

# Hiper-homocisteinemia e síndrome antifosfolípide primária

Jozélio Freire de Carvalho<sup>1,2</sup>, Maria Teresa Correia Caleiro<sup>2</sup>, Eloísa Bonfá<sup>3</sup>

## RESUMO

**Objetivos:** Investigar a prevalência de hiper-homocisteinemia e suas possíveis associações clínicas e laboratoriais em pacientes com síndrome antifosfolípide primária (SAFP). **Pacientes e métodos:** Estudo transversal de 27 pacientes (88% mulheres) com SAFP (critérios de Sapporo). Foram avaliados dados demográficos, clínicos, comorbidades, medicações, anticorpos antifosfolípidos, colhendo-se uma amostra de sangue para dosagem da homocisteína, pela técnica de cromatografia líquida de alta resolução. **Resultados:** Seis (22%) dos 27 pacientes apresentaram níveis de homocisteinemia acima dos valores normais ( $98,7 \pm 8,9$  versus  $8,0 \pm 2,9$   $\mu$ M,  $P = 0,0008$ ). Comparando-se o grupo de pacientes com hiper-homocisteinemia com aquele que apresentava níveis normais, verificou-se que ambos os grupos de pacientes com SAFP não diferiram estatisticamente em relação aos dados demográficos (idade, cor branca, peso, altura e índice de massa corporal), bem como ao tempo de duração de doença ( $64 \pm 39,6$  versus  $77,9 \pm 61,3$  meses,  $P = 0,32$ ). Nenhum dos grupos apresentou diferenças quanto às manifestações da doença (eventos arteriais, venosos e obstétricos, trombose venosa profunda, tromboembolismo pulmonar, plaquetopenia, infarto agudo do miocárdio, angina e acidente vascular cerebral), comorbidades (hipertensão arterial e dislipidemia), ao estilo de vida (atividade física e tabagismo atual e progressivo), bem como ao uso de medicações (corticoide atual e progressivo, estatina, cloroquina e ácido acetilsalicílico). A prevalência e os títulos de anticorpos anticardiolipina foram semelhantes em ambos os grupos. **Conclusão:** A hiper-homocisteinemia pode ser detectada em cerca de um quarto da população com SAFP, sem associação com características distintas clínicas e laboratoriais dessa doença.

**Palavras-chave:** síndrome antifosfolípide primária, hiper-homocisteinemia, trombose, clínica.

## INTRODUÇÃO

A síndrome antifosfolípide (SAF) é uma trombofilia autoimune adquirida, caracterizada pela presença de trombooses vasculares e/ou eventos obstétricos, acompanhada ou não de plaquetopenia na vigência de níveis moderados e persistentes de anticorpos antifosfolípidos.<sup>1</sup>

Recentemente, essa síndrome tem sido associada à presença de aterosclerose precoce e eventos coronários.<sup>2</sup> Fatores de risco tradicionais para doenças cerebrovasculares têm sido demonstrados na SAF, porém o papel de outros fatores de risco não tradicionais vem sendo pouco estudado. A homocisteína, um aminoácido sulfidrílico formado no metabolismo da metionina que, em níveis elevados, pode causar toxicidade endotelial e ativar o sistema de coagulação, tem sido associada à ateros-

clerose e à isquemia cerebral.<sup>3,4</sup> Poucos estudos têm avaliado a presença de hiper-homocisteinemia em pacientes com SAF primária (SAFP), e a maioria inclui pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) na ausência de condições secundárias que possam alterar os níveis séricos desse aminoácido.<sup>5-7</sup>

O objetivo do presente estudo foi investigar a prevalência de hiper-homocisteinemia em uma população de SAFP e avaliar sua possível associação com achados clínicos e laboratoriais da doença.

## PACIENTES E MÉTODOS

Neste estudo, foram incluídos consecutivamente 27 pacientes de ambos os sexos, com idades entre 18 e 55 anos, com diagnóstico de SAFP segundo os critérios de Sapporo.<sup>8</sup> Esses

Recebido em 26/11/2008. Aprovado, após revisão, em 11/03/2009. Declaramos a inexistência de conflitos de interesse.

1. Professor colaborador da disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina (FMUSP)

2. Médico Assistente Doutor do Serviço de Reumatologia (HC-FMUSP)

3. Professora Titular do Serviço de Reumatologia (HC-FMUSP)

Endereço para correspondência: Jozélio Freire de Carvalho. Disciplina de Reumatologia (FMUSP). Av. Dr. Arnaldo, 455, 3º andar, sala 3.190, São Paulo - SP - CEP: 01246-903. Tel/Fax: 55 (11) 3061-7490. E-mail: jotafc@gmail.com

pacientes foram acompanhados no ambulatório de SAF do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

Na consulta de avaliação, foram coletados os dados utilizados neste trabalho, seguidos de revisão dos prontuários médicos. Os eventos clínicos arteriais e venosos foram todos confirmados por métodos de imagens, seja ultrassom Doppler, cintilografia pulmonar de ventilação-perfusão, tomografia computadorizada, ressonância nuclear magnética (RNM), arteriografia, angiotomografia e angio-RNM. A plaquetopenia foi definida como níveis de plaquetas  $< 100.000/\text{mm}^3$  em pelo menos duas ocasiões consecutivas. Avaliou-se também a presença de comorbidades: hipertensão arterial sistêmica (PA  $> 140 \times 90$  mmHg ou uso de medicação anti-hipertensiva), presença de dislipidemia e medicamentos em uso. A presença e os títulos de anticorpos IgG e IgM anticardiolipina (aCL) foram investigados no momento do diagnóstico clínico da síndrome.

Os critérios de exclusão foram as condições que alteram os níveis de homocisteína, tais como insuficiência renal crônica, neoplasias, idade avançada ( $> 55$  anos), lúpus eritematoso sistêmico, uso de vitamina B12 e ácido fólico.

**Detecção dos anticorpos anticardiolipina:** Os anticorpos IgG e IgM anticardiolipina foram detectados por enzima imunoensaio (ELISA) indireto.<sup>9</sup> Resumidamente, poços de microplacas de poliestireno foram sensibilizados com cardiolipina (Sigma Chem. Co., EUA), na concentração de  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  em etanol gelado ( $50 \mu\text{L}/\text{orifício}$ ), por 16 horas, a  $4^\circ\text{C}$ . Após lavagem, a placa foi bloqueada por duas horas com soro fetal bovino inativado ( $56^\circ\text{C}$ , por trinta minutos) a 30% em PBS. Os poços foram sequencialmente incubados, em duplicata, com os soros diluídos a 1:50 e anticorpos IgG policlonais de cabra anti-IgG ou anti-IgM humanas, marcados com peroxidase (Sigma Chem. Co., EUA). Os resultados foram expressos em unidades GPL e MPL, determinadas por meio de curva construída a partir dos valores de absorbância obtidos de amostras de soro referência definido internacionalmente. Para o diagnóstico da síndrome, foram considerados aqueles acima de 20 U, segundo os critérios de Sapporo.<sup>8</sup>

A pesquisa de anticoagulante lúpico (LAC) foi realizada por meio de testes hematológicos funcionais: inicialmente, pelo teste de rastreamento com o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e, em seguida, pelo teste do veneno da víbora de Russel. Em caso de alteração, realizava-se a prova de mistura de 50% de plasma normal com 50% do plasma-teste; caso houvesse correção do TTPa, diagnosticava-se deficiência de fator de coagulação. Caso contrário, se não houvesse correção e esta fosse obtida com a mistura com plasma rico em fosfolípidos (plaquetas), diagnosticava-se o LAC.

**Dosagem de homocisteína:** uma amostra de sangue foi colhida após jejum de 12 horas para medida da homocisteinemia. A amostra foi mantida em gelo e imediatamente centrifugada a  $0^\circ\text{C}$  para obter o plasma. Os níveis de homocisteína foram mensurados por meio de cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa (Shimadzu Class-Vp System), técnica descrita por Fiskerstrand *et al.*<sup>10</sup> Os valores  $\geq 15 \mu\text{M}$  foram considerados alterados.

**Análise estatística:** os resultados foram apresentados em médias e desvios-padrão. A análise estatística foi realizada no programa GraphPad InStat versão 2.00 e utilizados os testes t de Student para comparação das médias e teste exato de Fisher para as frequências. Os resultados foram considerados de valor significativo quando  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

A média de idade de todos os 27 pacientes com SAF foi de  $38,6 \pm 9,7$  anos, sendo 23 (85,2%) mulheres e 81,5% da cor branca. O tempo médio de duração da doença foi de  $75,1 \pm 57,1$  meses. Em relação aos eventos vasculares, 66,7% tiveram trombozes arteriais; 48,2%, trombozes venosas; e 14,8% apresentaram plaquetopenia.

Seis (22%) dos 27 pacientes apresentaram níveis de homocisteinemia acima dos valores normais ( $> 15 \mu\text{M}$ ). Os valores médios desse grupo foram estatisticamente maiores do que no grupo de normo-homocisteinemia ( $98,7 \pm 8,9$  versus  $8,0 \pm 2,9 \mu\text{M}$ ,  $P = 0,0008$ ). Comparando-se o grupo de pacientes que apresentavam hiper-homocisteinemia com aquele com níveis normais de homocisteína, não foram observadas diferenças significativas em relação a idade, frequências de sexo feminino e cor branca, médias de peso, altura, índice de massa corporal, bem como em relação ao tempo de doença (Tabela 1).

Em relação às manifestações clínicas e comorbidades da doença, ambos os grupos de pacientes foram similares, seja em eventos arteriais, venosos e obstétricos, tromboembolismo pulmonar, plaquetopenia, acidente vascular cerebral, síndrome de Sneddon, isquemia de extremidades, infarto agudo do miocárdio, angina, trombose venosa profunda, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e osteonecrose. O estilo de vida também não diferiu em nenhum dos grupos, em relação à frequência de prática de atividade física, tabagismo pregresso e atual (Tabela 2).

Ambos os grupos também obtiveram respostas similares em relação ao uso das seguintes medicações: corticoides (uso atual e pregresso), cloroquina, varfarin, estatinas e ácido acetilsalicílico (Tabela 3).

**Tabela 1**

Comparação dos dados demográficos, antropométricos e da duração de doença nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária (SAFP) de acordo com a homocisteinemia

Dados	SAFP Homocisteína ≥ 15 µM N = 6	SAFP Homocisteína < 15 µM N = 21	P
Idade (anos)	42,5 ± 9,5	37,5 ± 9,7	0,27
Sexo feminino, n (%)	5(83)	18(85,7)	1,00
Cor branca, n (%)	6(100)	16(76)	0,56
Peso (kg)	67,4 ± 9,9	74,7 ± 18,5	0,18
Altura (cm)	157,2 ± 8,4	161,2 ± 8,8	0,33
Índice de massa corporal (kg/cm <sup>2</sup> )	27 ± 2,9	28,4 ± 6,4	0,61
Duração da doença (meses)	64 ± 39,6	77,9 ± 61,3	0,32

Os dados são apresentados em médias ± desvios-padrão ou porcentagem. Os testes t de Student foram utilizados para a comparação das médias; o exato de Fisher, para as frequências.

A frequência de anticoagulante lúpico e de anticorpos IgG e IgM anticardiolipina nos dois grupos de pacientes foi similar, bem como suas médias (Tabela 4).

## DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou presença de hiper-homocisteinemia em cerca de um quarto dos pacientes com síndrome antifosfolípide primária avaliados no ambulatório de SAF do Serviço de Reumatologia do HC-FMUSP.

A elevação dos níveis de homocisteína, um tio-aminoácido formado devido à demetilação da metionina, tem sido associada à disfunção endotelial, podendo interferir na via da anticoagulação da proteína C ao reduzir a síntese de trombomodulina e a ligação da trombina, o que leva à resistência à proteína C ativada.<sup>11,12</sup>

Diversas condições podem causar alteração nos níveis de homocisteína, tais como síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, lúpus eritematoso sistêmico, hipotireoidismo e reposição de vitaminas B12 e ácido fólico. No presente estudo, essas condições foram totalmente excluídas para garantir a relevância clínica dos resultados.<sup>13</sup>

Diversos estudos têm avaliado a presença de homocisteinemia em pacientes com anticorpos antifosfolípide, com ou sem síndrome antifosfolípide.<sup>14,15</sup> Em um estudo prévio realizado

**Tabela 2**

Comparação de dados clínicos, eventos cardiovasculares, comorbidades e estilo de vida dos pacientes com síndrome antifosfolípide primária (SAFP) de acordo com a homocisteinemia

Dados	SAFP Homocisteína ≥ 15 µM N = 6	SAFP Homocisteína < 15 µM N = 21	P
Evento arterial, n (%)	5 (83,3)	13 (61,9)	0,63
Evento venoso, n (%)	2 (33,3)	11 (52,4)	0,65
Evento obstétrico, n (%)	1 (16,6)	3 (14,3)	1,00
Acidente vascular cerebral, n (%)	5 (83,3)	9 (42,8)	0,16
Síndrome de Sneddon, n (%)	2 (33,3)	5 (23,8)	0,63
Isquemia de extremidades, n (%)	2 (33,3)	5 (23,8)	0,63
Infarto agudo do miocárdio, n (%)	0	2 (9,5)	1,00
Angina, n (%)	1 (16,6)	1 (4,7)	1,00
Trombose venosa profunda, n (%)	2 (33,3)	11 (52,4)	0,65
Tromboembolismo pulmonar, n (%)	1 (16,6)	3 (14,3)	1,00
Plaquetopenia, n (%)	0	4 (19,0)	0,55
Hipertensão arterial sistêmica, n (%)	4 (66,6)	8 (38,1)	0,36
Dislipidemia, n (%)	2 (33,3)	8 (38,1)	1,00
Atividade física, n (%)	2 (33,3)	5 (23,8)	0,63
Tabagismo atual, n (%)	0	3 (14,3)	1,00
Tabagismo pregresso, n (%)	2 (33,3)	9 (42,8)	1,00

O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar as frequências.

no Brasil que avaliou fatores de risco cardiovascular na SAF, com a participação de um dos autores deste trabalho, a presença de hiper-homocisteinemia não foi convenientemente investigada. Entretanto, observações preliminares sugeriram que pacientes com SAF e trombose arterial poderiam apresentar níveis séricos mais elevados de homocisteína em comparação à população controle.<sup>16</sup> Contudo, neste estudo, não houve

**Tabela 3**

Comparação das frequências de medicações dos pacientes com síndrome antifosfolípide primária (SAFP) de acordo com a homocisteinemia

Dados	SAFP Homocisteína ≥ 15 µM N = 6	SAFP Homocisteína < 15 µM N = 21	P
Uso atual de corticoide, n (%)	1 (16,6)	1 (4,7)	0,40
Uso prévio de corticoide, n (%)	3 (50)	11 (52,4)	1,00
Uso de varfarin, n (%)	4 (66,6)	17 (80,9)	0,59
Uso de cloroquina, n (%)	1 (16,6)	8 (38,1)	0,63
Uso de estatina, n (%)	3 (50)	7 (33,3)	0,64
Uso atual de ácido acetilsalicílico, n (%)	1 (16,6)	6 (28,6)	1,00

O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar as frequências.

diferença estatística no nível de homocisteína apresentado pela população de pacientes com SAF e trombose, quando comparado com aquele da população que não apresentava tal manifestação. Achado similar foi relatado por Lee *et al.*, que encontraram uma prevalência de hiper-homocisteinemia em mulheres com SAF de 14%, não diferindo dos controles, sem apresentar qualquer associação com manifestações clínicas ou laboratoriais da doença.<sup>17</sup>

No estudo realizado por Del Ross *et al.*, foi detectada a presença de hiper-homocisteinemia em dez de 29 pacientes com SAFP. Observa-se que nove desses pacientes tinham antecedentes de doença cerebrovascular.<sup>18</sup> É importante ressaltar que os autores não excluíram nesse trabalho condições secundárias, como insuficiência renal e lúpus eritematoso sistêmico, que interferem nos níveis de homocisteína.

Com o mesmo objetivo, Avivi *et al.* encontraram hiper-homocisteinemia em 30,8% de 52 pacientes com SAFP. Esses

**Tabela 4**

Comparação das frequências de fator antinúcleo e anticorpos antifosfolípides dos pacientes com síndrome antifosfolípide primária (SAFP) de acordo com a homocisteinemia

Dados	SAFP Homocisteína ≥ 15 µM N = 6	SAFP Homocisteína < 15 µM N = 21	P
Anticoagulante lúpico, n (%)	4 (80)	16 (76)	0,63
IgG aCL, GPL	31 ± 46,5	53,9 ± 52,1	0,35
IgM aCL, MPL	28,2 ± 46,6	36,3 ± 22,6	0,70
Presença de IgG aCL, n(%)	3 (50)	12 (57)	1,00
Presença de IgM aCL, n(%)	3 (50)	12 (57)	1,00
Presença de IgG ou IgM aCL	3 (50)	17 (80,9)	0,29

Os dados são apresentados em médias ± desvios-padrão ou porcentagem. aCL: anticorpo anticardiolipina. Os testes t de Student foram utilizados para a comparação das médias; o exato de Fisher, para as frequências.

autores concluíram que os níveis aumentados de homocisteína estavam associados a um maior risco de eventos tromboembólicos.<sup>19</sup> Entretanto, neste estudo, não foram excluídas as condições que poderiam causar variações na determinação dos níveis da homocisteína.

O presente estudo mostrou que uma proporção dos pacientes com síndrome antifosfolípide primária pode apresentar níveis séricos elevados de homocisteinemia. Entretanto, esse achado não esteve associado a manifestações clínicas e laboratoriais da doença, nem à presença de morbidades cerebrais e cardiovasculares da população estudada. Esse fato pode decorrer do baixo número de pacientes com hiper-homocisteinemia encontrado neste trabalho. Dessa forma, estudos prospectivos, incluindo uma maior amostra de pacientes com elevados valores de homocisteinemia ainda são necessários para avaliar os efeitos da hiper-homocisteinemia em pacientes com SAF.

## REFERÊNCIAS

1. Hughes GR. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;287:1088-9.
2. Jara LJ, Medina G, Vera-Lastra O. Systemic antiphospholipid syndrome and atherosclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007;32:172-7.
3. Bots ML, Launer LJ, Lindemans J, Hoes AW, Hofman A, Witteman JC *et al.* Homocysteine and short-term risk of myocardial infarction and stroke in the elderly: the Rotterdam Study. *Arch Intern Med* 1999;159:8-44.
4. Adachi H, Hirai Y, Fujiura Y, Matsuoka H, Satoh A, Imaizumi T. Plasma homocysteine levels and atherosclerosis in Japan: epidemiological study by use of carotid ultrasonography. *Stroke* 2002;33:2177-81.
5. Onetti L, Villafañe S, Menso E. Hyperhomocysteinemia as a thrombotic risk factor in patients suffering from systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* 2005;62:19-23.
6. Reshetniak TM, Shirokova IE, Lisitskaia TL. The role of hyperhomocysteinemia in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Ter Arkh* 2006;78:24-30.
7. Martínez-Berriotxo A, Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Rueda M, Aguirre C. Homocysteine, antiphospholipid antibodies and risk of thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004;13:927-33.
8. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Locksin MD, Branch DW, Piette JC *et al.* International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1309-11.
09. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GRV. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 1987;46:1-6.

10. Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, Ueland PM. Homocysteine and other thiols in plasma and urine: automated determination and sample stability. *Clinical Chemistry* 1993;39:263-71.
11. Undas A, Brozek J, Szczeklik A. Homocysteine and thrombosis: from basic science to clinical evidence. *Thromb Haemost* 2005;4:7-15.
12. Ebbesen LS. Hyperhomocysteinemia, thrombosis and vascular biology. *Cell Mol Biol* 2004;50:917-30.
13. Santos RD, Martinez LRC, Cavalheiro C, Machado César LA. "Novos fatores de risco". In: Nobre F, Serrano Jr. CV. *Tratado de cardiologia SOCESP*, 1 ed. São Paulo: Manole, 2005.
14. Chen WH, Lin HS, Kao YF, Lan MY, Liu JS. Hyperhomocysteinemia relates to the subtype of antiphospholipid antibodies in non-SLE patients. *Clin Appl Thromb Hemost* 2007;13:398-403.
15. Kassis J, Neville C, Rauch J. Antiphospholipid antibodies and thrombosis: association with acquired activated protein C resistance in venous thrombosis and with hyperhomocysteinemia in arterial thrombosis. *Thromb Haemost* 2004;92:1312-19.
16. de Souza AW, Silva NP, de Carvalho JF, D'Almeida V, Noguti MA, Sato EI. Impact of hypertension and hyperhomocysteinemia on arterial thrombosis in primary antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2007;16:782-7.
17. Lee RM, Brown MA, Ward K, Nelson L, Branch DW, Silver RM. Homocysteine levels in women with antiphospholipid syndrome and normal fertile controls. *J Reprod Immunol* 2004;63:23-30.
18. Del Ross T, Ruffatti A, Tonello M. Primary antiphospholipid syndrome and hyperhomocysteinemia: a study of a group of 29 patients. *Reumatismo* 2006;58:375-867.
19. Avivi I, Lanir N, Hoffman R, Brenner B. Hyperhomocysteinemia is common in patients with antiphospholipid syndrome and may contribute to expression of major thrombotic events. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13:169-72.