

Homocisteinemia de la población de Buenos Aires: una realidad alejada de la idealidad

Irene L. Quintana¹, María M. Castañón¹, Alicia Murúa², Lucía C. Kordich¹

¹Área Análisis Biológicos, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

²Sociedad Argentina de Medicina Vascular.

Dirección postal: Irene Quintana, Laboratorio de Hemostasia y Trombosis. Dpto. Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pabellón II, 4º piso. Ciudad Universitaria. C1428 EHA Buenos Aires, Argentina. Tel /Fax: (54) 11 4576 3342. E-mail: lht@qb.fcen.uba.ar

Fecha de recepción: 19-02-02

Fecha de aprobación: 01-03-02



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA, Vol. 6 N° 1: 2-7
Enero-Abril, 2002

RESUMEN

Numerosas evidencias científicas indican que una concentración elevada de homocisteína plasmática (hiperhomocisteinemia) sería un factor de riesgo independiente para las enfermedades vasculares oclusivas, tanto o más importante que el colesterol, el tabaquismo o la hipertensión. Surge entonces la necesidad de conocer y determinar los niveles normales de homocisteinemia. En nuestro estudio se analizaron las muestras de 151 individuos (3 a 59 años) aparentemente sanos, obteniéndose un valor de homocisteína total = 12.1 ± 3.6 $\mu\text{mol/l}$ (media \pm DE). Además, se evaluaron los datos registrados para dos grupos etáreos extremos, obteniéndose 6.4 ± 2.6 $\mu\text{mol/l}$ (neonatos) y 13.6 ± 5.9 $\mu\text{mol/l}$ (> 60 años). Se encontró que la homocisteinemia se incrementa con la edad, aún en el grupo de 3 a 59 años, y el valor medio es significativamente mayor en los hombres que en las mujeres. Los datos evaluados mostraron que la concentración de homocisteína total para el 95% de la población general varía entre 5.0 y 19.2 $\mu\text{mol/l}$. El valor elevado del límite superior de este rango sugiere que, probablemente han sido incluidos individuos con niveles vitamínicos subóptimos, consistentes con los hábitos alimentarios de nuestro medio. Además, estudios internacionales proponen valores de corte para hiperhomocisteinemia notablemente menores (≤ 12 $\mu\text{mol/l}$) al que surge de nuestro intervalo (19.2 $\mu\text{mol/l}$). Por lo tanto los niveles de homocisteína plasmática obtenidos para la población de Buenos Aires no deben considerarse como valores de referencia o normales, sino por el contrario, deben alertar acerca del posible riesgo vascular asociado.

Palabras claves: Homocisteinemia, Valores de referencia, Factor de riesgo aterotrombótico.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años la determinación de la concentración plasmática o sérica de homocisteína (Hcy) ha cobrado importancia. El interés surgió porque numerosos estudios epidemiológicos han

postulado que niveles elevados de Hcy constituyen un importante factor de riesgo independiente para la enfermedad aterotrombótica, afectando el sistema vascular coronario, cerebral y periférico^{1,3}.

La Hcy es un aminoácido formado durante la conversión metabólica de la metionina de origen dietario. La Hcy puede ser metabolizada por dos vías alternativas de remetilación a metionina o por el camino irreversible de la transulfuración a cisteína. Según el camino metabólico, las reacciones son catalizadas por las siguientes enzimas: metionina-sintetasa, betaín-homocisteín-metiltransferasa y cistationin- β sintetasa. Actúan como cofactores las vitaminas B₆ y B₁₂ y como dadores de grupos metilos necesarios para la remetilación, intervienen el metiltetrahidrofolato y la betaína⁴.

En el plasma la Hcy puede encontrarse en su forma reducida (alrededor de 1%) u oxidada. En este último caso la Hcy forma dímeros a través de puentes disulfuros, tales como Hcy-Hcy (homocistina) y Hcy-cisteína (disulfuro mixto) o da lugar a la forma cíclica denominada Hcy tiolactona. Si bien la Hcy reducida y los dos disulfuros existen en forma libre, la mayor proporción de estas especies (aproximadamente un 80%) circulan unidas a proteínas, fundamentalmente a la albúmina⁵.

Se define Hcy plasmática total a la suma de todas las especies de Hcy circulantes. El aumento en circulación de este aminoácido (hiperhomocisteinemia) puede ser originado por causas congénitas y/o adquiridas. Entre las primeras se describen las deficiencias o alteraciones de las enzimas involucradas en el metabolismo^{6,7}. Las causas adquiridas incluyen niveles bajos de ácido fólico, vitaminas B₆ y B₁₂; insuficiencia renal crónica, psoriasis, cáncer, hipotiroidismo y el uso de ciertas drogas (metotrexate, carbamazepina, hidrocortizida, teofilina, óxido nitroso, etc)⁸. Es conocido que el sexo y la edad influyen sobre la homocis-

teinemia. Aparentemente numerosas variables afectan los niveles de Hcy circulante, sin embargo la mayoría de los factores mencionados confluyen en un factor común: el nivel vitamínico del individuo.

En 1969 K. McCully fue el primero en postular una relación entre la homocistinuria y la enfermedad aterosclerótica⁹, pero recién a comienzos de 1990 comenzaron los estudios epidemiológicos importantes, ya que se disponía de métodos de dosaje de Hcy más accesibles. Actualmente existen varias técnicas analíticas para determinar la homocisteinemia, como la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), la Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masa, el Enzimoimmunoensayo (EIA), Inmunoensayo con Fluorescencia Polarizada (FPIA) y la Electroforesis Capilar¹⁰.

Dadas las implicancias clínicas asociadas a la hiperhomocisteinemia el objetivo de este trabajo fue evaluar los niveles plasmáticos de homocisteína total en la población de Buenos Aires para establecer los valores de referencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población

Los individuos que participaron en este estudio fueron seleccionados aleatoriamente entre estudiantes, docentes, personal administrativo y de maestría de diversas facultades de la Universidad de Buenos Aires (Argentina). Además, se incluyeron familiares de sujetos pertenecientes a la Institución no incorporados en el presente estudio. Durante un período de 6 meses se extrajeron las muestras sanguíneas correspondientes a voluntarios aparentemente sanos y en particular se excluyeron del estudio aquellos individuos que declararon el uso de drogas que afectan los niveles de la Hcy; ser portadores de enfermedad vascular sintomática, enfermedad renal, psoriasis y otras patologías asociadas a incrementos en los niveles de Hcy.

Los individuos fueron clasificados según la siguiente distribución etárea: *Grupo A*: neonatos; *Grupo B*: de 3 a 59 años y *Grupo C*, > 60 años.

En todos los casos se obtuvo el consentimiento de cada participante del estudio, o el de los padres en el caso de los individuos menores de edad.

Muestras

Se extrajo sangre a los voluntarios en ayunas, con EDTA tripotásico 10%, 50 µL de anticoagulante + 5 ml de sangre como anticoagulante. Las muestras fueron enfriadas inmediatamente y centrifugadas (2.000 x g, 10 minutos) dentro de la primera hora de

extracción. Los plasmas obtenidos fueron congelados a -70 °C. Se descartaron aquellas muestras que mostraron hemólisis.

Método

Los niveles de Hcy fueron determinados utilizando una técnica de enzimoimmunoensayo (EIA, Axis Biochemicals ASA, Noruega).

Previamente, realizamos la validación de esta técnica de EIA¹¹, mediante estudios de precisión y comparación con el método de referencia para homocisteinemia (HPLC). Para un amplio rango de concentraciones (2-54 µM) los coeficientes de variación intra e inter-ensayo resultaron ≤ 8.5%. En cuanto a la comparación entre EIA y HPLC se encontró que la regresión lineal entre ambos métodos presentaba un alto coeficiente de correlación de Pearson ($r = 0.984$) y una pendiente igual a 0.952. Además, el procedimiento de Bland-Altman mostró que el promedio de la diferencia de los valores de cada muestra obtenidos por las dos técnicas era 0.5 µM. Estos resultados sugieren que la técnica de enzimoimmunoensayo para la determinación de los niveles de homocisteína total, permite obtener datos reproducibles y confiables.

Este método requiere que las diferentes especies en que se encuentra la Hcy plasmática sean convertidas a Hcy libre mediante la acción reductora del ditiotreitól. La Hcy libre total es transformada en S-adenosil-L-homocisteína (SAH) con exceso de adenosina y por la acción de la SAH-hidrolasa. Se realiza un enzimoimmunoensayo en fase sólida, basado en la competición entre la SAH de la muestra y la SAH unida al medio soporte, por los sitios de unión de un anticuerpo monoclonal anti-SAH. Por el agregado de un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa y un sustrato que desarrolla color, se mide la actividad desarrollada espectrofotométricamente a 450 nm y los valores de absorbancia registrados son inversamente proporcionales a la concentración de SAH de la muestra. Todas las determinaciones fueron realizadas por el mismo operador y con un único aparato, un lector de ELISA (Reader 100, Organon Teknica, EEUU).

Métodos estadísticos

Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico "Statistix for Windows 2.1". En la etapa de análisis exploratorio de los datos se realizaron histogramas, box-plots, estudio de "outliers" y se evaluó normalidad con el test de Shapiro-Wilks. Las diferencias entre las medias de los distintos grupos fueron comparadas utilizando test de t, test de

Z o test de la mediana considerando diferencias significativas para $p < 0.05$.

RESULTADOS

Según los criterios de selección enunciados el número total de muestras analizadas fue 305, con la siguiente distribución: *Grupo A*, 32; *Grupo B*, 151 y *Grupo C*, 122.

Los niveles de Hcy para la población general o *Grupo B* mostraron una distribución normal (Figura 1) y los valores hallados se encuentran resumidos en la Tabla I. Cuando al *Grupo B* se lo dividió por sexo, el análisis estadístico también mostró una distribución normal de frecuencias de la homocisteinemia para cada uno de los sexos. Los datos indicaron que el valor promedio de Hcy es significativamente mayor en los hombres que en las mujeres.

Para evaluar si la concentración plasmática de Hcy está relacionada con la edad, se ordenaron los

sujetos del *Grupo B* en tres subgrupos etáreos. Los resultados correspondientes para cada subgrupo se muestran en la Tabla II. Se observa que el promedio de la concentración plasmática de Hcy aumenta con la edad, encontrándose diferencias significativas sólo entre el primer subgrupo y el segundo.

Se analizaron los datos correspondientes a dos grupos etáreos extremos, el de los neonatos (*Grupo A*) y el de los sujetos > 60 años (*Grupo C*). Los valores están resumidos en la Tabla III. Los niveles de Hcy del *Grupo A* siguieron una curva de distribución normal, mientras que los correspondientes al *Grupo C* mostraron una distribución no normal, con valores "outliers" o atípicos a la derecha de la curva de Gauss. Nuevamente se observó que la concentración plasmática de Hcy aumenta con la edad encontrándose diferencias significativas entre los valores de homocisteinemia del *Grupo A* vs *Grupo B* y entre el *Grupo B* vs *Grupo C*.

DISCUSIÓN

Basados en las evidencias de un número muy importante de estudios epidemiológicos, se ha postulado que la hiperhomocisteinemia está asociada a una mayor incidencia de aterosclerosis y trombosis. Estos hallazgos han planteado la inquietud y necesidad de establecer un rango de referencia para los niveles de Hcy plasmática de nuestra población. Varios investigadores han recomendado que los valores de referencia para la concentración de Hcy plasmática total deben establecerse en poblaciones aparentemente sanas y además, con adecuado nivel vitamínico.

Se determinó la media y su desvío estándar en cada uno de los tres grupos etáreos principales: *Grupo A* (neonatos), $6.4 \pm 2.6 \mu\text{mol/l}$; *Grupo B* (3 - 59 años), $12.1 \pm 3.6 \mu\text{mol/l}$ y *Grupo C* (> 60 años), $13.6 \pm 5.9 \mu\text{mol/l}$, observándose que los valores de

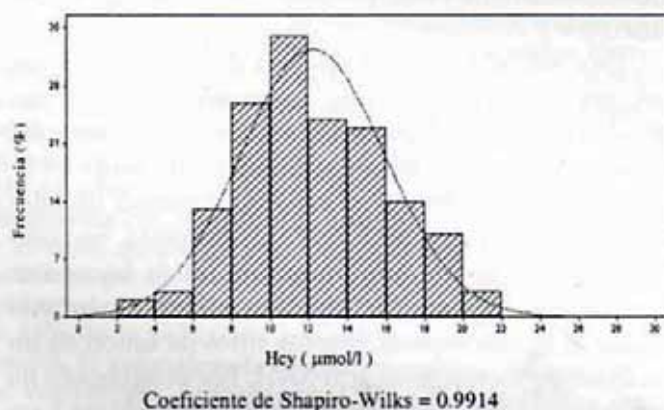


Fig. 1: Distribución de frecuencias de homocisteinemia para la población general (3 a 59 años).

TABLA I
Homocisteinemia en Buenos Aires. Resumen de resultados para la población general (3 a 59 años).

	n	Edad (años)		Nivel plasmático de Hcy ($\mu\text{mol/l}$)	
		Media \pm DE	Mediana (Rango)	Media \pm DE	Mediana (Rango)
Total	151	31.2 ± 14.0	30.0 (3-59)	12.1 ± 3.6	11.7 (3.1-20.1)
Hombres	58	28.0 ± 14.0	28.5 (3-59)	12.7 ± 3.8	12.4 (4.3-20.1)
Mujeres	93	32.7 ± 13.1	30.0 (4-59)	11.7 ± 3.4	11.5 (3.1-19.6)

DE: desvío estándar

Hcy_{Hombres} > Hcy_{Mujeres} ($p = 0.0493$, test de t)

TABLA II
Distribución de Homocisteinemia según edad y sexo para la población general (3 a 59 años).

Edad (años)		n	Nivel plasmático de Hcy ($\mu\text{mol}/\text{L}$)		
			Media \pm DE	Mediana (Rango)	
3 - 19	Total	30	9.7 \pm 3.6	8.9 (3.1 - 17.0)	$p^{*a} = 0.0654$
	Hombres	17	9.3 \pm 3.3	8.5 (4.3 - 17.0)	
	Mujeres	13	10.3 \pm 4.1	9.9 (3.1 - 15.6)	
20 - 39	Total	81	12.4 \pm 3.3	12.0 (5.0 - 19.7)	$p^* = 0.0001$
	Hombres	31	13.8 \pm 3.0	14.1 (7.3 - 19.7)	
	Mujeres	50	11.6 \pm 3.2	11.5 (5.0 - 18.5)	
40 - 59	Total	40	13.3 \pm 3.8	12.0 (6.8 - 20.1)	$p^b = 0.108$
	Hombres	10	15.1 \pm 3.2	15.2 (10.6 - 20.1)	
	Mujeres	30	12.7 \pm 3.8	11.6 (6.8 - 20.0)	

p^{*a} : Hcy_{Hombres} vs Hcy_{Mujeres} (test de θ).

p^* : Hcy_{3-19 años} vs Hcy_{20-39 años} (test de t).

p^* , t: Hcy_{Hombres} vs Hcy_{Mujeres} (test de t).

p^b : Hcy_{20-39 años} vs Hcy_{40-59 años} (test de t).

TABLA III
Distribución de homocisteinemia según edad. Análisis en grupos etáreos extremos.

	n	Media \pm DS	Mediana (Rango)	p
Grupo A (neonatos)	32	6.4 \pm 2.6	5.9 (2.4 - 10.3)	$p^{AB,t} = 0.0001$
Grupo B (3-59 años)	151	12.1 \pm 3.6	11.7 (3.1 - 20.1)	
Grupo C (> 60 años)	122	13.6 \pm 5.9	12.7 (5.0 - 41.0)	$p^{BC,z} = 0.007$

$p^{AB,t}$: Hcy_A vs Hcy_B, test de t.

$p^{BC,z}$: Hcy_B vs Hcy_C, test de z.

homocisteinemia se incrementan con la edad, aún dentro del Grupo B. También se encontró que los hombres muestran niveles de Hcy significativamente mayores que las mujeres. Esta diferencia entre los sexos tuvo significación estadística aún a pesar de que la media de las edades de las mujeres fue mayor que la de los hombres. Todos estos hallazgos coinciden con los presentados por otros autores¹².

Dado que la homocisteinemia es función de los niveles de folato, vitamina B₁₂ y posiblemente vitamina B₆, Ubbink *et al*¹³ utilizaron los datos obtenidos en individuos sometidos a suplementación vitamínica y desarrollaron un modelo matemático para establecer un rango de valores normales. De esta manera el intervalo para homocisteinemia propuesto fue de 4.9 a 11.7 $\mu\text{mol}/\text{l}$. También Rasmussen y colaboradores¹⁴ establecieron valores de referencia en una población con niveles óptimos de ácido fólico, obteniendo los siguientes rangos en función del sexo y la edad: 4.6 a 8.1 $\mu\text{mol}/\text{l}$ para hombres y mujeres de 20 a 29 años; 4.5 a 7.9 $\mu\text{mol}/\text{l}$ para mujeres y 6.3 a 11.2 $\mu\text{mol}/\text{l}$ para hombres, de 30 a 59 años y 5.8 a 11.9 $\mu\text{mol}/\text{l}$ para ambos sexos a partir de los 60 años.

Nuestro estudio mostró que los niveles plasmáticos de Hcy total para el 95% de la población de Buenos Aires con edad de 3 a 59 años, están comprendidos entre 5.0 y 19.2 $\mu\text{mol}/\text{l}$ (calculado como la media \pm 1.96 DE). Cabe cuestionarse si este rango corresponde al intervalo de referencia para homocisteinemia en nuestra ciudad. En un sentido, la respuesta sería afirmativa ya que estos valores fueron obtenidos del análisis estadístico propuesto por Altman¹⁵, para aquellos datos de una población aparentemente sana, con una distribución normal. Sin embargo, como se discutió anteriormente, el cálculo de los valores de referencia para la concentración plasmática de Hcy requiere de la participación de individuos no sólo aparentemente en buen estado de salud, sino con niveles séricos óptimos de folatos, vitamina B₁₂ y B₆. En el presente trabajo no se determinaron los niveles de estas vitaminas, pero dado el valor elevado del percentilo 97.5 = 19.2 $\mu\text{mol}/\text{l}$, podría sospecharse la presencia de deficiencias vitamínicas subclínicas en algunos de los individuos estudiados. En particular, este hecho fue confirmado en un estudio realizado en 44 sujetos del

Grupo C (> 60 años) que fueron sometidos a suplementación vitamínica farmacológica y/o dietaria¹⁶. Después del tratamiento, los niveles de Hcy descendieron más del 50% en todos los casos, alcanzando valores $\leq 9.5 \mu\text{mol/l}$. El grado de respuesta observado sugiere que, al menos en el Grupo C, existen portadores de déficit vitamínico, en especial de ácido fólico. Probablemente el resto de la población también presente niveles subóptimos de folato, principal dador de grupos metilos necesarios para la remetilación de la Hcy. La posible deficiencia vitamínica estaría asociada a los hábitos alimentarios de nuestro medio, caracterizados por un alto consumo de proteínas de origen animal y baja ingesta de alimentos con alto contenido de ácido fólico. Además, nuestra población presenta una alta prevalencia de la variante termolábil de la metilen-tetrahidrofolato-reductasa (heterocigota 42.8% y homocigota 15.8%), cuya actividad disminuida se pone de manifiesto cuando la concentración de folatos no es la apropiada¹⁷.

Si bien aún no está esclarecido si existe un valor umbral por debajo del cual la concentración de Hcy no confiere riesgo para el desarrollo de eventos aterotrombóticos, numerosos autores proponen valores límites superiores para homocisteinemia como prevención de enfermedades vasculares. En este sentido, Malinow *et al.*¹⁸ encontraron que el engrosamiento de la pared de la carótida se incrementaba significativamente cuando los niveles plasmáticos de Hcy eran $> 10.5 \mu\text{mol/l}$. Selhub *et al.*¹⁹ mostraron una fuerte asociación entre estenosis carotídea y homocisteinemia a partir de concentraciones de Hcy $> 11.4 \mu\text{mol/l}$. También se postuló que el riesgo de enfermedad coronaria se incrementa a partir de niveles de Hcy $\geq 11.7 \mu\text{mol/l}$ ^{20,21}. En 1997 Graham *et al.*²² propusieron un valor de corte de $12 \mu\text{mol/l}$ para hiperhomocisteinemia y su relación con el riesgo de enfermedad vascular. Recientemente el estudio NANHES III²³, realizado en 8086 participantes en EEUU, estableció como niveles elevados de Hcy a aquellos valores mayores al percentilo 95 registrados en una población sana, joven (edad 20 - 39 años), con un adecuado nivel sérico vitamínico y sin insuficiencia renal. Basados en este criterio, se definió como hiperhomocisteinemia a los niveles superiores a $10.4 \mu\text{mol/l}$ en las mujeres y $11.4 \mu\text{mol/l}$ en los hombres. Debe destacarse que en todos los estudios mencionados los valores de corte presentados son considerablemente más bajos que el límite de $15 \mu\text{mol/l}$ aceptado corrientemente¹⁰.

Teniendo en cuenta el criterio para definir niveles elevados de Hcy propuesto en NANHES III, nuestra población de 3 a 59 años de edad presentó un 44.1% y un 50.0% de hiperhomocisteinemia, en

mujeres y hombres respectivamente (NANHES III: 12.0 y 20.8%). En el caso de sujetos > 60 años, la proporción alcanzó el 63.1% (NANHES III: 48.3%). Se observa que la prevalencia de hiperhomocisteinemia en nuestra población es mucho mayor que la de la población de Estados Unidos.

En síntesis, la mayoría de los estudios realizados a nivel internacional coinciden en que los valores de Hcy superiores a $12 \mu\text{mol/l}$ e inclusive mayores a $10 \mu\text{mol/l}$ se asocian con un aumento significativo del riesgo de enfermedad vascular. Teniendo en cuenta estas observaciones, los valores de homocisteinemia hallados en el presente estudio no deberían considerarse como valores de referencia; por el contrario, sugieren que más del 50% de nuestra población estaría expuesto a un mayor riesgo del desarrollo de aterotrombosis.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por la Universidad de Buenos Aires (UBACYT TX 018).

SUMMARY

Several evidences suggest that high concentrations of plasmatic homocysteine (hyperhomocysteinemia) are an independent risk factor for occlusive vascular diseases, as much as cholesterol, smoking or hypertension. It is, therefore, vital to determine normal homocysteine levels. In our study, samples of 151 apparently healthy individuals (3-59 years old) were analyzed, showing a total homocysteine value of $12.1 \pm 3.6 \mu\text{mol/l}$ (mean \pm SD). Results obtained from two end-age groups were $6.4 \pm 2.6 \mu\text{mol/l}$ (newborns) and $13.6 \pm 5.9 \mu\text{mol/l}$ (> 60 years old). Moreover, it was found that homocysteinemia increases with age, even in the 3 to 59 year-old group, and that mean value is significantly higher in men than in women. Total homocysteine concentration in 95% general population ranges from 5.0 to $19.2 \mu\text{mol/l}$. This increased upper limit of the range suggests that the study probably included individuals with low vitamin status, which are consistent with our eating habits. Additionally, international epidemiological studies propose cut-off values ($\leq 12 \mu\text{mol/l}$) significantly lower than the one obtained in our study ($19.2 \mu\text{mol/l}$). Thus, plasmatic homocysteine levels determined in the population of Buenos Aires could not be considered normal or reference values. On the contrary, they alert on the existence of a possible vascular risk.

Key words: Homocysteinemia, Reference values, Atherothrombotic risk factor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Malinow MR, Kang SS, Taylor LM y col. Prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1989; 79: 1180-1188.
2. Brattstrom L, Lindgren A. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for stroke. *Neurol Res* 1992; 14: 81-84.

3. Stampfer M, Malinow R, Willett W y col. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992; 268: 877-881.
4. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990; 1: 228-237.
5. Ueland M. Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem* 1995; 41: 340-342.
6. Mudd SH, Skovby F, Levy H y col. The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 1-31.
7. Frosst P, Blom H, Milos R y col. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* 1995; 10: 111-113.
8. Schneede J, Refsum H, Ueland PM. Biological and environmental determinants of plasma homocysteine. *Semin Thromb Hemos* 2000; 26: 263-279.
9. Mc Cully K. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-128.
10. Ueland PM, Refsum H, Stabler S, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: Methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993; 39: 1764-1779.
11. Quintana I, Freeman D, Galarza C, Murúa A, Spence JD, Kordich L. Validation of an enzyme immunoassay for the determination of total homocysteine in plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000; 11: 235-238.
12. Nygård O, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 263-270.
13. Ubbink J, Becker P, Hayward Vermaak WJ, Delport R. Results of B-Vitamin supplementation study used in a prediction model to define a reference range for plasma homocysteine. *Clin Chem* 1995; 41/7: 1033-1037.
14. Rasmussen K, Moller J, Lyngbak M, Pedersen A, Dybkjaer L. Age- and gender- specific reference intervals for total homocysteine and methylmalonic acid in plasma before and after vitamin supplementation. *Clin Chem* 1996; 42/4: 630-636.
15. Altman DG. Some common problems in medical research. *Practical statistics for medical research*, 1992, 419-425, Chapman & Hall, London.
16. Murúa A, Quintana I, Janson J, Batista M, Camera M, Kordich L. Plasmatic homocysteine response to vitamin supplementation in elderly people. *Thromb Res* 2000; 100: 495-500.
17. Genoud V, Castañon M, Annichino-Bizzacchi J, Korin J, Kordich L. Prevalence of three prothrombotic polymorphisms: Factor V G1691A, Factor II G20210A and Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C 677T in Argentina. *Thromb Res* 2000; 100: 127-131.
18. Malinow MR, Nieto FJ, Szklo M, Chambless LE, Bond G. Carotid artery intima-medial wall thickening and plasma homocyst(e)ine in asymptomatic adults. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation*. 1993; 87: 1107-1113.
19. 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.
20. Pancharuniti N, Lewis CA, Sauberlich HE y col. Plasma homocyst(e)ine, folate, and vitamin B12 concentrations and risk for early-onset coronary artery disease. *Am J Clin Nutr*. 1994; 59: 940-948.
21. Perry U, Refsum H, Morris RW, Ebrahim SB, Ueland PM, Shaper AG. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet*. 1995; 346:1395-13988.
22. Graham IM, Daly LE, Refsum HM y col. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: The European Concerted Action Project *JAMA* 1997; 277: 1775-1781
23. Selhub J, Jacques PF, Rosemberg IH y col. Serum total homocysteine concentrations in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1991-1994): Population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentration. *Ann Intern Med* 1999; 131: 331-339.