

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**«Hiperhomocisteinemia y ateromatosis coronaria.
Estudio epidemiológico en un grupo de población de
enfermos de la Provincia de Santa Cruz de Tenerife»**

**Autor: Alberto Domínguez Rodríguez
Director: Dr. D. Diego de Armas Trujillo**

Departamento de Medicina Interna, Derma. Psiqu.

DR. DIEGO DE ARMAS TRUJILLO, PROFESOR TITULAR DE PATOLOGÍA MÉDICA- CARDIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Y JEFE DEL SERVICIO DE CARDIOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CANARIAS.

CERTIFICO:

Que Don ALBERTO DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ, licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación correspondiente a la TESIS DOCTORAL: "HIPERHOMOCISTEINEMIA Y ATEROMATOSIS CORONARIA. Estudio epidemiológico en un grupo de población de enfermos de la Provincia de Santa Cruz de Tenerife".

Revisado el presente trabajo estimo que corresponde fielmente a los resultados obtenidos y que puede ser presentado para ser juzgado por el tribunal que sea designado para su lectura.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo y firmo el presente certificado en La Laguna, a tres de junio de dos mil.

AGRADECIMIENTOS.

Una vez finalizado mi tesis doctoral, tengo la obligación de enfrentarme al capítulo más complicado de este trabajo, que no es otro que el de los agradecimientos. He de sintetizar en unas breves líneas mi sentida y sincera gratitud hacia las personas que me han ayudado. Sin ellas, hubiese sido del todo imposible afrontar con éxito la elaboración de este proyecto, en la que tanta ilusión he puesto.

De forma muy especial, quiero dejar constancia de mi agradecimiento al **Dr. Diego de Armas Trujillo**, al que nunca podré corresponder como merecería tantos años de conocimiento y sabiduría empleados en mi formación. Por si no fuera suficiente la deuda de gratitud que con él tengo contraída, me ha distinguido al dirigir este trabajo, y me honra cada día con su personal trato y afecto. Gracias, de corazón, por ser un verdadero maestro.

Mi gratitud, para el **Dr Pedro Abreu González**, por haber trabajado conmigo todo el tiempo necesario con una entrega y dedicación absoluta, además de su inestimable amistad, y porque supo trasmitirme su ilusión para despertar en mí el "gusanito" de la investigación.

A mis **compañeros del Servicio de Cardiología del Hospital Universitario de Canarias**, médicos y enfermeras, por su inestimable ayuda incondicional, para la elaboración de este trabajo, expresando una especial gratitud a la enfermera **María del Pino (Mapi)**

Agradecimiento al **Psicólogo Alejandro Jiménez Sosa** , por su colaboración y asesoramiento en el procesamiento estadístico de los datos.

Por último, en el apartado personal, mi gratitud y todo mi amor a *Milagros*, mi esposa, compañera y amiga, por su inestimable apoyo y comprensión para sobrellevar el abandono al que ha estado sometida durante todas las horas que he dedicado a éste trabajo. También gracias, una y otra vez a *Verónica*, mi hija, que espero con todo deseo que llegue a entender algún día el motivo por el que durante tantas horas no he podido dedicarle la atención que merece, y para que le quede el recuerdo de un ideal realizado, también con su ayuda.

INDICE.

1. INTRODUCCION.

1.1 <i>Homocisteína en sangre</i>	8
1.1.1. ¿Qué es la homocisteína?	8
1.1.2. Metabolismo de la homocisteína.....	9
1.1.3. Formas moleculares de la homocisteína.....	9
1.1.4. Determinación de homocisteína en sangre	10
1.1.5. Definición de hiperhomocisteinemia.....	10
1.1.6. Prevalencia de hiperhomocisteinemia	11
1.2 <i>Etiología de la hiperhomocisteinemia</i>	11
1.2.1. Causas Genéticas.....	11
1.2.2. Causas Nutricionales	12
1.2.3. Otras causas	13
1.3 <i>Propiedades aterotrombóticas de la homocisteína</i>	14
1.4 <i>Homocisteína-Enfermedad Cardiovascular</i>	15
1.4.1. Homocisteína-Accidente cerebrovascular	15
1.4.2. Homocisteína-Enfermedad vascular periférica.....	16
1.4.3. Homocisteína-Enfermedad arteromatosa coronaria	16
1.4.4. Homocisteína-Trombosis venosa.....	16

2. OBJETIVOS.

2.1 <i>Plantamiento del problema</i>	17
2.2 <i>Objetivos del estudio</i>	17

3. MATERIAL Y METODOS.

3.1 <i>Descripción de la muestra</i>	18
3.1.1. Tipo de diseño.....	18
3.1.2. Población de estudio.....	18
3.1.3. Pacientes.....	18
3.1.4. Criterios de inclusión de los pacientes en el estudio.....	18
3.1.5. Criterios de exclusión de los pacientes en el estudio.....	19
3.2 <i>Recogida de datos</i>	19
3.3 <i>Parámetros analíticos</i>	19
3.3.1. Determinación de "bioquímica sanguínea".....	19
3.3.2. Determinación de niveles de homocisteína total.....	20
3.3.2.a. Recogida de muestras sanguíneas.....	20
3.3.2.b. Cuantificación de homocisteína total.....	20
3.3.2.c. "Principios" del análisis.....	21
3.3.2.d. Aspectos metodológicos de la técnica.....	22
3.3.3. Determinación de la vitamina B ₆	23
3.3.4. Determinación del ácido fólico y vitamina B ₁₂	23
3.4 <i>Procesamiento estadístico de los datos</i>	23

4. RESULTADOS.

4.1 <i>Análisis descriptivo de la muestra</i>	25
4.1.1. Características socio-demográficas.....	25
4.1.1.A. Edad.....	25
4.1.1.B. Sexo.....	25
4.1.1.C. Características analíticas entre los casos y controles.....	25

4.1.1.D. Características clínicas de los casos	26
4.2 <i>Contraste de Hipótesis</i>	27
4.2.1. Análisis univariado de la homocisteína	27
4.2.2. Distribuciones de los niveles de homocisteína por sexo	28
4.2.3. Distribuciones de los niveles de homocisteína por quintiles	28
4.2.4. Factores de riesgo para enfermedad arterial coronaria.....	29
4.2.4.A. Factores de riesgos principales independientes para enfermedad arterial coronaria	29
4.2.4.B. Factores de riesgos predisponentes para enfermedad arterial coronaria	29
4.2.4.C. Factor de riesgo condicional para enfermedad arterial coronaria...30	
4.3 <i>Análisis multivariado</i>	31
4.3.1. Análisis de Regresión Logística.....	31
4.3.1.A. Factores de riesgos principales independientes para enfermedad arterial coronaria	31
4.3.1.B. Factores de riesgos predisponentes para enfermedad arterial corona- ria	31
4.3.1.C. Factor de riesgo condicional para enfermedad arterial coronaria...32	
4.3.2. Análisis de Regresión logística para modelo final.....	32
5. DISCUSIÓN.	
5.1 <i>Asociación de la homocisteína con aterosclerosis y trombosis</i>	33
5.2. <i>Homocisteína y enfermedad arterial coronaria</i>	36
5.3. <i>La Homocisteína como factor de Riesgo cardiovascular</i>	37

6. CONCLUSIONES	40
7. BIBLIOGRAFÍA	41

1. INTRODUCCION.

La cardiopatía coronaria ha sido identificada en humanos desde hace más de 3000 años. La enfermedad tenía una incidencia relativamente baja antes de finales del siglo XVIII, cuando la industrialización introdujo cambios importantes en el estilo de vida, incluyendo aumento de grasa, colesterol y sal en la alimentación, tabaco, y una marcada disminución de la actividad física.

El Framingham Heart Study, que se inició en 1948, ha seguido sistemáticamente más de 5000 hombres y mujeres que inicialmente estaban libres de cardiopatía coronaria. Este y numerosos estudios posteriores documentaron firmemente que la prevalencia de la cardiopatía coronaria se asocia a los siguientes factores de riesgo: edad avanzada, sexo masculino, antecedentes familiares de cardiopatía coronaria, hipercolesterolemia, tabaquismo, hipertensión, diabetes mellitus y estilo de vida sedentario.

Sin embargo, no es infrecuente que no se detecte ningún factor de riesgo "clásico" (tabaquismo, diabetes mellitus, hipertensión, etc.) en pacientes que han sufrido accidentes cardiovasculares, incluso en aquellos jóvenes y con una historia de accidentes cardiovasculares previos. En 1969 McCully y Wilson (McCully y Wilson, 1969) describieron dos casos de especímenes de necropsia con una extensa enfermedad arteriosclerótica en dos niños con homocistinuria. Seis años después el propio McCully publicó su teoría (McCully, 1975), en la que relacionaba la homocisteína como un factor causal de ateromatosis. En el año 1976 Wilcken y Wilcken publicaron el primer artículo en que se relacionaba la homocisteína con la patogénesis de la enfermedad coronaria (Wilcken, et al, 1976). En este estudio demostraron que en pacientes con enfermedad coronaria la proporción de los que tenían niveles elevados o moderadamente elevados de homocisteína era más alta que en los individuos sin enfermedad coronaria que utilizaron de control.

1.1. HOMOCISTEINA EN SANGRE.

1.1.1. ¿Qué es la homocisteína?

La homocisteína es un aminoácido sulfurado que se produce en los vertebrados a partir de la metionina (Lehringer AL, et al, 1993).

1.1.2. Metabolismo de la homocisteína.

La metionina procedente de la dieta o del catabolismo de las proteínas endógenas es transformada en las células a homocisteína mediante tres reacciones sucesivas (figura 1) (Córdoba Porras A, et al, 1997). Esta es la única fuente de homocisteína en vertebrados (Finkelstein JD., 1990). En la homocisteína el metabolismo de la metionina se bifurca en las rutas metabólicas de la transulfuración y de las transmetilación en el metabolismo de los aminoácidos que contienen azufre. En la ruta de la transulfuración, la homocisteína se transforma a cisteína mediante dos reacciones dependientes de la vitamina B₆. La primera de estas reacciones es catalizada por la cistationina β-sintasa y, en ella, la homocisteína se condensa con una molécula de serina para formar cistationina. En condiciones fisiológicas, esta reacción es irreversible. En la segunda reacción, la cistationasa cataliza la formación de cisteína y α-cetobutirato a partir de la cistationina (Finkelstein JD., 1990).

La transmetilación de la homocisteína se realiza mediante dos rutas metabólicas independientes, en las que participan respectivamente las enzimas 5-metiltetrahidrofolato homocisteína metiltransferasa (metionina sintasa) y la betaína homocisteína metiltransferasa. La primera de estas enzimas se encuentra en todas las células y requiere de 5-metiltetrahidrofolato como fuente de grupos metilos, y de metilcobalamina como cofactor. La segunda se encuentra en el hígado y en menor proporción en los riñones y las glándulas suprarrenales, y emplea betaína como fuente de grupos metilos (Finkelstein JD., 1990). Aproximadamente, el 50% de la homocisteína es transformada a metionina mediante remetilación (Mudd SH y Poole JR, 1975; Mudd SH, et al, 1980).

1.1.3. Formas moleculares de homocisteína.

El 70-80% de la homocisteína está ligada a las proteínas, principalmente a la albúmina, mediante puentes disulfuro. A esta fracción se la denomina homocisteína ligada a proteínas. El 20-30% restante se conoce como homocisteína libre y está formada por dímeros de homocisteína-cisteína y homocisteína-homocisteína (homocistina), en ambos casos unidos por puentes disulfuro, y por último monómero de homocisteína (Ueland PM., 1995). La suma de todas las especies plasmáticas de homocisteína se denomina

homocisteína total, y su determinación es la que resulta de interés diagnóstico, ya que la concentración de homocisteína libre es muy variable.

1.1.4. Determinación de homocisteína en plasma.

Para determinar la homocisteína en plasma es necesario la colocación inmediata en hielo de la muestra de sangre, así como proceder a la separación del plasma antes de que pase 20 minutos, utilizando para ello una centrifugadora. Ello es debido a que, a temperatura ambiente, los eritrocitos exportan homocisteína al plasma y, por ello, pueden falsear los resultados (Refsum H, et al., 1997).

El método más ampliamente usado para la cuantificación de la homocisteína plasmática es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección de fluorescencia o electroquímica (Ueland et al., 1993). Esta técnica no está siempre disponible en muchos laboratorios clínicos, de ahí el interés en los últimos años por la aparición de nuevos métodos que hagan accesible la determinación de la homocisteína. Por el momento, de entre las diferentes posibilidades existentes, los métodos inmunoquímicos parece ser los más avanzados (Shipchandler et al., 1995; Frantzen et al., 1998).

Se recomienda que la medida de la homocisteína sea después de un ayuno de al menos 12 horas, para evitar la elevación de ésta después de la comida (Guttormsen AB, et al., 1994).

La determinación de la homocisteína tras sobrecarga de metionina, es una prueba que consiste en suministrar una dosis oral de 100 mg de L-metionina/Kg de peso o 3,8 g/m² de superficie corporal. La homocisteinemia se determina entre 2 y 8 horas después de la ingesta de la metionina (Ueland et al., 1993). Esta prueba es de interés para detectar en heterocigotos la deficiencia de la cistationina β-sintasa y déficit de vitamina B₆.

1.1.5. Definición de hiperhomocisteinemia.

Los niveles de homocisteína en plasma que usualmente se consideran normales alcanzan un rango entre 5 y 15 μmol/l (Still RA y McDowell IF, 1998; Refsum H, et al., 1997). Sin embargo las concentraciones de homocisteína en plasma que se consideran "normales" en términos estadísticos varía entre diferentes países, y también entre diferentes

laboratorios. Se suele utilizar el criterio de considerar hiperhomocisteinémicos a las personas con concentraciones plasmáticas de homocisteína basal y/o con incrementos post-metionina que son superiores a la media más dos desviaciones estándar de los controles o, alternativamente, aquellos con concentraciones superiores al percentil 90 o 95% de éstos (Dudman NP, et al.,1993). Arbitrariamente se clasifica la hiperhomocisteinemia en moderada (16-30 $\mu\text{mol/l}$), intermedia (31-100 $\mu\text{mol/l}$) y severa ($> 100 \mu\text{mol/l}$).

1.1.6. Prevalencia de hiperhomocisteinemia.

La prevalencia de la hiperhomocisteinemia ha sido estimada en un 5% en la población general, y en un 13 y 47% entre pacientes con enfermedad vascular aterosclerótica sintomática (McCully KS, 1996; Malinow MR, et al., 1998). Sin embargo estas estimaciones están basadas por concentraciones superiores al percentil 90 o 95% de la distribución de la homocisteína total en la población general.

1.2. ETIOLOGIA DE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA.

1.2.1. Causas Genéticas:

- A) Deficiencia de Cistationina- β -Sintasa (C β S): La causa genética más común de hiperhomocisteinemia severa y homocistinuria clásica es la deficiencia homocigota de la C β S. Esto ocurre de 1 en 100.000 nacimientos. Se hereda de forma autosómica recesiva. (Mudd SH et al., 1995). Los pacientes con homocistinuria clásica presentan retraso mental, luxación del cristalino, anormalidades esqueléticas y enfermedad vascular prematura. Los eventos vasculares suelen ocurrir antes de los 30 años, en aproximadamente la mitad de los homocigotos no tratados (Mudd SH et al., 1985). Se estima que entre el 0,3 y el 1% de la población general es portador de un defecto en uno de los alelos del gen que codifica para esta enzima.
- B) Deficiencia de la Metionina Sintasa: causa rara de hiperhomocisteinemia severa. Se produce por una actividad alterada de la enzima metionina sintasa debido a una alteración genética del metabolismo de la vitamina B₁₂ (Ogier de Baulny H, et al., 1998).

- C) Deficiencia de la Metilenotetrahidrofolato reductasa (MTHFR): Existe una deficiencia severa(homocigótica) de la enzima MTHFR, que es muy poco frecuente y causa una hiperhomocisteinemia severa (Frosst P, et al., 1995).
- D) Deficiencia de la MTHFR variante "termolábil": Los estudios "in vitro" demuestran que la enzima presenta una sensibilidad térmica (46°C). El defecto molecular en esta variante se produce por una sustitución de una citosina por una timina en el nucleótido 677 del gen, lo que origina un cambio de alanina por valina (Frosst P, et al., 1995). La actividad enzimática disminuida de esta variante, incrementa la susceptibilidad a desarrollar hiperhomocisteinemia moderada, especialmente en individuos con concentración sérica de ácido fólico en el límite bajo de la normalidad (Malinow MR, et al., 1997). La prevalencia de esta deficiencia se sitúa entre un 10 y 15% en la población general, siendo por tanto el defecto genético más común.

1.2.2. Causas nutricionales.

- A) Deficiencia de ácido fólico: cuando la concentración de ácido fólico está ligeramente disminuida, las probabilidades de desarrollar hiperhomocisteinemia son muy altas (Kang SS, et al., 1987).
- B) Deficiencia de vitamina B₁₂: En la deficiencia subclínica de cobalamina, la concentración de homocisteína en sangre es dos veces superior a la de los controles. En los pacientes con evidencia clínica de deficiencia de cobalamina, la concentración basal de homocisteína está elevada en prácticamente todos los casos (Kang SS, et al., 1987).
- C) Deficiencia de vitamina B₆: Afecta significativamente la velocidad de las reacciones que transforman la homocisteína en cisteína al disminuir la actividad de las enzimas CBS y cistationina γ -liasa e inducir un aumento en las concentraciones de homocisteína en sangre post-metionina (Kang SS, et al., 1987).

Se ha sugerido que aproximadamente el 60% de la hiperhomocisteinemia es debido a niveles inadecuados en sangre de una o más de estas vitaminas (Selhub J, et al., 1993).

- D) Incremento en la síntesis de homocisteína debido a la toma en gran cantidad de metionina.

1.2.3. Otras causas.

- A) Insuficiencia renal: En los pacientes con insuficiencia renal crónica, la concentración de homocisteína en sangre se encuentra aumentada entre 1,95 y 3,6 veces respecto a los controles. La hiperhomocisteinemia tiene un papel importante en la marcada susceptibilidad a desarrollar enfermedad vascular prematura de estos pacientes (Bostom AG, et al., 1997; Moustapha A, et al., 1998). Las bases metabólicas y moleculares del aclaramiento renal de la homocisteína son muy poco conocidas, aunque se sabe que no implican una excreción urinaria importante de homocisteína.
- B) Tratamiento farmacológico: El metotrexate, fenotiazinas, antidepresivos tricíclicos, contraceptivos orales, tuberculostáticos y el trimetoprin inhiben la enzima dihidrofolato reductasa, interfiriendo en la remetilación de la homocisteína. La fenitoína, el fenobarbital, la primidona, la carbamacepina y el ácido valproico también influyen negativamente el metabolismo del ácido fólico. El óxido nítrico empleado como anestésico, inactiva irreversiblemente la enzima metionina sintasa, por lo que induce hiperhomocisteinemia. El azaribine, isoniazida, cicloserina, hidralacina y teofilina son antagonistas de la vitamina B₆.
- C) Enfermedades: anemia perniciosa; hipotiroidismo; leucemia linfoblástica aguda; carcinoma de ovario, mama y páncreas; psoriasis severa.
- D) Edad, Sexo y otros factores: La concentración de homocisteína basal en plasma es mayor en hombres que en mujeres. Después de la menopausia, la concentración de homocisteína se incrementa hasta alcanzar la de los hombres. Estas diferencias en las concentraciones de homocisteína con relación al sexo pueden reflejar el efecto de las hormonas sexuales sobre el metabolismo de la homocisteína y el efecto de una mayor masa muscular en los hombres respecto a las mujeres, ya que alrededor del 75% de la homocisteína se forma junto con la creatinina. El incremento de la homocisteína con la edad podría estar relacionado con una disminución de las concentraciones de las vitaminas necesarias para el metabolismo de la homocisteína, con una disminución del metabolismo renal, así como con otros factores desconocidos. El tabaquismo, la falta de ejercicio y el consumo importante de café tienen un efecto moderado

aumentando la concentración de homocisteína si se dan aislados. Su efecto se potencia cuando se asocian, muy especialmente si ello coincide con un consumo bajo de fólico (Blom HJ, 1998).

1.3. PROPIEDADES ATEROTROMBOTICAS DE LA HOMOCISTEINA.

La homocisteína tiene propiedades aterogénicas y protrombóticas que pueden explicar el riesgo incrementado de enfermedad vascular.

- A) Homocisteína y lípidos: Una acumulación de homocisteína en el cuerpo conduce a una sobreproducción de una forma altamente reactiva de homocisteína que hace que las LDL se agregen (Naruszewics M, et al., 1994). Esta forma reactiva, la homocisteína tiolactona, se forma a partir de metionina en el hígado mediante una enzima que participa en la formación de proteínas y mediante otros procesos peor comprendidos. Los agregados LDL-homocisteína tiolactona son liberados a la sangre desde el hígado. Posteriormente, estos agregados son capturados por los macrófagos de la pared de las arterias, muchos de los cuales derivan de monocitos erráticos de la sangre para formar las células espumosas de las placas ateromatosas tempranas. Estas células espumosas degradan los LDL-homocisteína tiolactona y liberan grasa y colesterol a las placas en desarrollo. Las células espumosas también liberan homocisteína tiolactona en las células que se encuentran alrededor de la pared arterial, lo que afecta al modo en que las células manejan el oxígeno. Como resultado, se acumulan radicales del oxígeno altamente reactivos dentro de las células, que lesionan las células de revestimiento de las arterias, que estimulan la formación de coágulos y producen el crecimiento de las células musculares arteriales que forman tejido fibroso, matriz mucoide y tejido elástico degenerativo (McCully KS, 1996).
- B) Inhibición de la liberación del factor de relajación: La exposición prolongada de las células endoteliales a homocisteína disminuye la producción del factor de relajación, NO (Stamler JS, et al., 1993).
- C) Lesión de las células endoteliales de la pared arterial: La homocisteína produce una agresión sostenida sobre el endotelio que acelera el desarrollo de la trombosis y la ateromatosis (Harker LA, et al., 1974). El efecto tóxico de la

oxidación del grupo sulfhidrilo de la homocisteína sobre las células endoteliales está mediado por la generación de peróxido de hidrógeno *in vitro*. Por ello, la toxicidad de la homocisteína sobre las células desaparece en presencia de catalasa (Stakebaum G y Harlan JM, 1986). Niveles en plasma elevado de moléculas de adhesión celular solubles (ICAM, VCAM) pueden ser detectadas en respuesta a la hiperhomocisteinemia aguda (Nappo F, et al., 1999).

- D) Proliferación de las células musculares lisas: La homocisteína induce una proliferación de éstas células en las lesiones ateromatosas *in vivo* (Harker LA, et al., 1983). Se ha observado que en respuesta a la hiperhomocisteinemia aguda se eleva la presión arterial media y la viscosidad sanguínea (Nappo F, et al., 1999).
- E) Hiperhomocisteinemia y trombosis: El exceso de homocisteína induce inhibición de la antitrombina III, de la síntesis del heparán sulfato, del activador tisular del plasminógeno, de la actividad de la trombomodulina y la actividad anticoagulante de la proteína C; activación del factor V y estimulación de la síntesis de tromboxanos (Córdoba Porras A, et al., 1997).
- F) Agregación plaquetaria: La agregación plaquetaria puede ser secundaria al efecto proagregatorio directo de la homocisteína o al deterioro de la inhibición plaquetaria mediada por el endotelio (Stamler JS, et al., 1993).

1.4. HOMOCISTEINA-ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.

1.4.1. Homocisteína-Accidente cerebrovascular.

Las concentraciones plasmáticas de homocisteína en estado de ayuno son significativamente superiores en los pacientes con accidente cerebrovascular que en los controles (Córdoba Porras A, et al., 1997). La frecuencia de hiperhomocisteinemia en los pacientes con accidente cerebrovascular es independiente del tipo de accidente (infarto aterotrombótico, infarto embólico, infarto lacunar e infarto hemorrágico)(Brattström L, et al., 1992). La relación entre la hiperhomocisteinemia y la enfermedad cerebrovascular se evidencia en los resultados de un metaanálisis que asigna una *odds ratio* de 2,3 a la hiperhomocisteinemia en estado de ayuno. Por cada 5 μmol que aumenten las concentraciones de homocisteína, aumenta la *odds ratio* en 1,9 (Boushey CJ, et al., 1995).

1.4.2. Homocisteína-Enfermedad vascular periférica.

Los estudios que analizan la relación de la enfermedad vascular periférica y las concentraciones de homocisteína indican que es muy frecuente encontrar mayores concentraciones de homocisteína libre o total en situación basal o tras la sobrecarga de metionina en los pacientes que en los controles. Independientemente de los factores de riesgo convencionales para la enfermedad vascular periférica temprana, la hiperhomocisteinemia podría contribuir a la lesión ateromatosa periférica en el 28-50% de los pacientes (Córdoba Porras A, et al., 1997). El riesgo de enfermedad vascular periférica en los pacientes con hiperhomocisteinemia basal es de 6,8 veces superior respecto a los controles (Boushey CJ, et al., 1995).

1.4.3. Homocisteína-enfermedad ateromatosa coronaria.

Se han realizado un cierto número de estudios clínicos encaminados a estudiar la relación de las concentraciones plasmáticas de homocisteína y la enfermedad ateromatosa coronaria. Los resultados indican que los pacientes estudiados con enfermedad ateromatosa coronaria objetivada presentan una concentración de homocisteína en estado de ayuno que es entre 1,13 y 1,32 veces a la observada en los controles (Córdoba Porras A, et al., 1997). En una población con enfermedad ateromatosa coronaria, el riesgo aparente atribuible a la hiperhomocisteinemia es del 10%. Los resultados de un metaanálisis indican una *odds ratio* de 1,8 para la enfermedad ateromatosa coronaria en los individuos con hiperhomocisteinemia. Los incrementos de 5µmol/l de homocisteína, respecto a los controles, aumentan la *odds ratio* en 1,7 (Boushey CJ, et al., 1995).

1.4.4. Homocisteína-trombosis venosa.

La presencia de hiperhomocisteinemia aumenta el riesgo de trombosis venosa de 2 a 3 veces (Den Heijer M, et al., 1995), y es independiente de los factores de riesgo para trombosis, tales como la deficiencia de la proteína C, S o antitrombina o el uso de anticonceptivos orales (Den Heijer M, et al., 1996). Se ha confirmado en un metanálisis (Ray JG, 1998) la existencia de una asociación positiva entre hiperhomocisteinemia basal y un riesgo incrementado de trombosis venosa inicial y recurrente.

2.- OBJETIVOS.

2.1. Planteamiento del Problema.

Una condición fundamental para demostrar que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo cardiovascular depende de evidenciar que su concentración plasmática es mayor en pacientes que en controles (Blanco Vaca F, 1999).

Hay que establecer, además, a partir de qué concentraciones de homocisteína aumenta el riesgo cardiovascular para determinar qué concentraciones son indeseables (Blanco Vaca F, 1999).

2.2. Objetivos del estudio.

- A)** El propósito del presente estudio es conocer las concentraciones plasmáticas de homocisteína en los pacientes con enfermedad arterial coronaria en un grupo de población significativa en la provincia de Santa Cruz de Tenerife.
- B)** Establecer si la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo cardiovascular en la población de estudio.

3.- MATERIAL Y METODOS.

3.1. DESCRIPCION DE LA MUESTRA

3.1.1. Tipo de Diseño.

Diseño de Casos y Controles, con casos incidentes.

3.1.2. Población de estudio.

Pacientes diagnosticados de cardiopatía isquémica coronaria residentes en la zona norte de Tenerife.

3.1.3. Pacientes.

Se incluyeron en el estudio 150 pacientes desde mayo de 1998 a abril de 1999. De estos, 18 eran sujetos controles.

En lo que se refiere a la **RAZA** se controló, introduciendo entre los criterios de inclusión sólo **SUJETOS BLANCOS**. Del mismo modo se controló la **DIABETES**, introduciendo entre los criterios de inclusión sólo **SUJETOS NO DIABETICOS**.

A todos los sujetos del estudio se les **realizó estudio Angiográfico Coronario**.

3.1.4. Criterios de inclusión de los pacientes en el estudio.

Criterios para los CASOS.

La enfermedad arterial coronaria se definió como:

- Antecedentes de infarto de miocardio previo (mayor o igual a 6 meses).
- Síndrome anginoso inestable (vertiente trombogénica).
- Síndrome anginoso de esfuerzo con prueba de sobrecarga isquémica positiva.
- Demostración por angiografía coronaria de lesiones ateromatosas o no, en una o más arterias principales coronarias.

Criterios para los CONTROLES.

AUSENCIA de enfermedad arterial coronaria.

3.1.5. Criterios de exclusión de los pacientes en el estudio.

- Función renal con creatinina mayor de 1,7 mgr/dl.
- Enfermedades hepáticas.
- Patología tiroidea.
- Embarazo.
- Toma de medicación anticonvulsivante, ó cualquier fármaco que interfiera en el metabolismo de la homocisteína.
- Enfermedades psiquiátricas.
- Exposición a óxido nitroso.
- Cualquier enfermedad sistémica aguda o maligna.
- Toma de complejos multivitamínicos

3.2. RECOGIDA DE DATOS.

Los antecedentes cardiovasculares se obtuvieron por medio de un cuestionario contestado por el propio sujeto. Los parámetros evaluados fueron: sexo, edad, talla, peso, profesión, tabaquismo, hipercolesterolemia, hipertensión arterial, hipertrigliceridemia, etilismo, antecedentes familiares para enfermedad arterial coronaria y toma de fármacos (terapia antiisquémica, antiagregantes plaquetarios, anticoagulantes, diuréticos, digitálicos, inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina, antiarrítmicos y otros).

En los **casos** aparte de recoger lo anteriormente enunciado, se evaluó lo siguiente: angina, grado funcional, infarto de miocardio-localización y antecedentes de cirugía coronaria.

3.3. PARAMETROS ANALITICOS.

3.3.1. Determinación de "bioquímica sanguínea".

Todas las muestras de sangre se extrajeron tras 12 horas de ayuno. La determinación de la bioquímica sanguínea se realizó en el Laboratorio Central del Hospital Universitario de Canarias mediante los siguientes métodos:

1. Glucosa por un test enzimático colorimétrico.

2. Colesterol Total y sus diferentes fracciones por un test enzimático colorimétrico.
3. Acido úrico por un test enzimático colorimétrico.
4. Triglicéridos por un test enzimático colorimétrico.
5. BUN y Creatinina por un test enzimático colorimétrico.
6. Apolipoproteína A1 por un test inmunturbidimétrico.

Todas estas determinaciones se realizaron por un analizador "HITACHI" 917 (Boehringer-Mannheim, Alemania).

El fibrinógeno se determinó por un analizador "ACL-FUTURA PLUS", por medio de un test turbidimétrico (coagulométrico).

3.3.2. Determinación de niveles de homocisteína total.

3.3.2.a) Recogida de muestras sanguíneas.

Las muestras de sangre se extrajeron tras 12 horas de ayuno. Posteriormente se realizó la siguiente metodología de trabajo:

1. Extracción de 2 ml de sangre total.
2. Previamente, los tubos con anticoagulantes EDTA-K2, se colocaron en frío (hielo picado).
3. Se colocó la sangre en los tubos y se dejó en el hielo un tiempo no superior a 30 minutos.
4. Luego se centrifugó a 2000 rpm, durante 10-15 minutos.
5. El plasma se recogió con cuidado, de no llevarse las células.
6. Se distribuyó en 2 tubos de Eppendorf, previamente rotulados de acuerdo al "protocolo de trabajo establecido".
7. Por último se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis.

3.3.2.b) Cuantificación de homocisteína total.

La homocisteína se determinó por medio de un inmunoensayo enzimático adaptado a microplacas. Es un método que tiene muy buena correlación con la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Dias, V.C., et al., 1998). La imprecisión intra-inter ensayo es <

6 y 8% respectivamente. Con este método puede ser analizada 82 muestras en un intervalo de tiempo de 2,5 horas aproximadamente (Frantzen F, et al., 1998).

3.3.2.c) "Principios" del análisis.

El test de Homocisteína-Axis es un inmunoensayo enzimático para la determinación de homocisteína total en sangre. La homocisteína ligada a proteínas, la homocistina (homocisteína-homocisteína unida por puentes de disulfuro) y la homocisteína-cisteína (también unida por puentes de disulfuro) es reducida a homocisteína libre por el uso de ditioneitol (DTT). Posteriormente ésta homocisteína es convertida a S-adenosil-L-homocisteína (SAH) por el uso de SAH hidrolasa y exceso de adenosina. Por lo tanto la **homocisteína total de la muestra** es determinada como SAH en un inmunoensayo competitivo con un anticuerpo monoclonal contra la SAH (figura 1) (Frantzen F, et al., 1998).

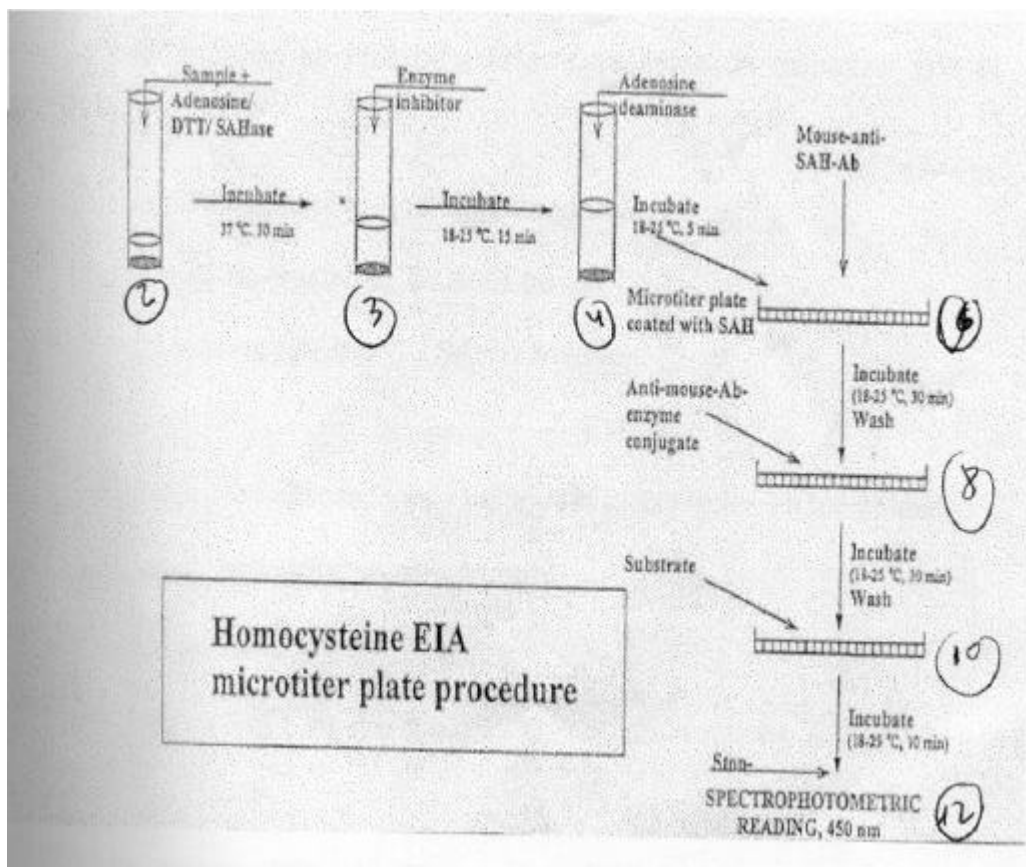


Fig 1. Enzymatic conversion immunoassay for the determination of homocysteine: sketch of the assay procedure. (Frantzen F, Faaren AL, Alfheim I, Nordhei AK. Enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum. Clin Chem 1998; 44: 311-316.)

3.3.2.d) Aspectos metodológicos de la técnica.

Se realizaron los siguientes pasos:

1. Se preparó el SPS (Sample Preparation Solution) para 10 muestras. Esta solución se hizo inmediatamente antes de comenzar con el ensayo:
 - 4,5 ml de reactivo A (fosfato tampón)
 - + 0,25 ml reactivo B (Adenosina/ DTT)
 - + 0,25 ml reactivo C (SAH hidrolasa).
2. Se diluyó los calibradores y las muestras/controles en tubo plástico:
 - 25 µL calibrador/muestra/control.
 - 500 µL SPS
 - Se incubó a 30 minutos a 37°C.
3. Se añadió 500 µL de reactivo D (inhibidor de la enzima). Posteriormente se incubó durante 15 minutos a 18-25 °C.
4. Luego se añadió 500 µL de reactivo E (adenosin deaminasa). Posteriormente se incubó durante 5 minutos a 18-25°C.
5. A continuación, las siguientes reacciones se llevan a cabo en una microplaca de 96 pocillos, cada uno de los cuales lleva "adherido" a sus paredes BSA-SAH (Albúmina sérica bovina-S adenosil homocisteína).
6. Se añadió 200 µL de reactivo F (anticuerpo monoclonal anti-SAH). Se incubó durante 30 minutos a 18-25°C.
7. Se realizó un lavado con una solución tampón 4 X 350 µL.
8. Se añadió 200 µL de reactivo G (enzima conjugada anticuerpo anti-monoclonal). Se incubó durante 30 minutos a 18-25 °C.
9. Se realizó un lavado con una solución tampón 4 X 350 µL.

10. Se añadió 200 µL de reactivo H (Solución sustrato). Se incubó durante 10 minutos a 18-25 °C, con constante agitación.
11. Se añadió 100 µL de reactivo S (ácido sulfúrico 0,8 M).
12. Por último se realizó la medida de absorbancia en un espectrofotómetro para microplaca a 450 nm.

3.3.3. Determinación de la Vitamina B₆.

La determinación de la vitamina B₆ (piridoxal 5' fosfato) se determinó por radioinmunoanálisis en el Laboratorio de Inmunología del Centro Inmunológico de Cataluña.

3.3.4. Determinación del Acido fólico y Vitamina B₁₂.

La determinación de vitamina B₁₂ y ácido fólico se determinó por radioinmunoanálisis, (RIA) de doble marcaje (¹²⁵I y ⁵⁷Co) método suministrado por el DRG (DRG Instruments GmbH, Alemania).

3.4. PROCESAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se llevó a cabo utilizando el programa informático SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 8.0 para Windows (SPSS Inc; Ill). De cada una de las variables consideradas se ha calculado la estadística básica. Las variables continuas se presentan como media ± desviación estandar. Las variables categóricas se presentan como porcentajes. Se practicó el test *De Levene* para comprobar la homogeneidad de las varianzas. Para comprobar si los promedios de dos o más variables son diferentes se ha utilizado el análisis de la varianza (ANOVA). Para determinar la relación de la variable dependiente (homocisteína) con otras variables confundentes se ha realizado una análisis de la covarianza (ANCOVA).

Se practicó análisis de regresión logística múltiple, utilizando como variable dependiente ser caso o control y se controlaron las siguientes variables: hipercolesterolemia, hipertensión arterial, fumador, hipertrigliceridemia, antecedentes

familiares y obesidad. La variable independiente principal fue los niveles de homocisteína. El método de selección de variables fue por paso. Se calcularon la odds ratio y los intervalos de confianza del 95%.

Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

4.- RESULTADOS.

4.1. ANALISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA.

4.1.1. CARACTERÍSTICAS SOCIO-DEMOGRÁFICAS.

4.1.1.A) Edad.

La edad media de los casos fue de $61,72 \pm 10,32$ años y la de los controles fue de $60,94 \pm 12,19$ años. No se observó diferencias significativas entre ambos grupos ($p= 0,76$)

4.1.1.B) Sexo.

Del total de los pacientes en estudio, 42 eran mujeres (31 en los casos y 11 en los controles), y 108 eran varones (101 en los casos y 7 en los controles). Se observaron diferencias significativas entre ambos sexos. Los hombres tuvieron una frecuencia mayor que las mujeres (Tabla I).

Tabla I

VARIABLE	VARONES	MUJERES	P*
Sexo	108 (72%)	42(28%)	0,001

* = significación estadística del contraste de proporciones.

4.1.1.C) Características analíticas entre los casos y controles.

Las características analíticas (incluyendo índice de masa corporal y gramos de alcohol) entre casos y controles se exponen en la tabla II. No hubo diferencias significativas entre los casos y controles.

Tabla II

VARIABLE	CASOS (N=132) $\bar{X} \pm SD$	CONTROLES (N=18) $\bar{X} \pm SD$	P *
IMC** (kg/m ²)	27,88 ± 4,23	27,66 ± 4,51	NS
Gr. de alcohol	7,98 ± 14,99	5,52 ± 9,85	NS
Acido fólico (nmol/l)	4,62 ± 1,97	4,55 ± 1,72	NS
Vitamina B12 (pmol/l)	498,33 ± 275,28	516,97 ± 192,66	NS
Vitamina B6 (nmol/l)	39,39 ± 32,84	41,01 ± 26,28	NS
Glucosa (mg/dl)	97,33 ± 13,23	94,38 ± 11,77	NS
Colesterol (mg/dl)	226,87 ± 49,31	219 ± 49,29	NS
LDL-Colesterol (mg/dl)	145,20 ± 39,50	140,23 ± 45,44	NS
HDL-Colesterol (mg/dl)	41,83 ± 11,12	43,38 ± 10,03	NS
Apolipoproteína A1 (mg/dl)	117,56 ± 22,68	120,38 ± 24,67	NS
Triglicéridos (mg/dl)	199,45 ± 117,36	178,44 ± 94,17	NS
Acido úrico (mg/dl)	6,72 ± 1,69	6,68 ± 1,65	NS
Fibrinógeno (mg/dl)	460,32 ± 131,21	456,11 ± 121,14	NS
Creatinina (mg/dl)	0,93 ± 0,21	0,85 ± 0,20	NS
BUN (mg/dl)	20,46 ± 6,76	21,11 ± 6,12	NS

* = Significación estadística del contraste de medias.

** = Índice de masa corporal.

4.1.1.D) Características clínicas de los casos.

En todos los casos se evaluó los siguientes parámetros clínicos:

- Síndrome anginoso, presencia y tipo.
- Grado funcional según la New York Heart Association (NHYA).
- Infarto de miocardio antiguo (mayor o igual a 6 meses).
- Realización o no de Cirugía Coronaria.
- Número de vasos coronarios epicárdicos afectados.

En la tabla III se expone las distintas frecuencias y porcentajes de los distintos parámetros clínicos.

Tabla III

VARIABLE		FRECUENCIA	PORCENTAJE
Angina	No	2	1,5
	Estable	60	45,5
	Inestable	70	53,0
G.F* NYHA	I	2	1,5
	II	26	19,7
	III	65	49,2
	IV	39	29,5
Infarto Antiguo	NO	87	65,9
	SI	45	34,1
I.Q.**	NO	124	93,9
	SI	8	6,1
Arterias Afectadas	1 Vaso	34	25,8
	2 Vasos	46	34,8
	3 Vasos	52	39,4

GF*: Grado funcional (New York Heart Association (NHYA)).

I.Q.**: Intervención quirúrgica.

4.2.CONTRASTE DE HIPOTESIS.

4.2.1. Análisis univariado de la homocisteína.

La concentración media de los niveles de homocisteína en plasma para los casos fue de 12,30 $\mu\text{mol/l}$, y para los controles de 14,32 $\mu\text{mol/l}$. No hubo diferencias significativas entre los niveles de homocisteína para la población de estudio ($p= 0,37$). (Veáse Tabla IV).

Tabla IV

HOMOCISTEÍNA (X \pm SD; $\mu\text{MOL/L}$)	CASOS	CONTROLES	P*
	(n= 132)	(n= 18)	
	12,30 \pm 8,78	14,32 \pm 10,50	NS

* = Significación estadística del contraste de medias.

4.2.2. Distribución de los niveles de homocisteína por sexo.

La concentración media de los niveles de homocisteína en plasma para las mujeres en los casos fue de 11,96 $\mu\text{mol/l}$ y en los controles de 14,91 $\mu\text{mol/l}$. No hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de homocisteína entre las mujeres de casos y controles ($p= 0,38$). En lo que respecta a los hombres los niveles medios de homocisteína en plasma para los casos fue de 12,40 $\mu\text{mol/l}$ y en los controles de 13,40 $\mu\text{mol/l}$; no existiendo diferencias significativas entre ellos ($p= 0,77$). (Veáse Tabla V)

Tabla V

SEXO	CASOS (N) NIVEL DE HOMOCISTEÍNA (X \pm SD; $\mu\text{MOL/L}$)	CONTROLES (N) NIVEL DE HOMOCISTEÍNA (X \pm SD; $\mu\text{MOL/L}$)	P*
Mujeres	(31) 11,96 \pm 9,44	(11) 14,91 \pm 9,78	NS
Hombres	(101) 12,40 \pm 8,61	(7) 13,40 \pm 12,31	NS

* = Significación estadística del contraste de medias.

4.2.3. Distribución de los niveles de homocisteína por quintiles.

En la distribución entre niveles de homocisteína por quintiles entre casos y controles no se encontró diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,57$).

La cantidad de homocisteína en plasma distribuida por quintiles no parece estar asociada sobre la producción de enfermedad arterial coronaria. (Veáse Tabla VI)

Tabla VI

	1 0,65-4,56 $\mu\text{mol/l}$	2 4,58-7,30 $\mu\text{mol/l}$	3 7,33-13,72 $\mu\text{mol/l}$	4 13,87-21,04 $\mu\text{mol/l}$	5 21,21-35,14 $\mu\text{mol/l}$	P**
Casos % QH* (n)	19,7% (26)	20,5% (27)	21,2% (28)	20,5% (27)	18,2% (24)	0,57
Controles % QH* (n)	22,2% (4)	16,7% (3)	11,1% (2)	16,7% (3)	33,3% (6)	

** = Significación estadística del contraste de proporciones.

* = % de Quintiles de homocisteína.

4.2.4. Factores de riesgo para la enfermedad arterial coronaria

4.2.4. A) Factores de riesgo principales independientes para enfermedad arterial coronaria

Los factores de riesgo principales independientes tales como: tabaquismo, hipertensión arterial e hipercolesterolemia, son variables que no parecen discriminar a los pacientes coronarios. No hubo diferencias significativas entre los diferentes factores de riesgo en los pacientes de estudio. (Veáse Tabla VII).

Tabla VII

VARIABLES	CASOS (132)	CONTROLES (18)	P*
Tabaquismo	27,3% (36)	22,2% (4)	0,12
Hipertensión arterial	32,1% (35)	50% (8)	0,16
Hipercolesterolemia	42,6% (40)	33,3% (5)	0,50

* = Significación estadística del contraste de proporciones.

4.2.4. B) Factores de riesgo predisponentes para enfermedad arterial coronaria.

Entre los factores de riesgo predisponentes tenemos: antecedentes familiares para arteriopatía coronaria y obesidad. Son factores que no parecen discriminar a los pacientes con enfermedad arterial coronaria. No hubo diferencias significativas entre ambos factores de riesgo. (Veáse Tabla VIII).

Tabla VIII.

VARIABLES	CASOS (132)	CONTROLES (18)	P*
Antecedentes familiares			
- Si < 50 años	5,3% (7)	5,6% (1)	0,38
- Si > 50 años	31,1% (41)	16,7% (3)	
- Si < y > 50 años	5,3% (7)	0	
Obesidad:			
- grado I	43,9% (58)	33,3% (6)	0,64
- grado II-III	26,5% (35)	27,8% (5)	

* = Significación estadística del contraste de proporciones.

4.2.4. C) Factor de riesgo condicional para enfermedad arterial coronaria.

En los factores de riesgo condicionales tenemos la hipertrigliceridemia. Es un factor que no discriminó a los pacientes con enfermedad coronaria. No hubo diferencias significativas. (Veáse Tabla IX).

Tabla IX.

VARIABLES	CASOS (132)	CONTROLES (18)	P*
Hipertrigliceridemia	12,2% (15)	16,7% (3)	0,59

* = Significación estadística del contraste de proporciones.

4.3. ANALISIS MULTIVARIADO.

4.3.1) ANALISIS DE REGRESION LOGISTICA.

4.3.1.A) Factores de riesgo principales independientes para enfermedad arterial coronaria.

El análisis de regresión logística para los factores de riesgo de tabaquismo, hipertensión arterial e hipercolesterolemia, mostró que cuando entre ellas se controlaban no existía influencia en la predicción de enfermedad coronaria. (Veáse Tabla X).

Tabla X

VARIABLE	β	ODDS RATIO	INTERVALO DE CONFIANZA (95%)	P *
HTA	0,75	2,13	0,70 - 6,50	NS
Hipercolesterolemia	-0,74	0,47	0,13 - 1,62	NS
Tabaquismo	-0,79	0,45	0,12 - 1,62	NS

* Significación estadística de los estimadores de riesgo.

4.3.1.B) Factores de riesgo predisponentes para enfermedad arterial coronaria.

En el análisis de regresión logística para los antecedentes familiares de arteriopatía coronaria y obesidad, tampoco existió influencia sobre la predicción de enfermedad coronaria, cuando se introducían en el modelo. (Veáse Tabla XI).

Tabla XI

VARIABLE	β	ODDS RATIO	INTERVALO DE CONFIANZA (95%)	P *
AF* < 50 años	-0,25	0,77	0,08 - 6,89	NS
AF* > 50 años	-0,93	0,39	0,10 - 1,46	NS
Obesidad grado I	-0,64	0,52	0,16 - 1,69	NS
Obesidad grado II-III	-0,28	0,75	0,21 - 2,63	NS

* Significación estadística de los estimadores de riesgo.

AF*: Antecedentes familiares.

4.3.1.C) Factor de riesgo condicional para enfermedad arterial coronaria.

En el análisis de regresión logística para la variable hipertrigliceridemia, no se asoció con la enfermedad coronaria. (Veáse Tabla XII).

Tabla XII

VARIABLE	β	ODDS RATIO	INTERVALO DE CONFIANZA (95%)	P *
Hipertrigliceridemia	0,36	1,44	0,37 - 5,56	NS

* Significación estadística de los estimadores de riesgo.

4.3.1) ANALISIS DE REGRESION LOGISTICA PARA MODELO FINAL.

El análisis de regresión logística de los factores de riesgo principales independientes, comparado con los quintiles de homocisteína no demostró evidencia de una asociación significativa.

VARIABLE	β	ODDS RATIO	INTERVALO DE CONFIANZA (95%)	P *	
HTA	0,65	1,92	0,63 - 5,83	NS	
Hipercolesterolemia	-0,36	0,69	0,20 - 2,30	NS	
Tabaquismo	-0,70	0,49	0,13 - 1,76	NS	
Homocisteína	Quintil 2	-0,50	0,60	0,11 - 3,09	NS
	Quintil 3	-0,74	0,47	0,07 - 2,92	NS
	Quintil 4	-0,38	0,67	0,13 - 3,51	NS
	Quintil 5	0,51	1,67	0,39 - 7,03	NS

* Significación estadística de los estimadores de riesgo.

5.- DISCUSION.

La homocistinuria es un trastorno genético autosómico recesivo raro ($\approx 1:200.000$ nacimientos), que suele obedecer a actividad defectuosa de la cistationina β -sintetasa. Los pacientes presentan hiperhomocisteinemia severa y diversas anomalías, con una alta incidencia de patología vascular que puede provocar muerte prematura por infarto de miocardio, accidente cerebrovascular o embolia pulmonar (Mudd SH, et al., 1995). Estudios bioquímicos y patológicos en niños homocistinúricos llevaron a McCully y Wilson (McCully KS, Wilson RB, 1975) a proponer que una homocisteína sanguínea elevada puede causar ateromatosis. Observaciones de ≈ 80 estudios clínicos y epidemiológicos han sugerido que el aumento de homocisteína es un factor de riesgo de enfermedad vascular ateromatosa y de tromboembolismo arterial y venoso (Refsum H, et al., 1998). Por ello, y en base a evidencias previas, hemos planteado nuestro trabajo bajo la hipótesis de que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo cardiovascular relevante en los pacientes diagnosticados de cardiopatía isquémica residentes en la zona norte de Tenerife.

5.1. ASOCIACION DE LA HOMOCISTEINA CON ATEROMATOSIS Y TROMBOSIS.

Como es bien sabido, las enfermedades cardiovasculares de origen ateromatosis (infarto de miocardio, angina de pecho, enfermedad vascular periférica, accidente vascular cerebral y tromboembolismo venoso) son causas muy relevantes de morbimortalidad. En contra de lo que pudiera esperarse, durante las décadas de los setenta y ochenta, pocos investigadores se interesaron por la hiperhomocisteinemia como factor de riesgo cardiovascular. Sin embargo, los estudios sobre este tema en la década de los 90 han ido aumentando de forma exponencial, en buena parte por la consistencia de los resultados positivos que asocian hiperhomocisteinemia y enfermedad cardiovascular (Blanco Vaca F, 1999).

La demostración de que una alteración metabólica sea causa enfermedad cardiovascular requiere del resultado positivo de diversas aproximaciones, y que haya algún

modelo de enfermedad hereditaria que, aunque poco frecuente, apoye la relación causa-efecto entre la alteración metabólica y la enfermedad (Blanco Vaca F, 1999).

La homocisteína presenta una gran variedad de efectos, entre ellos tenemos: lesión directa de las células endoteliales, la actividad plaquetaria defectuosa, la elevación de la actividad procoagulante, el aumento de la síntesis de colágeno y el incremento de la proliferación de miocitos lisos. Asimismo desde el punto de vista bioquímico se ha propuesto que modifica el metabolismo de los eicosanoides, promueve la translocación de la PKC (proteína kinasa C) del núcleo de la célula y del citoplasma a las membranas celulares, e induce la actividad de *c-fos* y *c-myb* (Dalton ML, et al., 1997). Muchas de estas observaciones se relacionan con la patogenia de las enfermedades cardiovasculares. No obstante, al analizar los resultados de diferentes estudios la atención general se dirige a desvelar si los efectos son específicos de la homocisteína, y si se producen con las concentraciones que se encuentran en la mayoría de los pacientes cardiovasculares.

Los experimentos *in vitro* se realizan habitualmente con concentraciones de homocisteína $\geq 100 \mu\text{mol/L}$, niveles que sólo se encuentran en los raros individuos homocigotos para el déficit de la cistationina β -sintetasa. Además, los resultados se comparan con los obtenidos en tejidos suspendidos en un tampón libre de homocisteína, una concentración que jamás se observa *in vivo*. En los estudios realizados con animales no se han obtenido pruebas experimentales que indiquen que un aumento moderado de la homocisteína sea una "causa de ateromatosis".

En los estudios epidemiológicos en los que se demuestra la existencia de una correlación significativa entre los niveles de homocisteína y las enfermedades cardiovasculares tienden a informar de que las concentraciones de homocisteína en los pacientes son de ≈ 11 a $16 \mu\text{mol/L}$, sólo $\approx 3 \mu\text{mol/L}$ mayores que las del grupo control correspondiente (Kuller y Evans, 1998).

Existen múltiples trabajos, clínicos y de investigación animal, que correlacionan el aumento de homocisteína en sangre con un riesgo elevado de ateromatosis y trombosis, aunque, como en toda situación médica, existan autores que opinen lo contrario.

Un metaanálisis de 27 estudios observacionales con ≈ 4000 pacientes, (estudios transversales y retrospectivos casos-contróles) que relaciona la homocisteína con la enfermedad vascular ateromatosa (Boushey CJ, et al., 1995), indicó que la *odds ratio* de

enfermedad coronaria en sujetos con hiperhomocisteinemia era de 1,7 (intervalo de confianza del 95%: 1,5-1,9). Así mismo los incrementos de 5 $\mu\text{mol/L}$ de homocisteína, respecto a los controles, aumentan la *odds ratio* de la misma forma que lo harían 0,5 mmol/L (20 mg/dl) de colesterol (Boushey CJ, et al., 1995). Desde este metaanálisis, 22 publicaciones que abarcan 7800 sujetos, incluidos 9 estudios transversales y 13 de caso-controlado, analizados por Refsum y colaboradores (Refsum H, et al., 1998), han aportado evidencia adicional de una relación entre homocisteína y ateromatosis coronaria, cerebral y periférica. En este período, sólo 2 estudios transversales (Herzlich BC, et al., 1996; Munshi MN, et al., 1996) y 2 estudios caso-control (Malinow MR, et al.,1996; Valentine RJ, et al.,1996) con 850 sujetos no mostraron una asociación entre homocisteína y ateromatosis; estos estudios incorporaron a pacientes que cursaban la fase aguda de un infarto de miocardio o de un accidente cerebrovascular, situación en la que descienden los niveles de homocisteína (Lindgren A, et al.,1995; Landgren F, et al., 1995).

El riesgo de enfermedad coronaria mostró un efecto dosis-respuesta a través de toda la distribución de los niveles de homocisteína basales (Boushey CJ, et al.,1995; Arnesen E, et al.,1995; Malinow MR, et al.,1996; Graham IM, et al.,1997) y postcarga de metionina (Graham IM, et al.,1997), y este efecto fue estadísticamente independiente de la mayor parte de los factores convencionales de ateromatosis (Refsum H, et al.,1998; Arnesen E, et al.,1995; Graham IM, et al.,1997; Genest JJ Jr, et al.,1990), aunque se ha publicado una interacción multiplicativa con tabaquismo y presión arterial (Graham IM, et al.,1997). Además, un estudio (Nygard O, et al.,1997) demostró que el riesgo de muerte de 587 hombres y mujeres con enfermedad coronaria estaba altamente correlacionado con los niveles basales de homocisteína; después de una mediana de seguimiento de 4,6 años, la estimación de mortalidad para sujetos con homocisteína $\geq 15,0 \mu\text{mol/L}$ fue del 24,7%, mientras que fue del 3,8% en los casos con homocisteína $< 9,0 \mu\text{mol/L}$.

Los estudios de casos y controles demuestran asociaciones, no causalidad. La forma idónea para establecer la relación causa-efecto entre hiperhomocisteinemia y enfermedad cardiovascular en la población general es mediante estudios prospectivos.

5.2. HOMOCISTEINA Y ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA.

En nuestro estudio, no se observaron diferencias significativas entre los niveles de homocisteína entre los pacientes y controles. Asimismo no se encontraron diferencias significativas al comparar los valores de homocisteína de ambos sexos ni en los pacientes ni en los controles. Los resultados difieren claramente de los obtenidos en numerosos estudios retrospectivos de casos y controles en los que se demostró que las concentraciones de homocisteína eran superiores en los pacientes con infarto de miocardio y enfermedad coronaria que en los sujetos de control (Boushey CJ, et al., 1995).

Es posible que las asociaciones encontradas entre los estudios retrospectivos con casos y controles puedan atribuirse a elevaciones de las concentraciones de homocisteína producidas tras un infarto de miocardio u otras enfermedades vasculares agudas. De esta forma, el hecho de encontrar concentraciones de homocisteína superiores en los pacientes caso que en los sujetos de control podría deberse a la enfermedad (infarto de miocardio) o a una enfermedad vascular subyacente (p. Ej., ateromatosis) en lugar de una causa de infarto de miocardio o de enfermedad vascular. Los estudios prospectivos tenderían a reducir al mínimo este posible sesgo asociado a los estudios de casos y controles.

Egerton y colaboradores (Egerton W, et al., 1996) midieron los valores de homocisteína en sangre en el momento del infarto agudo de miocardio y hasta 180 días después del infarto. Las concentraciones de homocisteína fueron de $12,9 \pm 0,9 \mu\text{mol/L}$ el día del infarto de miocardio y del $15,3 \pm 1,1 \mu\text{mol/L}$ ($p=0,05$) 180 días después del infarto. Los cambios del nivel de homocisteína entre los días 1 y 180 fueron tan grandes como las diferencias entre los niveles de homocisteína observadas en muchos estudios de casos y controles.

Los resultados de nuestro estudio son compatibles con los obtenidos en 4 estudios prospectivos, en la que no demostraron asociación entre niveles de homocisteína y enfermedad arterial coronaria (Folsom AR, et al., 1998; Verhoef P, et al., 1997; Evans RW, et al., 1997; Alfthan G, et al., 1994) (Tabla I).

Tabla I.

Estudio	C/c	"Endpoints"	HCY ($\mu\text{mol/l}$) (C/c)	OR (95%IC)
Folsom (1998)	232/537	IM.	8,9/8,5	1,28(0,5-3,2)
Verhoef (1997)	149/149	Angina, CABG	10,9/10,4	1,0(0,4-2,4)
Evans (1997)	240/472	IM. Muerte C.	12,6/13,1	0,82(0,5-5,4)
Alfthan (1994)	265/269	IM	9,9/9,8	1,05(0,5-1,9)

C/c: Casos/Controles

HCY: homocisteína ($\mu\text{mol/L}$).

OR: Odds Ratio (Intervalo de confianza 95%).

IM.: Infarto de miocardio.

CABG: Cirugía de Revasc. Coronaria

Muerte C. : Muerte origen Cardíaco.

5.3. LA HOMOCISTEINA COMO FACTOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR.

Se ha extendido el concepto de que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo cardiovascular independiente del resto de factores de riesgo cardiovascular "clásicos" (Blanco Vaca F, 1999).

En los últimos 2-3 años han ido apareciendo los resultados de diferentes estudios prospectivos. A mediados del año 1999 de los 11 estudios prospectivos que habían investigado el papel del aumento de la homocisteína en el riesgo cardiovascular de muestras de la población general, sólo seis encontraron asociación entre ambas variables (Hankey GJ. y Eikelboom JW, 1999). Incluso, en estos seis estudios el riesgo relativo conferido por la hiperhomocisteinemia era sustancialmente menor al calculado a partir de estudios de casos y controles. Ello, junto a los resultados negativos de los estudios sobre el polimorfismo T677 de la MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa) (Schwartz SM, et al.,1997; Wilcken DE, et al.,1996; Ma J, et al.,1996; Folsom AR, et al., 1998), ha

generado serias dudas sobre si la hiperhomocisteinemia moderada es un factor de riesgo cardiovascular en la población general.

Según Grundy y colaboradores (Grundy SM, et al., 1999) dividen a los factores de riesgo para enfermedad arterial coronaria en tres tipos: Factores de Riesgos Principales Independientes, Factores de Riesgos Predisponentes y Factores de Riesgos condicionales (Tabla II, III y IV).

Tabla II

FACTORES DE RIESGOS PRINCIPALES INDEPENDIENTES
Fumador
Hipertension arterial
Colesterol total y LDL elevado
Colesterol HDL disminuido
Diabetes mellitus
Edad avanzada

Tabla III.

FACTORES DE RIESGOS PREDISPONENTES
Obesidad
Inactividad física
Antecedentes familiares para cardiopatía isquémica coronaria
Características étnicas
Factores psicosociales

Tabla IV

FACTORES DE RIESGOS CONDICIONALES
Hipertrigliceridemia
Partículas LDL pequeñas
<i>HOMOCISTEINA EN SUERO ELEVADA.</i>
Lpa elevada
Factores protrombóticos (por ej. Fibrinógeno)
Marcadores inflamatorios (por ej. Proteína C-reactiva)

CONCLUSIONES.

Las conclusiones que se derivan del presente estudio pueden sintetizarse en los siguientes puntos:

1. Se comprueba **que *no existe diferencia significativa*** entre los niveles plasmáticos de **homocisteína entre los pacientes y controles en un grupo de población de la provincia de Santa Cruz de Tenerife.**
2. Los resultados de nuestra población de estudio **no sustenta la hipótesis de que el aumento de los niveles séricos de homocisteína sea *factor de riesgo independiente* para enfermedad arterial coronaria.**
3. En la actualidad ***no hay pruebas firmes*** de que las concentraciones en sangre de homocisteína guarden relación con el nivel de ateromatosis en la población.
4. Ante estos hallazgos y los de otros autores, y en **ausencia** de un estudio controlado de intervención clínica, ***es prematuro concluir que los niveles de homocisteína predicen la aparición de enfermedad arterial coronaria.***

BIBLIOGRAFIA.

ALFTHAN G, PEKKANEN J, JAUHAINEN M, PITKANIEMI J, KARVONEN M, TUOMILEHTO J, SALONEN JT, EHNHOLM C. (1994): Relation of serum homocysteine and lipoprotein concentrations to atherosclerotic disease in a prospective Finnish population based study. *Atherosclerosis* **106**: 9-19.

ARNESEN E, REFSUM H, BONAA KH, UELAND PM, FORDE OH, NORDREHAUNG JE. (1995) Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* **24**:704-709.

BLANCO VACA F. (1999) Hiperhomocisteinemia: ¿un factor de riesgo cardiovascular?. *Atherosclerosis (edición española)* **1**: 7-11.

BLOM HJ. (1998) Determinants of plasma homocysteine. *Am J Clin Nutr* **67**: 188-189.

BOSTOM AG, SHEMIN D, VERHOEF P, NADEAU MR, JACQUES PF, SELHUB J, DWORKIN L, ROSENBERG IH. (1997) Elevated fasting total plasma homocysteine levels and cardiovascular disease outcomes in maintenance dialysis patients. A prospective study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 2554-2558.

BOUSHEY CJ, BERESFORD SAA, OMENN GS, MOTULSKY AG. (1995) A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* **274**: 1049-1057.

BRATTSTRÖM L, LINDGREN A, ISRAELSSON B, MALINOW MR, NORRVING B, UPSON B ET AL. (1992) Hyperhomocysteinemia in stroke: prevalence, cause, and relationships to type of stroke and stroke risk factors. *Eur J Clin Invest* **22**: 214-221.

CÓRDOBA PORRAS A, BLANCO VACA F, GONZÁLEZ SASTRE F. (1997) Hiperhomocisteinemia, un nuevo marcador de riesgo vascular: territorios vasculares

afectados, papel en la patogénesis de la arteriosclerosis y la trombosis y tratamiento. *Med Clin* **109**: 715-725.

DALTON ML, GADSON PF JR, WRENN RW, ROSENQUIST TH. (1997) Homocysteine signal cascade: production of phospholipids, activation of protein kinase C, and the induction of c-fos and c-myc in smooth muscle cells. *FASEB J.* **11**: 703-711.

DEN HEIJER M, BLOM HJ, GERRITS WBJ, ROSENDAAL FR, HAAK HL, WIJERMANS PW ET AL. (1995) Is hyperhomocysteinemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? *Lancet* **345**: 882-885.

DEN HEIJER M, KOSTER T, BLOM HJ, BOS GM, BRIET E, REISTMA PH ET AL. (1996) Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* **334**: 759-762.

DIAS, V.C., BAMFORTH, F.J., TESANOVIC, M, HYNDANAN, M.E., PARSONS, H.G. AND CEMBROWSKI, G.S. (1998). Evaluation and intermethod comparison of the Biorad HPLC method for plasma total homocysteine. *Clin. Chem.* **44(10)**: 2199-2201.

DUDMAN NP, WILCKEN DE, WANG J, LYNCH JF, MACEY D, LUNDBERG P. DISORDERED. (1993) Methionine/homocysteine metabolism in premature vascular disease: its occurrence, cofactor therapy, and enzymology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **12**: 1253-60.

EGERTON W, SILBERBERG J, CROOKS R, RAY C, DUDMAN N. (1996) Serial measures of plasma homocysteine after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* **77**: 759-761.

EVANS RW, SHATEN BJ, HEMPEL JD, CUTLER JA, KULLER LH. (1997) Homocysteine and risk of cardiovascular disease in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **17**: 1947-1953.

FINKELSTEIN JD. (1990) Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* **1**: 228-237.

FOLSOM AR, NIETO FJ, MCGOVERN PG, TSAI MY, MALINOW MR, ECKFELDT JH, HESS DL, DAVIS CE. (1998) Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphism, and B vitamins: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation*. **98**: 204-210.

FRANTZEN F, FAAREN AL, ALFHEIM I, NORDHEI AK. (1998) Enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum. *Clin Chem* **44**: 311-316.

FROSST P, BLOM HJ, MILOS R, GOYETE P, SHEPPARD CA, MATTHEWS RG, VAN DE HEUVEL LP, ROZEN R. (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet* **10**: 111-113.

GENEST JJ JR, MCNAMARA JR, SALEM DN, WILSON PW, SCHAEFER EJ, MALINOW MR. (1990) Plasma homocysteine levels in men with premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. **16**:1114-1119.

GRAHAM IM, DALY LE, REFSUM HM, ROBINSON K, BRATTSTROM LE, UELAND PM, PALMA-REIS RJ, BOERS GH, SHEAHAN RG, ISRAELSSON B, UITERWAAL CS, MELEADY R, MCMASTER D, VERHOEF P, WITTEMAN J, RUBBA P, BELLET H, WAUTRECHT JC, DE VALK HW, SALES LUIS AC, PARROT-ROULAUD FM, TAN KS, HIGGINS I, GARCON D, ANDRIA G, MEDRANO MJ, CANDITO M, EVANS A. (1997) Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: the European Concerted Action Project. *JAMA*. **277**:1775-1781.

GRUNDY SM, PASTERNAK R, GREENLAND P, SMITH JR S, FUSTER V. (1999) Assessment of Cardiovascular Risk by Use of Multiple-Risk-Factor Assessment Equations. A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association and the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol* **34**: 1348-59.

GUTTORMSEN AB, SCHEEDE J, FISKERSTRAND T, UELAND PM, REFSUM HM. (1994) Plasma concentrations of homocysteine and other aminothiol compounds are related to food intake in healthy human subjects. *J Nutr* **124**: 1934-41.

HANKEY GJ, EIKELBOOM JW. (1999) Homocysteine and vascular disease. *Lancet* **354**: 407-13.

HARKER LA, HARLAN JM, ROSS R. (1983) Effect of sulfinpyrazone on homocysteine-induced endothelial injury and atherosclerosis in baboons. *Circ Res* **53**: 731-739.

HARKER LA, SLICHTER SJ, SCOTT CR, ROSS R. (1974) Homocysteinemia: vascular injury and arterial thrombosis. *N Engl J Med* **291**: 537-543.

HERZLICH BC, LICHSTEIN E, SCHULHOFF N, WEINSTOCK M, PAGALA M, RAVINDRAN K, NAMBA T, NIETO FJ, STABLER SP, ALLEN RH, MALINOW MR. (1996) Relationship among homocysteine, vitamin B-12 and cardiac disease in the elderly: association between vitamin B-12 deficiency and decreased left ventricle ejection fraction. *J Nutr*. **126**:1249S-1253S.

KANG SS, WONG PWK, NORUSIS M. (1987) Homocysteinaemia due to folate deficiency. *Metabolism* **36**: 458-62.

KULLER LH, EVANS RW. (1998) Homocysteine, Vitamins, and Cardiovascular Disease. *Circulation*. **98**: 196-199.

LANDGREN F, ISRAELSSON B, LINDGREN A, HULTBERG B, ANDERSSON A, BRATTSTROM L. (1995) Plasma homocysteine in acute myocardial infarction: homocysteine-lowering effect of folic acid. *J Intern Med.* **237**:381-388.

LEHRINGER AL, NELSON DL, COX MN. (1993) Principios de Bioquímica (2^a ed.). Barcelona: Omea.

LINDGREN A, BRATTSTROM L, NORRVING B, HULTBERG B, ANDERSSON A, JOHANSSON BB. (1995) Plasma homocysteine in the acute and convalescent phases after stroke. *Stroke.* **26**:795-800.

MA J, STAMPFER MJ, HENNEKENS CH, FROSST P, SELHUB J, HORSFORD J, MALINOW MR, WILLET WC, ROZEN R. (1996) Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation.* **94**: 2410-2416.

MALINOW MR, DUCIMETIERE P, LUC G, EVANS AE, ARVELIER D, CAMBIEN F, UPSON BM. (1996) Plasma homocysteine levels and graded risk for myocardial infarction: findings in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. *Atherosclerosis.* **126**:27-34.

MALINOW MR, DUELL PB, HESS DL, ET AL. (1998) Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary heart disease. *N Engl J Med* **338**: 1009-15.

MALINOW MR, NIETO FJ, KRUGER WD, ET AL. (1997) The effects of folic acid supplementation on plasma total homocysteine are modulated by multivitamin use and methylenetetrahydrofolate reductase genotypes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 1157-62.

MCCULLY KS. (1996) Homocysteine and vascular disease. *Nat Med* **2**: 386-89.

MCCULLY KS. (1969) Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* **56**: 111-128.

MCCULLY KS, WILSON RB. (1975) Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis*. **22**: 215-227.

MOUSTAPHA A, NASO A, NAHLAWI M, GUPTA A, ARHEART KL, JACOBSEN DW, ROBINSON K, DENNIS VW. (1998) Prospective study of hiperhomocysteinemia as and adverse cardiovascular risk factor in end-stage renal disease. *Circulation* **97**: 138-141.

MUDD SH, EBERT MH, SCHRIVER CR. (1980) Labile methyl group balances in the human the role of sarcosine. *Metabolism* **29**: 707-720.

MUDD SH, LEVY HL, SKOVBY F. (1995) Disorders of transsulfuration. En : Scriver CR, Beadet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic Molecular Bases of inherited diseases*. New York, NY: McGraw-Hill Inc, 1279-1327.

MUDD SH, POOLE JR. (1975) Labile methyl balances for normal humans on varios dietary regimens, *Metabolism* **24**: 721-735.

MUDD SH, SKOVBY F, LEVY HL, ET AL. (1985) The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* **37**: 1-31.

MUNSHI MN, STONE A, FINK L, FONSECA V. (1996) Hypermocysteinemia following a methionine load in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and macrovascular disease. *Metabolism*. **45**:133-135.

NAPPO F, DE ROSA N, MARFELLA R, ET AL. (1999) Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. *JAMA* **281**: 2113-2118.

NARUSZEWICZ M, MIRKIEWICZ E, OLSZEWSKI AJ, MCCULLY KS. (1994)
Thiolation of low-density lipoproteins by homocysteine thiolactone causes increased aggregation and altered interaction with cultured macrophages. *Nutrition, Metabol Cardiovasc Dis* **4**: 70-77.

NYGARD O, NORDREHAUG JE, REFSUM H, UELAND PM, FARSTAD M, VOLLSET SE. (1997) Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* **337**:230-236.

OGIER DE BAULNY H, GERARD M, SAUDUBRAY JM, ZITTOUN J. (1998)
Remethylation defects: guidelines for clinical diagnosis and treatment. *Eur J Pediatr* **157** (suppl 2): S77-S83.

RAY JG. (1998) Meta-analysis of hyperhomocysteinemia as a risk factor for venous thromboembolic disease. *Arch Intern Med* **158**: 2101-16.

REFSUM H, FISKERSTRAND T, GUTTORMSEN AB, UELAND PM. (1997)
Assessment of homocysteine status. *J Inherit Metab Dis* **20**: 286-94.

REFSUM H, UELAND PM, NYGARD O, VOLLSET SE. (1998) Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med.* **49**: 31-62.

SCHWARTZ SM, SISCOVICK DS, MALINOW MR, ROSENDAAL FR, BEVERLY RK, HESS DL, PSATY BM, LONGSTRETH WT JR, KOEPESELL TD, RAGHUNATHAN TE, REITSMA PH. (1997) Myocardial infarction in young women in relation to plasma homocysteine, folate, and a common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Circulation.* **96**: 412-417.

SELHUB J, JACQUES PF, WILSON PW, RUSH D, ROSENBERG IH. (1993)
Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinaemia in an elderly population. *JAMA* **270**: 2693-98.

SHIPCHANDLER MT, MOORE EG. (1995) Rapid fully automated measurement of plasma homocysteine with the Abbott Imx Analyzer. *Clin Chem* **41**: 991-994.

STAKEBAUM G, HARLAN JM.(1986) Endothelial cell injury due to copper-catalized hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* **77**: 1370-1376.

STAMLER JS, OSBORNE JA, JARAKI O, RABBANI LE, MULLINS M, SINGEL D ET AL.(1993) Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* **91**: 308-318.

STILL RA, MCDOWELL IF. (1998) Clinical implications of plasma homocysteine measurement in cardiovascular disease. *J Clin Pathol* **51**: 183-88.

UELAND PM. (1995) Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem* **41**: 340-42.

UELAND PM, REFSUM H, STABLER SP, MALINOW MR, ANDERSSON A, ALLEN RH. (1993) Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* **39**: 1764-1779.

VALENTINE RJ, KAPLAN HS, GREEN R, JACOBSEN DW, MYERS SI, CLAGETT GP. (1996) Lipoproteina, homocysteine, and hypercoagulable states in young men with premature peripheral atherosclerosis: a prospective, controlled analysis. *J Vasc Surg.* **23**:53-63.

VERHOEF P, HENNEKENS CH, ALLEN RH, STABLER SP, WILLETT WC, STAMPFER MJ. (1997) Plasma total homocysteine and risk of angina pectoris with subsequent coronary artery bypass surgery. *Am J Cardiol.* **79**: 799-801.

WILCKEN DE, WANG XL, SIM AS, MCCREDIE RM. (1996)Distribution in healthy and coronary populations of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **16**: 878-882.

WILCKEN DEL, WILCKEN B. (1976)The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest* **57**: 1079-1082.