

## Homocisteína Plasmática Total e Fator von Willebrand no Diabete Melito Experimental

*Total Plasmatic Homocysteine and von Willebrand Factor in Experimental Diabetes Mellitus*

Renato Delascio Lopes, Lindalva Batista Neves, Vânia D'Almeida, Gleice Margarete de Souza Conceição, Alexandre Gabriel Junior

Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP-EPM - São Paulo, SP

### Resumo

**Objetivos:** Determinar os valores plasmáticos de homocisteína e fator von Willebrand, como marcador de disfunção endotelial, em ratos com diabete melito induzido por estreptozotocina.

**Métodos:** Trinta e cinco ratos (*Rattus norvegicus albinus*), machos, adultos (180-200 g), randomizados em três grupos: controle (n=10) não receberam agente ou veículo; sham (n=10) receberam solução veículo da estreptozotocina; e diabético (n=15) receberam estreptozotocina. Após oito semanas de indução do diabete melito, os animais foram pesados, anestesiados e tiveram sangue colhido da aorta abdominal para determinação dos valores de homocisteína plasmática total, fator von Willebrand e glicemia.

**Resultados:** O modelo experimental foi reprodutível em 100% dos animais. A média das concentrações plasmáticas de homocisteína foi: 7,9  $\mu\text{mol/l}$  (controle); 8,6  $\mu\text{mol/l}$  (sham) e 6,1  $\mu\text{mol/l}$  (diabético), com diferença entre os grupos ( $p < 0,01$ ). Pelo método de comparações múltiplas entre os grupos, observou-se que os valores no grupo diabético foram menores que no sham ( $p \leq 0,01$ ). A média dos valores do fator von Willebrand foi 0,15 U/l (controle), 0,16 U/l (sham) e 0,18 U/l (diabético), com diferença entre os grupos ( $p = 0,03$ ). A média dos seus valores no grupo diabético foi maior que no grupo controle ( $p \leq 0,05$ ). No grupo diabético não houve correlação entre homocisteína e fator von Willebrand.

**Conclusão:** No diabete melito induzido por estreptozotocina constataram-se valores reduzidos de homocisteína e elevados de fator von Willebrand, sem, contudo, haver correlações entre si e com níveis de glicemia final.

**Palavras-chave:** Homocisteína / sangue, fator de von Willebrand, diabete melito, epidemiologia, experimental.

### Summary

**Objectives:** To determine the plasma homocysteine and von Willebrand factor levels as markers of endothelial dysfunction in rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin.

**Methods:** Thirty-five adult male rats (*Rattus norvegicus albinus*) (weight between 180-200g) were randomized into three groups: control group (n=10), which received no drugs or vehicles; sham group (n=10), which received streptozotocin solution; and diabetic group (n=15), which received streptozotocin. Eight weeks after diabetes mellitus induction, the animals were weighed and anesthetized; blood samples were collected from abdominal aorta for plasma total homocysteine, von Willebrand factor and glucose levels.

**Results:** The experimental model was reproducible in 100% of animals. The mean plasma homocysteine levels were: 7.9  $\mu\text{mol/l}$  (control), 8.6  $\mu\text{mol/l}$  (sham) and 6.1  $\mu\text{mol/l}$  (diabetic), with difference among the groups ( $p < 0.01$ ). Multiple comparison analysis among the groups showed that values in the diabetic group were lower than in the sham group ( $p \leq 0.01$ ). The mean von Willebrand factor values were 0.15 U/l (control), 0.16 U/l (sham) and 0.18 U/l (diabetic), with difference among the groups ( $p = 0.03$ ). The mean value was higher in the diabetic group than in the control group ( $p \leq 0.05$ ). Correlation between homocysteine and von Willebrand factor was not observed in the diabetic group.

**Conclusion:** Reduced homocysteine levels and increased von Willebrand factor levels were observed in diabetes mellitus induced by streptozotocin; nevertheless, there were no correlations between them and with final glucose levels.

**Key words:** Homocysteine / blood; von Willebrand factor; diabetes mellitus; epidemiology; experimental.

### Introdução

O diabete melito (DM), doença caracterizada fundamentalmente por distúrbio no metabolismo dos hidratos

de carbono, cursa habitualmente com macro e microangiopatia, neuropatia periférica, de nervos cranianos e autossômica, que acarretam isoladamente ou associados, importantes complicações clínicas, com elevado índice de mortalidade.

No que diz respeito à vasculopatia, o endotélio é o principal responsável e vários elementos têm sido incriminados pela sua disfunção.

O objetivo deste trabalho é estudar as possíveis alterações dos níveis plasmáticos da homocisteína (He) e do fator von

**Correspondência:** Renato Delascio Lopes •

Rua Pedro de Toledo, 980, 11º andar, conj. 116 - Vila Clementino -

04039-002 - São Paulo, SP

E-mail: rdlopes@climed.epm.br

Artigo recebido em 02/05/06, revisado recebido em 12/06/06; aceito em 12/06/06.

Willebrand (fvW), sabidamente relacionados à patogênese da disfunção endotelial, em ratos portadores de DM induzida por estreptozotocina (STZ).

## Métodos

Trata-se de um estudo experimental. Foram utilizados ratos da linhagem *rattus norvegicus albinus*, *Rodentia*, *mammalia*, machos, adultos, pertencentes à mesma faixa etária, com pesos entre 180 e 200 g. Os animais foram pesados no início do experimento e semanalmente até o dia do sacrifício e randomizados em três grupos: Grupo I (controle): os animais permaneceram em regime de alimentação normal e água *ad libitum*; Grupo II (*sham*): receberam somente solução veículo da STZ (tampão citrato 0,1M, pH 4,5) e permaneceram em iguais condições locais e de alimentação aos do grupo I; Grupo III (diabete): receberam injeção de STZ (Sigma® IP).

Para indução do DM utilizou-se STZ (dose única de 60 mg/kg de peso), intraperitoneal, diluída em 0,3 ml de solução tampão citrato 0,1M<sup>1-3</sup>. Nas primeiras 48 horas, aos ratos diabéticos foram oferecidas soluções de glicose (2,5% e 5%) substituindo a água, para evitar hipoglicemia por hiperinsulinemia resultante da destruição das células beta do pâncreas. Durante as primeiras 72 horas após administração de STZ, a glicemia foi determinada diariamente, sempre no mesmo horário, para comprovar a reprodutibilidade do método, utilizando-se aparelho Advantage (Roche®) com sangue obtido por punção da veia da cauda dos animais. Foram considerados diabéticos os ratos cujos valores de glicemia foram iguais ou superiores a 250 mg/dl<sup>1-5</sup>.

Após oito semanas de indução do DM, os animais foram pesados, tiveram suas glicemias aferidas e foram submetidos a anestesia com tionebutal (Sigma®) intraperitoneal (50 mg/kg de peso) para posterior coleta de sangue e sacrifício.

A coleta de sangue foi realizada através de punção de artéria aorta abdominal e 3 ml de sangue foram colocados em tubos contendo EDTA como anticoagulante, centrifugado a 3.000 rpm e o plasma alíquotado em "vials" de 1 ml e acondicionados em congelador a -20°C até a determinação dos níveis de He total plasmática. O sangue restante foi colocado em tubo seco, centrifugado, e o soro foi alíquotado em "vials" de 1,5 ml, congelados a -20°C, para a determinação do fvWe glicemia.

A determinação da He total plasmática foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), por detecção fluorimétrica, seguindo protocolo padronizado e baseado na metodologia descrita por Pfeiffer e cols.<sup>6</sup> e utilizado por Cruz e cols.<sup>7</sup>. O plasma passou por três etapas de preparação: redução, precipitação de proteínas e derivatização. O sistema utilizado foi da Shimadzu®, constando de auto-injetor modelo SIL-10 Advp, bombas e detector de fluorescência modelo RF – 10AXL. A separação foi com uma coluna Prodigy ODS2, 150 x 3,2 mm com micropartículas de 5 µm (Phenomenex®) e por uma pré-coluna de Adsorbosphere® C18 de 7,5 x 4,6 mm com micro-partículas de 5 µm (Alltech®). A detecção foi feita com o detector ajustado para excitação a 385 µm e emissão a 515 µm.

Para dosar a glicemia de jejum inicial (Glic inicial) e ao

término do experimento (Glic final) utilizou-se o método enzimático-colorimétrico, glicose oxidase/peroxidase (GOD PAP-Celm), e considerando-se valores de referência entre 75-99 mg/dl. O fvW foi determinado pela técnica de Elisa, utilizando-se kit von Willebrand factor (DAKO®).

O trabalho foi avaliado e devidamente aprovado pelo CEP 1341/05. Durante a análise estatística, para avaliar se as médias das variáveis em estudo eram as mesmas nos três grupos, utilizou-se à análise de variância (ANOVA) com o fator fixo (grupo) e três níveis (controle, *sham* e diabete). Para a variável glicemia final, utilizou-se a transformação inversa, para estabilizar a variância. Quando a ANOVA mostrou que as médias dos grupos não eram idênticas, utilizou-se o procedimento de comparações múltiplas de Tukey para identificar quais grupos eram responsáveis por essas diferenças. Foram construídos diagramas de dispersão e calculados os coeficientes de correlação de Pearson para avaliar a presença de associação linear entre as variáveis em estudo. O nível de significância foi fixado em 5% em todas as análises.

## Resultados

O modelo experimental de DM foi reprodutível em 100% dos animais. A tabela 1 mostra valores da média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo para as variáveis em estudo em cada grupo. As figuras de 1 a 4 contêm os box-plots para essas variáveis.

A tabela 1 também apresenta o nível descritivo da análise de variância empregada para comparar as médias dos três grupos, para cada variável. Segundo essa análise, não houve diferença entre as médias da glicemia inicial nos três grupos ( $p=0,23$ ). Para as demais variáveis (He plasmática, fvW e concentração sérica de glicemia no dia do sacrifício), as médias não foram iguais nos três grupos ( $p<0,01$ ,  $p=0,03$  e  $p<0,01$ , respectivamente).

Segundo o procedimento de comparações múltiplas de Tukey, a He média foi menor no grupo de animais diabéticos do que nos grupos controle e *sham*, não havendo diferença entre as médias dos grupos controle e *sham* ( $p<0,05$ ). Em relação ao fvW, a média foi maior no grupo diabete do que no controle; nenhuma outra diferença entre os grupos foi detectada ( $p<0,05$ ). Para a glicemia final, a média foi maior no grupo diabete do que nos grupos controle e *sham*, não havendo diferença entre as médias dos grupos controle e *sham* ( $p<0,05$ ).

A tabela 2 apresenta os coeficientes de correlações de Pearson entre as variáveis em estudo para o grupo diabete. Não se observaram correlações entre as variáveis: He plasmática, fvW e glicemia ao término do experimento.

## Discussão

O DM, doença responsável por inúmeras complicações cardíacas e vasculares, apresenta como elemento importante na sua fisiopatologia a disfunção endotelial, e várias alterações bioquímicas plasmáticas são tidas como responsáveis.

A He, relacionada pela primeira vez em 1969 como causa de aterosclerose<sup>8</sup>, vem alcançando importância como fator

Tabela 1 - Medidas descritivas para a glicemia (Glic) inicial e final, homocisteína (He) e fator von Willebrand (fvW), em cada grupo e nível descritivo da ANOVA

		Controle	Sham	Diabete	Nível descritivo
He	Média	7,9	8,6	6,1	<0,01
	Desvio padrão	2,3	2,2	1,3	
	Mínimo	4,2	6,4	3,2	
	Mediana	7,7	7,8	6,3	
	Maximo	12,0	13,0	8,1	
fvW	Média	0,15	0,16	0,18	0,03
	Desvio padrão	0,3	0,2	0,4	
	Mínimo	0,11	0,13	0,14	
	Mediana	0,15	0,15	0,18	
	Maximo	0,19	0,19	0,26	
Glic inicial	Média	88,7	88,9	85,1	0,23
	Desvio padrão	5,9	8,2	5,2	
	Mínimo	80,0	80,0	80,0	
	Mediana	90,0	88,0	83,0	
	Maximo	99,0	101,0	98,0	
Glic final	Media	85,0	80,9	353,5	<0,01
	Desvio padrão	7,1	5,0	98,2	
	Mínimo	76,0	75,0	245,0	
	Mediana	84,5	79,5	349,0	
	Maximo	99,0	91,0	561,0	

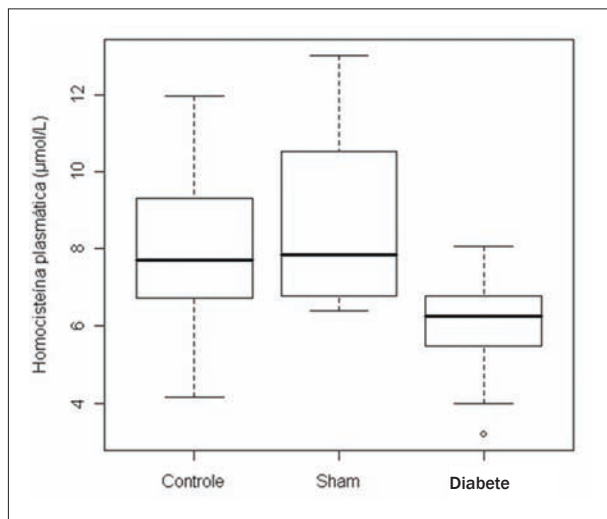


Fig. 1 - Homocisteína plasmática total em cada grupo (box-plot). Diferenças encontradas ( $p < 0,05$ ): diabete x controle; diabete x sham.

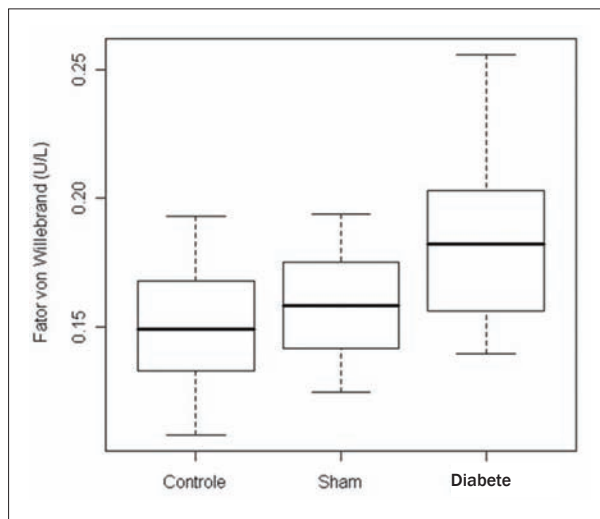


Fig. 2 - Fator von Willebrand em cada grupo (box-plot). Diferenças encontradas ( $p < 0,05$ ): diabete versus controle.

de risco para doença arterial coronária<sup>9-15</sup>, sendo intrigante sua possível participação na patogênese da disfunção endotelial. Aminoácido formado exclusivamente a partir da desmetilação da metionina da dieta ou do catabolismo, contém um grupamento tiol (SH-) e não participa da formação de proteínas<sup>16</sup>. Apenas 2% a 5% da He plasmática livre são

encontradas em sua forma reduzida, e 70% a 80% circulam ligadas a proteínas plasmáticas, principalmente albumina.

A prevalência da hiper-homocisteinemia (HHe) é de 5% a 7% na população geral e níveis intermediários são encontrados em 13% a 47% dos indivíduos com doença vascular aterosclerótica sintomática<sup>17-19</sup>. Várias publicações correlacionam HHe com

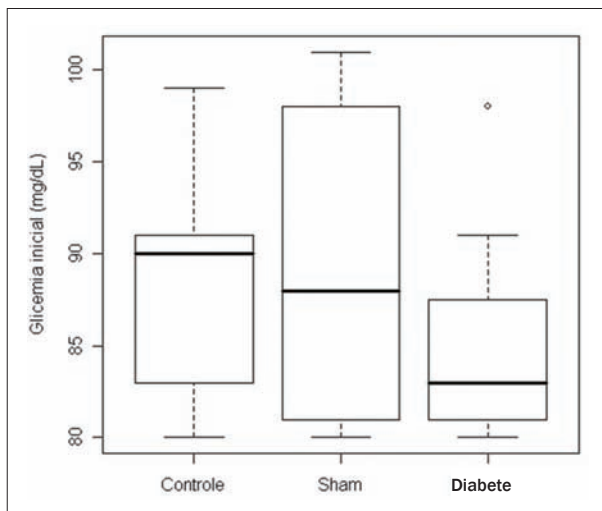


Fig. 3 - Glicemia de jejum inicial em cada grupo (box-plot). Nenhuma diferença entre as médias foi detectada ( $p=0,23$ ).

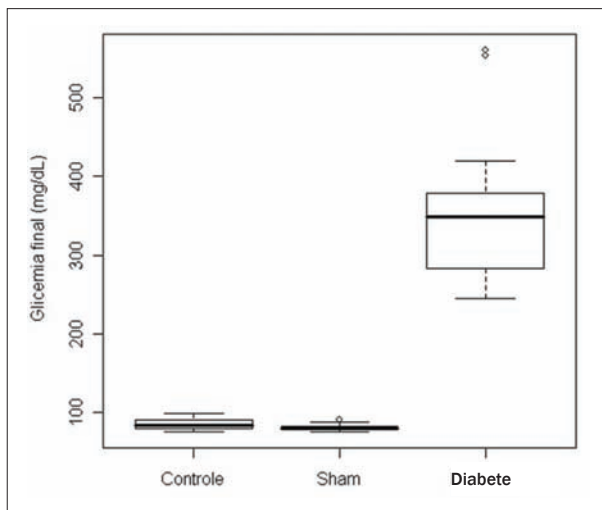


Fig. 4 - Glicemia de jejum final em cada grupo (box-plot). Diferenças encontradas ( $p<0,05$ ): diabete x controle; diabete x sham.

Tabela 2 – Coeficientes de correlações de Pearson entre as variáveis em estudo em cada grupo

Diabete	He	fvW
fvW	0,13*	
Glic final	-0,06*	0,18*

\* NS; fvW - fator von Willebrand; Glic - Glicemia.

doença arterial coronária, cerebral e periférica, assim como trombose venosa, e tem se mostrado importante fator de risco cardiovascular independente dos demais<sup>20</sup>.

Metanálise com mais de 4.000 pacientes envolvendo 27 estudos mostrou que a partir de valores de He acima de 10  $\mu\text{mol/l}$ , o acréscimo de 5  $\mu\text{mol/l}$  de He circulante associa-se a

maior risco para doença cardiovascular. Aumento de 5  $\mu\text{mol/l}$  de He corresponde a aumento de 20 mg/dl de colesterol total plasmático com maior probabilidade de infarto agudo do miocárdio<sup>21</sup>. Graham e cols.<sup>22</sup> concluíram que HHe em jejum ou pós-sobrecarga de metionina corresponde a risco cardiovascular semelhante ao da hiperlipemia e do tabagismo, embora inferior ao da hipertensão arterial sistêmica.

Em 1998, Folsom e cols.<sup>23</sup>, em importante pesquisa, colocam em dúvida a participação da HHe na fisiopatologia da doença arterial coronária. Contudo, seus resultados não encontram sustentação frente às pesquisas mais recentes<sup>24</sup>.

A patogenia da lesão vascular determinada pela HHe inclui lesão da célula endotelial, crescimento da musculatura lisa vascular, maior adesividade plaquetária, aumento da oxidação do LDL-colesterol com deposição na parede vascular e ativação direta da cascata da coagulação<sup>20</sup>. No entanto, ainda não está bem claro por qual mecanismo fisiopatológico a He pode promover aterotrombose<sup>25</sup>.

O endotélio, principal órgão endócrino do organismo, é de grande importância em inúmeras doenças degenerativas e inflamatórias. Dentre os vários métodos para aquilatar sua disfunção, o fvW tem se mostrado muito eficiente e com ótima sensibilidade. Células endoteliais e megacariócitos sintetizam, armazenam e secretam o fvW. Essa secreção aumenta quando as células endoteliais são estimuladas ou lesadas e seus valores podem aumentar de duas a 10 vezes em indivíduos doentes. O fvW liga-se ao colágeno e a outros componentes da parede vascular e, portanto, serve de mediador da adesão das plaquetas ao subendotélio dos vasos lesados<sup>26</sup>.

A lesão vascular expõe a matriz de colágeno subendotelial, à qual se liga ao fvW circulante no plasma, que por sua vez se liga à porção extracelular de glicoproteínas da membrana da plaqueta (GPIb), cuja porção intracelular está ligada à filamina do citoesqueleto plaquetário. Tal interação, conhecida por adesão plaquetária, é suficiente para deflagrar dois fenômenos nas plaquetas: a contração celular e a alteração conformacional<sup>27-29</sup>.

No DM, em decorrência de fatores genéticos e bioquímicos plasmáticos, a disfunção endotelial é precoce e determina o início e progressão da doença vascular, levando à micro e macroangiopatia diabética. Em estudo recente, Becker e cols.<sup>25</sup> objetivaram determinar o quanto a He estava associada com a disfunção endotelial em ratos diabéticos e não-diabéticos e se essa disfunção poderia ser estimada pelos níveis plasmáticos de fvW, e concluíram que a relação entre He e a aterotrombose não pode ser explicada pela associação da homocisteína com fvW. Na busca de um elemento que possa ser um marcador desse comprometimento, o fvW passa a ter importante interesse clínico, podendo ser considerado um marcador sérico de disfunção endotelial no DM.

Para indução do DM, nesse experimento foi utilizada a STZ por ser o modelo que representa melhor reprodutibilidade dos resultados obtidos em relação aos da literatura<sup>30-35</sup>. Os resultados deste trabalho demonstram que no DM, em decorrência das alterações metabólicas, dentre as quais a hiperglicemia é a mais importante, há modificações nos níveis plasmáticos de He e do fvW.

À semelhança dos resultados do presente estudo (tab. 1),

os trabalhos de Jacobs e cols.<sup>36</sup>, Wollesen e cols.<sup>37</sup> e Veldman e cols.<sup>38</sup> demonstram, no diabete experimental em ratos, níveis mais baixos de He.

A He, por lesar diretamente o endotélio, estimula a proliferação celular e a produção de colágeno, perpetua o processo inflamatório crônico vascular, altera o relaxamento arterial endotélio-dependente por meio do óxido nítrico, aumenta o estresse oxidativo, ativa fatores de coagulação e inibe a atividade da proteína C. Logo, seria de esperar no diabete, pela extensa lesão endotelial, valores elevados de He. Contudo, na presença de hiperglicemia, há aumento da filtração glomerular<sup>37-38</sup>, e as alterações metabólicas na via de formação da He<sup>36</sup> resultam em valores mais baixos dessa, o que corrobora para a assertiva de que a He seja fator de risco para disfunção endotelial e não marcador específico de lesão do endotélio no DM. Pode-se inferir que valores normais ou elevados de He no DM estejam relacionados com lesão endotelial.

O fVW vem sendo otimizado como marcador de disfunção endotelial. No presente trabalho, os seus valores (tab. 2)

foram significativamente mais elevados nos ratos diabéticos, o que nos leva a admitir ser ele, fator importante na disfunção endotelial presente no DM.

Não foi observada correlação entre He e fVW (tab. 2), o que permite concluir que nesse experimento a relação entre He e possível aterotrombose em ratos diabéticos não pode ser explicada pela associação entre He e fVW.

## Conclusão

Os valores de He foram mais baixos nos ratos diabéticos, podendo iniciar e perpetuar a lesão endotelial, não sendo, portanto, marcador de sua disfunção. Os níveis elevados de fVW, por esse ser marcador de disfunção endotelial, permitem inferir a presença de lesão vascular no DM. Não houve correlação entre glicemia final, He e fVW nos ratos diabéticos.

## Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflitos de interesses pertinentes.

## Referências

1. Trachtman H, Futterweit S, Maesaka J, Ma C, Valderrama E, Fuchs A, et al. Taurine ameliorates chronic streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Am J Physiol*. 1995; 268 (38): F429-38.
2. Wongsurawat N, Armbricht HJ. Calcitonin stimulates 1, dihydroxyvitamin D production in diabetic rats kidney. *Metabolism*. 1991; 40 (1): 22-5.
3. Grisham FK. Calcium transport by basolateral membranes of diabetic rats. *Am J Clin Nutr*. 1993; 58 (2): 209-14.
4. Anderson S, Jung FF, Ingelfinger JR. Renal renin angiotensin system in diabetes functional, immunohistochemical and molecular biological correlation. *Am J Physiol*. 1993; 265 (4 Pt 2): F477-86.
5. Geirger H, Bahne V, Vaaben W, Dammrich J, Heidland A, Luft FC. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic rats with reduced renal function. *J Lab Clin Med*. 1992; 120 (6): 861-8.
6. Pfeiffer CM, Huff DL, Gunter EW. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. *Clin Chem*. 1999; 45 (2): 290-2.
7. Cruz EM, D'Almeida V, Cardien LC, Terzi CA, Diniz DC, Carvalho ACC, et al. Padronização da dosagem de homocisteína plasmática por cromatografia líquida de alta pressão e aplicação em pacientes com doença arterial coronariana. *J Bras Patol*. 2000; 36 (3): 166-73.
8. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: Implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol*. 1969; 56 (1): 111-28.
9. Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, et al. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA*. 1992; 268 (7): 877-81.
10. Evans RW, Shaten BJ, Hempel JD, Cutler JA, Kuller LH. Homocysteine and risk of cardiovascular disease in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 7 (10): 1947-53.
11. Wald NJ, Watt HC, Law MR, Weir DG, McPartlin J, Scott JM. Homocysteine and ischemic heart disease: results of a prospective study with implications regarding prevention. *Arch Intern Med*. 1998; 158 (8): 862-7.
12. Neto JRF, Chagas, ACP. A homocisteína como fator de risco coronariano. *Atherosclerosis*. 2001; 12 (1): 20-5.
13. Tavares JR, D'Almeida V, Diniz DC, Terzi CA, Cruz EM, Stefanini E, et al. Analysis of plasma homocysteine levels in patients with unstable angina. *Arq Bras Cardiol*. 2002; 79 (2): 167-72.
14. Neves LB, Macedo DM, Lopes AC. Homocisteína: artigo de revisão. *J Bras Patol Med Lab*. 2004; 40 (5): 311-21.
15. Gravina-Taddei CF, Batlouni M, Sarteschi C, Baltar VT, Salvarini NAC, Bertolami MC, et al. Hiper-homocisteinemia como fator de risco para doença aterosclerótica coronariana em idosos. *Arq Bras Cardiol*. 2005; 85 (3): 166-73.
16. Fonseca V, Guba SC, Fink LM. Hyperhomocysteinemia and endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis. *Endocr Rev*. 1999; 20 (5): 738-59.
17. Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease and drug therapy. *J Lab Clin Med*. 1989; 114 (5): 473-501.
18. McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nat Med*. 1996; 2 (4): 386-9.
19. Malinow MR, Duell PB, Hess DL, Anderson PH, Kruger WD, Phillipson BE, et al. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary heart disease. *N Engl J Med*. 1998; 338 (15): 1009-15.
20. Durand P, Prost M, Loreau N, Lussier-Carrcan S, Blanche D. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest*. 2001; 81(5): 645-72.
21. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*. 1995; 274 (13): 1049-57.
22. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA*. 1997; 277 (22): 1775-81.
23. Folsom AR, Nieto FJ, McGovern PG, Tsai MY, Malinow MR, Eckfeldt JH, et al. 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.
24. Bostom A, Selhub J. Homocysteine and arteriosclerosis: subclinical and clinical disease associations. *Circulation*. 1999; 99: 2361-3.
25. Becker A, Van Hinsbergh VW, Kostense PJ, Jager A, Dekker JM, Nijpels G, et al. Serum homocysteine is weakly associated with von Willebrand factor and soluble vascular cell adhesion molecule 1, but not with C-reactive protein in



- type 2 diabetic and non-diabetic subjects – The Hoom Study. *Eur J Clin Invest.* 2000; 30 (9): 763-70.
26. Mosher DF. Disorders of blood coagulation. In: Wyngaarden JB, Smith LH, Bennet, JC. *Cecil textbook of medicine.* 19th ed. Philadelphia: Saunders Company; 1996. p. 999-1017.
27. Guyton AC, Hall JE. Hemostasia e coagulação sanguínea. In: Guyton AC, Hall JE eds. *Tratado de fisiologia médica.* 9a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p. 394-404.
28. Fiorini VCC, Scattolini M, Palumbo MN, Roizenblatt SS, Lopes AC. Hemostasia: fisiologia e farmacologia. *Bras J Clin Ther.* 2001; 27 (2): 71-9.
29. Rakiety N, Rakiety ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep.* 1963; 29: 91-8.
30. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacologia.* 3.ed. Rio Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.
31. Schein PS, Cooney DA, Mcmenamin MC, Anderson T. Streptozotocin diabetes-further studies on the mechanisms of nicotinamide adenine dinucleotide concentration in mouse pancreatic islets and liver. *Biochem Pharmacol.* 1973; 22 (20): 2625-31.
32. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 1989; 320 (14): 915-24.
33. Stringer MD, Gorog PG, Freeman A, Kakkar VV. Lipid peroxides and atherosclerosis. *BMJ.* 1989; 298 (6669): 281-4.
34. Oberly LW. Free radicals and diabetes. *Free Radical Biol Med.* 1988; 5(2): 113-24.
35. Garg MC, Ojha S, Bansal DD. Antioxidant status of streptozotocin diabetic rats. *Indian J Exp Biol.* 1996; 34 (3): 264-6.
36. Jacobs RL, House JD, Brosnan ME, Brosnan JT. Effects of streptozotocin-induced diabetes and of insulin treatment on homocysteine metabolism in the rat. *Diabetes.* 1998; 47: 1967-70.
37. Wollesen F, Brattström L, Refsum H, Ueland PM, Berglund L, Berne C. Plasma total homocysteine and cysteine in relation to glomerular filtration rate in diabetes mellitus. *Kidney Int.* 1999; 55: 1028-35.
38. Veldman BAJ, Vervoort G, Blom H, Smits P. Reduced plasma total homocysteine concentrations in type 1 diabetes mellitus is determined by increased renal clearance. *Diabet Med.* 2004; 22: 301-5.