

Homocisteína plasmática: factor de riesgo independiente de afecciones vasculares oclusivas

OSVALDO FRIDMAN, J. L. D'ERAMO, A. E. FINKELSTEIN

Departamento de Investigaciones Diagnósticas, Centro de Investigaciones Médicas Albert Einstein (CIMA E)

Trabajo recibido para su publicación: 10/96 Aceptado: 2/97

Dirección para separatas: Dr. Osvaldo Fridman, Departamento de Investigaciones Diagnósticas, Centro de Investigaciones Médicas Albert Einstein (CIMA E), Luis Viale 2831, (1416) Buenos Aires, Argentina

La determinación de los niveles de homocisteína plasmática total se ha convertido en un estudio de gran utilidad debido a que los valores moderadamente elevados de homocisteína circulantes pueden causar aterosclerosis y obstrucción de las arterias coronarias. Existen numerosos trabajos que han establecido que la hiperhomocisteinemia moderada constituye un importante factor de riesgo independiente para el desarrollo y progreso de afecciones vasculares oclusivas. Se sabe que son varios los factores que causan el aumento de homocisteína plasmática; éstos incluyen afecciones metabólicas hereditarias, estado nutricional y el tratamiento con ciertos fármacos. Los posibles mecanismos por los cuales los niveles elevados de homocisteína causan afecciones vasculares incluyen efectos sobre las plaquetas, los factores de coagulación y el endotelio. Niveles séricos bajos de vitaminas B6 y B12 y folato se encuentran frecuentemente asociados con altas concentraciones de homocisteína plasmática, que pueden ser reducidas con suplemento vitamínico. De esta forma, las lesiones ateroscleróticas y la trombosis relacionadas con la hiperhomocisteinemia podrían ser prevenidas con una dieta rica en vitaminas, aunque esto hasta el presente no ha sido comprobado. REV ARGENT CARDIOL 1997; 65 (5): 571-581.

Palabras clave Homocisteína - Factor de riesgo - Vitaminas - Afecciones vasculares oclusivas

El aminoácido homocisteína fue descrito por De Vigneaud en 1932 como un producto de la desmetilación de la metionina. (1) A principios de la década del '60, Carson, Neill, Gerritsen y Waisman identificaron homocistina en la orina de niños con anomalías congénitas que presentaban retardo mental. (2, 3) A partir de estos descubrimientos se iniciaron numerosos estudios sobre las características clínicas y bases bioquímicas de la homocistinuria. En 1964 Mudd y colaboradores encontraron falta de actividad de la enzima cistationina β -sintetasa en una biopsia de hígado de un paciente homocistinúrico. (4) Los síntomas predominantes en esos pacientes fueron tromboembolismo, aterosclerosis prematura y retardo mental. (5) Se iniciaron así estudios tendientes a encontrar alguna relación entre homocisteína y las lesiones vasculares. (6) Durante las últimas décadas se han mejorado las técnicas para su determinación en materiales biológicos. En un principio se pensó que la homocisteína no se encontraba en el plasma y tejidos humanos bajo condiciones fisiológicas; sin embargo, se ha llegado a

cuantificar en plasma de individuos normales y en pacientes con enfermedades diferentes de la homocistinuria, en varios estados de deficiencia nutricionales y durante la exposición a distintas drogas. (7, 8) Una consecuencia de los niveles moderadamente elevados de homocisteína plasmática, que ha atraído mayor atención durante los últimos años, es el incremento del riesgo de afecciones vasculares prematuras.

Metabolismo de la homocisteína

La homocisteína es un intermediario en el metabolismo de la metionina (Figura 1). La metionina incorporada con la dieta se S-adenosila, dando lugar al dador de metilo S-adenosilmetionina y éste, por transferencia del grupo metilo a distintos aceptores celulares, se transforma en S-adenosil homocisteína. En los vertebrados, la escisión de S-adenosil homocisteína en homocisteína y adenosina es el único paso metabólico que conduce a la formación de homocisteína. Esta reacción es catalizada por la enzima ubicua S-adenosil homocisteína hidrolasa. (9, 10)

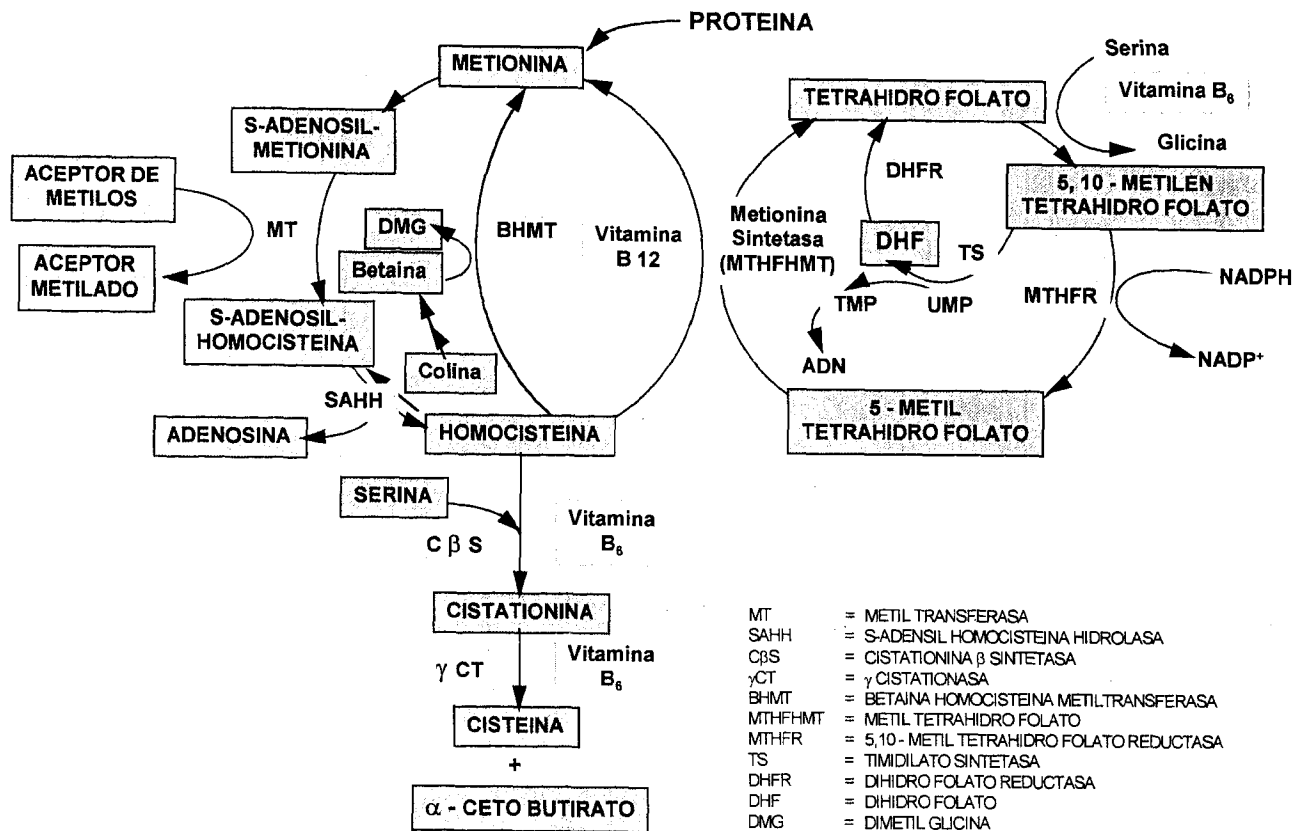


Fig. 1. Metabolismo de metionina.

La homocisteína intracelular puede ser remetilada a metionina o condensada con serina para formar cistationina. Esta última reacción es catalizada por la enzima cistationina β-sintetasa, de amplia distribución en tejidos de mamíferos, que utiliza como cofactor a piridoxal 5'-fosfato, la forma biológicamente activa de la vitamina B6. (11) Esta reacción es irreversible, de modo que, más allá de este paso metabólico, la homocisteína ya no es más precursora de metionina. (7) La cistationina es clivada por la enzima τ-cistationasa a cisteína y α-cetobutirato. También esta última enzima requiere de piridoxal 5'-fosfato. Esta es la vía de transulfuración. (12)

La remetilación de homocisteína a metionina es catalizada por caminos independientes, a través de dos enzimas, la 5-metiltetrahydrofolato-homocisteína metiltransferasa (metionina sintetasa) y la betaína-homocisteína metiltransferasa. La primera enzima, que se encuentra ampliamente distribuida en los tejidos animales, requiere como donante de metilo y cofactor a 5'-metiltetrahydrofolato y vitamina B12 respectivamente. (11) Basados en estudios realizados con enzimas bacterianas, se determinó que la metilcobalamina metila a la homocisteína, mientras que el grupo metilo del 5'-metiltetrahydrofolato remetila a la cobalamina. (13) En esta reac-

ción, el 5'-metiltetrahydrofolato es convertido en tetrahydrofolato. La 5'-metiltetrahydrofolato-homocisteína metiltransferasa es el nexo entre los metabolismos de la homocisteína, el folato y la vitamina B12.

La conversión de homocisteína en metionina es también catalizada por la enzima betaína-homocisteína metiltransferasa, que requiere de betaína como donante de metilos. (14) Esta enzima se encuentra en el hígado y una muy pequeña actividad fue descrita en el riñón. (15) Se la responsabiliza del catabolismo de colina y la remoción de homocisteína, pero también se postula que está involucrada en la homeostasis de metionina en mamíferos. (15-17)

También fue posible detectar pequeñas (1 a 5 nmol/gm) aunque estables cantidades de homocisteína en tejidos, una fracción de la cual está asociada con proteínas. (18, 19) En estudios con células aisladas se demostró que ambas fracciones intracelulares tienen una vida media muy corta. La tasa de salida de la homocisteína al medio extracelular es directamente proporcional a su síntesis, lo que indica que el egreso de la homocisteína también juega un papel en la regulación de las concentraciones intracelulares. (20) A partir de estos estudios en células aisladas se postuló que los niveles de homocisteína

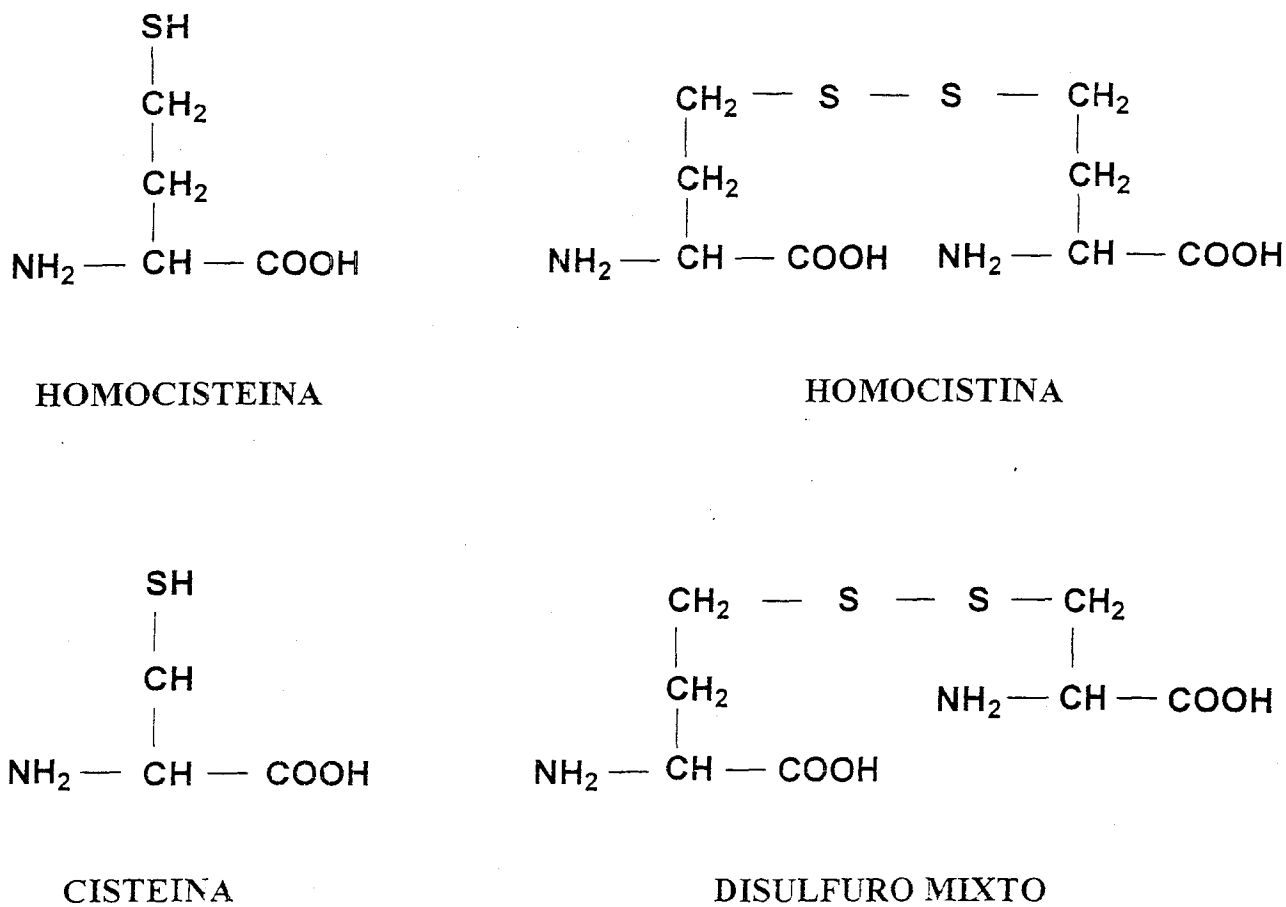


Fig. 2. Homocisteína y moléculas relacionadas.

en los medios extracelulares, como el plasma y la orina reflejan el balance entre la producción intracelular de homocisteína y su utilización. (8)

Homocisteína plasmática

Se define homocisteína plasmática total (tHcy) a la suma de todas las especies de homocisteína circulantes. Estas incluyen las formas libres (homocisteína, homocistina y el disulfuro mixto homocisteína-cisteína) (Figura 2) y la unida a proteínas. Esta última fracción representa aproximadamente el 80% del total. (21) Existen varias técnicas para la determinación de tHcy. Ellas incluyen la conversión por reducción de todas las formas en una especie única, por lo que la redistribución entre la fracción libre y la unida a proteínas no afecta el resultado y la medición puede ser realizada en muestras almacenadas. (22) La tHcy en sangre entera *in vivo* aumenta a temperatura ambiente, debido a la continua producción y liberación de homocisteína por los eritrocitos. Sin embargo, los resultados de este proceso son poco significativos si el plasma es separado antes de una hora de la extracción o la sangre es mantenida en

hielo. (23) Los diferentes métodos correlacionan bien entre sí y en condiciones de ayuno se consideran normales los valores entre 5 y 15 $\mu\text{mol/litro}$. (24, 25) En nuestro laboratorio hemos desarrollado un método de medición de tHcy por HPLC y detección electroquímica con un electrodo "glassy-carbon". (26) Este electrodo, a pesar de ser inespecífico, posee alta sensibilidad. La especificidad se logra mediante una eficiente separación cromatográfica. (26)

Hiperhomocisteinemia

La hiperhomocisteinemia puede deberse a menores actividades de las diferentes enzimas que regulan su metabolismo o a deficiencias de los cofactores esenciales (vitaminas B6 y B12) o del cosustrato metiltetrahidrofolato.

La homocistinuria, una de las clásicas fallas metabólicas congénitas, es una enfermedad metabólica recesiva autosómica que en su forma más común es causada por deficiencia de la enzima cistationina- β -sintetasa y el homocigota se caracteriza por una excreción urinaria de homocisteína. (2) Los afectados son normales al nacer, pero luego desarrollan

cambios durante la niñez y la adolescencia, que involucran varios órganos. Se destacan: subluxación de las lentes de los ojos, alargado y debilitamiento de huesos largos y diferentes grados de retardo mental. (27-29) Además, es frecuente la incidencia de aterosclerosis y una aumentada disposición a desarrollar trombosis arterial y venosa. (28) Las manifestaciones vasculares incluyen afección arterial periférica oclusiva e infarto de miocardio. Puede también haber oclusión de la carótida interna y de arterias cerebrales, senos intracraneales, trombosis de venas mayores, incluyendo venas renales, y vena porta y arterias pulmonares. (30-36) La condición heterocigota también puede estar asociada con niveles de tHcy aumentados. McCully en 1969 postuló que la homocisteína podía ser causa de aterosclerosis, (36) y Wilcken y Wilcken sugirieron que la homocisteinemia era un factor de riesgo de enfermedad vascular. (37) A partir de estos estudios, un gran número de publicaciones confirmaron la existencia de una íntima relación entre los niveles plasmáticos aumentados de homocisteína en los heterocigotas y las diferentes manifestaciones de afecciones vasculares.

También se han descrito desórdenes en el metabolismo de la cobalamina, causados por defectos genéticos, que afectan el proceso de remetilación de la homocisteína a metionina. (38-41)

Otra causa enzimática de hiperhomocisteinemia severa es la deficiencia en la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa, que también afecta la remetilación de homocisteína a metionina. La 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa cataliza la reducción de 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato. En esta reacción, la flavina adenina dinucleótido actúa como cofactor. En los homocigotas se presenta hiperhomocisteinemia severa (causante de anomalías neurológicas, retardo mental, aterosclerosis y trombosis), mientras que en los heterocigotas la actividad enzimática es de aproximadamente el 50% de la media normal y no se conoce aún si esta condición está asociada con un aumento de riesgo de enfermedad vascular. También existe una variante termolábil de esta enzima, con una incidencia del 17% entre los pacientes coronarios, producida por una transición de timidina a citocina en el nucleótido 677 del gen. (33, 38, 42-47).

La concentración de tHcy aumenta con la edad; esto puede deberse a disminuciones en los niveles de cofactores o a una alteración renal, frecuentes en ancianos. (38, 48-50) También se describió una reducción de la actividad de la cistationina β -sintetasa dependiente de la edad. (51)

En general, los hombres presentan mayores niveles de tHcy que las mujeres. (24, 48) Luego de la menopausia las concentraciones de tHcy pueden aumentar o se mantienen sin cambios. (48, 50, 52)

Aunque las diferencias de sexo pueden ser explicadas por el efecto de las hormonas sexuales sobre el metabolismo de la homocisteína, también pueden atribuirse a los altos valores de creatinina, o a la mayor masa muscular en el hombre. (50, 53)

La población negra sudafricana posee menores concentraciones de homocisteína plasmática que los blancos. Según algunos autores esto podría explicar, al menos parcialmente, su relativa resistencia a las afecciones cardiovasculares. (54)

Existe una correlación positiva entre la tHcy y la creatinina sérica, aunque el mecanismo no está claro. (50, 55) En la insuficiencia renal crónica los niveles de tHcy pueden ser dos a cuatro veces mayores que los normales. (56, 57) Estas concentraciones disminuyen luego de diálisis. Chauveau y colaboradores postulan que los aumentos de la tHcy en la insuficiencia renal se deben a fallas metabólicas y a una menor capacidad de su captación por el parénquima renal. (57)

Frente a deficiencias de vitamina B12 o del cosustrato folato, los niveles de tHcy pueden encontrarse significativamente elevados, aunque también se observa hiperhomocisteinemia con niveles de B12 y folato en el rango normal. (49, 58-61) Los efectos de la deficiencia en vitamina B6 sobre la tHcy en pacientes no son tan claros; sin embargo en sujetos normales se vio una correlación negativa. (49, 62, 63)

Los niveles de tHcy pueden ser aumentados por efectos de agentes farmacológicos tales como metotrexato, óxido nitroso, fenitoína, carbamacepina y azarabina. (38, 64) El metotrexato deplemina al 5-metiltetrahidrofolato, el cosustrato de la 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasa. (38, 64) El óxido nitroso inactiva a la 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasa dependiente de la vitamina B12. (38) Los anticonvulsivantes como la fenitoína y la carbamacepina interfieren con el metabolismo del folato. (38, 64) La azarabina, que inicialmente fue usada para los casos refractarios de psoriasis, es un antagonista de la vitamina B6 e inhibe a la cistationina β -sintetasa. Su utilización se asoció con un aumento del tromboembolismo. El uso combinado de drogas diuréticas y de agentes que reducen lípidos, como el colestipol y la niacina, también está asociado con niveles elevados de tHcy. (65, 66)

Los contraceptivos orales que contienen estrógenos pueden alterar el metabolismo de la homocisteína a través de la actividad de la betaína-homocisteína metiltransferasa. (64) Aunque las mujeres que toman anticonceptivos orales presentan bajos niveles de tHcy, en algunas se puede encontrar niveles altos. (67) Un estudio prospectivo realizado por van der Mooren y colaboradores mostró un 10,9% de disminución en los niveles de tHcy en mujeres posmenopáusicas con tratamiento de reemplazo hormonal. (69)

La penicilamina, un análogo de la cisteína con propiedades quelantes, usado en la enfermedad de Wilson, en el envenenamiento con metales pesados, en la artritis reumatoidea y en la cistinuria, puede disminuir los niveles de tHcy, posiblemente debido a la formación del disulfuro mixto homocisteína-penicilamina, que presenta alta tasa de eliminación por riñón. (64)

Mecanismos de injuria vascular

Los mecanismos por los cuales la homocisteína induce aterosclerosis y trombosis no son del todo conocidos. Sin embargo, se demostró que un aumento en la concentración de homocisteína plasmática ejerce efectos deletéreos sobre varios aspectos de las funciones vascular y endotelial. Harker y colaboradores vieron que si infundían homocisteína-tiolactona a mandriles se inducía una pérdida por parches del 10% de la cubierta endotelial de la aorta, a pesar de que también se podía observar un aumento en 25 veces de la regeneración endotelial. (69) En otro estudio en mandriles, los mismos investigadores, administrando homocisteína-tiolactona, luego de tres meses de tratamiento describieron el desarrollo de células espumosas. (70) Sin embargo, cuando se utilizaron cerdos en lugar de mandriles, otros autores obtuvieron resultados disímiles, lo que sugirió la existencia de diferencias específicas significativas. (71, 72)

El efecto deletéreo de homocisteína sobre el endotelio ha sido confirmado *in vitro*. Wall y colaboradores expusieron células de endotelio venoso en cultivo a 2,5-10 mmol/l de DL-homocisteína-tiolactona, lo que causó daño endotelial y desprendimiento. (73) Diversos estudios sugirieron que el efecto sobre el endotelio podía deberse a la acción del grupo sulfidrilo, que facilitarían la formación de peróxido de hidrógeno y la inhibición de la síntesis de prostaciclina. (74-77) Existen evidencias de que los hidroperóxidos de lípidos modifican la captación de lipoproteínas de baja densidad por las células musculares lisas y los macrófagos en la pared arterial. (78, 79) Además, estas lipoproteínas de baja densidad aumentan la agregación plaquetaria. (80, 81)

La homocisteína está asociada con la generación de radicales libres que pueden provocar daño vascular y acelerar los procesos aterogénicos. La transformación por oxidación de homocisteína en homocistina es un proceso dependiente del oxígeno en el que el cobre o la ceruloplasmina son catalizadores obligados. (74) Se vio que la catalasa puede prevenir el daño endotelial inducido por homocisteína *in vitro*, lo que sugirió que la injuria podría ser mediada por el peróxido de hidrógeno. (74) Existen, también, evidencias de que el óxido nítrico, producido por las células endoteliales, se opondría a los efectos

adversos de la homocisteína, debido a la formación del derivado no tóxico s-nitroso-homocisteína. Sin embargo, estos efectos protectores son superados cuando la exposición a mayores concentraciones de homocisteína es mantenida en el tiempo, como ocurre en la hiperhomocisteinemia. En estas circunstancias, el efecto tóxico ejercido por los peróxidos de hidrógeno y los hidroxilos generados durante la oxidación de la homocisteína, sobre la célula endotelial, afecta la producción de óxido nítrico. (82)

Tsai y colaboradores encontraron que la homocisteína inhibe la síntesis de ADN en células endoteliales mientras que, por el contrario, estimula la síntesis de ADN y la proliferación de células musculares lisas vasculares. (83) Este efecto sobre la célula muscular representaría un mecanismo por el cual la homocisteína induce a la aterosclerosis. También, recientemente lograron demostrar que la homocisteína aumenta la tasa de transcripción del gen de ciclina A y midieron mayores niveles de ciclina A y de la actividad de quinasa asociada. (84)

Sumado a estas acciones sobre el endotelio, existen evidencias de que la homocisteína puede presentar efectos protrombóticos. Como resultado del daño endotelial se incrementa la adhesión plaquetaria a las paredes de los vasos, se producen radicales de oxígeno libres, se reduce la producción de prostaciclina y aumenta la activación de la protrombina. (69, 70, 73, 76, 85) La homocisteína puede aumentar la actividad del factor V y la activación de la trombina por el factor Xa y reducir las actividades de la proteína C, inhibitoria del factor Va asociado a las células endoteliales y de trombosmodulina. (85, 86) La homocisteína aumenta los niveles del mRNA de trombosmodulina en células endoteliales; sin embargo, su expresión en la superficie celular se halla bloqueada probablemente, debido a que la homocisteína también afecta su glicosilación. (87, 88)

Además, es inhibitoria de la secreción del factor von Willebrand y de la unión de la célula endotelial con la antitrombina III, proteína plasmática que inactiva las proteasas de serina del sistema de coagulación de la sangre, ante la presencia de heparina. (89, 90)

En células endoteliales humanas la homocisteína bloquea la unión del activador del plasminógeno. (91) También, en pacientes con enfermedad coronaria, se encontró una correlación positiva entre la homocisteína y el fibrinógeno. (92) Finalmente, la homocisteína puede inducir la actividad del factor tisular en células endoteliales humanas, en cultivo, por estimulación de la transcripción del gen. (93)

Hiperhomocisteinemia y afecciones vasculares

Numerosos estudios, metodológicamente diferentes entre sí, que suman varios miles de pacientes,

mostraron mayores niveles de tHcy en pacientes con afecciones vasculares (coronarios, cerebrovasculares, vasculares periféricos y con trombosis venosa) que en los sujetos normales. (48, 53, 55, 65, 94-112)

Estudios sobre homocisteína y riesgo coronario

Los primeros que investigaron el metabolismo de la metionina y su relación con las enfermedades coronarias fueron Wilcken y Wilcken, quienes estudiaron pacientes mayores de 50 años con afecciones coronarias comprobadas por angiografía. (37) En 1983 este mismo grupo realizó un segundo estudio con pacientes coronarios pero no pudieron confirmar sus resultados anteriores. (113)

Boers y colaboradores examinaron pacientes con afecciones vasculares en los que se incluían algunos coronarios. (96) Encontraron niveles significativamente mayores de tHcy asociados a afecciones vasculares periféricas y accidente cerebrovascular, pero no así en coronariopatías. En los dos primeros casos, la enzima cistationina β -sintetasa mostró menor actividad, lo que sugirió la existencia de heterocigosis para homocistinuria. Esto último tampoco fue observado en coronarios. Probablemente estos resultados se debieron al pequeño tamaño de la muestra, pues en la mayoría de los estudios posteriores se pudo confirmar la existencia de una asociación entre la enfermedad coronaria y altas concentraciones de tHcy. Clarke y colaboradores compararon los niveles de tHcy en pacientes con enfermedad vascular prematura (menores de 55 años) con los de normales. (97) Encontraron hiperhomocisteinemia en el 42% de los pacientes con enfermedad cerebrovascular, en el 28% de los que presentaban afecciones vasculares periféricas y en el 30% de los coronarios, mientras que tHcy no se encontraba aumentada en ninguno de los controles. Aproximadamente el 80% de los pacientes que tenían concentraciones altas de tHcy presentaban baja actividad de cistationina β -sintetasa. Concluyeron que la causa más frecuente de hiperhomocisteinemia era una deficiencia parcial en la actividad de la enzima cistationina β -sintetasa. Debido a los resultados conflictivos que se obtuvieron en algunos de los primeros estudios y a la falta de estandarización de la metodología, en 1990, en Europa, se llevó a cabo un estudio multicéntrico del tipo caso-control. (114) Se consensuaron la metodología y las definiciones de las enfermedades vasculares y se estudiaron, aproximadamente, 800 pacientes y 800 controles. Este estudio permitió confirmar que existe una independencia entre los niveles altos de tHcy y los demás factores de riesgo. (110)

En 1992, en un estudio prospectivo también se concluyó que las concentraciones elevadas de tHcy constituían un factor de riesgo independiente de in-

farto de miocardio. (108) En un estudio similar realizado en Noruega, (107) se encontró que las concentraciones de tHcy eran mayores en pacientes que más tarde tuvieron infarto de miocardio, que en los que no lo padecieron.

Homocisteína plasmática, folato, vitamina B12 y vitamina B6

En los últimos años se ha explorado la correlación entre la tHcy y las concentraciones séricas de vitamina B12, folato y vitamina B6 en pacientes coronarios. Tanto el ácido fólico como la vitamina B12 fueron bajos en pacientes con tHcy alta. (97, 100) Otros estudios también mostraron una correlación negativa entre tHcy y vitamina B12 y folato tanto en pacientes coronarios como en controles. (24, 53, 95, 115) En uno de los estudios también se encontró una correlación inversa entre tHcy y vitamina B6. (53) Estos hallazgos fueron consistentes con otros trabajos *in vivo*, en los que se desarrollaron lesiones ateroscleróticas en animales deprivados crónicamente de vitamina B6. (116, 117) A partir de estos estudios se ha puesto énfasis en el papel de los bajos niveles vitamínicos como posibles causantes de las enfermedades vasculares.

Hiperhomocisteinemia y otros factores de riesgo de enfermedad cardiovascular

En un importante número de estudios realizados no se pudo comprobar correlación alguna entre tHcy y el colesterol sérico. (55, 98, 99, 102, 105). Pero en otros se correlacionó la tHcy tanto con los niveles de colesterol LDL como con los de apolipoproteína B. (106) Estas relaciones no pudieron ser confirmados con un análisis de regresión lineal múltiple. Sin embargo, Kang y colaboradores encontraron una correlación entre la tHcy y el colesterol en pacientes con niveles de colesterol en el rango normal, (48) y Wu y colaboradores encontraron una correlación con colesterol LDL. (53)

La mayoría de los estudios encontraron que el tabaquismo no se correlaciona con la tHcy en pacientes con enfermedad vascular, (48, 53, 55, 98, 103, 105, 106) aunque unos pocos estudios sí mostraron una correlación. (118-120) Investigadores noruegos, en un trabajo que incluyó a 7.591 hombres y 8.585 mujeres de entre 40 y 67 años, encontraron que, comparados con los no fumadores, los fumadores presentaban mayores niveles de tHcy y que estos valores aumentaban proporcionalmente con el número de cigarrillos fumados diariamente. (121) El efecto del tabaquismo resultó ser mayor en las mujeres que en los hombres, y también mayor en los grupos de edad avanzada comparados con los más jóvenes. Es de destacar que los ex fumadores presentaban niveles normales de tHcy. (121) El alcoholismo crónico

también ha sido relacionado con hiperhomocisteinemia y se ha sugerido que el alcohol interfiere con el metabolismo del folato y de la vitamina B6, impidiendo la metabolización de la homocisteína a través de las vías de transmetilación y transulfuración. (123) También se postuló que el tabaquismo ejerce su acción a través del metabolismo de la vitamina B6. (121)

No se ha observado correlación entre presión sanguínea y concentración de tHcy en la mayoría de los estudios con pacientes coronarios. (48, 53, 55, 65, 94, 95, 98, 103, 105) Sin embargo, Malinow y colaboradores encontraron que el 77% de los pacientes con lesiones arteriales periféricas que presentaban tHcy elevada eran hipertensos, mientras que padecían de hipertensión sólo el 40% de los que tenían niveles normales. (99) Otro estudio reveló que la tHcy era significativamente más alta en pacientes hipertensos que en normotensos. (59) Por último, en varias investigaciones no se encontró correlación entre diabetes e hiperhomocisteinemia. (53, 55, 95, 98, 99, 104, 106)

Estudios terapéuticos en pacientes con enfermedades vasculares

En tratamientos con vitamina B6, sola o en combinación con ácido fólico, se logró reducir los niveles elevados de tHcy. (102) Otros autores obtuvieron resultados similares. (109, 124) También se trabajó con pacientes con aterosclerosis coronaria, a quienes se les redujo la tHcy mediante la administración de ácido fólico, vitamina B6 y B12. (109, 125-127). Landgren y colaboradores tuvieron éxito administrando dosis de 2,5 y 10 mg de ácido fólico en un pequeño grupo de pacientes que habían padecido un infarto de miocardio. (127)

Dudman y colaboradores redujeron el tHcy en pacientes coronarios usando una variedad de regímenes que incluían ácido fólico, vitamina B6, colina y betaína. (109) Ryan y colaboradores, mediante una combinación de vitamina B6 y ácido fólico, lograron una disminución del 15%. (125) En un estudio reciente, Saltzman y colaboradores probaron ácido fólico solo o combinado con vitaminas B12 y B6 o la combinación de B12 y B6 solas en pacientes que tuvieron una angioplastia coronaria, y todos estos tratamientos fueron efectivos. (126) Naurath y colaboradores usaron un régimen intramuscular de 1,1 mg de folato, 1 mg de vitamina B12 y 5 mg de B6 en una amplia variedad de pacientes, incluyendo vasculares, y en el 80% de los casos redujeron las tHcy elevadas hasta el rango normal. (128)

Recientemente, Brattström sugirió que una combinación de 1 mg de ácido fólico y 0,4 mg de cianocobalamina es suficiente para lograr una reducción efectiva de homocisteína plasmática. (129)

Las dosis y combinaciones vitamínicas óptimas para producir una reducción máxima de tHcy en pa-

cientes coronarios aún no han sido establecidas. Tampoco se determinó el efecto de la disminución de las concentraciones de tHcy sobre el riesgo vascular.

Trasplante cardíaco

La aterosclerosis coronaria es la mayor causa de morbi-mortalidad en los trasplantados cardíacos, y las concentraciones de tHcy se encontraron aumentadas. (130, 131) Berger y colaboradores publicaron un trabajo con 44 pacientes en los que los niveles de tHcy aumentaron un 70% luego de un trasplante de corazón, mientras que los niveles de vitamina B12 y folato disminuyeron en un 49% y un 20% respectivamente. (131) La tasa de filtración glomerular también disminuyó un 25%. (131) El deterioro de la función renal posiblemente se debió a la toxicidad de los agentes inmunodepresores. Los mecanismos de estas alteraciones en el metabolismo de la homocisteína requiere de posteriores evaluaciones; sin embargo, ya habíamos visto que existe una correlación negativa entre tHcy y los niveles vitamínicos y que en la insuficiencia renal existiría una menor capacidad de captación de la homocisteína por el parénquima renal. Los resultados sugieren que se trata de una etiología compleja y probablemente multifactorial.

CONCLUSIONES

La homocisteína, aminoácido que en un principio ha sido estudiado por ser un intermediario en el metabolismo de la metionina, comenzó a cobrar interés desde que se describió su presencia en la orina de pacientes que presentaban una serie de anomalías, entre las cuales llamaron la atención las afecciones vasculares oclusivas en edad temprana.

Posteriormente, un gran número de estudios epidemiológicos permitió relacionar las concentraciones moderadamente elevadas de homocisteína plasmática con tromboembolismo arterial y venoso. En los últimos años se ha podido concluir que las concentraciones de homocisteína plasmática mayores de 15,8 μ moles/litro constituyen un factor de riesgo de tromboembolismo vascular independiente de cualquier otro factor metabólico conocido.

La determinación en plasma de estos bajos niveles ha sido posibilitada por el desarrollo de nuevas técnicas de medición que incluyen su separación y cuantificación por cromatografía líquida de alta presión de la homocisteína libre, así como acomplejada con moléculas fluorescentes.

Los mecanismos de acción por los cuales la homocisteína es responsable de la tendencia aterogénica y trombótica no están totalmente dilucidados, aunque se sabe por estudios *in vivo* e *in vitro* que induce la agregación plaquetaria, activa los procesos de coagulación y ejerce efectos deletéreos sobre el endotelio.

La participación en su metabolismo de cofactores como las vitaminas B12 y B6 y del cosustrato folato estimuló la realización de un gran número de investigaciones tendientes a encontrar un tratamiento capaz de reducir la hiperhomocisteinemia. Distintas fórmulas que incluyen a estas vitaminas fueron ensayadas con éxito; sin embargo no existe acuerdo sobre cuál es la combinación y dosis más eficaz.

Un gran número de publicaciones aconseja tratamientos vitamínicos, por la falta de efectos colaterales adversos y por su accesibilidad, a pesar de que aún no se estableció que la reducción de los niveles plasmáticos de homocisteína permita retraer los acontecimientos trombóticos y embólicos.

En la actualidad se acepta a la hiperhomocisteinemia como un factor más de riesgo de enfermedades vasculares oclusivas. Esto explicaría en parte las afecciones coronarias en pacientes que no presentan dislipemia, hipertensión u otros factores de riesgo convencionales.

SUMMARY

PLASMA HOMOCYSTEINE: INDEPENDENT RISK FACTOR FOR OCCLUSIVE VASCULAR DISEASE

Determination of total homocysteine in plasma is becoming an important procedure in clinical chemistry, since high homocysteine levels may damage blood vessels, causing atherosclerosis, or clogging of the heart arteries. Numerous studies established that moderate hyperhomocysteinemia is a major independent risk factor for the development and progression of occlusive vascular disease. Several conditions are known to elevate homocysteine in plasma above normal levels, including inborn errors of metabolism, nutritional status and treatment with drugs. Possible mechanisms by which elevated homocysteine levels lead to vascular disease include effects on platelets, clotting factors and endothelium. Low serum vitamins B6 and B12 and folate levels are often associated with high homocysteine in plasma concentration and can be reduced by vitamin supplementation. Thus, atherosclerotic lesions and thrombosis related to hyperhomocysteinemia might be prevented with a higher vitamin intake. However, no clinical trials have been conducted.

Key words Homocysteine - Risk factor - Vitamins - Occlusive vascular disease

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a la Dra. María P. Neuman y al Dr. José Neuman por la lectura del manuscrito y por sus valiosos comentarios.

BIBLIOGRAFIA

1. De Vigneaud VE. Trail of research in sulfur chemistry and metabolism, and related fields. Ithaca, NY, Cornell University Press, 1952.
2. Carson NAJ, Neill DW. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child* 1962; 37: 505-513.
3. Gerritsen T, Waisman HA. Homocystinuria, an error in the metabolism of methionine. *Pediatrics* 1964; 33: 413-420.
4. Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverence F, Laster L: Homocystinuria: an enzymatic defect. *Science* 1964; 143: 1443-1445.
5. Skovby F. Homocystinuria. Clinical, biochemical and genetic aspects of cystathionine β -synthase and its deficiency in man. *Acta Pediatr Scand* 1985; 321: 1-21.
6. McCully KS. Homocysteine theory of arteriosclerosis: development and current status. *Atherosclerosis Reviews* 1983; 11: 157-246.
7. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals: the biochemical basis for homocystinuria. *Metabolism* 1974; 23: 387-398.
8. Ueland PM, Refsum H, Svardal AM, Djurhuus R, Helland S. Perturbation of homocysteine metabolism by pharmacological agents in experimental and clinical use. *En: Aarbakke J, Chiang PK, Koeffler HP (eds). Tumor cell differentiation. Biology and pharmacology.* Clifton, New Jersey, Humana Press, 1987; 269-278.
9. Ueland PM. Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol Rev* 1982; 34: 223-253.
10. Cantoni GL. The centrality of S-adenosylhomocysteine in the regulation of the biological utilization of S-adenosylmethionine. *En: Borchard RT, Creveling CR, Ueland PM (eds). Biological methylation and drug design. Experimental and clinical roles of S-adenosylmethionine.* Clifton, New Jersey, Humana Press, 1986; 227-238.
11. Mudd SH, Levy HL. Disorders of transsulfuration. *En: Standbury JB (ed). Metabolic basis of inherited diseases.* New York, McGraw-Hill Publications, 1983; 522-559.
12. Stipanuk MH. Metabolism of sulfur-containing amino acids. *Ann Rev Nutr* 1986; 6: 179-209.
13. Frasca V, Banerjee RV, Dunham WR, Sands RH, Matthews RG. Cobalamin-dependent methionine synthase from *Escherichia coli* B; electron paramagnetic spectra of the inactive form and the active methylated form of the enzyme. *Biochemistry* 1988; 27: 8448-8465.
14. Skiba WE, Taylor MP, Wells MS, Magnum JH, Awad WMJ. Human hepatic methionine biosynthesis. Purification and characterization of betaine: homocysteine S-methyltransferase. *J Biol Chem* 1982; 257: 14944-14948.
15. Finkelstein JD, Kyle WE, Harris BJ. Methionine metabolism in mammals. Regulation of homocysteine methyltransferases in rat tissue. *Arch Biochem Biophys* 1971; 146: 84-92.
16. Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Chem* 1984; 259: 9508-9513.
17. Finkelstein JD, Martin JJ, Harris BJ. Methionine metabolism in mammals. The methionine-sparing effect of cysteine. *J Biol Chem* 1988; 263: 11750-11754.
18. Ueland PM, Helland S, Broch OJ, Schanche JS. Homocysteine in tissues of the mouse and rat. *J Biol Chem* 1984; 259: 2360-2364.
19. Svardal A, Refsum H, Ueland PM. Determination of in vivo protein binding of homocysteine and its relation to free homocysteine in the liver and other tissues of the rat. *J Biol Chem* 1986; 261: 3156-3163.
20. Svardal AM, Djurhuus R, Ueland PM. Disposition of homocysteine and S-3-deazaadenosylhomocysteine in cells exposed to 3-deazaadenosine. *Mol Pharmacol* 1986; 30: 154-158.

21. Mansoor MA, Svardal AM, Ueland PM. Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine and glutathione in human plasma. *Anal Biochem* 1992; 200: 218-229.
22. Refsum H, Helland S, Ueland PM. Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin Chem* 1985; 31: 624-628.
23. Malinow MR, Axthelm MK, Meredith MJ, MacDonald NA, Upson BM: Synthesis and transsulfuration of homocysteine in blood. *J Lab Clin Med* 1994; 123: 421-442.
24. Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R y col. Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex difference and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. *Clin Chem* 1994; 40: 873-881.
25. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Anderson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993; 39: 1764-1779.
26. Fridman O, D'Eramo JL, Romo HP, Feierstein C, Finkelstein AE. Homocisteína plasmática por HPLC y detección electroquímica con electrodo de "glassy-carbon". XXXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica. Córdoba, 1995. Libro de Resúmenes: M 126.
27. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. Disorders of transsulfuration. *En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). The Metabolic Basis of Inherited Disease, Vol 1, 6th ed.* New York, McGraw-Hill, 1989; 693-734.
28. Cacciari E, Salardi S. Clinical and laboratory features of homocystinuria. *Haemostasis* 1989; 19 (Suppl 1): 10-13.
29. McKusick VA, Hall JG, Char F. The clinical and genetic characteristics of homocystinuria. *En: Carson MAJ, Raine DN (eds). Inherited Disorders of Sulphur Metabolism. Proceedings of the Eighth Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors in Metabolism.* London, Churchill Livingstone, 1971; 179-203.
30. Vandresse JH, de Saint Hubert E, Evrard P. Homocystinuria and carotid arteriography. *Neurocardiology* 1978; 17: 57-58.
31. McKusick VA (ed). Homocystinuria. *En: Heritable Disorders of Connective Tissue (4th ed).* St Louis, Missouri, Mosby, 1972; 224-281.
32. Zimmerman R, Sherry RG, Elwood JC y col. Vascular thrombosis and homocystinuria. *Am J Roentgenol* 1987; 148: 953-957.
33. Erbe RW. Inborn errors of folate metabolism. *En: Blackely RL (ed). Folates and Pterins: Nutritional, Pharmacological and Physiological Aspects.* Boston, Massachusetts, Wiley, 1986; 413-465.
34. Mudd SH, Skovby F, Levy HL y col. The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 1-31.
35. Dunn HG, Perry TL, Dolman CL. Homocystinuria. A recently discovered cause of mental defect and cerebrovascular thrombosis. *Neurology* 1966; 16: 407-420.
36. McCully KS. Vascular pathology of homocystinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-128.
37. Wilcken DEL, Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease: a possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest* 1976; 57: 1079-1082.
38. Ueland PM, Refsum H, Brattström LE. Plasma homocysteine and cardiovascular disease. *En: Francis RB Jr (ed). Atherosclerotic Cardiovascular Disease, Hemostasis and Endothelial Function.* New York, Marcel Dekker, 1992; 183-236.
39. McCully KS. Vascular pathology of homocystinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-128.
40. Cooper BA, Rosenberg DS. Inherited defects of vitamin B12 metabolism. *Ann Rev Surg* 1987; 7: 291-320.
41. Fenton WA, Rosenberg LE. Inherited disorders of cobalamin transport and metabolism. *En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). New York, Mc Graw-Hill, 1995; 3129-3149.*
42. Rosenblatt DS. Inherited disorders of folate transport and metabolism. *En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). New York, Mc Graw-Hill, 1995; 3111-3128.*
43. Goyette P, Summer JS, Milos R y col. Human methyltetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1995; 7: 195-200.
44. Goyette P, Frost P, Rosenblatt DS, Rozen R. Seven novel mutations in the methyltetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methyltetrahydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1052-1059.
45. Kang S-S, Wang PWK, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methyltetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 536-545.
46. Kang S-S, Passen EL, Ruggie N, Wong PWK, Sora J. Thermolabile defect of methyltetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 1993; 88: 1463-1469.
47. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Shepard CA, Matthews RG y col. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methyltetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-113.
48. Kang S-S, Wong PWK, Cook HY, Norusis M, Messer JV. Protein-bound homocysteine. A possible risk factor for coronary disease. *J Clin Invest* 1986; 77: 1482-1486.
49. Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocystinemia in an elderly population. *JAMA* 1993; 270: 2693-2698.
50. Anderson A, Brattström LE, Israelsson B, Isaksson A, Hamlet A, Hultberg BL. Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 79-87.
51. Nordström M, Kjellström T. Age dependency of cystathionine beta synthase activity in human fibroblasts in homocystinemia and atherosclerotic vascular disease. *Atherosclerosis* 1992; 94: 213-221.
52. Boers GH, Smals AG, Trijbels FJ, Leermakers AI, Kloppenborg PW. Unique efficiency of methionine metabolism in premenopausal women may protect against vascular disease in the reproductive years. *J Clin Invest* 1983; 72: 1971-1976.
53. Wu LL, Wu J, Hunt SC y col. Plasma homocysteine as a risk factor for early familial coronary artery disease. *Clin Chem* 1994; 40: 552-561.
54. Ubbink JB, Delport R, Vermaak WJH. Plasma homocysteine concentrations in a population with a low coronary heart disease prevalence. *J Nutr* 1996; 126: 1254-1257.
55. Brattström LE, Lindgren A, Israelsson B y col. Hyperhomocystinemia in stroke: prevalence, cause and relationships to type of stroke and stroke risk factors. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 214-221.
56. Wilcken DEL, Gupta VJ. Sulfur containing amino acids in chronic renal failure with particular reference to homocysteine and cysteine-homocysteine mixed disulfide. *Eur J Clin Invest* 1979; 9: 301-307.
57. Chauveau P, Bernardette C, Coudé M y col. Hyperhomocystinemia, a risk factor for atherosclerosis in chronic uremic patients. *Kidney Int* 1993; 43: S72-S77.
58. Brattström LE, Israelsson B, Lindgarde F, Hultberg BL. Higher total plasma homocysteine in vitamin B12 deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Metabolism* 1988; 37: 175-178.
59. Kang S-S, Wong PWK, Norusis M. Homocystinemia due to folate deficiency. *Metabolism* 1987; 36: 458-462.
60. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Elevation of total homocysteine in the se-

- rum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Invest* 1988; 81: 466-474.
61. Lindenbaum J, Rosenberg IH, Wilson PWF, Stabler SP, Allen RH. Prevalence of cobalamin deficiency in the Framingham elderly population. *Am J Clin Nutr* 1994; 60: 2-11.
 62. Ubbink JB, Vermaak WJH, van der Merwe A, Becker PJ. B-12, vitamin B-6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 47-53.
 63. Miller JW, Ribaya-Mercado JD, Russel RM y col. Effect of vitamin B-6 deficiency on fasting plasma homocysteine concentrations. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 1154-1160.
 64. 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; 114: 473-501.
 65. Taylor LM Jr, DeFrang RD, Harris EJ Jr, Porter JM. The association of elevated plasma homocysteine with progression of symptomatic peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 1991; 13: 128-136.
 66. Blakenborn DH, Malinow MR, Mack WJ. Colestipol plus niacin therapy elevates plasma homocysteine levels. *Coron Art Dis* 1991; 2: 357-360.
 67. Wong PWK, Kang S-S. Accelerated atherosclerosis. *Am J Med* 1988; 84: 1093-1094.
 68. van der Mooren MJ, Wouters MG, Blom HJ, Schellekens LA, Eskes TKAB, Rolland R. Hormone replacement therapy may reduce high serum homocysteine in postmenopausal women. *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 733-736.
 69. Harker LA, Slichter SJ, Scott CR, Ross R. Homocysteinemia: vascular injury and arterial thrombosis. *N Engl J Med* 1974; 291: 537-543.
 70. Harker LA, Ross R, Slichter SJ y col. Homocysteine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 1976; 58: 731-741.
 71. Reddy GSR, Wilcken DEL. Experimental homocysteinemia in pigs: comparison with studies in sixteen homocysteinuric patients. *Metabolism* 1982; 31: 778-783.
 72. Smolin LA, Cremshaw TD, Kurtycz D, Benevenga NJ. Homocysteine accumulation in pigs fed diets deficient in vitamin B-6: relationship to atherosclerosis. *J Nutr* 1983; 113: 2122-2133.
 73. Wall RT, Harlan JM, Harker LA, Striker GE. Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury. *Thromb Res* 1980; 18: 113-121.
 74. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* 1986; 77: 1370-1376.
 75. Rosenberg LE. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. *En: Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS y col (eds). The Metabolic Basis of Inherited Disease (5th ed). New York, McGraw-Hill, 1983; 476-497.*
 76. Pangalamala RV, Karpen CW, Merola AJ. Peroxide mediated effects of homocysteine on arterial prostacyclin synthesis. *Prostaglandins Leukotrienes and Medicine* 1986; 22: 349-356.
 77. Whorton P, Montgomery P, Kent RS. Effect of hydrogen peroxide on prostaglandin production and cellular integrity in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 1985; 76: 295-302.
 78. Henrickson T, Mahoney EM, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis* 1983; 3: 149-159.
 79. Heinecke JW, Rosen H, Chait A. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* 1984; 74: 1890-1894.
 80. Parthesarathy S, Fong LG, Otero D, Steinberg D. Recognition of solubilized apoproteins from delipidated, oxidized low density lipoprotein (LDL) by the acetyl-LDL receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 537-540.
 81. Montgomery RR, Nathan CF, Cohn ZA. Effects of reagent and cell-generated hydrogen peroxide on the properties of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 6631-6635.
 82. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O y col. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 1993; 91: 308-318.
 83. Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M y col. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6369-6373.
 84. Tsai JC, Wang H, Perrella MA, Yoshizumi M, Sibinga NES, Tan LC y col. Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1996; 97: 146-153.
 85. Rodgers GM, Kane WH. Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest* 1986; 77: 1909-1916.
 86. Rodgers GM, Conn MT. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood* 1990; 75: 895-901.
 87. Lentz SR, Sadler JE. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest* 1991; 88: 1906-1914.
 88. Hayashi T, Honda G, Suzuki K. An atherogenic stimulus homocysteine inhibits cofactor activity of thrombomodulin and enhances thrombomodulin expression in human umbilical vein endothelial cells. *Blood* 1992; 79: 2930-2936.
 89. Nishinaga M, Ozawa T, Shimada K. Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparin sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; 92: 1381-1386.
 90. Lentz SR, Sadler JE. Homocysteine inhibits von Willebrand factor processing and secretion by preventing transport from the endoplasmic reticulum. *Blood* 1993; 81: 683-689.
 91. Hajjar KA. Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J Clin Invest* 1993; 91: 2873-2879.
 92. Von Eckardstein A, Malinow MR, Upson B. Effects of age, lipoproteins, and hemostatic parameters on the role of homocysteinemia as a cardiovascular risk factor in men. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 960-964.
 93. Fryer RH, Wilson BD, Gubier DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 1327-1333.
 94. Genest JJ, McNamara JR, Upson B y col. Prevalence of familial hyperhomocysteinemia in men with premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 1129-1136.
 95. Pancharuniti N, Lewis CA, Sauberlich HE y col. Plasma homocysteine, folate, and vitamin B-12 concentrations and risk for early-onset coronary artery disease. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 940-948.
 96. Boers GHJ, Smals AGH, Trijbels FJM, Fowler B, Bakkeren JA, Schoondrwaldt HJ y col. Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. *N Engl J Med* 1985; 313: 709-715.
 97. Clarke R, Daly L, Robinson K y col. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1149-1155.
 98. Murphy-Chutorian DR, Wexman MP, Grieco AJ y col. Methionine intolerance: a possible risk factor coronary artery disease. (Published erratum appears in *J Am Coll Cardiol* 1986; 7: 450). *J Am Coll Cardiol* 1985; 6: 725-730.
 99. Malinow MR, Kang S-S, Taylor LM y col. Prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1989; 79: 1180-1188.
 100. Israelsson B, Brattström LE, Hultberg BL. Homocysteine and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1988; 71: 227-233.
 101. Ubbink JB, Vermaak WJH, Bennett JM, Becker PJ, van Staden DA, Bissbort S. The prevalence of homocysteinemia and

- hypercholesterolemia in angiographically defined coronary heart disease. *Klin Wochenschr* 1991; 69: 527-534.
102. Brattström LE, Israelsson B, Norrving B y col. Impaired homocysteine metabolism in early-onset cerebral and peripheral occlusive arterial disease: effects of pyridoxine and folic acid treatment. *Atherosclerosis* 1990; 81: 51-60.
 103. Araki A, Sako Y, Fukushima Y, Matsumoto M, Asada T, Kita T. Plasma sulphhydryl-containing amino acids in patients with cerebral infarction and in hypertensive subjects. *Atherosclerosis* 1989; 79: 139-146.
 104. Coull BM, Malinow MR, Beamer N, Sexton G, Nordt F, de Garmo P. Elevated plasma homocysteine concentration as a possible independent risk factor for stroke. *Stroke* 1990; 21: 572-576.
 105. Brattström LE, Hardebo JE, Hultberg BL. Moderate homocysteinemia; a possible risk factor for arteriosclerotic cerebrovascular disease. *Stroke* 1984; 15: 1012-1016.
 106. Mølgaard J, Malinow MR, Lassvik C, Holm AC, Upson B, Olsson AG. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for intermittent claudication. *J Intern Med* 1992; 231: 273-279.
 107. Arnesen E, Refsum H, Bonna KH, Ueland PM, Forde OH, Nordrehaug JE. Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 1995; 24: 704-709.
 108. Stampfer MJ, Malinow MR, Willet WC y col. A prospective study of plasma homocysteine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992; 268: 877-881.
 109. Dudman NPB, Wilcken DEL, Wang J, Lynch JF, Macey D, Lundberg P. Disordered methionine/homocysteine metabolism in premature vascular disease. Its occurrence, cofactor therapy, and enzymology. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 1253-1260.
 110. Graham IM. Homocysteinemia and vascular disease. *En: Vuylsteek K, Hallen M (eds). Epidemiology. Luxembourg, Commission of the European Community, IOS Press, 1994; 332-353.*
 111. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG y col. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid artery stenosis. *N Engl J Med* 1995; 332: 286-291.
 112. den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Bos GMJ, Briet E, Reitsma PH y col. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 759-762.
 113. Wilcken DEL, Reddy GSR, Gupta VJ. Homocysteinemia, ischemic heart disease, and the carrier state for homocystinuria. *Metabolism* 1983; 32: 363-370.
 114. Robinson K (ed). *Homocysteinemia and vascular disease. Luxembourg, Commission of the European Communities, 1990.*
 115. Robinson K, Mayer EL, Miller DP y col. Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate: independent and reversible risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1995; 92: 2825-2830.
 116. Rinehart JF, Greenberg LD. Arteriosclerotic lesions in pyridoxine-deficient monkeys. *Am J Pathol* 1949; 25: 481-491.
 117. Krishnaswamy K, Rao SB. Failure to produce atherosclerosis in macaca radiata on a high-methionine, high-fat, pyridoxine-deficient diet. *Atherosclerosis* 1977; 27: 253-258.
 118. Williams RR, Malinow MR, Hunt SC y col. Hyperhomocysteinemia in Utah siblings with early coronary disease. *Coron Artery Dis* 1990; 1: 681-685.
 119. Glueck CJ, Shaw P, Lang J, Tracy T, Seive-Smith L, Wang Y. Evidence that homocysteine is an independent risk factor for atherosclerosis in hyperlipidemic patients. *Am J Cardiol* 1995; 75: 132-136.
 120. Bergmark C, Mansoor MA, Swedenborg J, de Faire U, Svardal AM, Ueland PM. Hyperhomocysteinemia in patients operated for lower extremity ischaemia below the age of 50: effect of smoking and extent of disease. *Eur J Vasc Surg* 1993; 7: 391-396.
 121. Nygård O, Vollset SE, Refsum H y col. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* 1995; 274: 1526-1533.
 122. Hultberg B, Berglund M, Andersson A, Frank A. Elevated plasma homocysteine in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 687-689.
 123. Cravo ML, Gloria LM, Selhub J, Nadeau MR, Camilo RE, Resende MP y col. Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 220-224.
 124. Franken DG, Boers GH, Blom HL, Trijbels FJ, Kloppenborg PW. Treatment of mild homocysteinemia in vascular disease patients. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 465-470.
 125. Ryan M, Robinson K, Clarke R, Refsum H, Ueland P, Graham I. Vitamin B6 and folate reduce homocysteine concentrations in coronary artery disease (resumen). *Ir J Med Sci* 1993; 162: 197A.
 126. Saltzman E, Mason JB, Jacques PF y col. B vitamin supplementation lowers homocysteine levels in heart disease (resumen). *Clin Res* 1994; 42: 172A.
 127. Landgren F, Israelsson B, Lindgren A, Hultberg BL, Andersson A, Brattström LE. Plasma homocysteine in acute myocardial infarction: homocysteine-lowering effect of folic acid. *J Intern Med* 1995; 237: 381-388.
 128. Naurath HJ, Joosten E, Reizler R, Stabler SP, Allen RH, Lindenbaum J. Effects of vitamin B12, folate, and vitamin B6 supplements in elderly people with normal serum vitamin concentrations. *Lancet* 1995; 346: 85-89.
 129. Brattström L. Vitamins as homocysteine-lowering agents. *J Nutr* 1996; 126: 1276S-1280S.
 130. Ambrosi P, Barlatier A, Habib G y col. Hyperhomocysteinemia in heart transplant recipients. *Eur Heart J* 1994; 15: 1191-1195.
 131. Berger PB, Jones JD, Olson LJ y col. Increase in total plasma homocysteine concentration after cardiac transplantation. *Mayo Clin Proc* 1995; 70: 125-131.