter hiperhomocisteinemia constituiu um factor de risco significativo para a doença vascular cerebral. Deste modo podemos afirmar que a homocisteinemia, quer como variável discreta – ter hiperhomocisteinemia – quer como variável contínua – valor de homocisteinemia – representa um factor de risco de doença cerebrovascular.

Os resultados deste quadro apoiam ainda a noção de que o doseamento da homocisteinemia após sobrecarga com metionina é mais discriminativo como factor de risco de doença cerebrovascular do que o doseamento da homocisteinemia basal, facto que era previsível, já que o doseamento da homocisteinemia após sobrecarga com metionina testa a capacidade do indivíduo metabolizar a

metionina e eliminar, por transulfuração ou por remetilação, a homocisteína, enquanto que a homocisteinemia basal depende marcadamente da quantidade de metionina ingerida na dieta. Acresce que, sendo a homocisteína tóxica para o endotélio e indutora de lesões arterioscleróticas, serão os níveis mais elevados de homocisteinemia o factor fisiopatológico a ter em conta e não os níveis mais baixos, como os que existem em jejum.

No *Quadro 2* apresentamos o número de doentes com hiperhomocisteinemia e odds ratio por grupos etários. Tratando-se de números reduzidos em cada célula e com vários valores de zero, os odds ratio terão sempre que ser aproximados e apresentam-se apenas como indicativos. No entanto, agrupando com idades, verifica-se que até aos 46 anos o odds ratio é de 8,8, abaixo dos 51 anos é de 6,3 e abaixo dos 55 (toda a população) é de 5,7. Nestas circunstâncias, podemos dizer que os odds ratio por idade sugerem que, na doença cerebrovascular, o facto de se ter hiperhomocisteinemia é um factor de risco mais importante nas idades mais jovens. De acordo com este resultado fica esclarecido como em estudos com mais de uma centena de casos e controlos com idade avançada a homocisteinemia não surgiu como factor de risco de doença vascular cerebral³⁰, enquanto que noutros, com números de casos e controlos na ordem das duas dezenas, mas com doentes mais jovens, a homocisteinemia surgiu como um factor de risco importante de doença vascular cerebral²²⁻²⁹.

Um outro dado a ter em conta é o risco ligado à hiperhomocisteinemia. O odds ratio caso-controlo de 5,7, se bem que importante, está longe do de 40, referido por Clarke, num grupo de 38 doentes vasculares com idade até aos 55 anos, comparados com 38 controlos emparelhados com os doentes por sexo e idade⁴³.

Quadro 1 – Homocisteinemias (HC) ($\mu\text{mol/L}$) (Estudo caso - controlo nos doentes cerebrovasculares)

| Característica (unidades) | Casos | Controlos | Signif. |
|---------------------------------|------------------|------------------|-----------|
| Número total | 35 | 35 | |
| HC BASAIS (média \pm D.P.) | 10,02 \pm 3,32 | 8,60 \pm 1,71 | p < 0,05 |
| HC APÓS SOBREC(média \pm D.P) | 27,71 \pm 7,58 | 21,59 \pm 5,54 | p < 0,001 |
| HIPERHOMOCISTEINEMIA (N°) | 9 | 2 | p < 0,05 |

Quadro 2 – Número de doentes com hiperhomocisteinemia por grupos etários e odds ratio

| Idades | (N°cas/n°cont) | Casos | Contrl. | Odds Ratio |
|--------------|----------------|----------|----------|--------------------|
| <41 anos | (8/8) | 2 | 0 | 6,6# |
| 41 a 45 anos | (6/6) | 1 | 0 | 3,6# |
| 46 a 50 anos | (7/7) | 2 | 1 | 2,4 |
| 51 a 55 anos | (14/14) | 4 | 1 | 5,2 |
| Total | (35/35) | 9 | 2 | 5,7(p=0,02) |
| <46 anos | (14/14) | 3 | 0 | 8,8# |
| <51 anos | (21/21) | 5 | 1 | 6,3 |
| >45 anos | (21/21) | 6 | 2 | 3,8 |

Foi adicionada meia unidade a cada célula para se poder efectuar o cálculo do odds ratio.

Quadro 3 – Número de doentes e controlos por níveis de homocisteinemia após sobrecarga e respectivos odds ratio caso - controlo

| Homocisteinemia | (Nºcasos/nºcontrol) | Odds Ratio | (Lim.Conf.) | Sign |
|-----------------|---------------------|------------|--------------|------|
| <23 µmol/L | (10/25) | 0,16 | (0,05-0,50) | *** |
| 23 a 26 µmol/L | (9/5) | 2,07 | (0,54-8,85) | NS |
| 26 a 32 µmol/L | (7/3) | 2,66 | (0,54-14,58) | NS |
| >32 µmol/L | (9/2) | 5,71 | (1,01-57,47) | * |

Obs : * = p<0,05; ***= p<0,001; Lim. Conf. = Limite de confiança de 95%

No *Quadro 3* apresentam-se os odds ratio por diferentes níveis de homocisteinemia após sobrecarga com metionina. As homocisteinemias baixas apresentam odds ratio inferiores a 1, e, apesar da dimensão reduzida da amostra, apresentam um alto grau de significância. As homocisteinemias intermédias apresentam odds ratio intermédios, tanto mais elevados quanto maiores as homocisteinemias, e as homocisteinemias mais elevadas implicam odds ratio mais elevados e recuperam a significância estatística.

Deste modo, podemos dizer que, em relação aos valores da homocisteinemia, homocisteinemias baixas são protectoras e homocisteinemias elevadas constituem um factor de risco tanto mais importante quanto mais elevados forem os seus valores. Nestas circunstâncias, é muito claro que um factor meramente genético, como a heterozigotia para a deficiência de cistationina beta sintetase (C B S), não pode explicar o risco vascular da homocisteinemia, nomeadamente o efeito protector de homocisteinemias baixas. É possível que acima dos valores considerados normais de homocisteinemia - indivíduos com hiperhomocisteinemia - se encontrem os portadores de heterozigotia para C B S, mas a sua elevada prevalência nos controlos (2/35 = 6%), que ultrapassa largamente a prevalência hipotética do gene na população, permite-nos deduzir que uma grande parte destes indivíduos terão outras causas de hiperhomocisteinemia que não a deficiência genética de C B S.

CONCLUSÕES

Neste estudo caso - controlo com doentes vasculares cerebrais com patologia muito provavelmente trombótica e idade até aos 55 anos, a homocisteinemia basal ou após sobrecarga, em termos contínuos, constituíram factores de risco de doença cerebrovascular. A hiperhomocisteinemia, tal como a definimos, constituiu um factor de risco vascular com significado estatístico, apresentando um odds ratio de 5,7.

A homocisteinemia constituiu um factor de risco de doença vascular cerebral mais importante nas idades mais baixas, nomeadamente até aos 45 ou 50 anos.

A homocisteinemia como factor de risco de doença cerebrovascular apresentou-se como um factor de risco contínuo, que, se elevado, constitui um factor de risco, se baixo, constitui um factor protector. Nestas circunstâncias, a heterozigotia para a deficiência de cistationina beta sintetase, que tem sido referida como a causa mais importante de hiperhomocisteinemia não pode explicar,

pelo menos em grande parte, o risco cerebrovascular da homocisteína.

BIBLIOGRAFIA

- MUDD S H, SKOVBY F, LEVY H L et al: The natural history of homocystinuria due to cystathione B-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 1-31
- VIZY J M, COZ L P, CHADEFAX B et al: Homocystinuria due to 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency revealed by stroke in adult siblings. *Neurology* 1991;41: 1313-5
- BRATTSTROM L: Homocysteine in vascular disease. A clinical study of homocysteine metabolism in health and in vascular disease. Thesis, University Lund, Sweden 1989
- MCCULLY K S: Vascular pathology of homocystinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-128
- MCCULLY K S. Homocysteine theory of arteriosclerosis: development and current status. *Atherosclerosis Rev* 1983; 11: 157-246
- DUDMAN N P B, HICKS C WILCKEN D E L: The effects of homocysteine on the attachment of human arterial endothelial cells. *J Mol Cell Card* 1985; 17: R8
- DEGROOT P G, WILLEMS C, BOERS G H et al: Endothelial cell dysfunction in homocystinuria. *Eur J Clin Invest* 1983; 13: 405-10
- WEIMANN B J, KUHN H, BAUMGARTNER H R: Effect of homocysteine on cultured bovin and human endothelial cells. *Experientia* 1980; 36: 762
- WALL R T, HARLAN J M, HARKER L A, STRIKER G E: Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: A model for the study of vascular injury. *Throm Res* 1980; 18: 113-21
- PANGANAMALA R V, KARPEN C W, MEROLA A J: Peroxide mediated effects of homocysteine on arterial prostacyclin synthesis. *Prost Leuko Med* 1986; 22: 349-56
- STARKEBAUM G, HARLAN J M: Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* 1986; 77: 1370-76
- PREIBISCH G, KUFFNER C, ELSTNER E F: Biochemical model reactions on the prooxidative activity of homocysteine. *Z Naturforsch C* 1993; 48: 58-62
- RATNOFF O D: Activation of Hageman factor by L-homocysteine. *Science* 1968; 162: 1007-9
- RODGERS G M, KANE W H: Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest* 1986; 77: 1906-16
- PALARETI G, SALARDI S, PIAZZI S et al: Blood coagulation changes in homocystinuria: effects of pyridoxine and other specific therapy. *J Pediatr* 1986; 109: 1001-1006
- RODGERS G M, CONN M T: Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood* 1990; 75: 895-901
- LENTZ S R, SADLER J E: Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest* 1991; 88: 1906-14
- FRANKEN D C, VREUGDENHIL A, BOERS G H et al: Familial cerebrovascular accidents due to concomitant hyperhomocystinemia and protein C deficiency. *Stroke* 1993; 24: 1599-600
- HAIJAR K A: Homocysteine induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J Clin Invest* 1993; 91: 2873-9
- HARKER L A, ROSS R, SLICHTER S J, SCOTT C R: Homocysteine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 1976; 58: 731-41

21. MCDONALD L, BRAY C, FIELD C et al: Homocystinuria, thrombosis, and blood-platelets. *Lancet* 1964; 1: 745-6
22. BOERS G, SMALS A, TRIJBELS F J et al: Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. *N Engl J Med* 1985; 313: 709-715
23. BRATTSTROM L, HARDEBO J E, HULTERBERG B L: Moderate homocysteinemia. A possible risk factor for arteriosclerotic cerebrovascular disease. *Stroke* 1984; 15: 1012-1016
24. CLARKE R, FITZGERALD D, O'BRIEN C et al: Hyperhomocysteinemia: A risk factor for extracranial carotid artery atherosclerosis. *Ir J Med Sci* 1992; 161: 61-5
25. BRATTSTROM L, LINDGREN A, ISRAELSSON B, et al: Hyperhomocysteinemia in stroke: prevalence, cause, and relationships to type of stroke and stroke risk factors. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 214-21
26. RICHARD C M, MULLER J P, FAIVRE E et al: Total plasma homocysteine determination in subjects with premature cerebral vascular disease. *Clin Chem* 1991; 37: 126
27. BOERS, G H J, SCHOONDERWALDT H C, SHULTE B P M et al: Heterozygosity for homocystinuria: A risk factor of occlusive cerebrovascular disease? *Clin Genet* 1983; 24: 3001
28. BRATTSTROM L, ISRAELSSON B, HULTBERG B: Plasma homocysteine and methionine tolerance in early onset vascular disease. *Haemostasis* 1989; 19 Suppl 1: 35-44
29. PALMA REIS R, AZINHEIRA J, REIS H P et al: A homocysteinemia como factor de risco de doença cerebrovascular precoce. *Acta Médica Portuguesa* 1994
30. VERHOEF P, HENNEKENS C H, MALINOW et al: A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of ischemic stroke. *Stroke* 1994; 25: 1924-30
31. LEVENE C I, MURRAY J C: The etiological role of maternal vitamin B 6 deficiency in the development of atherosclerosis. *Lancet* 1977; 1: 628-9
32. MILLER J W, RIBAYA-MERCADO J D, RUSSELL R M et al: Effect of vitamin B-6 deficiency on fasting homocysteine concentrations. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 1154-60.
33. SWIFT M E, SHULTZ T D: Relationship of vitamins B 6 and B 12 to homocysteine levels: risk for coronary heart disease. *Nutr Rep Int* 1986; 34: 1-14
34. BRATTSTROM L, ISRAELSSON B, LINDGARDE F, HULTBERG B: Higher total plasma homocysteine level in vitamin B12 deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionine B-Synthase deficiency. *Metabolism* 1988; 37: 175-78
35. STABLER S P, MARCELL P D, PODELL E R et al: Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography - mass spectrometry. *J Clin Invest* 1988; 81: 466-74
36. KANG S S, WONG P W K, NORUSIS M: Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism* 1987; 36: 458-62
37. LEWIS C A, PANCHARUNITI N, SAUBERLICH H E: Plasma folate adequacy as determined by homocysteine level. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 669: 360-62
38. HULTEMBERG B, AGARDH E, ANDERSON A et al. Increased levels of plasma homocysteine are associated with nephropathy, but not with severe retinopathy in type 1 diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1991; 51: 277-82
39. CHAUVEAU P, CHADEFaux B, COUDE M et al. Hyperhomocysteinemia, a risk factor for atherosclerosis in chronic uremic patients. *Kidney Int Suppl* 1993; 41: S72-7
40. HOROWITZ J H, RYPINS E B, HENDERSON J M et al. Evidence for impairment of transsulfuration pathway in cirrhosis. *Gastroenterol* 1981; 81: 668-75
41. CHADEFaux B, COUDE M, HAMEY M et al. Dosage radioisotopique de la L-homocysteine totale dans le plasma et l'urine: application à des dosages en serie. *Ann Biol Clin* 1990; 48: 33-36
42. PALMA REIS R: Homocysteinemia e doença vascular. Estudo epidemiológico e clínico. Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa 1994, pag 81-2.
43. CLARKE R, DALY L, ROBINSON K et al: Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991, 324: 1149-55