

Avaliação da Relação Entre o Polimorfismo C677T no Gene Para MTHFR e a Concentração Plasmática de Homocisteína na Doença Arterial Coronariana

artigo original

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste trabalho é determinar a prevalência do polimorfismo C677T do gene metilenotetraidrofolato redutase (*MTHFR*) e associá-la com a concentração plasmática de homocisteína plasmática na doença arterial coronariana (DAC). **Métodos:** Foram avaliados 93 pacientes com DAC documentada, atendidos no Hospital Universitário Oswaldo Cruz (Recife, PE, Brasil), e 108 controles sem a doença. Foram determinados os perfis lipídicos de pacientes e controles. As concentrações plasmáticas de homocisteína e folato foram determinadas por HPLC e quimioluminescência, respectivamente. A genotipagem foi realizada por RFLP/PCR. **Resultados:** Os grupos de pacientes e controles foram homogêneos quanto aos perfis genéticos do polimorfismo investigado. Nos pacientes, as concentrações plasmáticas médias de homocisteína ($11,7 \pm 4,4 \mu\text{mol/L}$) e de folato ($6,22 \pm 3,0 \text{ ng/dL}$) foram estatisticamente diferentes daquelas observadas nos controles ($8,84 \pm 3,2 \mu\text{mol/L}$ e $7,69 \pm 3,1 \text{ ng/dL}$, respectivamente), ao nível de significância de 0,05. Entretanto, não houve correlação entre concentração plasmática de homocisteína e folato nos pacientes ($r = -0,202$). Não foi observada associação entre a homozigidade 677TT para *MTHFR* e a concentração plasmática de homocisteína sérica ($p = 0,634$). A comparação dos casos e controles que apresentaram simultaneamente alta concentração plasmática de homocisteína e baixa concentração de folato, resultou numa razão de chance superior à de cada variável analisada independentemente (RC = 11,9; IC 95% = 4,16–34,42, $p < 0,01$). **Conclusões:** A mutação C677T não parece ser um fator genético importante capaz de explicar a hiperhomocisteinemia moderada observada nos pacientes com DAC. Outros fatores, ambientais e genéticos, devem ser investigados. (Arq Bras Endocrinol Metab 2006;50/6:1059-1065)

Descritores: Doença aterosclerótica coronariana; Homocisteína; Metilenotetraidrofolato redutase; Folato; Polimorfismo; Dislipidemias

ABSTRACT

Evaluation of *MTHFR* C677T Gene Polymorphism and Homocysteine Level in Coronary Atherosclerotic Disease.

Objective: The aim of this study is to determine the prevalence of C677T methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) polymorphism and correlate it with plasma homocysteine levels in coronary artery disease (CAD). **Methods:** Ninety-three patients with documented CAD from Hospital Universitário Oswaldo Cruz (Recife, PE, Brazil) and 108 healthy controls were evaluated. Homocysteine and folate levels were determined by HPLC and chemoluminescence, respectively, and lipid profile was considered. Genotyping was done by RFLP/PCR. **Results:** The groups were homogeneous for the C677T polymorphisms. The homocysteine level in cases ($11.7 \mu\text{mol/L}$) was statistically different from that observed in controls ($8.84 \mu\text{mol/L}$, $p < 0.05$). It was also observed that 72% of the patients had homocysteine values above $12 \mu\text{mol/L}$ while the control group presented only 32% in this range. There was no relationship between homozigosity for the

Maria Tereza C. Muniz
Erika R.F. Siqueira
Rosana A. Fonseca
Vânia D'Almeida
Júlia K. Hotta
José E. dos Santos
Maria do S.M. Cavalcanti
Cláudio A.M. Sampaio

Departamento de Bioquímica (CAMS) e Laboratório de Erros Inatos de Metabolismo, Departamento de Pediatria (VD'A), da Universidade Federal de São Paulo, SP; Departamento de Ciências Fisiológicas – ICB (MTCM, ERFs, RAF & MSMC), Universidade de Pernambuco, Recife, PE; e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (JKH & JES), Universidade de São Paulo, SP.

Recebido em 06/02/06
Revisado em 30/05/06
Aceito em 19/07/06

C677T polymorphism and the homocysteine level ($p=0.634$). We noticed statistical differences between folate levels from patients and controls (6.22 and 7.69 ng/dL, $p < 0.05$, respectively). However, there was no correlation between homocysteine and folate concentrations in the entire group ($r = -0.202$). Comparing cases and controls, the odds ratio (OR) when homocysteine is high and folate is low was $OR = 11.9$; $CI\ 95\% = 4.16-34.42$, $p < 0.01$. **Conclusion:** A lack of correlation between C677T mutation and homocysteine level suggests that environmental factors and others genetic factors seem to exert more influence on homocysteine level in this population. (Arq Bras Endocrinol Metab 2006; 50/6:1059-1065)

Keywords: Coronary arterial disease; Homocysteine; Methylenetetrahydrofolate reductase; Folate; Polymorphism; Dislipidemias

EVIDÊNCIAS EPIDEMIOLÓGICAS MOSTRAM que a concentração elevada de homocisteína plasmática é um fator de risco independente para a doença cardiovascular (1-5), e pode contribuir para a manifestação prematura (6,7) e severidade da doença arterial coronariana (DAC) (8,9), além de representar um preditor de mortalidade, independente dos fatores de risco tradicionalmente conhecidos (10).

A concentração plasmática de homocisteína é influenciada tanto por fatores nutricionais, tais como o *status* do ácido fólico e as vitaminas B6 e B12, quanto por fatores hereditários, especialmente ligados às enzimas do metabolismo da metionina e da cisteína. A homocisteína pode ser remetilada a metionina ou convertida a cisteína por transulfuração. Nesta última rota, a metionina é catabolisada numa reação dependente de B6. Na via da remetilação, a homocisteína é remetilada a metionina em uma reação dependente de B12 e requer o 5-metiltetrahydrofolato (5-metill-THF), que é produzido por redução do 5,10 metileno-THF, através da enzima 5,10 metileno-THF redutase (MTHFR), que é uma proteína reguladora do metabolismo da homocisteína (11,12).

Polimorfismos em genes específicos parecem conferir uma base genética para riscos de doenças vasculares. A forma termolábil da *MTHFR*, resultante da transição de 677C a T no gene correspondente, contribui para a insuficiência funcional e conseqüente hiperhomocisteinemia observada nos homozigotos (11-14). A homozigosidade para 677TT está comumente associada com o risco aumentado de DAC em Israel (28), na América do Norte (29) e no Japão, mas não em outras populações como a chinesa, que carrega o mesmo polimorfismo para *MTHFR* (30). Em con-

traste com a população francesa, na qual a substituição A66G do gene *MTRR* — metionina sintetase redutase é determinante de hiperhomocisteinemia moderada associada à DAC (31). A mutação parece ser neutra em relação à homocisteína, quando o folato está em níveis adequados (15-17), mas, naqueles indivíduos com baixo nível de folato, a homocisteína aumenta significativamente nos homozigotos 677TT e, em valores intermediários, nos indivíduos heterozigotos (18). A região na qual se estabeleceu a mutação na enzima está envolvida com a ligação do folato e, quando o nível de folato é adequado, a enzima pode ser estabilizada (19).

Desde que as condições econômicas, sociais e os hábitos culturais influenciam o *status* do folato, desde que o *background* genético varia etnicamente e ambos os fatores interagem para expressão e prevalência de DAC, o presente estudo tem por finalidade verificar a relação entre o polimorfismo C677T no gene para *MTHFR* e a concentração plasmática de homocisteína e folato, em pacientes portadores de doença arterial coronariana, no Recife.

MÉTODOS

População estudada

Um estudo caso-controle foi conduzido em um grupo de indivíduos (sem história pessoal ou familiar de DAC, insuficiência renal, doença da tireóide, diabetes) constituído de 108 indivíduos selecionados do Programa de Atividade Física para Terceira Idade da Universidade de Pernambuco e funcionários do Instituto de Ciências Biológicas, todos provenientes de Recife, PE, com faixa etária de 23 a 61 ($48,9 \pm 9,1$), sendo 75 (69%) do sexo feminino e 33 (31%) do sexo masculino. O grupo de pacientes foi constituído de 93 indivíduos com faixa etária de 33 a 67 anos ($52,5 \pm 6,9$), sendo 43 (47%) do sexo feminino e 50 (53%) do sexo masculino. Os pacientes, tidos como portadores de DAC, eram atendidos no Hospital Universitário Oswaldo Cruz, e a inclusão dos mesmos no projeto foi realizada de acordo com os critérios de Grahan e cols., 1998 (2), como presença de doença coronária com evidência clínica (dor torácica) e laboratorial (ECG e enzimas como CK total e CK MB) de angina ou infarto do miocárdio, excetuando a faixa etária que no presente estudo ultrapassou a idade de sessenta anos. E os critérios de exclusão para os pacientes foram: presença de doença hepática, insuficiência renal (avaliada pela dosagem de creatinina no soro), gravidez, uso de medicamentos anticonvulsivantes, alcoolismo crônico, doença psiquiátrica franca e exposição ao óxido nítrico

a menos de três meses. Todos os indivíduos que participaram deste estudo assinaram um termo de consentimento, que foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Pernambuco.

Análises bioquímicas e genotipagem

A homocisteína total plasmática foi determinada pelo método HPLC, por detecção fluorimétrica, de acordo com Pfeiffer e cols., 1999 (20), cujo valor de referência para o método utilizado é $< 12 \mu\text{mol/L}$, e o folato foi determinado por quimioluminescência ACS: 180 (BAYER Diagnostics Corporation), cujo valor de referência é de 1,1 a 20 ng/mL. Colesterol total e triglicerídeos foram determinados por fotometria enzimática. Colesterol HDL foi determinado após precipitação de LDL e VLDL, seguido por fotometria enzimática. O DNA foi obtido de linfócitos do sangue periférico e a determinação dos genótipos C677T *MTHFR* foi efetuada por RFLP/PCR, com posterior digestão pela enzima de restrição *Hinf* I, de acordo com o protocolo de Frosst e cols. (14).

Análise estatística

As variáveis contínuas foram expressas como média \pm desvio-padrão. Os dados qualitativos foram analisados pelo teste de homogeneidade do qui-quadrado e os dados quantitativos, analisados pelo teste *t-Student*. Análise multivariada e teste de Bonferroni para intervalos de confiança foram usados para avaliar os diferentes fatores entre pacientes e controles. O teste bilateral de Fisher foi usado para associar *MTHFR* e Homocisteína. Todos os cálculos foram realizados com auxílio dos pacotes estatísticos MINITAB e SAS. Para estimar a razão de chance com intervalos de confiança de 95%, foi utilizado o programa estatístico Biostat versão 2.0.

RESULTADOS

As variáveis bioquímicas estão descritas na tabela 1. Não houve diferenças estatisticamente significantes nos perfis lipídicos entre os grupos, mas foram encontradas nas concentrações de homocisteína e folato. Foi observado que 39,9% dos pacientes apresentavam valores de homocisteína acima de $12 \mu\text{mol/L}$, enquanto nos controles, foi apenas de 15,8%. Baixos níveis de folato, variando de 1,0 a 5,5 ng/mL, foram encontrados em 52,2% dos pacientes e 25% dos controles. As concentrações de homocisteína plasmática variaram de 4,7 a 35,8 $\mu\text{mol/L}$ (média 11,7; DP= 4,4) nos pacientes e de 2,7 a 21,3 (média 8,8; DP= 3,2) nos controles, e a diferença entre os grupos foi estatística-

mente significativa [$z(U) = 5,70$; $p < 0,01$]. O terceiro quartil da distribuição de valores de homocisteína nos controles foi usado para dividir os indivíduos de acordo com a concentração superior ou inferior a $10 \mu\text{mol/L}$. Entre os pacientes, 59% pertenciam à primeira categoria. A razão de chance de portadores de concentrações altas de homocisteína desenvolverem DAC foi de 4,3 (IC 95%= 2,38–7,91, $p < 0,01$). As concentrações de folato plasmático nos pacientes variaram de 2,2 a 20,2 ng/mL (média 6,2; DP= 2,9) e, nos controles, de 3,0 a 20,0 ng/dL (média 7,7; DP= 3,1). A diferença entre os grupos teste e controles foi também significativa [$z(U) = 4,25$; $p < 0,01$]. O primeiro quartil nos controles foi usado para classificar os grupos em valores inferiores e superiores a 5,5 ng/dL e 52,2% dos pacientes se enquadraram na primeira categoria. A razão de chance de indivíduos com baixo folato de desenvolver DAC foi de 3,4 (IC 95%= 1,88–6,27, $p < 0,01$). A comparação dos casos e controles que apresentaram simultaneamente alta concentração plasmática de homocisteína e baixa concentração de folato resultou numa razão de chance superior à de cada variável analisada independentemente (RC= 11,9; IC 95%= 4,16–34,42, $p < 0,01$).

As distribuições genotípicas do polimorfismo C677T no gene *MTHFR* estão de acordo com aquelas esperadas na situação de equilíbrio genético (Hardy-Weinberg), tanto nos pacientes ($\chi^2 = 3,025$; $p = 0,22$), como nos controles ($\chi^2 = 3,04$; $p = 0,218$). As frequências do alelo 677T foram de 24% nos pacientes e 23% nos controles, justificando as alterações não significativas das frequências dos genótipos nestes grupos ($\chi^2 = 0,96$; $p = 0,97$) (tabela 2). A figura 1 mostra um gel de poliácridamida 8% onde se observa o polimorfismo C677T do gene *MTHFR* com os genótipos CC, CT e TT. Comparando altas concentrações plasmáticas de homocisteína ($> 10 \mu\text{mol/L}$), baixas concentrações de folato ($< 5,5 \text{ ng/dL}$) com os genótipos *MTHFR* C677T, através do teste exato de Fisher (unilateral), os resultados indicaram uma associação de DAC com os portadores do alelo 677T (homozigotos mais heterozigotos), tanto para homocisteína ($p = 0,0276$) como para o folato ($p = 0,047$). A razão de chance para a homocisteína foi de 2,94; IC 95%= 1,09–7,93, $p = 0,055$. A razão de chance para o folato foi de 2,46; IC 95%= 0,96–6,30, $p = 0,095$.

A relação entre as concentrações de homocisteína alta e baixo folato em relação aos genótipos não revelou diferença estatística significativa através do teste Qui-quadrado ($p = 0,244$).

A frequência do alelo T para cada quartil de homocisteína e folato está descrita nas tabelas 3 e 4.

Tabela 1. Valores das variáveis bioquímicas em pacientes com DAC e grupo controle.

Parâmetros	Controle (n= 108) Média ± DP	DAC (n= 93) Média ± DP	p
Colesterol Total (mg/dL)	193,6 ± 38,8	184,9 ± 38,4	NS
Colesterol LDL (mg/dL)	136 ± 38,8	133,6 ± 52,1	NS
Colesterol HDL (mg/dL)	47,9 ± 13,5	45,1 ± 11,5	NS
Triglicerídeos (mg/dL)	118,5 ± 38,8	111,4 ± 40,4	NS
Homocisteína (µmol/L)	8,8 ± 3,2	11,7 ± 4,4	< 0,05
Folato (ng/mL)	7,7 ± 3,1	6,2 ± 2,9	< 0,05

NS: não significante

Tabela 2. Distribuição genotípica e alélica do gene da MTHFR C677T em pacientes com DAC e controles.

Genótipo / alelo MTHFR	Controle (n= 108)		DAC (n= 93)	
	n	(%)	n	(%)
CC	68	(63,0)	57	(61,3)
CT	31	(28,7)	28	(30,1)
TT	9	(8,3)	8	(8,6)
T	49	(23,0)	44	(24,0)

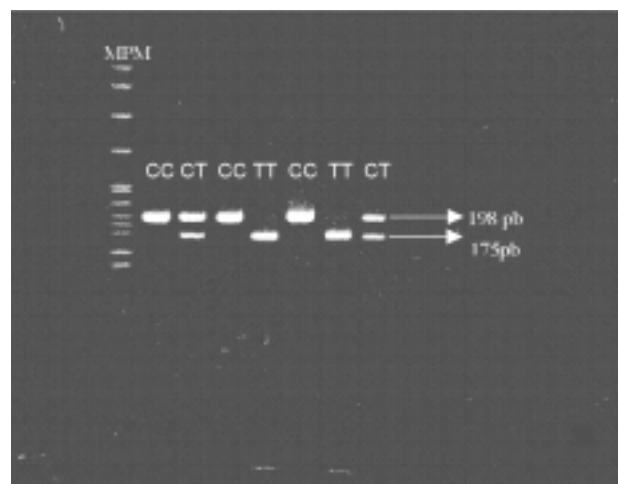


Figura 1. Gel de poliacrilamida 8% com resultados para o polimorfismo C677T da MTHFR. MPM (marcador de peso molecular 1Kb), CC (homozigoto normal), CT (heterozigoto) e TT (homozigoto mutante).

Tabela 3. Frequências alélicas e concentração plasmática de homocisteína total por quartil.

	Pacientes		Controles		p
	C n (%)	T n (%)	C n (%)	T n (%)	
Q ¹	10 (8,3)	2 (1,67)	50 (8,6)	8 (13,8)	0,678*
Q ²	13 (65,0)	7 (35,0)	39 (84,8)	7 (15,2)	0,102*
Q ³	28 (70,0)	12 (30,0)	39 (72,2)	15 (27,8)	0,996**
Q ⁴	93 (80,2)	23 (19,8)	37 (66,0)	19 (34,0)	0,067**

Quartis: Q¹ < 6,87; Q² = 6,88–8,14; Q³ = 8,15–9,92; Q⁴ > 9,93

* Teste Exato de Fisher; ** Teste do qui-quadrado.

Tabela 4. Frequências alélicas e concentração plasmática de folato por quartil.

	Pacientes		Controles		p*
	C n (%)	T n (%)	C n (%)	T n (%)	
Q ¹	77 (77,0)	23 (23,0)	39 (65,0)	21 (35,0)	0,143
Q ²	29 (76,3)	9 (23,7)	39 (78,0)	11 (22,0)	0,944
Q ³	20 (76,9)	6 (23,1)	46 (85,2)	8 (14,8)	0,550
Q ⁴	16 (80,0)	4 (20,0)	43 (82,7)	9 (17,3)	0,939

Quartis: Q¹ < 5,5; Q² = 5,6–7,1; Q³ = 7,2–9,2; Q⁴ > 9,3

* Teste do qui-quadrado.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, a concentração plasmática de homocisteína e de folato foi estatisticamente mais elevada e mais baixa, respectivamente, nos pacientes com DAC do que nos controles, podendo sugerir uma possível participação desses fatores como agentes causais para os danos vasculares que podem levar à DAC. Já foram propostos vários mecanismos biológicos para explicar esta associação, tal como o estresse oxidativo (21). Recentemente, foi observado que a homocisteína pode induzir danos no DNA e que a concentração aumentada está associada com o número de vasos afetados e o índice de micronúcleos, fatos indicativos da severidade de DAC e de instabilidade genética (12,22).

O folato é um fator de risco relacionado com a homocisteína (23,24), e a administração de ácido fólico combinada com as vitaminas B12 e B6 reduz a homocisteína nos pacientes com DAC (25). Além disso, os pacientes 677T homocigotos apresentam concentrações plasmáticas de homocisteína elevadas, principalmente quando o folato está baixo (26), e estes podem ser mais responsivos à suplementação de folato (27). Contudo, no presente estudo não foi observada uma correlação inversa, estatisticamente significativa para as concentrações de folato e homocisteína, fato este que pode ser justificado pela limitação do estudo no que se refere ao tamanho da amostra, quando aplicados os testes estatísticos.

As variantes alélicas comuns que produzem uma deficiência na enzima *MTHFR* poderiam influenciar a concentração plasmática de homocisteína no processo crônico do desenvolvimento de DAC, mas os resultados dos estudos epidemiológicos realizados até o momento ainda são controversos. O presente trabalho sugere que o polimorfismo C677T da *MTHFR* não é um fator de risco independente para DAC e que, apesar de a população estudada estar em equilíbrio genético, quando os alelos de um loco dialélico se combinam para formar os diferentes genótipos da geração seguinte, em uma população, as

frequências esperadas desses genótipos devem ser p², 2pq e q², para os genótipos CC, CT e TT, respectivamente, se os cruzamentos forem determinados apenas pelo acaso; a homocigosidade para 677TT não se correlacionou com os níveis aumentados de homocisteína em nordestinos mas, como a frequência do alelo *MTHFR* 677T é baixa nesta população, é provável que seja um acontecimento ao acaso ou que seja necessária uma amostra maior para se estabelecer a associação entre eles. E, ainda, outros fatores genéticos podem estar envolvidos na assimilação e metabolismo do folato, interagindo com fatores ambientais para a expressão de DAC.

Este estudo apresentou algumas limitações: a idade média foi significativamente maior nos pacientes quando comparada com os controles. No que se refere ao sexo, há uma diferença estatisticamente significativa entre as proporções dos gêneros masculino e feminino entre pacientes e controles. Além disso, é necessário avaliar outros fatores de risco para DAC, como tabagismo, obesidade, IMC (índice de massa corporal), e relacionar com as concentrações de homocisteína e de folato.

CONCLUSÃO

De acordo com os nossos resultados, as concentrações aumentadas de homocisteína e diminuídas de folato estão presentes nos pacientes com DAC do Recife, mas estas variações não puderam ser atribuídas ao polimorfismo *MTHFR* C677T, o que permite estimular a investigação de outros fatores genéticos, em uma amostra maior.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela UNIFESP — São Paulo, USP — Ribeirão Preto e FAPESP.

REFERÊNCIAS

- Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, D'Agostino RB, Wilson PW, Belanger AJ, et al. Association between plasma homocysteine concentrations and extra cranial carotid-artery stenosis. **N Engl J Med** 1995;332:286-91.
- Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: The European concerted action Project. **JAMA** 1997;277:1775-81.
- Guba SC, Fink IM, Fonseca V. Hyperhomocysteinemia an emerging and important risk factor for thromboembolic and cardiovascular disease. **Am J Clin Pat** 1996;105:709-22.
- Wolfgang H, Obeid R, Jouma M. Hyperhomocysteinemia and vitamin B-12 deficiency are more striking in Syrians than in Germans – causes and implications. **Atherosclerosis** 2003;166:143-50.
- Van den Brandhof WE. The relation between plasma cysteine, plasma homocysteine and coronary atherosclerosis. **Atherosclerosis** 2001;157:403-9.
- Mager A, Lalezari S, Shohat T, Birnbaum Y, Adler Y, Magal N, et al. Methylene-tetrahydrofolate reductase genotypes and early-onset coronary artery disease. **Circulation** 1999;100:2406-10.
- Tsai MY, Welge BG, Hanson NQ, Bignell MK, Vessey J, Schwichtenberg K, et al. Genetic causes of mild hyperhomocysteinemia in patients with premature occlusive coronary artery diseases. **Artherosclerosis** 1999;143:163-70.
- Chao CL, Tsai HH, Lee CM, Hsu SM, Kao JT, Chien KL, et al. The graded effect of hyperhomocysteinemia on the severity and extent of coronary atherosclerosis. **Atherosclerosis** 1999;147:379-80.
- Yoo JH, Park JE, Hong KP, Lee SH, Kim DK, Lee WR, et al. Moderate hyperhomocysteinemia is associated with the presence of coronary artery disease and the severity of coronary atherosclerosis in Koreans. **Thromb Res** 1999;94:45-52.
- Anderson JL, Muhlestein JB, Horne BD, Carlquist JF, Bair TL, Madsen TE, et al. Plasma homocysteine predicts mortality independently of traditional risk factors and C-reactive protein in patients with angiographically defined coronary artery disease. **Circulation** 2000;102:1227-32.
- Verhoef P, Kok FJ, Kluijtmans LAJ, Refsum H, Ueland PM, Kruysen DACM. The 677 C→T mutation in methylene-tetrahydrofolate reductase gene: associations with plasma total homocysteine levels and risk of coronary atherosclerotic disease. **Atherosclerosis** 1997;132:105-13.
- Andreassi MG, Botto N, Cocci F, Battaglia D, Antonioli E, Masetti S, et al. Methylene-tetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism, homocysteine, vitamin B12, and DNA damage in coronary artery disease. **Hum Genet** 2003;112:171-7.
- Gudnason V, Stansbie D, Scott J, Bowron A, Nicaud V, Humphries S. C677T (thermolabile alanine/valine) polymorphism in methylene-tetrahydrofolate reductase (MTHFR): its frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. **Atherosclerosis** 1998;136:347-54.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylene-tetrahydrofolate reductase. **N Genet** 1995;10:111-3.
- Yoo J, Park S-C. Low plasma folate in combination with the C677T methylene-tetrahydrofolate reductase polymorphism is associated with increased risk of coronary artery disease in Koreans. **Thromb Res** 2000;97:77-84.
- Gemmati D, Serino ML, Trivellato C, Fiorini S, Scapoli GL. C677T substitution in methylene-tetrahydrofolate reductase gene as a risk factor for venous thrombosis and arterial disease in selected patients. **Haematologica** 1999;84:824-8.
- Jee SH, Beaty TH, Suh I, Yoon Y, Appel LJ. The methylene-tetrahydrofolate reductase gene is associated with increased cardiovascular risk in Japan, but not in other populations. **Atherosclerosis** 2000;153:161-8.
- Girelli D, Friso S, Trabetti E, Olivieri O, Russo C, Pessotto R, et al. Methylene-tetrahydrofolate reductase C677T mutation plasma homocysteine, and folate in subjects from northern Italy with or without angiographically documented severe coronary atherosclerotic disease: evidence for an important genetic-environmental interaction. **Blood** 1998;9:4158-63.
- Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML. The structure and properties of methylene-tetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. **N Struct Biol** 1999;6:359-65.
- Pfeiffer CM, Huff DL, Gunter EW. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. **Clin Chem** 1999;45:290-2.
- Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. **J Clin Invest** 1996;98:5-7.
- Botto N, Andreassi MG, Manfredi S, Masetti S, Cocci F, Colombo MG, et al. Genetic polymorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage. **Eur J Hum Genet** 2003;11:671-8.
- Heijer M, Brouwer IA, Bos GMJ. Vitamin supplementation reduces blood homocysteine levels. A controlled trial in patients with venous thrombosis and healthy volunteers. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 1998;18:356-61.
- van der Griend R, Haas FJ, Biesma DH, Duran M, Meuwissen OJ, Banga JD. Combination of low-dose folic acid and pyridoxine for treatment of hyperhomocysteinemia in patients with premature arterial disease and their relatives. **Atherosclerosis** 1999;143:177-83.
- Wang XL, Duarte N, Cai H, Adachi T, Sim AS, Cranney G, et al. Relationship between total plasma homocysteine, polymorphisms of homocysteine metabolism related enzymes, risk factors and coronary artery disease in the Australian hospital-based population. **Atherosclerosis** 1999;146:133-40.
- Lobo A, Naso A, Arheart K, Kruger WD, Abou-Ghazala T, Alsous F, et al. Reduction of homocysteine levels in coronary artery disease by low-dose folic acid combined with vitamins B6 and B12. **Am J Cardiol** 1999;83:821-5.
- Kruger WD, Evans AA, Wang L, Malinow MR, Duell PB, Anderson PH, et al. Polymorphisms in the CBS gene associated with decreased risk of coronary artery disease and increased responsiveness to total homocysteine lowering by folic acid. **Mol Metab** 2000;70:53-60.

-
28. Mager A, Battler A, Birnbaum Y, Magal N, Shohat M. Plasma homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase genotypes and age at onset of symptoms of myocardial ischemia. **Am J Cardiol** 2002;89:919-23.
29. Wu AH, Tsongalis GJ. Correlation of polymorphism to coagulation and biochemical risk factors for cardiovascular disease. **Am J Cardiol** 2001;87:1361-6.
30. Ho CH, Kuo BI, Kong CW, Chau WK, Hsu HC, Gau JP, et al. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism, B vitamins and other factors on plasma homocysteine and risk of thromboembolic disease in Chinese. **J Chin Med Assoc** 2005;68:560-5.
31. Gueant-Rodriguez RM, Juilliere Y, Candito M, Adjalla CE, Gibelin P, Herbeth B, et al. Association of MTRRA66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTRA2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the French population. **Thromb Haemost** 2005;94:510-5.

Endereço para correspondência:

Maria Tereza Cartaxo Muniz
Rua Dr. José Maria 615/203
52041-000 Recife, PE
E-mail: tcartaxo.upe@hotmail.com