

A HOMOCISTEÍNA COMO FATOR DE RISCO CORONARIANO

Dr. José Rocha Faria Neto¹, Dr. Antonio Carlos P. Chagas²

¹Pós-Graduando da Unidade Clínica de Aterosclerose do Instituto do Coração - HCFMUSP

²Professor Livre-Docente da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

INTRODUÇÃO

A aterosclerose é hoje a maior causa de morte nos países ocidentais. Aproximadamente 45% da população desta parte do planeta morrerá vítima de suas conseqüências¹. No Brasil, as doenças cardiovasculares vitimam cerca de 300 mil pessoas por ano, ou seja, 820 óbitos por dia², o que resulta em 16,22% do total de gastos em assistência médica do Sistema Único de Saúde³.

Alguns dos fatores de risco para a doença aterosclerótica são atualmente bastante conhecidos, como a hipercolesterolemia, hipertensão arterial, tabagismo, diabete melito, história familiar e sedentarismo – este em menor escala. Nos últimos anos, a pesquisa sobre a doença aterosclerótica concentrou-se basicamente nas alterações do perfil lipídico, pois grandes estudos demonstraram clara correlação entre dislipidemias e doença aterosclerótica coronariana (DAC). O estudo de Framingham⁴, realizado com aproximadamente 5 mil habitantes desta comunidade em Massachusetts, demonstrou risco mais elevado quanto maiores os níveis de LDL-colesterol e quanto menor o HDL-colesterol. Demonstrada essa correlação, vários estudos sucederam-se comprovando a hipótese de que é possível o controle de eventos cardiovasculares a partir da normalização dos níveis de colesterol⁵⁻⁷. Entretanto, muitos pacientes com doença cardiovascular apresentam níveis normais de colesterol. Estima-se que representem 30%–35% dos pacientes com DAC. Logo, é contínua a procura por novos fatores que possam estar envolvidos na gênese da aterosclerose coronariana.

Dentre esses novos fatores, a homocisteína (HCT), um aminoácido sulfidrílico formado no metabolismo da metionina, tem sido tema de várias publicações na literatura internacional (ver bibliografia). Elevação leve a moderada da HCT (seja em sua forma reduzida, livre ou ligada à proteína, coletiva-

mente chamadas de homocist(e)ina) tem sido relacionada com doença cardiovascular em estudos retrospectivos (caso-controle) e, recentemente, também em estudos prospectivos. O conhecimento do metabolismo da metionina torna-se necessário para a compreensão dos mecanismos que levam à hiper-homocisteinemia.

METABOLISMO

O metabolismo da metionina inicia-se com a formação de S-adenosilmetionina, que é demetilada para formar S-adenosil-homocisteína. Desta substância, após processo de hidrólise, formam-se adenosina e homocisteína. A HCT pode então seguir dois caminhos distintos: o ciclo de remetilação ou a via de transulfuração. A remetilação ocorre através de duas diferentes reações. A primeira requer a presença da enzima 5-metiltetraidrofolato-homocisteína-metiltransferase. Vitamina B₁₂ e metiltetraidrofolato servem como cofator e cosubstrato para esta enzima. A formação de metiltetraidrofolato é dependente da enzima metilenetetraidrofolatorredutase. A segunda reação existente para a remetilação da HCT é catalisada pela enzima betaina-homocisteína-metiltransferase, também dependente da vitamina B₁₂. O ciclo da remetilação é favorecido quando há deficiência relativa da metionina.

Na via de transulfuração, a homocisteína é ligada à serina para formação de cistationina. Essa reação é dependente da enzima cistationina-β-sintase. A cistationina é então metabolizada em cistina, que é transformada em água e sulfato (excretado pela urina). Quando há excesso de metionina, há favorecimento da via de transulfuração por processo de “up-regulation” da cistationina-β-sintase e “down-regulation” do ciclo de remetilação. A concentração de homocisteína no sangue é reflexo de



sua concentração intracelular e da integridade das várias vias de seu metabolismo⁸. A deficiência da enzima cistationina- β -sintase pode ser responsável por elevações importantes na homocisteinemia^{9,10}.

HOMOCISTEÍNA E LESÃO VASCULAR

Estudos clínicos

As observações iniciais correlacionando a HCT com a aterosclerose datam de 1969, quando McCully demonstrou aterosclerose precoce em crianças com homocistinúria¹¹. A homocistinúria é um distúrbio inato do metabolismo da HCT causado pela homozigose para a deficiência da cistationina- β -sintase, resultando no acúmulo de HCT nos tecidos e no plasma e sua excreção em grande quantidade na urina. Caracteriza-se pelo deslocamento de lentes oculares, retardo mental, desordens esqueléticas e importante agressão vascular, com trombose arterial e venosa. A ocorrência de síndromes clínicas semelhantes, com o mesmo grau de comprometimento vascular, causadas por deficiência de diferentes enzimas envolvidas no metabolismo da metionina, mas todas resultando no acúmulo anormal de HCT, levaram à forte suspeita de que esta era a substância responsável pela agressão vascular. Posteriormente, a infusão de homocisteína em animais de laboratório confirmou a rápida formação de lesões vasculares típicas¹². A confirmação da HCT como fator de risco para doença arterial veio através dos estudos clínicos, mostrando associação com doença vascular periférica^{13,14}, acidente vascular cerebral^{15,16} e coronariopatia^{14,17,18}.

A prevalência de hiper-homocisteinemia em pacientes com doença vascular periférica foi demonstrada, entre outros autores, por Malinow et al.¹⁹, em 1989, em estudo comparativo que envolveu 47 indivíduos com comprometimento vascular e 103 indivíduos sãos. Após correção para idade, colesterolemia, tabagismo e diabetes, demonstrou-se que a alta concentração plasmática de HCT é um fator de risco independente para a doença arterial periférica. Resultado semelhante apresentou Van Der Berg²⁰ em estudo realizado com população abaixo dos 55 anos. O comprometimento vascular pela hiper-homocisteinemia pôde também ser demonstrado em outros vasos. Em estudo realizado com 1.041 pacientes idosos, Selhub et al.²¹ avaliaram, através de ultrasonografia, a presença e o grau de estenose em porção extracranial de artéria carótida e também

a concentração plasmática de homocisteína. O risco de estenose > 25% foi maior em indivíduos que apresentavam níveis de homocisteinemia acima de 11,4 $\mu\text{mol/L}$.

Quanto à doença coronariana, em estudo realizado em população canadense, Dalery¹⁸ comparou o nível sérico de HCT em população de ambos os sexos com doença coronariana angiograficamente comprovada em homens e mulheres sadios e sem fatores de risco para DAC (exceto por tabagismo). Demonstrou que a proporção de pacientes com DAC com níveis de HCT acima do 90º percentil dos controles foi de 18,1% para homens e 44% para mulheres. Dentre os estudos prospectivos que demonstraram a importância da HCT como fator de risco para DAC, destaca-se o de Stampfer et al.¹⁷, que demonstrou em médicos

**NO BRASIL, AS DOENÇAS
CARDIOVASCULARES
VITIMAM CERCA DE 300 MIL
PESSOAS POR ANO, OU
SEJA, 820 ÓBITOS POR DIA,
O QUE RESULTA EM 16,22%
DO TOTAL DE GASTOS EM
ASSISTÊNCIA MÉDICA DO
SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE**

norte-americanos que o risco de IAM em pessoas sem história de doença vascular é 3,4 vezes maior naqueles com altas concentrações de HCT plasmática em comparação com indivíduos com níveis normais. Em estudo recentemente publicado, Nygard et al.²² investigaram prospectivamente a relação entre hiper-homocisteinemia e mortalidade em 587 pacientes com DAC angiograficamente comprovada. Após seguimento médio de quatro anos, 64 pacientes (10,9%) haviam morrido; houve forte correlação entre os níveis de HCT encontrados e a mortalidade cardiovascular, assim demonstrados: apenas 3,8% dos pacientes com homocisteinemia < 9 $\mu\text{mol/L}$ haviam morrido, comparando-se com 24,7% dos pacientes com níveis > 15 $\mu\text{mol/L}$. Concluiu-se que a hiper-ho-





homocisteinemia é forte preditor de mortalidade em pacientes com DAC comprovada.

MECANISMOS DE LESÃO VASCULAR

Homocisteína e endotélio

O endotélio apresenta funções centrais no controle da trombose, na interação de plaquetas e leucócitos com a parede arterial e na regulação do tônus vascular. O controle do tônus é realizado através da liberação de substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras, como as prostaciclina e, principalmente, o óxido nítrico. Esse controle permite aumento do fluxo coronariano em situações de aumento de demanda, como, por exemplo, o exercício físico. Quando há lesão endotelial, como na aterosclerose, há um distúrbio desse controle, podendo levar a situações paradoxais de vasoconstrição sob estímulos que deveriam levar à vasodilatação. Isso foi inicialmente demonstrado no homem por Ludmer et al.²³, através da infusão intracoronariana de acetilcolina. Em células normais, a acetilcolina estimula a liberação endotelial de óxido nítrico, causando vasodilatação. Neste estudo, realizado com pacientes com DAC, demonstrou-se angiograficamente vasoconstrição nos sítios de placas ateroscleróticas após infusão da acetilcolina. Posteriormente, Gordon et al.²⁴ avaliaram também angiograficamente a resposta das artérias coronárias epicárdicas ao esforço realizado com bicicleta ergométrica em posição supina. Dos 28 segmentos angiograficamente normais analisados, 21 apresentaram dilatação ao esforço, quatro não apresentaram alteração e um apresentou constrição. Em contraste, dos dez segmentos com lesão aterosclerótica > 50%, todos apresentaram vasoconstrição.

Vários estudos mostram que a agressão ao endotélio é um dos mecanismos pelo qual a homocisteína leva à lesão vascular. A disfunção endotelial está presente em pacientes jovens com doença arterial periférica oclusiva e hiper-homocisteinemia²⁵. A hiper-homocisteinemia parece atuar como fator de risco independente para disfunção endotelial arterial^{26,27}. Em modelos experimentais e em culturas de células, a HCT produziu efeito lesivo direto ao endotélio^{28,29}. Hiper-homocisteinemia experimental em primatas não-humanos induz desendotelialização e espessamento da íntima^{30,31}. Células endoteliais de aorta bovina e umbilicais humanas expostas à homocisteína exibem liberação de creatinina de modo dose-dependente, captação de azul de tripano, descolamento celular e lise celular, todas manifestações de citotoxicidade^{32,33}. Estudos mais

detalhados dos mecanismos de citotoxicidade demonstraram que o processo é mediado por sulfidrila, é criticamente dependente da disponibilidade de oxigênio e é acelerado por metais³³. A citoproteção pela catalase confirmou o mecanismo através de radicais livres e implicou o peróxido de hidrogênio como a espécie injuriosa nesses modelos experimentais³⁴. Em humanos, Tawakol et al.³⁵ avaliaram através de ultrasonografia vascular a vasodilatação dependente e não-dependente do endotélio em artéria sem comprometimento aterosclerótico de 26 indivíduos idosos com hiper-homocisteinemia, comparando-a com 15 indivíduos, pareados para sexo e idade, com níveis normais de homocisteína. Os autores demonstraram que a vasodilatação dependente do endotélio encontra-se comprometida nos indivíduos com hiper-homocisteinemia. Em cultura de célula muscular lisa arterial na presença de meio rico em homocisteína, Majors et al.³⁶ demonstraram crescimento celular em maior densidade e produção aumentada de colágeno, assim como o seu acúmulo, em relação aos controles. As células tratadas com homocisteína apresentaram síntese de colágeno aumentada em até 214% dos valores dos controles. A adição de cobalamina às culturas tratadas promoveu um controle na proliferação celular e na produção de colágeno.

Homocisteína e plaquetas

Os efeitos da homocisteína na função e sobrevivência plaquetária são objeto de controvérsia. Dois anos após a descrição da homocistinúria como entidade clínica, McDonald et al.³⁷ mostraram que crianças com homocistinúria apresentavam aumento da adesão plaquetária que podia ser reproduzida pela adição de homocisteína ao sangue total normal, porém não observaram efeito na agregação plaquetária. Estudos posteriores, porém, não comprovaram esses efeitos. Estudos em relação à sobrevivência plaquetária não foram menos ambíguos³⁸.

Homocisteína e colesterol

Uma relação muito pouco entendida entre os metabolismos do colesterol e da homocisteína pode representar uma explicação adicional para a aterosclerose induzida pela homocisteína. Infusões de tiolactona de homocisteína aumentam os níveis de colesterol total e LDL-colesterol em coelhos, e a relação entre os níveis de colesterol e de homocisteína em humanos também foi postulada³⁹. A inabilidade de pacientes com deficiência de cistationina-β-sintase em formar cisteína daria alguma luz ao mecanismo bioquímico desta relação obscura, se-



gundo os autores: os produtos finais dos metabolismos do colesterol e da cisteína são o ácido cólico e a taurina, excretados na bile como o ácido biliar conjugado, ácido taurocólico; portanto, a transulfuração impedida da homocisteína à cistina poderia levar à diminuição da eficiência do metabolismo de colesterol, sendo que a aterogenicidade promovida por níveis elevados de LDL seria maior em pacientes com homocistinúria. Além disso, a oxidação da LDL induzida pela homocisteína^{40,41} e a forte carga iônica de proteoglicanos expostos⁴² poderiam facilitar a captação vascular de LDL e levar a um padrão acelerado de aterosclerose; a tiolactona da LDL pela tiolactona de homocisteína representaria um meio potencial adicional de modificação da LDL nessa doença, de significância não-determinada. Por outro lado, segundo Blom et al.⁴³, o risco aumentado de aterosclerose na hiper-homocisteinemia não é devido ao aumento da peroxidação lipídica.

Boushey et al.⁴⁴, em recente revisão, resumiram um grande número de evidências convincentes, associando níveis elevados de homocisteína e doença vascular. Baseados nos dados da literatura, os autores concluíram que o aumento de 5 µmol/L nos níveis de homocisteína total conferia o mesmo aumento de risco para doença vascular que um aumento de 20 mg/dL nos níveis de colesterol total. Recentemente, Tonstad et al.⁴⁵ estudaram 155 crianças de ambos os sexos, entre 7 e 17 anos, com hipercolesterolemia familiar, e concluíram que níveis moderadamente elevados de homocisteinemia podem contribuir para o risco familiar de doença cardiovascular nessa patologia e postulam a inclusão de recomendações dietéticas que afetem o metabolismo da homocisteína nesses pacientes.

Homocisteína e coagulação

A ativação de fatores de coagulação V e XII, induzida pela homocisteína⁴⁶, pode contribuir para a predisposição trombótica da homocistinúria. A ativação do fator V é também indiretamente mediada e atribuída à indução, pela homocisteína, de uma protease ativadora do fator V. Mais ainda, o mecanismo da proteína C para a inativação dos fatores V e VIII é impedido em células endoteliais tratadas com homocisteína⁴⁷. Isso é atribuído à possível ação da homocisteína como um inibidor competitivo da ligação da trombina com a trombomodulina. Dados mais recentes sugerem que a homocisteína reduz diretamente a expressão de trombomodulina em células endoteliais, com conseqüente inibição da atividade da prote-

ína C⁴⁸. Entretanto, as atividades dos fatores de coagulação não estão evidentemente aumentadas em pacientes com homocistinúria.

CAUSAS DE HIPER-HOMOCISTEINEMIA

O termo hiper-homocisteinemia familiar foi introduzido na literatura por Genest et al.⁴⁹, em um trabalho que analisava dados de estudo de pais e parentes de pacientes com doença coronariana prematura.

Hiper-homocisteinemia severa é usualmente resultado de deficiência homozigótica da cistationina-β-sintase (CBS). O gene desta enzima é herdado de modo recessivo autossômico e demonstra

ALGUNS DOS FATORES DE RISCO PARA A DOENÇA ATEROSCLERÓTICA SÃO ATUALMENTE BASTANTE CONHECIDOS, COMO A HIPERCOLESTEROLEMIA, HIPERTENSÃO ARTERIAL, TABAGISMO, DIABETE MELITO, HISTÓRIA FAMILIAR E SEDENTARISMO – ESTE EM MENOR ESCALA

marcada heterogeneidade genética. A incidência da deficiência homozigótica é estimada em 1 em cada 335 mil nascimentos⁵⁰. O gene para CBS está localizado no cromossomo 21⁵¹. Pacientes com trissomia 21 possuem atividade enzimática de até 166% do normal; é interessante que esses pacientes raramente desenvolvem doença aterosclerótica⁵². Em anos recentes, verificou-se que a herança de somente um gene CBS funcional pode resultar também em hiper-homocisteinemia, apesar do grau moderado. A incidência de deficiência heterozigótica da CBS é estimada entre 0,3% e 1,0% da população geral.

Deficiências de enzimas da via da remetilação também podem resultar em hiper-homocisteinemia. A enzima metilenotetraidrofolatorredutase (MTHFR)





catalisa a conversão de 5,10-metilenotetraidrofolato a 5-metiltetraidrofolato. A deficiência homozigótica dessa enzima ocorre na população geral numa taxa de 1/10 da deficiência de CBS⁵³. Pacientes com deficiência homozigótica não apresentam atividade enzimática e desenvolvem hiper-homocisteinemia e síndrome clínica consistindo de disfunção neurológica, retardo psicomotor, epilepsia e neuropatia periférica. Autópsias de pacientes homozigóticos revelaram uma alta incidência (70%) de trombozes arteriais e venosas⁵⁴. A deficiência heterozigótica resulta em cerca de 50% da atividade enzimática normal, o que aparentemente é adequado para a proteção contra deficiências neurológicas.

Kang et al. descreveram um mutante termolábil do MTHFR que ocorre em pacientes neurologicamente normais⁵⁵; de 16 pacientes que eram heterozigotos obrigatórios para deficiência severa de MTHFR, quatro tinham herdado um gene da variante termolábil. Esta enzima possui 50% da atividade normal da MTHFR e pode resultar em elevação moderada dos níveis sanguíneos de MTHFR⁵⁶. A forma termolábil da enzima (MTHFR-T) resulta da transição 677 C → T no gene da MTHFR (Ala 677 → Val) e compromete o local de ligação com o ácido fólico que, uma vez não-ativo, dificulta a metabolização da homocisteína. Homozigotos para MTHFR-T têm níveis de homocisteína 2,5 vezes superiores aos valores observados entre indivíduos normais ou heterozigotos.

A prevalência da homozigose para MTHFR é comum na população geral, sendo detectada em 5%–15% das populações caucasóides japonesas e do Oriente Médio, mas é menos freqüente (1%–2%) entre populações africanas⁵⁸.

No Brasil, foi verificado que apenas 4% de 296 indivíduos eram homozigotos para a variante termolábil dessa enzima⁵⁹, mas nenhuma correlação com os níveis plasmáticos de homocisteína foi estudada.

Alguns outros fatores têm sido relacionados com o aumento na concentração plasmática da homocisteína. Sabe-se que há elevação dos níveis de HCT com a idade⁶⁰, mas os fatores que determinam tal

elevação não são conhecidos. Os níveis encontrados em homens são, em geral, mais elevados que nas mulheres; a diferença talvez esteja relacionada aos hormônios sexuais, já que os níveis podem elevar-se após a menopausa⁶¹. A homocisteinemia está também inversamente relacionada com a função renal, com níveis consistentemente elevados em pacientes em hemodiálise⁶². Algumas doenças crônicas podem cursar com hiper-homocisteinemia, como a psoríase severa⁶³ (possivelmente por uma queda nos níveis de folato) e alguns tipos de câncer⁶⁴.

Entre os fatores adquiridos relacionados com a hiper-homocisteinemia, encontram-se em destaque as alterações nutricionais relacionadas com os níveis séricos de folato, cossustrato e vitaminas B₁₂ e B₆, cofatores no metabolismo da HCT. Por ocasião do 20º exame do estudo epidemiológico de Framingham (1988–1989)⁶⁵, avaliaram-se os níveis séricos de HCT em 1.160 indivíduos com idade variando de 67 a 96 anos. A prevalência de HCT elevada (> 14 µmol/L) foi de 29,3% neste subgrupo e foi maior entre aqueles com baixos níveis de folato. Por outro lado, concentrações plasmáticas inadequadas de uma ou mais vitaminas B contribuíram para 67% dos casos de hiper-homocisteinemia.

Não dispomos até o momento de estudos publicados que demonstrem o papel da homocisteína como fator de risco na população brasileira. Os dados disponíveis referem-se a populações distintas da brasileira em vários aspectos. Por tratar-se de um país em desenvolvimento, encontramos no Brasil carências alimentares peculiares à baixa condição social de parte significativa de nossa população. Logo, sendo a HCT uma substância derivada unicamente da metionina proveniente da ingesta protéica diária, e sendo o seu metabolismo também dependente de substâncias encontradas na dieta, torna-se necessário avaliar o papel da hiper-homocisteinemia como fator de risco para doença coronariana em nossa população. Se a redução da homocisteína implicará redução do risco cardiovascular é uma questão que somente estudos randomizados prospectivos poderão responder. ■

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roberts WC. Preventing and arresting coronary atherosclerosis. *Am Heart J* 1995; 130: 580-600.
2. Lotufo PA. Epidemiologia das doenças cardíacas no Brasil: histórico, situação atual e proposta de modelo teórico. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 1996; 5: 541-7.
3. Costa EA, Klein CH. Meio urbano e doenças cardiovasculares. *Cadernos de Saúde Pública* 1985; 1: 305-12.
4. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PWF, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham study. *JAMA* 1986; 256: 2835-38.
5. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4.444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Group (4S). *Lancet* 1994; 344: 1383-94.
6. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA et al. Cholesterol and recurrent events (CARE). *N Engl J Med* 1996; 335: 1001-9.
7. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. The West of Scotland Coronary Prevention Study. *N Engl J Med* 1995; 333: 1301-7.



8. Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. *JACC* 1996; 27: 517-27.
9. Masser PA, Taylor LM, Porter JM. Importance of elevated plasma homocysteine levels as a risk factor for atherosclerosis. *Ann Thorac Surg* 1994; 58: 1240-6.
10. Van Der Berg, Boers GHJ. Homocystinuria: what about mild hyperhomocysteinemia. *Postgrad Med J* 1996; 72: 513-8.
11. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-28.
12. Harker CA, Slichter SF, Scott CR, Ross R. Homocysteinemia: vascular injury and arterial thrombosis. *N Eng J Med* 1974; 291: 537-43.
13. Boers GHJ, Smals AGH, Trijbels FJM et al. Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. *N Eng J Med* 1985; 313: 709-15.
14. Clarke R, Daly L, Robinson K et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Eng J Med* 1991; 324: 1149-55.
15. Coul BM, Malinow MR, Beamer N et al. Elevated plasma homocyst(e)line concentration as a possible independent risk factor for stroke. *Stroke* 1990; 21: 572-6.
16. Perry IJ, Refsum H, Morris RW. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet* 1995; 346 (8987): 1395-8.
17. Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC et al. A prospective study of plasma homocyst(e)line and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992; 268: 877-81.
18. Dalery K, Lussier-Cacan S, Selhuub J et al. Homocysteine and coronary artery disease in French Canadian subjects: relation with vitamins B₁₂, B₆, pyridoxal phosphata and folate. *Am J Cardiol* 1995; 75: 1107-11.
19. Malinow MR, Kang SS, Taylor LM et al. Prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with peripheral arterial disease. *Circulation* 1989; 79: 1180-8.
20. Van Der Berg M, Stehower CDA, Bierdhager E, Rauwerda JA. Plasma homocysteine and severity of atherosclerosis in young patients with lower-limb atherosclerotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 165-71.
21. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG et al. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Eng J Med* 1995; 332: 286-91.
22. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H et al. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Eng J Med* 1997; 337: 230-6.
23. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Eng J Med* 1986; 315: 1046-52.
24. Gordon JB, Ganz P, Nabel EG et al. Atherosclerotic and endothelial function influence the coronary vasomotor response to exercise. *J Clin Invest* 1989; 83: 1946-52.
25. Van Der Berg M, Boers GH, Franken DG, Blom HJ, van Kamp GJ, Jakobs C, Rauwerda JA, Kluff C, Stehouwert CD. Hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction in young patients with peripheral arterial occlusive disease. *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 176-81.
26. Woo KS, Chook P, Lolini YI, Cheung ASP, Chan LT, Sun YY, Sanderson JE, Metreweli C, Celermajer DS. Hyperhomocyst(e)linemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 1997; 96: 2542-44.
27. Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ, Bhopitkar MY, Faraci FM, Malinow MR, Heistad DD. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)linemia. *J Clin Invest* 1996; 98: 24-9.
28. Harker LA, Ross R, Slichter SJ et al. Homocysteine-induced arteriosclerosis: the role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 1976; 58: 731-41.
29. Wall RT, Harlan JM, Harker LA et al. Homocysteine-induced endothelial cell injury. *Thromb Res* 1980; 18: 113-21.
30. Harker LA, Slichter SJ, Scott CR, Ross R. Homocysteinemia, vascular injury and arterial thrombosis. *N Engl J Med* 1974; 291: 537-43.
31. Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR. Homocysteine-induced atherosclerosis. The role of endothelial-cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 1976; 58: 731-41.
32. De Groot PG, Willems C, Godfried H. Endothelial cell dysfunction in homocystinuria. *Eur J Clin Invest* 1983; 13: 405-10.
33. Wall RT, Harlan JM, Harker LA, Striker GE. Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury. *Thromb Res* 1980; 18: 113-21.
34. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* 1986; 77: 1370-6.
35. Tawakol A, Omland T, Gerhard M et al. Hiperhomocyst(e)linemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation* 1997; 95: 1119-21.
36. Majors A, Ehrhart LA, Pezacka EH. Homocysteine as a risk factor for vascular disease: enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2074-81.
37. McDonald L, Bray C, Field C, Love F, Davies B. Homocystinuria, thrombosis, and blood-platelets. *Lancet* 1964; i: 745-6.
38. Uhlemann ER, Ten Pas JH, Lucky AW, Schulman JD, Mudd SH, Shulam N. Platelet survival and morphology in homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency. *N Engl J Med* 1976; 295: 1283-6.
39. Olszewski AJ, Szostak WB, Bialkowska M, Rudnicki S, McCully KS. Reduction of plasma lipid and homocysteine levels by pyridoxine, folate, cobalamin, choline, riboflavin, and troloxeratin in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1989; 75: 1-6.
40. Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA, Chait A. The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1987; 262: 10098-103.
41. Parthasarathy S. Oxidation of low-density lipoprotein by thiol compounds leads to its recognition by the acetyl LDL receptor. *Biochim, Biophys, Acta* 1987; 917: 337-40.
42. McCully KS. Importance of homocysteine-induced abnormalities of proteoglycan structure in arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1979; 59: 181-93.
43. Blom HJ, Kleinvelde HA, Boers GH, Demacker PN, Hak-Lemmers HL, Te Poele-Pothoff MT, Trijbels JM. Lipid peroxidation and susceptibility of low-density lipoprotein to in vitro oxidation in hyperhomocysteinemia. *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 149-54.
44. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995; 274: 1049-57.
45. Tonstad S, Refsum H, Ueland PM. Association between plasma total homocysteine and parental history of cardiovascular disease in children with familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1997; 96: 1803-8.
46. Rodgers GM, Kane WH. Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest* 1986; 77: 1909-16.
47. Rodgers GM, Conn MT. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood* 1990; 75: 895-901.
48. Lentz SR, Sadler JE. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic homocysteine. *J Clin Invest* 1991; 88: 1900-4.
49. Genest JJ, McNamara JR, Upson B, Salem DN, Ordovas JM, Schaefer EJ, Malinow MR. Prevalence of familial hyperhomocyst(e)linemia in men with premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 1129-36.
50. Kang SS, Wong PWK, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)linemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr* 1992; 12: 279-98.
51. Skovby F, Krassikoff N, Francke U. Assignment of the gene for cystathionine-β-synthase to human chromosome 21 in somatic cell hybrids. *Hum Genet* 1984; 65: 291-4.
52. Brattström L, Englund E, Brun A. Does Down syndrome support homocysteine theory of arteriosclerosis? *Lancet* 1987; i(8529): 391-2.
53. Kang SS, Wong PWK, Bock HGO, Horwitz A, Grix A. Intermediate hyperhomocysteinemia resulting from compound heterozygosity of methylenetetrahydrofolate reductase mutations. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 546-51.
54. Skovby F. Inborn errors of metabolism causing homocysteinemia and related vascular involvement. *Haemostasis* 1989; 19 (suppl. 1): 4-9.
55. Kang SS, Zhou J, Wong PWK, Kowalysyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 414-21.
56. Kang SS, Wong PWK, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 536-45.
57. Motulsky AG. Nutritional ecogenetics: homocysteine-related arteriosclerotic vascular disease, neural tube defects, and folic acid. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 17-20.
58. Ubbink JB, Vermaak WJH, Delport R, van der Merwe A, Becker PJ, Potgieter H. Effective homocysteine metabolism may protect South African blacks against coronary heart disease. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 802-8.
59. Arruda VR, von Zuben PM, Chiapparini LC, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF. The mutation Ala 677 → Val in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 77: 818-21.
60. Kang SS, Wong PWK, Cook HY et al. Protein-bound homocysteine: a possible risk factor for coronary disease. *J Clin Invest* 1986; 77: 1482.
61. Boers GH, Smals AG, Trijbels FJ, Leemakers AI, Kloppenborg PW. Unique efficacy of methionine metabolism in premenopausal women may protect against vascular disease in reproductive years. *J Clin Invest* 1983; 72: 1971-6.
62. Kang SS, Wong PWK, Bidani A et al. Plasma protein bound homocyst(e)line in patients requiring chronic haemodialysis. *Clin Sci* 1983; 65: 335-6.
63. Ueland PM, Refsum H, Brattstrom L. Plasma homocysteine and cardiovascular disease. In: Francis RB Jr (ed.). *Atherosclerotic Cardiovascular Disease, Hemostasis and Endothelial Function*. New York: Marcel Dekker, 1992, p. 183-236.
64. Wu JT, Wu L, Wilson W. Increased levels of plasma homocysteine in patients with various carcinomas (abstract). *Ir J Med Sci* 1995; 164: 29A.
65. Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF et al. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993; 270: 2696-8.