

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: NEFROLOGIA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA EM PACIENTES
TRANSPLANTADOS RENAIIS COM E SEM HIPERCOLESTEROLEMIA.**

FABIANA PIOVESAN

Porto Alegre

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: NEFROLOGIA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA EM PACIENTES
TRANSPLANTADOS RENAIIS COM E SEM HIPERCOLESTEROLEMIA.**

Dissertação de Mestrado
apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências Médicas:
Nefrologia

FABIANA PIOVESAN

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Veríssimo Veronese

Co-Orientador: Prof. Dr. David Saitovitch

Porto Alegre, março de 2007

“À todos os que estiveram comigo
nesta caminhada me incentivando
e acreditando na minha conquista.”

AGRADECIMENTOS

À minha família e ao meu marido pelo eterno apoio e compreensão.

Aos Drs. David Saitovitch e Francisco José V. Veronese, orientadores deste trabalho, pela atenção, paciência, dedicação e apoio em todas as etapas.

Aos Drs. Elizete Keitel, Auri Santos, Antonio Bittar e Valter Duro Garcia pela oportunidade e incentivo.

Ao Dr. Péricles S. Sarturi, mestre e amigo, que sempre deu incentivo na escolha da especialidade e durante toda a caminhada.

À Dra. Roberta Pozza fiel amiga e colaboradora.

À Abbot pelo apoio e auxílio à pesquisa.

Ao Laboratório Weinmann pela importante colaboração.

Aos amigos pelas palavras de apoio e respeito nas horas mais difíceis.

Ao Serviço de Transplante Renal Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia pela oportunidade de crescimento acadêmico.

Aos pacientes, pois sem estes nada seria possível.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	
LISTA DE FIGURAS.....	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	
INTRODUÇÃO.....	01
1. ASPECTOS GERAIS.....	01
2. METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA.....	02
3. CAUSAS DE HIPERHOMOCISTEINEMIA.....	05
4. HIPERHOMOCISTEINEMIA COMO FATOR DE RISCO CARDIOVASCULAR.....	08
5. O IMPACTO CLÍNICO E O MANEJO DA HIPERHOMOCISTEINEMIA NO TRANSPLANTE RENAL.....	13
JUSTIFICATIVA.....	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
OBJETIVOS.....	25
ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	26
ARTIGO EM INGLÊS.....	46

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1 – Causas de hiperhomocisteinemia.....08

Tabela 2 - Mecanismos de aterosclerose associada à hiperhomocisteinemia.....09

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Tabela 1 - Dados demográficos e clínicos dos pacientes transplantados renais conforme o nível de colesterol.....42

Tabela 2 - Dados demográficos e clínicos dos pacientes transplantados renais conforme o nível de homocisteína.....43

Tabela 3 – Análise multivariada das correlações do logaritmo da homocisteína.....44

ARTIGO EM INGLÊS

Table 1 – Demographic and clinical data of renal transplant recipients according to cholesterol concentrations.....61

Table 2 - Demographic and clinical data of renal transplant recipients according to homocysteine levels.....62

Table 3 – Multivariate analysis of log homocysteine correlations.....63

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Metabolismo da homocisteína.....05

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Figura 1 - Box-plot mostrando o logaritmo da homocisteína (mediana e intervalo inter-quartil) em pacientes hipercolesterolêmicos e não-hipercolesterolêmicos.....45

ARTIGO EM INGLÊS

Figure 1 - Box-plot of log homocysteine levels (median and interquartile range) of patients with and without hypercholesterolemia.....64

LISTA DE ABREVIATURAS

Hcy	Homocisteína
Cya	Ciclosporina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
SAM	S-adenosil-metionina
CBS	Cistationa β-sintetase
MTHFR	Metileno tetrahidrofolato redutase
MTHF	L-5-metiltetrahidrofolato
IMC	Índice de massa corporal

INTRODUÇÃO

1. ASPECTOS GERAIS

A doença cardiovascular é uma importante causa de morbidade e mortalidade após transplante renal. Fatores de risco distintos, atuando isoladamente ou em conjunto, iniciam o processo aterosclerótico, levando a disfunção endotelial. Geralmente, mais de um desses fatores, que incluem hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, obesidade, dislipidemia, tabagismo e história familiar são encontrados nos pacientes transplantados renais, o que pode explicar a alta prevalência de doença cardiovascular (17, 32, 43). Elevações significativas nos níveis séricos de colesterol e LDL-colesterol são freqüentes após o transplante renal, ocorrendo em mais de 60% desse grupo de pacientes (50).

Por estes fatores de risco serem altamente prevalentes na população de transplantados renais, há um grande interesse na sua patogênese e tratamento (1 – 4, 31).

Fonseca e al. demonstraram em um estudo com 676 pacientes transplantados renais a influência negativa da hipercolesterolemia na sobrevida do enxerto e do paciente transplantado (32).

A elevação do nível sérico de homocisteína tem sido recentemente reconhecido como um fator de risco independente para trombose e doença vascular. Níveis elevados de homocisteína sérica também foram preditores de morte em pacientes

com doença arterial coronariana (3), bem como prematuridade desta, estando associada ou não aos tradicionais fatores de risco coronarianos (14, 17, 40, 41).

A hiperhomocisteinemia é um fator de risco cardiovascular estabelecido na população em geral e alguns estudos sugerem que o mesmo possa ocorrer em transplantados renais. Neste grupo, a concentração plasmática de homocisteína parece estar aumentada em até 70% dos indivíduos (2, 4, 10, 18, 23-26).

Estudo sobre a homocisteína como fator de risco cardiovascular foi realizado por Kilmer McCully e cols. há mais de 30 anos atrás (41), o qual demonstrou extensas lesões ateroscleróticas presentes na autópsia de pacientes afetados por certas variantes genéticas da homocistinúria. Este autor propôs a teoria de que a homocisteína estaria envolvida na gênese da aterosclerose.

Estudo também demonstrou que o nível aumentado de homocisteína parece ser um fator adicional no dano aterosclerótico de pacientes com hipercolesterolemia, visto através da avaliação do fluxo sanguíneo da artéria braquial e a relação entre o espessamento da média-intíma carotídeas e femurais (42).

Com o aumento da meia-vida dos enxertos renais, atenção tem sido focada na morbidade e mortalidade cardiovascular nesta população de transplantados renais.

2. METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA

A homocisteína, similar a cisteína, mas com um grupo metileno em sua cadeia lateral, é um aminoácido sulfurado e tem como cofatores a vitamina B6 na transsulfuração e a vitamina B12 na remetilação. (29, 41)

A homocisteína é formada pela desmetilação da metionina e é metabolizada por remetilação à metionina ou transsulfuração à cisteína. Um elevado nível plasmático de homocisteína pode ocorrer como resultado de distúrbios hereditários, os quais alteram a atividade da enzima nas vias de transsulfuração e remetilação. Alternativamente, deficiências nutricionais de cofatores essenciais ou substratos da enzima, incluindo cobalamina (vitamina B12), folato e piridoxina (vitamina B6), podem resultar em bloqueio das vias metabólicas da homocisteína (6, 11, 32).

No estudo do metabolismo da metionina-homocisteína (ilustrado na figura 1) vê-se que a metionina é convertida a homocisteína através de dois compostos intermediários: S-adenosil-metionina (SAM) e S-acetil-homocisteína. O metabolismo da homocisteína ocorre tanto pela via transsulfuração quanto pela via remetilação. É sabido que a remetilação é ativa no estado de jejum e a transsulfuração ocorre predominantemente após uma sobrecarga de metionina, tal como ocorre com as refeições com grande teor de proteínas. A homocisteína irreversivelmente se condensa com a serina para formar a cistationina e esta reação é catalisada pela cistationina β -sintetase (CBS) e é também dependente de vitamina B6 como cofator. A cistationina é hidrolisada a cisteína pela enzima cistationase. Alternativamente, a metionina pode ser ressinetizada pela via da remetilação quando um grupo metil é doado para a homocisteína. Nesta via, o 5,10- metileno tetrahydrofolato é convertido a N-5-metiltetrahydrofolato, em uma reação catalizada por MTHFR (metileno tetrahydrofolato redutase), com riboflavina como cofator (32, 34-36, 45).

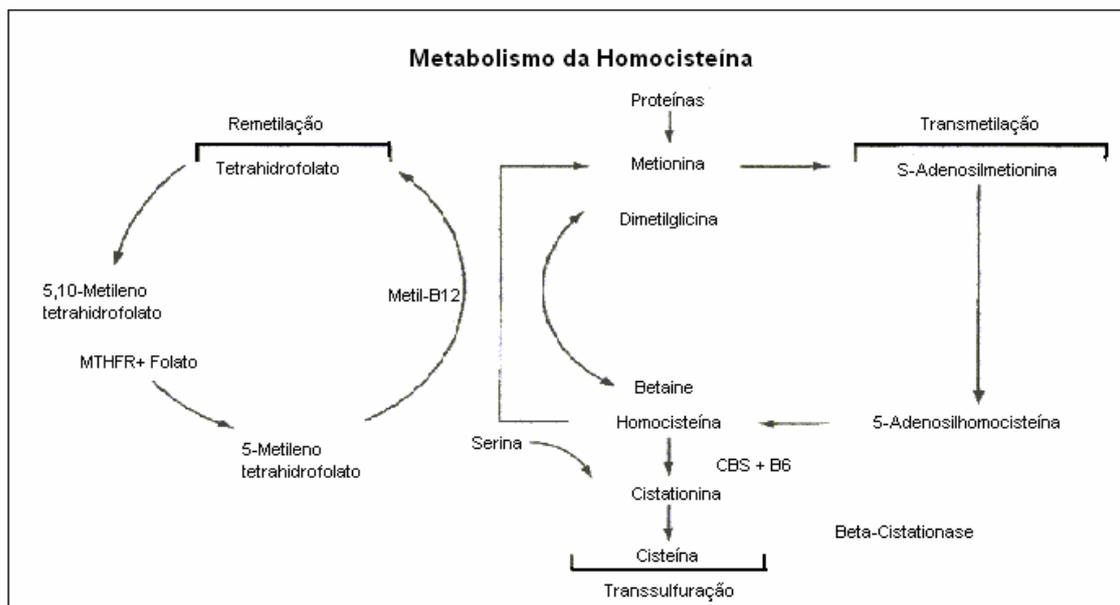
O N-5-metil tetrahidrofolato doa um grupo metil para a homocisteína em uma reação catalisada por metionina sintetase e seu substrato (vitamina B12). Em uma via alternativa, o grupo metil pode ser doado por betaine formando dimetilglicina e metionina. A reação betaine-homocisteína não é dependente de vitamina B12 ou folato.

Autores propuseram que a divisão da homocisteína entre a síntese de novo de metionina e o catabolismo através da síntese de cistationina ocorre por regulação coordenada pela S-adenosil-metionina. Estes aventaram a hipótese de que a inativação de uma via metabólica da homocisteína estaria associada à inativação de outra via, levando à hiperhomocisteinemia, como demonstrado em ratos (29).

Demonstrou-se, também, que a S-adenosil-metionina é tanto um inibidor alostérico da MTHFR (metileno tetrahidrofolato redutase) como um ativador da CBS (cistationina β -sintetase) (30). Acredita-se que o nível de SAM (S-adenosil-metionina) possa ser o determinante chave do nível de homocisteína plasmática. Mais estudos para determinar os fatores que afetam a SAM e os seus subsequentes efeitos no metabolismo da homocisteína parecem ser necessários. Níveis plasmáticos normais de homocisteína variam de 7-15 μ mol/l, e quando alterados podem ser divididos em moderados (15-30 μ mol/l), intermediários (31-100 μ mol/l) e severamente elevados (>100 μ mol/l) (6, 9, 12).

As dosagens de homocisteína sérica são realizadas através dos métodos de cromatografia líquida de alta performance ou imunofluorescência polarizada (17, 36).

Figura 1. Metabolismo da homocisteína.



3. CAUSAS DE HIPERHOMOCISTEINEMIA

Aproximadamente cinco por cento da população em geral é hiperhomocisteinêmica. (22). As causas de hiperhomocisteinemia são diversas e incluem doenças genéticas tais como deficiências enzimáticas do metabolismo da homocisteína; dieta pobre em cofatores ou co-substratos do metabolismo da Hcy, tais como vitamina B6, B12 e folatos; drogas, como metotrexate; insuficiência renal crônica, o que ocasiona um aumento moderado a severo da Hcy, e deficiência da enzima MTHF redutase.

A função renal parece ser o principal determinante do nível de Hcy e, haveria relação inversa entre o nível de Hcy e a taxa de filtração glomerular. Entretanto, estudos experimentais sugerem haver um metabolismo renal ativo de homocisteína, porém isto não tem sido demonstrado em estudos realizados em

humanos. Algumas das mudanças parecem ser causadas, pelo menos em parte, por um defeito na síntese, degradação ou depuração pelos rins. Fatores adicionais que podem influenciar estes níveis são relacionados a desnutrição ou ao estado urêmico *per se*, nos quais toxinas urêmicas podem afetar a atividade de enzimas, em prejuízo do transporte de membrana e da ligação às proteínas plasmáticas (17, 19, 28, 33, 42).

Rins normais têm considerável capacidade de metabolizar a homocisteína, mas a redução da filtração glomerular pode ser um fator determinante de marcada elevação da homocisteinemia, freqüentemente observada em pacientes com insuficiência renal terminal. Neste grupo de pacientes a prevalência de hiperhomocisteinemia pode chegar a 90%. Esta elevação dos níveis séricos parece ser significativamente maior quando comparados à população em geral (19, 26, 30).

Existem evidências que o catabolismo da homocisteína tenha importância em nível renal, principalmente nas células tubulares, o que explicaria a relação inversa entre ritmo de filtração glomerular e nível de homocisteína plasmática (12, 15).

A função do enxerto, entretanto, em receptores de transplante renal é avaliada pela dosagem da creatinina sérica e pela depuração de creatinina endógena, métodos sabidamente pouco acurados para estimar a filtração glomerular (51).

A queda nos níveis séricos de homocisteína são menores que as esperadas com a melhora da função renal após o transplante renal, demonstrando que podem haver outros fatores mantenedores destes níveis elevados, aumentando assim o risco cardiovascular destes indivíduos (26).

A deficiência de MTHF redutase é conhecida como causa de hiperhomocisteinemia severa. Estes pacientes apresentam, entre o período neonatal e o primeiro ano de vida, doença neurológica grave incluindo convulsões, doença do neurônio motor superior, microcefalia, anormalidades no eletroencefalograma e retardo no desenvolvimento psicomotor. Anormalidades vasculares têm sido identificadas em muitos pacientes *post mortem*. (40)

As mulheres têm uma concentração de homocisteína 21% menor do que os homens, porém no período da pós-menopausa esta diferença diminui. Os estrógenos poderiam ter efeitos na atividade de algumas enzimas no metabolismo da homocisteína.(32).

Existe uma correlação negativa entre a homocisteína, concentração de folato e vitamina B12 séricos. Fonseca e colaboradores relatam que a elevação de homocisteína plasmática foi associada com gênero masculino, aumento da idade, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, colesterol elevado e sedentarismo (32). Outro estudo também demonstrou a associação entre hipercolesterolemia e hiperhomocisteinemia em transplantados renais (27).

Estudos demonstraram não haver correlação entre os níveis séricos de ciclosporina e os de Hcy (5, 6, 12, 16). Alguns autores encontraram níveis séricos mais baixos de homocisteína em pacientes que estavam em uso de tacrolimus, porém nestes estudos a concentração de creatinina sérica era menor, o que poderia justificar este achado (13, 38, 39, 44). As causas de aumento dos níveis plasmáticos de Hcy estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1. Causas de hiperhomocisteinemia.

Deficiências Nutricionais	Folato Vitamina B12 Vitamina B6
Medicações	Metotrexate Fenitoína e Carbamazepina Teofilina Metformina Colestipol e niacina
Doenças	Insuficiência renal crônica Leucemia linfoblástica aguda Malignidades Hipotireoidismo Diabete tipo 1 e 2
Genéticas	Anormalidades na transsulfuração: deficiência da cistationina β -sintetase Alterações na remetilação (alteração no transporte da vit. B12, defeitos na metionina sintetase) Mutações na MTHFR (metileno tetrahydrofolato redutase)
Fisiológicas	Idade

4. HIPERHOMOCISTEINEMIA COMO FATOR DE RISCO CARDIOVASCULAR

A hiperhomocisteinemia constitui-se num prevalente fator de risco cardiovascular considerando a população de pacientes de alto risco para eventos cardiovasculares. Um grande estudo realizado em 80.000 enfermeiras, com seguimento de quatorze anos, demonstrou que uma dieta rica em folato é associada com significativa redução do risco cardiovascular, podendo estar correlacionadas com níveis séricos menores de homocisteína (41).

Os mecanismos bioquímicos de toxicidade da Hcy no endotélio, musculatura lisa dos vasos, plaquetas e na cascata da coagulação são a oxidação, a nitrosilação, a acetilação e a hipometilação. (41) A oxidação e a nitrosilação resultam na

formação de peróxido de hidrogênio e espécies reativas do oxigênio produzindo peroxidação lipídica. Através da acetilação ocorre a produção de tiolactona e, na hipometilação, o acúmulo de Hcy causa a hidrólise da S-adenosilhomocisteína, um produto de detoxificação. (41)

Outros possíveis mecanismos de doença vascular acelerada (aterotrombose) na hiperhomocisteinemia incluem a injúria à célula endotelial, disfunção endotelial, aumentado crescimento das células musculares lisas dos vasos, aumentada adesividade plaquetária, acentuada oxidação de LDL colesterol, depósito de LDL oxidado nas paredes arteriais e ativação direta da cascata da coagulação (18, 21, 34). As alterações vasculares na hiperhomocisteinemia parecem ser multifatoriais e são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Mecanismos de aterosclerose associada à hiperhomocisteinemia.

Endotélio	Perda da viabilidade e função Geração de radicais livres e peroxidação lipídica Aumento do fator von Willebrand e trombosmodulina Diminuição das prostaciclina Diminuição da síntese de DNA Diminuição do óxido nítrico Diminuição da reatividade vascular
Plaquetas	Diminuição da sobrevivência plaquetária Aumento da adesividade e agregação Aumento de liberação de fatores estimulantes da proliferação do músculo liso e vasoconstrição
Coagulação	Inibição da expressão na superfície celular de trombosmodulina Diminuição da ativação da proteína C Diminuição da atividade da anti-trombosmodulina III, diminuição do fator VII
Parede Arterial	Proliferação e hipertrofia da célula muscular lisa vascular Aumento da espessura médio-intimal

A disfunção plaquetária parece ser decorrente do aumento da adesividade das plaquetas, devido à acentuada liberação de tromboxane A₂. Outras anormalidades da coagulação encontradas são a ativação dos fatores XII e do fator endotelial V.

O efeito no endotélio, que é o principal sítio do dano causado pela hiperhomocisteinemia, ocorre, principalmente, pela interação da homocisteína com o óxido nítrico (NO), levando a diminuição da viabilidade deste. Desta forma, ocorre perda da vasodilatação, geração de espécies reativas de oxigênio (H₂O₂), inibição da glutathione peroxidase (enzima anti-oxidante que *in vitro* catalisa a redução de peróxidos de lipídios), proliferação de células musculares lisas vasculares e supressão do crescimento das células endoteliais. Parece haver, associada a esta proliferação vascular, indução da síntese de DNA (43). A importância clínica destes achados *in vivo* ainda não é clara, necessitando de estudos adicionais.

Está bem estabelecido que os tióis, incluindo a homocisteína, são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio, principalmente como consequência da sua própria auto-oxidação. Entretanto, entre os tióis, somente a homocisteína parece ser capaz de diminuir a habilidade de detoxificação das espécies reativas de oxigênio, devido à inibição das enzimas anti-oxidantes (glutathione peroxidase e superóxido dismutase). A presença de uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio, acoplada a uma piora da habilidade de detoxificar peróxidos, pode explicar a toxicidade celular da homocisteína comparada com outros tióis. As células endoteliais parecem ter especial susceptibilidade à esta toxicidade induzida pela hiperhomocisteinemia (43).

Uma das principais causas de perda do enxerto no pós-transplante renal é a morte do paciente com rim funcionante, devido principalmente à doença cardiovascular (46-48). Transplantados renais não diabéticos apresentam risco de morte por doença cardíaca isquêmica aproximadamente seis vezes maior que a população em geral, e os diabéticos, 20 vezes maior (46).

Em uma análise de causas de morte em 7.040 pacientes com o enxerto renal funcionante, no período de 1988 a 1997, as doenças cardiovasculares foram responsáveis por 2.538 (36,1%) óbitos, sendo que metade destes ocorreram devido à infarto agudo do miocárdio. Acidente vascular cerebral foi a causa de morte em 438 (6,2%) destes. As prevalências de doença arterial coronariana e de hipertrofia ventricular são estimadas em 15% e 50%, respectivamente (50). Muitos pacientes já têm doença cardiovascular significativa antes do transplante, na fase de tratamento conservador e mais ainda na fase dialítica. Entretanto, fatores de risco cardiovascular clássicos são freqüentemente mantidos ou agravados após o transplante, como hipertensão arterial sistêmica (50%-80%), hipercolesterolemia (60%), hipertrigliceridemia (35%) e diabetes mellitus adquirido pós-transplante (10%). Fatores de risco não clássicos como inflamação crônica, proteinúria, fatores protrombóticos, hiperhomocisteinemia e estresse oxidativo são atualmente reconhecidos como amplificadores da doença cardiovascular. (44)

A magnitude da associação entre hiperhomocisteinemia e doença cardiovascular é mais forte (RR:1,6) em pacientes com diabete melito tipo 2 do que em pacientes não diabéticos (32).

Conforme estudo de Wald et al, os níveis de homocisteína foram maiores nos pacientes que morreram de doença cardíaca isquêmica do que nos controles (34).

Para os homens com grande aumento de homocisteína o risco relativo de morte chegou a 2,9 (após ajuste para os fatores de confusão) quando comparado a pacientes com valores de homocisteína normais. Boushey et al relataram que a razão de chances para o desenvolvimento de doença arterial coronariana para cada aumento de 5 μ mol/l de homocisteína sérica acima do normal seria de 1,6 para homens e 1,8 para mulheres (32).

O estudo Framingham também relatou um aumento duas vezes maior na incidência de hiperhomocisteinemia em pacientes com doença carotídea comparado a indivíduos com menores concentrações (32).

A dislipidemia é uma complicação freqüente após o transplante renal. Sua prevalência varia de 16% a 81%, dependendo do momento em que são determinados os lipídios séricos após o transplante (50, 51). As potenciais causas de dislipidemia em transplantados renais incluem predisposição genética, dieta, ganho de peso pós-transplante, idade, sexo, peso do receptor, nível dos lipídios séricos pré-transplante, diabetes, variáveis relacionadas à função do enxerto (proteinúria e creatinina sérica) e uso de drogas como diuréticos, beta-bloqueadores e imunossupressores (52).

Atualmente, a avaliação do perfil lipídico tende a ser realizada precocemente após o transplante (52). Kasiske, em recente revisão sobre doença cardiovascular em transplantados renais, sugere que também nessa população sejam seguidas as mesmas recomendações, em relação às metas de LDL-colesterol, preconizadas para pacientes dislipidêmicos em geral (53). Ducloux e colaboradores verificaram relação positiva entre homocisteína e LDL-colesterol (33), porém esta associação não foi demonstrada em outro estudo (17). Em transplantados renais, as

potenciais estratégias terapêuticas para a dislipidemia incluem a terapia dietética, a modificação no esquema imunossupressor e o uso de drogas hipolipemiantes (20, 43, 52).

Portanto, a diminuição do risco cardiovascular é um dos desafios mais importantes a ser enfrentado na busca de aumento da sobrevida de pacientes transplantados renais (49).

5. O IMPACTO CLÍNICO E O MANEJO DA HIPERHOMOCISTEINEMIA NO TRANSPLANTE RENAL

A prevalência de hiperhomocisteinemia na população de transplantados renais aproxima-se a 70% sendo de fundamental importância sua avaliação (18, 23, 27).

Ducloux et al demonstrou que a homocisteína prediz complicações cardiovasculares em receptores de transplante renal. Neste estudo, onde foram avaliados 207 pacientes, o risco relativo para a ocorrência de complicações cardiovasculares aumentou 6% para cada $\mu\text{mol/l}$ de aumento no nível sérico de homocisteína (1).

Em outra análise têm sido demonstrado que o *clearance* de creatinina, o status do folato e o genótipo MTHFR 677TT foram os principais preditores dos níveis de homocisteína em transplantados renais (45). Estudando-se 189 pacientes transplantados renais, entretanto, Hagen et al verificou que nenhum dos genótipos MTHFR nem polimorfismos destes influenciaram na sobrevida do enxerto e do paciente transplantado renal (45).

A reposição de ácido fólico e de vitaminas B6 e B12 em doses suprafisiológicas pareceu reduzir os níveis de homocisteína sérica (12, 20, 25). Entretanto, diversos

estudos demonstraram que a creatinina sérica foi o único fator independentemente associado aos níveis séricos de homocisteína em receptores de transplante renal, e que os níveis de vitamina B12 e de ácido fólico tiveram uma influência fraca nestes pacientes (6,12).

É interessante mencionar que receptores de transplante renal parecem ser resistentes às doses padrão de vitamina B usadas na população em geral para a correção dos níveis de homocisteína (37).

Foi demonstrado que a suplementação dietética de vitamina B diminuiu as concentrações plasmáticas de homocisteína, mas não corrigiu a disfunção endotelial em macacos ateroscleróticos com estabelecida lesão estrutural e hipercolesterolemia persistente. Estes dados indicam que intervenções mais precoces com o intuito de diminuir ambos, homocisteína e colesterol, podem ser necessárias para corrigir a disfunção endotelial efetivamente (12, 43). Notou-se, também, que um ano de tratamento para diminuir a homocisteína sérica não melhorou a função endotelial de pacientes em tratamento dialítico. Intervenções em fases mais precoces da insuficiência renal podem ser necessárias para corrigir a disfunção endotelial de forma efetiva em pacientes urêmicos (43).

Em contrapartida, a hiperhomocisteinemia, mais leve nos transplantados renais do que em pacientes submetidos à hemodiálise, parece ser consideravelmente menos refratária ao tratamento com altas doses de vitamina B (23).

Estudos comparando a suplementação de MTHF com a de ácido fólico em transplantados renais demonstraram que a MTHF não resultou em reduções adicionais nos níveis de Hcy. Houve também uma menor porcentagem de

pacientes em hemodiálise, comparados aos transplantados renais, que atingiram o nível de homocisteína sérico desejado neste estudo ($< 12 \mu\text{mol/l}$) (23).

Estudos com o uso de fibratos demonstraram que os níveis séricos de homocisteína se elevaram após seis meses de tratamento, o que provavelmente ocorreu devido à piora da função do enxerto nestes pacientes (7-9).

Agentes como o folato e a piridoxina são seguros, de baixo custo, e podem ser usados para o tratamento da hiperhomocisteinemia, uma vez que níveis mais baixos destas substâncias foram encontrados em transplantados renais estáveis (11, 24, 39).

JUSTIFICATIVA

Pacientes transplantados renais apresentam índices elevados de doenças vasculares ateroscleróticas. A incidência aumentada de eventos cardiovasculares em transplantados é atribuída, em parte, a alta prevalência de fatores de risco tradicionais do processo aterosclerótico como hipertensão arterial, dislipidemia, diabetes mellitus, obesidade, sedentarismo e, como sugerido por estudos mais recentes, fatores não tradicionais como hiperhomocisteinemia (4, 6, 10, 14, 24, 26, 27). Entretanto, a associação entre risco cardiovascular e hiperhomocisteinemia não é clara nessa população de pacientes (2, 34).

A avaliação dos níveis séricos de homocisteína em transplantados renais tem sido foco de atenção de diversos estudos, e alguns autores demonstraram uma correlação positiva entre níveis séricos de colesterol e homocisteína (27, 28, 33). Pouco se sabe sobre a prevalência de hiperhomocisteinemia em receptores de transplante renal no Brasil. Fonseca et al.(17), estudando um grupo de transplantados renais estáveis com hiperhomocisteinemia, não observaram correlação entre os níveis séricos de homocisteína e de lipídios.

Dentro deste contexto, objetivamos neste estudo estimar a prevalência de hiperhomocisteinemia em transplantados renais em um centro de transplantes de Porto Alegre, RS, verificar a existência de correlação entre homocisteína e lipídios séricos e identificar potenciais fatores demográficos e clínicos que sejam determinantes dos níveis de homocisteína neste grupo de pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ducloux D, Motte G, Challier B, Gibey R, Chalopin JM. Serum total homocysteine and cardiovascular disease occurrence in chronic, stable renal transplant recipients: a prospective study. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 134-137.
2. Dimeny E, Hultberg B, Wahlberg J, Fellstrom B, Arnadottir M. Serum total homocysteine concentration does not predict outcome in renal transplant recipients. *Clin Transplant* 1998; 12:563-568.
3. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum h, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *New Engl J Med* 1997; 337:230-237.
4. Massy ZA, Chadeaux-Vekemans B, Chevalier A, Bader CA, Druke TB, Legendre C, Lacour B, Kamoun P, Kreis H. Hyperhomocysteinaemia: a significant risk factor for cardiovascular disease in renal transplant recipients. *Nephron Dial Transplant* 1994; 9: 1103-1108.
5. Arnadottir M, Hultberg B, Vlsdov V, Nilsson-Ehle P, Thyssell H. Hyperhomocysteinaemia in cyclosporin-treated renal transplant recipients. *Transplantation* 1996; 61:509-512.
6. Ducloux D, Ruedin C, Gibey R, Vautrin P, Bresson-Vautrin, Rebibou JM, Chalopin JM. Prevalence, determinants, and clinical significance of hyperhomocysteinaemia in renal transplant recipients. *Nephron Dial Transplant* 1998; 13: 2890-2893.

7. Giral P, Bruckert E, Jacob N, Chapman MJ, Foglietti MJ, Turpin G. Homocysteine and lipid lowering agents. A comparison between atorvastatin and fenofibrate in patients with mixed hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2001; 154:421-427.
8. Westphal S, Diekes J, Luley C. Effects of fenofibrate and gemfibrozil on plasma homocysteine. *Lancet* 2001; 358:39-40.
9. Lorgeryl M, Salen P, Paillard F, Lacan F, Richard G. Lipid-lowering drugs and homocysteine. *Lancet* 1999; 353:209-210.
10. Bostom AG, Gohh RY, Liaugaudas G, Beaulieu AJ, Han H, Jacques PF, Dworkin L, Rosenberg IH, Selhub J. Prevalence of mild fasting hyperhomocysteinaemia in renal transplant versus coronary artery disease patients after fortification of cereal grain flour with folic acid. *Atherosclerosis* 1999; 145(1): 221-224.
11. Beaulieu AJ, Gohh RY, Han H, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG. Enhanced reduction of fasting total homocysteine levels with supraphysiological versus standard multivitamin dose folic acid supplementation in renal transplant recipients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(12):2918-2921.
12. Bostom AG, Gohh RY, Beaulieu AJ, Han H, Jacques PF, Dworkin L, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of fasting plasma total homocysteine levels among chronic stable renal transplant recipients. *Transplantation* 1999; 68:257-261.

13. Quiroga I, Morris-Stiff G, Baboo R, Darby CR, Lord RH, Jurewicz WA. Differential homocysteine levels in renal transplant patients receiving neoral versus tacrolimus. *Transplant proc* 2001; 33:1209-1210.
14. Beaulieu AJ, Lapane KL, Gohh RY, Selhub J, Monaco AP, Dworkin L, Rosenberg IH, Bostom AG. Short-term reproducibility of total homocysteine determinations in stable renal transplant recipients. *Transplant proc* 1999; 31:2121-2123.
15. Kim SI, Yoo TH, Song HY, Hwang JH, Lee HY, Han DS, Moon JI, Kim YS, Park KI, Paeng KJ, Choi KH. Hyperhomocysteinemia in renal transplant recipients with cyclosporine. *Transplant proc* 2000; 32:1878-1879.
16. Ducloux D, Gibey R, Vautrin P, Bresson-Vautrin, Rebibou JM, Chalopin JM. Hyperhomocysteinemia in renal transplant recipients with and without cyclosporine. *Clinic Nephrol* 1998; 49:232-235.
17. Fonseca I, Queirós J, Santos MJ, Mendonça D, Henriques AC, Sarmiento AM, Santos AC, Guimarães S, Pereira M. Hyperhomocysteinemia in renal transplantation: preliminary results. *Transplant proc* 2000; 32:2602-2604.
18. Kes P. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal failure. *Acta Med Croatica* 2000; 54(4-5): 175-81.
19. Hoffer LJ, Robitaille L, Elian KM, Bank K, Hongsprabhas P, Mamer OA. Plasma reduced homocysteine concentration are increased in end-stage renal disease. *Kidney Int* 2001; 59(1): 372-377.
20. Yeun JY, Kaysen GA. C-reactive protein, oxidative stress, homocysteine, and troponin as inflammatory and metabolic predictors of atherosclerosis in ESRD. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; 9(6): 621-630.

21. Van Guldener C, Stehouwer CD. Hyperhomocysteinemia, vascular pathology and endothelial dysfunction. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26(3): 281-289.
22. Sunder-Plassmann G, Winkelmayr WC, Foldinger M. Therapeutic potential of total homocysteine-lowering drugs on cardiovascular disease. *Expert Opin Investig Drugs* 2000; 9 (11): 2637-2651.
23. Bostom AG, Shemin D, Gohh RY, Beaulieu AJ, Bagley P, Massy ZA, Jacques PF, Dworkin L, Selhub J. Treatment of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients and renal transplant recipients. *Kidney Int Suppl* 2001; 78:S246-S252.
24. Bostom AG, Gohh RY, Beaulieu AJ, Nadeau MR, Hume AL, Jacques PF, Selhub J, Rosenberg IH. Treatment of hyperhomocysteinemia in renal transplant recipients. A randomized, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1997; 127(12): 1089-1092.
25. Sunder-Plassmann G, Floth A, Foldinger M. Hyperhomocysteinemia in organ transplantation. *Curr Opin Urol* 2000; 10(2): 87-94.
26. Arnadottir M, Hultberg B, Wahlberg J, Fellstrom B, Dimeny E. Serum total homocysteine concentration before and after renal transplantation. *Kidney Int* 1998; 54(4): 1380-1384.
27. Locsey L, Asztalos L, Dan A, Kincses Z, Berczi C, Sziki G. Changes in cardiovascular risk factors after renal transplantation. *Magy Seb* 2001; 54(2): 101-104.
28. Krmar RT, Ferraris JR, Ramirez JA, Galarza CR, Waisman G, Janson JJ, Llapur CJ, Sorroche P, Legal S, Camera MI. Hyperhomocysteinemia in

- stable pediatric, adolescents, and young adult renal transplant recipients. *Transplantation* 2001; 71(12): 1748-1751.
29. Fodinger M, Wagner OF, Horl WH, Sunder-Plassmann G. Recent insights into molecular genetics of the homocysteine metabolism. *Kidney Int* 2001; 59 (Suppl. 78): S238-S242.
30. Wrone EM, Zehnder JL, Hornberger JM, McCann LM, Coplon NS, Fortmann SP. An MTHFR variant, homocysteine, and cardiovascular comorbidity in renal disease. *Kidney Int* 2001; 60:1106-1113.
31. Hjelmessaeth J, Hartmann A, Midtvedt K, Aakhus S, Stenstrom J, Morkrid L, Egeland T, Tordarson H, Fauchald P. Metabolic cardiovascular syndrome after renal transplantation. *Nephron Dial Transplant* 2001; 16:1047-1052.
32. Fonseca V, Guba SC, Fink LM. Hyperhomocysteinemia and the Endocrine System: Implications for Atherosclerosis and Thrombosis. *Endocrine Reviews* 1999; 20 (5): 738-759.
33. Ducloux D, Gibey R, Motte G, Nguyen UN, Abdelfath A, Chalopin JM. Homocysteine, nutritional status and insulin in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1674-1677.
34. Mangoni AA, Jackson SHD. Homocysteine and cardiovascular disease: current evidence and future prospects. *Am J Med* 2002; 112: 556-565.
35. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. (Second edition). *Principles of biochemistry* – NY-Worth Publishers, 1993; p. 525-702.
36. Roskoski RJ. *Biochemistry* (First edition). Saunders Company, 1996; p.225-226.

37. Friedman AN, Rosenberger IH, Selhub J, Levey AS, Bostom AG. Hyperhomocysteinemia in renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2002; 2(4): 308-313.
38. Laures AS, Gomes A, Alvarez V, Coto E, Baltar J, Alvarez-Grande J. Influence of anticalcineurinic therapy in plasma homocysteine levels of renal transplant recipients: a prospective study. *Transplant Proc* 2003; 35(5): 1739-1741.
39. Akbas SH, Tuncer M, Gurkan A, Yucetin L, Yavuz A, Demirbas A, Ersoy F, Gultekin M, Yakupoglu G, Akaydin M. Plasma homocysteine levels in renal transplant patients on tacrolimus therapy. *Transplant Proc* 2004; 36(1):159-160.
40. Fowler B. The folate cycle and disease in humans. *Kidney Int* 2001; 59 (suppl 78): S221-S229.
41. Perna AF, Ingrosso D, Castaldo P, Galletti P, Santo AG. Homocysteine and transmethylation in uremia. *Kidney Int* 2001; 59 (suppl 78): S230-S233.
42. Guldener VC, Stam F, Stehouwer CDA. Homocysteine metabolism in renal failure. *Kidney Int* 2001; 59 (suppl 78): S234-S237.
43. Massy ZA, Ceballos I, Chadeaux-Vekemens B, Nguyen-Khoa T, Descamps-Latscha B, Drüeke TB, Jungers P. Homocysteine, oxidative stress, and endothelium function in uremic patients. *Kidney Int* 2001; 59 (suppl 78): S243-S245.

44. Maes BD, Vanrenterghem YFCh. Cyclosporine: Advantages Versus Disadvantages Vis-à-vis Tacrolimus. *Transplant Proc.* 2004; 36 (suppl 2): S40-S49.
45. Hagen W, Födinger M, Heinz G, Buchmayer H, Hörl WH, Sunder-Plassmann G. Effect of MTHFR genotypes and hyperhomocysteinemia on patient and graft survival in kidney transplant recipients. *Kidney Int* 2001; 59 (suppl 78): S253-S257.
46. Kasiske BL. Cardiovascular disease after renal transplantation. *Semin Nephrol* 2000; 20(2):176-187.
47. Fruchart JC, Nierman MC, Stroes ES, Kastelein JJ, Duriez P. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation* 2004; 15 (suppl 1):III15-19.
48. Vaudo G, Marchesi S, Siepi D, Bagaglia F, Paltriccia R, Pirro M, Schillaci G, Lupattelli G, Mannarino. Relevance of homocysteine on brachial flow-mediated vasodilatation and carotid and femoral intima-media thickness in patients with hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2004; 93 (11): 1413-1416.
49. Winkelmayr W.C, Kramar R, Curhan G, Chandraker A, Endler G, Födinger M, Hörl W, Sunder-Plassmann G. Fasting plasma total homocysteine levels and mortality and allograft loss in kidney transplant recipients: a prospective study. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 255-260.
50. Santos AF, Keitel E, Bittar AE, Neumann J, Fuchs FD, Goldani JC, Fonseca NA, Prates VC, Zaffan D, Voegeli C, Kroth L, Steffenello G, Saitovitch D, Garcia VD. Safety and efficacy of simvastatin for

hyperlipidemia in renal transplant recipients: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Transplant Proc.* 2001; 33 (1-2): 1194-1198.

51. Stores J, Lindley EJ, Bamfield MC, Burniston MT, New Stead CG. MDRD equation estimates of glomerular filtration rate in potential living kidney donors and renal transplant recipients with impaired graft function. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 2036-2037.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o nível sérico de homocisteína em pacientes transplantados renais dislipidêmicos e não dislipidêmicos.

Objetivos Secundários

1. Avaliar a prevalência de hiperhomocisteinemia em um centro brasileiro de transplantes.
2. Avaliar a influência do nível de função do enxerto na homocisteína sérica de pacientes transplantados renais.
3. Avaliar a correlação entre homocisteína e colesterol séricos em transplantados renais estáveis.
4. Avaliar a associação entre o uso de ciclosporina neoral e os níveis séricos de homocisteína em pacientes transplantados renais.

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Título

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS COM E SEM HIPERCOLESTEROLEMIA.

Fabiana Piovesan¹, Francisco José Veríssimo Veronese¹, Auri Ferreira Santos², Roberta Pozza², Péricles Serafim Sarturi¹, Alexandre Tognon², Valter Duro Garcia², Elizete Keitel², David Saitovitch.³

Instituições

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. ²Serviço de Transplante Renal Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, RS, Brasil. ³Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde: Nefrologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Tópicos Correntes: Homocisteína em receptores de transplante renal

Resumo

A doença cardiovascular é uma importante causa de morbidade e mortalidade após transplante renal. Estudos recentes têm sugerido a associação entre hiperhomocisteinemia, dislipidemia, aterosclerose e eventos cardiovasculares. A meta deste estudo foi determinar a prevalência de hiperhomocisteinemia em transplantados renais estáveis e avaliar a associação dos lipídios séricos e da função do enxerto nos níveis séricos de homocisteína (Hcy). Hiperhomocisteinemia foi definida como valores séricos de homocisteína maiores do que 15 μ mol/l. Foram avaliados 105 pacientes clinicamente estáveis, considerando idade, tempo pós-transplante, níveis séricos de colesterol, função do enxerto, proteinúria e uso de ciclosporina como as principais variáveis relacionadas ao nível sérico de homocisteína.

Análise de regressão linear múltipla foi empregada para avaliar o efeito independente destes parâmetros nos níveis de homocisteína. A prevalência de hiperhomocisteinemia nesta população de transplantados renais foi 74,3%.

Pacientes foram divididos, posteriormente, em 2 grupos, hiper (colesterol total maior que 200mg/dl e LDL-colesterol maior que 130mg/dl) e normocolesterolêmicos. Receptores hipercolesterolêmicos foram mais velhos e tiveram um menor tempo pós-transplante. Eles também apresentavam menor DCE e maior proteinúria bem como níveis séricos mais elevados de homocisteína. Pacientes com hiperhomocisteinemia tinham estatisticamente maiores níveis séricos de triglicerídeos e pior função do enxerto, e seu LDL-colesterol sérico também tendeu a ser maior do que nos pacientes sem hiperhomocisteinemia. Uma correlação significativa e positiva foi encontrada entre creatinina sérica e

níveis de homocisteína ($r=0,32$, $P=0,01$). A análise de regressão múltipla revelou que ambos, dislipidemia e função renal, afetam independentemente os níveis de homocisteína.

Nossos resultados confirmam a alta prevalência de hiperhomocisteinemia em receptores de transplante renal, especialmente em pacientes hipercolesterolêmicos. Sugere-se que uma pior função do enxerto possa influenciar negativamente os níveis séricos de homocisteína e colesterol. Posteriores estudos devem investigar se este adverso perfil metabólico está associado com maior mortalidade cardiovascular ao longo do tempo.

Palavras-chave: dislipidemia, transplante renal, hiperhomocisteinemia.

Correspondência para autor:

David Saitovitch

Av. Ipiranga 6670, conj. 204. Centro Clínico da PUCRS

[CEP 90610.000] Porto Alegre, Brasil.

Fone/ Fax: (51) 3336-7700

E-mail: dsaitov@terra.com.br

A doença cardiovascular é uma causa importante de morbidade e mortalidade após o transplante renal. Fatores de risco distintos, atuando isoladamente ou em conjunto, iniciam o processo aterosclerótico, levando a disfunção endotelial. Geralmente, mais de um desses fatores, os quais incluem hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, obesidade, dislipidemia, tabagismo e a história familiar são encontrados nos pacientes transplantados renais. Isto pode explicar a alta prevalência da doença cardiovascular nesta população (1,2,11). Elevações significativas nos níveis séricos de colesterol e LDL-colesterol são freqüentes após o transplante renal, ocorrendo em mais de 60% desses pacientes (3).

Roodnat e colaboradores acompanharam 676 pacientes transplantados renais e analisaram o papel da hipercolesterolemia na sobrevida do enxerto e do paciente demonstrando uma influencia negativa (4).

A homocisteína como fator de risco cardiovascular foi estudado há mais de 30 anos atrás, após observarem extensas lesões ateroscleróticas em autópsias de pacientes afetados por certas variantes genéticas da homocistinúria. A partir de então a homocisteína tem sido investigada como fator na gênese da aterosclerose (5).

Hoje, a hiperhomocisteinemia é um fator de risco cardiovascular bem estabelecido na população em geral, e alguns estudos sugerem que esta associação também está presente em transplantados renais. Em 50 a 70% dos pacientes a concentração sérica da homocisteína parece estar aumentada (1,2,6,7,23).

Estudos recentes têm sugerido mecanismos através dos quais a hiperhomocisteinemia possa ser um fator de risco adicional para o desenvolvimento de aterosclerose e doença cardiovascular em pacientes que

apresentam outros fatores de risco, tal como os dislipidêmicos (2,8,9). Ducloux e colaboradores (11) estudaram transplantados renais clinicamente estáveis, demonstrando uma correlação positiva entre a homocisteína e o LDL-colesterol séricos. Neste contexto, o dano endotelial ocorre, entre outros fatores, pela predominância no plasma das formas oxidadas da homocisteína, gerando espécies reativas de oxigênio e toxicidade tecidual (5,8,10,12).

Fatores associados à hiperhomocisteinemia são idade, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, níveis de folato e de vitamina B12, colesterol elevado, sedentarismo e, principalmente, a função renal (6, 11, 13, 14-19). Em relação às drogas imunossupressoras, alguns estudos demonstraram não haver correlação entre os níveis sanguíneos de ciclosporina e de homocisteína (9,14,16). Por outro lado, os estrógenos podem afetar a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo da homocisteína, reduzindo os seus níveis (18).

Acredita-se que o risco de óbito por cardiopatia isquêmica seja aproximadamente seis vezes maior em transplantados renais do que na população em geral (2,13,21). Além disso, o risco relativo para a ocorrência de complicações cardiovasculares em transplantados renais aumenta 6% para cada $\mu\text{mol/l}$ de aumento nos níveis de homocisteína sérica (25). Portanto, o controle de fatores de risco cardiovasculares, como a dislipidemia e a hiperhomocisteinemia é mandatório.

Níveis séricos de homocisteína são inversamente relacionados à função renal, na qual este é o principal determinante (8,22). Entretanto, após o transplante renal a queda dos níveis séricos de homocisteína parece ser menor que o esperado com a melhora da função renal. Outros fatores, tais como a disfunção crônica do

enxerto, a dislipidemia e as drogas imunossupressoras podem influenciar os níveis de Hcy, aumentando o risco cardiovascular nestes indivíduos (16).

O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de hiperhomocisteinemia em pacientes transplantados renais estáveis com ou sem dislipidemia, e avaliar o efeito de variáveis clínicas, tais como função do enxerto, colesterol sérico e uso de ciclosporina sobre os níveis séricos de homocisteína.

Pacientes e Métodos

Dados clínicos e demográficos que foram incluídos em outro estudo (3) foram previamente coletados de 67 transplantados renais com hipercolesterolemia. Soros foram coletados e estocados a -80°C de janeiro de 2000 a dezembro de 2001. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Santa Casa de Porto Alegre, Brasil, e os pacientes foram incluídos no estudo após assinarem o termo de consentimento informado.

Para a presente análise, 38 receptores de transplante renal sem hipercolesterolemia (colesterol sérico $<200\text{mg/dl}$ e LDL-colesterol $<130\text{mg/dl}$) foram selecionados, através dos mesmos critérios de inclusão e exclusão (com a exceção dos níveis séricos de colesterol) do estudo anteriormente mencionado. Tais critérios foram: idade igual ou superior a 18 anos, tempo de transplante maior que seis meses, e depuração da creatinina endógena, avaliada pela coleta de urina de 24h, superior a 20 ml/min. Foram excluídos pacientes com síndrome nefrótica, portadores de insuficiência cardíaca congestiva severa (classes III ou IV) ou infarto agudo do miocárdio recente (< 6 meses), uso de anticoagulantes e/ou de vastatinas e níveis de triglicérides superiores a 400mg/dl. Nenhum

paciente estava em uso de suplementação de ácido fólico ou vitaminas do complexo B.

As variáveis demográficas e clínicas estudadas foram idade, gênero, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, tabagismo, uso de anticoncepcional oral, tempo pós-transplante, número de transplantes e esquema imunossupressor. Foram também coletados uréia, creatinina, albumina, glicemia de jejum, hemograma, plaquetas, transaminases, depuração de creatinina endógena e proteinúria de 24 horas. Os soros foram coletados após jejum de 12h e armazenados à -80°C , de janeiro a dezembro de 2003.

Homocisteína sérica foi medida por imunofluorescência polarizada (Abbott GmbH Diagnostika, Wiesbaden-Delkenheim, Alemanha). Hiperhomocisteinemia foi definida como níveis de homocisteína superiores a $15\ \mu\text{mol/l}$ (2).

Pacientes foram inicialmente divididos em 2 grupos, de acordo com os níveis séricos de colesterol, em normo e hipercolesterolêmicos. Em uma segunda análise os pacientes foram novamente divididos em outros 2 grupos, de acordo com os níveis de homocisteína.

Os testes t de Student e Mann-Whitney ou Wilcoxon foram usados respectivamente para amostras independentes e variáveis contínuas com distribuição normal e assimétrica. Qui-quadrado ou exato de Fischer foram usados para variáveis categóricas. Coeficientes de Pearson ou de Spearman foram usados para análise de correlação. Como a distribuição dos níveis séricos de homocisteína foi assimétrica, valores foram submetidos a transformação logarítmica para aproximar a curva aos valores da normalidade. Análise de regressão linear múltipla foi empregada para avaliar o efeito independente das

variáveis dislipidemia, tempo pós-transplante, idade, função do enxerto, uso de ciclosporina e proteinúria sobre os níveis séricos de homocisteína. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $P < 0,05$.

Resultados

Os dados demográficos e clínicos dos pacientes incluídos no estudo, conforme o nível de colesterol, são apresentados na tabela 1. Pacientes com hipercolesterolemia foram consideravelmente mais velhos e tinham um tempo pós-transplante menor. Houve também diferenças nos níveis de triglicerídeos, proteinúria e homocisteína, os quais foram maiores neste grupo. A função renal também foi pior nestes pacientes.

Setenta por cento dos pacientes foram mantidos em regimes imunossupressores baseados em ciclosporina. Outros esquemas imunossupressores utilizados foram prednisona e azatioprina em 15 pacientes hipercolesterolêmicos (29,8 %) e em 7 não hipercolesterolêmicos (18,5%). Tacrolimus associado a micofenolato mofetil ou azatioprina foi utilizado em seis pacientes. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada em qualquer nível de colesterol ou homocisteína em relação ao uso de ciclosporina (tabela 1 e 2).

A prevalência de hiperhomocisteinemia nesta população foi de 74,3%. Níveis séricos de homocisteína foram significativamente mais elevados nos pacientes com hipercolesterolemia (tabela 1). Essa diferença também é demonstrada na figura 1.

Foram apresentados os valores de mediana e intervalo interquartil do logaritmo da homocisteína dos grupos normo e hipercolesterolêmico (figura 1).

Verificamos também que os níveis séricos de homocisteína não foram influenciados pelos fatores demográficos, tais como, gênero, raça, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, tabagismo ou imunossupressão empregada. Entretanto, pacientes com hiperhomocisteinemia apresentaram maiores concentrações de triglicerídeos e creatinina sérica (tabela 2).

Uma correlação positiva e significativa foi vista entre a função do enxerto e os níveis de homocisteína ($r=0,32$, $P=0,01$). O modelo de regressão linear múltipla demonstrou que o uso de ciclosporina, a proteinúria, a idade e o tempo pós-transplante não se constituíram em fatores de confusão na relação da homocisteína com o colesterol sérico. Estes fatores, após serem ajustados neste modelo de regressão, não influenciaram os níveis de homocisteína. Os únicos fatores que influenciaram de forma independente os níveis séricos de homocisteína (expressa em logaritmo) foram a dislipidemia e a função renal (Tabela 3).

Discussão

O resultado deste estudo demonstrou uma elevada prevalência de hiperhomocisteinemia (74,3%) em transplantados renais clinicamente estáveis. Pacientes com hipercolesterolemia apresentaram maiores níveis séricos de homocisteína, em concordância com estudos prévios (2,8,9,11,14). Ducloux e colaboradores conduziram um estudo com 103 pacientes transplantados renais estáveis e demonstraram uma positiva associação entre homocisteína e LDL-colesterol (8). Contudo, tal associação não foi vista por outros autores (17,22).

Houve uma tendência de pacientes hiperhomocisteinêmicos terem níveis maiores de LDL-colesterol em relação aos pacientes normohomocisteinêmicos.

Receptores de transplante renal com hiperhomocisteinemia mostraram maiores níveis séricos de creatinina, porém a diferença não parece ser clinicamente relevante. Todavia, a função do enxerto destes receptores de transplante foi avaliada através do nível sérico de creatinina e depuração de creatinina endógena, métodos sabidamente pouco acurados para estimar a filtração glomerular (24). É possível que a pior função do enxerto possa ter afetado os níveis séricos de homocisteína, como sugerido pela análise de regressão dos resultados.

Uma elevação moderada da homocisteína está presente nos estágios precoces da insuficiência renal, a qual aumenta linearmente com a diminuição da filtração glomerular (11,14,15,19). Vários estudos têm demonstrado uma correlação inversa entre função renal e homocisteína sérica, utilizando diversos métodos de mensuração da função renal, tais como, creatinina sérica, depuração de creatinina endógena, cistatina C e Cr-EDTA (1,7,9,11).

Fonseca et al. descreveram que a elevação da homocisteína sérica estaria associada com gênero masculino, idade, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica e altos níveis de colesterol (18). No presente estudo, somente os níveis de triglicerídeos foram maiores no grupo hiperhomocisteinêmico. LDL-colesterol também tendeu a ser maior.

Para confirmar o efeito das variáveis clínicas nos níveis séricos de homocisteína, foi realizada uma análise de regressão múltipla. Neste modelo, os únicos fatores que independentemente influenciaram os níveis de homocisteína foram o

colesterol sérico e a função do enxerto. Níveis de homocisteína tenderam a serem menores em pacientes usando anticoncepção oral ($15,33 \pm 5,28 \mu\text{mol/l}$ x $21,67 \pm 8,98 \mu\text{mol/l}$, $P=0,09$). Estrógenos podem afetar a atividade de enzimas que participam no metabolismo da homocisteína. Isto pode explicar nossos resultados (18). Também houve uma tendência do tempo pós-transplante ser menor no grupo hiperhomocisteinêmico.

Pacientes com hipercolesterolemia parecem ter um pior perfil metabólico, como demonstrado por níveis mais elevados de homocisteína.

Ducloux e colaboradores (25) demonstraram um aumento de 6% no risco relativo de complicações cardiovasculares para cada $\mu\text{mol/l}$ de aumento na homocisteína sanguínea. Não consistia objetivo deste estudo a avaliação da associação entre doença cardíaca isquêmica e hiperhomocisteinemia, mas, com base em estudos prévios (2,8,21), acredita-se que a soma dos fatores de risco encontrados em transplantados renais - dislipidemia, hiperhomocisteinemia, hipertensão arterial, tabagismo, obesidade – possa resultar em aumentada morbidade e mortalidade cardiovascular.

Nenhuma correlação entre os níveis séricos de ciclosporina e homocisteína foi vista. Este achado também foi descrito em outros estudos (9,14,16). Menores valores de homocisteína em pacientes usando tacrolimus foram descritos. Entretanto, menores níveis de creatinina encontrados nestes pacientes podem, por si, justificar estes achados (20,26-28).

Winkelmayer e colaboradores (9) verificaram uma associação entre níveis séricos elevados de homocisteína e risco de perda do enxerto renal e morte em transplantados renais.

Em conclusão, nosso estudo demonstrou uma alta prevalência de hiperhomocisteinemia em receptores de transplante renal, especialmente no grupo com hipercolesterolemia e pior função do enxerto. Novos estudos podem investigar a possibilidade de que a pobre função do enxerto possa afetar negativamente os níveis séricos de homocisteína.

Referências

1. Bostom AG, Shemin D, Gohh RY, et al. Treatment of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients and renal transplant recipients. *Kidney Int Suppl* 2001; 78: S246-S252.
2. Massy ZA, Chadeaux-Vekemans B, Chevalier A, et al. Hyperhomocysteinaemia: a significant risk factor for cardiovascular disease in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9: 1103-1106.
3. Santos AF, Keitel E, Bittar AE, et al. Safety and efficacy of simvastatin for hyperlipidemia in renal transplant recipients: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Transplant Proc* 2001; 33(1-2): 1194-1198.
4. Roodnat JI, Mulder PG, Zietse R, et al. Cholesterol as an independent predictor of outcome after renal transplantation. *Transplantation* 2000; 69: 1704-1710.
5. Perna AF, Ingrosso D, Castaldo P, Galletti P, Santo AG. Homocysteine and transmethylation in uremia. *Kidney Int Suppl* 2001; 59: S230-S233.
6. Fonseca I, Queiros J, Santos MJ, et al. Hyperhomocysteinemia in renal transplantation: preliminary results. *Transplant Proc* 2000; 32: 2602-2604.
7. Beaulieu AJ, Lapane KL, Gohh RY, et al. Short-term reproducibility of total homocysteine determinations in stable renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1999; 31: 2121-2123.
8. Ducloux D, Gibey R, Motte G, Nguyen UN, Abdelfath A, Chalopin JM. Homocysteine, nutritional status and insulin in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1674-1677.

9. Winkelmayr WC, Kramar R, Curhan G, et al. Fasting plasma total homocysteine levels and mortality and allograft loss in kidney transplant recipients: a prospective study. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 255-260.
10. Kes P. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal failure. *Acta Med Croatica* 2000; 54: 175-181.
11. Ducloux D, Ruedin C, Gibey R, et al. Prevalence, determinants, and clinical significance of hyperhomocysteinaemia in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 2890-2893.
12. Mangoni AA, Jackson SHD. Homocysteine and cardiovascular disease: current evidence and future prospects. *Am J Med* 2002; 112: 556-565.
13. Locsey L, Asztalos L, Dan A, Kincses Z, Berczi C, Sziki G. Changes in cardiovascular risk factors after renal transplantation. *Magy Seb* 2001; 54: 101-104.
14. Ducloux D, Gibey R, Vautrin P, Bresson-Vautrin C, Rebibou JM, Chalopin JM. Hyperhomocysteinemia in renal transplant recipients with and without cyclosporine. *Clinic Nephrol* 1998; 49: 232-235.
15. Guldener VC, Stam F, Stehouwer CDA. Homocysteine metabolism in renal failure. *Kidney Int Suppl* 2001; 59: S234-S237.
16. Arnadottir M, Hultberg B, Wahlberg J, Fellstrom B, Dimeny E. Serum total homocysteine concentration before and after renal transplantation. *Kidney Int* 1998; 54: 1380-1384.
17. Bostom AG, Gohh RY, Beaulieu AJ, et al. Determinants of fasting plasma total homocysteine levels among chronic stable renal transplant recipients. *Transplantation* 1999; 68: 257-261.

18. Fonseca V, Guba SC, Fink LM. Hyperhomocysteinemia and the endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis. *Endocr Rev* 1999; 20: 738-759.
19. Kim SI, Yoo TH, Song HY, et al. Hyperhomocysteinemia in renal transplant recipients with cyclosporine. *Transplant Proc* 2000; 32: 1878-1879.
20. Laures AS, Gomes A, Alvarez V, Coto E, Baltar J, Alvarez-Grande J. Influence of anticalcineurinic therapy in plasma homocysteine levels of renal transplant recipients: a prospective study. *Transplant Proc* 2003; 35: 1739-1741.
21. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *New Engl J Med* 1997; 337: 230-237.
22. Drüeke TB, Abdulmassih Z, Lacour B, Bader C, Chevalier A, Kreis H. Atherosclerosis and lipid disorders after renal transplantation. *Kidney Int* 1991; 31: 24-28.
23. Sunder-Plassmann G, Floth A, Foldinger M. Hyperhomocysteinemia in organ transplantation. *Curr Opin Urol* 2000; 10: 87-94.
24. Stoves J, Lindley EJ, Barnfield MC, Burniston MT, Newstead CG. MDRD equation estimates of glomerular filtration rate in potential living kidney donors and renal transplant recipients with impaired graft function. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 2036-2039.
25. Ducloux D, Motte G, Challier B, Gibey R, Chalopin JM. Serum total homocysteine and cardiovascular disease occurrence in chronic, stable renal

transplant recipients: a prospective study. J Am Soc Nephrol 2000; 11: 134-137.

26. Quiroga I, Morris-Stiff G, Baboo R, Darby CR, Lord RH, Jurewicz WA. Differential homocysteine levels in renal transplant patients receiving neoral versus tacrolimus. Transplant Proc 2001; 33:1209-1211.
27. Akbas SH, Tuncer M, Gurkan A, et al. Plasma homocysteine levels in renal transplant patients on tacrolimus therapy. Transplant Proc 2004; 36: 159-160.
28. Maes BD, Vanreenterghem YFCh. Cyclosporine: advantages versus disadvantages vis-à-vis tacrolimus. Transplant Proc 2004; 36: S40-S49.

Tabela 1. Dados demográficos e clínicos dos pacientes transplantados renais conforme o nível de colesterol.

	Hipercolesterolêmico (N:67)	Normocolesterolêmico (N:38)	P
Idade (anos)	43,24 ± 10,9	38 ± 10,0	0,016
Gênero (M/F)	30/37	24/14	0,07
Raça (B/P)	61/6	34/4	0,79
HAS	32 (47,8%)	20 (52,6%)	0,63
IMC	27,09 ± 4,23	28,19 ± 4,74	0,72
Diabete Melito	4 (6%)	3 (7,9%)	0,70
Tabagismo	7 (10,4%)	4 (10,5%)	0,99
ACO	2 (5,4%)	4 (28,5%)	0,11
Uso de Ciclosporina	47 (70,2%)	20 (52,6%)	0,10
Tempo pós-tx (meses)	57,51 ± 38,22	86,08 ± 59,61	0,01
Colesterol Total (mg/dl)	278,97 ± 41,85	181,05 ± 21,97	<0,001
LDL colesterol (mg/dl)	182,06 ± 35,15	100,05 ± 17,21	<0,001
HDL colesterol (mg/dl)	56,06 ± 19,06	54,21 ± 14,04	0,60
Triglicerídeos (mg/dl)	202,51 ± 70,06	108,26 ± 26,95	<0,001
Creatinina (mg/dl)	1,49 ± 0,05	1,39 ± 0,06	0,22
DCE (ml/min)	68,08 ± 18,67	75,25 ± 14,42	0,03
Proteinúria (g/24h)	0,781 ± 0,99	0,245 ± 0,16	<0,001
Homocisteína (μmol/l)	22,79 ± 8,6	18,66 ± 8,5	0,03

(n:105) 1.Média ± SD 2.n (%) 3.IMC: Índice de massa corporal 4.Tx: Transplante renal

Tabela 2. Dados demográficos e clínicos dos pacientes transplantados renais conforme o nível de homocisteína.

	Homocisteína (n:78)	>15 Homocisteína ≤15 (n:27)	P
Idade (anos)	41,7±10,9	40,2±10,6	0,53
Gênero (M/F)	41/37	13/14	0,69
Raça (B/P)	68/10	27/0	0,08
IMC	20,0±4,3	26,8±5,0	0,47
Tempo pós-Tx (meses)	62,3±44,5	83,7±57,5	0,08
HAS	38 (48,7%)	14 (51,9%)	0,78
Tabagismo	9 (11,5%)	2 (7,4%)	0,73
Diabete Melito	6 (7,7%)	1 (3,7%)	0,67
ACO	3 (3,9%)	3 (11,1%)	0,18
Uso de Ciclosporina	56 (71,8%)	18 (66,7%)	0,62
Colesterol Total (mg/dl)	247,7±59,5	231,4±58,0	0,22
LDL colesterol (mg/dl)	157,5±47,8	137,5±52,4	0,07
HDL colesterol (mg/dl)	53,1±14,2	62,0±23,2	0,21
Triglicerídeos (mg/dl)	180,5±72,6	133,1±66,6	0,04
Creatinina (mg/dl)	1,5±0,38	1,2±0,44	0,01
DCE (ml/min)	70,2±16,2	71,9±21,1	0,65
Proteinúria (g/24h)	0,58±0,81	0,60±0,92	0,92

(n=105) 1.Média ± SD 2.n (%) 3.IMC: Índice de massa corporal 4.Tx: Transplante renal

Tabela 3. Análise multivariada das correlações do logaritmo da homocisteína

Modelo	Efeitos no log Hcy ¹	Coefficiente Beta	P
Constante	2.496	-	<0.001
Idade	-0.003	-0.073	0.47
Tempo pós transplante ²	-0.001	-0.160	0.16
Uso de ciclosporina	-0.005	-0.006	0.94
Creatinina sérica	0.277	0.302	0.001
Hipercolesterolemia	0.182	0.23	0.014

¹Coefficiente Beta expressando o efeito no log da homocisteína foi obtido em um modelo de regressão linear múltipla; ²Tempo de transplante do último seguimento.

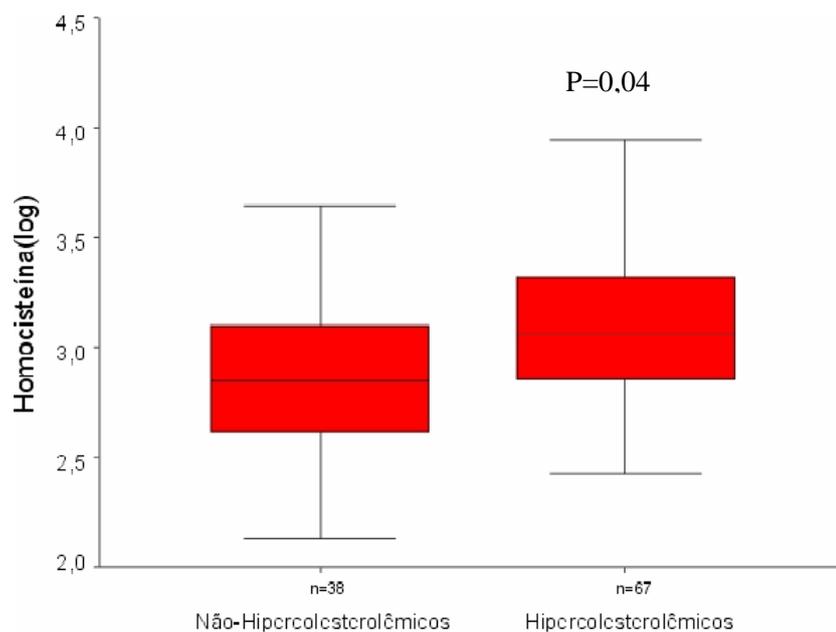


Figura 1. Box-plot mostrando o logaritmo dos níveis de homocisteína (mediana e intervalo inter-quartil) em pacientes hipercolesterolêmicos e normocolesterolêmicos.

**Assessment of serum homocysteine levels in renal transplant recipients
with and without hypercholesterolemia**

Fabiana Piovesan¹, Francisco José Veríssimo Veronese¹, Auri Ferreira Santos²,
Roberta Pozza², Péricles Serafim Sarturi¹, Alexandre Tognon², Valter Duro
Garcia², Elizete Keitel², David Saitovitch.³

¹Post Graduate Program in Medical Sciences: Nephrology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ²Renal Transplant Unit, Irmandade Santa Casa de Misericórdia, Porto Alegre, RS, Brazil. ³Post Graduate Program in Medicine and Health Sciences: Nephrology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Running head: Homocysteine in renal transplant recipients

Piovesan F, Veronese FJV, Santos AF, Pozza R, Sarturi PS, Tognon AP, Garcia VD, Keitel E, Saitovitch D

Assessment of serum homocysteine levels in renal transplant recipients with and without hypercholesterolemia

Abstract

Cardiovascular disease is a major cause of morbidity and mortality after renal transplantation. Recent studies have suggested an association among hyperhomocysteinemia, dyslipidemia, atherosclerosis and cardiovascular events. The aim of this study was to determine the prevalence of hyperhomocysteinemia in stable renal transplant recipients and to evaluate the association of serum lipids and graft function on serum homocysteine (Hcy) levels. Hyperhomocysteinemia was defined as serum levels of Hcy greater than 15 $\mu\text{mol/l}$. One hundred and five clinically stable renal transplant recipients were evaluated, considering age, post-transplant time, cholesterol levels, graft function, proteinuria and cyclosporine use as the main explanatory variables for Hcy serum levels. Multiple linear regression analysis was employed to evaluate the independent effect of these parameters on Hcy levels. The prevalence of hyperhomocysteinemia in this population was 74.3%. Patients were further divided in 2 groups, hyper (total cholesterol greater than 200mg/dl and LDL-cholesterol greater than 130mg/dl) and normocholesterolemic. Hypercholesterolemic recipients were older and had a shorter post-transplant time. They also presented lower endogenous creatinine clearance and higher proteinuria as well as Hcy serum levels. Patients with

hyperhomocysteinemia had statistically higher serum triglycerides and poorer graft function, and their LDL-cholesterol concentration also tended to be higher than in patients without hyperhomocysteinemia. A positive and significant correlation was found between serum creatinine and Hcy levels ($r=0.32$, $P=0.01$). Multiple regression analysis revealed that both dyslipidemia and renal function independently affect homocysteine values. Our results confirm a high prevalence of hyperhomocysteinemia in renal transplant recipients, especially in hypercholesterolemic patients. It is also suggested that worse graft function may negatively influence serum homocysteine and cholesterol levels. Further studies should investigate if this adverse metabolic profile is associated with higher cardiovascular mortality in the long term.

Keywords: dyslipidemia, renal transplant, hyperhomocysteinemia.

Corresponding author:

David Saitovitch

Av. Ipiranga 6690/204 – Centro Clínico da PUCRS

CEP 90610-000 – Porto Alegre, RS – Brazil

Phone: +55-51-3336-7700

Fax: +55-51-3336-7700

E-mail: dsaitov@terra.com.br

Introduction

Cardiovascular disease is an important cause of morbidity and mortality after renal transplantation. Distinct risk factors, acting isolatedly or in cooperation, trigger the atherosclerotic process, thus leading to endothelial dysfunction. Generally, more than one of these factors, which include systemic arterial hypertension, diabetes mellitus, obesity, dyslipidemia, smoking and family history, are found in renal transplant recipients. This may explain the high prevalence of cardiovascular disease in this population (1,2,11). Significant elevation in serum levels of cholesterol and LDL-cholesterol are frequent after renal transplantation, occurring in more than 60% of these patients (3).

Roodnat et al. accompanied 676 renal transplant recipients and analyzed the role of hypercholesterolemia in both graft and patient survival, demonstrating a negative influence (4).

Homocysteine, as a cardiovascular risk factor, was studied (5) over 30 years ago, after observing extensive atherosclerotic lesions during autopsies of patients affected by certain genetic variants of homocystinuria. Henceforth, homocysteine has been investigated as a factor in the genesis of atherosclerosis.

Today, hyperhomocysteinemia is a well-established cardiovascular risk factor in the general population, and some studies suggest that this association is also present among renal transplant recipients. In 50 to 70% of the patients, the serum concentration of homocysteine is increased (1,2,6,7,23).

Recent studies have suggested mechanisms through which hyperhomocysteinemia may be an additional factor for the development of atherosclerosis and cardiovascular disease in patients presenting other risk

factors, such as dyslipidemia (2,8,9). Ducloux et al. (11) studied clinically stable renal transplant recipients, showing a positive correlation between serum homocysteine and LDL-cholesterol. In this context, endothelial damage occurs, among other factors, due to predominance of oxidated forms of homocysteine in plasma, thus generating reactive oxygen species and tissue toxicity (5,8,10,12).

Factors associated with hyperhomocysteinemia are age, smoking, systemic arterial hypertension, folate and vitamin B12 levels, elevated cholesterol, sedentarism and, especially, renal function (6,11,13,14-19). As for immunosuppressive drugs, some studies have shown that there is no correlation between blood cyclosporine and homocysteine levels (9,14,16). However, estrogens may affect the activity of enzymes involved in homocysteine metabolism, thus reducing its levels (18).

Risk of death by ischemic heart disease is believed to be six times greater in renal transplant recipients than for the general population (2,13,21). Moreover, the relative risk of cardiovascular complications in renal transplant recipients increases 6% for each $\mu\text{mol/l}$ increase in blood homocysteine levels (25). Therefore, control of cardiovascular risk factors, such as dyslipidemia and hyperhomocysteinemia, is mandatory.

Serum homocysteine levels are inversely related to renal function, which, in turn, is the major determinant of the former (8,22). However, after renal transplant, the decrease in serum homocysteine levels seems to be smaller than expected with the improvement of renal function. Others factors, such as chronic graft dysfunction, dyslipidemia or the effect of immunosuppressive drugs, may influence homocysteine levels, thus increasing cardiovascular risk in these individuals (16).

The purpose of this study was to determine the prevalence of hyperhomocysteinemia in stable renal transplant recipients with or without dyslipidemia, and to assess the effect of clinical variables, such as graft function, serum cholesterol and use of cyclosporine, on serum homocysteine levels.

Patients and Methods

Clinical and demographic data that we included in another study (3) had been previously collected from 67 renal transplant recipients with hypercholesterolemia. Sera were collected and stored at -80°C from January 2000 and December 2001. This study was approved by the Ethics Committee of Santa Casa de Misericórdia Hospital; Porto Alegre, Brazil, and the patients were included in the study after signing an informed consent.

For the present analysis, 38 renal transplant recipients without hypercholesterolemia (serum cholesterol < 200mg/dl and LDL-cholesterol < 130 mg/dl) were selected, through the same inclusion and exclusion criteria (with the exception of serum cholesterol levels) of the aforementioned study. Such criteria were: age over 18 years-old, time post-transplant greater than six months, and endogenous creatinine clearance, in 24h-urine, greater than 20 ml/min. Patients with nephrotic syndrome, severe congestive heart failure (classes III or IV) or recent acute myocardial infarction (< 6 months), using of anticoagulants and/or statins and with serum triglyceride concentration greater than 400 mg/dl were excluded. No patient was on folic acid or vitamin B supplementation.

Demographic and clinical variables studied were age, gender, systemic arterial hypertension, diabetes mellitus, smoking, use of oral contraceptives, post-transplantation time, number of transplants and immunosuppressive regimen. Serum urea, creatinine, albumin, fasting blood glucose, complete blood count, platelets, liver enzymes, endogenous creatinine clearance and 24-hour proteinuria were collected. Serum samples were drawn after 12-hour fasting and stored at -80°C, from January to December 2003.

Serum homocysteine was measured by polarized immunofluorescence (Abbot GmbH Diagnostika, Wiesbaden-Delkenheim, Germany). Hyperhomocysteinemia was defined as serum homocysteine levels greater than 15 $\mu\text{mol/l}$ (2).

Patients were initially divided in 2 groups, according to serum cholesterol levels, in norm and hypercholesterolemic. In the second step the patients select to study were divided again in other 2 groups, now according to serum homocysteine levels.

Student's *t* Test and Mann-Whitney or Wilcoxon Tests were respectively used for independent samples and continuous variables with normal or asymmetric distribution. Chi-square or Fisher exact tests were used for categorical variables. Pearson or Spearman coefficients were used for correlation analysis. As the distribution of homocysteine serum levels was asymmetric, values underwent logarithmic transformation in order to reduce skewness. Multiple linear regression analysis was used to assess the independent effect of dyslipidemia, post-transplantation time, age, graft function, cyclosporine use and proteinuria on serum homocysteine levels. Statistical significance was established at $P < 0.05$.

Results

Demographic and clinical data of the patients included in the study, according to cholesterol levels, are shown in Table 1. Patients with hypercholesterolemia were considerably older and had a shorter post-transplantation time. There were also differences in triglycerides, proteinuria and homocysteine levels, which were higher in this group. Renal function was worse in these patients.

Seventy percent of the patients were maintained on a cyclosporine-based regimen. Of the patients with hypercholesterolemia, 52 (70.2%) used a triple regimen (cyclosporine, azathioprine and prednisone), whereas 20 (52.6%) patients without hypercholesterolemia used the same regimen. Other immunosuppressant regimens were prednisone and azathioprine, followed by 15 patients with hypercholesterolemia (29.8%) and 7 patients without hypercholesterolemia (18.5%). Six patients used tacrolimus associated with mycophenolate or azathioprine. No difference was observed in either serum cholesterol or homocysteine levels regarding cyclosporine use (table 1 and 2 respectively).

The prevalence of hyperhomocysteinemia was 74.3%. Serum homocysteine levels were significantly higher in patients with hypercholesterolemia (Table 1). Median and interquartile range of homocysteine logarithm of the groups normo and Hypercholesterolemic were also presented. This difference is also illustrated in Figure 1.

It was also found that serum homocysteine levels were not influenced by demographic factors, such as gender, ethnicity, systemic arterial hypertension, diabetes mellitus, smoking or immunosuppressive regimen. However, patients with

hyperhomocysteinemia presented higher triglyceride and serum creatinine concentrations (Table 2).

A positive and significant correlation was found between graft function and homocysteine levels ($r=0.32$, $P=0.01$). Multiple linear regression revealed that cyclosporine use, proteinuria, age and post-transplant time were not confounding factors in the association between homocysteine and serum cholesterol. These factors, after adjustment in the regression model, did not affect homocysteine values. The only factors that independently affected homocysteine serum levels (expressed as a logarithm) were dyslipidemia and renal function (Table 3).

Discussion

The results of this study showed a high prevalence of hyperhomocysteinemia elevated (74.3%) in clinically stable renal transplant recipients. Patients with hypercholesterolemia showed higher serum homocysteine levels, which is in agreement with previous studies (2,8,9,11,14). Ducloux et al. conducted a study with 103 clinically stable renal transplant recipients and showed a positive association between homocysteine and LDL-cholesterol (8). However, such an association was not found by other authors (17,22).

Renal transplant recipients with hyperhomocysteinemia showed higher serum creatinine levels, although the difference did not seem to be clinically relevant. However, graft function in these transplant recipients was evaluated by serum creatinine measurement and endogenous creatinine clearance, methods that are knowingly not very accurate in estimating glomerular filtration (24). Poorer graft

function may have affected serum homocysteine levels, as suggested by regression analysis results.

A moderate elevation of homocysteine levels is found in the early stages of renal failure, which increases linearly with the decrease in glomerular filtration (11,14,15,19). Several studies have shown an inverse correlation between renal function and serum homocysteine using different renal function measurement methods, such as serum creatinine, endogenous creatinine clearance, cystatin C and Cr-EDTA (1,7,9,11).

Patients with hypercholesterolemia seems to have a worst metabolic profile, as evidenced by higher homocysteine serum levels.

Fonseca et al. (18) described that the elevation of serum homocysteine were associated with male gender, aging, smoking, systemic arterial hypertension and high cholesterol levels. In the present study, only triglyceride levels were higher in the hyperhomocysteinemic. LDL-cholesterol also tended to be higher.

Multiple linear regression analysis was performed in order to confirm the effect of clinical variables on serum homocysteine levels. In this model, the only factors that independently influenced homocysteine were serum cholesterol and graft function. Homocysteine levels tended to be lower in patients using oral contraceptives ($15.33 \pm 5.28 \mu\text{mol/l}$ x $21.67 \pm 8.98 \mu\text{mol/l}$, $P=0.09$). Estrogens might affect the activity of enzymes that participate in homocysteine metabolism. This could explain our results (18). Also, post-transplant time tended to be shorter in the hyperhomocysteinemic group.

Ducloux et al. (25) showed a 6% increase in the relative risk of cardiovascular complications for each $\mu\text{mol/L}$ increase in blood homocysteine. It was not the

purpose of this study to evaluate the association between ischemic heart disease and hyperhomocysteinemia, but according to previous studies (2,8,21) it is likely that the sum of risk factors found in transplant recipients – dyslipidemia, hyperhomocysteinemia, arterial hypertension, smoking, obesity – may result in greater cardiovascular morbidity and mortality.

No correlation between serum cyclosporine and homocysteine levels was found. This finding was also described in other studies (9,14,16). Lower homocysteine values in patients using tacrolimus were described. However, lower creatinine found in this patients could, by itself, justify this finding (20,26-28).

Winkelmayer et al. (9) found an association between elevated serum homocysteine levels and risk for renal graft loss and death in renal transplant recipients.

In summary, our study shows a high prevalence of hyperhomocysteinemia in renal transplant recipients, especially in the setting of hypercholesterolemia and poor graft function. Further studies should investigate the possibility that poorer graft function may negatively affect serum homocysteine levels.

References

1. Bostom AG, Shemin D, Gohh RY, et al. Treatment of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients and renal transplant recipients. *Kidney Int Suppl* 2001; 78: S246-S252.
2. Massy ZA, Chadeaux-Vekemans B, Chevalier A, et al. Hyperhomocysteinemia: a significant risk factor for cardiovascular disease in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9: 1103-1106.
3. Santos AF, Keitel E, Bittar AE, et al. Safety and efficacy of simvastatin for hyperlipidemia in renal transplant recipients: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Transplant Proc* 2001; 33(1-2): 1194-1198.
4. Roodnat JI, Mulder PG, Zietse R, et al. Cholesterol as an independent predictor of outcome after renal transplantation. *Transplantation* 2000; 69: 1704-1710.
5. Perna AF, Ingrosso D, Castaldo P, Galletti P, Santo AG. Homocysteine and transmethylation in uremia. *Kidney Int Suppl* 2001; 59: S230-S233.
6. Fonseca I, Queiros J, Santos MJ, et al. Hyperhomocysteinemia in renal transplantation: preliminary results. *Transplant Proc* 2000; 32: 2602-2604.
7. Beaulieu AJ, Lapane KL, Gohh RY, et al. Short-term reproducibility of total homocysteine determinations in stable renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1999; 31: 2121-2123.
8. Ducloux D, Gibey R, Motte G, Nguyen UN, Abdelfath A, Chalopin JM. Homocysteine, nutritional status and insulin in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1674-1677.

9. Winkelmayr WC, Kramar R, Curhan G, et al. Fasting plasma total homocysteine levels and mortality and allograft loss in kidney transplant recipients: a prospective study. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 255-260.
10. Kes P. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal failure. *Acta Med Croatica* 2000; 54: 175-181.
11. Ducloux D, Ruedin C, Gibey R, et al. Prevalence, determinants, and clinical significance of hyperhomocysteinaemia in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 2890-2893.
12. Mangoni AA, Jackson SHD. Homocysteine and cardiovascular disease: current evidence and future prospects. *Am J Med* 2002; 112: 556-565.
13. Locsey L, Asztalos L, Dan A, Kincses Z, Berczi C, Sziki G. Changes in cardiovascular risk factors after renal transplantation. *Magy Seb* 2001; 54: 101-104.
14. Ducloux D, Gibey R, Vautrin P, Bresson-Vautrin C, Rebibou JM, Chalopin JM. Hyperhomocysteinemia in renal transplant recipients with and without cyclosporine. *Clinic Nephrol* 1998; 49: 232-235.
15. Guldener VC, Stam F, Stehouwer CDA. Homocysteine metabolism in renal failure. *Kidney Int Suppl* 2001; 59: S234-S237.
16. Arnadottir M, Hultberg B, Wahlberg J, Fellstrom B, Dimeny E. Serum total homocysteine concentration before and after renal transplantation. *Kidney Int* 1998; 54: 1380-1384.
17. Bostom AG, Gohh RY, Beaulieu AJ, et al. Determinants of fasting plasma total homocysteine levels among chronic stable renal transplant recipients. *Transplantation* 1999; 68: 257-261.

18. Fonseca V, Guba SC, Fink LM. Hyperhomocysteinemia and the endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis. *Endocr Rev* 1999; 20: 738-759.
19. Kim SI, Yoo TH, Song HY, et al. Hyperhomocysteinemia in renal transplant recipients with cyclosporine. *Transplant Proc* 2000; 32: 1878-1879.
20. Laures AS, Gomes A, Alvarez V, Coto E, Baltar J, Alvarez-Grande J. Influence of anticalcineurinic therapy in plasma homocysteine levels of renal transplant recipients: a prospective study. *Transplant Proc* 2003; 35: 1739-1741.
21. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *New Engl J Med* 1997; 337: 230-237.
22. Drüeke TB, Abdulmassih Z, Lacour B, Bader C, Chevalier A, Kreis H. Atherosclerosis and lipid disorders after renal transplantation. *Kidney Int* 1991; 31: 24-28.
23. Sunder-Plassmann G, Floth A, Foldinger M. Hyperhomocysteinemia in organ transplantation. *Curr Opin Urol* 2000; 10: 87-94.
24. Stoves J, Lindley EJ, Barnfield MC, Burniston MT, Newstead CG. MDRD equation estimates of glomerular filtration rate in potential living kidney donors and renal transplant recipients with impaired graft function. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 2036-2039.
25. Ducloux D, Motte G, Challier B, Gibey R, Chalopin JM. Serum total homocysteine and cardiovascular disease occurrence in chronic, stable renal

transplant recipients: a prospective study. J Am Soc Nephrol 2000; 11: 134-137.

26. Quiroga I, Morris-Stiff G, Baboo R, Darby CR, Lord RH, Jurewicz WA. Differential homocysteine levels in renal transplant patients receiving neoral versus tacrolimus. Transplant Proc 2001; 33:1209-1211.
27. Akbas SH, Tuncer M, Gurkan A, et al. Plasma homocysteine levels in renal transplant patients on tacrolimus therapy. Transplant Proc 2004; 36: 159-160.
28. Maes BD, Vanreenterghem YFCh. Cyclosporine: advantages versus disadvantages vis-à-vis tacrolimus. Transplant Proc 2004; 36: S40-S49.

Table 1. Demographic and clinical data of renal transplant recipients according to cholesterol concentrations.

	Hypercholesterolemic (n=67)	Normocholesterolemic (n=38)	P
Age (years)	43.24 ± 10.9	38 ± 10.0	0.016
Sex (M/F)	30/37	24/14	0.07
Ethnicity (C/B)	61/6	34/4	0.79
Systemic Arterial Hypertension	32 (47.8%)	20 (52.6%)	0.63
BMI ¹	27.09 ± 4.23	28.19 ± 4.74	0.72
Diabetes Mellitus	4 (6%)	3 (7.9%)	0.70
Smoking	7 (10.4%)	4 (10.5%)	0.99
Oral Contraceptive	2 (5.4%)	4 (28.5%)	0.11
Cyclosporine use	47 (70,2%)	20 (52,6%)	0,10
Post-Tx time (months) ²	57.51 ± 38.22	86.08 ± 59.61	0.01
Total cholesterol (mg/dl)	278.97 ± 41.85	181.05 ± 21.97	<0.001
LDL-cholesterol (mg/dl)	182.06 ± 35.15	100.05 ± 17.21	<0.001
HDL-cholesterol (mg/dl)	56.06 ± 19.06	54.21 ± 14.04	0.60
Triglycerides (mg/dl)	202.51 ± 70.06	108.26 ± 26.95	<0.001
Creatinine (mg/dl)	1.49 ± 0.05	1.39 ± 0.06	0.22
Endogenous Creatinine Clearance (ml/min)	68.08 ± 18.67	75.25 ± 14.42	0.03
Proteinuria (g/24h)	0.781 ± 0.99	0.245 ± 0.16	<0.001
Homocysteine (μmol/l)	22.79 ± 8.6	18.66 ± 8.5	0.03

(N=105); Mean ± SD; N (%);¹BMI: Body mass index; ²Tx: renal transplantation.

Table 2. Demographic and clinical data of renal transplant recipients according to homocysteine levels.

	Homocysteine >15 (n=78)	Homocysteine ≤15 (n=27)	P
Age (years)	41.7 ± 10.9	40.2 ± 10.6	0.53
Sex (M/F)	41/37	13/14	0.69
Ethnicity (C/B)	68/10	27/0	0.08
BMI ¹	20.0 ± 4.3	26.8 ± 5.0	0.47
Post-Tx time (months) ²	62.3 ± 44.5	83.7 ± 57.5	0.08
Systemic Arterial Hypertension	38 (48.7%)	14 (51.9%)	0.78
Smoking	9 (11.5%)	2 (7.4%)	0.73
Diabetes Mellitus	6 (7.7%)	1 (3.7%)	0.67
Oral Contraceptive	3 (3.9%)	3 (11.1%)	0.18
Cyclosporine use	56 (71.8%)	18 (66.7%)	0.62
Total cholesterol (mg/dl)	247.7 ± 59.5	231.4 ± 58.0	0.22
LDL-cholesterol (mg/dl)	157.5 ± 47.8	137.5 ± 52.4	0.07
HDL-cholesterol (mg/dl)	53.1 ± 14.2	62.0 ± 23.2	0.21
Triglycerides (mg/dl)	180.5 ± 72.6	133.1 ± 66.6	0.04
Creatinine (mg/dl)	1.5 ± 0.38	1.2 ± 0.44	0.01
Endogenous Creatinine Clearance (ml/min)	70.2 ± 16.2	71.9 ± 21.1	0.65
Proteinuria (g/24h)	0.58 ± 0.81	0.60 ± 0.92	0.92

(n=105); Mean ± SD; n (%);¹BMI: Body mass index; ²Tx: renal transplantation.

Table 3. Multivariate analysis of log homocysteine correlations

Model	Effect on log Hcy ¹	Beta coefficient	p value
Constant	2.496	-	<0.001
Age	-0.003	-0.073	0.47
Time post transplant ²	-0.001	-0.160	0.16
Cyclosporine use	-0.005	-0.006	0.94
Serum creatinine	0.277	0.302	0.001
Hypercholesterolemia	0.182	0.23	0.014

¹Beta coefficient expressing effect on log homocysteine were obtained in a multiple linear regression model; ²Time from transplant to last follow up.

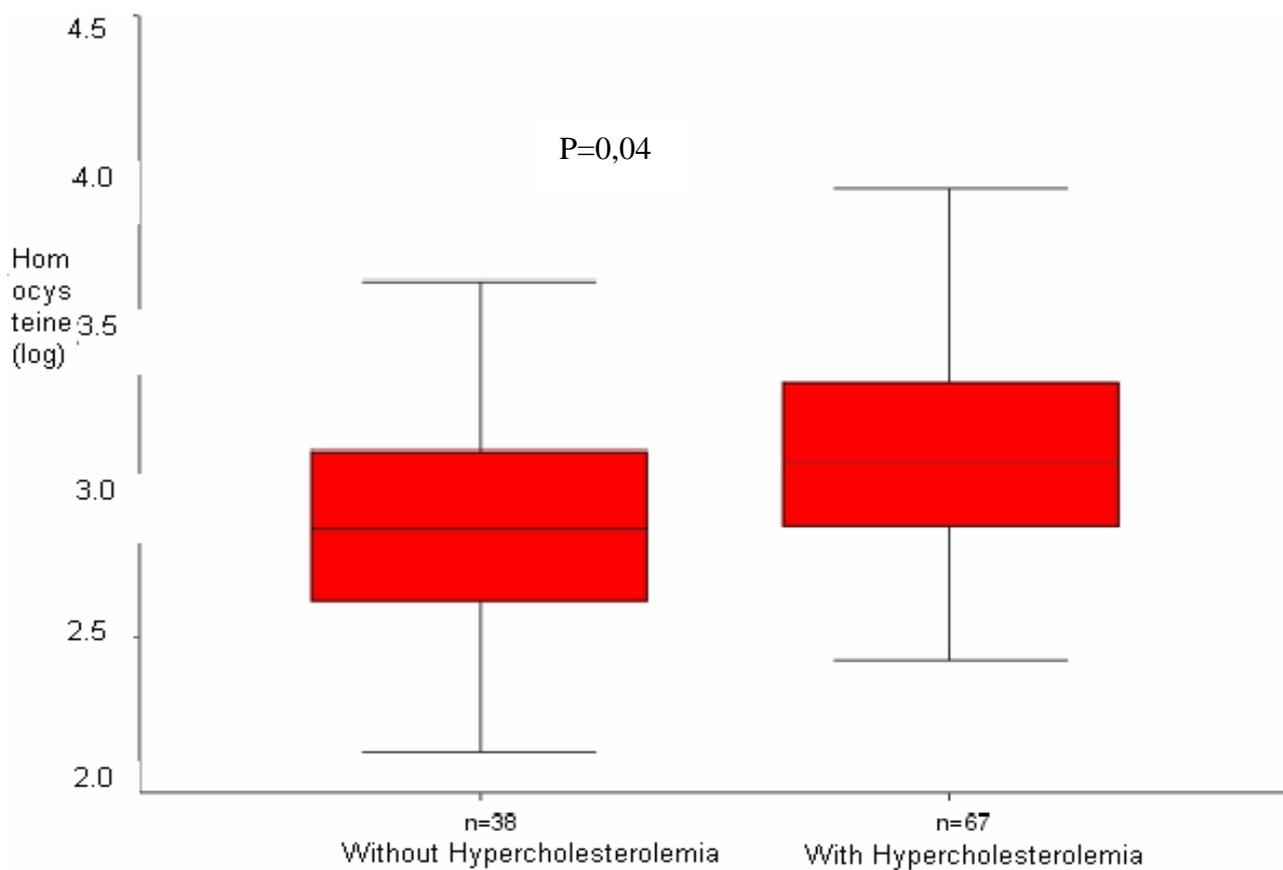


Figure legend:

Figure 1. Box-plot of log homocysteine levels (median and interquartile range) of patients hypercholesterolemic and normocholesterolemic.