

Determinación de homocisteína en plasma: metabolismo, metodología, interpretación de resultados y papel en la evaluación del riesgo vascular

F Blanco Vaca¹, R Deulofeu², M^a A Vilaseca³, P Chacon⁴, E Dulín⁵.
Grupo de trabajo sobre hiperhomocisteinemia moderada, de la SEQC

Resumen

Actualmente está bien establecido que la hiperhomocisteinemia moderada es un factor de riesgo de patología vascular cardíaca, cerebral y periférica.

Un aspecto importante es que se trata de un factor de riesgo fácilmente modificable mediante un tratamiento aparentemente seguro, barato y eficaz como la asociación de ácido fólico y vitaminas B₁₂ y B₆. La mayor disponibilidad de su determinación, al alcance en cualquier laboratorio de tamaño medio, comporta la necesidad de establecer las bases de su uso racional en la práctica clínica.

En esta revisión se analizan tanto los aspectos básicos del metabolismo de la homocisteína, así como su relación con dos aspectos fundamentales para la salud, como son nutrición y genética.

Los aspectos analíticos de la determinación de homocisteína empiezan a ser resueltos gracias a la reciente disponibilidad del enzoinmunoanálisis. Ello evitará la dispersión de resultados, propios de la proliferación de los métodos desarrollados en los diferentes laboratorios, que incluyen una gran diversidad de procedimientos y calibradores, y pese a que han sido la base de los estudios realizados hasta el presente, tienen el inconveniente de dificultar la transferibilidad de resultados. Aunque en nuestro país todavía no existen estudios epidemiológicos suficientemente amplios, se acepta ampliamente la evidencia de que el aumento de homocisteína plasmática total es un factor de riesgo asociado a la enfermedad vascular, a través de su papel promotor de aterotrombosis. De hecho, la gran mayoría de los estudios realizados hallan una mayor prevalencia de hiperhomocisteinemia en los pacientes vasculares que en los controles. El valor de corte (cut-off) más ampliamente aceptado es una concentración plasmática superior a 15 µmol/L y en algunas circunstancias puede ser aconsejable el tratamiento de ésta. Una recomendación de intervención más generalizada sólo será procedente cuando se obtengan los resultados de los estudios de intervención que se están realizando. Recientemente se ha demostrado que la hiperhomocisteinemia es también un factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer, observación que también comporta nuevas posibilidades de tratamiento. Todo ello, junto al aumento de edad de nuestra población, probablemente redundará en una mayor necesidad de control de la homocisteinemia y por tanto, de su determinación e interpretación por parte del bioquímico clínico (que también requerirá del análisis de creatinina, folatos, vitamina B₁₂ y TSH, sin olvidar otros factores de riesgo cardiovascular).

Summary

At present it is well established that moderate hyperhomocysteinemia is a risk factor for vascular disease either cardiac, cerebrovascular or peripheral.

An important aspect is that this risk factor is easily modifiable by means of a supposedly safe, cheap and efficient treatment with folic acid and vitamins B₁₂ and B₆.

The expanding possibility to measure this analyte in any middle size clinical chemistry laboratory stresses the need to establish the fundamentals for its rational use in clinical practice.

In this review we address homocysteine basic metabolic aspects as well as its relationship with two basic aspects for human health: nutrition and genetics.

Nowadays analytical aspects begin to be solved mainly due to the recent availability of enzymeimmunoassay based methods. This will reduce results dispersion due to diversity of methods and calibrators used in home developed methods.

Despite the fact that those methods had been the ones used in all studies carried out up to now they do affect results transferability between centers.

Although in our country there is a lack for large epidemiological studies, general evidence support the fact that elevated plasma total homocysteine concentrations are a risk factor associated to vascular disease through its role on promoting atherosclerosis and thrombosis. In fact a great majority of studies show a higher prevalence of hyperhomocysteinemia among vascular patients than in controls. The cut-off value of 15 µmol/L is the most widely accepted and in this case treatment should be considered. A more extensive recommendation for treatment will appear in agreement to the results obtained at the end of large intervention studies.

On the other side recently has been shown that hyperhomocysteinemia is also a risk factor associated to Alzheimer disease, an observation that also includes treatment possibilities. Taken altogether and the increase in mean age of our population will result in an increased need for homocysteine control, and hence its measurement and interpretation by the clinical chemist, which also requires assessment of creatinine, thyroid hormones, folic acid and B₁₂ status as well as other clinical vascular risk factors.

Palabras clave: homocisteína, factores de riesgo, aterosclerosis, enfermedad vascular

Servicios de Bioquímica de 1Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona;
2Hospital Clínic i Provincial, Barcelona; 3Hospital Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat; 4Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona; 5Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid
Recibido: 3-4-02
Aceptado: 27-6-02

Introducción

El interés por la homocisteína y su metabolismo comenzó hace unos 40 años cuando se describió un grupo de pacientes que presentaban un síndrome hereditario caracterizado por una extraordinaria elevación de la concentración de homocisteína en plasma superior a 100 $\mu\text{mol/L}$ y un aumento en la excreción urinaria del homodímero de homocisteína u homocistina. De ahí que el síndrome fuera denominado como homocistinuria (1). El cuadro clínico de estos pacientes se caracteriza por luxación del cristalino, signos y síntomas derivados de afectación ósea y neurológica y trombosis en venas y arterias de todos los calibres, que causan la muerte al 50% de estos pacientes antes de los 30 años de edad en ausencia de tratamiento (2). Luego, se identificó uno de los defectos moleculares responsable de la homocistinuria. Se trata del déficit de la enzima cistationina β -sintasa (C β S) (EC 4.2.1.22), que origina la forma de homocistinuria más frecuente en la población y que se suele denominar «clásica». Otros defectos enzimáticos, que fueron descritos con posterioridad, también causan a la vez hiperhomocisteinemia severa, homocistinuria y arteriosclerosis y trombosis en arterias y venas de diferentes tamaños. Estas observaciones condujeron a McCully y Wilson (3) a postular la existencia de una relación causal entre el aumento de la concentración de homocisteína plasmática y la enfermedad cardiovascular aterotrombótica, incluso en casos en que la hiperhomocisteinemia fuera moderada. Desde entonces, un gran número de estudios han demostrado que la elevación moderada de la concentración de homocisteína plasmática es un factor de riesgo frecuente e independiente de padecer enfermedad cardiovascular en la población general (4).

El hecho de que la hiperhomocisteinemia moderada constituya un factor de riesgo vascular está causando un creciente interés entre los especialistas dedicados al estudio y cuidado de pacientes con esta patología, como neurólogos, cardiólogos y cirujanos vasculares, debido fundamentalmente a dos factores: Es frecuente que no se detecte ningún factor de riesgo «clásico» (tabaquismo, diabetes mellitus, hipertensión, etc.) en pacientes que han sufrido accidentes vasculares, incluso en aquellos jóvenes y con historia de accidentes vasculares previos. Dos, existe un tratamiento barato y potencialmente seguro (a falta de estudios a largo plazo), como la administración de vitaminas específicas que logran normalizar, o al menos disminuir de forma muy notable, la mayor parte de hiperhomocisteinias (4). Sin embargo, no está todavía probado que dicha reducción de homocisteína produzca una disminución de morbimortalidad vascular (pendiente actualmente de la evaluación mediante estudios multicéntricos). Por contra, sí está probada una notable disminución de la morbimortalidad en aquellos pacientes con homocistinuria clásica que responden al tratamiento con vitaminas (5,6), lo que supone indudablemente un dato esperanzador a la espera de los resultados de los estudios de intervención mencionados actualmente en curso.

Uno de los factores limitantes que previamente había impedido una difusión más amplia de los estudios sobre homocisteína plasmática ha sido, al menos en parte, superado. Se trata de la complejidad técnica de su determinación, usualmente cromatográfica (7). Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado métodos inmunoquímicos para su análisis que permiten su automatización, con lo que su utilización es ahora totalmente asequible para laboratorios clínicos no especializados (4).

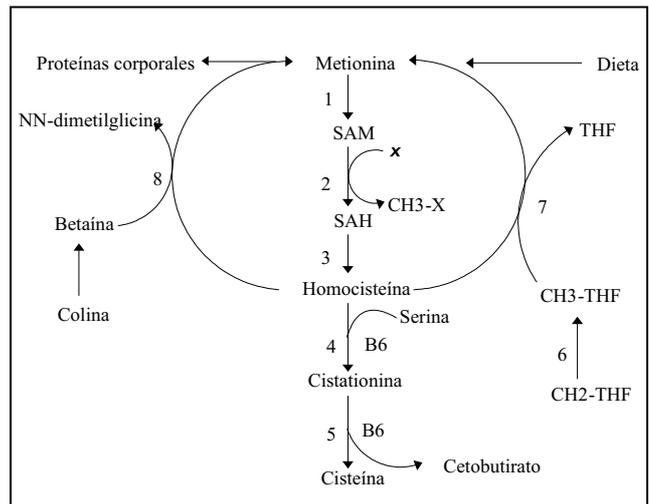


Figura 1. Metabolismo de la homocisteína

1. L-metionina adenosiltransferasa; 2. metiltransferasas; 3. S-adenosilhomocisteína hidrolasa; 4. cistationina β -sintasa; 5. cistationina γ -liasa; 6. metilnotetrahidrofolato reductasa; 7. metionina sintasa; 8. betaina:homocisteína metiltransferasa. SAM: S-adenosilmetionina; X: aceptor de grupos metilos; SAH: S-adenosilhomocisteína; TFH: ácido tetrahidrofolico; B6: Vitamina B₆

Por tanto, en la actualidad parece claro que la necesidad del diagnóstico y tratamiento de la hiperhomocisteinemia moderada es una realidad, aunque su generalización dependerá fundamentalmente de que se demuestre el efecto positivo de la disminución de la concentración de homocisteína plasmática en la prevención de la enfermedad vascular de origen aterotrombótico (4,8,9).

Metabolismo de la homocisteína

La L-metionina es el aminoácido precursor de la L-homocisteína. El exceso de metionina procedente de la dieta, o del recambio de las proteínas endógenas que no se reincorpora a las proteínas, es metabolizado a homocisteína mediante dos reacciones sucesivas (10) (Figura 1). En la primera, se forma un metabolito intermediario, S-adenosilmetionina (SAM), mediante una reacción catalizada por la enzima L-metionina adenosiltransferasa (EC 2.5.1.6). Este metabolito aporta grupos metilo a la biosíntesis de compuestos como colina, creatina, adrenalina, melatonina, entre otros, y también participa en la metilación de DNA y RNA. Tras esta reacción de desmetilación, SAM se transforma en S-adenosilhomocisteína, que luego es hidrolizada a homocisteína y adenosina por la enzima S-adenosilhomocisteína hidrolasa (EC 3.3.1.1) (5).

Una vez formada la homocisteína, su metabolismo se bifurca en las vías metabólicas de transulfuración –donde se transforma en cisteína mediante dos reacciones dependientes de vitamina B₆– y de remetilación –donde se regenera metionina– (10). En el caso de la transulfuración, la primera de estas reacciones es catalizada por C β S (EC 4.2.1.22) y en ella, la homocisteína se condensa con una molécula de serina para formar cistationina (5). En la segunda reacción, la cistationina γ -liasa (EC 4.4.1.1) cataliza la formación de cisteína y α -cetobutirato a partir de cistationina (5). En el caso de la remetilación, la homocisteína se metila para regenerar metionina mediante dos rutas metabólicas independientes, en las que participan respectivamente las enzimas 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína S-metiltransferasa (metionina sintasa; EC 2.1.13) y la betaina:

homocisteína metiltransferasa (EC 2.1.1.5) (11). La primera de estas enzimas se encuentra en la mayoría de estirpes celulares y requiere del ácido 5-metiltetrahidrofólico como cosustrato y de metilcobalamina como coenzima (7). La segunda, se encuentra en hígado, riñones y en menor proporción, en las glándulas suprarrenales, y emplea betaína como fuente de grupos metilo (7). La reacción en la que participa la metionina sintasa es muy importante en el metabolismo del ácido fólico, ya que permite la formación de tetrahidrofólico desmetilado, el depósito intracelular de ácido fólico reducido (11). Una alteración en esta reacción puede secuestrar el ácido fólico en forma de ácido 5-metiltetrahidrofólico, lo que disminuiría la disponibilidad de ácido tetrahidrofólico para la síntesis de DNA. Esta perturbación en la homeostasis del ácido fólico se observa en la deficiencia de cobalamina y se suele conocer como la trampa del ácido fólico (11).

La concentración plasmática de metionina determina si la homocisteína seguirá la vía de transulfuración o transmetilación. Cuando la metionina se encuentra aumentada, hay un incremento del flujo de la transulfuración y una disminución de la tasa de remetilación de homocisteína. Esto es debido al control metabólico que ejerce el aumento tisular de la concentración de SAM, el cual simultáneamente activa la CBS e inhibe la enzima metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR, EC 1.5.1.20) que convierte el 5,10 metileno tetrahidrofolato en 5-metiltetrahidrofolato (5,11). Por tanto, en estas condiciones hay un aumento de la síntesis de cistationina y una disminución en la formación de ácido 5-metiltetrahidrofólico. Cuando disminuye la concentración de metionina en la sangre, la concentración de los metabolitos y la actividad de las enzimas cambia en dirección opuesta. Este mecanismo de regulación asegura una conservación eficiente de metionina a través de la remetilación.

Cuando se aumenta la síntesis de homocisteína o se inhibe su catabolismo, aumenta la exportación hacia el espacio extracelular. La tasa de exportación refleja el balance entre síntesis y utilización de homocisteína. Por esta razón, la concentración extracelular de homocisteína, y en particular la del plasma, son indicadores de la actividad de las enzimas y de la disponibilidad de coenzimas y sustratos involucrados en su metabolismo (5,8-11). El 70 % de la homocisteína plasmática está ligada a las proteínas, principalmente a la albúmina, mediante puentes disulfuro. El 30 % de la homocisteína 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, monómeros de homocisteína. La suma de todas las formas plasmáticas de homocisteína se denomina homocisteína total (tHcy) (12) y su determinación es la que resulta de interés diagnóstico y/o fisiopatológico, ya que se ha demostrado que la concentración de homocisteína libre es muy variable, dependiendo de diferentes circunstancias fisiológicas y preanalíticas.

Causas de hiperhomocisteinemia

Las causas de hiperhomocisteinemia son múltiples y pueden interactuar entre ellas, lo que dificulta la interpretación de los valores elevados de homocisteína. Se pueden agrupar en causas fisiológicas, genéticas y adquiridas (4,13).

Entre los determinantes fisiológicos hay que señalar en primer lugar la edad y el sexo. La homocisteína total se incremen-

ta paulatinamente con la edad en ambos sexos. En la infancia, aún cuando no se observan diferencias entre sexos, se manifiesta ya una diferencia significativa entre niños menores de 10 años, de 11-15 y de 16-18 años (14). A partir de esta edad comienza a diferenciarse la concentración de homocisteína total de ambos sexos, observándose valores más elevados en varones que en mujeres (entre 1-2 $\mu\text{mol/L}$) (13,15,16). Esta elevación se mantiene hasta la menopausia, en que se igualan los valores observados en ambos sexos (17). Estas diferencias entre sexos se han explicado, en parte, por el efecto de las hormonas esteroideas sobre la homocisteína total. De hecho, también se observa un descenso de la homocisteína total durante el primer y segundo trimestre del embarazo, que se normaliza a los pocos días del parto (18,19). Este descenso se ha atribuido no sólo al efecto hormonal sino también a la hemodilución propia del embarazo, así como al aumento de los requerimientos fetales de metionina. La homocisteína total disminuye también en varones adultos tratados con estrógenos (20). Otro factor fisiológico que puede influir en las diferencias observadas entre sexos es la masa muscular, en relación con la síntesis de creatina-creatinina, que requiere S-adenosilmetionina, generándose homocisteína en dicha reacción enzimática (4). Por otra parte, el declive fisiológico de la función renal puede determinar la hiperhomocisteinemia observada en la edad avanzada, pudiendo influir también las deficiencias vitamínicas relacionadas con problemas de absorción intestinal de vitaminas (13).

Entre los determinantes genéticos podemos señalar en primer lugar los causantes de hiperhomocisteinemia grave, originados por mutaciones de genes que codifican a las principales enzimas implicadas en el metabolismo de la homocisteína. Entre ellas se encuentran la CBS, metileno tetrahidrofolato reductasa y el sistema metionina sintasa/metionina sintasa reductasa (5,11). Todos ellos causan importantes acumulaciones de homocisteína en tejidos y líquidos biológicos, que pueden ir acompañados de aciduria metilmalónica en algunos defectos del metabolismo de la cobalamina (variantes CblC, D, F). La condición de portadores de estas mutaciones graves (heterocigosis), particularmente de las causantes de homocistinuria clásica, determina una hiperhomocisteinemia moderada.

También algunos polimorfismos muy comunes en algunas áreas geográficas, como el 677 C \rightarrow T de MTHFR (21), que origina la sustitución de una alanina por una valina en la posición 225 de la proteína, provocando termolabilidad a la enzima y reduciendo su actividad catalítica en un 50%. Como consecuencia de ello se interfiere la síntesis de 5-metiltetrahidrofolato, la forma mayoritaria de folato circulante que proporciona el grupo metilo indispensable para la remetilación de la homocisteína, lo que explica que esta variante enzimática predisponga a la hiperhomocisteinemia moderada (22), especialmente cuando la concentración de folato es deficiente (23).

Entre los determinantes adquiridos de hiperhomocisteinemia más importantes se hallan los relacionados con el estilo de vida, ciertas condiciones clínicas y el efecto secundario de algunos fármacos. En cuanto al estilo de vida, el tipo de dieta, con menor o mayor ingestión de vitaminas, folato, riboflavina y vitaminas B₁₂ y B₆, implicadas en el metabolismo de la homocisteína (24-27), es uno de los mayores determinantes de hiperhomocisteinemia, pudiendo estar en estrecha relación con los factores genéticos antes citados (28). El metabolismo de la homocisteína es uno de los mejores ejemplos de interrelación entre Genética y Nutrición. El contenido proteico de la dieta

parece tener una influencia menor, ya que aún cuando una dieta de elevado contenido proteico aumentará el aporte de metionina, precursora de la homocisteína, también elevará el aporte de cobalamina, previniendo la posible hiperhomocisteinemia (13). Otros hábitos de vida como el tabaquismo, y el consumo elevado de café y/o alcohol también son determinantes de hiperhomocisteinemia (29-31). Por el contrario, la actividad física está inversamente relacionada con las concentraciones de homocisteína total, que se halla más elevada en los individuos con vida sedentaria (29). Asimismo, el estrés agudo induce una elevación transitoria de la concentración de homocisteína total (32).

Entre las condiciones nutricionales causantes de hiperhomocisteinemia destaca la deficiencia de vitaminas del grupo B (folato (B_9), B_{12} , B_6 y riboflavina (B_2)), que son la causa más importante de hiperhomocisteinemia moderada. Pueden contribuir la malnutrición, como ocurre en nuestro medio en el caso de la anorexia nerviosa (33), la malabsorción, que se produce en muchas enfermedades gastrointestinales (34), en pacientes infectados por VIH (35) y en la vejez (8-10). Como situaciones clínicas bien establecidas tenemos la insuficiencia renal crónica como causa importante de hiperhomocisteinemia, con un aumento del orden de dos a tres veces los valores normales, tanto en diabéticos como en no diabéticos (36,37) y se relaciona mejor con la disminución del aclaramiento de creatinina que con el aumento de excreción urinaria de proteínas (37,38). Ello se ha atribuido en parte a la disminución del metabolismo renal de la homocisteína y sólo es corregido en parte por la administración de vitaminas B (36). Aunque de forma mucho menos llamativa que en el caso de la insuficiencia renal, también el hipotiroidismo se asocia a hiperhomocisteinemia mientras que el hipertiroidismo se asocia a disminución de homocisteína total (39). En algunas enfermedades, como el cáncer (40) y algunas enfermedades inflamatorias crónicas (41) puede existir una mayor demanda vitamínica y que ello conduzca a la aparición de hiperhomocisteinemia.

Recientemente también se ha descrito el aumento de homocisteína en enfermedades hepáticas, especialmente cirrosis y alcoholismo, donde la prevalencia de hiperhomocisteinemia es superior a la encontrada en accidente vascular cerebral o coronario (4,7). Tanto el efecto de la patología hepática como la renal podrían estar relacionadas con la disminución de la remetilación a través de la betaína: homocisteína metiltransferasa, únicos órganos donde esta vía metabólica es activa.

Diversos fármacos pueden modificar las concentraciones plasmáticas de homocisteína total, entre ellos hay que destacar los que interaccionan con la absorción o el metabolismo del folato y vitaminas B_{12} y B_6 . Metotrexato inhibe la dihidrofolato reductasa, causando una depleción celular de folato reducido. A las elevadas dosis usadas en terapias antineoplásicas se eleva rápidamente la concentración de homocisteína, que se normaliza tras la administración de folatos (40). También a dosis bajas como las utilizadas en el tratamiento de la psoriasis o en artritis reumatoide la elevación es paulatina y de menor grado (41). Algunos fármacos antiepilépticos también producen elevación de la homocisteína debido a su acción antifolato, que se manifiesta especialmente en los pacientes homocigotos para el polimorfismo 677C->T de la MTHFR (42,43).

Ciertos antagonistas de las vitaminas B_6 (niacina, ionizada) o de la vitamina B_{12} (óxido nitroso), así como fármacos que interfieren con la absorción de estas vitaminas (colestiramina, metformina) causan hiperhomocisteinemia. Se ha señalado ya la acción de las hormonas sexuales (anticonceptivos, trata-

miento hormonal post-menopáusico) que disminuyen la homocisteína total (13).

En resumen, los determinantes fisiológicos, patológicos y genéticos de hiperhomocisteinemia están íntimamente relacionados (29). Por ello, sería útil –en algunos casos– acompañar la determinación de homocisteína total de la de estas vitaminas y de parámetros que informen de la función renal y tiroidea e incluso, del polimorfismo 677C->T de la MTHFR. Asimismo, como siempre, sería deseable tener la máxima información sobre el paciente (edad, sexo) y de su historia clínica, incluyendo tratamientos, estilo de vida (dieta, ejercicio físico, tabaco, café, alcohol, toma de medicamentos) todo lo cual facilitará la interpretación de los resultados.

Aspectos técnicos de la determinación de homocisteína total en plasma

Debido a las bajas concentraciones circulantes de homocisteína total en plasma, a lo largo de las últimas décadas se han ido desarrollando y perfeccionando técnicas sensibles, precisas y específicas para su determinación (44). El uso de los analizadores de aminoácidos mediante técnicas de intercambio iónico (45) o el radioinmunoanálisis (46) se fue reduciendo de forma muy importante por su largo tiempo de análisis. Rápidamente, la mayoría de laboratorios que analizaban especímenes de un número importante de pacientes empezaron a utilizar la cromatografía líquida de alta resolución con detector electroquímico (47) o de fluorescencia (26). Paralelamente se desarrollaron técnicas de cromatografía de gases-masas (47) y los enzimoimmunoanálisis (48). Finalmente, la cromatografía líquida asociada al detector de masas-masas podría ser considerado en un futuro próximo el método de referencia, aunque es demasiado laborioso y de instrumentación poco disponible para ser utilizado de forma rutinaria en la mayoría de laboratorios clínicos en los que el enzimoimmunoanálisis probablemente será el de elección como método recomendado por permitir la automatización.

Obtención y conservación de la muestra

Uno de los aspectos más importantes para la determinación de homocisteína total es evitar su liberación de los hematíes al plasma, que se produce si no se centrifuga el espécimen de sangre rápidamente (preferentemente a 4 °C) o si éste no se pone de inmediato después de obtenida en un baño de hielo o en una nevera a 4 °C (49). Al comparar muestras de suero y plasma se observó que, para muestras centrifugadas al mismo tiempo, no existían diferencias entre ambos tipos de muestra (50,51). Sin embargo, en la práctica diaria, es difícil garantizar que la centrifugación de la sangre se realice en el plazo de unos minutos tras su obtención, por lo que puede ser recomendable guardar la muestra a 4 °C hasta este momento, lo que permite un margen de 4 horas hasta la separación del plasma (Tabla I). En estas condiciones se obtienen aumentos de homocisteína total plasmática inferiores al 1% a las 4 horas y del 7% a las 24 h, mientras que a temperatura ambiente el aumento era de un 20% en las primeras 4 horas y del 62% a las 24h (50). Por ello, se recomienda separar el plasma conservado en frío antes de las 4 h. La situación es diferente una vez separado el suero o el plasma de los hematíes, ya que entonces la homocisteína total es estable 4 días a temperatura ambiente, varias semanas a 0-2°C y varios años conservado a -20°C (50).

Tabla I. Efecto de la preparación del espécimen de sangre sobre la concentración de homocisteína (49)

	Concentración plasmática, $\mu\text{mol/L}$			
	0 h	1 h	4 h	24 h
Conservación a 22°C				
Homocisteína total	7,5 \pm 1,6	8,9 \pm 1,2	11,6 \pm 2,3	20,7 \pm 2,7
Homocisteína libre	1,94 \pm 0,26	3,05 \pm 0,34	3,86 \pm 0,76	5,29 \pm 2,36
Conservación 4°C				
Homocisteína total	9,0 \pm 1,1	9,1 \pm 1,0	9,4 \pm 1,3	10,5 \pm 1,0
Homocisteína libre	2,06 \pm 0,33	2,46 \pm 0,35	2,88 \pm 0,39	3,48 \pm 0,74

El ayuno también puede afectar la determinación pues disminuye ligeramente la concentración plasmática de homocisteína total (51) aunque sin implicaciones clínicas o de tratamiento. Otro aspecto importante es el tiempo entre cada análisis para confirmar una hiperhomocisteinemia moderada, que comporta considerar la variación biológica de esta magnitud. Estudios recientes demuestran que la variación biológica mensual es de 8,3 y la anual es de 9,4% (52).

Existe polémica sobre la utilidad de la determinación de la homocisteína total tras sobrecarga oral de L-metionina (0,1 g/Kg peso, v.o.). A su favor, se ha dicho que aporta información adicional sobre el estado de la transulfuración y, de hecho, existen pacientes que presentan hiperhomocisteinemia post sobrecarga de metionina y son normohomocisteinémicos cuando el análisis se realiza en ayunas (4,15). Sin embargo, el porcentaje de pacientes con homocisteína basal normal y patológica post sobrecarga es muy variable según los estudios analizados y en nuestra práctica habitual muy poco frecuente. Además como toda prueba funcional su aplicación plantea dificultades prácticas y dado que su realización es prácticamente imposible en estudios epidemiológicos amplios (4,15), es muy probable que su utilización se limite a estudios de investigación.

Obtención de patrones y reactivos

Hasta la fecha, muchos de los patrones disponibles para medir homocisteína eran en la forma DL-homocistina con un porcentaje muy variable de impurezas (Sigma), mientras que algunas formas L-homocisteína parecían puras (ICN). Formas deuteradas para el análisis por CG-MS están también disponibles de forma comercial. Actualmente se recomienda el uso de L-homocistina como patrón ya que es más puro y más estable que el de homocisteína. Los patrones internos como la cisteamina y mercaptopropionil glicina son también fácilmente obtenibles y contribuyen a mejorar la precisión y exactitud de la determinación por cromatografía (53).

En cuanto a los reductores más comúnmente empleados, como la tributilfosfina o el borohidruro de sodio, o más recientemente la tris-carboxietil-fosfina (54) aunque suelen ser de una pureza aceptable deben prepararse justo antes de su uso y su estabilidad debería ser siempre comprobada en el laboratorio. El uso de ditiotreitól, mercaptoetanol u otros reductores de grupos sulfhidrilo suele usarse mayoritariamente en métodos inmunoenzimáticos.

Los agentes derivatizadores más frecuentemente usados para la detección fluorimétrica son el monobromobimano (mBrB, con Ex 380 nm y Em 470 nm) el fluorbenzodiazol sulfonato de sodio (SBDF, ex 380 em 510 nm) y el amonio fluorobenzoxadiazol sulfonato (ABD-F, ex 380, em 510 nm). Estos reactivos pueden conseguirse con una buena pureza de

Molecular Probes (Eugene, OR. USA), Wako (Neuss, Alemania) y Sigma.

Métodos disponibles

1. Radioenzimáticos

Se basan fundamentalmente en medir, tras la reducción de las diferentes formas moleculares presentes, la conversión de la homocisteína a S-adenosil-homocisteína en presencia de adenosina ^{14}C , y la enzima S-adenosilhomocisteína hidrolasa (44). Este método fue pronto descartado por su laboriosidad y poca practicabilidad.

2. Inmunoenzimáticos

El desarrollo de métodos inmunoenzimáticos ha permitido la automatización y la generalización de esta determinación ahora al alcance de la gran mayoría de laboratorios clínicos. El fundamento es el mismo que para el método radioenzimático, pero en este caso se determina la concentración de SAH por un método inmunológico. Actualmente existen EIA y análisis de fluorescencia polarizada comercializados, basados todos en el mismo anticuerpo originalmente comercializado por Axis (Noruega), al que se le asocian diversas estrategias para la cuantificación de homocisteína (48,55). Además su correlación con métodos cromatográficos es correcta, aunque lógicamente dependerá del método cromatográfico utilizado (56,57).

3. Cromatografía líquida

–Detección electroquímica:

Aprovechando la capacidad de oxidación de la homocisteína es posible usar el detector electroquímico para su determinación, como se ha hecho para otros compuestos azufrados. Un análisis optimizado fue descrito por Malinow en 1989 (58) y posteriormente han aparecido otros similares. Es importante disponer de experiencia en el uso de este tipo de detector.

–Detección por fluorescencia:

A partir del método descrito por Araki y Sato (59) usando tributilfosfina como agente reductor y derivatización precolumna con fluorobenzodiazol sulfonato SBDF, han aparecido múltiples trabajos describiendo métodos para la determinación de homocisteína por procedimientos modificados en mayor o menor grado (7,60-62). Un aspecto importante de estos métodos es la sensibilidad a la luz de los derivados formados, tanto luz natural (aspecto especialmente importante en nuestro país) como artificial (63). La mayoría de autores prefieren el SBDF puesto que el cromatograma obtenido es muy limpio, no dando señal en el detector si no hay reacción, a diferencia de otros de-

riativadores como el monobromobimano, (mBrB) o el ortophtalaldehído (OPA), que tienen mucha señal de fluorescencia propia y a veces esta señal es variable y poco estable como ocurre con el OPA. Como inconveniente del SBDF debemos señalar que requiere una incubación de 1 hora y temperatura elevada, mínimo 60 °C para que se produzca la reacción. Sin embargo, una vez derivado, el producto es estable a 4°C y protegido de la luz más de 48 h.

4. Cromatografía líquida tandem masas:

Recientemente, se han publicado métodos de cromatografía líquida con detección MS/MS utilizando patrones deuterados y como patrón interno, homocistina. Como en otras muchas técnicas, debe utilizarse desprotección y reducción previa del plasma (64).

5. Cromatografía de gases-masas:

La asociación de la cromatografía de gases a la espectrometría de masas ha sido un método utilizado en aquellos laboratorios que poseen dicha instrumentación, con un buen rendimiento en cuanto a precisión pero con una complejidad técnica superior a la cromatografía líquida (65,66).

En conclusión, podemos decir que de los métodos disponibles en la actualidad, la practicabilidad de los ensayos inmunoenzimáticos es superior a la de los sistemas cromatográficos, aunque éstos se han revelado muy útiles para sentar las bases de nuestro actual conocimiento sobre la fisiopatología y epidemiología de la hiperhomocisteinemia moderada y son aún válidos si tomamos las precauciones correspondientes. Se esperan en un futuro no muy lejano que paneles de expertos internacionales, bajo la coordinación de diferentes sociedades científicas, sean capaces de elaborar recomendaciones sobre cuál es el método de referencia y cuál es el método recomendado para uso clínico.

Materiales de control y programas de control de calidad

A pesar del relativamente poco tiempo que viene realizándose esta determinación de forma amplia, existen ya algunos programas de control de calidad en diversos países (67,68). Los primeros resultados disponibles indican una menor dispersión de los resultados cuando se utilizan métodos inmunoenzimáticos, aunque el número de centros participantes aún es pequeño. Esto podría ser debido a que utilizan el mismo calibrador, cosa que no sucede en los métodos cromatográficos desarrollados en los diferentes laboratorios y en los que se observa una dispersión mayor, probablemente debido al tipo de cromatografía utilizado y origen de los patrones.

Actualmente hay disponible en el mercado material de control de calidad comerciales de las casas Bio-Rad y Chromsystems (Teknokroma), así como algunos programas locales en países escandinavos o en Holanda, como el ERNDIM (www.erndimqa.nl).

Diagnóstico de hiperhomocisteinemia y valores de referencia

Las concentraciones de homocisteína en plasma que se consideran «normales» en términos estadísticos varían entre dife-

rentes países y, también, entre diferentes laboratorios. La mayor parte de estudios realizados en países occidentales muestran concentraciones plasmáticas de homocisteína que oscilan entre 5,0 y 16,0 $\mu\text{mol/L}$ (4).

En nuestro país la prevalencia de hiperhomocisteinemia moderada, a pesar de los pocos estudios realizados, y los pocos pacientes que incluyen, la podemos considerar alrededor del 15 % en enfermedad cardíaca y del 20 % en enfermedad cerebrovascular. Algunos de los factores responsables de esta variación, aparte de las diferencias en los métodos analíticos, serían las características de la población seleccionada por sus diferencias nutricionales y genéticas, especialmente entre el norte y el sur de Europa. Las primeras serán superadas cuando se utilicen sistemas comunes de calibración y se establezca cuál es el método de referencia y cuál (o cuáles) los recomendados para la práctica clínica. Las variaciones entre individuos y poblaciones diferentes están influidas por el tipo de dieta, la edad, el sexo, la ingesta de medicamentos, así como por las concentraciones séricas y tisulares de ácido fólico, cobalamina, vitaminas B₆ y B₁₂ y factores genéticos, sólo en parte comprendidos en el momento presente (4). Basándose en un criterio estadístico, se podría considerar hiperhomocisteinémicas a las personas con concentraciones plasmáticas de homocisteína que son superiores a la media más dos desviaciones estándar de los controles o, puesto que la distribución de las concentraciones de homocisteína en la población no suele ser Gausiana, a aquellas personas que superen el percentil 90 o 95 (4). Sin embargo, el concepto de valores deseables –que se basa en datos fisiopatológicos y que son aplicables a cualquier población– parece de mayor utilidad que el de valores de referencia. En este sentido, cada vez más se consideran concentraciones de homocisteína plasmática deseables aquellas inferiores a 10 $\mu\text{mol/L}$, valores límite a las que oscilan entre 10,1 y 15 $\mu\text{mol/L}$ y ya francamente indeseables aquellas superiores a 15 $\mu\text{mol/L}$ (4), aunque cabría distinguir entre hombres donde se podría aceptar hasta 16 $\mu\text{mol/L}$ y para mujeres premenopáusicas 14 $\mu\text{mol/L}$.

Utilidad de la determinación de homocisteína en plasma

Está ya bien establecido que la homocisteína es un factor de riesgo de accidente vascular y por tanto, podría o debería medirse en todos aquellos pacientes que ya han presentado algún episodio clínico o con antecedentes familiares de accidente vascular precoz (72). Los pacientes en los que se podría medir la concentración de homocisteína incluyen, aparte de aquellos con patología vascular aterotrombótica y el tromboembolismo venoso, aquellos con otros factores de riesgo cardiovascular como la insuficiencia renal, hipertensión, antecedentes familiares de accidente vascular prematuro, diabetes mellitus y dislipemia. Sin embargo, dado que estas enfermedades son muy prevalentes en la población, estas recomendaciones conllevan asociado un coste económico que necesariamente debe de ser considerado (73); por lo menos, en todos aquellos casos en que no parezca justificado un tratamiento vitamínico posterior. En dicho caso, la detección de hiperhomocisteinemia conllevaría a una mayor agresividad en el tratamiento de otros factores de riesgo cardiovascular «tratables» como por ejemplo el colesterol LDL (69).

Otro aspecto interesante de interés diagnóstico es la alta sensibilidad de la homocisteína como marcador de déficit de ácido fólico y vitamina B₁₂. (13,23)

Por ello, puede ser incluso de interés para la monitorización de los primeros, especialmente en casos de tratamientos farmacológicos con efectos anti-vitamina B₁₂ y B₆ o antifolato. Otra patología en la que se ha demostrado alteraciones de las concentraciones plasmáticas de homocisteína es la cirrosis hepática y en los pacientes alcohólicos (70). También, y muy recientemente, se ha podido establecer mediante un estudio prospectivo del estudio de Framingham, que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo de enfermedad de Alzheimer (71), hecho que probablemente incidirá en la necesidad de controlar este parámetro en los pacientes de edad avanzada.

Correspondencia:
R. Deulofeu
Hospital Clínic
Villaruel, 175
08015 Barcelona
Deulofeu@clinic.ub.es

Bibliografía

- Carson NAJ, Neill DW. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child* 1962; 37: 505-13.
- Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F, Laster L. Homocystinuria: an enzymatic defect. *Science* 1964; 143: 1.443-5.
- McCully KS, Wilson RB. Homocystinuria theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis* 1975; 22: 215-27.
- Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *New Engl J Med*. 1991; 324: 1.149-55.
- Mudd SH, Levy HL, Skovoy F. Disorders of transsulfuration. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, NY: McGraw-Hill Inc 1995; 1.279-328.
- Yap S, Naughten ER, Wilcken B, Wilcken DE, Boers GH. Vascular complications of severe hyperhomocysteinemia in patients with homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: effects of homocysteine-lowering therapy. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26(3): 335-40.
- Deulofeu R, Giralt M, Aibar C, Bauchet C, Varela-Moreiras G, Casals F, et al. Determinación de homocisteína en suero por cromatografía líquida de alta resolución. Aplicación al estudio de enfermos afectados de enfermedad vascular cerebral y periférica. *Química Clínica* 1996; 15: 77-84.
- Casals FJ, Deulofeu R. Hiperhomocisteinemia moderada: un nuevo factor de riesgo cardiovascular. *Clin Invest Arteriosclerosis* 1995; 7: 106-19.
- Córdoba A, Blanco-Vaca F, González-Sastre F. Hiperhomocisteinemia, un nuevo factor de riesgo cardiovascular: territorios vasculares afectados, papel en la patogénesis de la arteriosclerosis y trombosis y tratamiento. *Medicina Clínica* 1997; 109: 715-25.
- Córdoba A, Blanco-Vaca F, González-Sastre F. Bases moleculares de la hiperhomocisteinemia. *Química Clínica* 1998; 17: 5-18.
- Rosenblatt DS. Inherited disorders of folate transport and metabolism. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, NY: McGraw-Hill Inc 1995; 3.111-28.
- Mudd SH, Finkelstein JD, Refsum H, Ueland PM, Malinow MR, Lentz SR, et al. Homocysteine and its disulfide derivatives. A suggested consensus terminology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1.704-6.
- Schneede J, Refsum H, Ueland PM. Biological and environmental determinants of plasma homocysteine. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 263-79.
- Vilaseca MA, Moyano D, Ferrer I, Artuch R. Total homocysteine in pediatric patients. *Clin Chem* 1997; 43: 690-2.
- Andersson A, Brattstrom L, Israelsson B, Isaksson A, Hamfelt A, Hultberg B. Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 79-87.
- Lussier-Cacan S, Xhignesse M, Piolot A, Selhub J, Davignon J, Genest J Jr. Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological traits. *Am J Clin Nutr* 1996; 64: 587-93.
- Wouters MG, Moorrees MT, van der Mooren MJ, Blom HJ, Boers GH, Schellekens LA, et al. Plasma homocysteine and menopausal status. *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 801-5.
- Andersson A, Hultberg B, Brattstrom L, Isaksson A. Decreased serum homocysteine in pregnancy. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30: 377-9.
- Walker M, Smith G, Perkins S, Keely E, Garner P. Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 660-664.
- Brattstrom L, Israelsson B, Olsson A, Andersson A, Hultberg B. Plasma homocysteine in women on oral oestrogen-containing contraceptives and in men with oestrogen-treated prostatic carcinoma. *Scand J Clin Lab Invest* 1992; 52: 283-7.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet* 1995; 10: 111-3.
- Engbersen AM, Franken DG, Boers GH, Stevens EM, Trijbels FJ, Blom HJ. Thermolabile 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 142-50.
- Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 94: 2.322-3.
- Guttormsen AB, Ueland PM, Nesthus I, Nygard O, Schneede J, Vollset SE, et al. Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (> or =40 micromol/liter). The Hordaland Homocysteine Study. *J Clin Invest* 1996; 98: 2.174-83.
- Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in the elderly. *JAMA* 1993; 270: 2.693-8.
- Ubbick JB, Vermaak WJ, van der Merwe, Becker PJ. Vitamin B12, Vitamin B6, and Folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 47-53.
- Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Zhang Y, Bjorke-Monsen AL, Schneede J. Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: effect modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Clin Chem* 2000; 46: 1.065-71.
- Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 195-201.
- Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE et al. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* 1995; 274: 1.526-33.
- Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Stensvold I, Nordrehaug JE, Kvale G et al. Coffee consumption and plasma total homocysteine: The Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 136-43.
- Stickel F, Choi SW, Kim YI, Bagley PJ, Seitz HK, Russell RM, Selhub J et al. Effect of chronic alcohol consumption on total plasma homocysteine level in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24: 259-64.
- Stoney CM. Plasma homocysteine levels increase in women during psychological stress. *Life Sci* 1999; 64: 2.359-65.
- Moyano D, Vilaseca MA, Artuch R, Valls C, Lambruschini N. Plasma total-homocysteine in anorexia nervosa. *Eur J Clin Nutr* 1998; 52: 172-5.
- Lindenbaum J. Aspects on vitamin B12 and folate metabolism in malabsorption syndromes. *Am J Med* 1979; 67: 1.037-48.
- Vilaseca MA, Sierra C, Colomé C, Artuch R, Valls C, Muñoz-Almagro C et al. Hyperhomocysteinemia and folate deficiency in HIV-infected children. *Eur J Clin Invest* (en prensa).
- Bostom AG, Shemin D, Verhoef P, Nadeau MR, Jacques PF, Selhub J et al. Elevated fasting total plasma homocysteine levels and cardiovascular disease outcomes in maintenance dialysis patients. A prospective study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2.554-8.
- Chico A, Pérez A, Arcelús R, Carreras G, de Leiva A, González-Sastre F et al. Plasma homocysteine is related to albumin excretion rate in patients with diabetes mellitus: a new link between diabetic nephropathy and cardiovascular disease? *Diabetologia* 1998; 41: 684-93.
- Joven J, Arcelús R, Camps J, Ordóñez-Llanos J, Vilella E, González-Sastre F et al. Determinants of plasma homocyst(e)ine in patients with nephrotic syndrome. *J Mol Med* 2000; 78: 147-54.
- Nedrebo BG, Nygard O, Ueland PM, Lien EA. Plasma total homocysteine in hyper- and hypothyroid patients before and during 12 months of treatment. *Clin Chem* 2001; 47: 1.738-41.
- Refsum H, Wesenberg F, Ueland PM. Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Res* 1991; 51: 828-35.
- Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: Plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med* 1989; 144: 473-501.
- Ono H, Sakamoto A, Eguchi T et al. Plasma total homocysteine concentrations in epileptic patients taking anticonvulsants. *Metabolism* 1997; 46: 959-62.
- Vilaseca MA, Monrós E, Artuch R, Colomé C, Farré C, Valls C et al. Antiepileptic Drug Treatment In Children: Hyperhomocysteinemia, B-Vitamins And The 677c/T Mutation Of The Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene. *Eur J Ped Neurol* 2000; 4: 269-77.
- Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications *Clin Chem* 1993; 39: 1.764-79.
- Wilcken DEL, Reddy SG, Gupta VJ. Homocysteinemia, ischemic heart disease, and the carrier state for homocystinuria. *Metabolism* 1983; 32: 363-70.

46. Malinow R, Kang SS, Taylor LM, Wong PWK, Inahara T, Mukerjee D et al. Prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circ Res* 1989; 79: 1.180-8.
47. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH. Quantitation of total homocysteine, total cysteine and methionine in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1987; 162: 185-96.
48. Shipchandler MT, Moore EG. Rapid, fully automated measurement of plasma homocyst(e)ine with the Abbott IMx analyzer. *Clin Chem* 1995; 41: 991-4.
49. Andersson A, Isaksson A, Hultberg B. Homocysteine export from erythrocytes and its implication for plasma sampling. *Clin Chem* 1992; 38: 1.311-5.
50. Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, Ueland PM. Homocysteine and other thiols in plasma and urine: automated determination and sample stability. *Clin Chem* 1993; 39: 263-71.
51. Ubbink JB, Vermaak WJH, Vandermerwe A, Becker PJ. The effect of blood sample agging and food consumption on plasma total homocysteine levels. *Clin Chim Acta* 1992; 207: 119-28.
52. Voortman A, Melse-Boonstra A, Schulz JM, Burema, J, Katan MB, Verhoef P. Optimal time interval between repeated blood sampling for measurements of total homocysteine in healthy individuals. *Clin Chem* 2001; 47: 1.839-41.
53. Accinni R, Campolo J, Bartesaghi S, De Leo G, Lucarelli C, Cursano CF et al. High-performance liquid chromatographic determination of total plasma homocysteine with or without internal standards. *J Chromatogr A*. 1998; 828: 397-400.
54. Krijt J, Vakova M, Kozich V. Measurement of homocysteine and other amino thiols in plasma: advantages using tris(2-carboxyethyl)phosphine as reductant compared with tri-n-butylphosphine. *Clin Chem* 2001; 47: 1.821-28.
55. Frantzen F, Faaren AL, Alheim I, Nordhei AK. An enzyme conversion immunoassay for the determination of total homocysteine in plasma or serum. *Clin Chem* 1998; 44: 311-316.
56. Blanco-Vaca F, Arcelús R, González-Sastre F, Ordóñez-Llanos J, Queralto JM. Comparison of the Abbot IMx and HPLC method for measuring total plasma homocysteine. *Clin Chem Lab Med*. 2000; 38: 327-30.
57. Nexø E, Engbaek F, Ueland PM, Westby C, O'Gorman P, Johnston C et al. Evaluation of Novel Assays in Clinical Chemistry: Quantification of Plasma Total Homocysteine. *Clin Chem*. 2000; 46: 1.150-6.
58. Malinow MR, Kang SS, Taylor LM, Wong PWK, Inahara T, Mukerjee D. Prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circ Res* 1989; 79: 1.180-8.
59. Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chrom* 1987; 422: 43-52.
60. Ubbink JB, Vermaak WJH, Bissbort S. Rapid high performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum. *J Chrom* 1991; 565: 441-6.
61. Jacobsen DW, VJ Gatautis, R Green, K Robinson, SR Savon, M Secic, et al. Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects *Clin Chem* 1994; 40: 873-81.
62. Refsum H, Ueland PM, Svandal Am. Fully automated fluorescence assay for determining total homocysteine in plasma. *Clin Chem* 1989; 35: 1.921-27.
63. Dudman NP, Guo XW, Crooks R, Xie L, Silberberg JS. Assay of plasma homocysteine: light sensitivity of the fluorescent 7-benzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonic acid derivative, and use of appropriate calibrators. *Clin Chem* 1996; 42: 2.028-32.
64. Magera MJ, Lacey JM, Casetta B, Rinaldo P. Method for the determination of total homocysteine in plasma and urine by stable isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 1999; 45: 1.517-22.
65. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH. Quantitation of total homocysteine total cysteine and methionine in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1987; 162: 185-96.
66. Ubbink JB, Delport R, Riezler R, Vermaak H. Comparison of three different plasma homocysteine assays with gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chem* 1999; 45: 670-75.
67. Moller J, Christensen L, Rasmussen K. An external quality assessment study on the analysis of methylmalonic acid and total homocysteine in plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57: 613-619.
68. Tripodi A, Chantarangkul V, Lombardi R, Lecchi A, Mannucci PM, Cattaneo M. Multicenter study of homocysteine measurement--performance characteristics of different methods, influence of standards on interlaboratory agreement of results. *Thromb Haemost* 2001; 85: 291-5.
69. Executive summary of the third report of the national Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. *JAMA* 2001; 285: 2.486-97.
70. Ruiz E, Berasain C, Rodríguez JA, Corrales F, Arias R, Martin-Duce A et al. Hyperhomocysteinemia in liver cirrhosis, Mechanisms and role in vascular and hepatic fibrosis. *Hypertension* 2001; 38: 1.217-21.
71. Seshadri S, A Beiser, J Selhub, P Jaques, I Rosenberg, R D'Agostino et al. Plasma Homocysteine as a risk factor for dementia and alzheimer disease. *N Eng J Med* 2002; 346: 476-83.
72. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Ann Rev Med* 1998; 49: 31-62.
73. Tice JA, Ross E, Coxson PG et al. Cost-effectiveness of vitamin therapy to lower plasma Homocysteine levels for the prevention of coronary heart disease: effect of grain fortification and beyond. *JAMA* 2001; 286: 936-43.