



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Inês Filomena Prates da Graça

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Hiperhomocisteinemia: Impacto na disfunção cerebrovascular e no declínio cognitivo” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Elisa Silva, da Dra. Rita Ortega e da Professora Doutora Cátia Filipa Lourenço Marques e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2023

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Inês Filomena Prates da Graça

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Hiperhomocisteinemia: Impacto na disfunção cerebrovascular e no declínio cognitivo” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Elisa Silva, da Dra. Rita Ortega e da Professora Doutora Cátia Filipa Lourenço Marques e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2023

Eu, Inês Filomena Prates da Graça, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2018290168, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Hiperhomocisteinemia: Impacto na disfunção cerebrovascular e no declínio cognitivo” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 8 de setembro de 2023.

Inês Filomena Prates da Graça

(Inês Filomena Prates da Graça)

AGRADECIMENTOS

Obrigada,

Coimbra por estes 5 anos extraordinários que me proporcionaram momentos únicos.

Obrigada,

Família por me ajudarem sempre. Sem vocês nada disto era possível.

Obrigada,

Amigos por estarem lá quando foi necessário e por terem sempre uma palavra amiga para partilhar comigo.

Obrigada,

Professora Doutora Cátia Marques, pela paciência, simpatia e disponibilidade.

Obrigada,

A todas as pessoas que fizeram parte do meu estágio e que me ajudaram a aprender. Um obrigado especial à Dra. Elisa Silva, Dra. Teresa Grilo, Dr. João, Dra. Rita Folhas, Dra. Francisca Janeiro, Sr. Vítor, Dra. Rita Ortega e todas as equipas da Phagecon.

Obrigada,

Blue, a minha cadela que se sentou sempre no meu colo quando eu precisava de estudar ou fazer trabalhos para a universidade.

“Sábio é aquele que se contenta com o espetáculo do mundo.”

Fernando Pessoa

Índice

Parte I- Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de abreviaturas	8
Introdução	9
1.Contextualização da Farmácia Guarda Inglesa.....	9
2. Análise SWOT.....	10
2.1 Pontos Fortes	10
2.2. Pontos Fracos	11
2.3. Oportunidades	12
2.4 Ameaças.....	13
3. Casos Práticos.....	14
Considerações finais.....	17
Referências Bibliográficas	19

Parte II- Relatório de Estágio em Assuntos Regulamentares

Lista de Abreviaturas	21
Introdução	22
1. Entidades Reguladoras do medicamento	22
1.1 INFARMED	23
2.Assuntos regulamentares em Portugal	23
3. Phagecon.....	25
3.1. Departamento de Assuntos regulamentares.....	25
4. Análise SWOT.....	27
4.1 Pontos fortes	27
4.2 Pontos fracos.....	28
4.3 Oportunidades	28
4.4 Ameaças.....	29
Considerações Finais.....	29
Referências Bibliográficas.....	31

Parte III- "Hiperhomocisteinemia: Impacto na disfunção cerebrovascular e no declínio cognitivo"

Lista de Abreviaturas	33
Resumo	35
Abstract	36
1. Homocisteína	37
1.1. Biossíntese da Homocisteína.....	38
1.2. Metabolismo da Homocisteína	39
1.2.1. Remetilação	39

1.2.2. Transulfuração	39
2. Hiperhomocisteinemia	40
2.1. Hiperhomocisteinemia Primária	41
2.1.1. Cistationina Beta-Sintase (CBS)	41
2.1.2. Metileno-tetrahidrofolato (MTHFR)	42
2.2. Hiperhomocisteinemia Secundária.....	43
2.2.1. Aspectos Nutricionais	43
2.2.2. Doenças que podem induzir Hiperhomocisteinemia	44
3. Hiperhomocisteinemia e o impacto no Sistema Cardiovascular e no Declínio Cognitivo	45
3.1. Disfunção Endotelial e Stress Oxidativo	45
3.2. Aterosclerose	48
4. Hiperhomocisteinemia: impacto no declínio cognitivo	49
4.1. Doença de Alzheimer	50
4.2. Desregulação do fluxo sanguíneo cerebral	51
4.3. Alteração da Permeabilidade da Barreira Hematoencefálica	53
5. Tratamento da Hiperhomocisteinemia e Impacto no Declínio Cognitivo	54
Conclusão.....	55
Referências Bibliográficas	57

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Guarda Inglesa



Orientação

Dra. Elisa Silva, Diretora Técnica

Inês Filomena Prates da Graça

2022 / 2023

Lista de abreviaturas

FC – Farmácia Comunitária

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FGI – Farmácia Guarda Inglesa

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

MSRM – Medicamento Sujeito a Receita Médica

SNS – Sistema Nacional de Saúde

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats* (pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades, Ameaças)

UC – Unidade Curricular

Introdução

O estágio curricular realizado em farmácia comunitária (FC) assume uma enorme relevância, uma vez que finaliza o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) e permite a aplicação prática dos conteúdos teóricos lecionados nas unidades curriculares (UC). Assim, entre 9 de janeiro e 28 de abril, a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), ofereceu-me a oportunidade de estagiar em FC e pude, deste modo entrar no mercado de trabalho e colocar em prática o que aprendi durante o curso de MICF.

O farmacêutico enquanto agente de saúde pública, zela pelo bem-estar dos seus utentes e muitas vezes são os profissionais de saúde de primeira linha. Numa comunidade cada vez mais preocupada pelo bem-estar físico, qualidade de vida e saúde, o papel do farmacêutico é fundamental.

I.Contextualização da Farmácia Guarda Inglesa

A farmácia Guarda Inglesa (FGI) está localizada na Avenida Guarda Inglesa, Coimbra. Esta farmácia destaca-se pela sua modernidade e pelo seu amplo espaço. A FGI tem um conjunto muito variado de clientes, uma vez que se encontra numa zona residencial e numa zona turística.

Esta farmácia é constituída por uma equipa de 4 farmacêuticos cuja missão principal é o bem-estar dos clientes. Esta equipa é orientada pela Dra. Elisa Silva que desempenha a função de diretora técnica, sendo a própria, a proprietária da farmácia. Durante o estágio, tive a oportunidade de desempenhar várias tarefas na FGI, como por exemplo, a organização de encomendas, realização de encomendas e atendimento ao público. O atendimento ao público, devido à sua enorme componente teórico-prático, foi uma das tarefas mais importantes e desafiantes, o que me permitiu aplicar o que aprendi durante o meu percurso académico.

2. Análise SWOT



Figura 1. Análise SWOT

2.1 Pontos Fortes

Equipa Farmacêutica

Numa farmácia, é essencial que haja harmonia entre a equipa farmacêutica. Uma boa liderança e a cooperação entre colegas, é fundamental para o sucesso da farmácia. Na FGI fui muito bem recebida desde o início e a equipa mostrou-se disponível para me auxiliar em todas as minhas tarefas e dúvidas.

Quando comecei o estágio tive alguma dificuldade no aconselhamento farmacoterapêutico e na correlação entre nome comerciais e substâncias ativas, além disso também existe uma certa dificuldade inicial em usar o programa Sifarma mas a equipa esteve sempre disponível para me auxiliar durante o processo.

Desde cedo, que a equipa farmacêutica incentivou-me a fazer atendimentos, e com a prática, comecei a conseguir relacionar os nomes comerciais dos medicamentos com as respetivas substâncias ativas. A dificuldade inicial foi ultrapassada graças à equipa que sempre me ajudou e que esclareceu todas as minhas dúvidas.

Esta cooperação e solidariedade dos farmacêuticos da FGI, permitiu que ficasse mais familiarizada e confiante no atendimento ao utente. Assim, este processo foi muito vantajoso

para mim, visto que me disponibilizaram as ferramentas iniciais para continuar o meu percurso como farmacêutica.

Formações

Um farmacêutico deve manter-se sempre atualizado e investir na sua formação profissional ao longo da sua carreira. Isto permite que o farmacêutico, enquanto profissional de saúde, esteja apto para desempenhar as suas funções mais eficientemente.

A FGI incentivou-me a realizar formações durante o estágio com o objetivo de aperfeiçoar os meus conhecimentos sobre as mais diversas áreas. As visitas dos delegados de informação médica, foram também importantes para ampliar o meu conhecimento, porque deu-me a oportunidade de conhecer algumas das inovações que estão a ser comercializadas no mercado e que muitas vezes são produtos requisitados pelos clientes. É de extrema importância saber o que há atualmente no mercado e perceber que produtos se adequam mais para a farmácia, tendo em conta os clientes que a frequentam.

2.2. Pontos Fracos

Aconselhamento Farmacoterapêutico

O Aconselhamento Farmacoterapêutico é uma das áreas onde o Farmacêutico Comunitário pode intervir. Muitos dos clientes que se dirigem à farmácia vão comprar medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) e é fundamental que os farmacêuticos consigam aconselhar eficazmente sobre estes medicamentos.

No atendimento senti uma certa dificuldade em aconselhar MNSRM de uso veterinário, suplementos e dermocosméticos. Apesar de termos tido algumas UC que abordaram estes temas, sinto que é uma lacuna no nosso ensino. O mercado dos suplementos alimentares, dermocosméticos e MNSRM veterinários está a aumentar cada vez mais e é imprescindível que os farmacêuticos detenham conhecimento para conseguirem aconselhar os seus clientes da melhor maneira possível.

Consegui aplicar certos conhecimentos que aprendi em Indicação Farmacêutica, mas o conteúdo desta UC poderia ter sido muito mais reforçado aos longo destes 5 anos, uma vez que a principal área de intervenção de um farmacêutico são os MNSRM e não os MSRM.

Medicamentos Manipulados

A preparação de medicamentos manipulados é uma arte que tem vindo a decrescer ultimamente. Outrora, quase todos os medicamentos eram preparados pelos farmacêuticos, mas atualmente, devido à industrialização, este processo mudou muito e é uma prática pouco recorrente.

Apenas algumas farmácias produzem manipulados e a FGI é uma destas farmácias. Apesar de ser uma farmácia que é capaz de produzir medicamentos manipulados, constatei que eram poucos os clientes que se dirigiam à farmácia com receitas de medicamentos manipulados. Tive a oportunidade de assistir à preparação de uma solução alcoólica de ácido bórico saturado a 60°, utilizado no tratamento tópico de otites externas. Embora tenha sido gratificante assistir à preparação de manipulados, senti que não pude ampliar o meu conhecimento nesta vertente da FC.

Nomes Comerciais

Senti dificuldade durante o estágio em conseguir relacionar a substância ativa e o seu nome comercial. Muitos utentes são polimedicados e não reconhecem os medicamentos pela substância ativa.

Quando estava no atendimento tive alguma dificuldade para responder às questões dos doentes por não saber o nome comercial, dificultando a comunicação entre farmacêutico-doente.

2.3. Oportunidades

Controlo de Psicotrópicos e estupefacientes

Os psicotrópicos e estupefacientes são medicamentos de uso mais restrito e que seguem uma legislação específica. Durante o estágio, tive a oportunidade de ceder psicotrópicos e estupefacientes e ficar mais familiarizada com a sua cedência.

Inicialmente, na cedência destes medicamentos, é necessário recolher a informação do utente que toma a medicação e do adquirente. Finalizada a venda, é emitido um documento que resume a informação da venda. No final do mês, é emitida uma lista de saídas e uma cópia das receitas manuais, que depois é enviada ao infarmed.

Medicamentos Hospitalares

O programa PEMProx-C.H.U.C é um programa que permite aos doentes crónicos que são acompanhados nos Hospitais de Coimbra, levantar os medicamentos hospitalares numa farmácia hospitalar ou numa farmácia comunitária escolhida pelo cliente, caso este tenha dificuldade a deslocar-se ao hospital.

Quando o medicamento hospitalar chega à farmácia, confirmamos se o produto está conforme e de seguida, caso esteja tudo correto, o cliente é contactado. Para ceder medicamentos hospitalares, utilizamos o programa Sifarma, onde introduzimos os dados do cliente, o(s) medicamento(s) a ceder e a quantidade. Sinto que foi uma mais-valia ter efetuado o registo e a cedência de medicamentos hospitalares, porque me permitiu estar mais preparada e familiarizada para a cedências deste tipo de medicamentos.

2.4 Ameaças

Medicamentos esgotados

Constatei no decorrer do meu estágio, que a quantidade de medicamentos esgotados é elevadíssima e conseqüentemente a procura por estes medicamentos também aumenta. Muitos clientes chegavam à farmácia e expressavam descontentamento quando percebiam que não havia os medicamentos que lhes tinham sido receitados.

O problema reside no facto de muitos utentes acharem que a falta de medicamentos é um problema único daquela farmácia, e muitas vezes afirmavam que outras farmácias tinham e não compreendiam a situação. O facto de ser estagiária também acabou por tirar a credibilidade do meu trabalho porque muitos utentes referiam que frequentavam a farmácia há anos e não percebiam porque não lhes podia disponibilizar os medicamentos que estavam esgotados.

A venda de Trulicity® e Ozempic®, tornou-se caótica na farmácia, visto que, para além destes medicamentos estarem esgotados, muitos utentes usam estes medicamentos para tratar a obesidade, devido à perda de peso que o medicamento provoca na maioria das pessoas que os usa. O Trulicity® e Ozempic®, são usados no tratamento da diabetes *mellitus* tipo 2 insuficientemente controlada e são medicamentos bastante prescritos pelos médicos. Devido à enorme demanda por estes medicamentos, a FGI achou melhor criar listas de reservas e dar prioridade aos doentes diabéticos. Isto representa uma verdadeira ameaça não só para as farmácias, mas também para o Sistema Nacional de Saúde (SNS). A elevada demanda pelos

medicamentos faz com que a venda destes medicamentos seja mais restrita e coloca as farmácias numa posição difícil.

Venda Livre de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

A venda de MNSRM noutros estabelecimentos cria uma verdadeira concorrência com as farmácias. Atualmente, existem muitas franquias que conseguem comprar e vender MNSRM a preços baixíssimos. Estes preços são muito apelativos e incentivam o consumo em massa.

As farmácias para aplacar a concorrência, têm de baixar a margem de lucro dos produtos que vendem. Farmácias que existem há muitos anos e que sempre tiveram muitos clientes, deixam de conseguir ter lucro. A longo prazo, torna-se insustentável para a farmácia a continuação destes preços.

É uma ameaça não só para as farmácias, mas também para os farmacêuticos. O nosso campo de atuação passa pelo aconselhamento de MNSRM e se, a venda destes produtos continuar a decrescer, a nossa profissão também é ameaçada.

3. Casos Práticos

Caso Prático I

Uma senhora, com cerca de 60 anos, dirige-se à farmácia. Refere que tem dor de garganta há dois dias e diz que “lhe dói a engolir” e sente a “garganta arranhada”.

Comecei por perguntar à senhora se apresentava febre ou outro sintoma de constipação ou gripe. A senhora nega e refere que a única queixa é mesmo a garganta. Refere ainda que não gosta de usar pastilhas para a garganta porque não lhe fazem efeito. Por fim, perguntei à senhora se tomava medicação ao qual responde que a única medicação que toma é a atorvastatina, medicamento prescrito para tratamento da hipercolesterolemia.

Uma vez que a senhora tinha dificuldade na deglutição devido à dor provocada pela dor de garganta, aconselhei a tomar Spidifen EF 400 mg granulado 2 a 3 vezes por dia, com uma duração máxima de 7 dias (dores).

Caso prático 2

Senhora, com cerca de 40 anos, dirige-se à farmácia para comprar dulcolax comprimidos. Refere que já anda a tomar o medicamento há uma semana e que continua a ter dificuldade em evacuar.

Perguntei à senhora se havia alguma alteração dos seus hábitos que pudesse estar a causar a obstipação e se tinha alguma medicação habitual. A senhora respondeu que não tinha havido uma alteração dos seus hábitos, mas que tinha começado a tomar amitriptilina e era o único medicamento que tomava. Afirmou ainda que a obstipação era um problema recente e que a incomodava bastantes vezes. A obstipação é um efeito secundário comum dos antidepressivos tricíclicos e concluí que a obstipação provavelmente se devia à introdução da amitriptilina.

Dulcolax, comprimidos possui cerca de 5mg de bisacodilo e é um laxante de contacto que produz alívio da prisão de ventre entre 6-12 horas. O uso continuado pode provocar um desequilíbrio eletrolítico e eventualmente, uma desidratação. Além disso, o uso continuado de laxantes de contacto também pode ter efeito contrário ao pretendido e agravar a obstipação. Como a senhora já tomava Dulcolax há cerca de uma semana, aconselhei-a a interromper o uso continuado do mesmo, uma vez que este MNSRM apenas está aconselhado para situações de obstipação ocasional e só deve ser tomado esporadicamente.

O Laevolac[®] seria uma melhor opção uma vez que está indicado para situações de obstipação crónica. A senhora levou Laevolac[®] xarope com sabor a ameixa. Aconselhei a senhora a tomar 30 ml de xarope por dia em duas tomas, uma antes do pequeno-almoço e outra antes do almoço, diluídas num copo de água. Como medidas não farmacológicas, recomendei a ingestão de mais fibras através do consumo de cereais integrais, leguminosas, frutos e vegetais, ingestão de líquidos e atividade física. Por último, aconselhei a senhora a ir ao médico caso a sua situação se mantivesse e não houvesse melhorias.

Caso prático 3

Senhora, com cerca de 60 anos, refere que tem sentido algum desconforto quando vai à casa de banho, mal-estar e algum ardor. Refere que já costuma ter infeções urinárias recorrentes e quer algo mais natural.

Aconselhei a senhora a ir a um médico uma vez que, muito provavelmente se trata de uma infeção urinária e irá precisar de um antibiótico. A senhora afirma que já costuma ter infeções recorrentes e que queria algo que ajudasse a infeção a não piorar.

Visto que o antibiótico é um MSRM, aconselhei a senhora a levar o Systelle[®] que é um suplemento com extrato seco de Uva ursina (*Arctostaphylos uva-ursi L.*). A Uva Ursina possui propriedades antibacterianas e diuréticas que vão ajudar a destruir a parede bacteriana das bactérias responsáveis pela infeção. Este suplemento deve ser tomado durante 7 dias, 2 comprimidos, 3 vezes ao dia.

Como medidas não farmacológicas, aconselhei a senhora a ingerir bastante água e mencionei que uma correta higienização era fundamental. Por fim, referi que usar roupa de algodão era preferível ao invés de usar roupa interior sintética.

Caso prático 4

Senhor, com cerca de 65 anos, vai à farmácia e diz que quer um xarope para a tosse. Refere que o xarope que anda a tomar há dois dias não fez o efeito esperado e quer um “xarope bom”.

Comecei por perguntar ao senhor qual era o xarope que tomava, se a tosse era seca ou produtiva e se sentia sintomas associados a gripe/ constipações como febre e dor de cabeça. O utente responde que anda a tomar o Pulmiben[®] 5%, xarope e tem sentido muita expetoração “que não sai”. Afirma que não tem sintomas a não ser a tosse. Tem asma e não toma nenhuma medicação.

O Pulmiben[®] 5%, xarope tem atividade expetorante e a sua substância ativa é a carbocisteína. A carbocisteína é um mucolítico que graças à sua ação fluidificante, reduz a viscosidade das secreções respiratórias, o que facilita a libertação da expetoração. O Pulmiben[®] não é recomendado a asmáticos e no início do tratamento pode haver um aumento da expetoração e da tosse. A tosse e a expetoração deste utente, podem ter sido agravadas pelo uso do Pulmiben[®] 5%, uma vez que o xarope pode ter o efeito contrário à pretendida durante a fase inicial. Como o doente é asmático, este xarope não é a opção mais segura para a resolução da tosse produtiva.

Aconselhei o senhor a levar o xarope Panatosse xarope natura, uma vez que possui ação mecânica e é conhecido pelas suas propriedades demulcentes para acalmar a tosse seca e com expetoração, e além disso, é seguro para asmáticos. Recomendiei ao utente, tomar 20

ml de xarope, 2 a 3 vezes por dia. Por último, aconselhei o senhor a ir ao médico, uma vez que não toma medicação para controlar a asma e a tosse produtiva pode ser sintoma de que a asma está descompensada.

Caso prático 5

Uma mulher jovem, com cerca de 30 anos, dirige-se à farmácia e pede a pílula do dia seguinte. Diz que tomou antibiótico e tem receio que haja interferência com o método contraceutivo que já costuma utilizar.

Comecei por perguntar à senhora qual era o método contraceutivo que usava e qual era o antibiótico que tinha tomado. A utente respondeu que não sabia o antibiótico que tomou e que o meio contraceutivo que utiliza é o NuvaRing[®]. Perguntei se as relações sexuais tinham ocorrido nas últimas 72 horas e a resposta foi afirmativa.

Uma vez que o contraceutivo que a senhora utiliza, atua localmente, o antibiótico não vai interferir com o efeito do anel vaginal e, portanto, a toma da pílula do dia seguinte não é necessária. A senhora diz que quer levar a pílula do dia seguinte para prevenção e que não se sente confortável se não tomar. Como é uma situação incomum, acabo por ceder a pilula do dia seguinte, Postinor[®] e alerto para os possíveis efeitos adversos da toma da pílula seguinte, tais como, náuseas, pequenas hemorragias, dores abdominais e dores de cabeça. Alertei ainda a senhora, se vomitasse 3 a 4 horas após a toma da pilula, teria de tomar novamente a pilula do dia seguinte.

Considerações finais

Durante o estágio, surgiram diversas situações desafiantes que me fizeram adaptar às diferentes realidades do dia a dia. Ao deparar-me com estes casos, aprendi a solucionar problemas e a relacionar conceitos. Enquanto estudante de Ciências Farmacêuticas, o estágio curricular, é uma experiência que enriquece o percurso académico e que permite entrar no mercado de trabalho com mais experiência e confiança.

A área da saúde, é uma área que está em constante evolução e por isso, enquanto farmacêuticos, temos de estar atualizados e saber adaptarmo-nos às diferentes necessidades da população. A farmácia comunitária tem como principais objetivos a promoção do doente e da saúde. Sinto que a FGI me deu as ferramentas e informação necessárias para aconselhar os doentes e para promover o uso seguro e racional do medicamento.

Acabo esta última etapa do meu percurso académico com um sentimento de crescimento pessoal e sei que ainda tenho muito a aprender, nesta profissão que é tão bonita e cujo principal foco é sempre os doentes.

Referências Bibliográficas

1. INFARMED, I.P. – **Resumo das Características do Medicamento: Ozempic®**. [Consultado a 19 de fevereiro] Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>.
2. INFARMED, I.P. – **Resumo das Características do medicamento: Trulicity®**. [Consultado a 20 de fevereiro] Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>.
3. INFARMED, I.P. – **Resumo das Características do medicamento: Pulmiben® 5%, xarope**. [Consultado a 1 de março] Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
4. INFARMED, I.P. – **Resumo das Características do medicamento: NuvaRing®**. [Consultado a 5 de março] Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>.
5. INFARMED, I.P. – **Resumo das Características do medicamento: Postinor®**. [consultado a 5 de março] Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>.
6. INFARMED, I.P. – **Resumo das Características do medicamento: Dulcolax®**. [consultado a 7 de maio] Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>.
7. INFARMED, I.P. – **Resumo das Características do medicamento: Laevolac®**. [consultado a 7 de maio] Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>.
8. INFARMED, I.P. – **Resumo das Características do medicamento: Spidifen EF 400 mg granulado** [consultado a 7 de maio] Disponível em; <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
9. Panadol - **PanaTosse Natura Xarope** [Consultado a 1 de março] Disponível em: <https://www.panadol.com/pt-pt/produtos/gripe-constipacao/panatosse-cough-syrup.html>.
10. Tilman® - **Systeme®**. [Consultado a 17 de julho] Disponível em: <https://tilmanportugal.com.pt/systeme/>.

PARTE II

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM ASSUNTOS REGULAMENTARES

PHAGECON- Serviços e Consultoria Farmacêutica



Orientação

Rita Ortega, Head of Regulatory Affairs

Inês Filomena Prates da Graça

2022 / 2023

Lista de Abreviaturas

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

AR – Assuntos Regulamentares

CE – Comissão Europeia

CTD – Dossiê Técnico Comum

DGS – Direção-Geral de Assuntos

eAF – *Electronic Application Forms*

EMA – Agência Europeia do Medicamento

ERA – *Environmental Risk Assessment*

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FI – Folheto Informativo

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

QRD – *Quality Review of Documents*

RCM – Resumo das Características do Medicamento

SMUH – Sistema de Gestão de Medicamentos de Uso Humano

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats* (pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades, Ameaças)

UE – União Europeia

Introdução

A Faculdade da Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), permite que os alunos realizem um segundo estágio de carácter opcional. Tendo a oportunidade de realizar um segundo estágio, achei importante para o meu desenvolvimento profissional explorar outra saída profissional farmacêutica.

O meu estágio realizou-se na empresa Phagecon e decorreu no âmbito do término do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF). Teve início a 2 de maio e término a 28 de julho, com uma duração de 3 meses. Este estágio forneceu-me as ferramentas iniciais a nível profissional e permitiu um contacto mais próximo com a consultoria farmacêutica, no departamento de Assuntos Regulamentares (AR).

I. Entidades Reguladoras do medicamento

Todos os medicamentos necessitam de uma autorização de comercialização antes de serem colocados no mercado da União Europeia (UE), de modo a garantir que são eficazes, seguros e de máxima qualidade. O sistema europeu oferece diferentes vias para obter essa autorização e a Comissão Europeia (CE) desempenha uma função fundamental na regulação de medicamentos na UE.

Resumidamente, para se obter uma autorização de introdução no mercado (AIM), pode-se optar pelos seguintes procedimentos: Procedimento Centralizado, Procedimento Descentralizado, Procedimento por Reconhecimento Mútuo e Procedimento Nacional.

No procedimento centralizado, a UE permite a comercialização de um medicamento com base numa única avaliação e autorização de introdução no mercado, válida em toda a UE. O pedido de autorização é submetido à Agência Europeia do Medicamento (EMA).

A EMA foi criada em 1995 e atualmente, é responsável pela avaliação científica, principalmente de medicamentos inovadores cuja utilização se destina à UE. A avaliação do medicamento é efetuada pelos vários comités científicos da EMA e na fase final da submissão da AIM é efetuada uma recomendação à CE que aprova ou não, a comercialização do medicamento no mercado Europeu.

Apesar da UE permitir uma autorização única no mercado europeu, a grande maioria dos medicamentos não se inserem no âmbito do procedimento centralizado. Os medicamentos inovadores, nomeadamente os medicamentos para doenças raras só podem submeter uma AIM pelo procedimento centralizado e como nem todos os medicamentos se

inserir neste âmbito, o pedido de AIM é efetuado através dos restantes procedimentos. Deste modo, os medicamentos são autorizados pelas autoridades nacionais competentes dos vários Estados-Membros.

No procedimento descentralizado, as empresas podem pedir uma autorização simultânea de um medicamento em mais do que um estado-membro da UE desde que o medicamento em questão não possua uma AIM em nenhum estado-membro.

No procedimento de reconhecimento mútuo, as empresas já possuem uma AIM num dos estados-membros da UE e pedem que a autorização seja reconhecida noutros estados-membros, o que requer confiança nas avaliações científicas realizadas por outros estados-membros. Por último, uma AIM pode ser obtida através do procedimento nacional, caso se pretenda colocar um medicamento no mercado apenas num estado- membro específico.

1.1 INFARMED

Durante muitos anos, a aprovação de medicamentos foi realizada pela Direção-Geral de Saúde (DGS). Em 1984, surgiu a Direção-Geral de Assuntos Farmacêuticos e mais tarde, em 1993 surgiu o Infarmed com o intuito de responder às exigências científicas requeridas pela Comunidade Económica Europeia.

Atualmente, em Portugal, o INFARMED é a autoridade nacional do medicamento e produtos de saúde e tem total autonomia financeira e administrativa. A sua missão principal tem como objetivo regular e supervisionar os setores dos medicamentos de uso humano e os produtos de saúde, e deste modo garantir a proteção da saúde pública através medicamentos e produtos de qualidade, eficazes e seguros.

Existe uma cooperação internacional da CE e da EMA com os estados-membros e no caso de Portugal, o infarmed assume a responsabilidade de autoridade nacional, com o intuito de estabelecer uma relação mais próxima com as organizações de todo o mundo. Esta parceria promove o intercâmbio de conhecimentos especializados nos domínios científicos, regulamentar e incentiva as boas práticas na área regulamentar em todo o mundo.

2.Assuntos regulamentares em Portugal

O mercado do medicamento é extremamente regulamentado e a presença de farmacêuticos na área de AR é bastante recente, tendo surgido com o intuito de responder

às fortes exigências do mercado e devido à necessidade do governo de proteger a saúde pública e garantir a segurança e eficácia dos medicamentos.

Qualquer medicamento que entre no mercado europeu tem de possuir uma AIM. O conceito de AIM surgiu em janeiro de 1965 com a publicação da diretiva 65/65/CE que define a estrutura básica da avaliação e concessão da AIM. Cada AIM tem um titular que atua como entidade (pessoal ou coletiva) detentora do registo do medicamento. As AIM que são obtidas na UE tem uma validade de 5 anos e findo este prazo podem ser renovadas por um tempo ilimitado, salvo raras exceções.

Como referido anteriormente, existem 4 tipos de procedimentos pelos quais se pode obter uma AIM, o Procedimento Centralizado, o Procedimento Descentralizado, o Procedimento por Reconhecimento Mútuo e o Procedimento Nacional. Atualmente, para se obter uma AIM é necessário submeter a documentação necessária para a submissão que se rege por normas internacionais e uniformizadas a uma escala global. O Dossiê Técnico Comum (CTD) aglomera toda a informação que é necessária para a submissão de uma AIM, num único documento cuja informação se apresenta de forma clara e transparente, para facilitar a sua revisão. De modo a facilitar a partilha do CTD surgiu a versão eletrónica denominada de eCTD. O CTD está organizado em 5 módulos específicos:

- Módulo 1- Informação Administrativa, regional e nacional
- Módulo 2-Sumário geral de qualidade, sumário e avaliação crítica pré-clínica e sumário e avaliação crítica clínica
- Módulo 3- Documentação química, farmacêutica e biológica
- Módulo 4- Relatórios dos ensaios toxicológicos e farmacológicos da substância ativa e do medicamento
- Módulo 5- Relatórios dos ensaios clínicos

O profissional de AR possui várias responsabilidades, sendo que é fundamental deterem conhecimentos e manterem-se atualizados para se tornarem profissionais mais experientes. São uma ferramenta para o sucesso das empresas e garantem que os medicamentos são colocados no mercado.

3. Phagecon

A Phagecon é uma empresa portuguesa que se dedica à indústria farmacêutica. Esta empresa fornece aos seus clientes serviços de excelência com abordagens inovadoras, baseadas na experiência atualizada e integrada.

O meu estágio realizou-se no departamento de Assuntos Regulamentares, um dos vários departamentos da empresa. Os requisitos cada vez mais rígidos de Assuntos Regulamentares e o rápido crescimento desta área, tem levado ao desenvolvimento contínuo dos serviços de consultoria.

Assim, a Phagecon, não só garante a conformidade com todos os requisitos legais aplicáveis, como também garante que os prazos exigidos sejam cumpridos de uma forma rentável.

3.1. Departamento de Assuntos regulamentares

O departamento de Assuntos Regulamentares é constituído por uma equipa jovem e dinâmica que assegura a conformidade dos requisitos legais exigidos pelas autoridades competentes. Estão envolvidos durante todo o ciclo do medicamento e desempenham várias funções tais como, planeamento estratégico para a submissão da AIM, análise das lacunas de toda a documentação, elaboração de todos os documentos específicos para o dossiê de AIM, preparação do dossiê para submissão, submissão do dossiê de AIM até à aprovação, lançamento do produto e atividades de manutenção de AIM.

Durante o estágio tive a oportunidade de realizar diversas tarefas, tais como:

Elaboração do *Bridging Report*

Este relatório pode ser aplicado quando dois FI são suficientemente semelhantes em termos de conteúdo e *layout*. O *Bridging Report* comprova que o FI é legível em relação ao FI de referência e que cumpre a legislação aplicável.

Comparação do Resumo das Características do Medicamento (RCM) e Folheto Informativo (FI) com o *template Quality Review of Documents (QRD)*

A EMA fornece o template QRD para garantir que a Rotulagem, o RCM e FI contenham toda a informação e qualidade necessária de acordo com a legislação.

Elaboração de um *Environmental Risk Assessment (ERA)*

Com a crescente preocupação do impacto ambiental provocado pela indústria farmacêutica, surgiu a necessidade de não só fornecer segurança aos utentes, como também avaliar o impacto do produto medicinal no ambiente. O ERA é um relatório que visa a estabelecer o impacto ambiental proveniente do uso, acondicionamento e eliminação dos produtos medicinais.

Elaboração do Teste de Legibilidade de FI

As informações que constam nos FI devem ser claras, facilmente legíveis e compreensíveis para o utente. O teste de legibilidade garante que a informação contida no FI é compreendida pelos doentes através da realização de um questionário junto ao público-alvo.

Contacto com o Sistema de Gestão de Medicamentos de Uso Humano (SMUH)

- SMUH-AIM, onde se realiza a pré-submissão eletrónica de pedidos de Autorização de Introdução no Mercado, incluindo a consulta de situação de pedidos AIM para procedimentos nacionais.
- SMUH-ALTER, onde se realiza a submissão eletrónica de pedidos de alteração aos termos AIM.

Realização de *Electronic Application Forms (eAF)*

Esta plataforma permite que as indústrias farmacêuticas possam submeter um pedido de AIM, alterações ou renovações de medicamentos de uso humano e veterinário.

4. Análise SWOT



Figura 1. Análise SWOT

4.1 Pontos fortes

Equipa Acolhedora e Multidisciplinar

No departamento de Assuntos Regulamentares, fui recebida por uma equipa constituída por excelentes profissionais, que se mostraram sempre disponíveis para me ajudar e que revelaram elevadas competências na sua área de trabalho.

Na phagecon, existem vários departamentos que se relacionam entre si e muitas vezes é preciso que os vários departamentos trabalhem em conjunto, em determinado projeto para que consigam entregar ao cliente o projeto que lhes foi proposto, nos prazos indicados e com a máxima qualidade. Esta vertente de multidisciplinaridade, permite a interação entre os vários departamentos onde pude participar proactivamente. Considero que foi uma mais valia ter observado esta interação diária, uma vez que a cooperação entre os vários departamentos pode ter um impacto positivo na empresa já que todos os profissionais trabalham para o mesmo objetivo comum.

Sessão de Acolhimento

No início de qualquer emprego, é fundamental que a equipa informe o novo colega sobre o funcionamento do local de trabalho. Uma boa integração na equipa solidifica as relações interpessoais e constrói os alicerces para um bom ambiente de trabalho, cuja qualidade do trabalho desempenhado é diretamente impactado por esta variável.

No primeiro dia, a Phagecon, promoveu uma sessão de acolhimento com o departamento de Recursos Humanos, Farmacovigilância e Garantia de qualidade. Nesta sessão foi-me dada a conhecer a empresa, a sua missão, objetivos e a equipa que a integrava.

Finda a sessão de acolhimento foi-me apresentada a equipa com a qual eu ia trabalhar e realizamos uma pequena visita às instalações da empresa.

4.2 Pontos fracos

Plano de Estágio

Ter um plano de estágio definido desde o início, é fundamental para que o tempo seja rentabilizado o máximo possível. Apesar de a empresa ter uma sessão de acolhimento planeada e de envolver os estagiários nas formações iniciais, não existe um plano definido para os estágios curriculares.

O facto de não haver um protocolo de estágio definido pela empresa culmina num desaproveitamento do tempo de estágio e na atribuição de tarefas com algum grau de complexidade para quem está a começar.

Apesar da chefe do departamento de Assuntos Regulamentares tentar ao máximo ajudar-me e envolver nos projetos de equipa, sinto que a existência de um plano de estágio inicial, teria sido vantajoso para mim e que me ajudaria a desempenhar um papel mais ativo na equipa e na empresa.

4.3 Oportunidades

Ambiente Empresarial

Uma das vantagens de realizar um estágio numa empresa de consultoria é poder observar a dinâmica que existe entre as diferentes equipas e hierarquias da empresa. Sinto que foi uma mais valia poder observar o ambiente empresarial e concorrencial que ocorre

numa empresa, uma vez que trabalhar nesta área não costuma ser a opção mais comum quando se acaba o curso de Ciências Farmacêuticas.

O departamento de AR costuma realizar reuniões semanais e desde o início que fui integrada nestas reuniões como membro da equipa. Acho que foi uma mais valia ter testemunhado estas reuniões porque me permitiram ter contacto com um ambiente mais formal e profissional.

Todas as semanas também tinha reuniões semanais com a chefe do departamento de AR com intuito formativo. Acabou por ser uma enorme vantagem para mim, porque para além de ter sido integrada na equipa, também pude aprender novos conceitos e a rever conteúdos já lecionados anteriormente em MICF.

4.4 Ameaças

Inexistência de Incentivos Financeiros

A Phagecon é uma empresa que está localizada em Lisboa. O custo de vida em Lisboa tem vindo a aumentar muito nos últimos anos. Apesar de ter tido a oportunidade de estagiar em Lisboa, a longo prazo torna-se insustentável.

Não existem incentivos para os estágios curriculares e muitos estudantes têm de se deslocar para conseguirem a oportunidade de estagiar nas diferentes áreas farmacêuticas. Estes estágios assumem um papel relevante para qualquer aluno que está agora a acabar o curso e impactam diretamente o seu futuro profissional.

A faculdade podia incentivar as entidades acolhedoras a pagar o subsídio de alimentação ou criar protocolos com outras universidades do país para oferecerem lugares nas suas residências e motivarem desde modo os alunos a estagiar em diferentes regiões do país.

Muitos alunos perdem oportunidades incríveis porque lhes faltam os meios para as conseguirem alcançar.

Considerações Finais

Com a constante evolução do mercado do medicamento, acresce a necessidade de que os medicamentos sejam fortemente regulados. O profissional de AR ocupa uma função fundamental no ciclo do medicamento, uma vez que garante que são cumpridos todos os requisitos para a sua comercialização e garante a sua máxima qualidade e eficácia. A

oportunidade de realizar um estágio na empresa Phagecon foi uma mais-valia para o meu desenvolvimento profissional e permitiu que eu explorasse uma das possíveis saídas profissionais de MICF.

O estágio realizado nesta empresa permitiu que eu tivesse um contacto não só com a área regulamentar, mas também com outras áreas farmacêuticas como o departamento de Farmacovigilância e Garantia de Qualidade. Embora cada departamento tenha uma função definida, existe uma cooperação intrínseca entre os vários departamentos da empresa, visto que trabalham com um objetivo comum. Sinto que foi uma mais-valia ter testemunhado e feito parte desta cooperação e sinto que me trouxe as ferramentas necessárias para o meu futuro profissional.

Acabo este estágio com a sensação de que me tornei uma pessoa mais enriquecida em conhecimentos e enfatizo a importância de criar protocolos de estágio para que todos os alunos consigam acesso às mesmas oportunidades. Destaco ainda a importância de reforçar aos estudantes sobre as mais variadas saídas profissionais para que desde modo todas as profissões farmacêuticas sejam consideradas.

Concluo destacando a importância que o farmacêutico ocupa em AR como agente de saúde pública e agradeço a oportunidade de poder ter contactado com os outros departamentos farmacêuticos.

Referências Bibliográficas

PONCIANO - **Preparação do processo de Autorização de Introdução no Mercado.**

- Filipa – (2013)

Diretiva 65/65/CEE de 26 de janeiro de 1965

EMA – Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en>

INFARMED - [Consultado a 1 de junho] Disponível em: <https://www.infarmed.pt/>

PHAGECON - [Consultado a 28 de junho] Disponível em: <http://www.phagecon.pt/>

SCIENCEPHARMA - [Consultado a 13 de julho] Disponível em: <https://www.sciencepharma.com/>

PARTE III

MONOGRAFIA

**“HIPERMOCISTEINEMIA: IMPACTO NA DISFUNÇÃO
CEREBROVASCULAR E NO DECLÍNIO COGNITIVO”**

Sob orientação da Professora Doutora Cátia Marques

Lista de Abreviaturas

5-MTHF – 5-metil-tetra-hidrofolato

ADMA – Dimetilarginina assimétrica (do inglês *Asymmetric Dimethylarginine*)

Ala – Alanina

APP – Proteína Precursora de Amilóide (do inglês *Amyloid Precursor Protein*)

ATP – Adenosina Trifosfato

AVC – Acidente Vascular Cerebral

A β – Beta-amiloide

BHE – Barreira Hematoencefálica

BHMT – Betaína-Homocisteína Metiltransferase

CBS – Cistationina Beta-Sintase

cGMP – Monofosfato cíclico de guanosina (do inglês *Cyclic guanosine monophosphate*)

DA – Doença de Alzheimer

DDAH – Dimetilarginina Dimetilaminohidrolase

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic acid*)

DV – Demência Vascular

eNOS – Isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (do inglês *Endothelial Nitric Oxide Synthase*)

HDL – Lipoproteína de alta densidade (do inglês *High-Density Lipoprotein*)

Ile – Isoleucina

IRC – Insuficiência Renal Crônica

LDL – Lipoproteína de baixa densidade (do inglês *Low-Density Lipoprotein*)

MMP – Metaloproteinases de matriz (do inglês *Matrix Metalloproteinases*)

MS – Metionina Sintetase

MTHFR – Metilenotetrahidrofolato Redutase

NFT – Emaranhados neurofibrilares (do inglês *Neurofibrillary Tangles*)

PKG – Proteína Cinase G (do inglês *Protein Kinase G*)

RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês *Ribonucleic acid*)

ROS – Espécies reativas de oxigénio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

SAH – S-Adenosil Homocisteína

SAM – S-Adenosil-L-Metionina

SAMe – S-Adenosil-L-Metionina sintetase

sGC – Guanilato ciclase solúvel (do inglês *Soluble guanylyl cyclase*)

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido Dismutase

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

Thr – Treonina

TXA2 – Tromboxano A2

Val – Valina

Resumo

Existe uma forte evidência de que a homocisteína é um fator de risco para doenças cerebrovasculares e doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Alzheimer (DA). Nos últimos anos, tem sido assumido o importante impacto das doenças cerebrovasculares no desenvolvimento e progressão do declínio cognitivo associado à DA, a forma mais prevalente de demência, seguida da demência vascular (DV). Vários fatores de risco podem contribuir para a evolução de doenças cerebrovasculares, como a diabetes, hipertensão e acidente vascular cerebral (AVC). A concentração elevada de homocisteína no plasma – hiperhomocisteinemia - constitui também um fator de risco para a progressão de doenças cerebrovasculares e do declínio cognitivo. Embora a correlação entre a hiperhomocisteinemia e o declínio cognitivo tenham sido alvo de estudos nos últimos anos, o seu real impacto a longo prazo e os mecanismos moleculares que suportam esta correlação ainda não são completamente conhecidos.

Deficiências nutricionais são a principal causa de hiperhomocisteinemia. Em particular, a falta de vitaminas do complexo B impacta diretamente o metabolismo da homocisteína promovendo a sua acumulação no plasma. Embora o tratamento farmacológico com vitaminas do complexo B seja relativamente seguro e acessível, os resultados de estudos pré-clínicos e clínicos demonstram-se conflituosos no que diz respeito ao benefício sobre a declínio cognitivo associado à DA e/ou DV. O benefício da suplementação com vitaminas do complexo B para baixar os níveis de homocisteína ainda é incerto.

Palavras-Chave: Homocisteína, Disfunção Cerebrovascular, Declínio Cognitivo, Doença de Alzheimer, Vitaminas do Complexo B.

Abstract

There is strong evidence that homocysteine is a risk factor for cerebrovascular diseases and neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD). In recent years, the important impact of cerebrovascular diseases on the development and progression of cognitive decline associated with AD, the most prevalent form of dementia, followed by vascular dementia (VD) has been recognized. Several risk factors can contribute to the development of cerebrovascular diseases, such as diabetes, hypertension and stroke. The high concentration of homocysteine in plasma - hyperhomocysteinemia - is also a risk factor for the progression of cerebrovascular diseases and cognitive decline. Although the correlation between hyperhomocysteinemia and cognitive decline has been the subject of studies in recent years, its real long-term impact and the molecular mechanisms that support this correlation are not yet completely known.

Nutritional deficiencies are the main cause of hyperhomocysteinemia. In particular, the lack of B complex vitamins directly impacts the metabolism of homocysteine, promoting its accumulation in plasma. Although pharmacological treatment with B complex vitamins is relatively safe and accessible, the results of preclinical and clinical studies are conflicting regarding the benefit on cognitive decline associated with AD and/or VD. The benefit of supplementing with B complex vitamins to lower homocysteine levels is still uncertain.

KEYWORDS: Homocysteine, Cerebrovascular Dysfunction, Cognitive Decline, Alzheimer Disease, B Complex Vitamins.

Introdução

A demência é uma condição neurológica progressiva que engloba um grupo de sintomas relacionados com o declínio cognitivo, que leva à perda da autonomia funcional e cuja causa ainda é desconhecida. Prevê-se que a sua incidência e prevalência aumentem nos próximos anos e as abordagens terapêuticas atualmente disponíveis apenas alcançam a diminuição da progressão do declínio cognitivo¹. A doença de Alzheimer é a principal forma de demência, logo seguida da demência vascular. Estudos recentes, demonstraram que existe uma certa possibilidade de haver comorbilidade entre estas duas doenças². Cerca de 60% dos doentes com DA têm alterações cerebrovasculares que afetam o declínio cognitivo. Estas comorbilidades diminuem o tempo para o estabelecimento da demência e aumentam a taxa de rapidez do declínio cognitivo. Portanto, existe uma forte probabilidade de que as lesões cerebrovasculares sejam um pré-antecedente para as patologias da DA². As alterações cerebrovasculares têm consequências deletérias para o cérebro, com impacto no declínio cognitivo associado a diminuição da memória e raciocínio².

Existem diversos fatores de risco que podem ser modificados e que têm um impacto no declínio cognitivo¹, nos quais se incluem a homocisteína quando presente no plasma em concentrações elevadas^{2:3}. A preocupação de que a homocisteína pudesse ter um impacto no declínio cognitivo surgiu nos anos 90. Portanto, já há algum tempo, que se pensa que a homocisteína pode estar na gênese das doenças cerebrovasculares e das demências. O papel que a homocisteína ocupa na origem destas doenças tem vindo a ser debatido ao longo dos anos, mas os resultados, são na maior parte das vezes controversos. Apesar do debate controverso, existem inúmeras evidências empíricas que suportam que a hiperhomocisteinemia contribui para a gênese destas doenças¹.

I. Homocisteína

A homocisteína é um aminoácido que contém enxofre⁴, não forma proteínas⁵ e pode ser encontrada fisiologicamente em todas as células (**Figura 1**)¹. A maior parte da homocisteína que circula no organismo humano, encontra-se ligada à albumina (cerca de 70-90%), mas existe uma pequena fração que se encontra livre na forma de homocisteína reduzida e numa mistura de dissulfetos⁶. Este aminoácido está presente naturalmente no plasma^{3:5} e a soma da homocisteína ligada e livre designa-se por homocisteína total⁶. Como a homocisteína é um metabolito intermediário no ciclo da metionina, é possível obtê-la através do consumo

de alimentos ricos em metionina, como por exemplo ovos, sementes de sésamo, nozes e carne³.

A concentração de homocisteína é regulada no organismo principalmente por duas vias, nomeadamente a via da remetilação e a via da transulfuração (**Figura 2**). Na via da remetilação, a homocisteína pode ser convertida a metionina através de dois processos distintos e na via de transulfuração a metionina é convertida em cisteína^{2; 5; 7}.

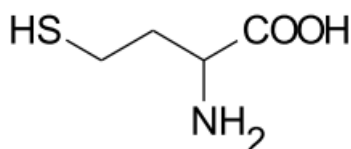


Figura 1. Fórmula estrutural da homocisteína⁴.

1.1. Biossíntese da Homocisteína

Como referido anteriormente, a homocisteína é um metabolito intermediário e não pode ser obtida pela dieta³. Então, para o organismo obter concentrações normais de homocisteína é necessário que ocorra a sua biossíntese através da metionina⁷.

A homocisteína é obtida através de síntese bioquímica da metionina que sofre desmetilação. A biossíntese de homocisteína pode ser resumida em três passos fundamentais⁸. Em primeiro lugar, ocorre transferência do grupo adenosina proveniente da adenosina trifosfato (ATP) para a metionina para produzir S-Adenosil-L-Metionina (SAM) através da SAMe sintetase^{7; 8}. De seguida, acontece a transmetilação e a SAM doa um grupo metilo para moléculas aceitadoras, como o DNA, RNA, proteínas e neurotransmissores^{7; 8}. Deste processo, forma-se a S-Adenosil homocisteína (SAH) que devido à falta do grupo metilo, é clivada e hidrolisada pela S-Adenosina homocisteína hidrolase para formar a homocisteína^{7; 8} e adenosina⁷. Esta reação é reversível, mas devido ao equilíbrio termodinâmico, a produção de SAH é favorecida em detrimento da produção de homocisteína e adenosina^{7; 8}, porque a homocisteína e adenosina são rapidamente metabolizadas ou exportadas para fora da célula, favorecendo a hidrólise⁸.

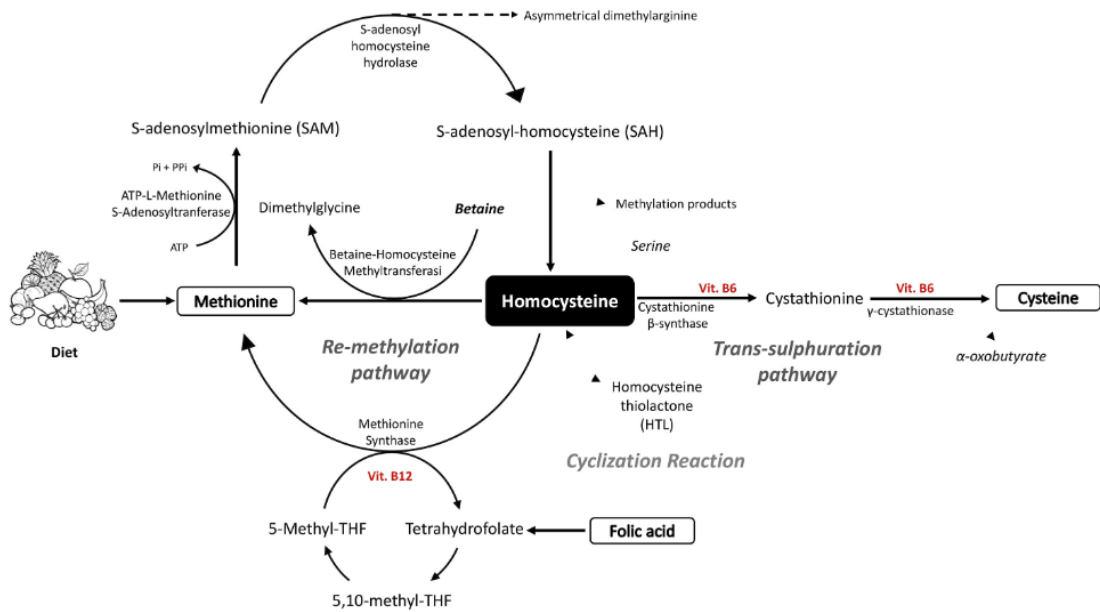


Figura 2. Diagrama esquemático da biossíntese da homocisteína e os dois processos metabólicos de remetilação e transulfuração⁸.

1.2. Metabolismo da Homocisteína

A homocisteína, uma vez produzida, pode ser metabolizada por via da remetilação, dando origem a metionina, ou por via da transulfuração, dando origem a cisteína^{5; 7}.

1.2.1. Remetilação

Na via da remetilação, a metionina sintetase (MS) catalisa a reação e usa a vitamina B12 como cofator para transferir o grupo metilo da 5-metil-tetra-hidrofolato (5-MTHF) para a homocisteína^{7; 8}. A vitamina B9 e a enzima metilenotetra-hidrofolato redutase (MTHFR) também vão ser necessárias na via da remetilação^{3; 5; 7}. O 5-MTHF é a principal fonte de grupos metilo utilizados na remetilação da homocisteína. No entanto, no fígado e no rim, os grupos metilo podem ser fornecidos pela betaína, um metabolito intermediário obtido da oxidação de colina. Neste caso, a remetilação da metionina é catalisada pela betaína-homocisteína metiltransferase (BHMT)^{3; 7; 8}.

1.2.2. Transulfuração

Na via da transulfuração, como já referido, ocorre a formação de cisteína. Neste caso, a homocisteína é irreversivelmente convertida em cistationina numa reação de condensação catalisada pela Cistationina Beta-Sintase (CBS) que depende de vitamina B6^{7; 8}. Posteriormente, a cistationina é clivada a cisteína⁸, que uma vez formada, pode ser utilizada para a formação de proteínas e para a produção de glutatona⁷.

2. Hiperhomocisteinemia

Em condições fisiológicas, a concentração plasmática de homocisteína em jejum situa-se entre 5 e 15 $\mu\text{mol/L}$ ⁹. Os valores da concentração de homocisteína variam ao longo da vida, em ambos os sexos, sendo que os homens, normalmente apresentam níveis plasmáticos de homocisteína superiores. No estudo realizado por NYGARD *et al*, verificou-se que a média de concentração de homocisteína nos homens era 10.8 $\mu\text{mol/L}$ enquanto nas mulheres era 9.1 $\mu\text{mol/L}$ ¹⁰. Contudo, após a menopausa nas mulheres, os valores da concentração de homocisteína tendem a aproximar-se nos dois sexos, devido à terapia hormonal¹¹. Quando a concentração de homocisteína no sangue está acima do intervalo de referência, condição designada de hiperhomocisteinemia, esta pode, como discutido adiante, desencadear diversos mecanismos patológicos⁵. A hiperhomocisteinemia pode ser categorizada com base nos níveis plasmáticos de homocisteína medidos em jejum, sendo que para concentrações entre 15 e 30 $\mu\text{mol/L}$ é considerada hiperhomocisteinemia leve, entre 30-100 $\mu\text{mol/L}$ considerada hiperhomocisteinemia moderada e hiperhomocisteinemia grave quando os níveis de homocisteína são superiores a 100 $\mu\text{mol/L}$ ^{2; 3; 5; 7}.

A hiperhomocisteinemia pode ainda ser classificada como primária ou secundária. A hiperhomocisteinemia primária tem como principal causa mutações genéticas nos genes que codificam algumas das enzimas envolvidas no metabolismo da homocisteína (por exemplo, MTHFR). Por sua vez, a hiperhomocisteinemia secundária tem como principal causa a disfunção do metabolismo da homocisteína sobretudo devido a deficiências de vitaminas do complexo B, que atuam como coenzimas no metabolismo da homocisteína. Se houver uma carência nutricional destas enzimas, poderá haver um comprometimento das vias metabólicas, o que implica o aumento das concentrações de homocisteína no plasma e a sua acumulação, levando a uma hiperhomocisteinemia³. Outras causas de hiperhomocisteinemia secundária incluem insuficiência renal crônica, anemia, hipotireoidismo, tumores malignos e medicamentos.

O entendimento das causas da hiperhomocisteinemia é fundamental, uma vez que esta desordem está associada ao envelhecimento e a inúmeras doenças como a insuficiência cardíaca congestiva, aterosclerose, doenças cerebrovasculares, doença de Alzheimer, cancro e perda auditiva^{3; 7}.

Tabela 1. Causas e consequências da hiperhomocistinemia⁷.

Causas da hiperhomocisteinemia	<ul style="list-style-type: none">• Mutações genéticas• Disfunções no metabolismo devido a deficiências nutricionais de Vitaminas do complexo B• Insuficiência Renal Crônica• Hipotireoidismo• Anemia• Tumores malignos• Certos fármacos: colestiramina, metformina, metotrexato, ácido nicotínico, derivados de ácido fólico e pilulas contraceptivas orais.
Consequências da hiperhomocisteinemia	<ul style="list-style-type: none">• Aterosclerose• Câncer• Perda auditiva• Doença de Alzheimer• Degeneração macular relacionada à idade• Insuficiência Cardíaca Congestiva

2.1. Hiperhomocisteinemia Primária

Como referido anteriormente, a principal causa de hiperhomocisteinemia primária está relacionada com defeitos enzimáticos no metabolismo da homocisteína, sobretudo nas vias da remetilização e a transulfuração^{5;7}. Em consequência de polimorfismos nos genes que codificam as enzimas intervenientes no metabolismo da homocisteína (ex. MTHFR, CBS e MS) a concentração plasmática de homocisteína pode variar⁵. Neste contexto, muitos estudos têm-se focado em estabelecer uma relação entre os polimorfismos genéticos associados a hiperhomocisteinemia e risco de AVC⁸.

2.1.1 Cistationina Beta-Sintase (CBS)

Deficiências na CBS condicionam a conversão da homocisteína a cistationina e, como consequência, aumentam as concentrações de homocisteína no sangue. Na ausência total da CBS, não é produzida nenhuma cistationina, uma vez que não há maneira de ocorrer a conversão da homocisteína, e como consequência a homocisteína acumula-se e a via da transulfuração fica deste modo, inutilizada⁷. A CBS está amplamente distribuída no corpo humano e a sua expressão ocorre naturalmente no fígado, rins, músculos, cérebro e ovários⁷.

O polimorfismo T833C no gene da CBS, que se traduz pela substituição do aminoácido Ile (isoleucina) em Thr (treonina) no nucleótido 833, condiciona a ação da enzima e, como consequência, a via da transulfuração, daqui resultando um aumento da concentração plasmática de homocisteína⁸.

2.1.2. Metileno-tetrahidrofolato (MTHFR)

Uma das alterações genéticas mais estudadas no contexto da hiperhomocisteinemia ocorre no gene MTHFR, nomeadamente o polimorfismo C677T que se traduz na substituição do aminoácido Ala (alanina) em Val (valina)^{8; 9}. Cerca de 60% da população mundial possui o genótipo homozigótico C677C que não é afetado pelo polimorfismo C677T, enquanto aproximadamente 31% possui o genótipo heterozigótico C677T. No entanto, apenas 10% da população mundial possui o genótipo 677TT⁹. O genótipo T677T é responsável pela redução da atividade da enzima MTHFR, que por sua vez aumenta a concentração de homocisteína⁸.

Pessoas afetadas pelo polimorfismo MTHFR C677T têm um maior risco de sofrerem hiperhomocisteinemia quando os níveis de vitaminas B9 e B12 diminuem, em comparação com os indivíduos que não possuem o polimorfismo (C677C) (**Tabela 2**). De facto, uma deficiência em vitamina B9 e B12, aumenta respetivamente, 2,5 e 2,6 vezes o risco de hiperhomocisteinemia em indivíduos com o genótipo C677T^{7; 12}.

Tabela 2. Associação dos genótipos do MTHFR C677T e a deficiência de vitamina B12 e ácido fólico e o risco de hiperhomocistinemia¹².

	<i>MTHFR 677</i> ²	
	CC	CT or TT
	OR (95% CI)	OR (95% CI)
Folate		
Normal (>3.5 ng/mL)	1.0 (reference)	1.48 (0.93–2.34)
	<i>n</i> (469)	<i>n</i> (163)
Deficiency (≤3.5 ng/mL)	1.99 (1.29–3.08)*	4.84 (2.80–8.37)**
	<i>n</i> (153)	<i>n</i> (87)
Vitamin B12		
Normal (>200 pg/mL)	1.0 (reference)	1.96 (1.33–2.88)*
	<i>n</i> (563)	<i>n</i> (224)
Deficiency (≤200 pg/mL)	2.68(1.41–5.07)*	4.33 (1.7–10.86)*
	<i>n</i> (59)	<i>n</i> (26)

¹Plasma homocysteine >15 μmol/L.

²Values are OR (95% CI) from logistic regression adjusted for age (year) and gender.

*p value <0.05;

**p value <0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0033222.t006

2.2. Hiperhomocisteinemia Secundária

Como referido anteriormente, a hiperhomocisteinemia secundária é provocada maioritariamente por carências nutricionais de vitamina B2 (Riboflavina), B6 (Piridoxina), B9 (ácido fólico) e B12 (Cobalamina), hipotiroidismo, anemia, tumores malignos e insuficiência renal crónica^{3;7}.

2.2.1. Aspetos Nutricionais

As vitaminas do complexo B, nomeadamente as vitaminas B2, B6, B9 e B12, atuam como cofatores no metabolismo da homocisteína, como anteriormente descrito. A falta de disponibilidade destes cofatores, ao condicionarem as reações envolvidas no metabolismo da homocisteína, podem promover a acumulação de homocisteína e por conseguinte em hiperhomocisteinemia^{3;5;7}. Nas populações idosas existe uma grave deficiência de vitamina B12 e B9, que estão envolvidas na via da remetilação, e de vitamina B6 que está envolvida na via de transulfuração. A falta de vitaminas do complexo B é bastante comum na população idosa e como resultado, a homocisteína tem tendência para aumentar com a idade. Além disso, como estas vitaminas são solúveis na água, podem ser facilmente perdidas pela urina e agravar a situação de hiperhomocisteinemia⁷.

A falta de vitamina B12 e ácido fólico está relacionada com o aumento da concentração de homocisteína e com os riscos que lhe estão associados, como as doenças cardiovasculares, complicações na gravidez e defeitos no tubo neural⁵. Assim, a suplementação de ácido fólico e vitamina B12 tem um efeito sinérgico na diminuição dos níveis de homocisteína no sangue⁷. Em adultos, com uma dieta equilibrada, a falta de vitamina B12 é improvável e a sua falta no organismo deve-se essencialmente a uma má absorção no intestino. A falta de vitamina B6 causa diretamente, a acumulação de homocisteína devido ao mau funcionamento da CBS, que usa a vitamina B6 como cofator. Como a vitamina B6 não é sintetizada pelo ser humano, a sua falta é rapidamente detetada e a sua concentração sérica, é normalmente baixa, em todos os grupos etários⁷.

A homocisteína pode ser obtida através da dieta pelo consumo de metionina.^{5;7} A metionina é um aminoácido essencial nos mamíferos e é a única fonte pela qual se pode obter homocisteína através da alimentação. Uma dieta rica em metionina induz a formação de homocisteína e pode levar à sua acumulação⁷. Para além da metionina e das vitaminas do complexo B, a colina e betaína obtidas na dieta também desempenham um papel relevante no

metabolismo da homocisteína, já que são importantes cofatores do seu metabolismo e a sua alteração pode contribuir para o aumento da homocisteína⁵.

2.2.2. Doenças que podem induzir Hiperhomocisteinemia

Como referido anteriormente, existem certas doenças que podem interferir no metabolismo da homocisteína, como é o caso da insuficiência renal crónica, hipotireoidismo, anemia e tumores.

O mecanismo patofisiológico por detrás do aumento da homocisteína causado pela insuficiência renal crónica (IRC), é ainda desconhecido. Contudo, pensa-se que a principal causa para o acúmulo da homocisteína provém da redução da taxa de filtração glomerular (TFG)⁷. A TFG pode ser considerada normal, para valores 120 ml/min. A IRC é uma doença provocada pela diminuição progressiva da função renal e a TFG é um marcador que permite dividir esta doença em 5 estádios de gravidade¹³. A hiperhomocisteinemia pode ocorrer para uma TFG inferior a 60 ml/min (estádio 3, IRC moderada) e nesta altura, o rim costuma perder metade da sua função. Adicionalmente, numa situação de doença renal terminal crónica (estádio 5 da IRC) o risco de ocorrer hiperhomocisteinemia é de 85% a 100%.

De acordo com alguns estudos científicos, a homocisteína pode ser usada como um biomarcador de vários tumores, uma vez que as células tumorais libertam grandes níveis de homocisteína. Contudo, o aumento da libertação de homocisteína de células tumorais não está relacionado com a diferença de características entre células tumorais e as células normais, mas sim devido à rápida proliferação de células tumorais que reduzem a quantidade de ácido fólico e inativam a via da remetilização catalisada pela MS (**Figura 2**), traduzindo-se num aumento da homocisteína⁷. A deficiência de ácido fólico em doentes com cancro, pode ser explicada pelo facto de as células tumorais necessitarem de sintetizar DNA, RNA e proteínas, e o ácido fólico desempenha um papel fundamental na síntese de purinas essenciais para a formação de DNA e RNA⁹.

Adicionalmente, NEDREBRO *et al* demonstrou que a concentração de homocisteína no plasma era significativamente maior em doentes com hipotireoidismo¹⁴. A tireoidite de Hashimoto é a principal causa de hipotireoidismo e é uma reação autoimune que se caracteriza pelo ataque de anticorpos do organismo às células da tiroide. Num estudo clínico foi comprovado que a tireoidite de Hashimoto aumenta a resposta autoimune e a inflamação e, consequentemente, aumenta os níveis de homocisteína.

3. Hiperhomocisteinemia e o impacto no Sistema Cardiovascular e no Declínio Cognitivo

O aumento da homocisteína no plasma está diretamente relacionado com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como é o caso da doença arterial coronária, doença arterial periférica, enfarte agudo no miocárdio, mas também de doenças cerebrovasculares². As doenças cerebrovasculares são particularmente afetadas pela hiperhomocisteinemia e podem manifestar-se através da ocorrência lesões da substância branca cerebral (leucoaraiose), aterosclerose, estenose/oclusão das artérias carótidas e das artérias cerebrais, hemorragias intracerebrais, entre outras¹⁵. As lesões cerebrovasculares, ilustradas na **Figura 3**, estão normalmente associadas ao desenvolvimento de um comprometimento cognitivo^{1;2} que pode culminar com a instalação um quadro de demência².

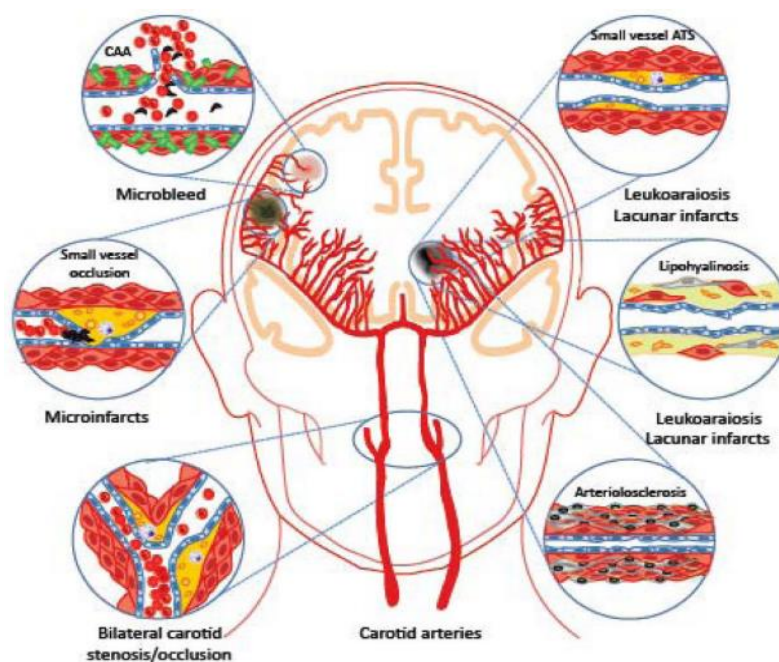


Figura 3. Lesões vasculares com impacto no declínio cognitivo¹⁵.

A hiperhomocisteinemia promove o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares por uma complexa série de mecanismos interrelacionados, sendo atribuído um papel central à disfunção endotelial e o *stress oxidativo*^{1; 16}.

3.1. Disfunção Endotelial e Stress Oxidativo

O endotélio é uma camada de células altamente especializadas que reveste a parte interna de todos os vasos sanguíneos e que, além de estabelecer uma barreira física entre o

sangue e os tecidos, desempenha um papel fundamental na regulação da homeostase da parede vascular^{17; 18}. Uma das funções mais proeminentes é a regulação do tónus vascular e, por conseguinte, regulação do fluxo sanguíneo. As células endoteliais podem, em resposta a diferentes estímulos químicos e físicos, produzir uma grande variedade de substâncias vasoativas, que incluem vasodilatadores (como por exemplo o óxido nítrico (NO) e a prostaciclina) e vasoconstritores (como a endotelina-1). Estas substâncias vasoativas incluem também compostos anti- e pró-coagulantes, fibrinolíticos e anti-fibrinolíticos, anti- e pró-inflamatórios, que intervêm noutras funções do endotélio, nomeadamente coagulação e fibrinólise, inflamação e crescimento celular¹⁷. O NO , principal vasodilatador, é sintetizado nas células endoteliais pela isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase (eNOS) a partir do aminoácido L-arginina. Uma vez produzido, difunde rapidamente até às células do músculo liso onde ativa a guanilato ciclase solúvel (sGC), levando ao aumento do GMP cíclico (cGMP) que, por ativação de uma proteína cinase (PKG), promove o vasorelaxamento. Além do efeito sobre o tónus vascular, o NO é capaz de regular diversos outros processos importantes para a manutenção da homeostase vascular, por exemplo a adesão e agregação das plaquetas (efeito anti-trombótico), a quimiotaxia dos leucócitos (efeito anti-inflamatório), etc.

A disfunção endotelial, caracteriza-se pela perda do equilíbrio entre a panóplia de compostos vasoativos produzidos pelo endotélio (por exemplo, perda de prevalência vasodilatadores relativa à de vasoconstritores) e constitui a principal causa do desenvolvimento aterosclerose¹⁷. A disfunção endotelial pode ser provocada por vários mecanismos, sendo atribuído ao *stress oxidativo* um papel significativamente relevante^{8; 17}. O *stress oxidativo* pode, de uma forma simples, ser definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e a capacidade de neutralização pelos sistemas antioxidantes celulares, do qual resulta dano para as biomoléculas (proteínas, lípidos e DNA) e consequente desregulação celular. As ROS incluem moléculas como peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Os sistemas antioxidantes que incluem enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase, bem como antioxidantes não enzimáticos como a glutatona, a vitamina C e a vitamina E.

A hiperhomocisteinemia está associada à disfunção endotelial, podendo esta estar associada à promoção de *stress oxidativo*. A cisteína produzida durante o metabolismo da homocisteína é um precursor da glutatona, um tripéptido constituído por cisteína, glutamato e glicina, muito importante para a manutenção do equilíbrio redox. Na sua forma reduzida (GSH), a glutatona atua como um importante antioxidante intracelular neutralizando diretamente ROS e servindo de cofator para enzimas antioxidantes (ex. glutatona transferases

envolvidas em processos de destoxificação celular de compostos eletrofílicos). Se a homocisteína não for convertida a cisteína, devido a mutações na CBS ou carências nutricionais de vitamina B6, os níveis de glutathione decrescem, resultando num aumento de ROS e conseqüentemente *stress oxidativo*². Além disso, está também descrito que homocisteína promove a sobreactivação das NADPH oxidases, enzimas que representam a principal fonte de ROS a nível vascular. A homocisteína está também implicada no desacoplamento da própria eNOS¹⁹. A eNOS na forma desacoplada, em vez de transferir os electrões para a L-arginina e assim formar *NO, promove a redução do oxigénio molecular gerando O₂^{-•}.

O aumento do *stress oxidativo* pode levar a uma diminuição da biodisponibilidade de *NO, condicionando os seus mecanismos de ação, nomeadamente a vasodilatação com conseqüências em termos de fluxo sanguíneo⁸. Adicionalmente, a homocisteína pode diminuir diretamente a síntese de *NO pela eNOS, através da inibição da atividade da dimetilarginina dimetilaminohidrolase (DDAH), enzima que degrada a dimetilarginina assimétrica (ADMA), um inibidor endógeno da eNOS¹⁹.

Como conseqüência da redução da biodisponibilidade de *NO, ocorre comprometimento da homeostase vascular da qual resulta a inflamação^{8;19} e a indução de um estado pró-trombótico¹⁷, que se consideram ser precedentes da formação de placas ateroscleróticas subjacente a doenças cardiovasculares e cerebrovasculares.

Adicionalmente, a disfunção endotelial pode aumentar a secreção de endotelina-1, que é um potente vasoconstritor e aumentar a concentração de fatores de adesão plasmáticos, células de adesão e micropartículas endoteliais provenientes de processos inflamatórios. A libertação anormal destas moléculas, agrava o processo inflamatório e contribui para o processo da inflamação vascular (**Figura 4**)³.

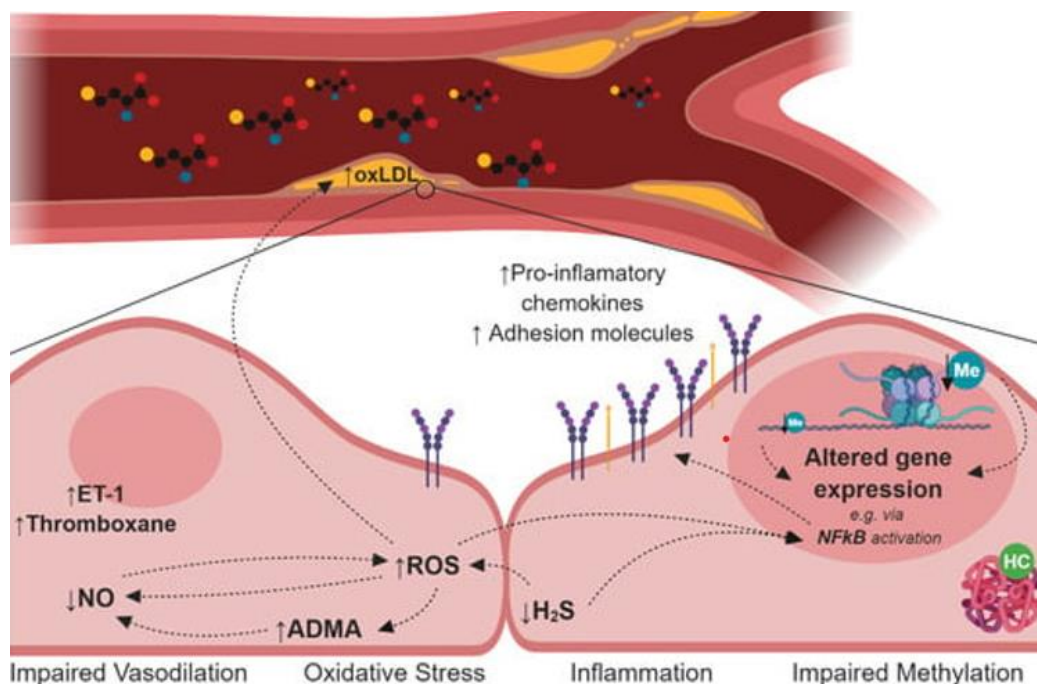


Figura 4. Representação dos mecanismos propostos para a disfunção endotelial e stress oxidativo mediados pela homocisteína¹⁹.

3.2. Aterosclerose

Como mencionado em cima, a disfunção endotelial promovida pela hiperhomocisteinemia está relacionada com o desenvolvimento e progressão de placas ateroscleróticas, sendo um fator de risco para a aterosclerose¹⁷. A aterosclerose é uma condição, que pode ser caracterizada pelo endurecimento e estreitamento da parede interna das artérias, e geralmente é provocada pela acumulação de material lipídico e elementos celulares, especialmente macrófagos e células musculares lisas, na túnica íntima das artérias de médio e grande calibre, levando à formação de placas que gradualmente estreitam o lúmen vascular e condicionam o fluxo sanguíneo. Os vasos sanguíneos mais afetados incluem a artéria aorta, as coronárias, as artérias carótidas e as artérias cerebrais.

Existem vários mecanismos que podem interferir no desenvolvimento da aterosclerose, mas a principal causa é a disfunção endotelial e a sua associação com o stress oxidativo como anteriormente descrito. O aumento do stress oxidativo e disfunção endotelial promovidos pela hiperhomocisteinemia estão associadas à facilitação da infiltração das partículas de baixa densidade (LDL) na íntima e a sua conseqüente oxidação. As LDL oxidadas podem ser fagocitadas por macrófagos para formar células esponjosas (“foam cells”) que constituem as placas ateroscleróticas. Existem também evidências que sugerem que o envolvimento da homocisteína na desregulação do metabolismo lipídico. Em particular, a

hiperhomocisteinemia tem sido inversamente correlacionada com níveis plasmáticos reduzidos de lipoproteínas de alta densidade (HDL), sugerindo condicionamento do transporte reverso do colesterol²⁰.

Adicionalmente, quando existe uma grande quantidade de homocisteína no sangue, podem ser produzidas substâncias procoagulantes como o tromboxano A2 (TXA2) e pode haver uma diminuição da formação de substâncias anticoagulantes, criando um ambiente favorável para a formação de coágulos (**Figura 5**)⁷.

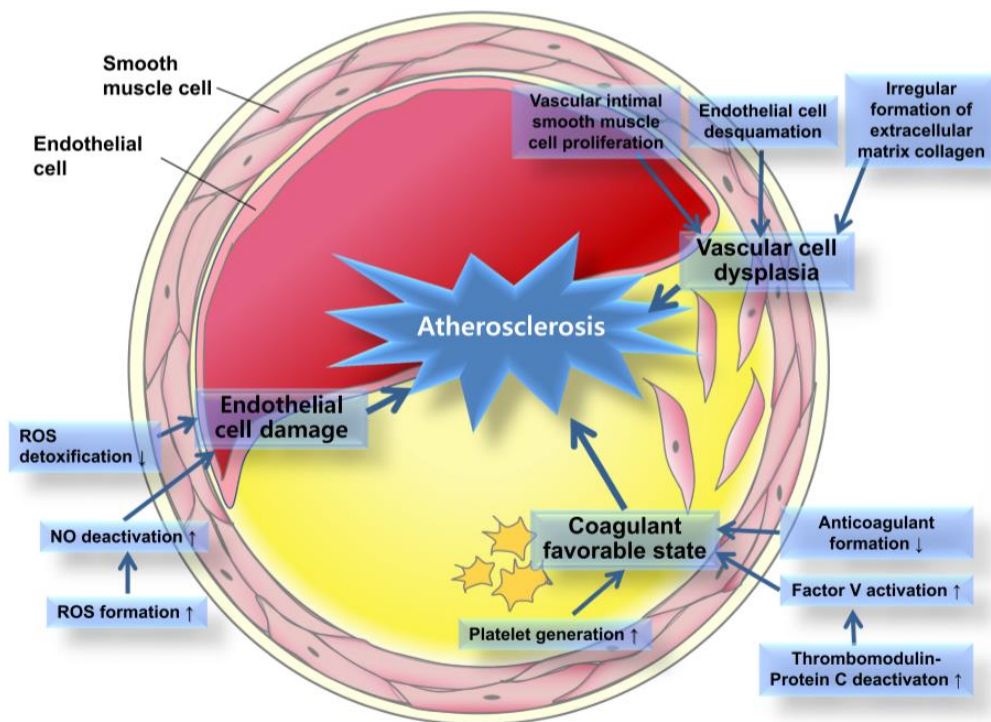


Figura 5. Processos patológicos da aterosclerose provocados pela hiperhomocistinemia⁷.

4. Hiperhomocisteinemia: impacto no declínio cognitivo

A hiperhomocistinemia configura um importante fator de risco vascular e está associada a um aumento da percentagem de atrofia do hipocampo e à aceleração dos mecanismos que estão subjacentes à patogênese da doença de Alzheimer (DA) e demência vascular (DV)^{21,22}. Algumas evidências científicas sugerem que a DA partilha muitos fatores de risco com as doenças cerebrovasculares sendo sugerido que disfunção cerebrovascular atue como precedente da DA²¹.

4.1. Doença de Alzheimer

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva e incurável e que se caracteriza por ser uma doença que provoca atrofia neuronal com impacto direto no declínio cognitivo²². A DA é o tipo de demência mais comum nos países ocidentais, atingindo uma taxa de 60-70% dos casos, enquanto a demência vascular representa 20% dos casos²³. A DV afeta a qualidade de vida das pessoas e normalmente, ocorre devido a eventos isquêmicos provenientes da diminuição da perfusão e lesões hemorrágicas¹⁹. É provável que em 2030 a demência afete cerca de 82 milhões de pessoas e que em 2050 haja um aumento para cerca de 152 milhões de pessoas a sofrerem desta condição debilitante¹⁸. Como a DA representa cerca de 70% dos casos de demência, é crucial entender as causas e os fatores de risco desta doença.

A DA é caracterizada por um conjunto de condições histopatológicas, entre as quais se destacam a formação de placas beta-amilóide (A β) e acumulação de proteína tau hiperfosforilada associada à formação de tranças neurofibrilares (NFT). As proteínas tau desempenham um papel essencial na estabilidade dos microtúbulos, constituintes essenciais do citoesqueleto, e dão suporte às células. A hiperfosforilação ocorre quando são adicionados grupos fosfatos em excesso às proteínas tau, comprometendo a sua função e propiciando a sua agregação. A formação de NFT podem causar diversos danos a nível neuronal como disfunção sináptica, inflamação e morte celular. Também a acumulação de péptidos de A β contribui para a formação de uma cascata de eventos fundamentais para a instalação e progressão da DA. Os péptidos formados pela clivagem proteolítica da proteína precursora de amiloide (APP) pela via amiloidogénica, e que constituem as placas encontradas no cérebro de DA, são extremamente tóxicos promovendo *stress* oxidativo e inflamação.

As causas e os fatores que levam à progressão da doença ainda não são totalmente conhecidas.¹⁸. Como referido anteriormente, diversos estudos sugerem que existe uma correlação entre a DA e as doenças cardiovasculares, existindo a possibilidade da DA ser um transtorno vascular com consequências neurodegenerativas e que se pode prevenir através da identificação de fatores de risco vasculares¹⁸.

Atualmente, a hiperhomocisteinemia é reconhecida como um fator de risco para a DA^{18; 21}. O mecanismo pelo qual a hiperhomocisteinemia promove o desenvolvimento DA ainda não é certo⁷, contudo alguns investigadores creem que a DA pode ser causada por alterações nos vasos sanguíneos cerebrais, provocados pelo *stress* oxidativo e disfunção endotelial. A disfunção endotelial e o *stress* oxidativo culminam em alterações estruturais e funcionais dos vasos sanguíneos cerebrais com impacto a nível da função neuronal e consequente função

cognitiva. Por exemplo, a estenose/oclusão das artérias carótidas e das artérias cerebrais associadas ao desenvolvimento de aterosclerose, como anteriormente mencionado (**Figura 3.**), estão associadas ao aumento do risco de declínio cognitivo^{15; 24}.

A homocisteína pode também condicionar a *clearance* de A β , assim favorecendo a disfunção cerebrovascular e processos inflamatórios responsáveis pelo desenvolvimento de DA²². Adicionalmente, foi demonstrado que a exposição de células cerebrais (astrócitos, microglia, células endoteliais e células neuronais) a concentrações elevadas de homocisteína resulta num aumento da expressão de genes de marcadores pró-inflamatórios que podem promover a hiperfosforilação das proteínas tau^{7; 25}. Na **figura 6** estão sistematizados alguns dos mecanismos propostos para a neurodegeneração promovida pela homocisteína e a sua interligação²².

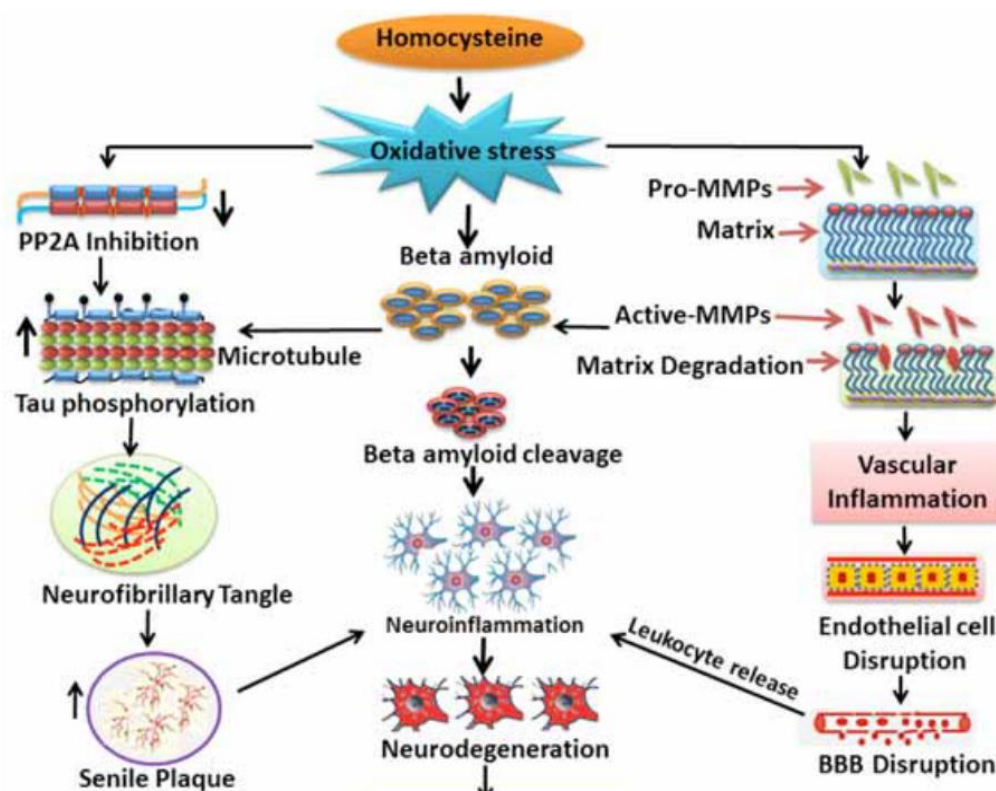


Figura 6. Diagrama de fluxo que sistematiza os mecanismos propostos pelos quais a homocisteína promove a neurodegeneração associada à DA e DV²².

4.2. Desregulação do fluxo sanguíneo cerebral

Apesar de o cérebro ocupar apenas 2% da massa total do corpo humano, o cérebro consome 20% do oxigênio e de glicose que são produzidos. Para o cérebro manter a sua integridade estrutural e funcional, é importante que haja uma boa regulação do fluxo sanguíneo cerebral. Se houver desregulação do fluxo sanguíneo cerebral, o cérebro perde algumas funções em apenas alguns segundos e em meros minutos pode ocorrer danos cerebrais. Os

vasos sanguíneos cerebrais transportam nutrientes essenciais para o cérebro ao mesmo tempo que removem resíduos metabólicos do sistema nervoso central (SNC). A diminuição do fluxo sanguíneo cerebral (hipoperfusão) resulta na limitação do aporte de nutrientes essenciais à função neuronal e na acumulação de moléculas neurotóxicas, e conseqüentemente em danos neuronais²⁴. Inúmeros estudos demonstram em indivíduos saudáveis que a redução do fluxo sanguíneo cerebral está associada à perda cognitiva e ao risco de desenvolverem DA²⁴.

O fluxo sanguíneo é mantido através de uma série de mecanismos que cooperam para manter a homeostase vascular, quer a nível da macrovasculatura e quer a nível da microvasculatura cerebral. A nível da microvasculatura, o fluxo sanguíneo cerebral é regulado de forma dinâmica pelas células da unidade neurovascular num processo denominado de acoplamento neurovascular. Este processo assegura um ajuste dinâmico do aporte de nutrientes às áreas cerebrais mais ativas, e por isso com maior demanda metabólica. A unidade neurovascular é formada por vários tipos de células, incluindo neurónios, células vasculares, células da glia e pericitos (**Figura 7**). Estas células atuam cooperativamente na produção de diversos compostos vasoativos em função do nível de atividade dos neurónios. De entre esses compostos, o NO destaca-se como importante mediador do acoplamento neurovascular.

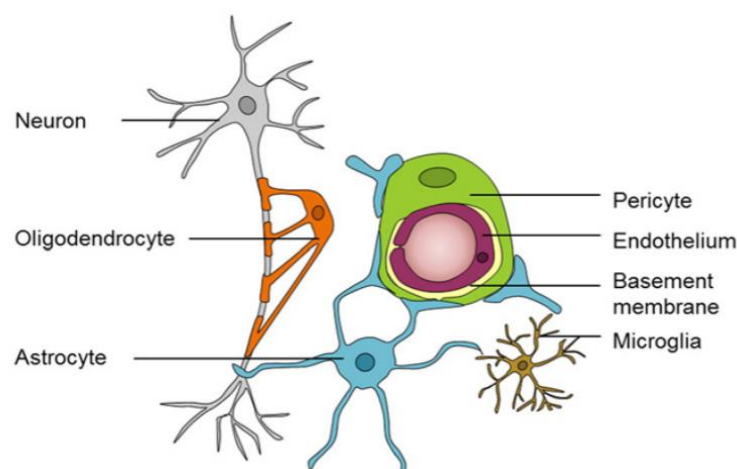


Figura 7. Constituição da unidade neurovascular²⁴.

A hiperhomocistinemia está intrinsecamente relacionada com a diminuição do fluxo sanguíneo, contudo os mecanismos subjacentes a este fenómeno ainda não são inteiramente conhecidos. Num estudo conduzido por HENRIKSEN *et al*, foi demonstrado em indivíduos saudáveis, que existe uma relação inversa entre a homocisteína e a perfusão sanguínea cerebral, ou seja, níveis plasmáticos aumentados de homocisteína estão associados a diminuição do fluxo sanguíneo cerebral (**Figura 8**)²⁶.

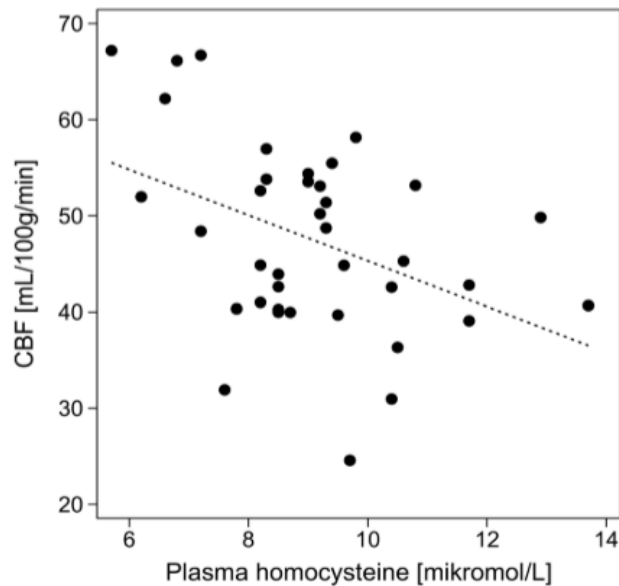


Figura 8. Gráfico que demonstra a relação inversa entre a concentração de homocisteína ($\mu\text{mol/L}$) e a perfusão sanguínea cerebral ($\text{ml}/100\text{g}/\text{min}$)¹⁶.

4.3. Alteração da Permeabilidade da Barreira Hematoencefálica

A barreira hematoencefálica (BHE) é uma estrutura especializada e altamente seletiva que separa o sangue do parênquima cerebral²⁷. A BHE desempenha um papel fundamental para o normal funcionamento do cérebro, facilitando a troca de nutrientes entre o cérebro e o sangue²⁸, enquanto atua como barreira de substâncias pequenas hidrofílicas, protegendo o cérebro da ação de substâncias potencialmente neurotóxicas e agentes patogênicos²⁷. A composição da BHE é complexa, sendo fundamentalmente composta por uma camada de células endoteliais altamente especializadas conectadas por estruturas especializadas, designadas de junções de oclusão^{27; 29}. As junções de oclusão são proteínas que desempenham um papel fundamental, uma vez que, fecham o espaço entre as células endoteliais adjacentes, impedindo deste modo a passagem de solutos e tornando a barreira pouco permeável²⁷. As proteínas de junção de oclusão mais abundantes do endotélio vascular são a claudina-1, claudina-5 e a ocludina^{27; 28}. A proteína claudina-5 assume um papel crítico para a manutenção da permeabilidade da BHE²⁹. A par com as células endoteliais e as junções de oclusão, também os astrócitos, os pericitos e a membrana basal (que conecta as células endoteliais com os pericitos e astrócitos) contribuem para a manutenção da integridade da BHE^{27; 29}. Alterações em qualquer um destes componentes está associado a distúrbios na integridade da BHE e comprometimento da função cerebral²².

Alguns estudos sugerem que a hiperhomocisteinemia pode provocar danos na integridade da BHE, promovendo a sua permeabilidade^{28; 29}. Quando em concentrações

elevadas, a homocisteína aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez estão associadas ao aumento da atividade das metaloproteinases de matriz (MMP). As MMP são endopeptidases que desempenham várias funções no organismo, sendo essenciais para a formação de tecidos, remodelação da rede neuronal e vascular e integridade da BHE²⁷. Em particular, a hiperhomocisteinemia está associada ao aumento da produção de MMP-2 e MMP-9, uma subfamília de metaloproteinases que quando produzidas em excesso digerem as proteínas de junção oclusiva, como por exemplo a claudina-5^{2; 25} e as proteínas da membrana basal²⁵. BEARDEN et al, num estudo científico, injetou homocisteína em células endoteliais da veia umbilical e descobriu que a homocisteína aumentava a permeabilidade da camada das células endoteliais e havia uma diminuição de claudina-5²⁸. Como consequência da digestão das junções oclusivas e das proteínas da membrana basal pode ocorrer aumento da permeabilidade da BHE³ e microhemorragias cerebrais² que desencadeiam dano neuronal e contribuem para progressão das doenças cerebrais²⁷.

5. Tratamento da Hiperhomocisteinemia e Impacto no Declínio Cognitivo

Vários ensaios clínicos sugerem que a suplementação com vitaminas do complexo B é eficaz no tratamento da hiperhomocisteinemia e conseqüentemente, pode atuar como um modificador de fatores de risco no desenvolvimento do declínio cognitivo, DV e DA². No ensaio clínico conduzido por DURGA et al, foram recrutadas pessoas com níveis plasmáticos de homocisteína entre 13 e 26 µM e com níveis adequados de vitamina B12²¹. Durante 3 anos, foram administrados diariamente e aleatoriamente, 800mg de ácido fólico ou placebo. Constatou-se que os participantes que tomaram ácido fólico, tiveram um aumento de 576% nos níveis séricos de ácido fólico e uma diminuição de 26% de homocisteína total plasmática, em relação aos participantes que tomaram placebo. Houve também uma melhoria significativa na função cognitiva no grupo que tomou ácido fólico, medido através da diferença na memória, velocidade motora e sensorial, velocidade de processamento de informação e fluência verbal^{29; 30}. Neste ensaio clínico, concluíram que a suplementação com ácido fólico durante 3 anos, tem impacto significativo na melhoria da função cognitiva^{21; 29; 30}.

Noutro ensaio clínico, conduzido por KANG et al, foi estudada a relação entre a suplementação com vitaminas do complexo B e o declínio cognitivo em mulheres com doenças cardiovasculares ou que possuíam fatores de risco cardiovasculares³¹. Depois de ser dada uma dose combinada de vitaminas B (2.5 mg de ácido fólico, 50 mg de vitamina B6 e 1 mg de vitamina B12) para prevenção secundária das doenças cardiovasculares, chegaram à conclusão de que a média de alteração do declínio cognitivo era similar tanto no grupo que fazia a

suplementação como no grupo placebo. Contudo, as mulheres que ingeriam pouca vitamina B diariamente, apresentaram sinais de melhoria na função cognitiva após a suplementação com uma dose combinada de vitaminas B^{21; 31}.

Por último, num estudo clínico realizado por DOUAUD *et al*, demonstraram que o tratamento com uma dose elevada de vitaminas do complexo B (0.8 mg de ácido fólico, 20 mg de vitamina B6 e 0.5 mg de vitamina B12) ao longo de 2 anos, desacelerava o encolhimento do cérebro. A atrofia cerebral diminuiu nas regiões da matéria cinzenta que são especialmente vulneráveis à DA³². Os danos na matéria cinzenta estão diretamente associados com o declínio cognitivo³³ e a homocisteína aumenta estes danos³². O tratamento com vitaminas do complexo B diminui a concentração plasmática de homocisteína e, em paralelo, diminui a atrofia cerebral na matéria cinzenta, que está intrinsecamente relacionada com o declínio cognitivo. Os resultados obtidos por DOUAUD *et al*, implicam que a suplementação com vitaminas do complexo B pode diminuir a atrofia em regiões específicas do cérebro que são fundamentais na patogénese da DA e do declínio cognitivo³².

Apesar de muitos ensaios clínicos apresentarem provas de que a suplementação com vitaminas do complexo B reduz a concentração de homocisteína plasmática, e consequentemente retarda o declínio cognitivo, existem muitos estudos que refutam estes resultados e que demonstram dados incongruentes. Existem inúmeras variáveis e fatores que podem justificar a aparente incongruência nos resultados, como por exemplo, a dosagem, a combinação terapêutica de vitaminas do complexo B, duração do tratamento e a população que é selecionada para o tratamento^{32; 34; 35}. Outro fator que pode ser responsável pelas discrepâncias nos resultados dos ensaios clínicos é a concentração basal de homocisteína total. Tem sido demonstrado que os participantes que apresentam um modesto aumento de concentração de homocisteína total, experienciam o efeito benéfico da suplementação com vitaminas do complexo B no declínio cognitivo³².

Conclusão

Nos últimos anos, a hiperhomocisteinemia tem emergido como um tema de grande interesse pela comunidade científica devido à sua implicação nas doenças cerebrovasculares e no declínio cognitivo. As evidências sugerem que a hiperhomocisteinemia desempenha um papel crucial na disfunção endotelial, o que provoca uma inflamação crónica, vasoconstrição, formação de coágulos sanguíneos e redução do fluxo sanguíneo cerebral. Como resultado,

são criadas condições para a ocorrência de acidentes vasculares cerebrais (AVC) e outras doenças cerebrovasculares. As alterações cerebrovasculares provocam lesões no cérebro que diminuem significativamente a memória, raciocínio e o comportamento, com um profundo impacto no declínio cognitivo. Estudos recentes demonstraram que existe uma forte probabilidade de que as lesões vasculares sejam um pré-antecedente para a instalação de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer.

Deste modo, é importante saber os mecanismos pelos quais a homocisteína atua e a influência que possui na patogênese das doenças cerebrovasculares e neurodegenerativas. Apesar dos grandes avanços que têm sido feitos, estes mecanismos são complexos e muitas vezes o seu impacto no organismo é desconhecido. A hiperhomocistinemia é uma condição que pode ser proveniente de fatores genéticos, estilos de vida e alterações metabólicas. Sendo um fator de risco modificável, é importante arranjar estratégias de prevenção e tratamento.

A suplementação com vitaminas do complexo B, nomeadamente a vitamina B6, B9 e B12, representa a principal estratégia de tratamento para a hiperhomocistinemia. Estas vitaminas desempenham um papel crucial no metabolismo da homocisteína e sua deficiência nutricional, pode aumentar a concentração de homocisteína. Muitos estudos indicam que a suplementação com vitaminas do complexo B é eficaz para retardar o declínio cognitivo induzido pela hiperhomocistinemia. Contudo, esta opinião é bastante controversa e os resultados são ainda contraditórios.

Em última instância, é importante continuar a estudar os mecanismos da hiperhomocistinemia e compreender a relação existente entre as doenças cerebrovasculares, o declínio cognitivo e as doenças neurodegenerativas. A compreensão desta condição pode ajudar a obter novas respostas clínicas e novas direções para o diagnóstico clínico, prevenção e tratamento da hiperhomocistinemia.

Referências Bibliográficas

1. LUZZI, S. [et al.] - Homocysteine, Cognitive Functions, and Degenerative Dementias: State of the Art. **Biomedicines**. ISSN 22279059. 10:11 (2022). doi: 10.3390/biomedicines10112741.
2. PRICE, B. [et al.] - Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor for Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia. **Frontiers in Aging Neuroscience**. ISSN 16634365. 10 (2018). doi: 10.3389/fnagi.2018.00350.
3. LI, S. [et al.] - Endothelial Dysfunction and Hyperhomocysteinemia-Linked Cerebral Small Vessel Disease: Underlying Mechanisms and Treatment Timing. **Frontiers in Neurology**. ISSN 16642295. 12 (2021). doi: 10.3389/fneur.2021.736309.
4. KAPLAN, P. [et al.] - Homocysteine and mitochondria in cardiovascular and cerebrovascular systems. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 14220067. 21:20 (2020) 1–19. doi: 10.3390/ijms21207698.
5. MANDAVIYA, P. [et al.] - Homocysteine and DNA methylation: A review of animal and human literature. **Molecular Genetics and Metabolism**. ISSN 10967206. 113:4 (2014) 243–252. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.10.006.
6. MAZZA, A. [et al.] - [Homocysteine and cardiovascular risk]. **Monaldi archives for chest disease = Archivio Monaldi per le malattie del torace**. ISSN 1122-0643. 62:1 (2004) 29–33.
7. KIM, J. [et al.] - Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance. **Archives of Pharmacal Research**. ISSN 19763786. 41:4 (2018) 372–383. doi: 10.1007/s12272-018-1016-4.
8. TINELLI, C. [et al.] - Hyperhomocysteinemia as a risk factor and potential nutraceutical target for certain pathologies. **Frontiers in Nutrition**. ISSN 2296861X. 6 (2019). doi: 10.3389/fnut.2019.00049.
9. HASAN, T. [et al.] - Disturbed homocysteine metabolism is associated with cancer. **Experimental and Molecular Medicine**. ISSN 20926413. 51:2 (2019). doi: 10.1038/s12276-019-0216-4.
10. NYGÅRD, O. [et al.] - Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: the Hordaland Homocysteine Study. **The American journal of clinical nutrition**. ISSN 0002-9165. 67:2 (1998) 263–70. doi: 10.1093/ajcn/67.2.263.

11. MIJATOVIC, V. [et al.] - A randomized controlled study of the effects of 17Beta-estradiol-dydrogesterone on plasma homocysteine in postmenopausal women. **Obstetrics & Gynecology**. ISSN 00297844. 91:3 (1998) 432–436. doi: 10.1016/S0029-7844(97)00704-7.
12. YAKUB, M. [et al.] - Polymorphisms in MTHFR, MS and CBS genes and homocysteine levels in a Pakistani population. **PLoS ONE**. ISSN 19326203. 7:3 (2012). doi: 10.1371/journal.pone.0033222.
13. KAUFMAN, D. [et al.] - **Physiology, Glomerular Filtration Rate**
14. FONSECA, V. [et al.] - **Hyperhomocysteinemia and the Endocrine System: Implications for Atherosclerosis and Thrombosis**. Disponível em: <https://academic.oup.com/edrv/article/20/5/738/2530980>.
15. MORRIS, J. [et al.] - Vascular Cognitive Impairment and Dementia. **CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology**. ISSN 15386899. 28:3 (2022) 750–780. doi: 10.1212/CON.0000000000001124.
16. GANGULY, P. [et al.] - Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. **Nutrition Journal**. ISSN 14752891. 14:1 (2015). doi: 10.1186/1475-2891-14-6.
17. LAI, W. [et al.] - Homocysteine-induced endothelial dysfunction. **Annals of Nutrition and Metabolism**. ISSN 14219697. 67:1 (2015) 1–12. doi: 10.1159/000437098.
18. LAURIOLA, M. [et al.] - Relationship of Homocysteine Plasma Levels with Mild Cognitive Impairment, Alzheimer’s Disease, Vascular Dementia, Psychobehavioral, and Functional Complications. **Journal of Alzheimer’s Disease**. ISSN 18758908. 82:1 (2021) 235–248. doi: 10.3233/jad-210166.
19. ESSE, R. [et al.] - The contribution of homocysteine metabolism disruption to endothelial dysfunction: State-of-the-art. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 14220067. 20:4 (2019). doi: 10.3390/ijms20040867.
20. YUAN, D. [et al.] - Mechanism of homocysteine-mediated endothelial injury and its consequences for atherosclerosis. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**. ISSN 2297055X. 9 (2023). doi: 10.3389/fcvm.2022.1109445.
21. HAINSWORTH, A. [et al.] - Homocysteine, hyperhomocysteinemia and vascular contributions to cognitive impairment and dementia (VCID). **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**. ISSN 1879260X. 1862:5 (2016) 1008–1017. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.11.015.

22. KAMAT, P. [et al.] - Homocysteine Induced Cerebrovascular Dysfunction: A Link to Alzheimer's Disease Etiology. **The open neurology journal**. ISSN 1874-205X. 9:1 (2015) 9–14. doi: 10.2174/1874205X01509010009.
23. IADECOLA, C. - The Pathobiology of Vascular Dementia. **Neuron**. ISSN 08966273. 80:4 (2013) 844–866. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.008.
24. NELSON, A. [et al.] - Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**. ISSN 1879260X. 1862:5 (2016) 887–900. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.12.016.
25. WEEKMAN, E. [et al.] - Hyperhomocysteinemia-Induced Gene Expression Changes in the Cell Types of the Brain. **ASN Neuro**. ISSN 17590914. 9:6 (2017). doi: 10.1177/1759091417742296.
26. HENRIKSEN, O. [et al.] - Resting brain perfusion and selected vascular risk factors in healthy elderly subjects. **PLoS ONE**. ISSN 19326203. 9:5 (2014). doi: 10.1371/journal.pone.0097363.
27. REMPE, R. [et al.] - Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**. ISSN 15597016. 36:9 (2016) 1481–1507. doi: 10.1177/0271678X16655551.
28. BEARD, R. [et al.] - Hyperhomocysteinemia increases permeability of the blood-brain barrier by NMDA receptor-dependent regulation of adherens and tight junctions. **Blood**. ISSN 0006-4971. 118:7 (2011) 2007–2014. doi: 10.1182/blood-2011-02-338269.
29. SHEN, S. [et al.] - The protective effects of butorphanol tartrate against homocysteine-induced blood-brain barrier dysfunction. **Bioengineered**. ISSN 21655987. 13:3 (2022) 7209–7220. doi: 10.1080/21655979.2022.2037953.
30. DURGA, J. [et al.] - Effect of 3-year folic acid supplementation on cognitive function in older adults in the FACIT trial: a randomised, double blind, controlled trial. **The Lancet**. ISSN 01406736. 369:9557 (2007) 208–216. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60109-3.
31. KANG, J. [et al.] - A trial of B vitamins and cognitive function among women at high risk of cardiovascular disease. **American Journal of Clinical Nutrition**. ISSN 00029165. 88:6 (2008) 1602–1610. doi: 10.3945/ajcn.2008.26404.
32. DOUAUD, G. [et al.] - Preventing Alzheimer's disease-related gray matter atrophy by B-vitamin treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United**

States of America. ISSN 00278424. 110:23 (2013) 9523–9528. doi: 10.1073/pnas.1301816110.

33. WAN, C. [et al.] - The new mechanism of cognitive decline induced by hypertension: High homocysteine-mediated aberrant DNA methylation. **Frontiers in Cardiovascular Medicine.** ISSN 2297055X. 9 (2022). doi: 10.3389/fcvm.2022.928701.

34. WALD, D. [et al.] - Effect of Folic Acid, with or without Other B Vitamins, on Cognitive Decline: Meta-Analysis of Randomized Trials. **The American Journal of Medicine.** ISSN 00029343. 123:6 (2010) 522-527.e2. doi: 10.1016/j.amjmed.2010.01.017.

35. FORD, A. [et al.] - Effect of homocysteine lowering treatment on cognitive function: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Alzheimer's disease : JAD.** ISSN 1875-8908. 29:1 (2012) 133–49. doi: 10.3233/JAD-2012-111739.