

CELSO ARRAIS RODRIGUES

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO VITAMÍNICA EM PARÂMETROS
DE GERAÇÃO DE TROMBINA, FIBRINÓLISE E FUNÇÃO
ENDOTELIAL NO TROMBOEMBOLISMO VENOSO**

Estudo duplo-cego, randomizado, controlado com placebo

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do título de
Doutor em Ciências

SÃO PAULO

2006

CELSO ARRAIS RODRIGUES

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO VITAMÍNICA EM PARÂMETROS
DE GERAÇÃO DE TROMBINA, FIBRINÓLISE E FUNÇÃO
ENDOTELIAL NO TROMBOEMBOLISMO VENOSO**

Estudo duplo-cego, randomizado, controlado com placebo

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Dayse Maria Lourenço

Co-orientadora: Profa. Dra. Vânia Maris Morelli

São Paulo

2006

Rodrigues, Celso Arrais

Efeito da suplementação vitamínica em parâmetros de geração de trombina, fibrinólise e função endotelial em pacientes com tromboembolismo venoso: Estudo duplo-cego, randomizado, controlado com placebo. / Celso Arrais Rodrigues – São Paulo, 2006.

xv, 83f

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Hematologia.

Título em Inglês: Effect of B-vitamin supplementation in markers of thrombin generation, fibrinolysis and endothelial function in patients with venous thromboembolism: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.

1. tromboembolismo venoso. 2. homocisteína. 3. suplementação vitamínica. 4. função endotelial. 5. fibrinólise. 6. geração de trombina.

*Aos meus pais, pelo
carinho, pela presença
constante e pelo exemplo
de ética e moral.*

*À Adriana, pelo
companheirismo, amor,
amizade, paciência e pelo
exemplo de dedicação e
perseverança.*

*Aos meus irmãos
Fábio e Patrícia, pelo
carinho, apoio,
incentivo e amizade.*

Agradecimentos

À Profa. Dra. Dayse Maria Lourenço, por ter me recebido, pela oportunidade, pela orientação científica e pelos ensinamentos em Hemostasia.

À Profa. Dra. Vânia Maris Morelli, pelo incentivo, pela dedicação, pela leitura crítica e contribuições apresentadas.

À Profa. Dra. Mihoko Yamamoto, pela amizade irrestrita e pela generosidade em partilhar seus conhecimentos.

À Cidinha, pela amizade, pela confiança e pela enorme dedicação em todos os momentos desse trabalho.

À Profa. Dra. Vânia D'Almeida e sua equipe, pela cooperação e pela possibilidade de realização dos exames em seu Laboratório.

À Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo, pelos conselhos, pela atenciosa ajuda e pelo apoio.

Ao Prof. Dr. José Orlando Bordin, pelo estímulo à pesquisa, pelo exemplo e pelo apoio.

À Profa. Dra. Maria de Lourdes L. Ferrari Chauffaille, pelo incentivo, pela confiança e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. José Salvador Rodrigues de Oliveira, pelo apoio e pelo exemplo de determinação.

À Profa. Dra. Gisele Wally Braga Colleoni, pelo apoio e estímulo constantes.

Ao Prof. Dr. José Kerbauy pelo acolhimento nessa instituição, pelo incentivo e pelos ensinamentos.

À Raniely, pela amizade e pela parceria durante esse estudo.

Ao Prof. Dr. Francisco Humberto de Abreu Maffei, Professor Titular, e à Profa. Dra. Izolete Aparecida Thomazini Santos, da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, pela inclusão de pacientes daquela instituição no estudo.

À Dra. Andréa Aparecida Garcia e à Dra. Maria Carolina Tostes Pintão, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pela inclusão de pacientes daquela instituição no estudo.

Ao Prof. Dr. Rendrik França Franco, pelos conselhos e pelo incentivo.

À Aline, pela presença constante como amiga e profissional, em todas as etapas deste estudo, partilhando os momentos de incertezas e de acertos.

Ao Adriano, pela amizade, pelo apoio incondicional e pela constante disponibilidade.

Aos amigos Ronald e Perla, pela amizade e companheirismo desde os primeiros anos dessa jornada.

Aos amigos Carlos Márcio, Anita, Marinez, Vivian e Klaus, pela amizade e parceria.

Aos amigos que estão distantes Yuri e Luiz Cláudio, pela amizade e pelo apoio.

Aos amigos pós-graduandos, residentes, médicos e funcionários da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UNIFESP, pela convivência agradável.

Aos colegas do Serviço de Hematologia do Hospital do Servidor Público Estadual “Francisco Morato de Oliveira”, pela amizade.

Esse trabalho foi desenvolvido com apoio financeiro da FAPESP

Processo no.: 03 / 12387 - 5

Sumário

Dedicatória	iii
Agradecimentos	vi
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas	xiv
Resumo	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Homocisteína e tromboembolismo venoso	2
1.2. Mecanismo da associação entre homocisteína e eventos vasculares	5
1.3. Efeito da suplementação sobre os níveis de homocisteína	7
1.4. Efeito da suplementação sobre marcadores laboratoriais	10
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Casuística	14
3.2. Desenho do estudo	15
3.3. Coleta de sangue e análises	15
3.4. Análise estatística	18
4. RESULTADOS	19
4.1. Seleção da população estudada	20
4.2. Pesquisa de trombofilia hereditária	22
4.3. Dosagens da homocisteína plasmática e das vitaminas	23
4.4. Efeito da suplementação na concentração de DD, F1+2, TAT, FVWAg, fibrinogênio e do fator VIII	28

4.5. Efeito da suplementação na concentração de t-PA e PAI-1-----	37
4.6. Análise dos parâmetros hemostáticos estudados em relação aos níveis de homocisteína basal-----	42
4.7. Correlação entre a homocisteína basal e valores basais dos parâmetros hemostáticos estudados-----	48
4.8. Efeito da suplementação na concentração dos parâmetros hemostáticos de acordo com o nível de homocisteína basal-----	51
5. DISCUSSÃO-----	55
6. CONCLUSÕES-----	64
7. ANEXOS-----	66
8. REFERÊNCIAS-----	84

Abstract

Bibliografia consultada

Lista de Figuras

Figura 1	Metabolismo da homocisteína-----	3
Figura 2	Distribuição dos pacientes após seleção para participação no estudo-----	20
Figura 3	Distribuição dos pacientes de acordo com o motivo da exclusão do protocolo-----	21
Figura 4	Distribuição dos valores basais de homocisteína dos 105 pacientes analisados, separando-os conforme o sexo-----	23
Figura 5	Valores de homocisteína antes (T1) e após (T2) a intervenção com vitaminas ou placebo, nos 100 pacientes analisados-----	24
Figura 6	Razão T2/T1 dos valores de homocisteína, folato, vitamina B12 e piridoxina nos pacientes que receberam suplementação vitamínica ou placebo-----	27
Figura 7	Valores de dímeros D (DD) antes (T1) e após (T2) a intervenção com vitaminas ou placebo, nos 99 pacientes avaliados-----	29
Figura 8	Valores de fragmento 1+2 (F1+2) antes (T1) e após (T2) a intervenção com vitaminas ou placebo, nos 99 pacientes avaliados-----	30
Figura 9	Valores de complexo trombina-antitrombina (TAT) antes (T1) e após (T2) a intervenção com vitaminas ou placebo, nos 99 pacientes avaliados-----	31
Figura 10	Valores do antígeno do fator de von Willebrand (FVWAg) antes (T1) e após (T2) a intervenção com vitaminas ou placebo, nos 99 pacientes avaliados-----	32
Figura 11	Valores de fator VIII antes (T1) e após (T2) a intervenção com vitaminas ou placebo, nos 99 pacientes avaliados-----	33
Figura 12	Valores de fibrinogênio antes (T1) e após (T2) a intervenção com vitaminas ou placebo, nos 99 pacientes avaliados-----	34
Figura 13	Razão T2/T1 dos valores de homocisteína, F1+2, TAT e DD, nos pacientes tratados com vitaminas ou placebo-----	35
Figura 14	Razão T2/T1 dos valores de homocisteína, antígeno do fator de von Willebrand (FVWAg), fator VIII e fibrinogênio, nos pacientes tratados com vitaminas ou placebo-----	36
Figura 15	Valores de t-PA antes (T1) e após (T2) a intervenção com vitaminas ou placebo, nos 99 pacientes avaliados-----	38

Figura 16	Distribuição dos valores de t-PA antes (T1) e após (T2) a intervenção com vitaminas ou placebo, de acordo com a curva de calibração utilizada-----	39
Figura 17	Valores de PAI-1 antes (T1) e após (T2) a intervenção com vitaminas ou placebo, nos 99 pacientes avaliados-----	40
Figura 18	Razão T2/T1 dos valores de homocisteína, PAI-1 e t-PA, nos pacientes tratados com vitaminas ou placebo-----	41
Figura 19	Distribuição dos valores de homocisteína basal dos 100 pacientes analisados, separando-os por tercís (superior e inferior)-----	42
Figura 20	Medianas, médias, variação interquartil, máximo e mínimo dos valores de fragmento 1+2, complexo trombina-antitrombina e dímeros D nos pacientes com homocisteína basal acima do tercil superior (12,6 $\mu\text{mol/L}$) e abaixo do tercil inferior (9,9 $\mu\text{mol/L}$) -----	44
Figura 21	Medianas, médias, variação interquartil, máximo e mínimo dos valores de antígeno do fator de von Willebrand, fator VIII e fibrinogênio, nos pacientes com homocisteína basal acima do tercil superior (12,6 $\mu\text{mol/L}$) e abaixo do tercil inferior (9,9 $\mu\text{mol/L}$)-----	45
Figura 22	Medianas, médias, variação interquartil, máximo e mínimo dos valores de t-PA e PAI-1, nos pacientes com homocisteína basal acima do tercil superior (12,6 $\mu\text{mol/L}$) e abaixo do tercil inferior (9,9 $\mu\text{mol/L}$)-----	46
Figura 23	Distribuição dos valores de t-PA basal nos pacientes, separando-os de acordo com os tercís de homocisteína basal (superior e inferior). A linha representa o valor do percentil 80% (10,4 ng/mL)-----	47
Figura 24	Gráfico de correlação entre os valores basais de homocisteína e t-PA-----	49
Figura 25	Gráfico de correlação entre os valores basais de t-PA e PAI-1-----	50
Figura 26	Nível de t-PA antes e após a intervenção com placebo ou suplementação vitamínica, separando os pacientes em função do nível de homocisteína basal-----	51
Figura 27	Nível de PAI-1 antes e após a intervenção com placebo ou suplementação vitamínica, separando os pacientes em função do nível de homocisteína basal-----	52

Lista de Tabelas

Tabela 1	Características clínicas dos 100 pacientes analisados, divididos em relação ao tratamento recebido-----	22
Tabela 2	Valores de homocisteína antes (tempo 1) e após (tempo 2) suplementação vitamínica das 3 pacientes com hiperhomocisteinemia acima de 30 $\mu\text{mol/L}$ -----	25
Tabela 3	Valores de homocisteína, folato, vitamina B12 e piridoxina: basal, após o tratamento e a razão entre os dois tempos (T2/T1), nos pacientes que receberam suplementação vitamínica ou placebo-----	26
Tabela 4	Valores de DD, F1+2, TAT, FVWAg, fator VIII e fibrinogênio : basais, após tratamento e a razão entre os dois tempos (T2/T1)-----	28
Tabela 5	Valores de t-PA e PAI-1: basal, após tratamento e razão entre os dois tempos (T2/T1)---	37
Tabela 6	Valores basais dos parâmetros hemostáticos em pacientes com homocisteína basal acima do tercil superior (12,6 $\mu\text{mol/L}$) e abaixo do tercil inferior (9,9 $\mu\text{mol/L}$)-----	43
Tabela 7	Coeficiente de correlação de Spearman entre os valores de homocisteína basal e os parâmetros analisados-----	48
Tabela 8	Valores de homocisteína, t-PA e PAI-1, antes (tempo 1) e após (tempo 2) suplementação vitamínica, nos 19 pacientes com valores basais de homocisteína acima do tercil superior (12,6 $\mu\text{mol/L}$)-----	53
Tabela 9	Valores dos parâmetros laboratoriais (basais e após o tratamento) dos pacientes, separando-os de acordo com os tercís de homocisteína basal (superior ou inferior)-----	54

Lista de Abreviaturas

AIT	acidente isquêmico transitório
AVCi	acidente vascular cerebral isquêmico
CBS	cistationina β -sintase
DD	dímeros D
DNA	ácido desoxirribonucléico
F1+2	fragmento 1+2
FMD	dilatação mediada por fluxo
FPA	fibrinopeptídeo A
FVW	fator de von Willebrand
FVWAg	antígeno do fator de von Willebrand
HPLC	cromatografia líquida de alto desempenho
MTHFR	metileno-tetrahidrofolato redutase
MTR	metionina sintase
PAI-1	inibidor do ativador do plasminogênio tecidual
PCR	proteína C reativa
PPP	plasma pobre em plaquetas
RNA	ácido ribonucléico
TAT	complexo trombina-antitrombina
TEV	tromboembolismo venoso
t-PA	ativador do plasminogênio tecidual
TVP	trombose venosa profunda

Resumo

Introdução: Hiperhomocisteinemia leve está associada com aumento do risco de tromboembolismo venoso (TEV) e doenças cardiovasculares. Estudos anteriores sugerem associação entre níveis elevados de homocisteína e marcadores de disfunção endotelial, fibrinólise e geração de trombina. Não está ainda definido, entretanto, se a redução da homocisteína pela suplementação vitamínica é capaz de modificar o nível desses marcadores.

Objetivos: Avaliar o efeito da suplementação vitamínica nos níveis de homocisteína e em parâmetros de ativação da coagulação, fibrinólise e função endotelial e avaliar a associação entre os níveis de homocisteína e os níveis de marcadores.

Métodos: Nesse estudo randomizado, duplo-cego, controlado com placebo, 105 pacientes foram randomizados para receber suplementação vitamínica com folato 5 mg, vitamina B12 0,4 mg e piridoxina 50 mg por 8 semanas. Foram incluídos pacientes com TEV objetivamente confirmado, com idade entre 18 e 70 anos.

Resultados: Foram avaliadas amostras basais de 104 pacientes e 99 (94,3%) completaram as 8 semanas de intervenção. Houve redução de 29% no nível de homocisteína dos pacientes tratados com suplementação vitamínica e elevação significativa de t-PA (ativador de plasminogênio tecidual) nesse mesmo grupo ($p=0,0008$). Não houve modificação nos demais parâmetros analisados (complexo trombina-antitrombina, fragmento 1+2 da protrombina, dímeros D, antígeno do fator de von Willebrand, fator VIII, fibrinogênio e inibidor do ativador de plasminogênio tipo-1 – PAI-1). Quando analisamos apenas pacientes com níveis de homocisteína acima do tercil superior ($12,6 \mu\text{mol/L}$), observou-se que houve elevação tanto de t-PA como de PAI-1 no grupo que recebeu suplementação vitamínica ($p=0,014$ e $p=0,0004$, respectivamente). Foi ainda observada correlação positiva entre os níveis basais de homocisteína e os níveis basais de t-PA ($r=0,2154$). Não houve correlação entre a homocisteína e os demais parâmetros e não houve diferença entre pacientes com homocisteína acima do tercil superior e aqueles com homocisteína abaixo do tercil inferior ($9,9 \mu\text{mol/L}$) em relação ao nível dos demais marcadores.

Conclusões: Em pacientes com TEV, a suplementação vitamínica causou elevação de t-PA e de PAI-1, ambos marcadores de lesão endotelial, em pacientes com níveis mais elevados de homocisteína. Não foi observado efeito da suplementação vitamínica sobre os demais marcadores de lesão endotelial, fibrinólise e geração de trombina.

Palavras chave: tromboembolismo venoso, homocisteína, suplementação vitamínica, função endotelial, fibrinólise, geração de trombina.

1. Introdução

1.1. Homocisteína e tromboembolismo venoso

Tromboembolismo venoso (TEV) é causa importante de morbidade e mortalidade na população, particularmente em indivíduos mais idosos ⁽¹⁾. A incidência de TEV está em torno de 1 a 3 por 1000 indivíduos por ano ^(2,3). As formas mais freqüentes de TEV são trombose venosa profunda (TVP) de membros inferiores e embolia pulmonar, podendo também ocorrer nos membros superiores, seios venosos cerebrais e órgãos intra-abdominais. As seqüelas podem ser graves e debilitantes como a síndrome pós-trombótica, que ocorre em até 20% dos casos. A mortalidade devido à embolia pulmonar pode variar de 1% nos jovens a 10% nos mais idosos ⁽³⁾.

A maioria dos casos de TEV é decorrente de anormalidades do sistema hemostático que podem ser hereditárias (fator V Leiden, mutação G20210A do gene da protrombina, deficiência dos inibidores naturais), adquiridas (imobilização prolongada, traumas, cirurgias, neoplasias, doenças inflamatórias, doenças do colágeno, síndrome antifosfolípide), ou mistas, como no caso da hiperhomocisteinemia ⁽⁴⁾. Frequentemente, o TEV é decorrente da associação de mais de uma dessas condições predisponentes.

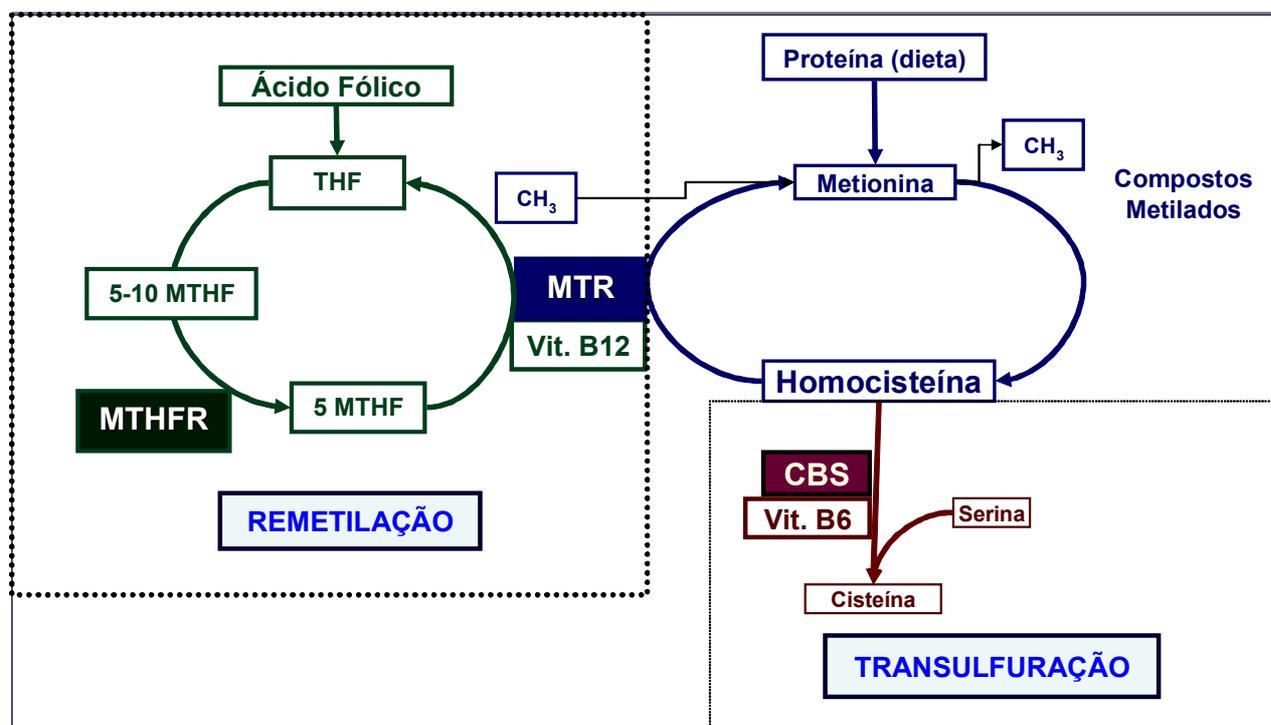
A homocisteína é um metabólito intermediário formado a partir da metionina, aminoácido essencial proveniente de proteínas de origem animal. O metabolismo intracelular da homocisteína envolve duas vias: a via de transulfuração que culmina na formação de cisteína, e a via de remetilação na qual a homocisteína originará novamente a metionina (figura 1). Na via de transulfuração, a metionina é convertida em S-adenosil-metionina, que irá doar seu grupo metil a compostos como RNA, DNA, precursores de melatonina, creatinina, epinefrina, entre outros. A S-adenosil-metionina é, desse modo, convertida em S-adenosil homocisteína, que ao perder a adenosina, origina a homocisteína. Parte da homocisteína reage com a serina para formar a cistationina, em uma reação catalisada pela enzima cistationina β -sintase (CBS) e seu cofator, o 5-piridoxal-fosfato (vitamina B6 - piridoxina). A cistationina é hidrolisada em cisteína através da ação da γ -cistationase, enzima também dependente da piridoxina. A homocisteína pode novamente originar a metionina através da remetilação, processo que é dependente de folato, vitamina B12 (cobalamina) e das enzimas metileno-tetrahydrofolato redutase (MTHFR) e metionina sintase (MTR) ^(5,6).

A maior parte da homocisteína (70 a 80%) encontra-se ligada covalentemente a proteínas plasmáticas (especialmente à albumina), enquanto que 20 a 30% encontra-

se na forma oxidada, representada principalmente pelo dissulfido cisteína-homocisteína. O termo homocisteína se refere à forma livre não-reduzida presente no plasma em baixas concentrações (<1%). Os ensaios para a determinação da homocisteína, como a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC – *high performance liquid chromatography*), detectam as três formas: ligada a proteínas, dissulfido e livre ⁽⁷⁾.

Figura 1: Metabolismo da homocisteína.

Na via da remetilação, a homocisteína pode novamente originar a metionina, processo que é dependente das enzimas metileno-tetrahydrofolato redutase (MTHFR) e metionina sintase (MTR), da vitamina B12 e do folato. Na via de transulfuração, parte da homocisteína reage com a serina para formar a cistationina, em reação catalisada pela enzima cistationina β-sintase (CBS) e seu cofator, a piridoxina.



THF: tetrahydrofolato; 5 MTHF: 5-metil-tetrahydrofolato; 5-10 MTHF: 5-10-metileno-tetrahydrofolato

Os fatores que determinam a concentração da homocisteína plasmática podem ser genéticos e ambientais. Três doenças autossômicas recessivas raras, conhecidas como homocistinúrias, estão associadas a níveis extremamente altos de homocisteína

(>100 $\mu\text{mol/L}$) por deficiência de uma das três principais enzimas envolvidas no metabolismo da homocisteína, mais frequentemente a CBS ⁽⁵⁾.

Posteriormente, foi descrito um polimorfismo no gene que codifica o domínio catalítico da enzima metileno-tetra-hidrofolatoredutase (MTHFR), no qual há substituição C \rightarrow T na posição 677 resultando na substituição de alanina por valina. Isso resulta em diminuição da capacidade de ligação ao folato e menor atividade da enzima (8). Cerca de 10 a 12% dos caucasianos no norte da Europa têm o genótipo 677TT e nesses indivíduos os níveis de homocisteína são cerca de 25% mais altos do que os indivíduos normais (677CC). Entretanto, essa diferença na concentração de homocisteína varia muito de acordo com as reservas de vitaminas do complexo B, sendo muito pequena em populações com alto consumo dessas vitaminas ⁽⁹⁻¹¹⁾.

Os outros fatores ambientais que interferem com o nível da homocisteína são alto consumo de metionina, tabagismo, consumo de café, uso de medicamentos (metotrexato, ciclosporina, anticonvulsivantes), sexo e idade. Além disso, a função renal e a função tiroideana são importantes determinantes do nível da homocisteína ⁽¹²⁾.

A primeira descrição da associação entre hiperhomocisteinemia e doenças vasculares foi feita por McCully em 1969 ⁽¹³⁾, através da análise de autópsia de indivíduos portadores de homocistinúria. Foram evidenciados sinais de aterosclerose e trombose arterial e pôde-se inferir que a hiperhomocisteinemia grave era a causa da doença vascular precoce nesses indivíduos jovens. Em 1976, Wilcken et al. ⁽¹⁴⁾ mostraram haver associação entre o nível de homocisteína após sobrecarga de metionina e a presença de doença arterial coronariana. Desde então, vários estudos demonstraram haver associação da hiperhomocisteinemia leve a moderada com doença arterial coronariana, cerebral e periférica ⁽¹⁵⁾.

No início dos anos noventa surgiram os primeiros trabalhos relacionando hiperhomocisteinemia leve e moderada com trombose venosa. Os dados iniciais foram obtidos de estudos do tipo caso-controle, retrospectivos e, desse modo não permitiam afirmar se a hiperhomocisteinemia havia causado o evento trombótico ou seria conseqüência do mesmo ⁽¹⁶⁻²¹⁾. Posteriormente, estudos prospectivos, nos quais a dosagem da homocisteína era realizada antes do desenvolvimento do evento trombótico, confirmaram que a hiperhomocisteinemia moderada era fator de risco independente para o desenvolvimento de TEV ^(10,22,23).

Existem poucos dados sobre essa associação na população brasileira. Em estudo caso-controle realizado por nosso grupo ⁽²⁴⁾, observou-se frequência bem maior de homocisteinemia acima do percentil 95 da população normal em pacientes com TEV (11/91 = 12,1%) do que em indivíduos normais (2/91 = 2,2%), o que resultou em razão de chances de 6,1, com intervalo de confiança a 95% (IC95%) de 1,3 a 28,4. Estes pacientes representam população altamente selecionada, tendo sido excluídos casos associados a qualquer outra causa adquirida de trombofilia.

Metanálise recente ⁽²⁵⁾ analisou 24 estudos retrospectivos (3289 casos) e três prospectivos (476 casos) para avaliar associação entre hiperhomocisteinemia e TEV, na tentativa de definir se a associação é causal. Foi observado que a elevação de 5 $\mu\text{mol/L}$ no nível da homocisteína está associada à elevação do risco de TEV em 27% (IC95% 1-59) nos estudos prospectivos e de 60% (IC95% 10-134) nos estudos retrospectivos. Assim como para os estudos em pacientes com doenças arteriais (doença coronariana e acidente vascular cerebral isquêmico), os resultados de trabalhos prospectivos provêm estimativas mais confiáveis de risco associado a diferenças nos níveis de homocisteína do que estudos retrospectivos. Por outro lado, as medidas de homocisteína nos estudos prospectivos muitas vezes são feitas em momentos distantes do evento vascular e podem não refletir o *status* de homocisteína de todo o período de observação. Possivelmente, o aumento de risco em 27% associado à elevação de 5 $\mu\text{mol/L}$ no nível de homocisteína esteja subestimado por essa razão.

Na mesma metanálise ⁽²⁵⁾, foram analisados 53 estudos (8364 casos) sobre a associação entre o genótipo 677TT da MTHFR e a ocorrência de TEV. O genótipo 677TT associou-se com aumento em 20% no risco (IC95% 8-32), quando comparado ao genótipo 677CC. Esse aumento de risco não foi visto nos estudos americanos, provavelmente devido ao alto consumo de folato e riboflavina nessa população.

De modo geral, portanto, existem evidências de uma modesta associação entre homocisteína e TEV. O risco associado ao genótipo 677TT na metanálise dos estudos não-americanos favorece a hipótese de que essa associação seja causal e não consequência do evento trombótico ⁽²⁵⁾.

1.2. Mecanismo da associação entre homocisteína e eventos vasculares

O mecanismo envolvido na associação entre a homocisteína plasmática e o risco de eventos trombóticos arteriais ou venosos ainda não está bem definido. Várias evidências sugerem que múltiplos mecanismos estão envolvidos^(5,26,27).

Estudos experimentais mostraram que a homocisteína causa estresse oxidativo, lesão endotelial e aumenta a trombogenicidade^(28,29). Na maioria dos trabalhos iniciais, entretanto, foram utilizadas culturas celulares e concentrações de homocisteína de até 1.000 $\mu\text{mol/L}$, ou seja, cerca de 5 vezes o nível médio de homocisteína dos homocistinúricos e cerca de 50 vezes dos indivíduos portadores de hiperhomocisteinemia moderada. Desse modo, deve-se ter cautela ao extrapolar esses resultados para o contexto clínico.

Outros modelos experimentais com concentrações mais semelhantes aos homocistinúricos demonstraram: aumento da atividade de fator tecidual nos macrófagos da parede vascular⁽³⁰⁾, redução da expressão endotelial de trombospondina solúvel com conseqüente diminuição da atividade da proteína C^(31,32), redução da resposta endotelial a vasodilatadores dependentes de endotélio⁽³³⁾, aumento da geração de radicais livres e diminuição da disponibilidade de óxido nítrico no endotélio⁽³⁴⁾.

Existem vários métodos para se avaliar a função endotelial. A forma mais simples, e por isso mais utilizada, é a dosagem de produtos do endotélio como fibronectina, endotelina, ativador de plasminogênio tecidual (t-PA - *tissue-type plasminogen activator*), inibidor do ativador de plasminogênio tipo-1 (PAI-1 - *plasminogen activator inhibitor-1*) e fator de von Willebrand (FVW). A forma mais direta de avaliar o endotélio é a medida do relaxamento vascular em resposta a estímulos dependentes de endotélio, seja por métodos invasivos como a angiografia coronariana, ou por métodos menos invasivos como a vasodilatação mediada por fluxo (FMD - *flow mediated vasodilation*)^(35,36).

Dados atuais sugerem que a hiperhomocisteinemia causa disfunção endotelial e interfere com a fibrinólise, especialmente através da modificação da ligação ao t-PA. Foi demonstrado que a homocisteína modifica a anexina II, bloqueia a ligação ao t-PA e inibe a ativação do plasminogênio nas células endoteliais⁽³⁷⁾. Além disso, níveis de homocisteína acima de 8 $\mu\text{mol/L}$ podem aumentar a ligação da lipoproteína A à fibrina e reduzir o potencial fibrinolítico⁽³⁸⁾. Sauls et al.⁽³⁹⁾ observaram ainda que o tempo de

lise de coágulos formados a partir de fibrinogênio purificado de pacientes hiperhomocisteinêmicos era significativamente maior do que de indivíduos normais. Outro mecanismo que tem sido estudado é o aumento da ativação da coagulação em indivíduos hiperhomocisteinêmicos. Níveis aumentados de complexos trombina-antitrombina (TAT), fragmento 1+2 da protrombina (F1+2) e fibrinopeptídeo A (FPA) são indicadores do aumento de geração de trombina. Alguns estudos observacionais demonstraram associação entre os níveis de homocisteína plasmática e de F1+2^(40,41) e TAT⁽⁴²⁾. Também foi demonstrada a elevação de F1+2 e dímeros D (DD) após sobrecarga de metionina em voluntários normais⁽⁴³⁾. Estudo mais recente, entretanto, não confirmou esse achado⁽⁴⁴⁾.

1.3. Efeito da suplementação sobre os níveis de homocisteína

Dados do estudo populacional de Framingham demonstraram que o nível de homocisteína em indivíduos normais reduziu-se significativamente após o ano de 1997, quando houve enriquecimento dos alimentos com folato⁽⁴⁵⁾. Ainda em indivíduos normais, observou-se redução da homocisteína em mulheres que receberam folato por 4 semanas, e que este efeito persistia mesmo após 8 semanas da interrupção da suplementação⁽⁴⁶⁾.

Vários estudos posteriores demonstraram que a suplementação vitamínica é capaz de reduzir os níveis plasmáticos de homocisteína. Metanálise recentemente publicada⁽⁴⁷⁾ mostrou que a redução média da homocisteína com a suplementação diária de 5 mg de folato é de cerca de 25%. A adição da vitamina B12 na dose média de 0,4 mg por dia causa redução adicional de cerca de 7%. Nesse mesmo trabalho, foi ainda confirmado que doses acima de 0,8 mg/d de folato parecem ter o mesmo efeito que doses mais altas (5 mg/d) e que a piridoxina não parece ter efeito aditivo na redução da hiperhomocisteinemia leve a moderada. Outros estudos demonstraram benefício adicional da piridoxina nos hiperhomocisteinêmicos graves e na redução da homocisteína após sobrecarga de metionina^(47,48).

Há, entretanto, poucos estudos que avaliaram o benefício clínico da suplementação vitamínica. No estudo VISP⁽⁴⁹⁾, com 3680 adultos com acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi), não houve benefício na redução de recorrência de AVCi, com o uso de suplementação em doses altas (folato - 2,5 mg, vitamina B12 - 0,4 mg e piridoxina -

25 mg ; n = 1827) ou em baixas doses (folato - 20 µg, vitamina B12 - 200 µg e piridoxina - 6 µg; n = 1853), após 2 anos de intervenção.

No estudo NORVITT⁽⁵⁰⁾, recentemente publicado, foi avaliado o efeito da suplementação vitamínica na prevenção secundária de pacientes com infarto do miocárdio prévio. Foram avaliados 3749 pacientes com episódio de infarto até no máximo 7 dias antes da randomização. Os pacientes foram randomizados para receber 3 esquemas diferentes de suplementação diária (folato - 0,8 mg, vitamina B12 - 0,4 mg e piridoxina - 40 mg; folato - 0,8 mg e vitamina B12 - 0,4 mg; apenas piridoxina - 40 mg) ou placebo. Nos grupos que receberam folato e vitamina B12 houve redução da homocisteína em cerca de 27%. Entretanto, não houve efeito na redução de recorrência de infarto, AVCi ou morte súbita de causa coronariana, com risco relativo (RR) de 1,08 (IC95% 0,93-1,25). No grupo que recebeu apenas piridoxina, não houve redução da homocisteína plasmática e tampouco houve modificação do risco (RR = 1,14; IC95% 0,98-1,32). No grupo que recebeu as 3 vitaminas, houve inclusive tendência a aumento de risco do conjunto desses eventos (RR = 1,22; IC95% 1,00-1,50).

O estudo HOPE-2⁽⁵¹⁾, publicado simultaneamente ao estudo NORVITT, confirmou os mesmos achados. Para avaliar redução do risco de eventos cardiovasculares, 5522 pacientes com 55 anos ou mais, portadores de doenças vasculares ou diabetes, receberam suplementação vitamínica em altas doses (folato - 2,5 mg, vitamina B12 - 1,0 mg e piridoxina - 50 mg) ou placebo, de modo duplo-cego e randomizado, por 5 anos em média. Não houve benefício da suplementação vitamínica em relação à ocorrência de eventos, ao risco de morte de causas cardiovasculares e ao risco de infarto do miocárdio. Houve redução discreta do risco de AVCi (RR = 0,75; IC95% 0,59-0,97) e, surpreendentemente, aumento do risco de angina instável (RR = 1,24; IC95% 1,04-1,49). O aparente benefício da suplementação sobre o risco de AVCi deve ser interpretado com cautela, já que o número de eventos (111 no grupo tratado com vitaminas e 147 no grupo tratado com placebo) é pequeno demais para avaliar esse risco. Pôde-se concluir, portanto, que a suplementação vitamínica não reduz o risco de eventos cardiovasculares graves em pacientes portadores de doenças vasculares.

Outros trabalhos de redução de homocisteína e de risco de doenças cardiovasculares estão em andamento e uma metanálise que envolverá 12 estudos e 52.000 participantes provavelmente terá poder estatístico para definir se há redução de risco⁽⁵²⁾.

O fato de pacientes homocistinúricos apresentarem redução significativa dos eventos trombóticos com a suplementação vitamínica é evidência suficiente que, ao menos para pacientes com hiperhomocisteinemia grave, a redução da homocisteína reduz o risco da ocorrência de eventos vasculares ⁽⁵³⁾.

Há poucos dados sobre o efeito da suplementação vitamínica no risco de TEV. No estudo HOPE-2 ⁽⁵¹⁾, houve apenas 37 (1,3% dos pacientes) eventos de TEV no grupo tratado com suplementação e 40 (1,4%) no grupo que recebeu placebo (RR = 0,96; IC95% 0,61-1,50). Como o número de eventos foi muito pequeno, não foi possível avaliar se a suplementação modifica o risco de TEV com esse estudo.

Há apenas um estudo, apresentado no XX Congresso da Sociedade Internacional de Hemostasia e Trombose (ISTH) em 2005 ⁽⁵⁴⁾, que avaliou o efeito da suplementação vitamínica na prevenção de recorrência em pacientes com TEV. Dos 701 pacientes randomizados, 353 pacientes (sendo 177 hiperhomocisteinêmicos) receberam suplementação vitamínica (folato - 5 mg, vitamina B12 - 0,4 mg e piridoxina - 50 mg) e 348 (183 hiperhomocisteinêmicos) receberam placebo. Após observação média de 30 meses, houve 43 recorrências nos 353 que receberam vitaminas (54/1000 por ano) e 50 nos 348 que receberam placebo (64/1000 por ano). O RR de recorrência foi de 0,84 (IC95% 0,56-1,26), sendo de 1,14 (IC95% 0,65-1,98) nos pacientes hiperhomocisteinêmicos e 0,58 (IC95% 0,31-1,07) nos normohomocisteinêmicos. Desse modo, apesar de não ter reduzido o risco de recorrência no total de pacientes, houve tendência a redução de risco apenas nos indivíduos com homocisteína normal. Entretanto, o número de pacientes e o tempo de observação desse estudo ainda não permitem concluir de modo seguro sobre o efeito da suplementação nessa população de pacientes.

Dessa forma, não há, até o momento, dados consistentes na literatura quanto ao impacto da redução da homocisteína com suplementação vitamínica na prevenção primária ou secundária do TEV.

1.4. Efeito da suplementação vitamínica sobre marcadores laboratoriais

Até o momento, existem poucos dados em relação ao efeito da redução do nível de homocisteína em marcadores de geração de trombina, fibrinólise e ativação endotelial. Estudos iniciais de intervenção mostraram resultados controversos. Em estudo com portadores de aterosclerose sintomática ⁽⁴²⁾, houve redução da homocisteína e de marcadores de geração de trombina com suplementação vitamínica, enquanto que em voluntários normais ⁽⁵⁵⁾ não foi observado efeito da fortificação dietética e da suplementação de folato em doses baixas sobre marcadores endoteliais.

Alguns estudos randomizados controlados com placebo que avaliaram o efeito da suplementação sobre marcadores hemostáticos foram então realizados em diferentes populações de pacientes ⁽⁵⁶⁻⁶⁰⁾. Na maioria deles não houve efeito ou houve apenas discretas variações nos marcadores avaliados. Em nenhum desses trabalhos randomizados, entretanto, foram avaliados pacientes com TEV.

Dessa forma, no presente estudo, foi avaliado o efeito da suplementação vitamínica com folato, vitamina B12 e piridoxina por 8 semanas, sobre alguns marcadores de geração de trombina, fibrinólise e função endotelial, em pacientes com TEV.

2. Objetivos

1. Avaliar o efeito da suplementação vitamínica, administrada por oito semanas, nos níveis de homocisteína e dos parâmetros de ativação da coagulação, fibrinólise e função endotelial, comparando com placebo.
2. Comparar os níveis de marcadores de ativação da coagulação, fibrinólise e função endotelial em pacientes com níveis mais elevados de homocisteína com aqueles com níveis mais baixos de homocisteína.
3. Avaliar se há correlação entre o nível basal de homocisteína e o nível basal dos marcadores de ativação da coagulação, fibrinólise e função endotelial.
4. Avaliar o efeito da suplementação vitamínica nos parâmetros de ativação da coagulação, fibrinólise e função endotelial nos pacientes com níveis mais elevados de homocisteína.

3. Material e métodos

3.1. Casuística

Foram estudados 105 pacientes com TEV. Desses, 98 acompanhados na Disciplina de Hematologia e Hemoterapia do Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), 4 na Disciplina de Hematologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (FMRP/USP) e 3 na Disciplina de Cirurgia Vascular do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP (FMB/UNESP), seguindo-se os mesmos critérios de inclusão e de exclusão estabelecidos, após cuidadosa avaliação clínica de cada paciente. Foram recrutados pacientes que tiveram diagnóstico de TEV durante o período de setembro de 2000 a agosto de 2004.

Foram incluídos pacientes de qualquer sexo, com idade entre 18 e 70 anos, com primeiro episódio de TEV confirmado através dos seguintes métodos objetivos: ultrassonografia com *doppler* ou flebografia para TVP de membros, arteriografia pulmonar, tomografia computadorizada ou cintilografia pulmonar com mapeamento de ventilação-perfusão para tromboembolismo pulmonar e ressonância magnética, angiorressonância ou angiografia para trombose venosa cerebral. Os pacientes deveriam ter sido tratados por pelo menos três meses com terapêutica anticoagulante e estarem com anticoagulação suspensa há pelo menos 1 mês do início do estudo e por não mais de 36 meses.

Foram excluídos pacientes portadores de neoplasias, doenças do colágeno, síndrome antifosfolípide, doença de Behçet, hemoglobinúria paroxística noturna, doenças renais e outras doenças auto-imunes e pacientes que não fossem capazes de entender o termo de consentimento livre e esclarecido.

Em todos os pacientes foi realizada avaliação laboratorial da função renal e tiroideana. Foram aferidos peso e altura de todos os pacientes na primeira consulta.

O trabalho foi aprovado pelos Comitês de Ética das Universidades participantes (Anexo 1). Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

3.2. Desenho do estudo

A suplementação vitamínica consistia em cápsulas contendo folato 5 mg, vitamina B12 0,4 mg e piridoxina 50 mg. O placebo consistia em cápsulas contendo 100 mg de lactose. As cápsulas com vitaminas e placebo eram visualmente idênticas e foram acondicionados em embalagens iguais, numeradas consecutivamente. Todas as cápsulas, tanto de vitaminas como de placebo, foram produzidas pelo Laboratório da Farmácia de Manipulação Biofórmula (São Paulo - SP), sob a supervisão do farmacêutico responsável.

Os pacientes incluídos foram randomizados para receber suplementação vitamínica ou placebo, através de sistema de números consecutivos. Apenas um observador, que não participou diretamente de nenhuma etapa do estudo, conhecia a identificação dos números em placebo ou vitaminas.

O primeiro frasco era entregue no momento da randomização e o segundo na primeira avaliação após 4 semanas. Cada frasco continha 30 cápsulas. Após 4 semanas e 8 semanas de suplementação, os pacientes eram reavaliados e era contado o número de cápsulas remanescentes dos frascos para determinar a aderência ao tratamento.

3.3 Coleta de sangue e análises

As determinações dos parâmetros hemostáticos (F1+2, TAT, DD, antígeno do FVW - FVWAg, fator VIII, fibrinogênio, t-PA, PAI-1, antitrombina, proteínas C e S) foram realizadas no Laboratório de Hemostasia e Trombose da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UNIFESP. A avaliação molecular (Fator V Leiden e mutação G20210A do gene da protrombina) foi realizada no laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UNIFESP. As dosagens de homocisteína, folato, vitamina B12 e piridoxina foram realizadas no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da UNIFESP, sob coordenação da Profa. Dra. Vânia D'Almeida.

Foram colhidas amostras de sangue em dois momentos: antes e após 8 semanas de tratamento com vitamina ou placebo.

As amostras eram colhidas entre 8 e 10 horas da manhã, após jejum mínimo de 12 horas, através de punção venosa periférica com o mínimo de estase, utilizando-se

scalp 19 ou 21 e seringas plásticas. O material para todos os parâmetros era colhido na mesma punção venosa, sendo que o segundo tubo era usado para os testes de hemostasia. O volume total coletado era de 20 ml.

- Dosagem de homocisteína e vitaminas

Para dosagem de homocisteína, as amostras eram colhidas em tubos contendo EDTA e, no máximo 30 minutos após a coleta, centrifugadas a 3.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O plasma era separado logo após a centrifugação.

Para a dosagem de folato, vitamina B12 e piridoxina, as amostras eram colhidas em tubo seco sem gel separador e centrifugadas a 3.000 rpm por 20 minutos em temperatura ambiente. O soro era separado logo após a centrifugação.

- Parâmetros hemostáticos

Para os testes da hemostasia, as amostras eram colhidas em tubos contendo citrato de sódio 100 mM, na proporção de uma parte de anticoagulante em nove partes de sangue total. O sangue era rapidamente centrifugado em temperatura ambiente a 3.000 rpm por 20 minutos, separando-se o plasma pobre em plaquetas (PPP).

Todas as amostras de soro ou plasma eram congeladas a -80°C para ensaio posterior.

- Métodos de dosagens

A dosagem dos níveis de homocisteína plasmática foi baseada no método de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com detecção fluorimétrica e eluição isocrática. O equipamento usado foi da marca Shimadzu (Tóquio, Japão), composto por injetor automático de amostras SIL-10Advp, detector de fluorescência RF-10AXL, coluna analítica da marca Phenomenex C18, modelo Prodigy ODS2 (150mm x 3,2mm e micropartículas de 5,0µm) e pré-coluna C18 modelo Alltech ODS (30mm x 3,2mm e micropartículas de 5,0µm).

A dosagem das vitaminas B6 e folato foi baseada no método de Sharma & Dakshinamurti (1992) para aplicação em HPLC com detecção ultravioleta (UV) e

eluição isocrática. Foram utilizados padrão de piridoxina (Piridoxal-5-fosfato - Sigma) e padrão de folato (Sigma), ambos com concentração de 1 mg/dL. As amostras foram submetidas ao processo de extração com ácido metafosfórico (Merck) 10%, na proporção de 3:1 (300 µL de ácido metafosfórico 10% e 100 µL de soro), agitadas por 30 segundos e depois centrifugadas em 10.000 rpm por 20 minutos. Todas as etapas da extração foram realizadas em microtubo escuro para minimizar a degradação das vitaminas, que são fotossensíveis. Foi utilizado o mesmo equipamento de HPLC (Shimadzu), injetor automático de amostras SIL-10Advp, detector de UV SPD-10Avp, coluna analítica da marca Phenomenex modelo Bondclone C18 (300 x 3,9mm e micropartículas de 10 µm) e pré-coluna C18 modelo Alltech ODS (30mm x 3,2mm e micropartículas de 5,0 µm).

A vitamina B12 foi dosada por técnica de quimioluminescência automatizada, utilizando-se kit comercial (AutoDELFIA® B12, Perkin Elmer, Boston-MA, EUA).

Foram utilizados kits comercialmente disponíveis de imunoenensaio (ELISA) para a dosagem de: fragmento 1+2 da protrombina (Enzyngnost® F1+2 micro, Dade-Behring, Marburg, Alemanha), complexo trombina-antitrombina (Enzyngnost® TAT micro, Dade-Behring, Marburg, Alemanha), dímeros D (VIDAS D-Dimer, BioMerieux, Marcy L'Étoile, França), ativador do plasminogênio tecidual (IMUBIND® tPA, American Diagnostica, Stamford-CT, EUA) e inibidor do ativador do plasminogênio 1 (IMUBIND® Plasma PAI-1, American Diagnostica, Stamford-CT, EUA) e antígeno do fator de von Willebrand (Asserachrom® FVW:Ag, Diagnostica Stago, Ansières, França).

A dosagem de fibrinogênio foi realizada pelo método de Clauss utilizando-se trombina bovina da marca Sigma e a atividade do fator VIII foi determinada por método coagulométrico, usando-se plasma deficiente em fator VIII (STA Deficient VIII, Diagnostica Stago, Ansières, França).

Para todos os parâmetros, as determinações das concentrações antes e após o tratamento foram realizadas no mesmo ensaio, utilizando as mesmas curvas, os mesmos lotes de reagentes e as mesmas placas, no caso de imunoenaios.

Os valores de referência fornecidos pelo fabricante para cada parâmetro estão apresentados no anexo 4.

Foram ainda avaliadas as principais causas conhecidas de trombofilia hereditária.

As dosagens de antitrombina e proteína C foram realizadas por método funcional cromogênico (Berichrom® Antithrombin e Berichrom® Protein C, Dade-Behring,

Marburg, Alemanha). A determinação da proteína S livre foi feita por imunoensaio (Asserachrom® Free Protein S, Diagnostica Stago, Ansières, França).

Para o estudo do fator V Leiden e da mutação G20210A do gene da protrombina foi feita extração de DNA do sangue total. A análise foi realizada simultaneamente pela técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) *multiplex*, utilizando-se as enzimas de restrição *MnII* para o fator V Leiden e *HindIII* para a mutação G20210A do gene da protrombina, conforme previamente descrito ⁽⁶¹⁾.

3.4. Análise estatística

Os dados demográficos e as características clínicas nos 2 grupos foram comparados utilizando teste t de Student ou teste de Mann-Whitney para variáveis contínuas. O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar dados categóricos. As diferenças da homocisteína, das vitaminas e dos marcadores antes e após o tratamento foram avaliadas pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon e as diferenças entre os grupos para cada variável pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Foi considerado significativo $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Seleção da população estudada

- Pacientes da UNIFESP:

No período de 09/2000 a 08/2004 foram encaminhados ao Setor de Hemostasia e Trombose da Disciplina de Hematologia da UNIFESP 403 pacientes com diagnóstico de TEV confirmado por método objetivo.

Desses, 25 (6,2%) perderam seguimento e não puderam ser avaliados. Foram excluídos 280 pacientes (69,5%) pela presença dos seguintes critérios de exclusão: 80 pacientes (19,9%) pela presença de neoplasias, 46 (11,4%) pela presença de colagenoses, 41 (10,2%) por idade abaixo de 18 ou acima de 70 anos, 41 (10,2%) em anticoagulação oral perene, 30 (7,4%) por TEV de repetição em anticoagulação oral, 10 (2,5%) por insuficiência renal, 7 (1,7%) pela recusa em participar e 25 (6,2%) por outras causas, como óbito, tiroidopatia, hepatopatias crônicas, doenças arteriais sintomáticas e incapacidade de compreensão do termo de consentimento (figuras 2 e 3).

Foram então incluídos 98 pacientes (24,3% dos casos) da UNIFESP.

Figura 2: Distribuição dos pacientes após seleção para participação no estudo

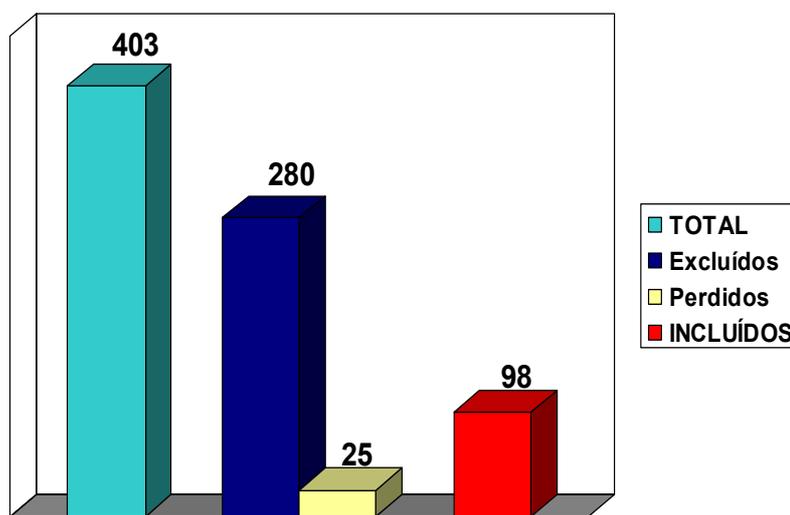
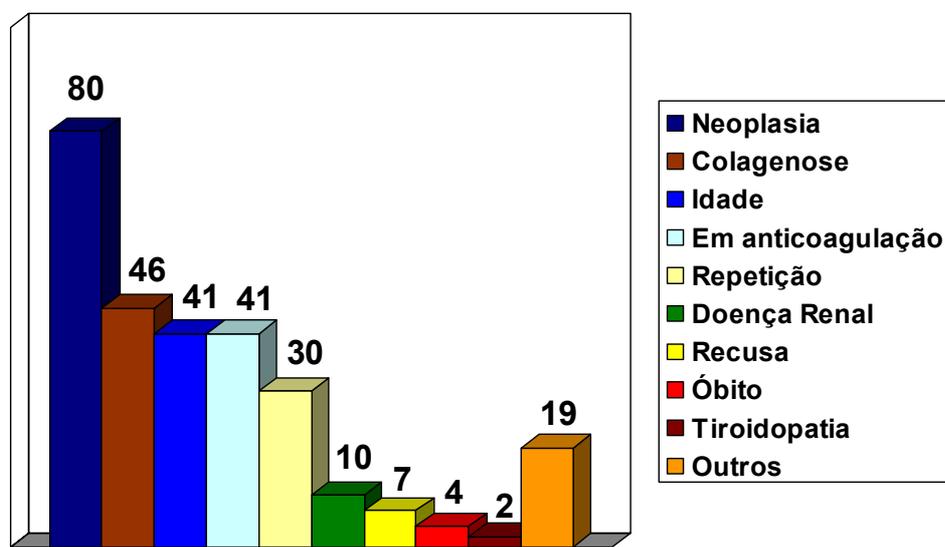


Figura 3: Distribuição dos pacientes de acordo com o motivo da exclusão do protocolo



- Pacientes das outras instituições

Adicionalmente aos nossos pacientes, foram ainda incluídos 4 pacientes da Disciplina de Hematologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (FMRP-USP) e 3 pacientes da Disciplina de Cirurgia Vascular do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP (FMB-UNESP), que obedeceram aos mesmos critérios de seleção.

Dessa forma, entre 11/05/04 e 25/02/05, foram randomizados 105 pacientes para participar do estudo.

Desses 105 pacientes, 5 não completaram as 8 semanas da medicação: 2 por recidiva do TEV, 2 por desistência e uma paciente que engravidou durante o período de tratamento. Foram então analisados 105 pacientes com amostras basais e 100 pacientes com amostras antes e após a intervenção. Desses 100 pacientes, 50 receberam placebo e 50 receberam suplementação vitamínica.

A tabela 1 resume as características demográficas e clínicas dos pacientes analisados. Não houve diferença entre os dois grupos em relação às características demográficas e clínicas basais.

Dos 100 pacientes que completaram o período de intervenção, 98 relatavam uso regular e a contagem de cápsulas confirmou a aderência adequada ao tratamento. Os dois pacientes que não fizeram uso adequado da suplementação receberam placebo e, por esse motivo, não foi necessário excluí-los da análise.

Até o término desse estudo, dos 98 pacientes incluídos do nosso serviço, 97 (99%) mantinham-se em acompanhamento ambulatorial. Além dos dois casos que foram excluídos por recorrência de TEV durante o período de intervenção, mais dois pacientes apresentaram recorrência de TVP após o término do estudo. Nenhum outro paciente apresentou recorrência até abril de 2006, sendo que a mediana do tempo de observação após o término do estudo foi de 21 meses, variando de 14 a 23 meses.

Tabela 1: Características clínicas dos 100 pacientes analisados, divididos em relação ao tratamento recebido

	TOTAL	PLACEBO	VITAMINAS	p
N	100	50	49	
Homens / Mulheres	27/73	16/34	11/39	0,40
Idade (anos)*	37	40,4 ± 13,1	37,2 ± 13,1	0,22
IMC (Kg/m ²)*	25,5	27,0 ± 4,9	25,7 ± 5,2	0,21
Sobrepeso / obesidade (%)	57	66	49	0,13
Tabagismo (%)	16	18	14	0,82
Diabetes (%)	4	6	2	0,62
Hipertensão arterial sistêmica (%)	16	14	18	0,75
Tempo de anticoagulação (meses)**	7	7 (3-15)	7 (4-23)	0,20
Tempo desde o TEV (meses)**	19,5	19,5 (6-43)	19,5 (7-45)	0,77
TEV Espontâneo (%)	52	48	56	0,48
Embolia pulmonar (%)	15	14	16	0,97
Trombose venosa cerebral (%)	11	12	10	0,78
Exposição a hormônio (%)	41	36	46	0,37

IMC: índice de massa corporal; TEV: tromboembolismo venoso

* resultados expressos em média ± desvio padrão.

** resultados expressos em medianas e variação (mínimo-máximo).

4.2. Pesquisa de trombofilia hereditária

Foi encontrado apenas 1 caso de deficiência de proteína S e nenhum caso de deficiência de proteína C ou de deficiência de antitrombina, nos 105 pacientes analisados.

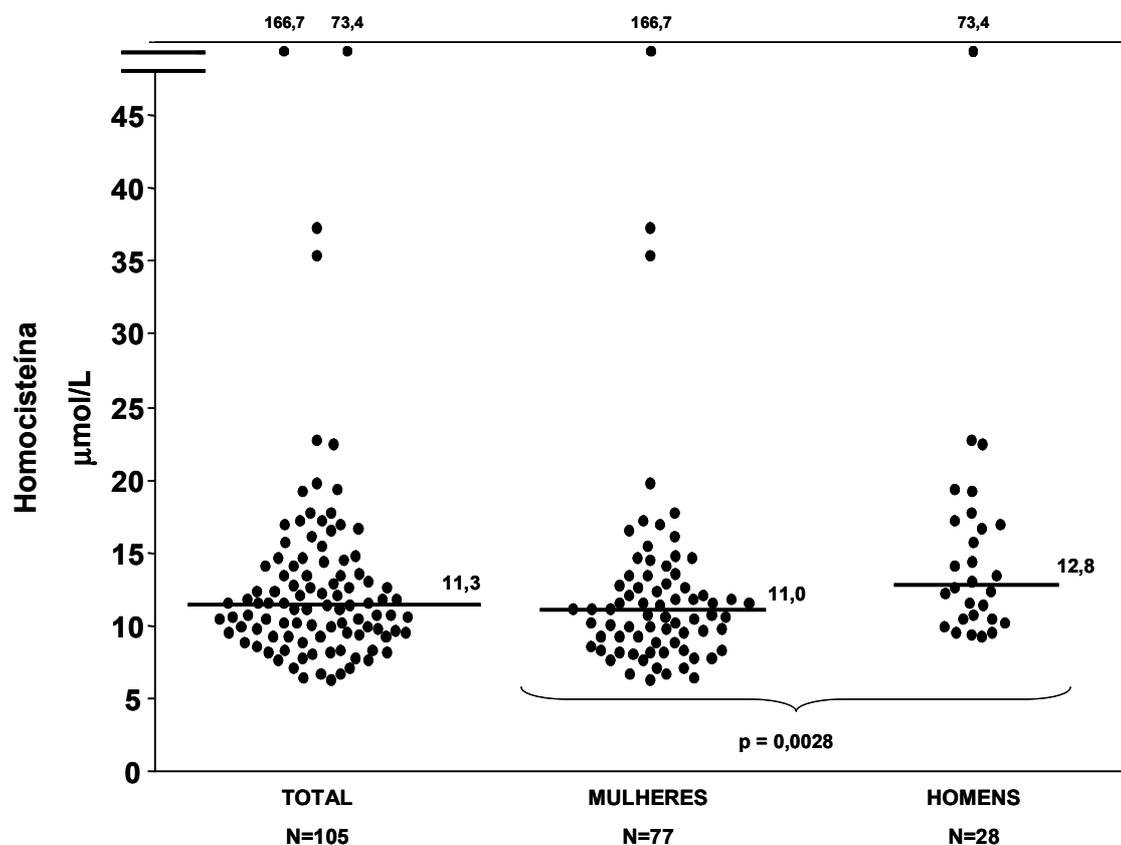
Dos 96 pacientes nos quais foi realizada a pesquisa do fator V Leiden e da mutação G20210A do gene da protrombina, foram encontrados 7 casos (7,3%) de fator V Leiden e 9 casos (9,4%) da mutação G20210A do gene da protrombina, todos em estado heterozigoto. Uma paciente do sexo feminino apresentava heterozigose para as duas mutações (fator V Leiden e mutação G20210A da protrombina).

4.3. Dosagens da homocisteína plasmática e das vitaminas

- Níveis de homocisteína basal

A mediana da homocisteína basal em jejum para os 105 pacientes foi de 11,3 $\mu\text{mol/L}$, sendo mais baixa nas mulheres (11,0 $\mu\text{mol/L}$) do que nos homens (12,8 $\mu\text{mol/L}$), $p=0,0042$ (teste de Mann-Whitney), como demonstrado na figura 4.

Figura 4: Distribuição dos valores basais de homocisteína dos 105 pacientes analisados, separando-os conforme o sexo



Estão representados os valores de cada indivíduo.

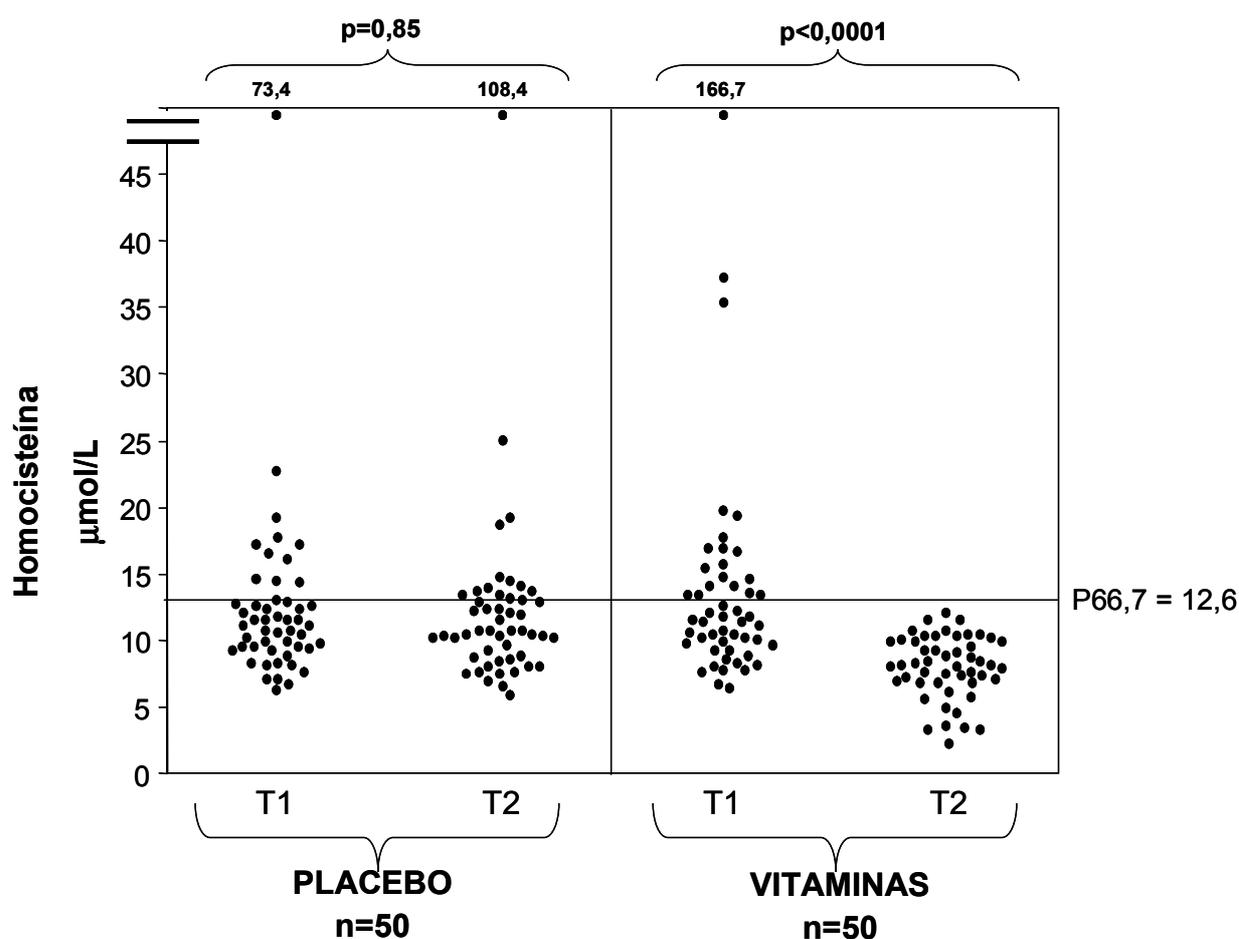
As barras horizontais representam as medianas.

Valor de p calculado pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

- Valores de homocisteína antes e após tratamento com vitaminas ou placebo

Os resultados individuais de homocisteína de todos os pacientes analisados estão apresentados na figura 5.

Figura 5: Valores de homocisteína antes (T1) e após (T2) a intervenção com vitaminas ou placebo, nos 100 pacientes analisados



Estão representados os valores de homocisteína de cada indivíduo.

A linha horizontal representa o tercil superior (p66,7) dos valores de homocisteína basal dos 100 pacientes analisados.

Valores de p calculados pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon.

Pode-se observar no gráfico, que com a suplementação vitamínica, nenhum paciente manteve-se com homocisteína acima do tercil superior (12,6 µmol/L). Uma paciente do sexo feminino apresentou redução da homocisteína de 166,7 para 9,5 µmol/L com as 8 semanas de suplementação. Houve ainda dois casos de pacientes com homocisteína

basal acima de 30 $\mu\text{mol/L}$ que também apresentaram redução significativa com a suplementação vitamínica (tabela 2).

Tabela 2: Valores de homocisteína antes (tempo 1) e após (tempo 2) suplementação vitamínica das 3 pacientes com hiperhomocisteinemia acima de 30 $\mu\text{mol/L}$

Iniciais	Idade (anos)	Sexo	Homocisteína tempo 1 ($\mu\text{mol/L}$)	Homocisteína tempo 2 ($\mu\text{mol/L}$)
AMAL	34	F	166,7	9,5
LLR	22	F	37,2	7,8
FMS	18	F	35,3	8,0

No grupo de pacientes tratados com suplementação vitamínica, houve redução significativa da mediana de homocisteína plasmática de 10,7 para 8,1 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,0001$, teste de Wilcoxon) e concomitante elevação da mediana dos níveis de folato de 8,7 para 17,6 nmol/L ($p < 0,0001$, teste de Wilcoxon) e de vitamina B12 de 279 para 428 pmol/L ($p < 0,0001$, teste de Wilcoxon). O mesmo não foi observado para a piridoxina, que se manteve inalterada (de 22,0 para 21,8 nmol/L , $p = 0,36$, teste de Wilcoxon) (tabela 3).

No grupo que recebeu placebo, não houve modificação dos níveis de homocisteína, folato, vitamina B12 ou piridoxina.

As variações entre os valores basais de homocisteína (tempo 1), folato, vitamina B12 e piridoxina e os valores após o tratamento (tempo 2) foram calculadas como razão tempo 2/tempo 1 ($T2/T1$). Observou-se que houve redução de 29% na concentração de homocisteína e elevação de 97% na concentração de folato e de 55% na concentração da vitamina B12 com a suplementação vitamínica por 8 semanas. Observou-se apenas discreta elevação de 3% no valor da piridoxina, evidenciando não ter havido modificação significativa dessa vitamina com a suplementação. Nos pacientes que receberam placebo, não houve variação superior a 1% em nenhum dos parâmetros avaliados.

Os resultados das medianas e variações interquartis das concentrações de homocisteína e das vitaminas, antes e após a intervenção para cada parâmetro, estão apresentados na tabela 3.

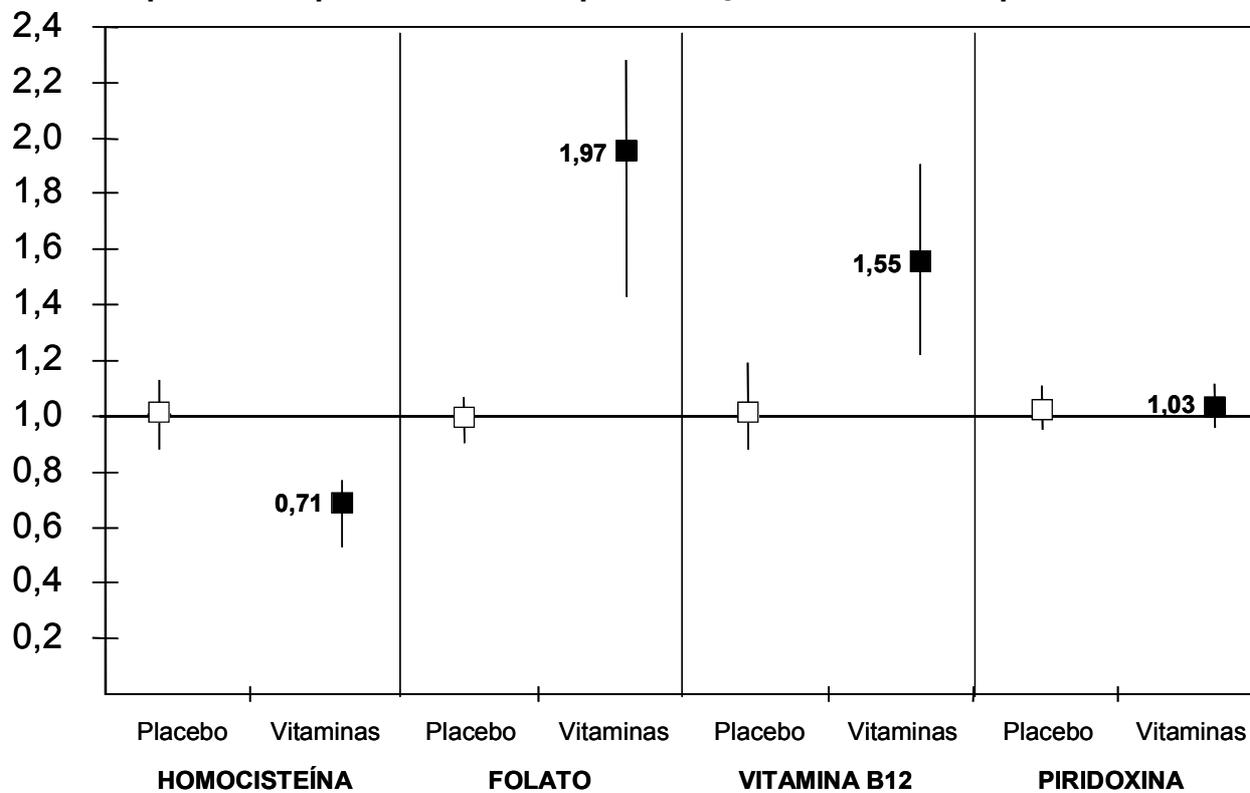
Tabela 3: Valores de homocisteína, folato, vitamina B12 e piridoxina: basal, após o tratamento e a razão entre os dois tempos (T2/T1), nos pacientes que receberam suplementação vitamínica ou placebo

	N	Basal	Após tratamento	Razão T2/T1	p
HOMOCISTEÍNA (μmol/L)					
PLACEBO	50	11,1 (9,3-12,8)	11,4 (9,6-14,4)	1,00 (0,88-1,13)	0,85
VITAMINAS	49	10,7 (8,7-13,1)	8,1 (6,8-9,9)	0,71 (0,53-0,77)	<0,0001
FOLATO (nmol/L)					
PLACEBO	50	8,9 (7,6-9,7)	8,8 (7,3-10,0)	0,99 (0,90-1,07)	0,44
VITAMINAS	49	8,7 (7,8-9,6)	17,6 (14,0-18,8)	1,97 (1,43-2,28)	<0,0001
VITAMINA B12 (pmol/L)					
PLACEBO	50	269 (212-336)	286 (226-370)	1,01 (0,88-1,19)	0,62
VITAMINAS	49	279 (207-343)	428 (358-511)	1,55 (1,22-1,91)	<0,0001
PIRIDOXINA (nmol/L)					
PLACEBO	50	22,5 (18,8-28,6)	24,3 (19,1-27,4)	1,01 (0,95-1,11)	0,23
VITAMINAS	49	22,0 (18,4-26,8)	21,8 (19,4-27,0)	1,03 (0,93-1,12)	0,36

Resultados expressos em medianas e variações interquartis (percentil 25% a percentil 75%). Valores de p calculados pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon.

As medianas e variações interquartis das razões T2/T1 estão apresentadas na figura 6.

Figura 6: Razão T2/T1 dos valores de homocisteína, folato, piridoxina e vitamina B12 nos pacientes que receberam suplementação vitamínica ou placebo



Estão representadas as medianas e variações interquartis.

4.4. Efeito da suplementação na concentração de DD, F1+2, TAT, FVWAg, fibrinogênio e do fator VIII

Apesar da significativa redução dos níveis de homocisteína, não houve modificação na concentração de DD, F1+2, TAT, FVWAg, fibrinogênio e fator VIII, nos pacientes que receberam suplementação vitamínica por 8 semanas (tabela 4).

Surpreendentemente, houve redução significativa de fibrinogênio e do fator VIII no grupo de pacientes que receberam placebo ($p=0,005$ e $p=0,04$, respectivamente, teste de Wilcoxon). Para os demais parâmetros (DD, F1+2, TAT, FVWAg), não houve modificação no grupo de pacientes que receberam placebo. Houve redução da mediana de TAT de 4,8 $\mu\text{g/L}$ para 3,4 $\mu\text{g/L}$ no grupo que recebeu placebo, porém essa redução não foi significativa ($p=0,12$, teste de Wilcoxon).

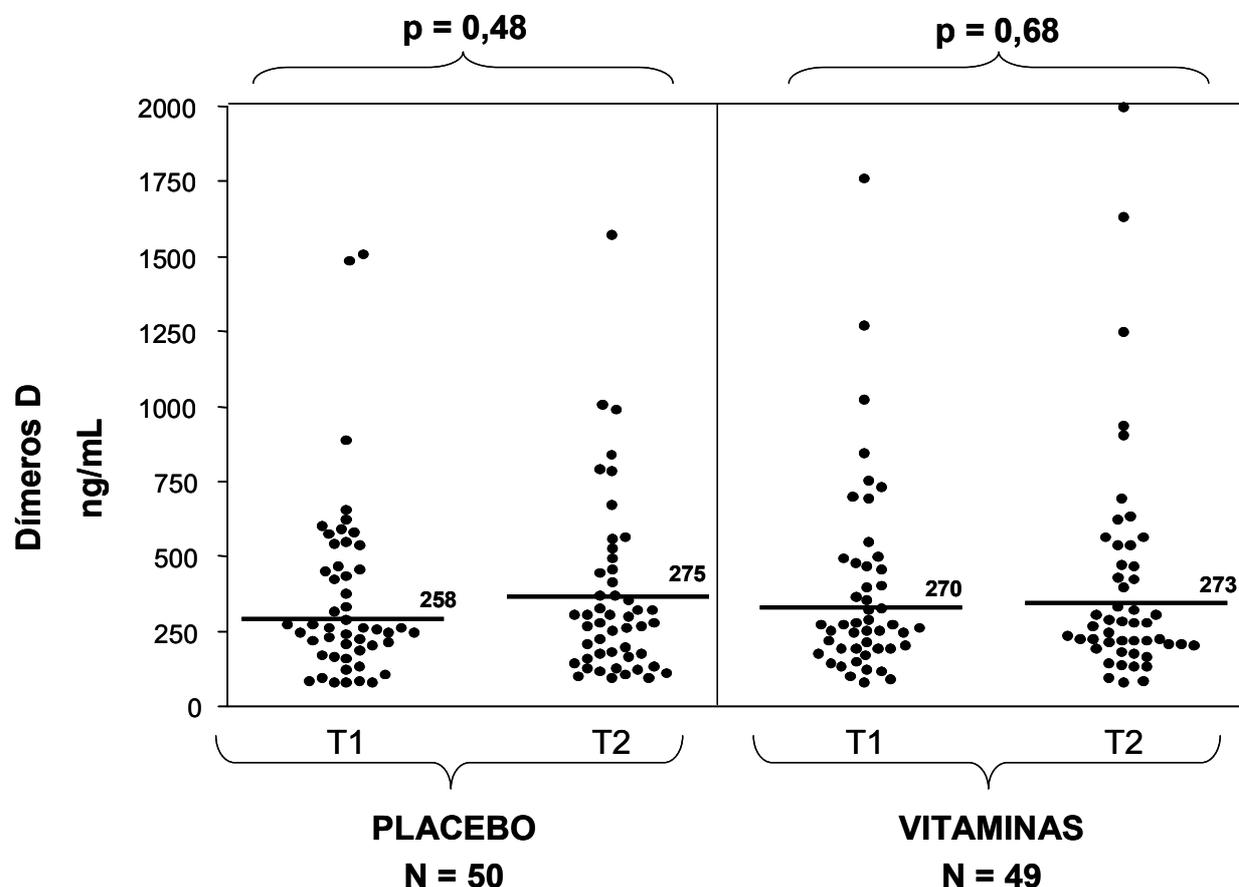
Os resultados das medianas e variações interquartis das concentrações desses parâmetros, antes e após a intervenção, bem como das razões T2/T1 para cada parâmetro, estão apresentados na tabela 4 e nas figuras 7 a 14.

Tabela 4: Valores de DD, F1+2, TAT, FVWAg, fator VIII e fibrinogênio : basal, após tratamento e a razão entre os dois tempos (T2/T1)

	N	Basal	Após tratamento	Razão T2/T1	p
Dímeros D (ng/ml)					
PLACEBO	50	258 (186-460)	275 (163-435)	1,03 (0,81-1,30)	0,48
VITAMINAS	49	270 (189-473)	273 (206-469)	0,95 (0,79-1,24)	0,68
Fragmento 1+2 (nmol/L)					
PLACEBO	50	0,72 (0,56-0,87)	0,72 (0,57-0,94)	0,97 (0,84-1,28)	0,91
VITAMINAS	49	0,71 (0,56-0,89)	0,74 (0,55-1,13)	1,05 (0,84-1,31)	0,11
TAT ($\mu\text{g/L}$)					
PLACEBO	50	4,8 (2,7-9,1)	3,4 (2,0-6,6)	0,77 (0,39-1,58)	0,12
VITAMINAS	49	3,4 (2,2-6,3)	3,7 (2,9-9,6)	1,19 (0,66-2,68)	0,15
von Willebrand (%)					
PLACEBO	50	185 (142-206)	173 (135-195)	0,97 (0,86-1,10)	0,41
VITAMINAS	49	178 (131-210)	179 (148-201)	0,98 (0,90-1,10)	0,75
Fator VIII (%)					
PLACEBO	50	143 (120-192)	134 (108-185)	0,92 (0,79-1,12)	0,04
VITAMINAS	49	142 (110-189)	140 (117-166)	0,99 (0,78-1,17)	0,23
Fibrinogênio (g/L)					
PLACEBO	50	3,56 (3,23-4,27)	3,37 (3,01-4,00)	0,94 (0,86-1,05)	0,005
VITAMINAS	49	3,32 (3,00-3,89)	3,22 (2,77-3,83)	0,96 (0,89-1,08)	0,26

Resultados expressos em medianas e variações interquartis (percentil 25% a percentil 75%). Valores de p calculados pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon.

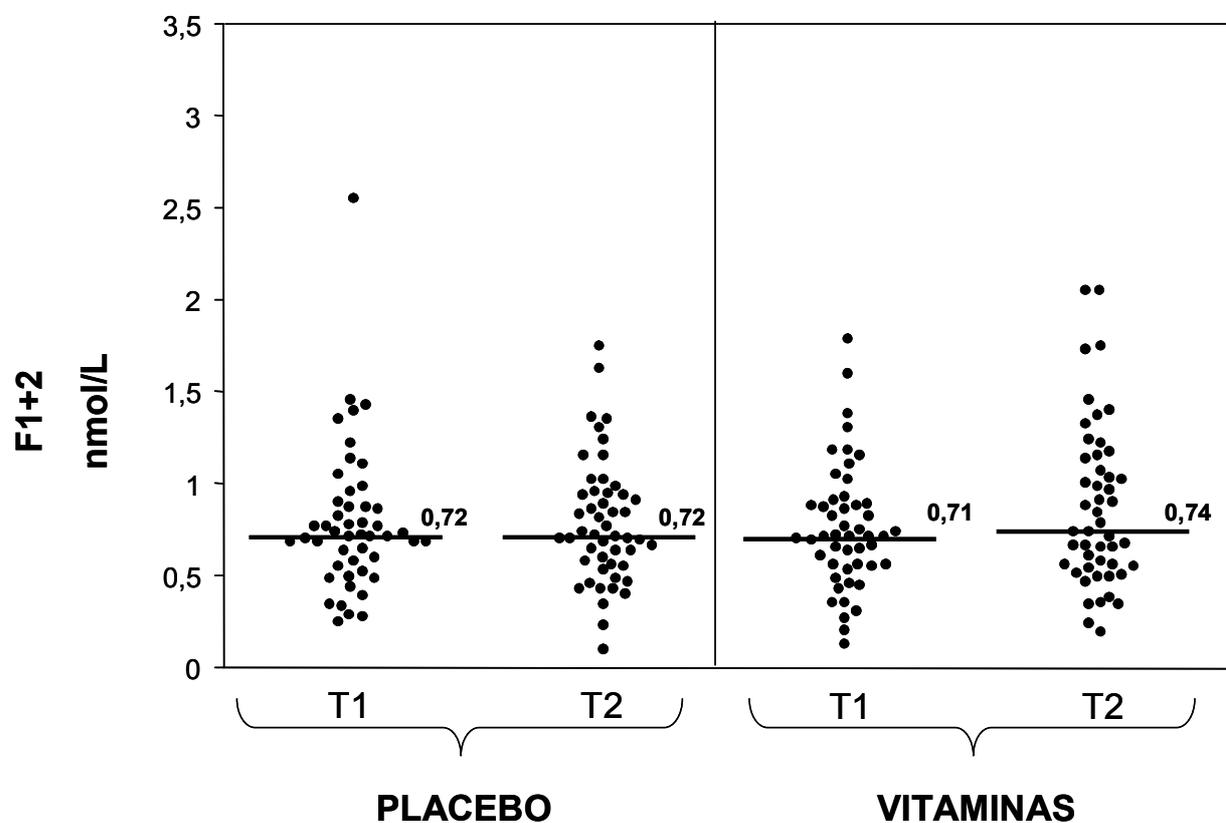
Figura 7: Valores de dímeros D (DD) antes (T1) e após (T2) a intervenção com vitaminas ou placebo, nos 99 pacientes avaliados



Estão representados os valores de cada indivíduo.
As barras horizontais representam as medianas.

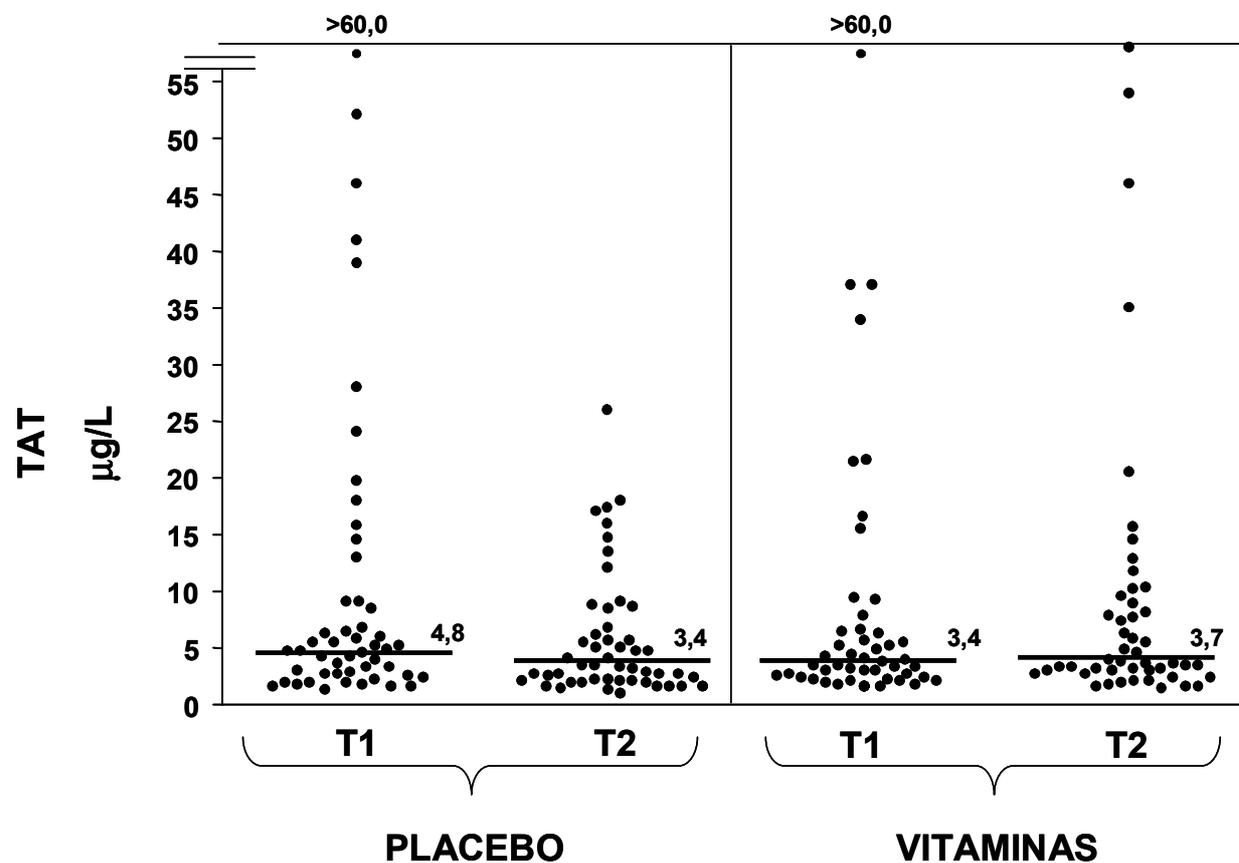
Analisando os resultados de dímeros D, observamos que 8 pacientes apresentavam níveis acima de 750 ng/mL no T1. Desses, 7 mantiveram níveis elevados após as 8 semanas de intervenção, tanto no grupo placebo como no grupo que recebeu suplementação vitamínica. Nenhum desses pacientes apresentou recidiva de TEV até a conclusão desse estudo. Além disso, um paciente do sexo masculino (de iniciais NSM) que apresentava dímeros D normais no T1 (398 ng/mL) apresentou grande elevação na concentração após 8 semanas (1994 ng/mL) e evoluiu com recidiva de TEV 3 semanas após o término da intervenção.

Figura 8: Valores de fragmento 1+2 (F1+2) antes (T1) e após (T2) a intervenção com vitaminas ou placebo, nos 99 pacientes avaliados



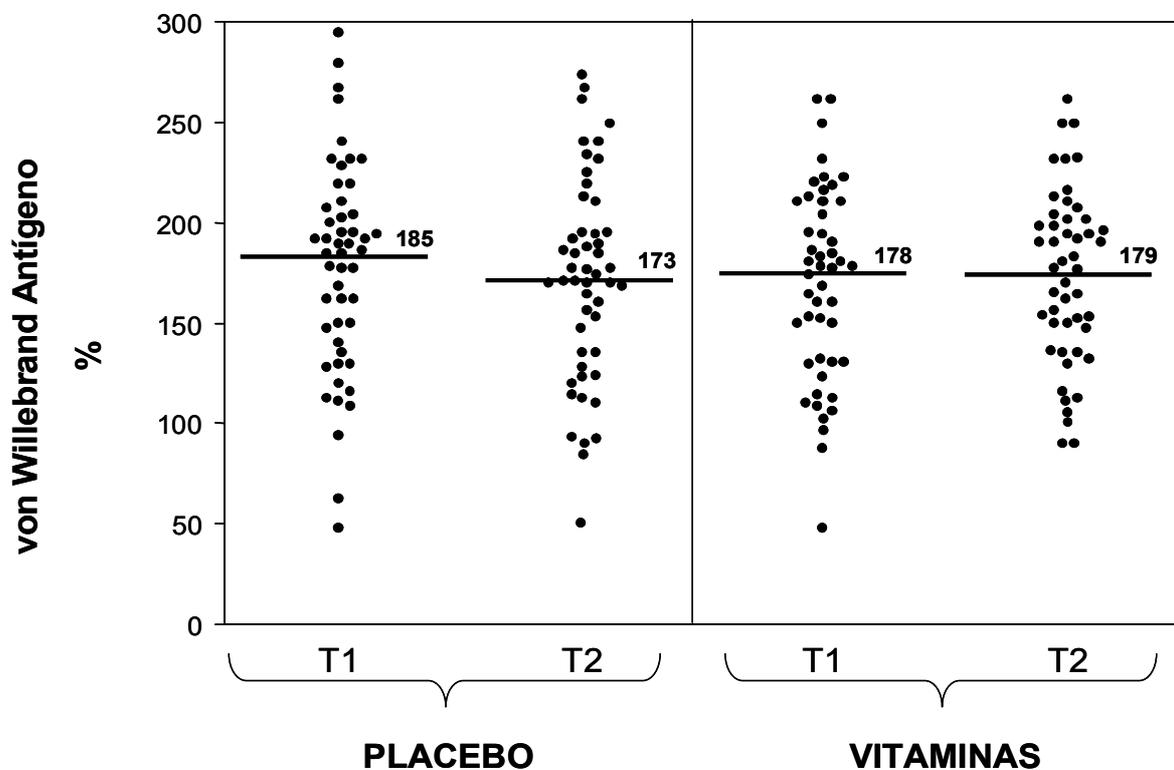
Estão representados os valores de cada indivíduo.
As barras horizontais representam as medianas.

Figura 9: Valores de complexo trombina-antitrombina (TAT) antes (T1) e após (T2) a intervenção com vitaminas ou placebo, nos 99 pacientes avaliados



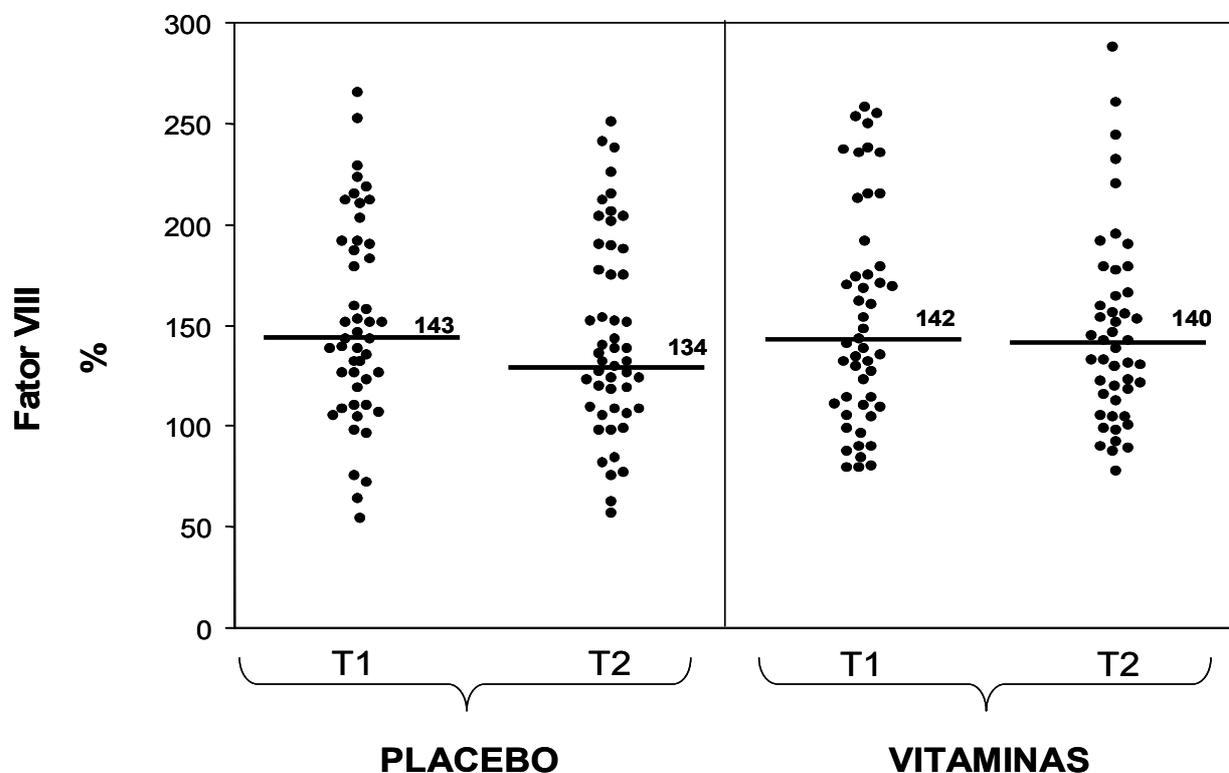
Estão representados os valores de cada indivíduo.
As barras horizontais representam as medianas.

Figura 10: Valores do antígeno do fator de von Willebrand (FVWAg) antes (T1) e após (T2) a intervenção com vitaminas ou placebo, nos 99 pacientes avaliados



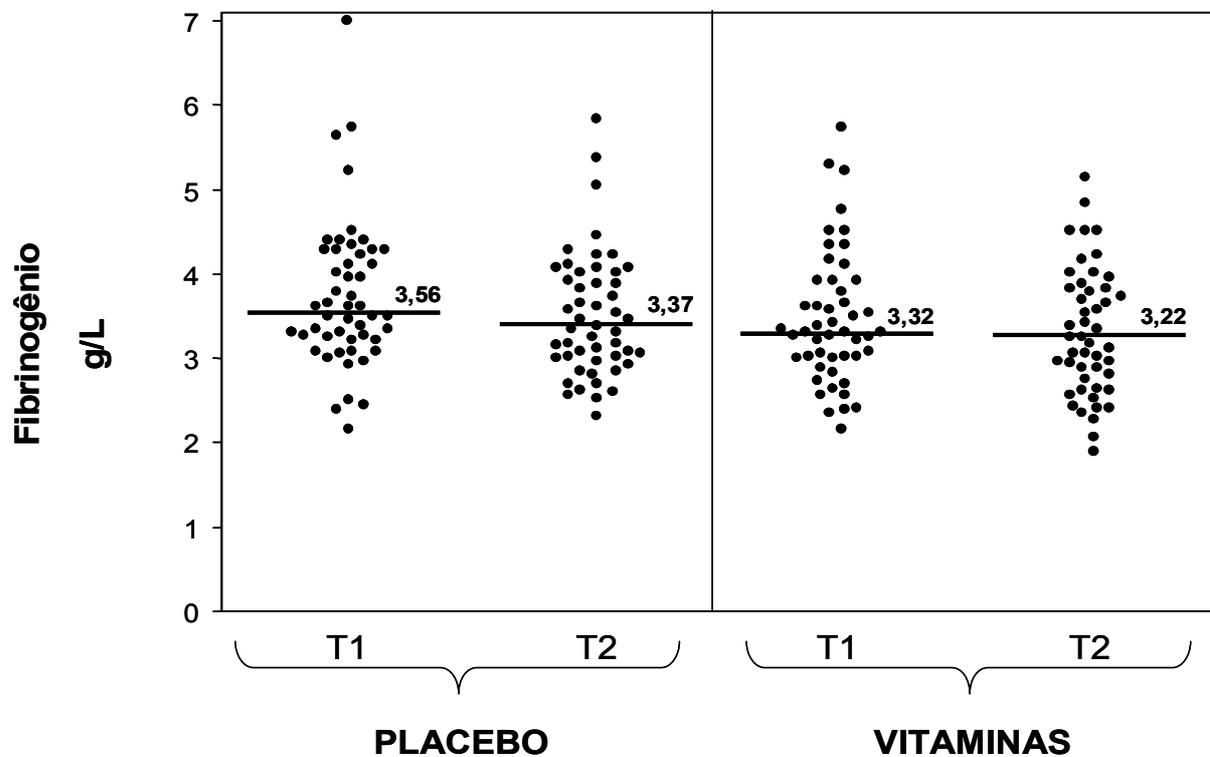
Estão representados os valores de cada indivíduo.
As barras horizontais representam as medianas.

Figura 11: Valores de fator VIII antes (T1) e após (T2) a intervenção com vitaminas ou placebo, nos 99 pacientes avaliados



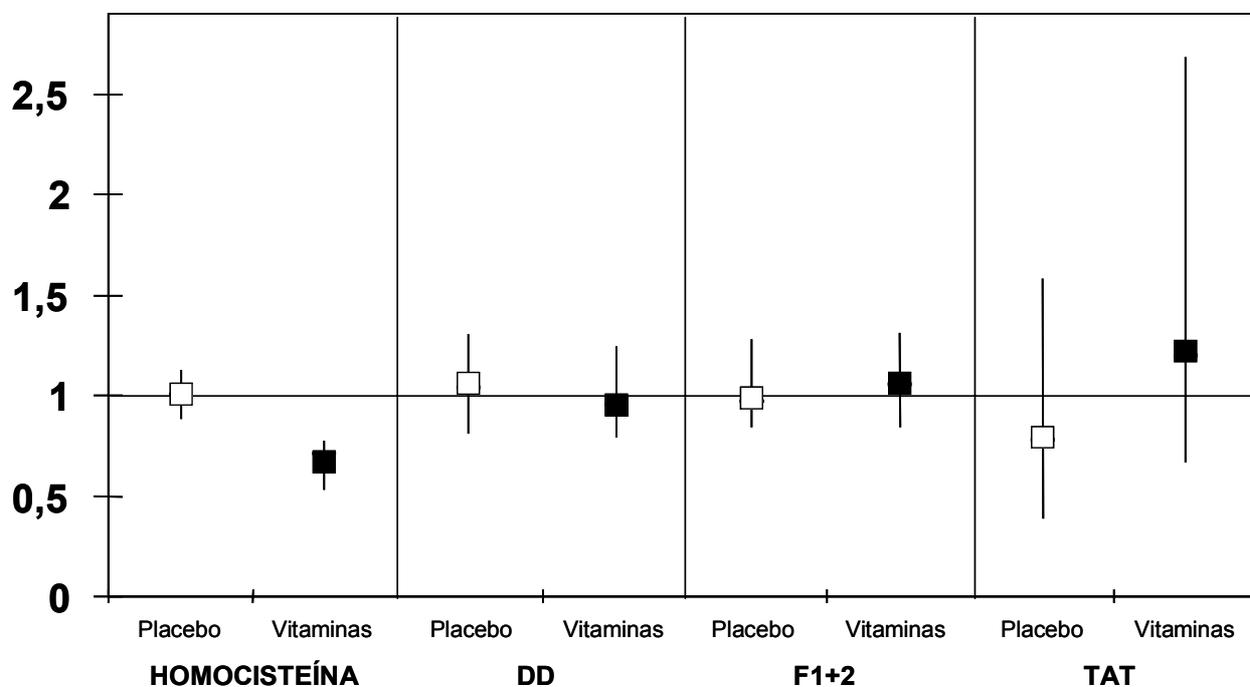
Estão representados os valores de cada indivíduo.
As barras horizontais representam as medianas.

Figura 12: Valores de fibrinogênio antes (T1) e após (T2) a intervenção com vitaminas ou placebo, nos 99 pacientes avaliados



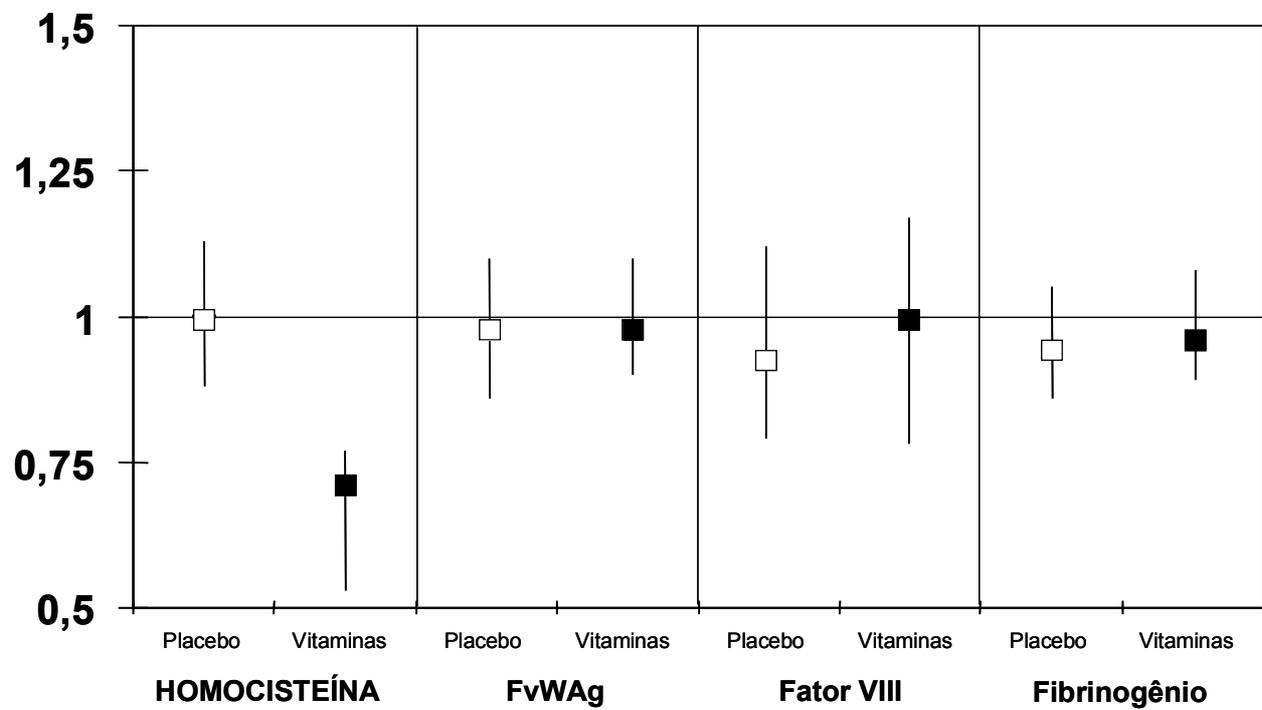
Estão representados os valores de cada indivíduo.
As barras horizontais representam as medianas.

Figura 13: Razão T2/T1 dos valores de homocisteína, dímeros D (DD), fragmento 1+2 (F1+2) e complexo trombina-antitrombina (TAT) nos pacientes tratados com vitaminas ou placebo



Estão representadas as medianas e variações interquartis.

Figura 14: Razão T2/T1 dos valores de homocisteína, antígeno do fator de von Willebrand (FvWAg), fator VIII e fibrinogênio, nos pacientes tratados com vitaminas ou placebo



Estão representadas as medianas e variações interquartis.

4.5. Efeito da suplementação na concentração de t-PA e PAI-1

Observou-se elevação significativa dos níveis de t-PA de 6,1 ng/ml para 9,0 ng/ml, $p=0,0008$ (teste de Wilcoxon) no grupo de pacientes tratados com vitaminas.

No grupo placebo também houve elevação, porém menos significativa (de 8,0 ng/ml para 9,5 ng/ml, $p=0,03$, teste de Wilcoxon), conforme demonstrado na tabela 5 e nas figuras 15 e 18.

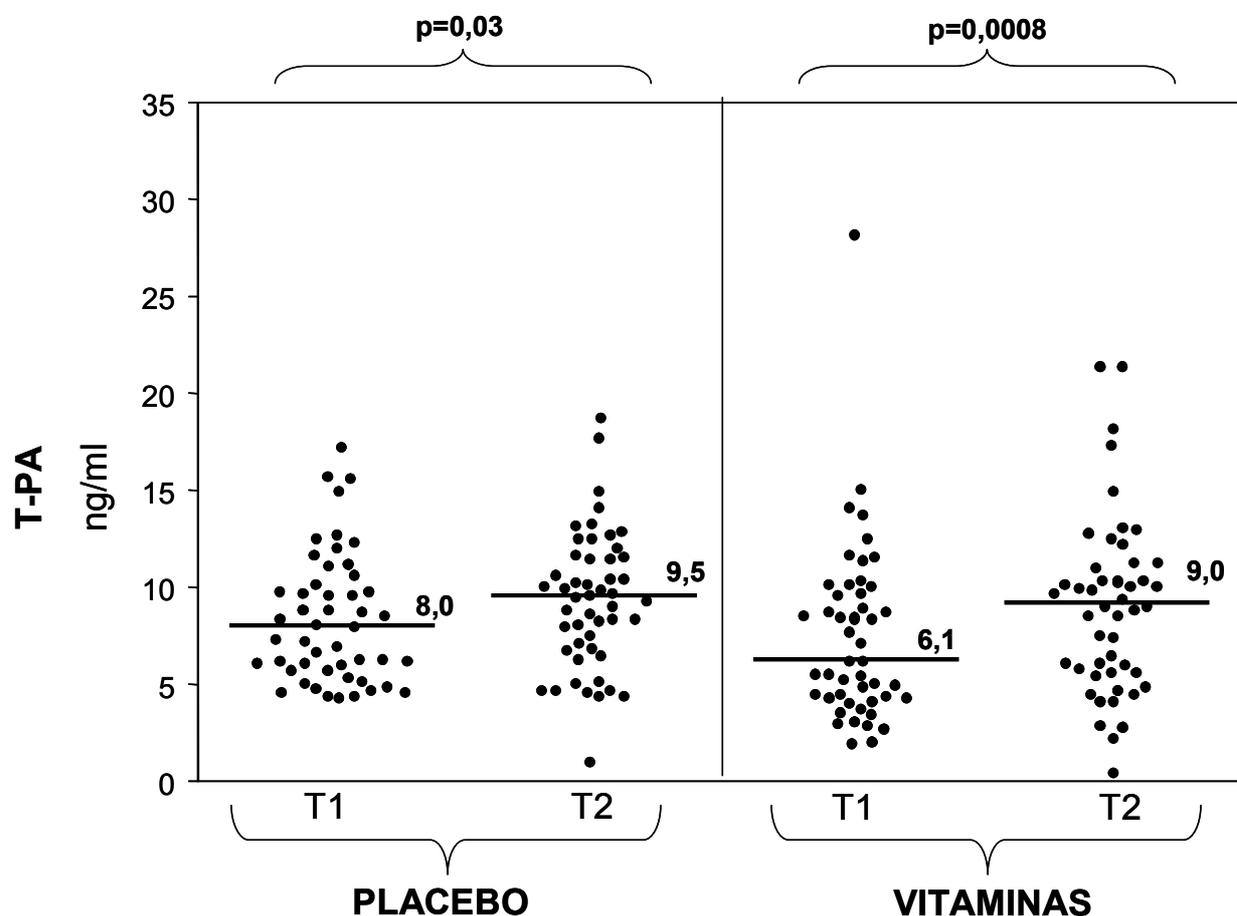
Tabela 5: Valores de t-PA e PAI-1: basal, após tratamento e a razão entre os dois tempos (T2/T1)

	N	Basal	Após tratamento	Razão T2/T1	p
t-PA					
PLACEBO	50	8,0 (5,8-10,0)	9,5 (6,9-11,5)	1,13 (0,84-1,46)	0,03
VITAMINAS	49	6,1 (4,2-9,6)	9,0 (5,6-10,8)	1,11 (1,03-1,59)	0,0008
PAI-1					
PLACEBO	50	39,3 (28,1-55,7)	36,5 (27,1-49,7)	0,93 (0,71-1,18)	0,28
VITAMINAS	49	35,5 (27,2-44,4)	38,5 (30,0-51,4)	1,05 (0,92-1,13)	0,35

Resultados expressos em medianas e variações interquartis.

Valores de p calculados pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon.

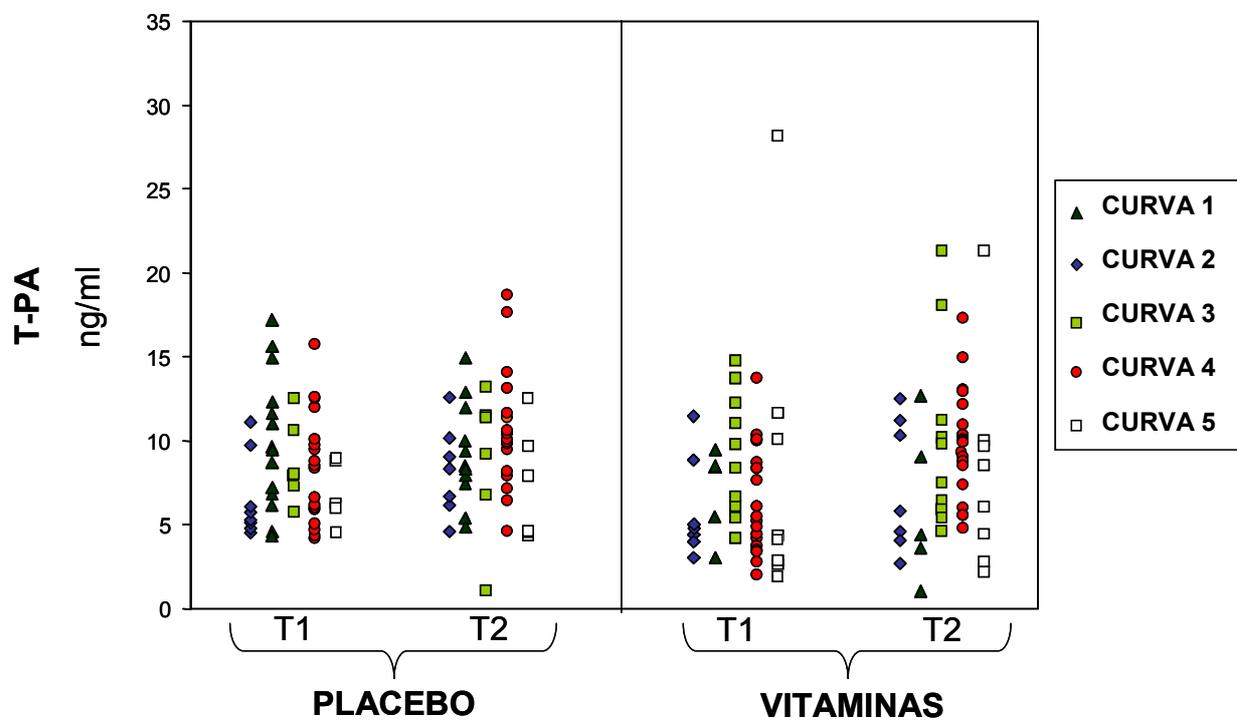
Figura 15: Valores de t-PA antes (T1) e após (T2) a intervenção com vitaminas ou placebo, nos 99 pacientes avaliados



Estão representados os valores de cada indivíduo.
As barras horizontais representam as medianas.

Para evitarmos que a elevação do t-PA mesmo no grupo placebo fosse decorrente de variáveis analíticas, tivemos o cuidado de fazer os dois tempos de cada paciente na mesma placa de ELISA e usando a mesma curva de calibração, como demonstrado na figura 16.

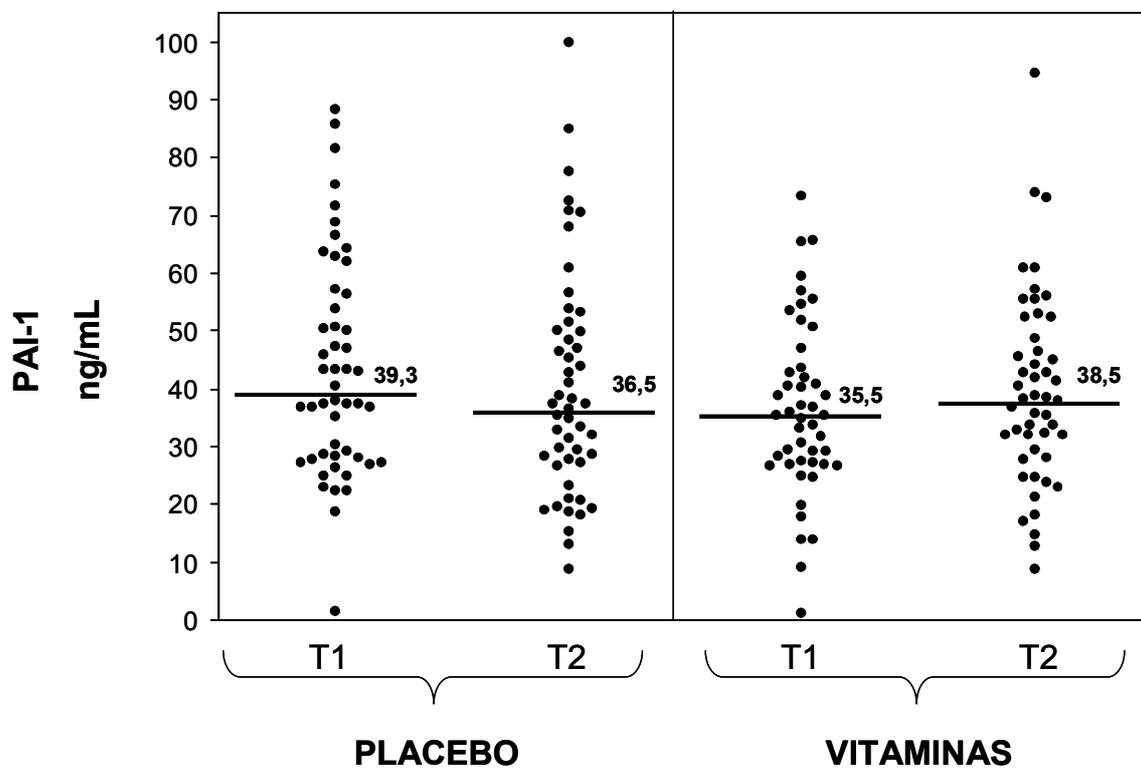
Figura 16: Distribuição dos valores de t-PA antes (T1) e após (T2) a intervenção com vitaminas ou placebo, de acordo com a curva de calibração utilizada



Estão representados os valores de cada indivíduo.

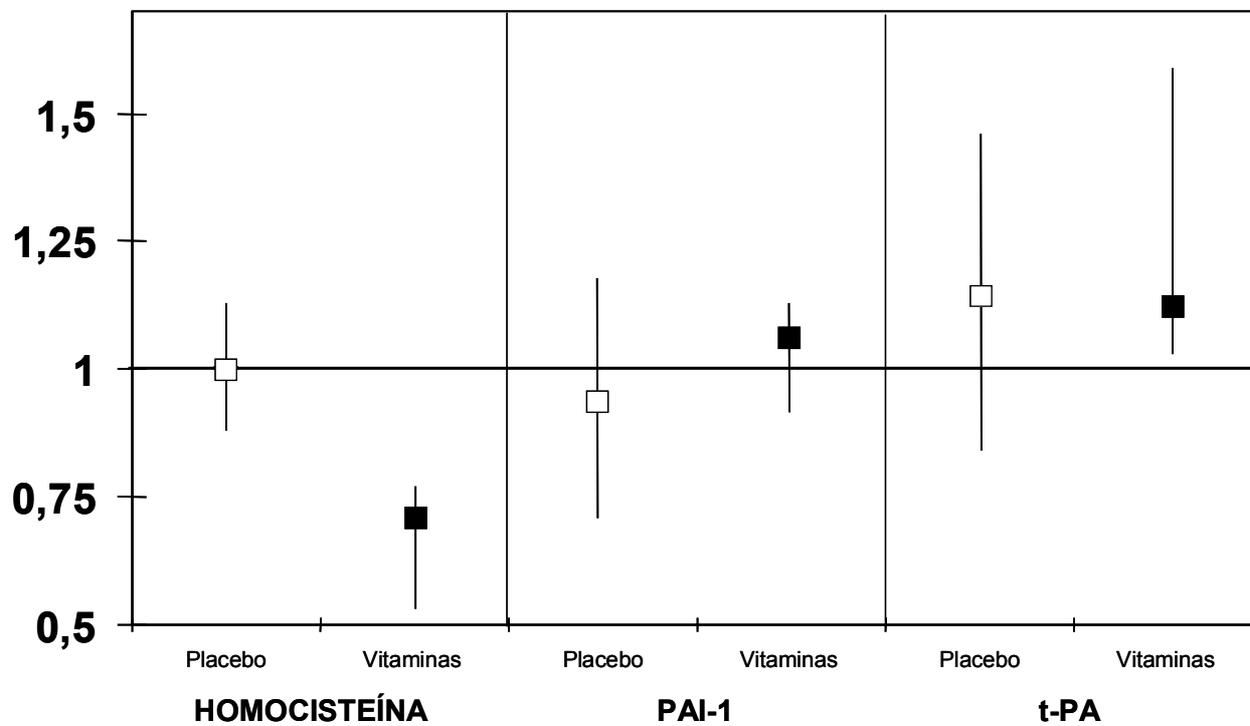
Não houve modificação significativa na concentração de PAI-1, nos pacientes que receberam suplementação vitamínica por 8 semanas. Houve elevação da mediana de 35,5 ng/mL para 38,5 ng/mL, porém não atingiu significância no teste emparelhado de Wilcoxon ($p=0,35$). Também não houve efeito no grupo de pacientes que receberam placebo (tabela 5, figuras 17 e 18).

Figura 17: Valores de PAI-1 antes (T1) e após (T2) a intervenção com vitaminas ou placebo, nos 99 pacientes avaliados



Estão representados os valores de cada indivíduo.
As barras horizontais representam as medianas.

Figura 18: Razão T2/T1 dos valores de homocisteína, PAI-1 e t-PA, nos pacientes tratados com vitaminas ou placebo



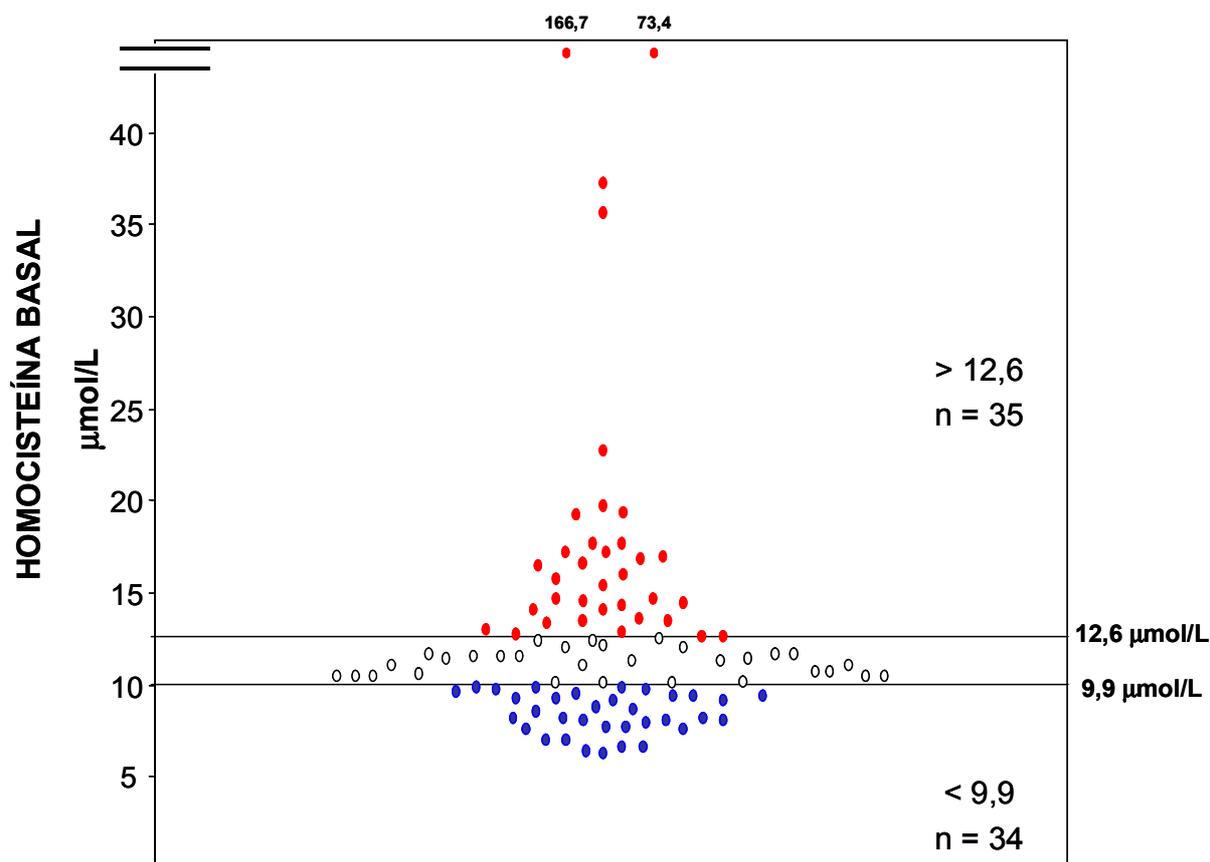
Estão representadas as medianas e variações interquartis.

4.6. Análise dos parâmetros hemostáticos estudados em relação aos níveis de homocisteína basal

Separamos então os pacientes de acordo com o nível de homocisteína, utilizando como referência os tercís (percentil 66,7% e percentil 33,3%) da homocisteína plasmática basal. Comparamos então os pacientes com valores basais acima do tercil superior (12,6 $\mu\text{mol/L}$) com aqueles abaixo do tercil inferior (9,9 $\mu\text{mol/L}$).

Havia 35 pacientes com homocisteína basal acima do tercil superior e 34 abaixo do tercil inferior (figura 19).

Figura 19: Distribuição dos valores de homocisteína basal dos 100 pacientes analisados, separando-os por tercís (superior e inferior)



Estão representados os valores de cada indivíduo.

As linhas horizontais representam os tercís superior (12,6 $\mu\text{mol/L}$) e inferior (9,9 $\mu\text{mol/L}$).

A mediana dos valores de t-PA foi mais elevada no grupo com homocisteína mais alta (8,7 ng/mL) do que no grupo com homocisteína mais baixa (6,1 ng/mL), porém essa

tendência não atingiu significância estatística ($p=0,076$, teste de Mann-Whitney – Figura 23).

Para todos os demais marcadores avaliados não houve diferença entre os pacientes com níveis mais elevados de homocisteína quando comparados àqueles com níveis mais baixos. Os valores estão mostrados na tabela 6 e nas figuras 20 a 22.

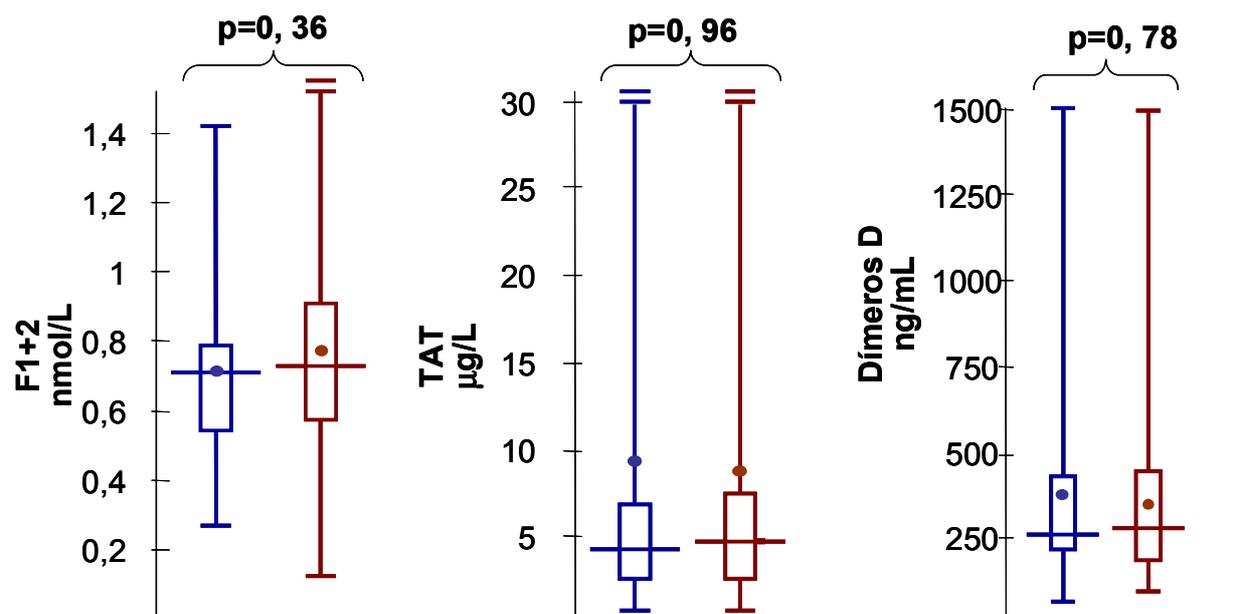
Tabela 6: Valores basais dos parâmetros hemostáticos em pacientes com homocisteína basal acima do tercil superior ($12,6 \mu\text{mol/L}$) e abaixo do tercil inferior ($9,9 \mu\text{mol/L}$)

	Nível de homocisteína (Tercil)		p
	<9,9 $\mu\text{mol/L}$	>12,6 $\mu\text{mol/L}$	
N	34	34	
F1+2 (nmol/L)	0,71 (0,54-0,78)	0,73 (0,57-0,92)	0,36
TAT ($\mu\text{g/L}$)	4,1 (2,4-6,5)	4,5 (2,3-7,5)	0,96
Dímeros D (ng/ml)	256 (200-440)	277 (187-446)	0,78
von Willebrand (%)	178 (155-195)	191 (131-220)	0,54
Fator VIII (%)	140 (112-190)	155 (132-192)	0,30
Fibrinogênio (g/L)	3,56 (3,26-3,96)	3,44 (3,00-4,10)	0,40
t-PA (ng/ml)	6,1 (4,8-9,6)	8,7 (5,8-11,6)	0,076
PAI-1 (ng/ml)	37,3 (28,9-50,4)	37,1 (27,2-54,1)	0,93

Resultados expressos em medianas e variações interquartis.

Valores de p calculados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

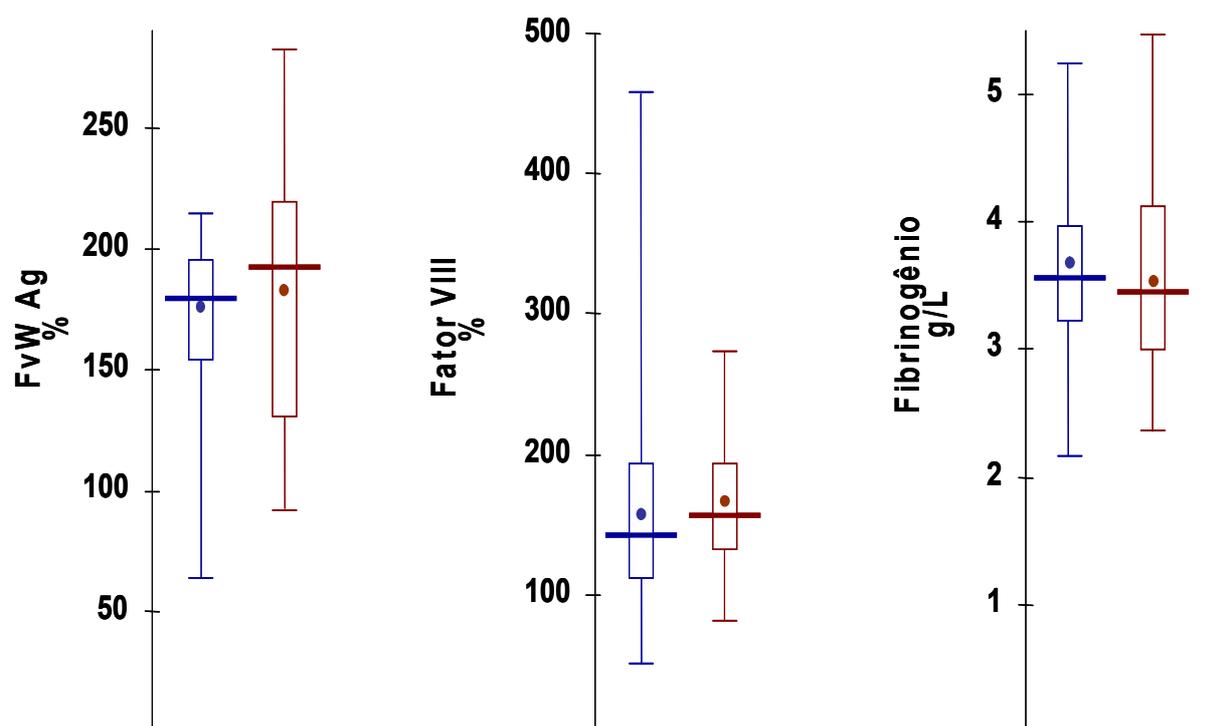
Figura 20: Medianas, médias, variação interquartil, máximo e mínimo dos valores de fragmento 1+2 (F1+2), complexo trombina-antitrombina (TAT) e dímeros D (DD), nos pacientes com homocisteína basal acima do tercil superior (12,6 $\mu\text{mol/L}$) e abaixo do tercil inferior (9,9 $\mu\text{mol/L}$)



Os gráficos azuis (☐) representam os pacientes com homocisteína basal abaixo do tercil inferior (9,9 $\mu\text{mol/L}$) e os vermelhos (☐) os pacientes com homocisteína basal acima do tercil superior (12,6 $\mu\text{mol/L}$).

As barras horizontais representam as medianas, os retângulos a variação interquartil, o ponto a média e as linhas verticais os extremos (máximo e mínimo).

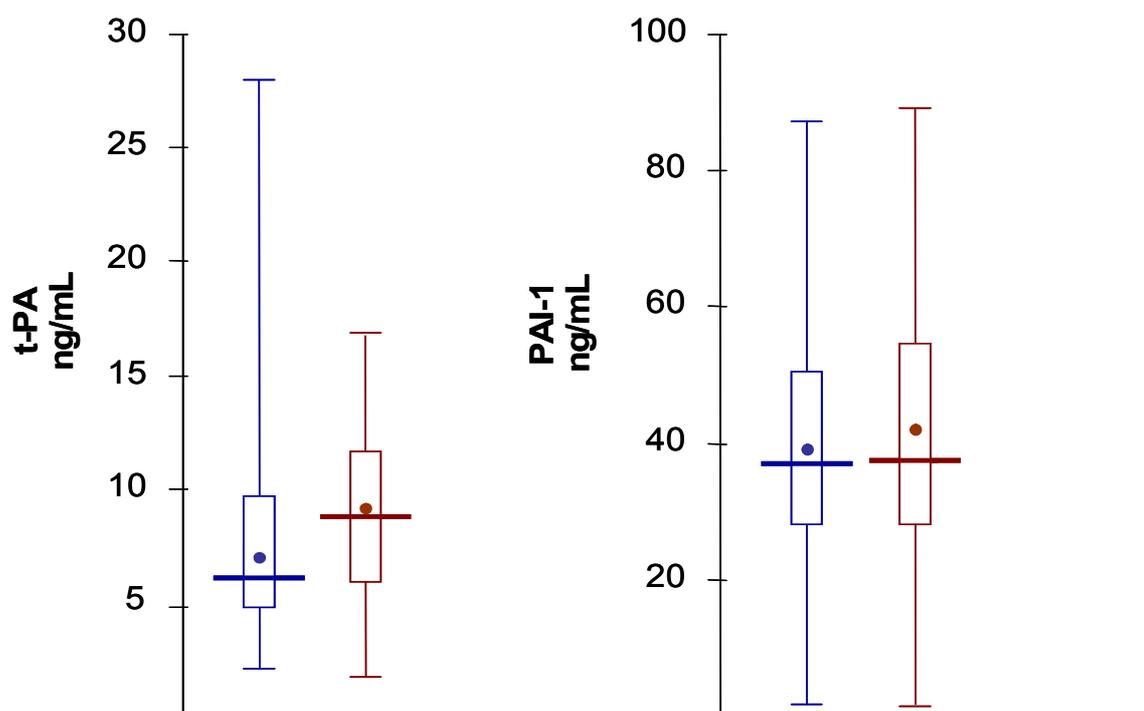
Figura 21: Medianas, médias, variação interquartil, máximo e mínimo dos valores de antígeno do fator de von Willebrand (FvWAg), fator VIII e fibrinogênio, nos pacientes com homocisteína basal acima do tercil superior (12,6 $\mu\text{mol/L}$) e abaixo do tercil inferior (9,9 $\mu\text{mol/L}$)



Os gráficos azuis (☐) representam os pacientes com homocisteína basal abaixo do tercil inferior (9,9 $\mu\text{mol/L}$) e os vermelhos (☐) os pacientes com homocisteína basal acima do tercil superior (12,6 $\mu\text{mol/L}$).

As barras horizontais representam as medianas, os retângulos a variação interquartil, o ponto a média e as linhas verticais os extremos (máximo e mínimo).

Figura 22: Medianas, médias, variação interquartil, máximo e mínimo dos valores de t-PA e PAI-1, nos pacientes com homocisteína basal acima do tercil superior (12,6 $\mu\text{mol/L}$) e abaixo do tercil inferior (9,9 $\mu\text{mol/L}$)

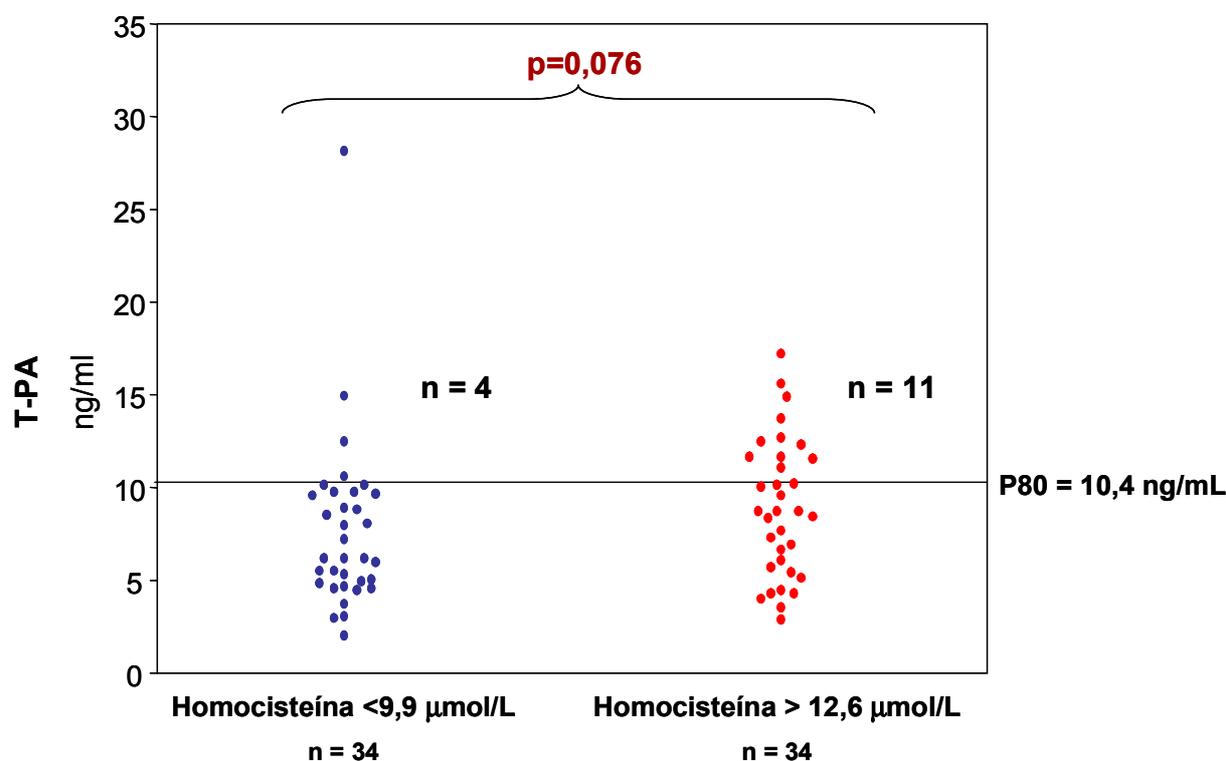


Os gráficos azuis (□) representam os pacientes com homocisteína basal abaixo do tercil inferior (9,9 $\mu\text{mol/L}$) e os vermelhos (□) os pacientes com homocisteína basal acima do tercil superior (12,6 $\mu\text{mol/L}$).

As barras horizontais representam as medianas, os retângulos a variação interquartil, o ponto a média e as linhas verticais os extremos (máximo e mínimo).

Além disso, o número de pacientes com t-PA basal acima do quintil superior (10,4 ng/mL) foi maior no grupo de pacientes com homocisteína basal acima de 12,6 $\mu\text{mol/L}$ (11 pacientes) do que naqueles com homocisteína menor que 9,9 $\mu\text{mol/L}$ (4 pacientes), (figura 23). Essa tendência, entretanto não atingiu significância estatística ($p=0,077$, teste exato de Fisher).

Figura 23: Distribuição dos valores de t-PA basal nos pacientes, separando-os de acordo com os tercís de homocisteína basal (superior e inferior). A linha representa o valor do percentil 80% (10,4 ng/mL)



Estão representados os valores de cada indivíduo.

A linha horizontal representa o quintil superior (p80) dos valores basais de t-PA dos 99 pacientes analisados.

Valor de p calculado pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

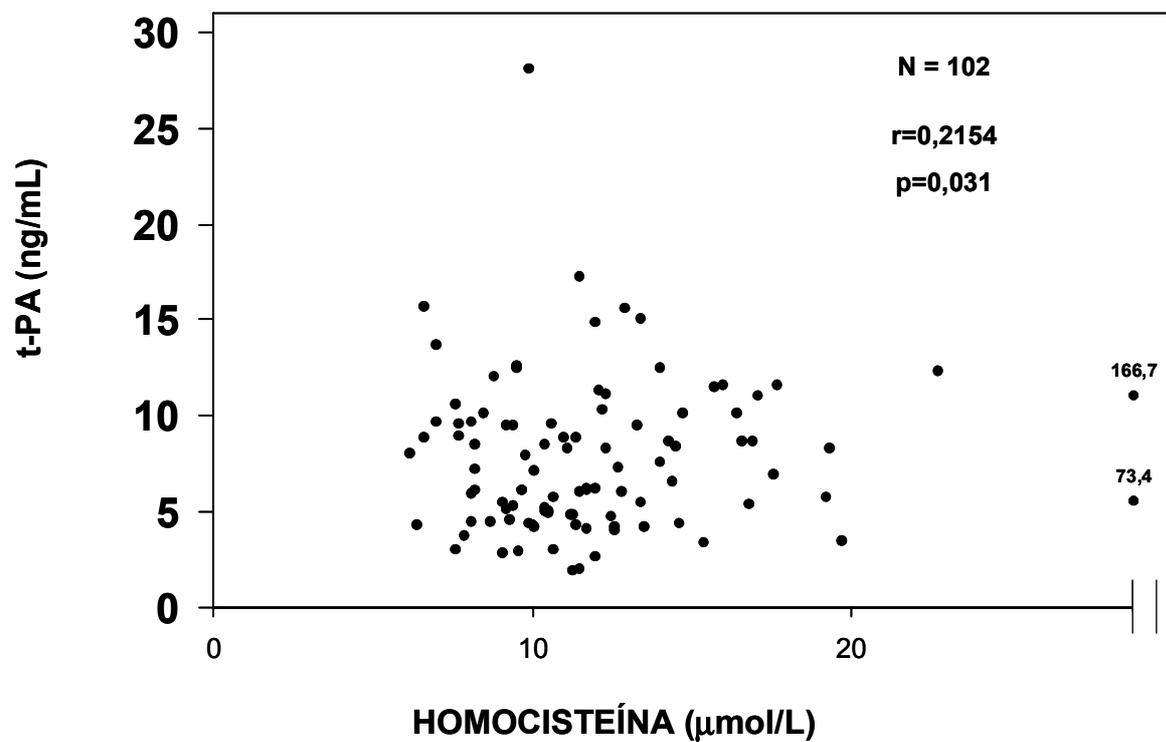
4.7. Correlação entre a homocisteína basal e valores basais dos parâmetros hemostáticos estudados

Houve correlação positiva entre os valores de homocisteína basal e t-PA, com r de 0,2154 ($p=0,031$), pelo coeficiente de correlação de Spearman (figura 24). Não houve correlação entre os valores basais de homocisteína e os demais parâmetros analisados (tabela 7).

Tabela 7: Coeficiente de correlação de Spearman entre os valores de homocisteína basal e os parâmetros analisados

	n	r	p
F1+2 (nmol/L)	104	0,1753	0,075
TAT ($\mu\text{g/L}$)	104	0,0447	0,65
Dímeros D (ng/ml)	101	0,0167	0,87
von Willebrand (%)	104	0,0592	0,55
Fator VIII (%)	104	0,1339	0,18
Fibrinogênio (g/L)	104	-0,1416	0,15
t-PA (ng/ml)	100	0,2154	0,031
PAI-1 (ng/ml)	102	0,0708	0,48

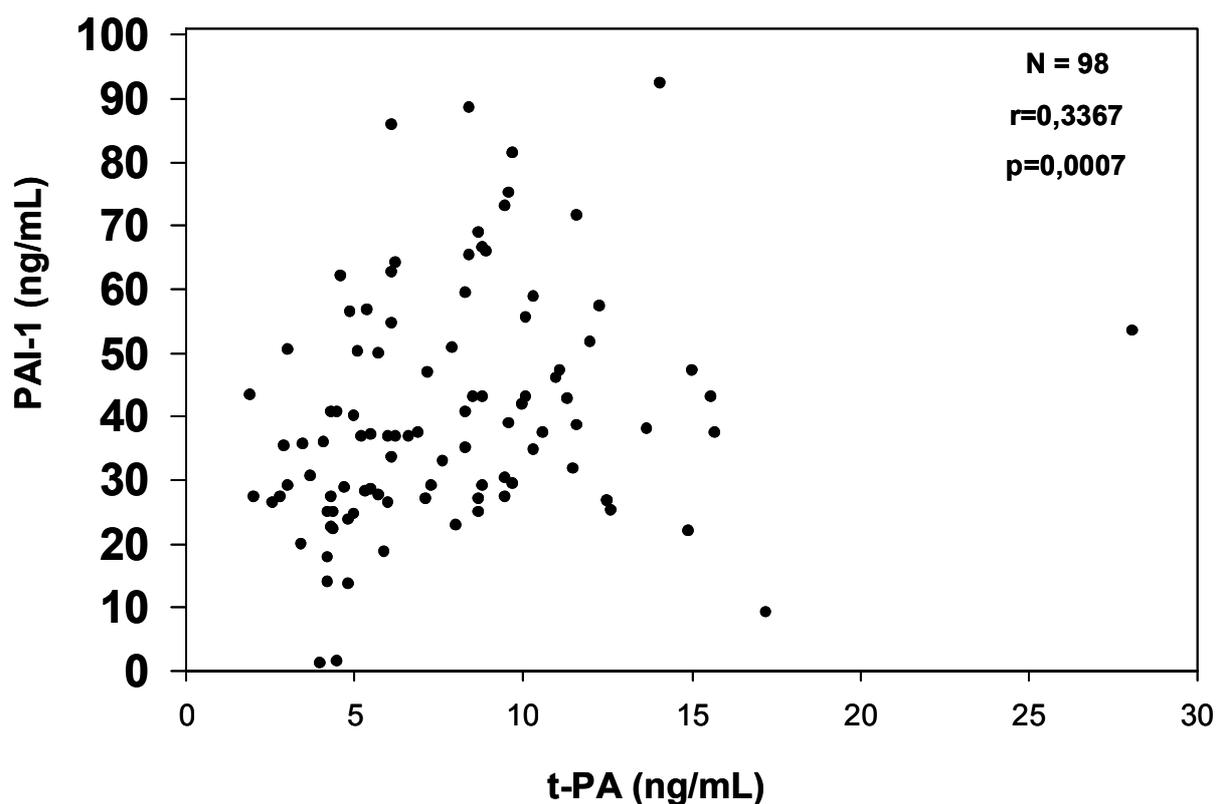
Figura 24: Gráfico de correlação de Spearman entre os valores basais de homocisteína (eixo X) e t-PA (eixo Y)



Estão representados os valores de homocisteína (eixo X) e t-PA (eixo Y) para cada indivíduo.

Apesar de não termos encontrado correlação entre os valores de homocisteína e PAI-1 ($r=0,0708$, $p=0,48$), houve significativa correlação positiva entre os valores de t-PA e PAI-1 ($r=0,3367$, $p=0,0007$), como demonstrado na figura 25.

Figura 25: Gráfico de correlação de Spearman entre os valores basais de t-PA (eixo X) e PAI-1 (eixo Y)

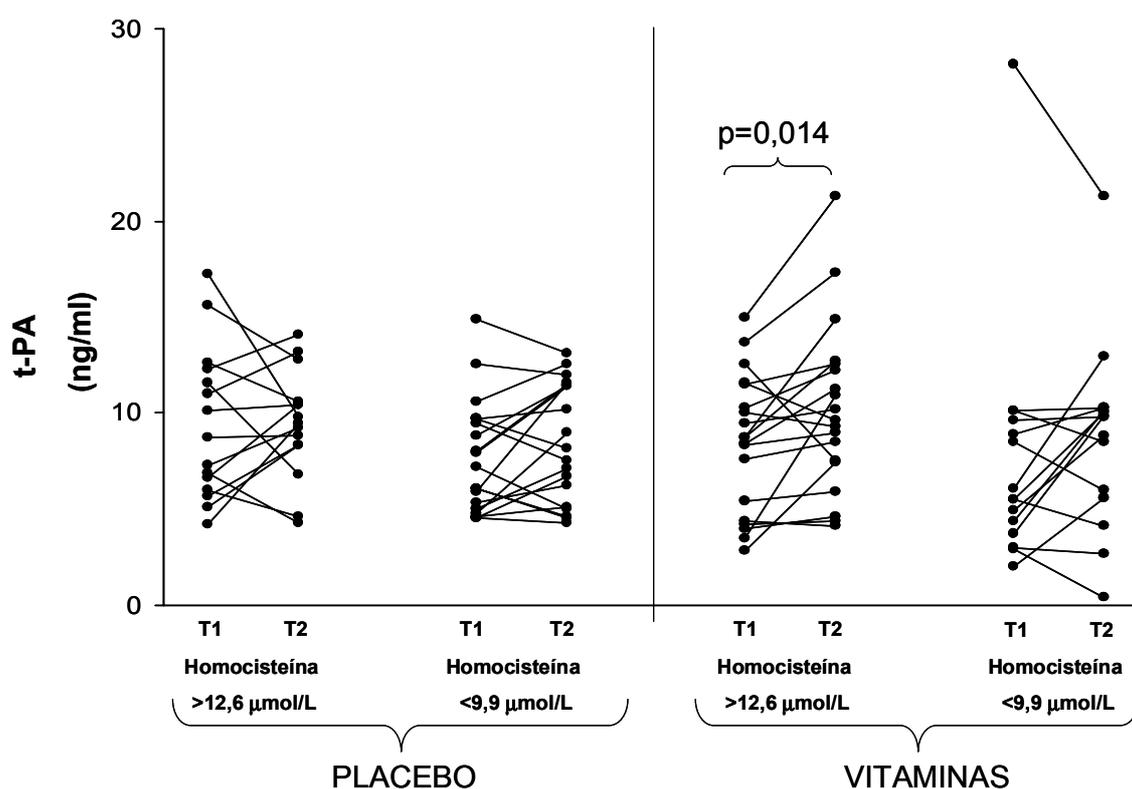


Estão representados os valores de t-PA (eixo X) e PAI-1 (eixo Y) para cada indivíduo.

4.8. Efeito da suplementação na concentração dos parâmetros hemostáticos de acordo com o nível de homocisteína basal

Avaliando separadamente o efeito da suplementação nos pacientes com valores basais de homocisteína acima do tercil superior ($12,6 \mu\text{mol/L}$) ou abaixo do tercil inferior ($9,9 \mu\text{mol/L}$), observou-se que houve elevação significativa tanto de t-PA ($p=0,014$) como de PAI-1 ($p=0,004$) apenas no grupo de pacientes que receberam a suplementação vitamínica e cuja homocisteína basal estava acima do tercil superior (figuras 26 e 27).

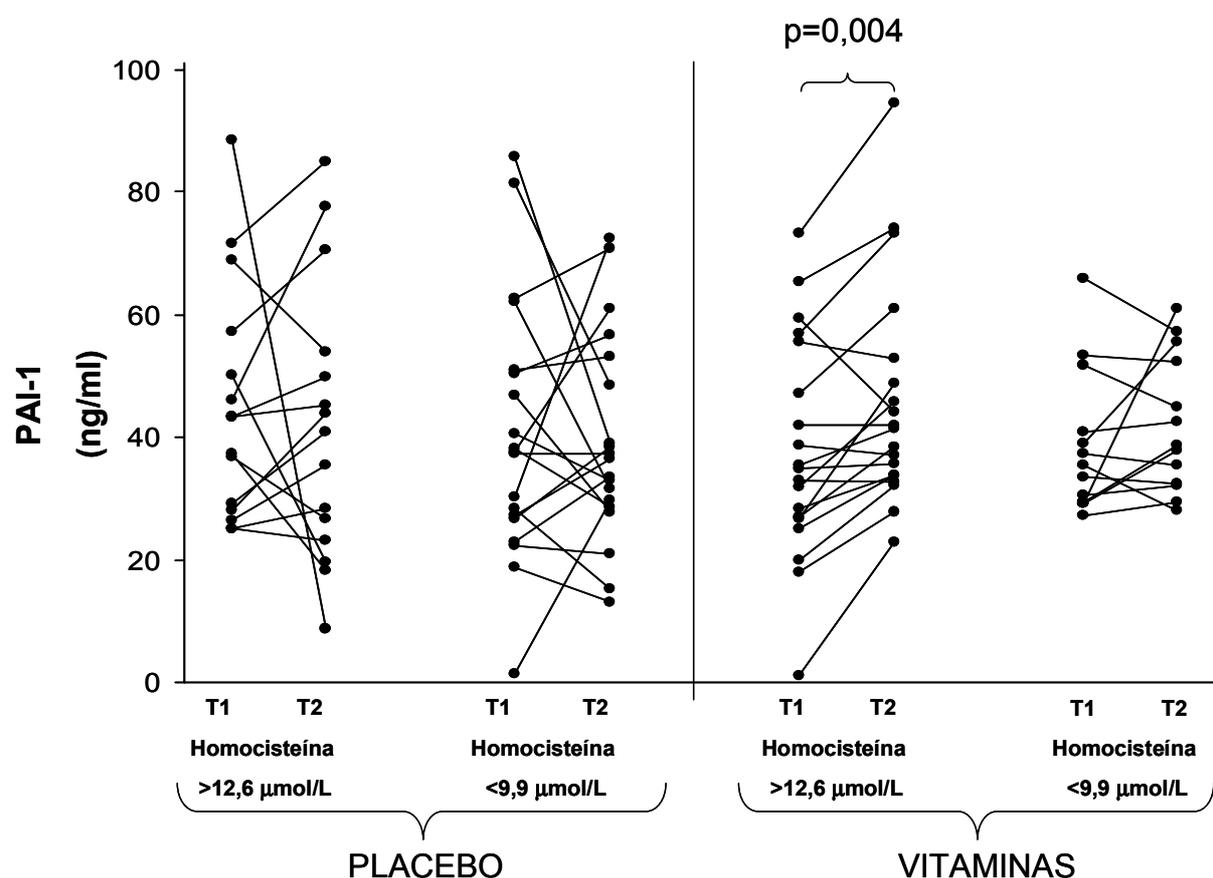
Figura 26: Nível de t-PA antes e após a intervenção com placebo ou suplementação vitamínica, separando os pacientes em função do nível de homocisteína basal



Estão representados os valores de cada indivíduo. Os valores do tempo 1 (T1) e do tempo 2 (T2) de cada paciente estão conectados por uma linha.

Valor de p calculado pelo teste não paramétrico de Wilcoxon.

Figura 27: Nível de PAI-1 antes e após a intervenção com placebo ou suplementação vitamínica, separando os pacientes em função do nível de homocisteína basal



Estão representados os valores de cada indivíduo. Os valores do tempo 1 (T1) e do tempo 2 (T2) de cada paciente estão conectados por uma linha. Valor de p calculado pelo teste não paramétrico de Wilcoxon.

Entre os 19 pacientes com homocisteína acima do tercil superior e que receberam vitaminas, estava o paciente (NSM) que apresentou recidiva de TEV três semanas após o término da intervenção. O valor de PAI-1 basal desse indivíduo era de 31,8 ng/mL e elevou-se para 45,6 ng/ml com a suplementação vitamínica. Ainda nesse grupo, havia um paciente do sexo masculino (iniciais GPF) cujo valor basal de PAI-1 era de 1,2 ng/ml, muito próximo ao limite inferior de detecção do método (1,0 ng/ml). Com a suplementação, houve elevação do valor de PAI-1 desse paciente para 22,8 ng/ml. Excluindo-se esses 2 pacientes da análise, ainda existe elevação significativa tanto do PAI-1 ($p=0,013$) como do t-PA ($p=0,026$), utilizando-se o teste de Wilcoxon, no

grupo de pacientes com homocisteína basal acima do tercil superior que receberam suplementação vitamínica. Os valores de homocisteína, PAI-1 e t-PA de cada um dos 19 pacientes desse grupo estão representados na tabela 8.

Tabela 8: Valores de homocisteína, t-PA e PAI-1, antes (tempo 1) e após (tempo 2) suplementação vitamínica, nos 19 pacientes com valores basais de homocisteína acima do tercil superior (12,6 $\mu\text{mol/L}$)

Iniciais	Idade (anos)	Sexo	Homocisteína Tempo 1 ($\mu\text{mol/L}$)	Homocisteína Tempo 2 ($\mu\text{mol/L}$)	t-PA Tempo 1 (ng/mL)	t-PA Tempo 2 (ng/mL)	PAI-1 Tempo 1 (ng/mL)	PAI-1 Tempo 2 (ng/mL)
AMAL	34	F	166,7	9,5	10,3	12,2	34,8	35,6
LLR	22	F	37,2	7,8	10,0	9,3	41,8	41,8
RSD	35	F	19,7	9,9	3,5	10,9	35,5	41,3
AHRT	37	M	19,3	8,3	8,3	9,0	59,4	44,2
VLP	43	M	17,7	12,0	11,6	9,6	38,7	36,9
AJ	62	F	16,9	10,1	8,7	12,7	26,9	38,3
ACL	34	M	16,8	10,2	5,4	5,9	56,8	73,1
RRP	23	M	16,6	8,0	8,7	14,9	25,0	33,8
NSM	61	M	15,7	10,7	11,5	12,5	31,8	45,6
RPH	26	F	15,4	10,4	4,4	4,1	19,8	32,1
MBA	47	F	14,7	10,4	13,7	17,3	55,5	52,9
SRSF	50	F	14,5	11,4	8,4	11,2	65,4	74,0
AES	30	F	14,0	3,4	7,6	8,5	33,0	32,8
DAM	24	M	14,0	10,6	12,5	7,5	26,7	48,8
SMC	24	F	13,5	6,9	4,2	4,4	17,9	27,8
MBSS	42	F	13,4	10,2	2,8	7,4	28,4	33,7
DS	30	M	13,4	9,2	15,0	21,3	47,1	60,9
ACS	61	M	13,3	9,8	9,5	10,2	73,2	94,6
GPF	27	M	12,6	9,2	4,0	4,6	1,2	22,8

Nos pacientes com homocisteína abaixo do tercil inferior que receberam vitamina e nos pacientes que receberam placebo não houve modificação desses marcadores.

Não encontramos diferenças significativas após a suplementação vitamínica ou placebo nos níveis dos demais marcadores estudados (F1+2, TAT, DD, FVWAg, Fator VIII e fibrinogênio), tanto no grupo de pacientes com homocisteína basal acima do tercil superior como naqueles com homocisteína basal abaixo do tercil inferior. Os valores de todos os parâmetros estudados, separando os pacientes pelo nível de homocisteína, estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9: Valores dos parâmetros laboratoriais (basais e após o tratamento) dos pacientes, separando-os de acordo com os tercís de homocisteína basal (superior ou inferior)

	Nível de Homocisteína (Tercil) ($\mu\text{mol/L}$)	Tratamento	N	Basal	Após tratamento	p
F1+2 (nmol/L)	> 12,6	VITAMINAS	18	0,75 (0,60-0,91)	0,81 (0,50-1,10)	0,32
		PLACEBO	15	0,70 (0,57-0,84)	0,84 (0,63-0,94)	0,24
	<9,9	VITAMINAS	15	0,69 (0,55-0,77)	0,67 (0,57-1,05)	0,23
		PLACEBO	19	0,72 (0,56-0,77)	0,70 (0,47-0,90)	0,66
TAT ($\mu\text{g/L}$)	> 12,6	VITAMINAS	18	2,95 (2,05-4,95)	4,15 (2,93-11,08)	0,067
		PLACEBO	15	6,00 (4,7-11,8)	5,00 (2,65-10,2)	0,21
	<9,9	VITAMINAS	15	4,90 (2,45-7,90)	3,40 (2,65-7,60)	0,80
		PLACEBO	19	3,90 (2,50-5,25)	3,30 (2,15-8,70)	0,86
DD (ng/mL)	> 12,6	VITAMINAS	18	231 (144-383)	259 (181-398)	0,87
		PLACEBO	15	327 (245-457)	348 (279-506)	0,14
	<9,9	VITAMINAS	15	267 (195-340)	213 (195-291)	0,52
		PLACEBO	19	255 (208-537)	262 (163-343)	0,75
FVWAg (%)	> 12,6	VITAMINAS	19	178 (113-213)	180 (151-192)	0,80
		PLACEBO	15	192 (149-231)	184 (164-230)	0,46
	<9,9	VITAMINAS	15	174 (153-184)	192 (159-200)	0,17
		PLACEBO	19	184 (162-202)	170 (138-191)	0,13
Fator VIII (%)	> 12,6	VITAMINAS	19	148 (114-177)	142 (99-165)	0,13
		PLACEBO	15	159 (138-201)	152 (120-209)	0,21
	<9,9	VITAMINAS	15	141 (116-192)	145 (120-168)	0,98
		PLACEBO	19	139 (115-188)	132 (99-165)	0,05
Fibrinogênio (g/L)	> 12,6	VITAMINAS	19	3,32 (2,72-3,75)	2,97 (2,48-3,77)	0,51
		PLACEBO	15	3,74 (3,32-4,38)	3,66 (3,26-4,00)	0,21
	<9,9	VITAMINAS	15	3,39 (3,25-3,86)	3,66 (3,05-4,02)	0,50
		PLACEBO	19	3,62 (3,27-4,13)	3,06 (2,84-3,75)	0,066
t-PA (ng/mL)	> 12,6	VITAMINAS	19	8,7 (4,9-10,9)	9,6 (7,5-12,4)	0,014
		PLACEBO	15	8,7 (6,3-12,0)	9,5 (8,3-10,5)	0,80
	<9,9	VITAMINAS	15	5,5 (4,1-9,3)	9,8 (5,8-10,2)	0,36
		PLACEBO	19	7,2 (5,2-9,6)	8,2 (5,7-11,5)	0,15
PAI-1 (ng/mL)	> 12,6	VITAMINAS	19	34,8 (26,8-51,3)	41,3 (33,8-50,9)	0,004
		PLACEBO	15	43,2 (28,6-53,7)	40,9 (24,9-51,8)	0,89
	<9,9	VITAMINAS	13	35,4 (29,4-40,8)	38,6 (32,3-48,7)	0,34
		PLACEBO	19	37,5 (27,1-50,6)	36,5 (29,2-50,8)	0,90

Resultados expressos em medianas e variações interquartis.
Valores de p calculados pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon.

5. Discussão

Nesse estudo randomizado, duplo-cego, controlado com placebo, em pacientes com TEV, foi observada redução de 29% na homocisteína plasmática com a suplementação de folato, vitamina B12 e piridoxina por 8 semanas.

Essa redução é muito semelhante àquela encontrada em estudos anteriores, de cerca de 30% com o uso de folato com doses entre 0,8 mg/d e 5 mg/d e vitamina B12 na dose média de 0,4 mg/d, conforme demonstrado em metanálise recente ⁽⁴⁷⁾. A piridoxina não parece ter efeito aditivo na redução da hiperhomocisteinemia leve a moderada, mas possivelmente contribui para a redução dos casos de hiperhomocisteinemia grave (acima de 100 $\mu\text{mol/L}$) e após sobrecarga de metionina, agindo como cofator na via da transulfuração ⁽⁴⁸⁾.

Apesar da redução da homocisteína e da concomitante elevação de folato (em 97%) e vitamina B12 (55%), não foi observada elevação significativa da piridoxina após a suplementação. Entre as possíveis explicações para essa observação estão o tempo curto de intervenção (8 semanas), a baixa concentração basal de piridoxina nessa população (mediana de 22,5 nmol/L) e o fato de que, com a suplementação, a piridoxina tende a se concentrar no meio intracelular ⁽⁴⁸⁾. A redução da homocisteína de 166,7 para 9,5 $\mu\text{mol/L}$ em uma das pacientes analisadas sugere ter havido efeito aditivo da piridoxina. Talvez essa redução não tivesse sido tão expressiva sem a participação dessa vitamina.

A mediana da homocisteína basal em nosso estudo é próxima àquela observada na maioria dos estudos de suplementação avaliados na metanálise recente ⁽⁴⁷⁾. Entre os 2596 indivíduos analisados, a mediana da homocisteína basal foi de 10,5 $\mu\text{mol/L}$, com variação interquartil de 8,5 a 13,6 $\mu\text{mol/L}$. A maioria desses estudos utilizou a mesma técnica de dosagem da homocisteína que o nosso estudo (HPLC) e, do total, apenas 30% haviam sofrido algum evento vascular. Dos 25 trabalhos, em apenas 9 há dados sobre a concentração de creatinina sérica. As diferenças na concentração de homocisteína entre os diversos estudos são justificadas principalmente por diferenças na idade, distribuição de sexo, etnia e função renal.

Chama a atenção que a concentração da homocisteína basal nessa população de pacientes com TEV (11,3 $\mu\text{mol/L}$) é maior quando comparada àquela de trabalho anterior do nosso grupo (7,4 $\mu\text{mol/L}$), que também avaliou pacientes com TEV ⁽²⁴⁾. Apesar de termos usado a mesma técnica (HPLC) e o mesmo aparelho, essa diferença

provavelmente se deve às condições pré-analíticas e características dos reagentes, uma vez que os dados demográficos (sexo, idade) são semelhantes. Devido a essa considerável diferença, não foi possível utilizar o grupo controle daquele trabalho para definir percentis de valores de homocisteína, ou para compará-los aos pacientes do trabalho atual.

Nosso trabalho confirmou que a homocisteína dos homens é mais elevada que a das mulheres, como também observado no trabalho anterior de nosso grupo ⁽²⁴⁾ e nos demais trabalhos internacionais ⁽⁴⁷⁾.

No estudo atual, foram avaliados todos os pacientes que preencheram os critérios de inclusão no estudo, independentemente do valor da homocisteína. Consideramos que essa abordagem trouxe vantagens à análise dos dados. O efeito da suplementação sobre os marcadores pôde ser observado nas diferentes concentrações basais de homocisteína e as variações dos marcadores puderam ser correlacionadas com a redução da homocisteína. Outra vantagem adicional de se avaliar todos os valores de homocisteína foi a possibilidade de se determinar correlações entre a concentração da homocisteína plasmática basal e de cada um dos marcadores analisados.

Ao nosso conhecimento, o estudo atual foi o primeiro que avaliou efeito de suplementação vitamínica sobre marcadores hemostáticos em população de pacientes com TEV. Não se observou efeito da suplementação vitamínica em altas doses nos marcadores de geração de trombina (F1+2, TAT) e em alguns marcadores de fibrinólise e função endotelial (DD, FVWAg, Fator VIII e fibrinogênio). Entretanto, observou-se elevação significativa dos níveis de t-PA com a suplementação vitamínica e, especificamente em indivíduos com homocisteína basal acima do tercil superior, houve elevação significativa tanto de t-PA como de PAI-1.

Em outros trabalhos randomizados e controlados com placebo também não foi observado efeito sobre alguns marcadores de geração de trombina e fibrinólise. Usando suplementação nas mesmas doses e pelo mesmo período de tempo que em nosso estudo, Klerk et al. ⁽⁵⁶⁾ não observaram efeito da suplementação sobre a concentração de F1+2 e TAT, apesar da redução da homocisteína em 27,7%, em 118 indivíduos normais (50 com homocisteína acima de 16 $\mu\text{mol/L}$ e 68 com homocisteína abaixo de 16 $\mu\text{mol/L}$). Houve apenas uma tendência à redução da concentração de DD.

O mesmo grupo do estudo anterior ⁽⁶⁰⁾ avaliou 276 adultos normais entre 50 e 70 anos, com homocisteína entre 13 e 26 $\mu\text{mol/L}$. Após 1 ano de suplementação com folato 0,8 mg/dia, não houve redução nos marcadores de ativação da coagulação (fator tecidual, fator VII e F1+2), de função endotelial (FVWAg) ou de inflamação (proteína C reativa), apesar de redução de 24% na homocisteína plasmática. Também não foi observada modificação nos marcadores de fibrinólise (atividade do t-PA e concentração dos produtos de degradação da fibrina).

Foi demonstrada redução significativa da razão albumina-creatinina urinária (que marca função endotelial) em outro estudo randomizado ⁽⁵⁷⁾ que avaliou o efeito da suplementação vitamínica com folato 5 mg e piridoxina 250 mg em 158 descendentes de pacientes com aterosclerose prematura. Houve discreta elevação (não significativa) de PAI-1 após 2 anos de suplementação, apenas no grupo tratado com vitaminas. Em estudo anterior com os mesmos 158 indivíduos, houve benefício da suplementação na redução da frequência de testes ergométricos anormais, porém sem efeito sobre marcadores de aterosclerose subclínica (índices hemodinâmicos e alterações no *doppler* arterial) ⁽⁶²⁾.

Também não houve benefício da redução da homocisteína em outros estudos que avaliaram marcadores hemodinâmicos. Em 130 descendentes de indivíduos com aterosclerose prematura, não foi observado efeito da redução da homocisteína sobre a vasodilatação dependente ou independente de endotélio ou sobre a rigidez e a distensibilidade das carótidas, apesar de discreta redução na pressão arterial, após 1 ano e 2 anos de suplementação com folato 5 mg e piridoxina 250 mg ⁽⁶³⁾. A fortificação da dieta com folato e a suplementação com folato em dose baixa (0,4 mg/d) não modificaram a concentração do FVWAg e de parâmetros de vasodilatação e fluxo em 126 indivíduos normais ⁽⁵⁵⁾. Outros estudos, com números menores de participantes, demonstraram benefício da redução da homocisteína com suplementação vitamínica na vasodilatação mediada por fluxo (dependente de endotélio) em indivíduos normais ^(64,65), em coronariopatas ⁽⁶⁶⁾ e em diabéticos tipo II ⁽⁶⁷⁾.

Entretanto, na maioria desses estudos foram avaliados indivíduos normais ou assintomáticos. Há poucos dados com indivíduos portadores de doenças cardiovasculares. van den Berg et al. ⁽⁶⁸⁾ estudaram o efeito da suplementação com folato 5 mg e piridoxina 250 mg em 18 pacientes com hiperhomocisteinemia leve e doença arterial periférica sobre marcadores de função endotelial (FVW, trombomodulina e t-PA). Após 1 ano de tratamento, houve redução dos valores de

FVW ($p=0,01$) e de trombomodulina ($p=0,04$). Os valores de tPA eram normais na coleta basal e não se alteraram com a intervenção. Já em estudo recente e com casuística bem mais representativa ⁽⁵⁹⁾, foram avaliados 285 pacientes com antecedentes de AVCi ou acidente isquêmico transitório (AIT). Após 6 meses de suplementação vitamínica (folato - 2 mg, vitamina B12 - 0,5 mg e piridoxina - 25 mg), foi observada redução do nível de homocisteína, porém não houve modificação de marcadores de inflamação (PCR, CD40L, IL-6), ativação da coagulação e fibrinólise (P-selectina, F1+2 e DD) e função endotelial (VCAM-1, ICAM-1e FVWAg).

Em outro estudo recente ⁽⁵⁸⁾, também randomizado, duplo cego e controlado com placebo, 119 voluntários normais foram submetidos à suplementação vitamínica com folato, vitamina B12 e piridoxina, nas mesmas doses e pelo mesmo período utilizados em nosso estudo. Apesar da redução da homocisteína em 30,9% no grupo que recebeu suplementação, apenas pequenas variações não significantes de FVW, t-PA e PAI-1 foram observadas. Assim como no presente estudo, e no estudo de Vermeulen et al. ⁽⁵⁷⁾, houve elevação de PAI-1 (de 62,4 ng/mL para 70,3 ng/mL) no grupo de pacientes com homocisteína mais elevada ($>16,0 \mu\text{M}$), porém essa diferença não foi significativa. Naquele estudo, foram utilizados tubos de citrato com estabilizadores de plaquetas (CTAD – citrato, teofilina, adenosina e dipiridamol). Apesar disso, eles obtiveram valores de PAI-1 mais elevados do que os obtidos em nosso trabalho e aqueles obtidos nos outros estudos que utilizaram a mesma técnica (imunoensaio) para determinação, utilizando-se tubos com ⁽⁶⁹⁾ ou sem CTAD ^(57,70,71,72).

Desse modo, a utilização de estabilizadores de plaquetas parece não modificar de forma significativa a determinação da concentração de PAI-1. As diferenças nas concentrações de PAI-1 devem ser provenientes principalmente das condições pré-analíticas, como as condições de coleta, o tempo até a separação do plasma, as condições de centrifugação e de armazenamento. Valores muito elevados de PAI-1 podem corresponder à liberação de PAI-1 latente pelas plaquetas. Essa liberação residual pode também impedir que pequenas variações nesse marcador sejam percebidas ⁽⁷³⁾.

No estudo atual, houve associação entre os níveis basais de homocisteína e de t-PA: a mediana dos valores de t-PA era mais elevada no grupo com homocisteína mais alta e o número de pacientes com t-PA basal acima do quintil superior era maior no grupo de pacientes com homocisteína basal mais elevada. Além disso, houve correlação positiva, ainda que fraca, entre os valores de homocisteína basal e t-PA. Apesar de não

termos encontrado correlação entre os valores de homocisteína e PAI-1, houve significativa correlação positiva entre os valores de t-PA e PAI-1. Não se observou correlação entre homocisteína e os demais marcadores, assim como não houve diferença na concentração desses marcadores entre pacientes com níveis de homocisteína basal mais elevada ou mais baixa.

Estudos com voluntários normais encontraram resultados conflitantes em relação à correlação entre homocisteína e marcadores de lesão endotelial, fibrinólise e geração de trombina. Kyrle et al. ⁽⁴⁰⁾ avaliaram 231 pacientes com história de TEV e encontraram níveis mais elevados de F1+2 nos pacientes com homocisteína acima do percentil 95% da população normal (11,6 $\mu\text{mol/L}$ para homem e 8,8 $\mu\text{mol/L}$ para mulheres) do que naqueles com homocisteína normal, durante a anticoagulação. Além disso, após a suspensão do anticoagulante, mais pacientes apresentavam níveis de F1+2 acima do limite normal entre aqueles com hiperhomocisteinemia do que entre os com homocisteína normal.

Em pacientes com doença aterosclerótica estável, Undas et al. ⁽⁴²⁾ encontraram níveis elevados de TAT apenas nos indivíduos com homocisteína acima de 60 $\mu\text{mol/L}$. Já em pacientes com síndromes coronarianas agudas, Al-Obaidi et al. ⁽⁴¹⁾ observaram correlação entre os níveis de F1+2 e de homocisteína. Nappo et al. ⁽⁴³⁾ observaram elevação dos níveis de F1+2 e dímeros D (DD) após sobrecarga de metionina em 20 voluntários normais. Utilizando o mesmo protocolo, Gerdes et al. ⁽⁴⁴⁾ não confirmaram esse achado e não observaram elevação de F1+2, DD, TAT ou FVW em outros 20 voluntários normais, apesar da elevação da homocisteína.

No estudo de Peeters et al. ⁽⁵⁸⁾ não houve correlação entre homocisteína basal e marcadores de função endotelial (FVW, t-PA e PAI-1) em voluntários normais. Em outro estudo com voluntários normais ⁽⁷⁴⁾ houve correlação positiva entre homocisteína e FVW, fibrinogênio e DD. Schreiner et al. ⁽⁷⁵⁾ avaliaram 660 indivíduos sem evidência de doença cardiovascular, porém com aumento da espessura da camada íntimo-medial das carótidas. Encontraram fraca correlação positiva entre homocisteína e marcadores pró-trombóticos (t-PA, PAI-1, DD e β -tromboglobulina). A análise de 3.216 participantes do ciclo 5 do estudo de Framingham sem doença cardiovascular ⁽⁷²⁾ demonstrou que o aumento da homocisteína plasmática estava associado ao aumento de t-PA e PAI-1, tanto em homens como em mulheres, mas não havia associação entre os níveis de homocisteína e outros marcadores estudados (fibrinogênio, fator VII e FVW). Em outro

estudo populacional, houve fraca correlação entre homocisteína e alguns marcadores de função endotelial e fibrinólise (t-PA, DD e FVW), mas houve correlação negativa entre homocisteína e PAI-1⁽⁷¹⁾.

Já em populações de pacientes com TEV, há poucos dados na literatura. Assim como em nosso estudo, Bienvenu et al.⁽⁷⁶⁾ demonstraram correlação entre homocisteína e t-PA e não observaram correlação entre homocisteína e PAI-1 em 50 pacientes com trombose venosa ou arterial. Já em estudo caso controle⁽⁶⁹⁾ com 157 pacientes com TEV e 138 controles normais, não foi observada diferença na concentração de t-PA ou PAI-1 comparando pacientes com TEV e hiperhomocisteinemia (n=17) e pacientes com TEV sem hiperhomocisteinemia (n=140). Os valores de corte para definição de hiperhomocisteinemia nesse estudo foram os percentis 95% dos controles: 11,4 µmol/L para mulheres e 12,6 µmol/L para homens. Esses resultados devem ser considerados com cautela devido ao pequeno número de indivíduos com hiperhomocisteinemia nesse estudo.

Essas diferenças entre os diversos estudos devem ser decorrentes das variações entre as características das populações estudadas, das condições pré-analíticas e dos métodos utilizados para análise. Outra possível explicação para variações em estudos observacionais é a presença de fatores não conhecidos que modificam os marcadores e dificultam a interpretação. Em nosso trabalho, tomamos o cuidado de sempre realizar a dosagem dos parâmetros dos dois tempos (basal e após intervenção) de cada paciente no mesmo ensaio. Dessa forma, as diferenças encontradas nos valores dos marcadores não podem ser atribuídas a variações entre as condições dos ensaios. Além disso, as recomendações das condições de coleta e manipulação das amostras foram seguidas rigorosamente, garantindo a qualidade do plasma analisado.

Em geral, na maioria dos estudos parece haver correlação entre homocisteína e alguns marcadores de função endotelial (em especial t-PA e PAI-1). Vários estudos demonstraram que a elevação de PAI-1 e alterações estruturais em sua molécula estão relacionadas a doenças cardiovasculares, aterosclerose e tromboembolismo venoso^(77,78). Dados clínicos epidemiológicos sugerem que níveis elevados de t-PA também estão associados ao risco de eventos cardiovasculares e aterosclerose⁽⁷⁹⁾. Foi demonstrado que indivíduos portadores de doenças cardiovasculares possuem níveis mais elevados de FVW, t-PA e proteína C reativa (PCR) do que indivíduos normais⁽⁸⁰⁾. Essa associação é provavelmente decorrente da interação entre o t-PA e a forma ativa do PAI-1 no plasma. Esse complexo covalente tem meia vida circulante mais longa que

o t-PA livre e, dessa forma, a elevação dos níveis do antígeno do t-PA podem representar maior atividade do PAI-1⁽⁷⁹⁾. Como a medida do antígeno de t-PA detecta também as suas formas de cadeia única ou cadeia dupla complexadas ao PAI-1, altos níveis desses marcadores de maneira conjunta reflete redução do potencial fibrinolítico^(81,82).

No estudo atual, apesar de haver correlação entre os valores basais de homocisteína e t-PA, a redução da homocisteína paradoxalmente provocou elevação desse marcador. Talvez esse efeito seja decorrente de outro mecanismo não conhecido da suplementação vitamínica, como o efeito direto das vitaminas sobre o endotélio, já observado por outros autores^(83,84,85). Por outro lado, o fato de não termos observado o mesmo efeito no grupo de pacientes com homocisteína basal mais baixa nos leva a atribuir a elevação desses fatores à redução da concentração da homocisteína e não ao efeito direto das vitaminas.

Deve-se considerar, entretanto, que o número de pacientes com homocisteína elevada (acima do tercil superior) e que receberam suplementação vitamínica nesse estudo é muito pequeno ($n = 19$) e, por esse motivo, deve-se interpretar esse efeito paradoxal da suplementação com cautela. Desses 19 pacientes, 10 tinham valores de homocisteína acima de $15 \mu\text{mol/L}$ e apenas 2 tinham valores acima de $20 \mu\text{mol/L}$ (tabela 8). Não se pode descartar que o achado positivo seja efeito do acaso ou de algum outro fator que não tenha sido avaliado nesse estudo.

Além disso, o tempo curto de suplementação (8 semanas) pode ter sido insuficiente para observar efeito nesses parâmetros. O aumento concomitante da homocisteína e de marcadores hemostáticos após eventos vasculares pode representar o estado pró-coagulante da lesão vascular aguda. Mudanças na geração de trombina e fibrinólise podem ser muito súbitas e efêmeras, uma vez que outros mecanismos estão envolvidos⁽⁸⁶⁾.

A interpretação do estudo atual e dos demais estudos que avaliaram os mesmos marcadores deve levar em consideração que esses parâmetros podem não ser adequados ou sensíveis para avaliar o efeito da redução da homocisteína sobre o endotélio. Múltiplos fatores estão envolvidos na determinação da concentração desses marcadores e não é possível evitar o efeito de outros interferentes nesse tipo de desenho de estudo.

Finalmente, pode ser que a hiperhomocisteinemia interfira com o risco de TEV por outros mecanismos diferentes desses que foram avaliados. A melhor elucidação da

fisiopatologia da hiperhomocisteinemia pode auxiliar na definição de marcadores mais específicos para avaliar o efeito de intervenções terapêuticas.

Há necessidade de estudos com maior número de pacientes com e sem hiperhomocisteinemia e TEV para confirmação desses achados.

6. Conclusões

Nesse estudo randomizado, duplo-cego, controlado com placebo, em pacientes com TEV, observou-se que:

- ✓ A suplementação vitamínica com folato, vitamina B12 e piridoxina reduziu a concentração da homocisteína plasmática. Não foi observado, entretanto, efeito da suplementação sobre marcadores de geração de trombina (F1+2, TAT) e outros marcadores de fibrinólise e função endotelial (DD, FVW, fator VIII, fibrinogênio, t-PA e PAI-1).
- ✓ Não havia diferença nos valores basais desses marcadores entre pacientes com homocisteína acima do tercil superior e aqueles com homocisteína abaixo do tercil inferior.
- ✓ Houve correlação entre os níveis de homocisteína basal e t-PA e dos valores basais de t-PA e PAI-1. Não foi observada correlação entre os demais parâmetros e a concentração de homocisteína.
- ✓ Houve elevação de t-PA e PAI-1 com a suplementação vitamínica nos indivíduos com homocisteína basal acima do tercil superior. Não foi observado efeito sobre os demais marcadores nesses pacientes.

7. Anexos

ANEXO 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

São Paulo, 10 de outubro de 2003

CEP Nº 1110/03

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): CELSO ARRAIS RODRIGUES DA SILVA

Disciplina/Departamento: Hematologia e Hemoterapia/Medicina

Ref.: Projeto de Pesquisa

Avaliação do efeito da suplementação vitamínica nos níveis da homocisteína plasmática de jejum e em parâmetros de ativação da coagulação da célula endotelial e na proteína C reativa em pacientes tromboembolismo venoso

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto acima.

Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Apresentar primeiro relatório parcial em **07/04/04**

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."

ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Título do projeto:

“Avaliação do efeito da suplementação vitamínica nos níveis da homocisteína plasmática de jejum e em parâmetros de ativação da coagulação, da célula endotelial e na proteína C reativa, em pacientes com tromboembolismo venoso: Um estudo multicêntrico, duplo-cego, randomizado, controlado com placebo”.

2. Desenho do estudo e objetivos:

Essas informações estão sendo fornecidas para a sua participação voluntária no estudo que visa avaliar os efeitos do tratamento com vitaminas sobre o nível elevado de um marcador no sangue chamado homocisteína que está associado ao risco de ter trombose.

Avaliaremos se a reposição de vitaminas realmente reduz o nível desse marcador e se essa redução melhora outros marcadores de trombose no sangue. Dessa forma, temos a intenção de avaliar se as vitaminas podem proteger as pessoas que já tiveram trombose de apresentar outra trombose.

As pessoas que aceitarem participar serão **sorteadas** para receber ou vitaminas ou uma cápsula sem efeito no organismo. Nem os pacientes, nem os médicos e nem as pessoas que farão os exames laboratoriais saberão se você está tomando vitaminas ou cápsulas sem efeito. Isso deve ser feito dessa forma para evitar que os resultados sejam influenciados em qualquer uma das fases, tornando suas conclusões mais confiáveis.

3. Descrição dos testes a serem realizados:

Serão realizados vários testes sanguíneos antes e após 2 meses de uso de vitaminas ou de cápsulas sem efeito. Esses testes incluem exames que são feitos de rotina e outros que são usados apenas em laboratórios especializados de pesquisa.

4. Descrição de como os testes serão realizados:

Todos os exames serão realizados através de coleta de sangue na veia do braço.

O primeiro exame será colhido de todos os pacientes. Será a dosagem do marcador: a **homocisteína**.

Apenas algumas pessoas serão selecionadas para participar do estudo. Essa seleção vai depender da dosagem da homocisteína no sangue. Apenas aqueles que tiverem homocisteína acima do normal ou abaixo do normal serão selecionados para receber vitaminas.

Serão colhidos exames em 3 momentos: antes do tratamento; durante o tratamento; e após o tratamento. Em cada coleta serão colhidos cerca de 10 ml de sangue.

5. Descrição dos possíveis desconfortos:

Os desconfortos desse estudo envolvem apenas a coleta de exames por punção de veia do braço nos momentos descritos e a tomada diária da medicação.

Nem as cápsulas com vitaminas nem as cápsulas com conteúdo sem efeito no organismo causam nenhum malefício ao organismo e não foram descritos efeitos colaterais em estudos anteriores com os mesmos produtos, alguns desses estudos com mais de 1500 pessoas.

6. Benefícios da participação:

A participação nesse estudo garantirá a realização de exames que investigam as causas da trombose. São exames importantes para determinar a causa da trombose e o seu risco de voltar a ter trombose no futuro. Além disso, serão realizados exames que investigam causas genéticas de trombose, permitindo avaliar se a seus familiares têm maior risco de trombose.

7. Relação dos procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar:

A sua participação nesse estudo garantirá a execução de exames adicionais àqueles feitos de rotina em pacientes com trombose.

Após o estudo, você será informado dos resultados obtidos. Sabemos então se a reposição de vitaminas foi benéfica para pessoas com o mesmo problema de trombose que você. Caso você tenha indicação de tomar vitaminas por ter homocisteína alta no

sangue, você será informado e imediatamente forneceremos receita médica com o medicamento para seu uso a partir dessa data.

A retirada do consentimento ou a opção por não participar em nada prejudicará seu tratamento ou o acesso aos médicos e serviços desse hospital.

8. Garantia de acesso:

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador principal é o Dr. Celso Arrais Rodrigues, que pode ser encontrado no endereço: Rua Botucatu, 740, 3º andar (Hematologia), telefones: 5576-4240 ou 5576-4237.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), à Rua Botucatu, 572, 1º andar, cj. 14, telefone: 5571-1062, fax: 5539-7162, e-mail: cepunifesp@epm.br.

9. Saída do estudo:

É garantida a liberdade de retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

10. Confidencialidade:

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com os outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

11. Atualização:

Todos os pacientes terão direito de se manter atualizados sobre os resultados parciais da pesquisa que sejam de conhecimento dos pesquisadores.

12. Despesas e compensações:

Não há despesas pessoais aos participantes em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se houver qualquer despesa adicional ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Aos participantes que necessitarem, será fornecido atestado médico para o período das consultas e coletas de exames.

13. Danos pessoais:

Não são previstos efeitos colaterais ou quaisquer danos pessoais associados aos medicamentos ou à coleta de exames. Se houver qualquer dano pessoal diretamente causado pelo tratamento proposto no estudo, o participante terá direito a tratamento médico na instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

14. Compromisso do pesquisador:

O pesquisador estabelece o compromisso de utilizar os dados e materiais coletados apenas para essa pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto:

“Avaliação do efeito da suplementação vitamínica nos níveis da homocisteína plasmática de jejum e em parâmetros de ativação da coagulação, da célula endotelial e na proteína C reativa, em pacientes com tromboembolismo venoso: Um estudo multicêntrico, duplo-cego, randomizado, controlado com placebo”.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito dessas informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Avaliação do efeito da suplementação vitamínica nos níveis da homocisteína plasmática de jejum e em parâmetros de ativação da coagulação, da célula endotelial e na proteína C reativa, em pacientes com tromboembolismo venoso: Um estudo multicêntrico, duplo-cego, randomizado, controlado com placebo”.

Discuti com o Dr. Celso Arrais Rodrigues sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso ao tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar desse estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento nesse serviço.

São Paulo, ____ de _____ de _____.

Paciente ou representante legal

Testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido desse paciente ou representante legal para a participação nesse estudo.

São Paulo, ____ de _____ de _____.

Responsável pelo estudo

ANEXO 3 – Ficha utilizada para coleta de dados

FICHA CLÍNICA – HOMOCISTEÍNA

Data: ____/____/____

Nº da randomização:

1. DADOS PESSOAIS:

NOME: _____

RH: _____ SEXO: ____ IDADE (Trombose): ____ DN: ____/____/____

PROFISSÃO: _____ PROCEDÊNCIA: ____ RAÇA: _____

PESO: _____ ALTURA: _____ IMC: _____

END: _____

CEP: _____ TEL: _____

2. DADOS CLÍNICOS: DATA DA TROMBOSE: ____/____/____

LOCAL DA TROMBOSE: _____

CIRCUSTÂNCIAS: _____

Sintomas de doenças recentes ou atuais? _____

TÉRMINO DO AVK: ____/____/____

3. ANTECEDENTES PESSOAIS:

TABAGISMO: _____

ETILISMO: _____

CIRURGIAS: _____

HAS: _____ DM: _____ HIPERLIPIDEMIA: _____

OUTROS: _____

MEDICAMENTOS: _____

4. HISTÓRIA GINECO-OBSTÉTRICA:

ACO (Nome): _____ TEMPO DE USO: _____

TÉRMINO DE USO: _____

G ___ P ___ C ___ A ___ MENOPAUSA: _____

PERDAS FETAIS: _____

MÉTODO ATUAL: _____

5. HISTÓRIA FAMILIAR:

HEREDOGRAMA:

6. EXAMES:

	___/___/___	___/___/___	___/___/___	___/___/___
ACA GPL				
ACA MPL				
TTPa				
TTPa Mistura				
Creatinina				
TSH				
Colesterol				
HDL				
LDL				
VLDL				
Triglicérides				
Glicose				

Doppler (___/___/___): _____

Outros: _____

ANEXO 4 – Valores de referência dos parâmetros hemostáticos analisados, conforme a bula fornecida pelos fabricantes dos produtos comerciais

Dímeros D:

Unidade: ng/ml
Referência: <500
Intervalo de medição: 45–10.000

Fragmento 1+2:

Unidade: nmol/L
Referência: 0,4 - 1,1
Esperado: média de 0,7
Intervalo de medição: 0,04 – 10,0

Complexo trombina – antitrombina:

Unidade: µg/l
Referência: 1,0 - 4,1
Esperado: média de 1,5
Intervalo de medição: 2,0 – 60,0

Fator de von Willebrand Antígeno:

Unidade: %
Referência: 50-160
Intervalo de medição: 2-120

PAI-1:

Unidade: ng/mL
Referência: 4,0 – 43,0
Intervalo de medição: 1,0 – 100,0

t-PA:

Unidade: ng/mL
Referência: <9,0
Intervalo de medição: 1 – 30

ANEXO 4 – Tabela com todos os valores de homocisteína e dos parâmetros analisados dos 99 pacientes incluídos, classificados de acordo com o nível de homocisteína basal e o tipo de intervenção recebida (placebo ou vitamina)

PACIENTES QUE RECEBERAM PLACEBO

No	Idade	Sexo	T1 HCY	T2 HCY	Razão HCY	T1 TAT	T2 TAT	Razão TAT	T1 DD	T2 DD	Razão DD	T1 F1+2	T2 F1+2	Razão F1+2
1.	30	M	73,4	108,4	1,48	39,0	14,7	0,38	373	258	0,69	0,68	0,66	0,97
2.	28	M	22,7	13,3	0,59	2,2	3,4	1,54	154	178	1,15	0,71	0,71	1,00
3.	40	M	19,2	25,0	1,30	9,0	5,0	0,55	245	364	1,48	0,74	0,86	1,16
4.	31	F	17,6	13,4	0,76	4,8	2,6	0,54	245	304	1,24	0,98	0,83	0,85
5.	53	F	17,1	12,2	0,71	4,7	17,4	3,70	546	667	1,22	0,90	0,93	1,03
6.	45	M	17,1	19,1	1,12	1,8	1,4	0,78	116	132	1,14	0,55	0,58	1,05
7.	58	F	16,4	18,6	1,13	5,8	5,6	0,96	463	455	0,98	0,77	1,35	1,75
8.	43	F	16,0	14,0	0,87	6,4	2,8	0,44	1482	1569	1,06	1,05	1,02	0,97
9.	67	F	14,6	14,7	1,00	52,0	2,0	0,04	269	348	1,30	0,59	0,93	1,41
10.	58	F	14,4	14,4	1,12	60,0	5,0	0,06	430	443	1,03	2,55	1,62	0,63
11.	45	M	14,3	11,8	0,83	1,8	1,5	0,83	284	223	0,78	0,64	0,42	0,65
12.	33	M	12,9	13,1	1,02	6,0	17,0	2,83	237	325	1,37	0,27	0,42	1,55
13.	100	F	12,8	10,6	0,83	4,7	2,7	0,57	451	789	1,75	0,70	0,95	1,36
14.	58	F	12,7	8,6	0,68	9,1	5,5	0,60	618	556	0,90	0,28	0,84	3,00
15.	55	F	12,6	12,1	0,96	14,5	26,0	1,79	327	300	0,92	0,52	0,59	1,13
16.	27	F	12,5	8,5	0,68	2,5	1,6	0,64	79	89	1,13	0,49	0,46	0,94
17.	39	M	12,3	13,6	1,11	3,3	8,4	2,54	74	125	1,69	0,43	0,42	0,97
18.	50	F	12,3	10,7	0,87	5,4	4,0	0,74	418	492	1,17	0,58	0,63	1,09
19.	25	F	12,0	12,2	1,00	13,0	1,0	0,08	272	277	1,02	0,76	0,72	0,95
20.	49	F	11,7	12,0	1,03	8,5	1,8	0,21	167	160	0,96	0,68	0,56	0,82
21.	44	F	11,5	10,1	0,88	2,7	6,7	2,48	570	525	0,92	0,82	0,76	0,93
22.	65	F	11,5	13,9	1,21	6,2	1,5	0,24	241	247	1,02	1,10	0,94	0,85
23.	39	F	11,4	10,1	0,89	2,8	18,0	6,43	182	273	1,50	1,35	1,75	1,30
24.	55	M	11,4	12,9	1,13	24,0	2,2	0,09	585	562	0,96	1,45	1,15	0,79
25.	48	F	11,1	10,7	0,96	15,8	1,6	0,10	600	258	0,43	1,13	1,15	1,01
26.	36	F	11,0	10,1	0,92	6,8	4,0	0,59	103	122	1,18	0,48	0,55	1,15
27.	22	F	10,7	10,2	0,95	1,3	2,6	2,00	161	140	0,87	0,87	1,36	1,56
28.	26	M	10,6	10,2	0,96	1,7	1,2	0,70	129	102	0,79	0,49	0,70	1,43
29.	43	F	10,5	12,8	1,22	19,7	5,6	0,28	259	194	0,75	0,87	0,68	0,78
30.	55	M	10,4	13,6	1,31	4,6	6,1	1,33	446	779	1,75	0,86	0,81	0,94
31.	28	M	10,1	11,5	1,14	1,5	2,3	1,53	82	110	1,34	0,71	0,63	0,89
32.	52	F	9,9	6,5	0,66	4,2	3,3	0,78	255	262	1,03	0,71	1,02	1,44
33.	60	M	9,8	10,4	1,06	5,1	2,0	0,39	206	205	0,99	0,73	0,53	0,73
34.	47	F	9,7	10,4	1,07	18,0	4,7	0,26	1503	1003	0,66	1,42	1,24	0,87
35.	57	M	9,5	12,8	1,35	3,3	4,7	1,42	218	318	1,46	0,95	0,74	0,78
36.	31	F	9,4	7,9	0,84	3,9	9,0	2,31	228	155	0,68	0,68	0,89	1,31
37.	27	M	9,4	9,6	1,02	28,0	1,6	0,06	75	111	1,48	0,72	0,23	0,32
38.	32	M	9,3	10,3	1,11	1,7	8,8	5,18	94	95	1,01	0,34	0,98	2,88

No	Idade	Sexo	T1 HCY	T2 HCY	Razão HCY	T1 TAT	T2 TAT	Razão TAT	T1 DD	T2 DD	Razão DD	T1 F1+2	T2 F1+2	Razão F1+2
39.	20	M	9,2	10,7	1,16	1,6	2,2	1,38	197	116	0,59	0,76	0,64	0,84
40.	29	F	9,2	9,2	1,00	2,7	13,5	5,00	259	262	1,01	0,68	1,30	1,91
41.	27	F	8,7	7,9	0,91	5,4	8,6	1,59	885	989	1,12	0,78	0,91	1,17
42.	27	F	8,2	8,8	1,07	2,3	1,9	0,83	77	90	1,17	0,48	0,45	0,94
43.	24	F	8,2	8,3	1,01	1,5	2,5	1,67	311	409	1,31	0,33	0,40	1,21
44.	26	F	8,1	5,8	0,72	4,2	3,2	0,76	257	171	0,66	0,76	0,70	0,92
45.	37	F	8,1	7,5	0,93	5,1	12,0	2,35	575	834	1,45	0,25	0,48	1,92
46.	41	F	7,6	7,6	1,00	41,0	15,9	0,39	534	299	0,56	1,40	0,84	0,60
47.	20	F	7,0	6,9	0,99	46,0	1,9	0,05	209	301	1,44	1,22	0,69	0,56
48.	44	F	7,0	7,4	1,06	3,6	2,1	0,58	654	367	0,56	0,74	0,34	0,46
49.	36	F	6,6	7,4	1,12	1,8	2,7	1,50	219	170	0,77	0,39	0,09	0,23
50.	39	F	6,2	8,0	1,29	2,9	3,4	1,17	539	316	0,59	0,63	0,70	1,11

HCY: homocisteína

No	T1 FVW	T2 FVW	Razão FVW	T1 FVIII	T2 FVIII	Razão FVIII	T1 FG	T2 FG	Razão FG	T1 PAI-1	T2 PAI-1	Razão PAI-1	T1 t-PA	T2 t-PA	Razão t-PA
1.	177	195	1,10	126	136	1,08	3,66	2,86	0,78	22,9	33,4	1,46	8,0	11,5	1,44
2.	116	112	0,97	72	82	1,14	4,52	2,81	0,62	37,3	37,3	1,00	9,7	8,2	0,85
3.	200	170	0,85	203	138	0,68	3,62	4,07	1,12	38,0	28,5	0,75	5,0	7,1	1,42
4.	294	156	0,53	469	204	0,43	5,22	4,23	0,81	81,5	48,4	0,59	9,7	10,2	1,05
5.	168	147	0,88	215	204	0,95	3,97	3,32	0,84	37,5	60,9	1,62	10,6	12,5	1,18
6.	62	50	0,81	75	57	0,76	3,32	3,03	0,91	18,7	13,1	0,70	5,9	11,6	1,97
7.	162	171	1,06	110	124	1,13	3,62	4,28	1,18	1,4	29,8	21,29	4,5	6,7	1,49
8.	204	195	0,96	151	98	0,65	3,06	2,69	0,88	46,9	27,8	0,59	7,2	5,0	0,69
9.	162	123	0,76	153	188	1,23	4,34	3,88	0,89	85,8	38,8	0,45	6,1	4,6	0,75
10.	210	160	0,76	183	152	0,83	3,79	3,62	0,96	40,6	32,9	0,81	4,8	9,0	1,88
11.	184	176	0,96	107	84	0,79	4,28	3,06	0,71	50,3	56,7	1,12	8,8	11,4	1,30
12.	150	128	0,85	54	62	1,15	3,28	2,97	0,91	30,2	72,5	2,40	14,9	13,1	0,88
13.	195	240	1,23	126	132	1,05	2,50	3,09	1,24	62,0	31,5	0,51	4,6	5,1	1,11
14.	219	213	0,97	218	201	0,92	3,09	2,69	0,87	27,3	36,5	1,34	9,5	7,5	0,79
15.	231	114	0,49	143	127	0,89	3,50	2,53	0,72	28,2	15,2	0,54	5,3	6,2	1,17
16.	128	170	1,33	132	99	0,75	2,17	2,62	1,21	26,8	38,3	1,43	12,5	12,0	0,96
17.	195	210	1,08	192	177	0,92	3,50	3,00	0,86	62,7	70,7	1,13	6,1	4,5	0,74
18.	177	168	0,95	139	151	1,09	3,25	4,07	1,25	50,8	53,1	1,05	7,9	11,4	1,44
19.	184	186	1,01	119	124	1,04	4,28	3,18	0,74	22,3	21,0	0,94	4,5	4,3	0,96
20.	162	170	1,05	64	109	1,70	2,97	3,18	1,07	63,6	46,4	0,73	4,3	9,9	2,30
21.	219	267	1,22	229	189	0,83	3,09	3,25	1,05	43,2	27,1	0,63	8,5	9,4	1,11
22.	202	184	0,90	105	123	1,17	5,65	5,06	0,90	56,3	51,5	0,91	15,7	6,4	0,41
23.	112	110	0,98	123	75	0,61	3,22	2,86	0,89	75,2	67,9	0,90	9,6	8,0	0,83
24.	111	135	1,22	132	126	0,95	2,39	2,56	1,07	27,6	20,6	0,75	5,7	0,9	0,16
25.	085	84	1,75	98	77	0,79	3,32	3,35	1,01	66,4	99,9	1,50	8,8	12,5	1,42
26.	178	164	0,92	126	251	1,99	4,40	3,54	0,80	53,8	42,8	0,80	9,5	10,1	1,06
27.	140	188	1,34	158	118	0,75	3,39	3,16	0,94	22,5	18,9	0,84	4,3	7,9	1,84

No	T1 FVW	T2 FVW	Razão FVW	T1 FVIII	T2 FVIII	Razão FVIII	T1 FG	T2 FG	Razão FG	T1 PAI-1	T2 PAI-1	Razão PAI-1	T1 t-PA	T2 t-PA	Razão t-PA
28.	043	261	0,89	143	190	1,33	7,00	5,84	0,83	43,1	47,0	1,09	8,8	9,6	1,09
29.	007	207	1,16	187	175	0,94	5,74	5,38	0,94	36,8	32,0	0,87	6,0	10,0	1,67
30.	039	194	0,99	104	129	1,24	4,12	3,74	0,91	27,2	29,5	1,08	12,0	17,6	1,47
31.	019	120	1,03	151	140	0,93	4,40	4,02	0,91	36,9	18,8	0,51	6,2	18,7	3,02
32.	009	186	0,92	212	143	0,67	3,62	4,02	1,11	64,3	37,3	0,58	6,2	8,6	1,39
33.	001	94	0,99	110	98	0,89	2,45	2,60	1,06	35,2	34,7	0,99	8,3	14,9	1,80
34.	108	189	1,16	223	241	1,08	3,35	3,46	1,03	47,3	50,0	1,06	11,1	12,6	1,14
35.	016	108	0,85	96	106	1,10	3,09	2,92	0,94	28,7	19,3	0,67	4,7	4,6	0,98
36.	013	192	0,91	151	138	0,91	4,28	4,23	0,99	25,0	28,3	1,13	4,2	9,5	2,26
37.	086	231	0,77	159	226	1,42	4,12	3,92	0,95	29,1	40,9	1,41	7,3	9,2	1,26
38.	100	189	1,00	190	152	0,80	4,23	4,12	0,97	26,3	35,5	1,35	6,0	4,6	0,77
39.	074	147	0,82	138	108	0,78	3,22	3,83	1,19	43,2	49,7	1,15	15,6	12,8	0,82
40.	062	135	1,13	192	105	0,55	3,97	3,58	0,90	68,9	53,8	0,78	8,7	8,8	1,01
41.	021	231	1,13	210	238	1,13	3,35	3,46	1,03	36,7	26,7	0,73	6,6	10,4	1,58
42.	027	279	0,81	252	206	0,82	4,40	4,07	0,93	25,0	23,1	0,92	12,6	10,6	0,84
43.	063	150	0,90	179	132	0,74	3,50	3,66	1,05	71,7	84,9	1,18	11,6	6,8	0,59
44.	017	267	1,02	265	212	0,80	4,02	3,39	0,84	43,2	45,3	1,05	10,1	10,4	1,03
45.	051	240	1,04	138	154	1,12	3,74	3,12	0,83	28,0	43,9	1,57	17,2	9,8	0,57
46.	073	192	1,22	212	175	0,83	3,28	3,09	0,94	45,9	77,5	1,69	11,0	13,2	1,20
47.	070	129	0,70	135	108	0,80	2,92	3,03	1,04	37,4	18,2	0,49	6,9	4,3	0,62
48.	092	129	1,37	132	215	1,63	3,46	4,46	1,29	50,0	19,5	0,39	5,7	8,3	1,46
49.	054	228	0,85	108	119	1,10	3,00	2,32	0,77	57,3	70,5	1,23	12,3	14,1	1,15
50.	047	192	0,96	146	120	0,82	4,28	3,88	0,91	88,4	8,8	0,10	5,1	8,3	1,63

FG: fibrinogênio

PACIENTES QUE RECEBERAM SUPLEMENTAÇÃO VITAMÍNICA

	No	Idade	Sexo	T1 HCY	T2 HCY	Razão HCY	T1 TAT	T2 TAT	Razão TAT	T1 DD	T2 DD	Razão DD	T1 F1+2	T2 F1+2	Razão F1+2
1.	018	34	F	166,7	9,5	0,06	9,4	20,5	2,18	1021	285	0,28	1,18	0,78	0,66
2.	023	22	F	37,2	7,8	0,21	5,2	8,9	1,71	142	172	1,21	0,72	0,88	1,22
3.	024	35	F	19,7	9,9	0,50	1,5	3,3	2,20	394	421	1,07	1,38	1,45	1,05
4.	009	37	M	19,3	8,3	0,43	2,0	1,6	0,80	148	128	0,86	0,71	0,71	1,00
5.	005	43	M	17,7	12,0	0,68	1,7	12,8	7,53	115	164	1,43	0,75	1,37	1,83
6.	002	62	F	16,9	10,1	0,60	3,8	6,2	1,63	688	562	0,81	1,18	1,13	0,96
7.	088	34	M	16,8	10,2	0,61	2,9	46,0	15,90	245	620	2,53	0,26	0,34	1,31
8.	057	23	M	16,6	8,0	0,48	7,8	4,6	0,59	351	327	0,93	0,92	1,15	1,25
9.	109	61	M	15,7	10,7	0,68	3,3	10,2	3,09	398	1994	5,01	1,30	1,00	0,77
10.	029	26	F	15,4	10,4	0,68	2,5	2,0	0,80	187	244	1,30	0,35	0,46	1,31
11.	035	47	F	14,7	10,4	0,71	1,9	5,4	2,84	322	221	0,69	0,89	0,19	0,21
12.	061	50	F	14,5	11,4	0,79	3,5	2,3	0,66	188	302	1,60	1,05	1,17	1,11
13.	015	30	F	14,0	3,4	0,24	3,0	3,2	1,07	216	206	0,95	0,56	0,49	0,88
14.	072	24	M	14,0	10,6	0,76	1,6	1,5	0,94	129	82	0,63	0,82	0,54	0,66
15.	003	24	F	13,5	6,9	0,51	4,2	11,8	2,81	698	535	0,67	0,71	1,02	0,44
16.	042	37	F	13,4	10,2	0,76	2,2	3,7	1,68	455	428	0,94	0,74	0,96	1,30
17.	081	30	M	13,4	9,2	0,69	5,4	14,5	2,68	98	230	2,35	0,87	0,84	0,96
18.	059	61	F	13,3	9,8	0,74	2,7	3,0	1,11	270	273	1,01	0,56	0,56	1,00
19.	107	27	M	12,6	9,2	0,73	16,5	2,9	0,17	117	93	0,79	1,12	0,24	2,00
20.	066	58	M	12,1	9,9	0,82	2,4	1,7	0,71	496	561	1,13	1,78	1,32	0,74
21.	071	40	F	12,0	4,5	0,38	3,3	3,1	0,94	189	534	2,82	0,86	1,40	1,63
22.	101	22	F	11,7	7,0	0,60	21,4	3,5	0,16	728	221	0,30	1,02	0,66	0,65
23.	087	32	F	11,7	11,4	0,97	3,0	54,0	18,00	211	632	2,99	0,65	0,74	1,14
24.	049	23	F	11,5	8,4	0,73	2,0	35,0	17,50	271	215	0,79	0,20	0,98	4,90
25.	097	28	F	11,3	8,7	0,77	4,3	7,6	1,77	748	930	1,24	0,45	2,05	4,55
26.	082	51	M	11,3	8,6	0,76	3,4	5,8	1,70	491	469	0,95	0,55	1,24	2,25
27.	014	41	F	11,1	8,1	0,73	3,9	15,7	4,02	547	689	1,26	0,88	0,91	1,03
28.	055	22	F	10,7	6,8	0,64	34,0	4,9	0,14	3316	318	0,10	1,59	0,49	0,31
29.	031	25	F	10,5	7,5	0,71	1,6	3,3	2,06	260	216	0,83	0,60	0,66	1,10
30.	012	46	F	10,4	10,2	0,98	5,1	2,1	0,41	247	223	0,90	1,10	1,22	1,11
31.	104	33	M	10,4	8,1	0,78	21,5	2,4	0,11	76	78	1,02	0,76	0,34	0,45
32.	056	47	F	10,1	7,3	0,72	1,6	3,6	2,25	473	393	0,83	0,48	0,50	1,04
33.	093	24	F	10,1	6,0	0,59	2,3	9,6	4,17	242	127	0,52	0,35	0,38	1,08
34.	099	62	F	10,0	10,0	1,00	6,4	8,1	1,26	1755	1629	0,93	0,66	0,65	0,98
35.	053	46	F	9,9	7,1	0,71	4,9	58,0	11,83	286	178	0,62	1,15	2,05	2,33
36.	011	32	F	9,7	3,5	0,36	37,0	1,4	0,04	246	136	0,55	1,15	0,60	0,52
37.	098	25	F	9,6	7,5	0,78	6,3	3,4	0,54	171	207	1,21	0,53	0,56	1,06
38.	064	44	F	9,1	7,4	0,81	6,6	1,6	0,24	363	262	0,72	0,56	0,51	0,91
39.	040	43	F	9,1	6,8	0,75	3,2	2,7	0,84	267	275	1,03	0,91	1,03	1,13
40.	037	28	F	8,8	9,0	1,02	4,0	3,9	0,98	317	213	0,67	0,30	1,07	3,57
41.	102	57	F	8,5	4,9	0,58	15,5	7,4	0,42	465	463	0,99	0,82	0,67	0,82
42.	083	59	F	8,2	8,2	1,00	37,0	3,1	0,08	1265	1247	0,98	0,63	1,75	2,78

43.	034	25	8,1	5,5	0,68	9,2	10,3	1,12	168	191	1,14	0,64	0,90	1,40
44.	020	27	7,9	2,2	0,28	5,7	2,9	0,50	86	138	1,60	0,71	0,65	0,91
45.	076	45	7,7	5,7	0,74	2,0	7,8	3,90	840	902	1,07	0,44	0,55	1,25
46.	065	35	7,7	3,2	0,42	1,7	3,6	2,12	198	302	1,52	0,69	0,58	0,84
47.	075	21	7,6	6,8	0,89	1,6	1,9	1,19	276	198	0,72	0,42	0,35	0,83
48.	041	18	6,6	3,2	0,48	2,7	60,0	25,50	249	212	0,87	0,71	1,73	2,44
49.	044	55	6,4	7,3	1,14	2,2	2,6	1,18	191	280	1,46	0,70	0,74	1,05

HCY: homocisteína

No	T1 FVW	T2 FVW	Razão FVW	T1 FVIII	T2 FVIII	Razão FVIII	T1 FG	T2 FG	Razão FG	T1 PAI-1	T2 PAI-1	Razão PAI-1	T1 t-PA	T2 t-PA	Razão t-PA
1.	044	164	1,21	90	145	1,61	3,22	3,66	1,14	40,8	42,6	1,04	5,5	10,0	1,82
2.	041	152	0,99	96	116	1,21	3,28	2,97	0,91	29,1	37,9	1,30	2,0	5,6	2,80
3.	075	123	0,90	143	153	1,07	3,39	3,12	0,92	29,1	60,9	2,09	3,0	2,7	0,90
4.	065	174	1,02	238	156	0,66	3,62	4,02	1,11	38,8	55,6	1,43	9,6	9,8	1,02
5.	076	222	0,91	235	288	1,23	3,79	3,83	1,01	65,8	57,3	0,87	8,9	10,3	1,16
6.	020	222	1,18	154	133	0,86	3,06	3,83	1,25	30,6	32,1	1,05	3,7	9,9	2,68
7.	034	180	1,29	104	192	1,84	4,52	4,52	1,00	29,4	38,6	1,31	4,4	10,1	2,30
8.	083	153	1,33	168	197	1,17	3,92	4,40	1,12	-	14,7	-	8,5	6,0	0,71
9.	102	183	1,08	250	179	0,72	3,66	3,42	0,93	-	42,6	-	10,1	8,5	0,84
10.	037	194	1,01	84	121	1,44	3,32	2,64	0,80	51,7	45,0	0,87	10,1	10,3	1,02
11.	040	178	0,92	215	131	0,61	3,32	3,54	1,07	27,2	29,3	1,08	4,9	8,8	1,80
12.	064	150	0,98	135	104	0,77	4,52	4,02	0,89	37,2	35,5	0,95	5,5	4,1	0,75
13.	098	102	1,62	127	151	1,19	2,89	1,89	0,65	35,4	28,1	0,79	2,9	0,4	0,14
14.	011	160	0,96	141	118	0,84	3,03	2,56	0,84	33,6	32,4	0,96	6,1	12,9	2,11
15.	053	184	1,04	134	104	0,77	4,77	4,52	0,95	53,4	52,3	0,98	28,1	21,3	0,76
16.	099	210	1,10	235	244	1,04	2,36	2,76	1,17	27,4	52,3	1,91	4,3	10,0	2,33
17.	056	160	0,98	110	129	1,17	5,74	4,23	0,74	27,0	18,1	0,67	7,1	10,3	1,45
18.	093	213	0,63	160	159	0,99	3,03	2,89	0,95	14,0	8,7	0,62	4,2	4,6	1,10
19.	012	108	0,83	99	123	1,24	3,09	3,35	1,08	36,7	21,2	0,58	5,2	5,6	1,08
20.	104	186	0,56	129	100	0,78	2,17	2,06	0,95	40,1	38,8	0,97	5,0	5,8	1,16
21.	031	130	0,86	80	78	0,98	3,62	3,06	0,85	24,6	23,7	0,96	3,4	6,0	1,76
22.	055	204	0,95	213	142	0,67	3,54	2,62	0,74	50,6	40,4	0,80	3,0	4,8	1,26
23.	014	261	0,95	237	232	0,98	5,22	4,84	0,93	40,6	55,4	1,36	8,3	13,0	1,57
24.	082	261	0,89	253	260	1,03	3,00	3,70	1,23	13,8	12,7	0,92	4,8	11,2	2,33
25.	097	177	0,92	174	190	1,09	2,56	2,62	1,02	43,5	46,3	1,06	1,9	2,2	1,1
26.	049	130	0,89	79	105	1,33	4,34	3,39	0,78	9,1	24,5	2,69	8,4	9,0	1,07
27.	087	132	1,59	105	112	1,07	3,22	3,06	0,95	54,7	17,1	0,31	6,1	6,4	1,05
28.	101	180	0,75	111	129	1,16	3,25	3,25	1,00	36,0	31,9	0,89	4,1	4,4	1,07
29.	071	48	2,75	132	120	0,91	3,28	4,18	1,27	26,5	24,5	0,92	2,6	2,8	1,08
30.	066	195	1,03	170	133	0,78	3,92	3,58	0,91	42,8	56,1	1,31	11,3	18,1	1,60
31.	107	129	1,93	148	146	0,99	2,39	2,41	1,01	1,2	22,8	19,0	4,0	4,6	1,15
32.	059	178	1,07	114	142	1,25	3,92	3,79	0,97	73,2	94,6	1,29	9,5	10,2	1,07
33.	042	210	0,84	87	122	1,40	4,18	3,03	0,72	28,4	33,7	1,19	2,8	7,4	2,64
34.	081	87	1,72	79	92	1,16	2,64	2,53	0,96	47,1	60,9	1,29	15,0	21,3	1,42
35.	003	210	0,92	192	138	0,72	4,12	2,89	0,70	17,9	27,8	1,55	4,2	4,4	1,05
36.	015	110	1,64	138	164	1,19	5,30	5,14	0,97	33,0	32,8	0,99	7,6	8,5	1,12

No	T1 FWW	T2 FWW	Razão FWW	T1 FVIII	T2 FVIII	Razão FVIII	T1 FG	T2 FG	Razão FG	T1 PAI-1	T2 PAI-1	Razão PAI-1	T1 t-PA	T2 t-PA	Razão t-PA
37.	072	168	0,91	162	98	0,60	3,42	2,28	0,67	26,7	48,8	1,83	12,5	7,5	0,60
38.	061	96	0,94	123	89	0,72	2,74	2,95	1,08	65,4	74,0	1,13	8,4	11,2	1,33
39.	035	249	0,86	169	179	1,06	4,34	2,97	0,68	55,5	52,9	0,95	13,7	17,3	1,26
40.	029	150	1,01	90	99	1,10	2,41	2,81	1,17	19,8	32,1	1,62	4,4	4,1	0,93
41.	109	231	0,56	132	155	1,17	3,00	3,97	1,32	31,8	45,6	1,43	11,5	12,5	1,09
42.	057	220	0,98	171	130	0,76	2,56	2,36	0,92	25,0	33,8	1,35	8,7	14,9	1,71
43.	088	216	0,85	179	195	1,09	3,32	3,18	0,96	56,8	73,1	1,29	5,4	5,9	1,09
44.	002	114	1,49	175	154	0,88	3,50	3,74	1,07	26,9	38,3	1,42	8,7	12,7	1,46
45.	005	218	0,87	258	166	0,64	2,84	2,43	0,86	38,7	36,9	0,95	11,6	9,6	0,83
46.	009	106	0,94	109	87	0,80	2,69	2,41	0,90	59,4	44,2	0,74	8,3	9,0	1,08
47.	024	190	1,00	255	220	0,86	3,03	3,25	1,07	35,5	41,3	1,16	3,5	10,9	3,11
48.	023	112	1,21	114	90	0,79	3,58	4,52	1,26	41,8	41,8	1,0	10,0	9,3	0,93
49.	018	210	0,99	215	177	0,82	3,35	3,88	1,16	34,8	35,6	1,02	10,3	12,2	1,18

FG: fibrinogênio

8. Referências

1. White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation*. 2003;107(23 Suppl 1):I4-8.
2. Anderson FA Jr, Wheeler HB, Goldberg RJ, Hosmer DW, Patwardhan NA, Jovanovic B, Forcier A, Dalen JE. A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. The Worcester DVT Study. *Arch Intern Med*. 1991;151(5):933-8.
3. Cushman M, Tsai AW, White RH, Heckbert SR, Rosamond WD, Enright P, Folsom AR. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in two cohorts: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *Am J Med*. 2004;117(1):19-25.
4. Rosendaal FR. Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2005:1-12.
5. Selhub J, D'Angelo A. Hyperhomocysteinemia and thrombosis: acquired conditions. *Thromb Haemost*. 1997;78(1):527-31.
6. Rees MM, Rodgers GM. Homocysteinemia: association of a metabolic disorder with vascular disease and thrombosis. *Thromb Res*. 1993;71(5):337-59.
7. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 1998;338(15):1042-50.
8. Kang SS, Wong PW, Zhou JM, Sora J, Lessick M, Ruggie N, Grceвич G. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in patients with coronary artery disease. *Metabolism*. 1988;37(7):611-3.
9. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995;10(1):111-3.
10. Tsai AW, Cushman M, Tsai MY, Heckbert SR, Rosamond WD, Aleksic N, Yanez ND, Psaty BM, Folsom AR. Serum homocysteine, thermolabile variant of methylene

- tetrahydrofolate reductase (MTHFR), and venous thromboembolism: Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE). *Am J Hematol.* 2003;72(3):192-200.
11. Davey Smith G, Ebrahim S. 'Mendelian randomization': can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? *Int J Epidemiol.* 2003;32(1):1-22.
 12. D'Angelo A, Mazzola G, Fermo I. Gene-gene and gene-environment interactions in mild hyperhomocysteinemia. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003;33(5-6):337-41.
 13. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol.* 1969;56(1):111-28.
 14. Wilcken DE, Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest.* 1976;57(4):1079-82.
 15. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ.* 2002;325(7374):1202.
 16. Brattstrom L, Tengborn L, Lagerstedt C, Israelsson B, Hultberg B. Plasma homocysteine in venous thromboembolism. *Haemostasis.* 1991;21(1):51-7.
 17. Bienvenu T, Ankri A, Chadeaux B, Kamoun P. Plasma homocysteine assay in the exploration of thrombosis in young subjects. *Presse Med.* 1991;20(21):985-8.
 18. Falcon CR, Cattaneo M, Panzeri D, Martinelli I, Mannucci PM. High prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with juvenile venous thrombosis. *Arterioscler Thromb.* 1994;14(7):1080-3.
 19. den Heijer M, Blom HJ, Gerrits WB, Rosendaal FR, Haak HL, Wijermans PW, Bos GM. Is hyperhomocysteinaemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? *Lancet.* 1995;345(8954):882-5.
 20. den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, Gerrits WB, Bos GM. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost.* 1998;80(6):874-7.

21. Marcucci R, Brunelli T, Giusti B, Fedi S, Pepe G, Poli D, Prisco D, Abbate R, Gensini GF. The role of cysteine and homocysteine in venous and arterial thrombotic disease. *Am J Clin Pathol.* 2001;116(1):56-60.
22. Ridker PM, Hennekens CH, Selhub J, Miletich JP, Malinow MR, Stampfer MJ. Interrelation of hyperhomocyst(e)inemia, factor V Leiden, and risk of future venous thromboembolism. *Circulation.* 1997;95(7):1777-82.
23. Eichinger S, Stumpflen A, Hirschl M, Bialonczyk C, Herkner K, Stain M, Schneider B, Pabinger I, Lechner K, Kyrle PA. Hyperhomocysteinemia is a risk factor of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 1998;80(4):566-9.
24. Morelli VM, Lourenco DM, D'Almeida V, Franco RF, Miranda F, Zago MA, Noguti MA, Cruz E, Kerbauy J. Hyperhomocysteinemia increases the risk of venous thrombosis independent of the C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in selected Brazilian patients. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2002;13(3):271-5.
25. den Heijer M, Lewington S, Clarke R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost.* 2005;3(2):292-9.
26. Domagala TB, Undas A, Libura M, Szczeklik A. Pathogenesis of vascular disease in hyperhomocysteinemia. *J Cardiovasc Risk.* 1998;5(4):239-47.
27. Lee R, Frenkel EP. Hyperhomocysteinemia and thrombosis. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2003;17(1):85-102.
28. Harker LA, Slichter SJ, Scott CR, Ross R. Homocystinemia. Vascular injury and arterial thrombosis. *N Engl J Med.* 1974;291(11):537-43.
29. Harker LA, Harlan JM, Ross R. Effect of sulfapyrazone on homocysteine-induced endothelial injury and arteriosclerosis in baboons. *Circ Res.* 1983;53(6):731-9.
30. Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb.* 1993;13(9):1327-33.

31. Rodgers GM, Conn MT. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood*. 1990;75(4):895-901.
32. Lentz SR, Sadler JE. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest*. 1991;88(6):1906-14.
33. Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ, Bhopatkar MY, Faraci FM, Malinow MR, Heistad DD. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest*. 1996;98(1):24-9.
34. Faraci FM, Lentz SR. Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke*. 2004;35(2):345-7.
35. Verhaar MC, Rabelink TJ. The endothelium: a gynecological and obstetric point of view. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001;94(2):180-5.
36. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(7):1149-60.
37. Hajjar KA, Mauri L, Jacovina AT, Zhong F, Mirza UA, Padovan JC, Chait BT. Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail domain. Direct modulation by homocysteine. *J Biol Chem*. 1998;273(16):9987-93.
38. Harpel PC, Chang VT, Borth W. Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhance the binding of lipoprotein(a) to fibrin: a potential biochemical link between thrombosis, atherogenesis, and sulfhydryl compound metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(21):10193-7.
39. Sauls DL, Wolberg AS, Hoffman M. Elevated plasma homocysteine leads to alterations in fibrin clot structure and stability: implications for the mechanism of thrombosis in hyperhomocysteinemia. *J Thromb Haemost*. 2003;1(2):300-6.
40. Kyrle PA, Stumpflen A, Hirschl M, Bialonczyk C, Herkner K, Speiser W, Weltermann A, Kaider A, Pabinger I, Lechner K, Eichinger S. Levels of prothrombin fragment F1+2 in patients with hyperhomocysteinemia and a history of venous thromboembolism. *Thromb Haemost*. 1997;78(5):1327-31.

41. Al-Obaidi MK, Philippou H, Stubbs PJ, Adami A, Amersey R, Noble MM, Lane DA. Relationships between homocysteine, factor VIIa, and thrombin generation in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2000;101(4):372-7.
42. Undas A, Domagala TB, Jankowski M, Szczeklik A. Treatment of hyperhomocysteinemia with folic acid and vitamins B12 and B6 attenuates thrombin generation. *Thromb Res*. 1999;95(6):281-8.
43. Nappo F, De Rosa N, Marfella R, De Lucia D, Ingrosso D, Perna AF, Farzati B, Giugliano D. Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. *JAMA*. 1999;281(22):2113-8.
44. Gerdes VE, Hovinga HA, ten Cate H, Macgillavry MR, Leijte A, Reitsma PH, Brandjes DP, Buller HR; The Amsterdam Vascular Medicine Group. Homocysteine and markers of coagulation and endothelial cell activation. *J Thromb Haemost*. 2004;2(3):445-51.
45. Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med*. 1999;340(19):1449-54.
46. Brouwer IA, van Dusseldorp M, West CE, Meyboom S, Thomas CM, Duran M, van het Hof KH, Eskes TK, Hautvast JG, Steegers-Theunissen RP. Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. *J Nutr*. 1999;129(6):1135-9.
47. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine: a meta-analysis of the randomized trials. *Am J Clin Nutr*. 2005;82(4):806-12.
48. Cattaneo M, Lombardi R, Lecchi A, Bucciarelli P, Mannucci PM. Low plasma levels of vitamin B(6) are independently associated with a heightened risk of deep-vein thrombosis. *Circulation*. 2001;104(20):2442-6.
49. Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, Spence JD, Pettigrew LC, Howard VJ, Sides EG, Wang CH, Stampfer M. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA*. 2004;291(5):565-75.

-
50. Bonna KH, Njolstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T, Wang H, Nordrehaug JE, Arnesen E, Rasmussen K; NORVIT Trial Investigators. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;354(15):1578-88.
51. Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, McQueen MJ, Probstfield J, Fodor G, Held C, Genest J Jr; Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med*. 2006;354(15):1567-77.
52. B-Vitamin Treatment Trialists' Collaboration. Homocysteine-lowering trials for prevention of cardiovascular events: a review of the design and power of the large randomized trials. *Am Heart J*. 2006;151(2):282-7.
53. Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia: an important risk factor for cardiovascular disease? Potentially, yes. *J Thromb Haemost*. 2003;1(9):1878-9.
54. den Heijer M, Willems HPJ, Blom HJ, Gerrits WBJ, Cattaneo M, Eichinger S, Rosendaal FR, Bos GMJ. Homocysteine lowering by B vitamins and the secondary prevention of deep-vein thrombosis and pulmonary embolism: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial [abstract]. *J Thromb Haemost*. 2005;3:Suppl 1, Abstract H03. [Apresentado no XX Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Sydney, Australia].
55. Pullin CH, Ashfield-Watt PA, Burr ML, Clark ZE, Lewis MJ, Moat SJ, Newcombe RG, Powers HJ, Whiting JM, McDowell IF. Optimization of dietary folate or low-dose folic acid supplements lower homocysteine but do not enhance endothelial function in healthy adults, irrespective of the methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) genotype. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38(7):1799-805.
56. Klerk M, Verhoef P, Verbruggen B, Schouten EG, Blom HJ, Bos GM, den Heijer M. Effect of homocysteine reduction by B-vitamin supplementation on markers of clotting activation. *Thromb Haemost*. 2002;88(2):230-5.
57. Vermeulen EG, Rauwerda JA, van den Berg M, de Jong SC, Schalkwijk C, Twisk JW, Stehouwer CD. Homocysteine-lowering treatment with folic acid plus vitamin B6 lowers

- urinary albumin excretion but not plasma markers of endothelial function or C-reactive protein: further analysis of secondary end-points of a randomized clinical trial. *Eur J Clin Invest.* 2003;33(3):209-15.
58. Peeters AC, van der Molen EF, Blom HJ, den Heijer M. The effect of homocysteine reduction by B-vitamin supplementation on markers of endothelial dysfunction. *Thromb Haemost.* 2004;92(5):1086-91.
59. Dusitanond P, Eikelboom JW, Hankey GJ, Thom J, Gilmore G, Loh K, Yi Q, Klijn CJ, Langton P, van Bockxmeer FM, Baker R, Jamrozik K. Homocysteine-lowering treatment with folic acid, cobalamin, and pyridoxine does not reduce blood markers of inflammation, endothelial dysfunction, or hypercoagulability in patients with previous transient ischemic attack or stroke: a randomized substudy of the VITATOPS trial. *Stroke.* 2005;36(1):144-6.
60. Klerk M, Durga J, Schouten EG, Klufft C, Kok FJ, Verhoef P. No effect of folic acid supplementation in the course of 1 year on haemostasis markers and C-reactive protein in older adults. *Thromb Haemost.* 2005;94(1):96-100.
61. Gomez E, van der Poel SC, Jansen JH, van der Reijden BA, Lowenberg B. Rapid simultaneous screening of factor V Leiden and G20210A prothrombin variant by multiplex polymerase chain reaction on whole blood. *Blood.* 1998;91(6):2208-9.
62. Vermeulen EG, Stehouwer CD, Twisk JW, van den Berg M, de Jong SC, Mackaay AJ, van Campen CM, Visser FC, Jakobs CA, Bulterjis EJ, Rauwerda JA. Effect of homocysteine-lowering treatment with folic acid plus vitamin B6 on progression of subclinical atherosclerosis: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2000;355(9203):517-22.
63. van Dijk RA, Rauwerda JA, Steyn M, Twisk JW, Stehouwer CD. Long-term homocysteine-lowering treatment with folic acid plus pyridoxine is associated with decreased blood pressure but not with improved brachial artery endothelium-dependent vasodilation or carotid artery stiffness: a 2-year, randomized, placebo-controlled trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(12):2072-9.

-
64. Bellamy MF, McDowell IF, Ramsey MW, Brownlee M, Newcombe RG, Lewis MJ. Oral folate enhances endothelial function in hyperhomocysteinaemic subjects. *Eur J Clin Invest.* 1999;29(8):659-62.
65. Woo KS, Chook P, Chan LL, Cheung AS, Fung WH, Qiao M, Lolin YI, Thomas GN, Sanderson JE, Metreweli C, Celermajer DS. Long-term improvement in homocysteine levels and arterial endothelial function after 1-year folic acid supplementation. *Am J Med.* 2002;112(7):535-9.
66. Thambyrajah J, Landray MJ, Jones HJ, McGlynn FJ, Wheeler DC, Townend JN. A randomized double-blind placebo-controlled trial of the effect of homocysteine-lowering therapy with folic acid on endothelial function in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37(7):1858-63.
67. Mangoni AA, Sherwood RA, Asonganyi B, Swift CG, Thomas S, Jackson SH. Short-term oral folic acid supplementation enhances endothelial function in patients with type 2 diabetes. *Am J Hypertens.* 2005;18(2 Pt 1):220-6.
68. van den Berg M, Boers GH, Franken DG, Blom HJ, van Kamp GJ, Jakobs C, Rauwerda JA, Kluft C, Stehouwert CD. Hyperhomocysteinaemia and endothelial dysfunction in young patients with peripheral arterial occlusive disease. *Eur J Clin Invest.* 1995;25(3):176-81.
69. Bozic M, Stegnar M, Fermo I, Ritonja A, Peternel P, Stare J, D'Angelo A. Mild hyperhomocysteinemia and fibrinolytic factors in patients with history of venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2000;100(4):271-8.
70. Freyburger G, Labrousche S, Sassoust G, Rouanet F, Javorschi S, Parrot F. Mild hyperhomocysteinemia and hemostatic factors in patients with arterial vascular diseases. *Thromb Haemost.* 1997;77(3):466-71.
71. Yarnell JW, Sweetnam PM, Rumley A, Lowe GD. Lifestyle and hemostatic risk factors for ischemic heart disease : the Caerphilly Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(1):271-9.
72. Tofler GH, D'Agostino RB, Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Lipinska I, Mittleman MA, Selhub J. Association between increased homocysteine levels and impaired

- fibrinolytic potential: potential mechanism for cardiovascular risk. *Thromb Haemost.* 2002;88(5):799-804.
73. Wiman B. Plasminogen activator inhibitor 1 in thrombotic disease. *Curr Opin Hematol.* 1996;3(5):372-8.
74. Kuch B, Bobak M, Fobker M, Junker R, von Eckardstein A, Marmot M, Hense HW. Associations between homocysteine and coagulation factors--a cross-sectional study in two populations of central Europe. *Thromb Res.* 2001;103(4):265-73.
75. Schreiner PJ, Wu KK, Malinow MR, Stinson VL, Szklo M, Nieto FJ, Heiss G. Hyperhomocyst(e)inemia and hemostatic factors: the atherosclerosis risk in communities study. *Ann Epidemiol.* 2002;12(4):228-36.
76. Bienvenu T, Ankri A, Chadeaux B, Montalescot G, Kamoun P. Elevated total plasma homocysteine, a risk factor for thrombosis. Relation to coagulation and fibrinolytic parameters. *Thromb Res.* 1993;70(2):123-9.
77. Wiman B. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in plasma: its role in thrombotic disease. *Thromb Haemost.* 1995;74(1):71-6.
78. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2000;342(24):1792-801.
79. Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Harrison DG, Mehta JL. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation.* 2004;109(25 Suppl 1):IV6-19.
80. de Jong SC, Stehouwer CD, van den Berg M, Vischer UM, Rauwerda JA, Emeis JJ. Endothelial marker proteins in hyperhomocysteinemia. *Thromb Haemost.* 1997;78(5):1332-7.
81. Andreasen PA, Nielsen LS, Kristensen P, Grondahl-Hansen J, Skriver L, Dano K. Plasminogen activator inhibitor from human fibrosarcoma cells binds urokinase-type plasminogen activator, but not its proenzyme. *J Biol Chem.* 1986;261(17):7644-51.

82. Juhan-Vague I, Alessi MC. Plasminogen activator inhibitor 1 and atherothrombosis. *Thromb Haemost.* 1993;70(1):138-43.
83. Verhaar MC, Wever RM, Kastelein JJ, van Dam T, Koomans HA, Rabelink TJ. 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, restores endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation.* 1998;97(3):237-41.
84. Folsom AR, Nieto FJ, McGovern PG, Tsai MY, Malinow MR, Eckfeldt JH, Hess DL, Davis CE. Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms, and B vitamins: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation.* 1998;98(3):204-10.
85. Ji Y, Diao J, Han Y, Huang Y, Bai H, Chen Q, Fan L, Ferro A. Pyridoxine prevents dysfunction of endothelial cell nitric oxide production in response to low-density lipoprotein. *Atherosclerosis.* [Epub ahead of print] In press 2006.
86. Undas A, Brozek J, Szczeklik A. Homocysteine and thrombosis: from basic science to clinical evidence. *Thromb Haemost.* 2005;94(5):907-15.

ABSTRACT

Background: Mild hyperhomocysteinemia is associated with an increased risk of venous thromboembolism (VTE) and other cardiovascular diseases. Previous studies suggest impaired endothelial function and increased thrombin generation in hyperhomocysteinemic patients. Whether decreasing homocysteine with B-vitamin supplementation interferes with its procoagulant effects is to be determined.

Objectives: To evaluate the correlation between homocysteine and markers of thrombin generation and endothelial function and to evaluate the effect of lowering homocysteine by B-vitamin supplementation on these markers in patients with VTE.

Patients/Methods: This study was a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. We randomized 105 patients with a first event of objectively confirmed VTE, aged between 18 and 70 years, to receive either vitamin supplementation (folic acid 5 mg, vitamin B₆ 50 mg and vitamin B₁₂ 0.4 mg) or placebo. Blood was collected at randomization and 8 weeks after the intervention period.

Results: Ninety-nine (94.3%) completed the 8-week period of treatment. In patients treated with vitamins, there was a 29% decrease in the homocysteine levels and a significant increase in the tissue plasminogen activator (t-PA) levels ($p=0.0008$). Both t-PA and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) levels significantly increased in the group of patients above the highest tertile of basal homocysteine (12.6 $\mu\text{mol/L}$) who received vitamin supplementation ($p=0.0004$ and $p=0.014$, respectively). There was no change in the levels of these two markers in patients with homocysteine levels below the lowest tertile or in patients who received placebo independently of the homocysteine level. All other markers (prothrombin fragment 1+2, thrombin-antithrombin complex, D-dimer, Factor VIII:C and von Willebrand factor antigen) were unaffected by both vitamins and placebo, even in patients above the highest tertile of homocysteine. There was no difference between patients with homocysteine above the highest tertile and those below the lowest tertile (9.9 $\mu\text{mol/L}$) in the levels of these markers.

Conclusions: In patients with VTE, homocysteine reduction by B-vitamin supplementation significantly increased both t-PA and PAI-1 in patients with higher levels of homocysteine. However, there was no effect of homocysteine reduction by B-vitamin supplementation on other markers of endothelial function, fibrinolysis and thrombin generation.

Key words: venous thromboembolism, homocysteine, B-vitamin supplementation, endothelial function, fibrinolysis and thrombin generation.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2ª edição, 2005, 122p.
2. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Writing and editing for biomedical publication [text on the internet]. Vancouver [Canada]; update 2004 Oct [cited 2005 Jan 21]. Available from:
<http://www.icmje.org>