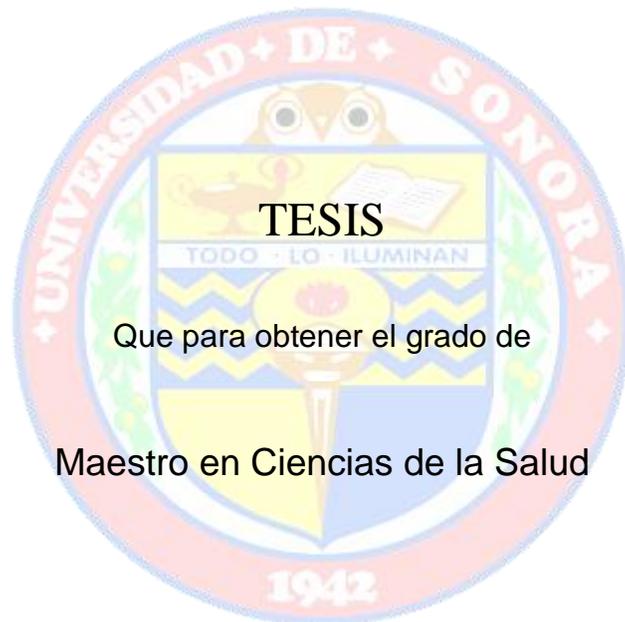


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Estimación de los Niveles de Homocisteína Sérica y de su Correlación con los Parámetros de Control Metabólico en Pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2 de una Unidad de Primer Nivel de Atención Médica de Hermosillo, Sonora



Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

PRESENTA

Alma Alicia Morales Zayas

Hermosillo, Sonora

Octubre de 2011

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Gobierno del Estado de Sonora por los recursos que proporcionaron para la elaboración de este trabajo a través del proyecto No. SON-2004-CO1-206 “Cuantificación Simultanea de Inmunoglobulina A1, Proteína C Reactiva y Homocisteína Plasmática, Para Evaluar el Riesgo de Complicaciones Vasculares en Pacientes con DM2”.

Agradezco también a la Dra. Maria del Carmen Candia Plata, directora de este trabajo, ya que desde la primera vez que se lo pedí he contado con su apoyo incondicional, me ha enseñado mucho y eso nunca lo voy a olvidar.

De la misma manera agradezco a los miembros del jurado que califico este trabajo, en especial a la Dra. Patricia Torres Chávez, su apoyo ha sido de gran valor para mí, muchas gracias.

Otra persona la que quiero agradecer es a la M. en C. Miriam Denisse García Villa, mi compañera de desvelos y trabajo, gracias amiga por tu ayuda y compañía que fueron muy importantes.

Agradezco de la misma manera a todas las personas que forman parte del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud por haberme permitido ser parte de esta institución y por darme la oportunidad de desarrollarme en la investigación.

Y por último quiero agradecer a las personas más importantes de mi vida a mi esposo, a mi hija y a mis padres.

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado a mi hija y a mi esposo, porque en cada cosa que hago me dan su apoyo, en cada paso que doy están conmigo y en cada tropiezo me ayudan a levantarme. Son la fuerza que tengo para seguir adelante, los amo.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
OBJETIVOS	ix
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Aspectos Clínicos y Fisiopatología de la Diabetes Mellitus Tipo 2.....	3
Homocisteína.....	5
Metabolismo de la Homocisteína.....	5
Etiología de la Hiperhomocisteinemia.....	8
Patogénesis de la Hiperhomocisteinemia.....	9
Diabetes Mellitus y la Hiperhomocisteinemia.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Tipo de Investigación y Plan General de la Investigación.....	19
Criterios de Selección de los Pacientes.....	19
Estimación de Parámetros Metabólicos.....	20
Determinación de Homocisteína.....	21
Reactivos	21
Materiales y Equipos	21
Condiciones Cromatográficas	21
Colección de la Muestra	22
Preparación del Suero	22
Preparación del Estándar y de la Curva	22
Análisis de la Información	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24

Estandarización del Método Cromatográfico para la Separación de Tioles.....	24
Resultados de las determinaciones analíticas	28
CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFÍA	40

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Clasificación patogénica de la hiperhomocisteinemia.....	10
II.	Comparación de los niveles basales de cada uno de los parámetros analizados en los adultos sanos (controles) y los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 incluidos en este estudio.....	29
III.	Resultados del análisis de correlación de la Hcys con los parámetros metabólicos en los pacientes diabéticos.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Metabolismo de la metionina y de la homocisteína.....	6
2.	Estructura química de la homocisteína y moléculas derivadas.....	7
3.	Patogénesis de la hiperhomocisteinemia.....	13
4.	Corridas isocráticas realizadas con una fase móvil a cinco diferentes pH.....	26
5.	Corridas isocráticas realizadas con el estándar de homocisteína y con una mezcla de estándares homocisteína-glutación.....	27

OBJETIVOS

Objetivo General

Estimar la concentración de homocisteína sérica y su posible correlación con algunos de los parámetros de control metabólico en un grupo de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) de una unidad de primer nivel de atención médica de Hermosillo, Sonora.

Objetivos Particulares

- Determinar la concentración de los marcadores de glicemia, perfil de lípidos, proteínas totales, albúmina, creatinina, proteína C reactiva (PCR) y ácido siálico (SA), para estimar el control metabólico de un grupo de pacientes con DMT2 y un grupo control formado con adultos aparentemente sanos.
- Estimar la concentración de homocisteína sérica, de pacientes y controles, por HPLC con detección fluorométrica.
- Comparar los niveles de homocisteína del grupo de pacientes con diabetes con relación al grupo control.
- Determinar la correlación entre homocisteína sérica y los parámetros de control metabólico en los pacientes diabéticos.

RESUMEN

La relación entre la hiperhomocisteinemia ($>15 \mu\text{mol/L}$) y la enfermedad cardiovascular en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), es aún motivo de controversia, pues mientras que algunos investigadores han demostrado una fuerte asociación, otros no la han encontrado o sólo la detectan en determinados subgrupos de pacientes.

Se ha demostrado que la concentración de homocisteína (Hcys) sérica varía entre poblaciones (Córdoba y Meneses, 2002) pero en Sonora, México, no se han estimado los niveles séricos de Hcys sérica, ni su relación con los parámetros de control metabólico en los pacientes con DMT2. En este trabajo, se brindan resultados preliminares de la elevación en la concentración de Hcys sérica en un grupo de 47 pacientes con DMT2 de una unidad de primer nivel de atención médica de Hermosillo, Sonora, así como de la relación entre algunos marcadores de control metabólico y la concentración de Hcys.

La Hcys se midió por HPLC con detección fluorométrica y la glucosa preprandial, colesterol total, HDL-colesterol (HDL-col), LDL-colesterol (LDL-col), triglicéridos, proteínas totales (PT), albúmina y creatinina, fueron estimadas por métodos colorimétricos. El ácido siálico (SA) se estimó por un método enzimático, la proteína C reactiva (PCR) por nefelometría de alta sensibilidad y la hemoglobina A1c (HbA1c) por inmunoafinidad.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los niveles de Hcys de los pacientes ($15.55 \mu\text{mol/L}$; RI = 11.6 - 18.8), con relación a un grupo de 17 adultos no diabéticos, pareados por sexo y edad ($11.2 \mu\text{mol/L}$; RI = 10.9 - 12.3). Se encontró asociación de la Hcys con el LDL-col y con la depuración de creatinina plasmática, solamente en el grupo de pacientes con DM2. Además, se encontraron significativamente elevados los niveles de HbA1c, glucosa, PCR y SA en los pacientes

con DM2. La concentración de estos marcadores, así como los de triglicéridos, proteínas totales y creatinina, fue significativamente superior a la del grupo control.

Considerando globalmente estos resultados y la aplicación que se les ha dado en otros estudios a resultados similares, se recomienda realizar otro estudio ampliando la muestra de pacientes, para estimar el valor de la Hcys como factor de riesgo de complicaciones vasculares en los pacientes con DM2.

INTRODUCCION

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es un desorden plurimetabólico que se caracteriza por hiperglicemia crónica. Este puede ser el único signo al diagnosticarse la enfermedad, pero al progresar ésta, se deteriora de la función de tejidos y órganos como los ojos, los riñones, los nervios y el corazón. Por ello, la diabetes es una de las principales causas de discapacidad prematura y muerte en adultos en México (OMS, 2010).

En los pacientes que sufren diabetes, la enfermedad cardiovascular es de dos a seis veces más frecuente que en las personas normoglicémicas (Masuda y col., 2008). La base patogénica de esta complicación es la aterosclerosis, en cuyo desarrollo está implicada la dislipidemia, la inflamación endotelial crónica y la acción de compuestos oxidantes tales como los radicales de oxígeno (Hadi y Suwaidi, 2007).

Estudios recientes sugieren que el aumento de homocisteína (Hcys) sérica contribuye también al desarrollo de la aterosclerosis (Córdoba y Meneses, 2002). La Hcys es un aminoácido azufrado originado metabólicamente de la metionina (Méndez y Fernández, 1999), que al elevarse en el suero participa en la formación de compuestos oxidantes con poder aterogénico (Vasan y col., 2003). Al parecer, el aumento de Hcys en suero (hiperhomocisteinemia) también produce la activación de algunos factores de la coagulación e inactivación de los anticoagulantes naturales, favoreciendo así la formación de trombos y el daño del endotelio vascular (Córdova y Meneses, 2002; Spijkerman y col., 2005). Por estas razones se cree que la medición de Hcys sérica podría ser de utilidad para estimar el riesgo de complicaciones vasculares de la diabetes (Spijkerman y col., 2005). Sin embargo, hasta ahora no hay un acuerdo global para aceptar a la hiperhomocisteinemia como marcador de complicaciones vasculares, porque en varios estudios se ha observado que no hay diferencia en los niveles de Hcys entre pacientes diabéticos y personas sanas, y porque no ha sido fácil la demostración de la relación entre la hiperhomocisteinemia y otros factores de riesgo de enfermedad

cardiovascular (Brazionis y col., 2008; Pavia y col., 2000). Es probable que las inconsistencias entre las diferentes publicaciones se deban a que los estudios se han hecho con poblaciones de pacientes muy pequeñas y sin considerar otros factores de riesgo cardiovascular (Spijkerman y col., 2005). También es posible que las diferencias en los resultados publicados internacionalmente, se deban a que no hay homogeneidad en los diseños ni en los criterios de selección de los grupos de pacientes y controles. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue estimar la concentración de Hcys sérica y su posible correlación con algunos de los parámetros de control metabólico en un grupo de pacientes con DM2 de una unidad de primer nivel de atención médica de Hermosillo, Sonora.

ANTECEDENTES

Aspectos Clínicos y Fisiopatología de la Diabetes Mellitus Tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es un síndrome plurimetabólico, en el que se presentan anomalías en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas. La alteración subyacente de esta enfermedad es la deficiencia en la secreción y/o la respuesta inadecuada de los tejidos a la acción de la insulina, que provoca la hiperglicemia crónica (glucosa en plasma ≥ 126 mg/dL o ≥ 7.0 $\mu\text{mol/L}$ en ayuno, y ≥ 200 mg/dL o ≥ 11.1 $\mu\text{mol/L}$ a las dos horas después de haber ingerido alimentos) característica de la diabetes mellitus (OMS, 2010). La hiperglicemia crónica no produce síntomas al iniciar la DMT2, pero al progresar ésta aparecen síntomas tales como poliuria, polidipsia, pérdida de peso, algunas veces con polifagia y visión borrosa (ADA, 2011).

La hiperglicemia crónica en la diabetes está fuertemente asociada con la aparición de daños a largo plazo, causando la disfunción de la red arterial y nerviosa, así como la discapacidad de varios órganos. La principal base patogénica de los daños orgánicos asociados a la hiperglicemia es la formación de placas de tejido fibroso en el endotelio vascular, acompañadas de un proceso inflamatorio crónico, así como de la acumulación de elementos lipóidicos (lipoproteínas de baja densidad) y plaquetas en el endotelio de las arterias periféricas y del corazón, causando hipertensión, alteraciones en el sistema hemodinámico y eventos tromboembólicos (ADA, 2011).

La diabetes, no sólo es un factor de riesgo importante para el desarrollo prematuro de la aterosclerosis sino también para su rápida progresión. Más aún, se ha observado que los procesos ateroscleróticos en pacientes de alto riesgo comienzan antes de que el diagnóstico de diabetes se haya establecido; el riesgo de enfermedad coronaria arterial de pacientes con estado prediabético o intolerantes a la glucosa es de dos a tres veces superior al de personas normoglicémicas, mientras que el riesgo de aterosclerosis en pacientes diabéticos es cuatro veces mayor (Hsueh, 2003; Hultberg y col., 1991).

Otros factores de riesgo relacionados con la diabetes (hiperinsulinemia, obesidad, hipertensión, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, tabaquismo, etc) también pueden aumentar el riesgo de enfermedad cardiovascular en pacientes con diabetes. Sin embargo, el proceso de aterosclerosis en la diabetes es complejo y por esto se han estado evaluando nuevos marcadores para detectar en etapas tempranas el riesgo de enfermedades vasculares (Guldener y Stehouwer, 2002). Dentro de estos marcadores se encuentran las concentraciones elevadas de lipoproteína (a) (Schwartzmany col., 1998), la alteración del balance entre radicales oxidantes y antioxidantes (Vita y col.,1998), la hipercoagulabilidad (Hamstem y col.,1987), el polimorfismo del gen de la enzima convertidora de la angiotensina (Cambien y col., 1992), el antígeno leucocitario humano DR (HLA)-DR (Neri y col.,1997), las infecciones crónicas (Danesh y col.,1997), las alteraciones del óxido nítrico (Moncada y col., 1991), la proteína C reactiva (PCR), la proteína sérica A amiloide (Liuzzo y col.,1994; Pepys y col.,1983 y 2003), la ceruloplasmina (Reunanen y col.,1992) y la baja concentración de albúmina sérica (Kuller y col.,1991). Otros marcadores, que han sido evaluados recientemente, son el ácido siálico y la Hcys. El ácido siálico es un componente de las membranas celulares y de muchas glicoproteínas plasmáticas (Yarema, 2006) y su nivel elevado en plasma puede indicar daño excesivo de la membrana celular vascular o pérdida del ácido siálico terminal en las moléculas plasmáticas. Además, el ácido siálico puede ser utilizado como marcador de la respuesta de fase aguda porque muchas de las proteínas que participan en los procesos de inflamación son glicoproteínas sialiladas (Pickup, 2004). Por otro lado, en la última década se ha mencionado que la determinación de Hcys sérica podría ser una herramienta de gran utilidad para identificar el riesgo de enfermedad cardiovascular (Brazionis y col., 2008), porque a diferencia de otros marcadores se ha visto que la concentración elevada de Hcys sérica (hiperhomocisteinemia) parece ser un factor de riesgo independiente de enfermedad cardiovascular en pacientes con diabetes tipo 2 (Guldener y Stehouwer, 2002). No obstante lo anterior, existen publicaciones en las que los resultados no han permitido comprobar lo anterior, trayendo un serio debate en torno a la utilidad de la Hcys como marcador de complicaciones vasculares.

Homocisteína

Metabolismo de la Homocisteína

La Hcys es un aminoácido que no forma parte de la dieta y no es incorporado a las proteínas. Es producida por el organismo humano a partir de la desmetilación del aminoácido metionina y la regulación de su síntesis ocurre por las vías metabólicas de remetilación y transulfuración (Figura 1) (Sayar y col., 2007; Nygard y col., 1999). Es un aminoácido con un grupo sulfhidrilo susceptible a la oxidación a pH fisiológico y, por lo tanto, con tendencia a formar enlaces disulfuro con los grupos tiol de diversos metabolitos y con otras moléculas de Hcys (Figura 2). La unión de dos moléculas de Hcys mediante un enlace disulfuro da lugar a la homocistina.

Pueden sintetizarse disulfuros mixtos de Hcys con cisteína libre o con las cisteínas de péptidos y proteínas; estas variantes se denominan en conjunto Hcys ligada a proteínas (Jacobnsen 1998; Welch y col., 1998). Otro derivado es la tiolactona de Hcys, que se obtiene al perder la Hcys una molécula de agua. En el plasma, aproximadamente el 1% de la Hcys se encuentra en su forma reducida; cerca del 70% se encuentra unida a albúmina y el resto (29%) formando compuestos disulfuro de peso molecular bajo (Soberón y col., 2004). La suma de todas estas especies de Hcys se conoce como Hcys total.

La Hcys no ligada a las proteínas se filtra en los glomérulos renales y se reabsorbe en su mayor parte en los túbulos renales. En condiciones normales se encuentran muy pequeñas cantidades en la orina, pero aún los pequeños descensos en el aclaramiento de creatinina pueden ser evidencia de la alteración de los niveles de Hcys total plasmática (Kronenberg, 1998).

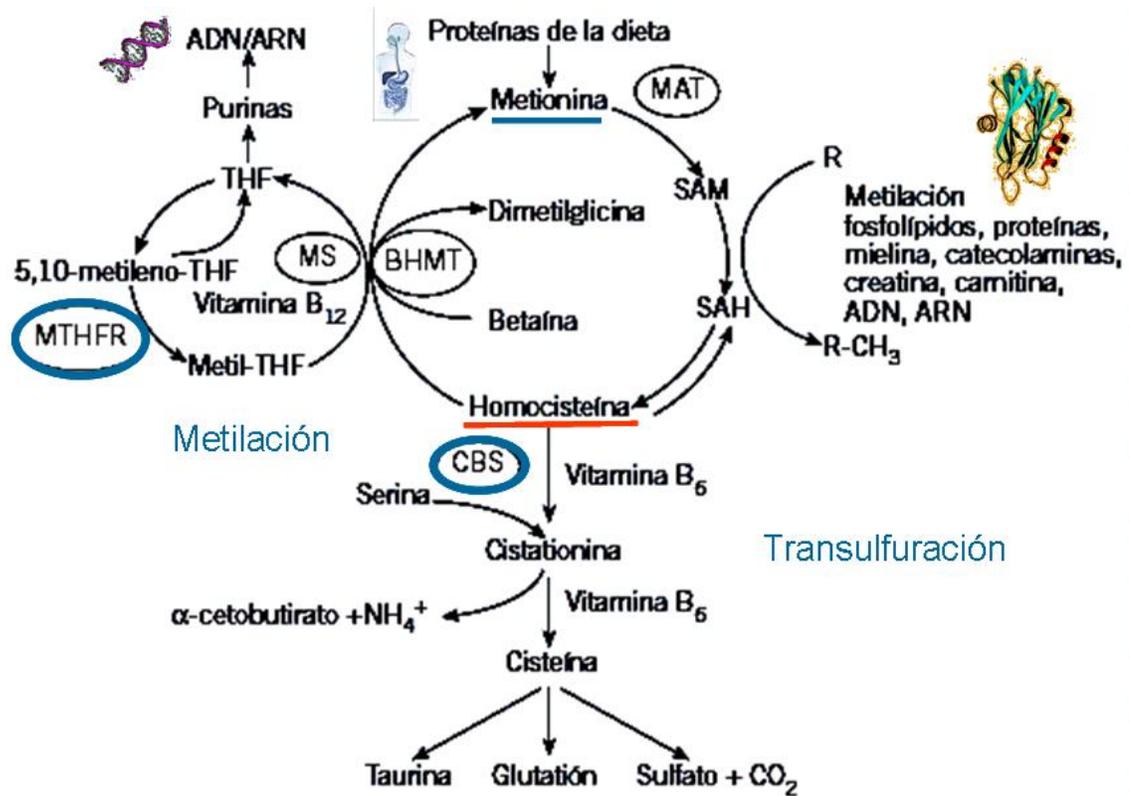
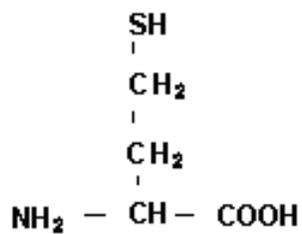


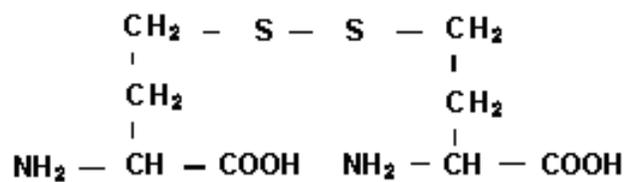
Figura 1. Metabolismo de la metionina y de la homocisteína.

SAM, S-adenosilmetionina; MS, metionina sintetasa; SAH, S-adenosilhomocisteína; THF, tetrahidrofolato; MTHFR, metilentetrahidrofolato reductasa; CBS, cistionina-β-sintetasa; BHMT, betaina-homocisteína metiltransferasa; MAT, metionina adenosiltransferasa; THF, tetrahidrofolato.

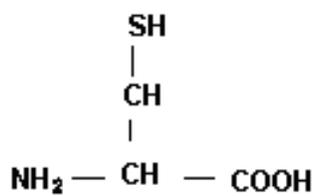
Fuente: De Luis y col., 2004.



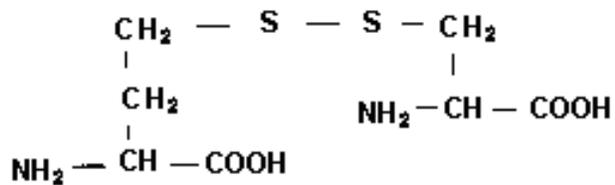
Homocisteína



Homocistina



Cisteína



Disulfuro Mixto

Figura 2. Estructura química de la homocisteína y moléculas derivadas.

Fuente: Fridman y col., 1997.

Cuando los niveles de metionina son normales, el 50% de la Hcys entra en la ruta metabólica de la transulfuración, que es regulada por la cistationina β -sintetasa (CBS) y utiliza como catalizador a una enzima dependiente del piridoxal-5-fosfato (un metabolito activo de la vitamina B-6). En dicha ruta, la Hcys se condensa con serina para formar cistationina y α -cetobutirato, por la acción de la enzima γ -cistationasa. La cistationina es hidrolizada a cisteína por una cistationasa que requiere también vitamina B6 (Fischer y col., 2000). Cuando los niveles de metionina están elevados, la Hcys es utilizada para la síntesis de la cisteína de manera irreversible. Eventualmente, la cisteína puede convertirse a glutatión, taurina y otros metabolitos sulfurados (Nygard y col., 1999).

Si los niveles de metionina son bajos, la Hcys es utilizada para mantener los niveles de metionina a través de varias vías de remetilación. En los tejidos extrahepáticos, la Hcys es remetilada por acción catalítica de la enzima metionina sintetasa (MS), que es dependiente de la vitamina B-12 y utiliza al metil tetrahidrofolato como donador de grupos metilo; también la betaína-homocisteína metiltransferasa, que utiliza la betaína como donante de grupos metilo, puede catalizar esta reacción en el hígado, riñón y glándulas suprarrenales. A su vez, la síntesis de metiltetrahidrofolato es catalizada por la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), dependiente de la vitamina B-2. Por estas razones, la deficiencia de estas vitaminas o la falla en la síntesis de estas enzimas ocasionaría una elevación de Hcys en el plasma (homocisteinuria) como la que se observa en los casos de errores congénitos del metabolismo de la Hcys (Selhub, 1999).

Etiología de la Hiperhomocisteinemia

Los factores que se deben considerar para que exista una anomalía en la concentración de Hcys sérica, son aquellos que pueden producir alteraciones en la ruta metabólica de la Hcys (procesos de transulfuración y remetilación) (Gutiérrez y col., 2004). En general, se acepta que los determinantes de la hiperhomocisteinemia son complejos e incluyen factores muy diversos de carácter genético y adquirido,

particularmente relacionados con el estilo de vida (Jacobsen, 1998). En un intento de clasificación etiológica, pueden plantearse varios grupos de causas (Tabla I): de origen genético (defectos enzimáticos en el metabolismo de la Hcys), deficiencias nutricionales (de vitaminas como la B12 y B6) y otras causas como el consumo de sustancias que interfieren con el metabolismo de la Hcys, las enfermedades crónicas y el estado hormonal, entre otras (Dierkes y Westphal, 2005).

Patogénesis de la Hiperhomocisteinemia

Dentro de las primeras investigaciones realizadas sobre la hiperhomocisteinemia en 1962, Gerritsen y Carson comunicaron la presencia de Hcys en la orina de niños con retardo mental. Dos años más tarde, Mudd y colaboradores encontraron deficiencia de la enzima CBS y eventos tromboembólicos frecuentes en estos pacientes (Fridman y col., 1997). En 1969, McCully y col., describieron la presencia de eventos tromboembólicos en pacientes con homocisteinuria y concluyeron que una de las causas de este tipo de trastorno vascular era la presencia de niveles altos de Hcys (Schini-Kerth, 2003). En 1972, nuevamente Mudd y col., encontraron casos de homocisteinuria asociados a la deficiencia de la enzima MTHFR y a defectos en el metabolismo de la vitamina B-12. Un cuadro clínico de eventos tromboembólicos, similar al que produce la deficiencia de la enzima CBS, fue observado en estos pacientes (Fridman y col., 1997). Sin embargo, hasta el año 1976 fue cuando Wilcken y Wilcken comunicaron por vez primera la relación entre el daño de las arterias coronarias y las alteraciones del metabolismo de la Hcys (Hajjar, 1993).

A partir de entonces, es motivo de debate la aparente participación de la Hcys en el desarrollo de alteraciones cardiovasculares y de los niveles patológicos de la Hcys. Sin embargo, hubo un avance importante a partir de los resultados del proyecto Acción

Tabla I. Clasificación patogénica de la hiperhomocisteinemia.

<p>Origen genético (Defectos enzimáticos en el metabolismo de la homocisteína):</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cistationina β sintetasa (1) - Metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR) (1) - Metionina sintetasa (1) - Errores en el metabolismo de los folatos (2) <p>Deficiencias nutricionales</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ácido fólico (2) - Vitamina B6 (piridoxina) (2) - Vitamina B12 (cobalamina) (2) <p>Fisiológicos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Vejez (3) - Sexo (2) - Menopausia (3) <p>Estilo de vida</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tabaquismo (3) - Alcoholismo (3) - Consumo de café (3) <p>Otras causas</p> <p><u>Enfermedades diversas</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Anemia Perniciosa (2) - Insuficiencia renal (4) - Hipotiroidismo (3) - Cáncer (5) - Psoriasis severa (5) - Lupus eritematoso sistémico (6) - Diabetes (4) <p><u>Drogas</u></p> <p><i>Aumentan los niveles de homocisteína:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Colestiramina, colestipol, metformina (7) (porque afectan la absorción de folatos y cobalamina) 	<ul style="list-style-type: none"> - Metotrexate (7) (inhibe la dihidrofolato reductasa) - Anticonvulsivantes (7): fenitoína, carbamazepina (antagonistas del folato) - L-Dopa (7) (aumenta la transmetilación) - Niacina, teofilinas y trimeptoprima (7) (inducen la deficiencia de vitamina B6) - Ciclosporina (8) (reducción de la función renal) - Derivados del ácido fíbrico (7) (posible alteración en la función renal) <p><i>Reducen los niveles de homocisteína</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Penicilamina y N-acetilcisteína (3) (favorece la remetilación) - Betaína (favorece la remetilación) - Anticonceptivos orales que contienen estrógenos (7) (incrementan la metilación)
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Fuentes: (1) Gellekink y col., 2005; (2) Sadeghian y col., 2006; (3) Villar y col., 2001; (4) Robinson, 2004; (6) Martínez y col., 2003; (5) Menéndez y col., 1999; (7) Dierkes y Westphal, 2005; (8) Schini-Kerth, 2003.

Concertada Europea de Homocisteína y Enfermedades Vasculares (Graham y col., 1997; Soberón y col., 2004), con los que se estableció el rango normal de Hcys total en adultos de 5 a 15 $\mu\text{mol/L}$ (media de 10 $\mu\text{mol/L}$). La hiperhomocisteinemia puede ser moderada cuando la concentración plasmática de Hcys es de 15 a 30 $\mu\text{mol/L}$, intermedia con 30 a 100 $\mu\text{mol/L}$ o severa si es mayor de 100 $\mu\text{mol/L}$ (Soberón y col., 2004; Schini-Kerth, 2003, Fernández y col., 2003). Sin embargo, estos rangos patológicos aun están en discusión (Refsum y col., 2004). Es probable que las diferencias en los valores de referencia encontrados en la literatura obedezcan a la diversidad de diseños empleados para definir los grupos de estudio, hasta los métodos analíticos utilizados (cromatográficas o inmunoenzimáticos), diferencias en el manejo de la muestra (por ejemplo el tiempo de almacenamiento después de la extracción) y, principalmente, a la diversidad de factores nutricionales y étnicos de las diferentes poblaciones estudiadas (Córdoba y Meneses, 2002; Eikelboom y col., 1999).

El mecanismo por el cual la Hcys contribuye al daño vascular no es claro. Se ha propuesto que la Hcys promueve la aterosclerosis y trombosis en arterias y venas gracias al: 1) efecto citotóxico (por estrés oxidativo) sobre el endotelio, mediado por las especies de oxígeno reactivo, incluyendo superóxidos, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo generados durante la oxidación de la homocisteína en presencia de ceruloplasmina (Sharma y col., 2006), 2) efecto mitogénico sobre las fibras lisas de las arterias (Tsai y col.,1994), 3) aumento de la afinidad de la lipoproteína (a) por la fibrina (Harpel y col.,1992), 4) la síntesis de inhibidores de los activadores tisulares del plasminógeno-1 y 2 (PAI-1 y PAI-2), 5) activación los factores V, X y VII de la coagulación (creando un entorno protrombótico) (Hofmann y col., 2001; Sharma y col., 2006), 6) disminución de la producción de óxido nítrico (NO) (Hofmann y col., 1998) y la actividad de la antitrombina III, 7) inhibición del complejo trombomodulina-trombina, la proteína C y selectivamente la unión del activador tisular del plasminógeno a las células endoteliales 8) aumento en la proliferación de células musculares lisas (CML) (Sharma y col., 2006; Hajjar,1993; Hofmann y col., 2001), y 9) potenciación de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Tan y col., 2002), entre otros. Por

otra parte, también se documenta la activación de la expresión y secreción de la interleucina-8 y la proteína-I quimioatrayente de monocitos (MCP-1) (mecanismo 10), lo cual es importante porque la IL-8 también es un potente factor quimiotáctico para monocitos (Schini-Kerth, 2003) (Figura 3).

Otro de los cambios celulares que induce la hiperhomocisteinemia ocurre en el retículo endoplásmico, con la modificación de algunas proteínas originada por la participación de la homocisteína en reacciones bisulfuro. Tal modificación conduce al desdoblamiento de proteínas secretoras y de membrana, tales como la trombomodulina y el factor de Von Willebrand, y sus consecuencias celulares (que se conocen genéricamente como estrés del retículo endoplásmico) que incluyen la alteración en el metabolismo de los lípidos, activación de vías inflamatorias y alteración de la vía de señalización de la insulina. Además, el estrés del retículo endoplásmico severo o prolongado puede conducir a la apoptosis celular (Lentz, 1991).

Existen numerosas evidencias en la literatura del papel aterogénico de la Hcys, que muestran que el incremento de la concentración de la Hcys sérica está asociado con el riesgo de enfermedades cerebrovasculares, cardiovasculares o neurológicas (Carod-Artal y col., 2007). Sin embargo, hay controversia cuando se discute la utilidad de la medición de las diferentes clases de Hcys; algunos datos sugieren que la determinación de Hcys total en la población general no está justificada, en cambio, en poblaciones con riesgo vascular elevado, el aumento de la Hcys total parece ser de gran utilidad para estimar el riesgo de nuevos eventos vasculares y muerte por problemas vasculares. Desde este punto de vista, el resultado de un mayor número de ensayos clínicos tendría influencia sobre la futura recomendación del uso de la determinación de Hcys total en los pacientes con enfermedades vasculares (Refsum y col., 1998).

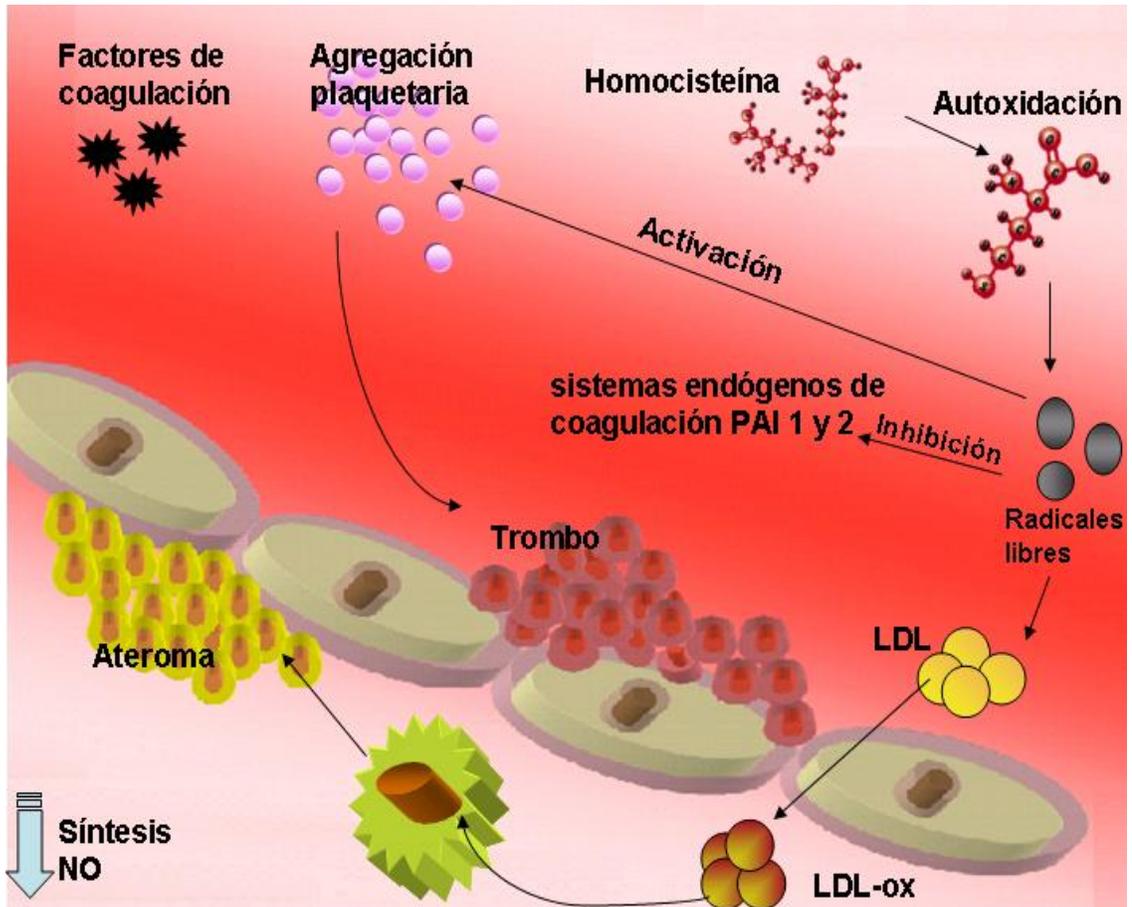


Figura 3. Patogénesis de la hiperhomocisteinemia.

La figura esquematiza una parte de los mecanismos por los cuales se piensa que la homocisteína libre (en altas concentraciones) causa daño endotelial.

Fuentes: Figura diseñada a partir de Hofmann y col., 2001; Sharma y col., 2006; Hofmann y col., 1998; Hajjar, 1993.

Diabetes Mellitus y la Hiperhomocisteinemia

Los factores de riesgo coronarios tradicionales no explican totalmente la alta mortalidad de los pacientes diabéticos por causas cardiovasculares, pero hay evidencias que ligan a la hiperhomocisteinemia con la aterosclerosis prematura de estos pacientes (Yeromenko y col., 2001; Baigent y col., 2002). Entre los mecanismos que parecen vincular la hiperhomocisteinemia con el daño endotelial, están las alteraciones de la hemostasia, la agregación plaquetaria y la fibrinólisis (Johnstone y col., 1993). Sin embargo, es probable que la controversia respecto a la potencial participación de la Hcys como factor causal de la macroangiopatía, se deba al hecho de que los pacientes con hiperhomocisteinemia suelen presentar hipertensión y dislipemia, dos factores de riesgo que influyen directamente el desarrollo de la macroangiopatía. En este mismo sentido, otras investigaciones han demostrado que los niveles de HDL-colesterol correlacionan negativamente con los niveles de Hcys, hecho que podría explicar por sí solo la tendencia prematura de aterosclerosis en pacientes con hiperhomocisteinemia (Hoogeveen y col., 1998,2000; Meigs y col., 2001).

No obstante lo anterior, existen múltiples vías por las que la hiperhomocisteinemia podría contribuir a la disfunción vascular directamente o en sinergia con moléculas aterogénicas como la LDL oxidada, con peróxidos de lípidos y con AGEP's (productos finales de glicación avanzada) (Warle y col., 1996), por lo que continúa siendo relevante el estudio de la hiperhomocisteinemia como factor de riesgo de complicaciones vasculares en los pacientes con diabetes mellitus. En este contexto, el estudio del metabolismo de la Hcys en los pacientes diabéticos y la demostración de la relevancia patogénica de la hiperhomocisteinemia es muy importante, especialmente porque su manejo adecuado supondría beneficios para la prevención de los daños vasculares.

Desde la perspectiva epidemiológica, se ha demostrado que la hiperhomocisteinemia se detecta hasta en el 41% de los pacientes diabéticos, en asociación significativa con los eventos macrovasculares de estos pacientes (Munshi y col., 1996). El riesgo de mortalidad por enfermedades cardiovasculares entre estos

pacientes aumenta considerablemente cuando los niveles de Hcys sérica están por encima de 14 $\mu\text{mol/L}$ en plasma (Hoogveen y col., 2000); Okada y col., (1999) demostraron que la prevalencia de hiperhomocisteinemia $> 14 \mu\text{mol/L}$ fue del 39,3% en un grupo de pacientes con diabetes mellitus tipo 2, siendo la concentración de Hcys superior en los pacientes diabéticos con estenosis coronaria con respecto a los pacientes diabéticos sin estenosis ($13,8 \pm 3,9$ vs $11,7 \pm 3,9 \mu\text{mol/L}$; $p = 0,0009$). En este mismo estudio el número de arterias estenosadas en los pacientes diabéticos correlacionó directamente con la concentración de Hcys, pero la prevalencia de macroangiopatía fue mayor en los pacientes diabéticos con nefropatía sugiriendo que los daños renales podrían haber sido por sí mismos los responsables de la macroangiopatía.

En otros estudios realizados en las últimas dos décadas, se ha podido demostrar la asociación entre las complicaciones cardiovasculares de los pacientes diabéticos y la hiperhomocisteinemia, aún con concentraciones de Hcys menores de 14 $\mu\text{mol/L}$. Por ejemplo, en un estudio publicado en 1999 por Stabler y col., se observó la correlación directa de la concentración de Hcys sérica con la hipertensión y el aumento de creatinina sérica, además de la correlación inversa con la vitamina B12 y el aclaramiento de creatinina en pacientes de 40 a 74 años de edad con diabetes mellitus tipo 2. La concentración de Hcys en los pacientes con neuropatía era mayor que en los controles no diabéticos ($10,3 \mu\text{mol/L}$ vs $9,3 \mu\text{mol/L}$; $p < 0,05$) y en pacientes que presentaban macroalbuminuria ($11,0 \mu\text{mol/L}$ vs a $9,2 \mu\text{mol/L}$, $p < 0,005$), pero no en aquellos con retinopatía o enfermedad cardiovascular. Estos resultados no concordaron con los que previamente habían reportado la correlación de la concentración de la Hcys con la macroangiopatía y dieron lugar a la hipótesis de que la elevación de la Hcys en este grupo de pacientes podría haberse debido a la combinación de un déficit vitamínico con la disminución de la función renal (Stabler y col., 1999). Sin embargo, posteriormente se ha confirmado que la macroalbuminuria, la elevación de la creatinina sérica y la reducción del aclaramiento de la creatinina, son factores de riesgo de infarto al miocardio en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Calvo y cols., 2000). Debido a que los riñones juegan un papel muy importante en el metabolismo de la Hcys

(Wollesen y col., 1999), no es extraño el hecho de que los pacientes diabéticos que padecen insuficiencia renal son quienes principalmente presentan hiperhomocisteinemia (Yeromenko y col., 2001; Baigent y col., 2002).

No obstante lo anterior, no en todos los estudios se ha podido demostrar la correlación positiva entre la hiperhomocisteinemia y la disfunción renal (Chico y col., 1998; Buyschaert y col., 2000; Stabler y col., 1999), por ejemplo, Hultberg y col., (1991) sólo pudieron demostrar una elevación moderada de Hcys en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con alteraciones de la función renal y proteinuria. Estos resultados contradicen claramente las publicaciones en las que se afirma la existencia de tal correlación, pero sus autores apelan al número reducido de pacientes incluidos en otros estudios para explicar la falta de correlación entre la concentración de Hcys y la disfunción renal.

Para aclarar la relación patogénica entre la hiperhomocisteinemia y las complicaciones vasculares de la diabetes mellitus tipo 2, se han realizado otros estudios en los que se evalúa el impacto de la resistencia a la insulina y la función renal sobre la concentración de Hcys. Emoto y col., en el 2001, publicaron sus resultados en 75 pacientes con diabetes tipo 2 en quienes observaron niveles de Hcys significativamente mayores que los observados en un grupo de personas no diabéticas ($12.0 \pm 0.7 \mu\text{mol/L}$ vs $8.7 \pm 0.3 \mu\text{mol/L}$; $p < 0.0001$). Ellos vieron además, que la sensibilidad a la insulina y la depuración de creatinina estuvieron relacionados ($r = 0.319$; $p = 0.005$ y $r = 0.634$; $p < 0.0001$, respectivamente) con la concentración de Hcys en los pacientes diabéticos tipo 2.

Empleando la pinza glicémica para evaluar la sensibilidad a la insulina, en otros estudios se ha demostrado que en el estado posprandial la concentración de Hcys disminuye en sujetos sanos (de 7.2 ± 2.6 a $6.0 \pm 2.7 \mu\text{mol/L}$) pero no se modifica en pacientes diabéticos tipo 2 (6.0 ± 2.7 vs $5.9 \pm 2.5 \mu\text{mol/L}$) ($p < 0.01$), sugiriendo así que

la insulina regula la concentración de Hcys en individuos sanos pero no en diabéticos tipo 2 con resistencia a la insulina (Fonseca y col., 2000).

A escala experimental (McCarty, 2000) existe la posibilidad de que la hiperinsulinemia suprima la expresión de cistationina- β -sintetasa incrementando la concentración de Hcys, de esta forma, cualquier factor que intervenga en la secreción de insulina podría incrementar la concentración de Hcys en el plasma (Hoogeveen y col., 2000; Must y col., 1999; De Fronzo y col., 1979). Sin embargo, los resultados obtenidos al evaluar a distintas poblaciones de pacientes diabéticos no han sido útiles para confirmar los experimentales de un modo contundente. Por ejemplo, Sheu y col, en el 2000, no encontraron relación entre el grado de resistencia a la insulina y la concentración de Hcys, a pesar de que demostraron que la concentración de Hcys de 90 pacientes con diabetes e hipertensión fue más alta que la de un grupo control, pareado por edad, sexo e índice de masa corporal (diabéticos = 8.0 ± 0.1 vs controles = 6.8 ± 0.2 $\mu\text{mol/L}$; $p < 0.05$). Cabe destacar que la concentración de Hcys en los pacientes incluidos en este estudio fue mucho menor a la reportada en otros estudios diseñados para determinar la concentración de Hcys plasmática en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

Con relación a la retinopatía, la otra complicación microangiopática de la diabetes mellitus tipo 2, tampoco se han podido obtener resultados concluyentes que demuestren su relación con la concentración de Hcys sérica, aunque en la mayoría de los estudios no se encuentra relación entre ambas variables (Hoogeveen y col., 2000). Goldstein y col., en el 2004, obtuvieron resultados que sugieren que la hiperhomocisteinemia puede estar asociada a la retinopatía diabética y puede explicar parcialmente el mayor riesgo de los pacientes diabéticos a desarrollar angiopatía microvascular. Brazionis y col. al realizar una evaluación entre diabéticos con y sin retinopatía encontraron concentraciones de $11.5 \mu\text{mol/L}$ contra $9.6 \mu\text{mol/L}$ respectivamente (la diferencia entre ellos fue solo de $2 \mu\text{mol/L}$), por otro lado mencionan que la concentración no rebasa el punto de corte

establecido y que el aumento de 1 $\mu\text{mol/L}$ puede incrementar el riesgo de padecer retinopatía diabética de un 15 a un 20% (Brazionis y col., 2008).

Actualmente se estudia la relación entre la Hcys y los daños vasculares en los pacientes con diabetes (Seghieri y col., 2003), al mismo tiempo que trata de revelar la participación de la Hcys en la diabetes gestacional e incluso su influencia en el deterioro cognitivo de los pacientes diabéticos ancianos (Arranz y col., 2002) o en patologías inmunológicas con riesgo cardiovascular como el lupus eritematoso (Martínez y col., 2003), entre otras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de Investigación y Plan General de la Investigación

Se trata de un estudio no aleatorizado, transversal, observacional, realizado en 47 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (31 mujeres y 16 hombres) de la Unidad de Medicina Familiar No. 37 del Instituto Mexicano del Seguro Social, para estimar la concentración sérica de Hcys y la potencial correlación de la homocisteinemia con los parámetros de control metabólico de los pacientes.

Criterios de Selección de los Pacientes

Los 47 pacientes incluidos en el estudio fueron seleccionados por conveniencia entre un grupo de 73 pacientes del Programa de Atención Integral al Paciente Diabético, de la Unidad de Investigación Epidemiológica y Servicios en Salud, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) que asisten bimensualmente a la consulta externa de Medicina Familiar de la Unidad de Medicina Familiar No. 37 del IMSS, en donde se les solicitó su consentimiento por escrito y voluntario para participar en el estudio. Se excluyeron y/o eliminaron aquellos pacientes diagnosticados con hiperhomocisteinemia congénita, enfermedades hepáticas crónicas no relacionadas con la diabetes, cáncer, alcoholismo o que hubieran tenido un consumo crónico de antioxidantes, multivitamínicos y/o ácido fólico, durante los seis meses previos a la toma de muestra sanguínea. Los pacientes con expediente clínico incompleto y/o que no fueron valorados clínicamente en la semana en la que se realizó la toma de muestra sanguínea tampoco fueron incluidos en el estudio.

Por tratarse de un estudio analítico, se integró un grupo control con 17 sujetos adultos euglicémicos, aparentemente sanos. El estado de salud de los adultos de este grupo, fue confirmado clínicamente y mediante la determinación de los marcadores de glicemia y perfil de lípidos. Cabe destacar que para conformar este grupo control, se evaluaron 188 personas adultas aparentemente sanas. Sin embargo, tras la valoración

clínica y de laboratorio y la aplicación subsecuente de los criterios de exclusión y eliminación (hiperglicemia en ayuno, hipertensión arterial, consumo de alcohol excesivo o consumo crónico de antioxidantes, multivitamínicos y/o ácido fólico, durante los seis meses previos a la toma de muestra sanguínea, e infección durante los dos meses previos a la toma de muestra) de las 188 personas solamente quedaron en el grupo control 17 personas.

Estimación de Parámetros Metabólicos

Todos los analitos utilizados para estimar el control metabólico de los pacientes fueron cuantificados por métodos enzimáticos colorimétricos de la casa comercial Randox ® (E.U.A). La concentración de glucosa preprandial fue estimada por el método de glucosa oxidasa (GOD-PAP, Cat. No. GL2623), proteínas totales por el método de Biuret (Cat. No. TP 1630), albúmina por el método de púrpura de bromocresol (Cat. No. AB 388 A), creatinina por el método de Jaffé sin desproteinización (Cat. No. CR 510), el colesterol total por el método CHOD-PAP (No. Cat. CH200) y sus fracciones, lipoproteína de alta densidad (HDL, Cat. No. CH 204A) por su precipitación con ácido fosfotúngstico/CHOD-PAP, lipoproteína de baja densidad (LDL, Cat. No. CH 1351), por el método de precipitación con heparina/CHOD-PAP y los triglicéridos por el método GPO-PAP (Cat. No. TR 210). La cuantificación de hemoglobina glicada (HbA1c, Cat. No. HA 3830A), para estimar el control glicémico de los pacientes con DM2, se hizo por medio de un ensayo de inmutuafinidad (inmutoturbidimétrico). La estimación de PCR se realizó con un método nefelométrico de la casa comercial The Binding Site (No. Cat. ZK 500R U.K.) y la cuantificación de ácido siálico (SA) se hizo con un ensayo colorimétrico de la casa comercial Roche ® (No. Cat. 10 784 192 001, Alemania).

Determinación de Homocisteína

Reactivos

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico, para espectroscopía y/o HPLC. La DL-homocisteína, tri-n-butilfosfina (TBP), dimetil formamida (DMF), ácido tricloroacético (TCA), amonio 7-fluorobenceno-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonato (SBD-F), L- glutatión, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, ácido clorhídrico, ácido ortofosfórico y el metanol fueron adquiridos en Sigma Chem Co. (St. Louis MO, USA). El acetato de sodio, hidróxido de sodio, Na₂EDTA, ácido acético y el ácido bórico fueron adquiridos en Fermont, México. El borato de sodio en J.T. Baker, México y el acetonitrilo fue de Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA).

Materiales y Equipos

Para la determinación de Hcys en las muestras séricas, se empleó un sistema para HPLC ProStar (Varian, Inc., USA), con una bomba ProStar modelo 240, detector de fluorescencia ProStar modelo 363 e inyector Rheodyne con asa de 50 µL. Para controlar y calcular los parámetros cromatográficos se utilizó el programa Galaxie acoplado al sistema HPLC.

Condiciones Cromatográficas

Se utilizó una columna Microsorb C-18 (de 100 mm de longitud por 4.6 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula; Varian, Inc., USA), acoplada a una precolumna de 5 cm con características de empaque iguales a la columna (Varian, Inc., USA), para la realización de corridas isocráticas, a 1 mL/min por 15 minutos, con solución reguladora de fosfatos 0.1 M, pH 3.0, con CH₃CN al 4% (v/v) como fase móvil, ajustada con ácido ortofosfórico. El sistema cromatográfico fue equilibrado durante 1 h antes de cada corrida y el detector de fluorescencia se ajustó a una longitud de excitación (λ_{ex}) de 386 nm y una longitud de emisión (λ_{em}) de 516 nm (Araki y Sako, 1987).

Colección de la Muestra

La muestra sanguínea se obtuvo por punción venosa, previo ayuno de 10-12 h, en tubos Vacutainer de 10 mL, sin anticoagulante. Después de que se formó el coágulo, dichas muestras se centrifugaron durante 15 min a 3,000 rpm. El suero obtenido fue fraccionado y congelado a -30 °C, para su conservación hasta la determinación de Hcys. Este proceso se realizó en menos de 2 h, manteniendo las muestras sanguíneas en hielo para evitar el incremento en la concentración de Hcys por su continua producción y liberación eritrocitaria a temperatura ambiente (Malinow y col., 1994).

Preparación del Suero

La determinación de Hcys se realizó en 500 µL de suero problema (o control) descongelado. El suero fue incubado con 50 µL de TBP al 10 % en DMF, en reposo, durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, se le añadieron 500 µL de Na₂EDTA 1 mM, en TCA al 10%, mezclando vigorosamente por 10 segundos en vórtex. Luego la mezcla se centrifugó a 1,000 x g durante 5 minutos a 4 °C. Una alícuota de 200 µL del sobrenadante fue incubada con 400 µL de solución reguladora de boratos y 200 µL de SBD-F (1mg/mL del fluorógeno en amortiguador de boratos 0.25 M, pH 9.5), en baño maría por 60 minutos a 60 °C. Después de enfriarse, se filtró la muestra derivatizada con filtros Millipore de 0.22 µm de punto de corte y 13 mm de diámetro (Araki y Sako, 1987).

Preparación del Estándar y de la Curva

La curva estándar de Hcys se preparó con DL homocisteína al 95% de pureza (Sigma Chem Co, St Louis Mo) en un intervalo de 0.05-10 µg/L. Para ello se pesaron 0.001 g del estándar que se disolvieron en 1 mL de solución amortiguadora de boratos 0.1 M, pH 9.5 con Na₂EDTA 2 mM (esta solución es estable por 4 días). A partir del estándar de 1 mg/mL, se prepararon las concentraciones de 0.05, 2, 6 y 10 µg/mL. A 200 µL de cada dilución se le agregó un volumen de solución reguladora de boratos 0.25

M, pH 10.5 con Na₂EDTA 4 mM y SBD-F. Esta mezcla se incubó en baño maría, por 60 min a 60 °C, después se enfrió y se filtró con filtros Millipore de 0.22 µm de punto de corte y 13 mm de diámetro (Araki y Sako, 1987).

Análisis de la Información

Se determinó la distribución de los valores de Hcys, así como de los valores de los marcadores de inflamación y de control glicémico del grupo de pacientes y del grupo control. Una vez descartada la distribución normal de los valores individuales de Hcys (sesgo = 3.79 y kurtosis = 18.40), se realizó el análisis estadístico de los resultados con el programa JMP versión 5.0.1 (SAS Institute, Carolina del Norte, Estados Unidos). El significado de las diferencias de las medianas entre los grupos (pacientes y controles) fue estimado por la prueba U de Mann-Whitney. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con $p < 0.05$. Se determinó el coeficiente de Spearman, tomando como variable dependiente a la Hcys y como variables independientes a todos los marcadores de control metabólico.

RESULTADOS Y DISCUSION

El interés despertado en los últimos años por determinar la concentración plasmática de Hcys en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2, se ha debido a su aparente utilidad como marcador de riesgo de complicaciones (Masuda y col., 2008) y ha favorecido el desarrollo de nuevos métodos para la cuantificación de Hcys para asegurar resultados confiables (Refsum y col., 1998; Ulenad y col., 1993; krijt y col., 2001).

En este trabajo, se cuantificó la concentración de Hcys sérica por cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés), para estimar su posible correlación con la concentración de ácido siálico sérico, proteína C-reactiva, y con los marcadores de control glicémico y lipídico, en un grupo de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) de una unidad de primer nivel de atención médica de Hermosillo, Sonora. De los 47 pacientes incluidos en el estudio, 17 (36.17%) presentaron complicaciones. Dos de los 17 pacientes 11.8% presentaron complicaciones renales, 32.3% complicaciones oftálmicas y 58.9% complicaciones cardiovasculares.

Estandarización del Método Cromatográfico para la Separación de Tioles

La Hcys es un analito muy sensible a los cambios de pH y concentración de sal (Andersson y col., 1993), pero además es muy sensible a la luz (Dudman y col., 1993). Por esta razón, la separación del suero de las muestras sanguíneas venosas y su almacenamiento a - 30°C se realizó en menos de 2 h (Malinow y col., 1994).

Otro aspecto importante que fue considerado en este trabajo es que actualmente la Hcys sérica se cuantifica sólo con fines de investigación (Cumurcu y col., 2006; Sharma y col., 2006; Refsum y col., 1998). Por esta razón, se requiere de un proceso de estandarización de las condiciones analíticas originales (Morales, 2008; Refsum y col., 1998) antes de iniciar la estimación la concentración de Hcys con un equipo e implementos distintos a los que fueron utilizados en los trabajos originales. Esto fue tomado en cuenta para la estandarización del método usado en este trabajo, mismo que

estuvo basado en el método Ubbink y col. (1991) el cual a su vez fue una modificación del original de Araki y Sako (1987). En el método de Ubbink y col., por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), los autores demostraron que al utilizar una fase móvil con un pH ácido ($\text{pH} = 2.1$) se asegura la protonación del 50% de los grupos carboxilo del complejo SBD-homocisteína, prolongando con ello el tiempo de retención de la molécula en la columna cromatográfica y obteniendo una mejor resolución. El pH utilizado en la fase móvil por tales investigadores, se encuentra en el rango recomendado por algunas casas comerciales (entre 2.0 y 7.5) para evitar la hidrólisis de los enlaces siloxanos de la fase estacionaria, ya que corren el riesgo de hidrolizarse a valores de pH extremos (CosmoBio, Argentina). Considerando lo anterior, en este trabajo se ensayaron condiciones analíticas similares a las utilizadas por Ubbink y col., (1991), con excepción del pH de la fase móvil, que se ensayó a un pH ácido en el rango de 3.0 a 4.8, para lograr una buena repetibilidad intralaboratorio.

Se realizaron cinco diferentes corridas isocráticas con el estándar de Hcys, manteniendo la composición de la fase móvil (fosfato de sodio dihidrogenado, 0.1 M, con CH_3CN al 4%, a pH ácido ajustado con ácido fosfórico concentrado), con cinco diferentes valores de pH: 3.0, 4.2, 4.4, 4.6 y 4.8 (Andersson y col., 1992). En la figura 4, puede observarse que la resolución de la Hcys fue mejor a pH 3.0, motivo por el que fue éste el pH al que se ensayó la separación de la Hcys del glutatión, por ser este último tiol muy abundante en el suero. Los resultados de este último ensayo pueden observarse en la figura 5, en la que se presentan los cromatogramas característicos de la separación de los estándares utilizados. En ellos, se puede observar que con la fase móvil a pH 3.0 (fosfato de sodio dihidrogenado, 0.1 M, con CH_3CN al 4%, a pH 3.0 ajustado con ácido fosfórico concentrado), el tiempo de retención (Tr) de la Hcys fue de 2.50 min, mientras que el Tr del glutatión fue de 5.03 min. La resolución de los tioles fue similar a la obtenida por Ubbink y col. (1991).

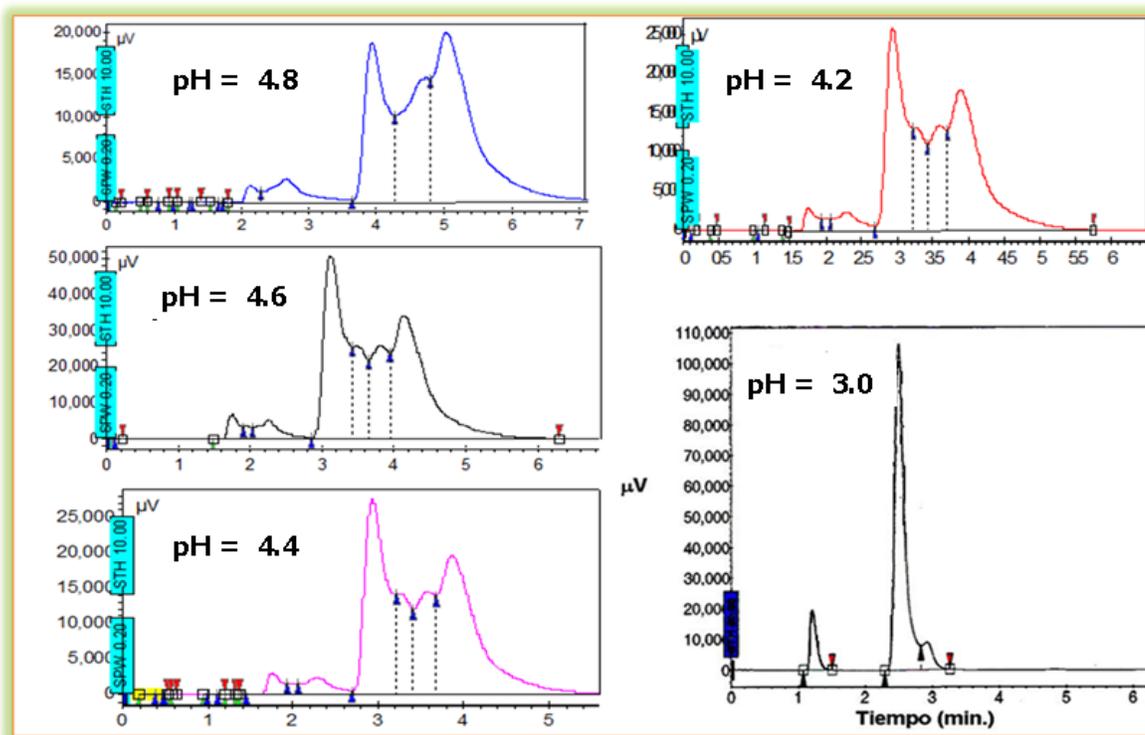


Figura 4. Corridas isocráticas realizadas con una fase móvil a cinco diferentes pH.

Las corridas se realizaron en un sistema Varian ProStar (bomba modelo 240, detector de fluorescencia modelo 363 e inyector Rheodyne con asa de 50 μL) con una fase estacionaria Microsorb C-18 (de 100 mm de longitud por 4.6 mm de diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula) y una precolumna de 5 cm (con características de empaque iguales a la columna) con amortiguador de fosfato de sodio dihidrogenado, 0.1 M, con CH_3CN al 4%, ajustado a pH de 4.8, 4.6, 4.4, 4.2 y 3.0, respectivamente.

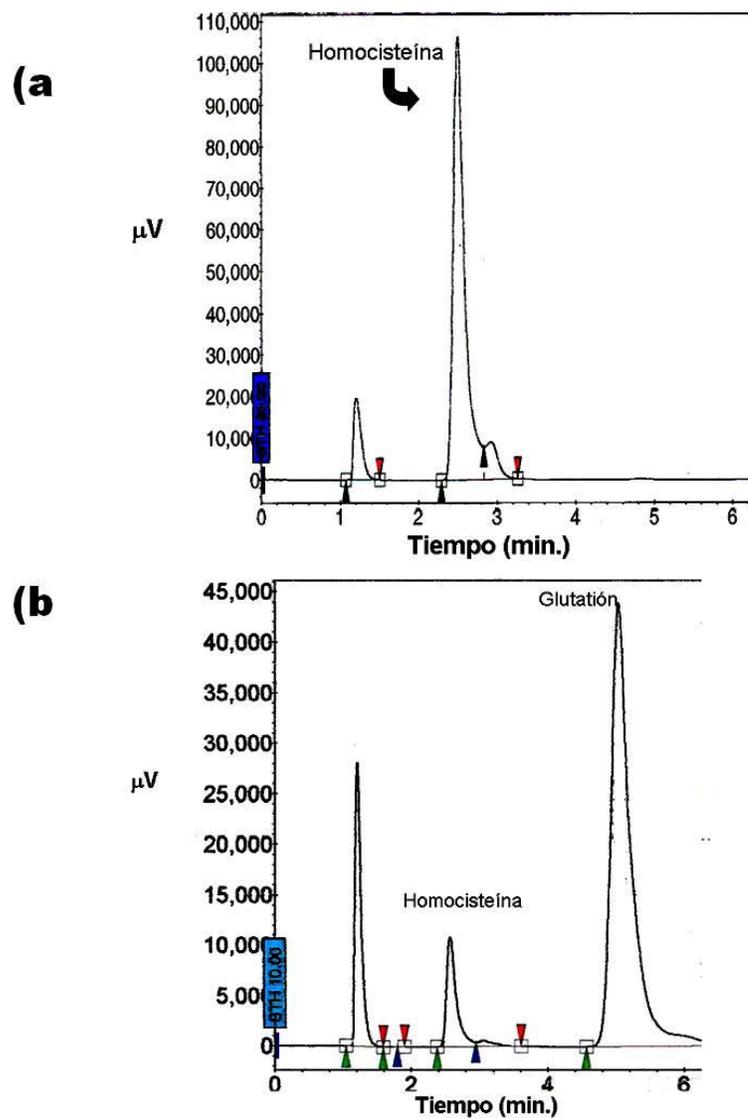


Figura 5. Corridas isocráticas realizadas con el estándar de homocisteína y con una mezcla de estándares homocisteína-glutación.

Las corridas se realizaron en un sistema Varian ProStar (ver características en el texto) en columna Microsob C-18 y fase móvil de fosfato de sodio dihidrogenado, 0.1 M, pH 3.0 con CH_3CN al 4%. a) Estándar de homocisteína, con Tr de 2.50 min y b) estándares de homocisteína y glutación, con un Tr del glutación de 5.03 min.

Con estos resultados, se obtuvo el tiempo de retención esperado (2.5 min para la Hcys), por lo que se tomó el acuerdo de usar estas condiciones para estimar la concentración de Hcys de las muestras de los pacientes (sueros problema) y controles; la curva de calibración obtenida con un gradiente lineal de 1.875 a 375 $\mu\text{mol/L}$, tuvo un coeficiente de correlación de 0.99 y un coeficiente de variación menor al 1%.

Resultados de las Determinaciones Analíticas

Los resultados de los parámetros bioquímicos analizados en los pacientes incluidos en este trabajo se presentan en la tabla II. En dicha tabla, se puede observar que la concentración de Hcys sérica de los sujetos sanos (grupo control) estuvo en el rango de 10.2 a 39.2 $\mu\text{mol/L}$ con una mediana de 11.2 (RI = 10.9 - 12.3) $\mu\text{mol/L}$, una concentración significativamente menor ($p < 0.05$) a la de los pacientes con diabetes, en quienes se observó que la concentración de Hcys estuvo entre 10.3 y 93.03 $\mu\text{mol/L}$, con una mediana de 15.55 (RI = 11.6 - 18.8) $\mu\text{mol/L}$ (Tabla II).

Soinio y col., (2004) hicieron un análisis prospectivo de siete años en el que evaluaron los niveles de Hcys en una población finlandesa de pacientes con diabetes, con y sin eventos vasculares, para buscar la asociación entre la concentración de Hcys y los eventos vasculares. En sus resultados observaron que los hombres que habían padecido alguna complicación mostraron una concentración de $11.4 \pm 4.8 \mu\text{mol/L}$ mientras que en los que no la padecieron fue de $10.2 \pm 4.8 \mu\text{mol/L}$ ($p = 0.013$); en la mujeres fue de 10.1 ± 3.4 contra $9.4 \pm 3.9 \mu\text{mol/L}$ ($p = 0.038$), respectivamente. Esto demuestra la importancia de realizar un análisis por género cuando se presenta este factor de sesgo en los grupos de estudio. En el presente trabajo, la variable género no influyó en los resultados de las concertaciones de homocisteína porque no encontraron diferencias entre los pacientes de sexo masculino y femenino ($p = 0.5150$) y fue similar en el de controles ($p = 0.1903$); se observó que de los 47 pacientes con diabetes mellitus, 31 fueron mujeres (65.9%) y 16 fueron hombres, mientras que en el caso de los 17

Tabla II. Comparación de los niveles basales de cada uno de los parámetros analizados en los adultos sanos (controles) y los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 incluidos en este estudio.

		Controles		Pacientes		P	Meta de control en los pacientes
		MEDIANA (RANGO INTERCUARTIL)		MEDIANA (RANGO INTERCUARTIL)			
N	F	17	11	47	31	p < 0.05	
	M		6		16		
Edad (años)		51.0 (44.2 - 63.75)		62.5 (53 - 68)		p < 0.05	
Glucosa (mg/dL)		93 (86 - 100)		137 (112 - 223)		p < 0.05	70-100
HDL-Col (mg/dL)		43 (38 - 55.5)		47 (40.8 - 60.9)		NS	>50
LDL-Col (mg/dL)		100 (51 - 127)		93 (69.5 - 153)		NS	<100
Colesterol (mg/dL)		190 (162 - 200)		180 (151 - 205)		NS	<200
Triglicéridos (mg/dL)		97 (70.5 - 115)		133 (90 - 178)		p < 0.05	<150
Proteínas totales (g/dL)		6.4 (6.05 -7.05)		7.2 (6.9 - 7.9)		p < 0.05	
Hcys (µmol/L)		11.2 (10.9 - 12.3)		15.5 (11.6 - 18.8)		p < 0.05	<14
Ácido siálico (mg/dL)		49 (31 -54)		74 (65 - 84)		p < 0.05	<60
PCR (mg/L)		3.7 (1.4 - 6.8)		5.9 (3.4 - 18.4)		p < 0.05	<3.8
Albúmina (g/dL)		3.8 (3.4 - 4.5)		4.2 (3.6 - 4)		NS	
Creatinina (g/dL)		0.8 (0.7 - 1)		1.1 (0.8 - 1.3)		p < 0.05	M:0.7 – 1.2 H:0.8 – 1.3
HB A1c (%)		5.6 (4.8 - 6.2)		8.6 (7.2 – 11.1)		p < 0.05	<7.0
Depuración de creatinina (mL/min)		109.3 (91.5 – 137.8)		70 (55.9 – 108.7)		p < 0.05	M:88 – 128 H: 97 – 137

NS: sin diferencias significativas, p < 0.05: diferencia significativa, M: mujer, H: hombre.

controles, 11 fueron mujeres (64.7%) y seis hombres, lo que demuestra la homogeneidad de las dos poblaciones en cuanto al género.

Al comparar la edad de los dos grupos de estudio, sí se observó una diferencia significativa, siendo mayor la edad de los pacientes (Mediana = 62.5; RI 53 - 68) ($p < 0.05$) que la de los controles (Mediana = 51.0; RI 44.2 - 63.75). La influencia de la edad sobre los niveles de Hcys, ha sido demostrada en estudios previos (Guldener y col., 2006), pero en el presente trabajo la diferencia en la concentración de Hcys entre los pacientes y los controles, fue significativamente diferente aún después de ajustar el análisis con la variable edad, por lo que es posible afirmar que la elevación de Hcys en los pacientes no fue influida por su edad.

No existen valores de referencia de la concentración de Hcys sérica en México, por lo que no fue posible hacer una comparación de ese tipo, pero al comparar nuestros resultados con los valores reportados a escala internacional, observamos que el 54% de los pacientes tuvo una concentración de Hcys por arriba del rango normal de 5 a 15 $\mu\text{mol/L}$ sugerido por Graham y col., (1997) en el proyecto Acción Concertada Europea de Homocisteína y Enfermedades Vasculares. Las implicaciones de la diferencia de concentración de Hcys que observamos entre los pacientes y los controles podrían ser analizadas a la luz de otros estudios en los que se ha demostrado que una concentración menor a la recomendada por Soberón y col., (2004), aunque significativamente superior a la de los sujetos sanos, puede ser un factor de riesgo de complicaciones.

La hiperhomocisteinemia se ha detectado hasta en el 41% de los pacientes diabéticos, en asociación significativa con los eventos macrovasculares de estos pacientes (Munshi y col., 1996). En el presente estudio, se observó que el 36.2% de los pacientes tuvo complicaciones y de ellos, el 14.8 % presentó una concentración de Hcys sérica $\geq 15.0 \mu\text{mol/L}$. Este porcentaje es menor al reportado por Okada y col., (1999) quienes observaron que la prevalencia de hiperhomocisteinemia (Hcys $> 14 \mu\text{mol/L}$) fue del 39.3% en un grupo de pacientes con diabetes mellitus tipo 2, siendo la concentración

de Hcys superior en los pacientes diabéticos con estenosis coronaria, con respecto a los pacientes diabéticos sin estenosis ($13,8 \pm 3,9$ vs $11,7 \pm 3,9$ $\mu\text{mol/L}$; $p = 0,0009$). Al respecto, se ha mencionado que el riesgo de mortalidad por enfermedades cardiovasculares entre los pacientes diabéticos aumenta considerablemente cuando los niveles de Hcys sérica están por encima de 14 $\mu\text{mol/L}$ en plasma (Hoogeveen y col., 2000), lo que nos permite suponer que el 54% (con hiperhomocisteinemia) de los 47 pacientes incluidos en este estudio tienen un riesgo elevado a padecer un accidente cardiovascular. Es probable que el porcentaje de pacientes en riesgo de complicaciones de nuestro estudio se incremente, al comparar nuestros resultados con los de otros estudios realizados en las últimas dos décadas, en los que se ha demostrado la asociación entre las complicaciones cardiovasculares de los pacientes diabéticos y la hiperhomocisteinemia con concentraciones de Hcys menores de 14 $\mu\text{mol/L}$ (Stabler y col., 1999; Chico y col., 1998; Buyschaert y col., 2000; Stabler y col., 1998; Hultberg y col., 1991). Por ejemplo, en el estudio de Emoto y col., en el 2001, se encontraron niveles de Hcys significativamente menores a los puntos de corte recomendados por el proyecto Acción Concertada Europea de Homocisteína y Enfermedades Vasculares, ya que reportaron que los pacientes con diabetes tuvieron una concentración de Hcys sérica de 12.0 ± 0.7 $\mu\text{mol/L}$, significativamente mayor a la de los controles sanos de 8.7 ± 0.3 $\mu\text{mol/L}$.

Con relación a la retinopatía, una complicación microangiopática de la diabetes mellitus tipo 2, Brazionis y col. (2008) encontraron concentraciones de 11.5 $\mu\text{mol/L}$ y 9.6 $\mu\text{mol/L}$ de Hcys en pacientes con y sin retinopatía, respectivamente. Mencionaron además que la concentración de Hcys no rebasa el punto de corte recomendado y, sin embargo, estimaron que con el aumento de 1 $\mu\text{mol/L}$ se incrementa el riesgo de padecer retinopatía diabética de un 15 a un 20% (Brazionis y col., 2008).

Contrariamente a los datos citados con anterioridad, se han publicado los resultados de investigaciones, como la de Tarkun y col., del 2003, quienes no encontraron diferencias en la concentración de Hcys entre los controles y los pacientes con diabetes

mellitus (9.66 ± 3.23 vs 9.38 ± 2.2 , $p < 0.7$; respectivamente). Estos resultados sugieren que aún es necesaria la comparación de los niveles de Hcys en diferentes poblaciones.

Por otro lado, se ha visto que los niveles de Hcys disminuyen significativamente cuando los pacientes toman suplementos alimentarios con vitamina B y ácido fólico (Rosenberg y col., 2006). Por esta razón, en este estudio no fueron incluidos los pacientes con tratamiento vitamínico y, por lo tanto, los niveles de Hcys observados en los pacientes y los controles no estuvieron influidos por este factor.

Al revisar el comportamiento de los componentes del perfil lipídico, no se encontraron diferencias significativas en el colesterol total, lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de alta densidad (HDL) entre los pacientes y los controles (Tabla II) y la concentración de los cuatro analitos estuvo dentro de los rangos normales. En el caso de los triglicéridos, se detectó una mayor concentración en los pacientes ($p < 0.05$) que en los controles, 133 mg/dL (RI = $90 - 178$) vs 97 mg/dL (RI = $70.5 - 115$), pero esta concentración no rebasó el límite superior normal de triglicéridos de 150 mg/dL (ADA, 2011). Además, la concentración de tres (colesterol total, HDL y LDL) de los cuatro analitos del perfil de lípidos fue menor en los pacientes, lo que es una demostración de su adecuado control lipémico, aunque sólo el 44.68% (21 pacientes) tenían la prescripción de tratamiento hipolipemiente.

Varios estudios han demostrado que los niveles de HDL-colesterol de los pacientes con diabetes mellitus son similares a los de los grupos de adultos no diabéticos, sin embargo los niveles de Hcys correlacionan negativamente con los de HDL sólo en los pacientes con DM2. Este hecho, podría explicar por sí sólo la tendencia prematura de aterosclerosis en los pacientes con diabetes (Hoogveen y col., 1998; Meigs y col., 2001). En nuestro estudio la concentración de HDL fue también similar entre pacientes y controles (Tabla II), pero no se observó correlación entre la HDL y la concentración de Hcys (Tabla III). Tampoco observamos diferencias en la concentración de colesterol total y la lipoproteína de baja densidad (LDL) entre los pacientes y los controles (Tabla

II), lo que pudo haber sido el resultado del tratamiento crónico de los pacientes con hipolipemiantes orales, ya que el 44.68 % de los 47 pacientes estaban con tratamiento a base de estatinas y/o fibratos. Interesantemente, la LDL mostró correlación (positiva) con la concentración de Hcys (Tabla III) ($r^2= 0.105$, $p= 0.0258$). Este resultado es similar al publicado por Fridman y col., 1997, quienes sugieren que la base de esta asociación es el sinergismo que podrían tener la Hcys y las partículas de LDL oxidadas en el proceso aterogénico. Por ello, es probable que sea necesaria la valoración de la LDL oxidada aún en pacientes normolipémicos, especialmente en grupos de pacientes con elevado riesgo angiopático como los pacientes con diabetes mellitus incluidos en este estudio.

La hipertensión es otro factor de alta prevalencia (49%) en la población incluida en este estudio, que podría estar influyendo directamente en el desarrollo de la macroangiopatía. Sin embargo, a diferencia de otros estudios (Hoogeveen y col., 1998; Meigs y col., 2001), en este trabajo no encontramos relación entre las dos variables, quizá debido a que el perfil de lípidos de los pacientes fue normal.

Los pacientes con disfunción renal avanzada, presentan niveles elevados de Hcys y creatinina plasmática (Stabler y col. 1999, Soinio y cols. 2004, Millan y col., 1998, Tarkun y col., 2003), pero en etapas de daño renal incipiente, la Hcys plasmática suele estar en niveles normales o bajos (Guldener y col., 2006). En este estudio, aunque en los pacientes se encontró una concentración mediana de creatinina plasmática significativamente mayor ($p < 0.05$) que en los controles (1.1 g/dL; RI = 0.8 - 1.3 vs 0.8 g/dL; RI = 0.7 - 1), la concentración de ambos grupos estaba en el rango normal. No se

Tabla III. Resultados del análisis de correlación entre la Hcys con los parámetros metabólicos en los pacientes diabéticos.

GRUPO CONTROL		GRUPO DE DIABETICOS	
ECUACION	r ²	ECUACION	r ²
Edad = 55.276154 - 1.2758171Hcys	0.021833	Edad = 61.108944 - 0.0694655 Hcys	0.000377
Glucosa = 94.589955 - 1.3483002 Hcys	0.024507	Glucosa = 161.01803 + 2.2493823 Hcys	0.005029
Colesterol = 176.45579 + 2.7225346 Hcys	0.029451	Colesterol = 174.49528 + 3.6543975 Hcys	0.050931
Trigliceridos = 94.343072 + 0.5035869 Hcys	0.000682	Trigliceridos = 129.64939 + 3.7965797 Hcys	0.023445
HDL = 38.819628 + 3.1749748 Hcys	0.079372	HDL = 52.896776 - 0.2935333 Hcys	0.002746
LDL = 86.082978 + 1.4039486 Hcys	0.002476	LDL = 86.006326 + 6.7926937 Hcys	0.105607 p=0.0258
PT = 6.7544591 - 0.087507 Hcys	0.060719	PT = 7.4465072 - 0.015621 Hcys	0.004336
PCR = 2.2184154 + 0.8448323 Hcys	0.094219	PCR = 11.737042 + 0.0737865 Hcys	0.000239
SA = 39.15486 + 1.7686443 Hcys	0.038131	SA = 69.507632 + 1.6381228 Hcys	0.052773
HGB = 5.2559509 + 0.1097441 Hcys	0.034535	HGB = 8.7012837 + 0.2587188 Hcys	0.035975
ALB = 3.973104 - 0.04875 Hcys	0.00777	ALB = 4.3712172 - 0.0271797 Hcys	0.008901
Creatinina = 0.7604912 + 0.0276413 Hcys	0.01931	Creatinina = 1.2628248 - 0.0255287 Hcys	0.013361
Depuración de crea= 142.0839- 1.29528 Hcys	0.018432	Depuración de crea= 62.4524+ 1.537928 Hcys	0.112937 p=0.0224

observó correlación entre las dos variables, de la manera en la que se observa cuando y col., 2003) sin embargo, al estimar la depuración de creatinina, a través de la fórmula de Cockcroft-Gault (Murillo 2005), se observó que sí existen diferencias entre los grupos, ya que la mediana que presentaron los pacientes era mucho menor en comparación con la de los controles (70; RI = 55.0 -108.7 vs 109.3; RI = 91.5 – 137.8) (Tabla II). Además se observó una correlación positiva entre la depuración de creatinina y los niveles de Hcys ($r^2 = 0.11$; $p = 0.0224$ Tabla III) (similar a la observada por Emoto y col., en el 2001). No obstante estos resultados, con este análisis transversal no se puede afirmar que la depuración de creatinina es un factor de riesgo de complicaciones renales en el grupo de pacientes; a pesar de que algunos estudios señalan que la elevación de Hcys contribuye al desarrollo de glomeruloesclerosis (Cho y col., 2010), en este estudio no es posible identificar a la hiperhomocisteinemia como factor de riesgo de daño renal.

El control de la glicemia es una de las metas más importantes en el tratamiento de los pacientes con DM2, ya que se ha demostrado que la hiperglicemia es el principal factor responsable del deterioro del organismo (ADA, 2011). En el caso de los pacientes de este estudio, se demostró que todos estaban con tratamiento hipoglicemiante, sin embargo, en el 51 % de los pacientes la HbA1c se encontraba por arriba (concentración mediana de 8.6 %; RI = 7.2 – 11.1) del valor que se tiene como meta terapéutica ($< 7\%$; ADA, 2011). El descontrol glicémico de los pacientes diabéticos es muy frecuente a pesar del tratamiento hipoglicemiante (Roca y col., 2010; Schramm y col., 2008) y por ello se les considera como pacientes con alto riesgo de sufrir accidentes vasculares.

La hiperglucemia crónica conduce a las complicaciones de la diabetes mellitus por diversos mecanismos bioquímicos, que incluyen la inflamación crónica (Rosado y col., 2007). La inflamación es fundamentalmente una respuesta de carácter protector, cuyo objetivo último es defender al organismo de lesiones celulares, así como de las consecuencias de las mismas. Algunos biomarcadores de inflamación como la proteína C reactiva (PCR; Zulet y col., 2007; Rosado y col., 2007) y el ácido siálico (SA; Browning y col., 2004), aunque son inespecíficos, son utilizados como predictores del

riesgo cardiovascular en los pacientes con DM2. La PCR es una proteína de fase aguda producida por el hígado, mientras que el ácido siálico es el azúcar terminal de muchas de las glicoproteínas séricas y endoteliales; ambos marcadores parecen tener una correlación positiva consistente con el riesgo vascular de los pacientes con DM2, motivo por el que su concentración también fue estimada en este trabajo. En el análisis de los resultados se observó que los pacientes diabéticos presentaron una concentración alta de PCR de 5.9 mg/L (RI = 3.4 - 18.4), ya que el nivel normal de PCR es < 3.8 mg/L, mientras que los controles presentaron una mediana de 3.7 mg/L (RI = 1.4 - 6.8) (Tabla II), que se encuentra dentro de los valores normales. La síntesis elevada de PCR podría explicar la elevación de las proteínas totales séricas (PT) que presentó el grupo de pacientes diabéticos en este estudio (7.2 mg/dL; RI = 6.9 - 7.9 vs controles con 6.4 mg/dL; RI = 6.05 - 7.05) ($p < 0.05$; Tabla II) (Zulet y col., 2007).

En el caso del SA, también hubo diferencias entre los grupos, ya que los pacientes tuvieron una mediana de 74 mg/dL (RI = 65 - 84), que se encuentra por encima del límite superior normal de SA (<60 mg/dL), mientras que los controles tuvieron valores muy por debajo del punto de corte (49 mg/dL; RI = 31 - 54). En muchos estudios se utiliza solamente la medición de PCR para estimar el grado de inflamación crónica de los pacientes con DM2, sin embargo, en el presente estudio fue utilizado además el SA porque parece tener menor variabilidad intraindividual en el tiempo que otros marcadores de inflamación, proporcionando información más significativa de un estado inflamatorio habitual, por tanto, además de ser más estable puede ser utilizado como marcador de la respuesta de fase aguda (Zulet y col., 2007; Pickup, 2004).

Finalmente, los resultados demostraron que globalmente el grupo de pacientes con DM2 incluido en este estudio presentó un importante estado inflamatorio crónico, descontrol glicémico, además de una concentración de Hcys significativamente superior al del grupo de personas normoglicémicas aparentemente sanas. La concentración de Hcys en los pacientes es parecida a la concentración que se ha observado en otras poblaciones de pacientes, además, al ser significativamente superior a la de los

controles, es probable que constituya un factor de riesgo de complicaciones, adicional al que representa por sí sola la hiperglicemia y el estado de estrés inflamatorio (Rigla y col., 2001). Aunque las asociaciones encontradas no fueron suficientes para establecer un modelo de regresión lineal, es necesario recordar que la evaluación simultánea de los factores de riesgo individuales constituye una herramienta invaluable para la evaluación del riesgo de complicaciones en los pacientes con DM2 (Suarez y cols., 2005).

Una limitación del presente trabajo fue el reducido número de enfermos incluidos, que impidió realizar un análisis estratificado de las variables de mayor interés (Gómez y col., 2004). Sin embargo, el trabajo tiene el indudable valor de haber utilizado criterios de inclusión, exclusión y eliminación sumamente rigurosos, por lo que los resultados son altamente confiables y permiten hacer inferencias acerca del estado metabólico general de los pacientes y del valor de la Hcys como marcador de riesgo vascular.

CONCLUSIONES

A pesar de la importancia que tiene el conocer el grado de descontrol metabólico y la potencial utilidad de biomarcadores como la Hcys para definir el riesgo de complicaciones de la DM2, son escasos los estudios publicados al respecto en nuestro Estado. Como ocurre con muchas variables biológicas humanas, la concentración de Hcys podría encontrarse influida por factores medioambientales y genéticos, y es por ello que resultan importantes los estudios controlados en los que se definen características específicas para la inclusión de los grupos de estudio.

Aunque no existen valores de Hcys normalizados en nuestra población, en los resultados obtenidos en esta investigación se observó que la concentración de Hcys estuvo significativamente más alta en los pacientes diabéticos (15.55 $\mu\text{mol/L}$; RI = 11.6 - 18.8), con relación a la que presentaron los sujetos control normoglicémicos (11.2 $\mu\text{mol/L}$; RI = 10.9 - 12.3). Esta diferencia es importante debido a que existen reportes que sugieren que los límites para establecer la hiperhomocisteinemia varían entre diferentes poblaciones y que el aumento de 2 $\mu\text{mol/L}$ puede hacer la diferencia entre sufrir o no alguna complicación. En el presente trabajo, se observó que de los 47 pacientes, el 36% presentaron alguna complicación y de estos el 14% presentó hiperhomocisteinemia.

La concentración de Hcys, correlacionó positivamente con la LDL a pesar de que la concentración de este analito estaba en los valores normales. Esto sugiere la necesidad de evaluar el estado de oxidación de la lipoproteína. También se observó correlación positiva entre la tasa de depuración de creatinina y la concentración de Hcys, aunque por el diseño transversal del estudio no fue posible conocer la relación causal entre ambas variables (Cho y col., 2010).

Finalmente, los niveles de HbA1c, PCR y SA estuvieron significativamente elevados en el grupo de pacientes incluido en este estudio, lo cual es una evidencia de su

descontrol metabólico y muestra la necesidad de profundizar en la búsqueda de estrategias para el control del proceso inflamatorio crónico de estos pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

- ADA (American Diabetes Association). 2011. Standards of Medical Care 2011. *Diabetes Care*; 34(1): S11-S61.
- Andersson A, Brattstrom L, Israelsson B, Isaksson A, Hamflet A, Hultberg BL. 1992. Plasma Homocysteine Before and After Methionine Loading with Regard to Age, Gender, and Menopausal Status. *Eur J Clin Invest*; 22: 79-87.
- Araki A, Sako Y. 1987. Determination of Free and Total Homocysteine in Human Plasma by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J Chromatog*; 422: 42-52
- Arranz M, Da de Luis, Domínguez N, Izaola O, Aller R. 2002. Total Homocysteine and Cognitive Deterioration in Patients with Diabetes Type 2. *Diabetes Res Clin Pract*; 55:185-90.
- Baigent C, Burbury K, Wheeler D. 2002. Premature Cardiovascular Disease in Chronic Renal Failure. *Lancet*; 356: 147-52.
- Brazionis L, Rowley K, Itsiopoulos C, Harper CA, O’dea K. 2008. Homocysteine and Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care*; 31:50-56.
- Browning LD, Krebs JD, Jebb SA. 2004. Discrimination Ratio Analysis of Inflammatory Markers: Implications for the Study of Inflammation in Chronic Disease. *Metabolism*; 53(7): 899-903.
- Buyschaert M, Wallemacq PE, Dramais AS, Hermans MP. 2000. Hyperhomocysteinemia in Type 2 Diabetes. Relationship to Macroangiopathy, Nephropathy, and Insulin Resistance. *Diabetes Care*; 23:1816-22.
- Calvo F, Aguillo E, Blasco C, Lorenzo MA, Faure E. 2000. Diabetes Mellitus II. Homocisteína Basal y Factores Asociados. *Av Diabetol*; 16: 189-194.

- Cambien F, Polrier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D. 1992. Deletion Polymorphism in the Gene for Angiotensin-Converting Enzyme is a Potent Risk Factor for Myocardial Infarction. *Nature*; 359: 641-644.
- Carod-Artal FJ, Nunes SV, Vargas AP, Portugal D. 2007. Factores Determinantes de la Hiperhomocisteinemia en la Fase Crónica del Ictus. *Rev Neurol*; 44 (9): 513-519.
- Chico A, Pérez A, Córdoba Porrás A, Arcelus R, Carreras G, de Leiva A. 1998. Plasma Homocysteine is Related to Albumin Excretion Rate in Patients with Diabetes Mellitus. A New Link between Diabetic Nephropathy and Cardiovascular Disease? *Diabetol*; 41:684-93.
- Cho EH, Kim EH, Kim WG, Jeong EH, KhoEH, Lee WJ, Kim MS, Park JY, Lee KU. 2010. Homocysteine as a Risk Factor for Development of Microalbuminuria in Type 2 Diabetes. *Korean Diabetes J*; 34:200- 206.
- Córdoba PA, Meneses LBE. 2002. La Hiperhomocisteinemia un Factor de Riesgo De Enfermedad Cardiovascular, Fácil de Modificar. *Iatreia*; 15(1):17-21.
- CosmoBio. Cuidado y Uso de Columnas con Base de Sílice. Ver. 104. Argentina.
- Cumurcu T, Sahin S, Aydin E. 2006. Serum Homocysteine, Vitamin B 12 and Folic Acid Levels in Different Types of Glaucoma. *BMC Ophthalmology*; 6: 1-6.
- D'Angelo A, Selhub J. 1997. Homocysteine and Thrombotic Disease. *Blood*; 90: 1-11.
- Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. 1998. Association of Fibrinogen, C-reactive Protein, Albumin, or Leukocyte Count With Coronary Heart Disease. *JAMA*; 279:1477-1482.
- Danesh J, Collins R, Peto R. 1997. Chronic Infections and Coronary Heart Disease: in There a Link?. *Lancet*; 350: 430-436.
- Danesh J, Lewington S. 1998. Plasma Homocysteine and Coronary Heart Disease: Systematic Review of Published Epidemiological Studies. *J Cardiovasc Risk*; 5(4):229-232.

- De Fronzo RA, Tobin JD, Andres R. 1979. Glucose Clamp Technique: A Method to Quantifying Insulin Secretion and Resistance. *Am J Physiol*; 237: 214-223.
- De Luis D, Fernández N, Aller R. 2004. Homocisteína en el paciente con diabetes mellitus. *Med Clin (Barc)*; 122(1):27-32.
- Dierkes J, Westphal S. 2005. Effect of Drugs on Homocysteine Concentrations. *Seminars in Vascular Medicine*; 5 (2): 124-139.
- Dudman NPB, Wilcken DEL, Wang J, Lynch JF, Macey D, Lundberg P. 1993. Disordered Methionine/Homocysteine Metabolism in Premature Vascular Disease its Occurrence, Cofactor Therapy, and Enzymology. *Arter and Thrombosis*;13 (9):1243-1260.
- Eikelboom JW, Lonn E, Genest J, Hankey G, Yusuf S. 1999. Homocysteine and Cardiovascular Disease: A Critical Review of the Epidemiologic Evidence. *Ann Intern Med* ;131: 363-375.
- Emoto M, Kanda H, Shoji T, Kawagishi T, Komatsu M, Mori K, Tahara H, Ishimura E, Inaba M, Okuno Y, Nishizawa Y. 2001. Impact of Insulin Resistance and Nephropathy on Homocysteine in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*; 24: 533-538.
- Fernández M, Castilla GL, Castella MA, Cueli RB, Fernández BR, Gutiérrez TR, Jiménez H. 2003. Trombosis Venosa Cerebral en Relación con la Hiperhomocisteinemia. *Rev Neurol*; 37: 1040-1043
- Fischer PA, Falcon C, Masnatta LD. 2000. Hiperhomocisteinemia Moderada: Fisiopatología de la Lesión Endotelial e Implicancia Clínica. *Rev Fed Arg Cardiol*; 29: 57-66.
- Fonseca V, Dicker-Brown A, Ranganathan S, Song W, Barnard RJ, Fink L, Kern PA. 2000. Effects of a High-Fat-Sucrose Diet on Enzymes in Homocysteine Metabolism in the Rat. *Metab*; 49: 736-741.

- Fridman O, D'eraimo JL, Finkelstein AE. 1997. Homocisteína Plasmática: Factor de Riesgo Independiente de Afecciones Vasculares Oclusivas. *Rev Argent Cardiol*; 65 (5): 571-581.
- Gellekink H, den Heijer M, Heil SG, Blom HJ. 2005. Genetic Determinants of Plasma Total Homocysteine. *Semin Vasc Med*; 5:98-109.
- Gerritsen T, Vaughn JG, Weisman HA. 1962. The Identification of Homocysteine in the Urine. *Biochem Biophys Res Commun*; 9: 493.
- Gómez FP, Ruiz A, Conde MR, Campos R, Vargas JC, Almaraz M. 2004. Marcadores de Inflamación Vascular en la Diabetes Mellitus tipo 2 con Hipertensión Arterial y Albuminuria. *Nefrología*; 24(1):67-69.
- Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM. 1997. Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Vascular Disease: The European Concerted Action Project. *JAMA*; 277: 1775-1781.
- Guldener CV, Stehouwer DA. 2002. Diabetes Mellitus and Hyperhomocysteinemia. *Semin Vasc Med*; 2(1):87-95.
- Guldener CV. 2006. Why is Homocysteine Elevated in Renal Failure and What can be Expected From Homocysteine-Lowering?. *Nephrol Dial Transplant*; 21: 1161-1166.
- Gutiérrez RJI, Pérez HF, Tamparillas SM, Calvo MMT. 2004. Influencia de Factores Bioquímicos y Genéticos en las Concentraciones de Homocisteína. *An Pediatr (Barc)*; 60 (3):215-21.
- Hadi HA, Suwaidi JA. 2007. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vascular health and riskmanagement*.; 3: 853-876.
- Hajjar KA. 1993. Homocysteine-Induced Modulation of Tissue Plasminogen Activator Binding to its Endothelial Cell Membrane Receptor. *J Clin Invest*; 91: 2873-2879.

- Hamstem A, De Faire U, Walldius G, Dahlen G, Szamosi A, Landou C. 1987. Plasminogen Activator Inhibitor in Plasma: Risk Factor for Recurrent Myocardial Infarction. *Lancet*; 2: 3-9.
- Harpel PC, Chang VT, Borth W. 1992. Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhance the binding of lipoprotein (a) to fibrin: A Potential Biochemical Link between Thrombosis, Atherogenesis, and Sulfhydryl Compound Metabolism. *Proc Natl Acad Sci*; 89: 10193-10197.
- Heijer M, Brouwer IA, Bos GM, Blom HJ, Put NM van der, Spaans AP. 1998. Vitamin Supplementation Reduces Blood Homocysteine Levels: A Controlled Trial in Patients with Venous Thrombosis and Healthy Volunteers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 18: 356-361.
- Hofmann MA, Ohl BK, Zumbach MS, Borcea V, Bierhaus A, Henkels Mamiral J, Schmidt AM, Fiehn W, Ziegler R, Wahl P, Nawroth P. 1998. Hyperhomocysteinemia and Endotelial Dysfunction in IDDM. *Diabetes Care*; 21(5):841-848.
- Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf B M, Ferran L J, Kohl B, Rao V, Kisiel W, Stern D M, Schmidt AM. 2001. Hyperhomocysteinemia Enhances Vascular Inflammation and Accelerates Atherosclerosis in a Murine Model. *J Clin Invest*; 107:675–683.
- Hoogeveen EK, Kostense PJ, Beks PJ. 1998. Hyperhomocysteinemia is associated with an increased Risk of Cardiovascular Disease, Especially in Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus. *Arterio Thromb Vasc Biol*; 18: 133-8.
- Hoogeveen EK, Kostense PJ, Eysink PE, Polak BC, Beks PJ, Jakobs C, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD. 2000. Hyperhomocysteinemia is Associated with the Presence of Retinopathy in Type 2 Diabetes Mellitus: The Hoorn Study. *Arch Intern Med*; 160(19): 2984-2990.

- Hoogeveen EK, Kostense PJ, Jakobs C, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwe CD. 2000. Hyperhomocysteinemia Increases Risk of Death, Especially in Type 2 Diabetes. 5-year Follow- Up of: The Hoorn Study. *Circulation*; 101: 1506-1511.
- Hsueh WA. 2003. Introduction: Newinsight in to Understanding the Relation of Type 2 Diabetes Mellitus, Insuline Resistance, and Cardiovascular Disease. *Am J Card*; 92 (4A): 7-9.
- Hultberg B, Agardh E, Andersson A, Brattstrom L, Isaksson A, Israelsson B, Agardh CD. 1991. Increased Levels of Plasma Homocysteine are Associated with Nephropathy, but not Severe Retinopathy in Type 1 Diabetes Mellitus. *Scand J Clin Invest*; 51: 277-282.
- Jacobsen DW. 1998. Homocysteine and Vitamins in Cardiovascular Disease. *Clin Chem*; 44: 1833-1843.
- Johnstone MT, Creager SJ, Sacles KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. 1993. Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation in Patients with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Circulation*; 88: 2510-2516.
- Krijt J, Vackova M, Kozich V. 2001. Measurement of Homocysteine and Other Aminothiols in Plasma: Advantages of Using Tris(2-carboxyethyl)phosphine as Reductant Compared with Tri-n-butylphosphine. *Clinical Chemistry*; 47(10): 1821–1828.
- Kronenberg F. 1998. Homocysteine Lipoprotein (a) and Fibrinogen: Metabolic Risk Factors for Cardiovascular Complications of Chronic Renal Disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*; 7: 271-278.
- Kuller LH, Eichner JE, Orchard TJ, Grandits GA, McCallum L, Tracy RP. 1991. The Relation between Serum Albumin Levels and Risk of Coronary Hearth Disease in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol*; 134: 1266-1277.

- Lentz SR, Sadler JE. 1991. Inhibition of Thrombomodulin Surface Expression and Protein C Activation by the Thrombogenic Agent Homocysteine. *J Clin Invest*; 88: 1.906-1.914.
- Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuzzi AG, Pepys MB. 1994. The Prognostic Value of C Reactive Protein and Serum Amyloid a Protein in Severe Unstable Angina. *N Engl J Med*; 331: 417-424.
- Malinow MR, Axthelm MK, Meredith MJ, MacDonald NA, Upson BM. 1994. Synthesis and Transsulfuration of Homocysteine in Blood. *J Lab Clin Med*; 123: 421-442.
- Malinow MR, Sexton G, Averbuch M, Wilson O, Upson B. 1990. Homocysteine in Daily Practice: Levels in Coronary Heart Disease. *Coronary Artery Dis*; 2: 4-12.
- Malinow MR. 1996. Plasma Homocysteine: A Risk Factor for Arterial Occlusive Diseases. *J Nutr*; 126: 1238S- 43S.
- Martínez A, Ruiz G, Egurbide MV, Ruiz M, Aguirre C. 2003. Homocisteína plasmática en pacientes con lupus eritematoso sistémico. *Med Clin (Barc)*; 120:681-5.
- Masuda Y, Kubo A, Kokaze A, Yoshida M, Fukuhara N, Takashima Y. 2008. Factors Associated with Serum Total Homocysteine Level in Type 2 Diabetes. *Environ Health Prev Med*; 13:148-155.
- McCarty. 2000. Insulin Secretion as a Potential Determinant of Homocysteine Levels. *Med Hypotheses*; 55: 454-455.
- McCully KS. 1969. Vascular Pathology of Homocysteinemia: Implications for the Pathogenesis of Arteriosclerosis. *Am J Pathol*; 56: 111- 128.
- Meigs JB, Jacques PF, Selhub J. 2001. Fasting Plasma Homocysteine Levels in the Insulin Resistance Syndrome. *Diabetes Care*; 24, 1403-10.
- Menéndez CA, Fernández RJE. 1999. Metabolismo de la Homocisteína y su Relación Con la Aterosclerosis. *Rev Cubana Invest Biomed*; 18 (3):155-68.

- Millán NJ, Botet MJP, Pintó SX, Hernández MA, Carey VJ, Hermans MP, Sacks FM, Fruchart JC. 2011. Estudio REALIST (REsiduAl risk, LIpids and Standard Therapies): Un Análisis del Riesgo Residual Dependiente del Perfil Lipídico en el Síndrome Coronario Agudo. *Endocrinol Nutr*; 58(1):38-47.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. 1991. Nitric Oxide: Physiology, Pathology and Pharmacology. *Pharmacol Rev*; 43: 109-142.
- Morales ZAA. 2008. Estandarización de un Método Para la Determinación de Homocisteína Sérica por Cromatografía Líquida de Alta Presión. http://tesis.uson.mx/digital/_tesis/wsp_tesis_detalle-nuevo.asp?tesis=18424.
- Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F, Laster L. 1964. Homocystinuria: An Enzymatic Defect. *Science*; 143: 1443-5.
- Mudd SH, Uhlenhof BW, Freeman JM, Finkelstein JD, Shih VE. 1972. Homocystinuria Associated with Decreased Methylene-Tetra Hydrofolate Reductase Activity. *Biochem Biophys Res Commun*; 46: 905-12.
- Munshi MN, Stone A, Fink L, Fonseca V. 1996. Hyperhomocysteinemia Following a Methionine Load in Patients with Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus and Microvascular Disease. *Metabolism*; 45: 133-135.
- Murillo GG. 2005. La Formula de Cockcroft-Gault. *Rev. med. IMSS*; 43(1):69-70.
- Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. 1999. The Disease Burden Associated with Overweight and Obesity. *JAMA*; 282: 1523-1529.
- Neri SGG, Prisco D, Martini F, Gori AM, Brunelli T, Poggesi L. 1997. Acute T-cell Activation is Detectable in Unstable Angina. *Circulation*; 95: 1.806-1.812.
- Nygaard O, Vollset SE, Refsum H, Brattström LM, Ueland PM. 1999. Total homocysteine and cardiovascular disease. *Journal of Internal Medicine*; 246: 425- 454.

- Okada E, Oida K, Tada H, Asazuma K, Eguchi K, Tohda G. 1999. Hyperhomocysteinemia is a Risk Factor for Coronary Arteriosclerosis in Japanese with Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*; 22:484-90.
- OMS, 2010.<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>.
- Pavia C, Ferrer I, Valis C, Artuch R, Colomé C, Vilaseca MA. 2000. Total Homocysteine in Patients with Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*; 23: 84-87.
- Pepys MB, Baltz ML. 1983. Acute Phase Proteins with Special Reference to C Reactive Protein and Related Proteins (Pentaxins) and Serum Amyloid a Protein. *Adv Immunol*; 34: 141-212.
- Pepys MB, Hirschfield GM. 2003. C-Reactive Protein: A Critical Update. *J Clin Invest*; 111:1805–1812.
- Pickup JC. 2004. Inflammation and Activated Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*; 27:813-823.
- Refsum H, Ueland PM. 1998. Recent Data are not in Conflict with Homocysteine as a Cardiovascular Risk Factor. *Curr Opin Lipidol*; 9: 533-539.
- Reunanen A, Knekt P, Aaran RK. 1992. Serum Ceruloplasmin and the Risk of Myocardial Infarction and Stroke. *Am J Epidemiol*; 136: 1082-1090.
- Rigla M, Pérez A, Leiva AD. 2001. Disfunción Endotelial, Alteraciones de la Coagulación e Hiperhomocisteinemia en la Diabetes Mellitus. *Cardiovascular Risk Factors*; 10(5): 296-302.
- Robinson K. 2004. Renal Disease, Homocysteine, and Cardiovascular Complications. *Circulation*; 109: 294-295.
- Roca RMM, Carral SLF, Baena NG, Aguilar DM. 2010. Evaluación del Grado de Consecución de Objetivos de Control Metabólico en Pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2. *Endocrinol Nutr*; 57(9): 434–439.

- Rosado PJ, Mendoza NVM. 2007. Mini-revisión: Inflamación Crónica y Estrés Oxidativo en la Diabetes mellitus. *Bioquímica*; 32(2): 58-69.
- Rosenberg HI, Mulrow DC. 2006. Trials That Matter: Should We Routinely Measure Homocysteine Levels and “Treat” Mild Hyperhomocysteinemia?. *Ann Intern Med.*;145 (3):226-227.
- Sadeghian S, Fallahi F, Salarifar M, Davoodi G, Mahmoodian M, Fallah N, Darvish S, Karimi A. 2006. Homocysteine, Vitamin B12 and Folate Levels in Premature Coronary Artery Disease. *BMC Cardiovascular Disorders*; 6 (38);1-7.
- Sayar N, Terzi S, Bilsel T, Yilmaz HY, Orhan L, Cakmak N, Erdem I, Tangurek B, Ciloglu F, Peker I, Esilcimen KY. 2007. Plasma Homocysteine Concentration in Patients With Poor or Good Coronary Collaterals . *Circulation J*; 71: 266 –270.
- Schini-Kerth BV. 2003. Homocysteine, a Proinflammatory and Proatherosclerotic Factor Role of Intracellular Reactive Oxygen Species. *Circ Res*; 93:271-273.
- Schramm TK, Gislason GH, Køber L, Rasmussen S, Rasmussen JN, Abildstrøm SZ, Hansen ML, Folke F, Buch P, Madsen M, Vaag A, Torp-Pedersen C. 2008. Los Pacientes Diabéticos Tratados con Hipoglucemiantes y los Individuos no Diabéticos Supervivientes de un Infarto de Miocardio Tienen el Mismo Riesgo Cardiovascular. Un Estudio Poblacional con 3,3 Millones de Individuos. *Circulation*; 117:1945-54.
- Schwartzman RA, Cox ID, Poloniecki J, Crook R, Seymour CA, Kaski JC. 1998. Elevated Plasma Lipoprotein (A) is Associated with Coronary Artery Disease in Patients with Chronic Stable Angina Pectoris. *J Am Coll Cardiol*; 31:1260-1266.
- Seghieri G, Breschi MC, Anichi R, De Bellis A, Alviggi L. 2003. Serum Homocysteine Levels are Increased in Women with Gestational Diabetes Mellitus. *Metabolism*; 52:720-3.
- Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF, Rush D, Rosenberg IH. 1993. Vitamin Status and Intake as Primary Determinants of Homocysteinemia in an Elderly Population. *JAMA*; 270: 2693-8.

- Selhub J. 1999. Homocysteine Metabolism. *Annu Rev Nutr*;19: 217-46.
- Sharma P, Senthilkumar RD, Brahmachari V, Sundaramoorthy E, Mahajan A, Sharma A, Sengupta S. 2006. Mining Literature for a Comprehensive Pathway Analysis: A Case Study for Retrieval of Homocysteine Related Genes for Genetic and Epigenetic Studies. *Lipids in Health and Disease*, 5:1.
- Sheu WH, Lee WJ, Chen YT. 2000. Plasma Homocysteine Concentrations and Insulin Sensitivity in Hypertensive Subjects. *Am J Hypertens*; 13: 14-20.
- Soberón M, Charaja A, Agüero Y, Oriondo R, Sandoval M, Núñez M. 2004. Estudio de los Niveles Plasmáticos de Homocisteína, Ácido Fólico y Vitamina B-12 en una Población Limeña de Jóvenes Adultos. 2004. *Anales de la Facultad de Med Univ. Nac. Mayor de San Marcos.*; 65 (2): 89 – 96.
- Soinio M, Marniemi J, Laakso M, Lehto S, Rönnemaa T. 2004. Elevated Plasma Homocysteine Level Is an Independent Predictor of Coronary Heart Disease Events in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Ann Intern Med*; 140 (2):94-100.
- Spijkerman AMW, Smulders YM, Kostense PJ, Henry RMA, Becker A, Teerlink T, Jakobs C, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CDA. 2005. Sadenosylmethionine and 5-Methyltetrahydrofolate are Associated with Endothelial Function after Controlling for Confounding By Homocysteine .The Hoorn Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 25: 778-784.
- Stabler S, Estacio R, Jeffers BW, Cohen JA, Allen RH, Schrier RW. 1999. Total Homocysteine is Associated with Nephropathy in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Metabolism*; 48:1096-101.
- Standards of Medical Care for Patients with Diabetes Mellitus. ADA, *Diabetes Care* 2003; 26: S33-S50.
- Suarez R, Campo SC, de la Morena S, Ruilope LM. 2005. Evaluación del riesgo cardiovascular y nuevos factores de riesgo de aterosclerosis. *Hipertension*; 22(5):195-203.

- Tan KCB, Karmin O, Chow WS, Ai VHG, Siow YL, Lam KSL. 2002. Hyperhomocysteinemia and Impaired Vasomotor Function in Type 2 Diabetes Mellitus. *Eur J Clin Invest*; 32(5):328-334.
- Tarkun I, Arslan B, Canturk Z, Tarkun P, Kozdag G, Topsever P. 2003. Homocysteine Concentrations in Type 2 Diabetes Mellitus Patients Without Cardiovascular Disease: Relationship to Metabolic Parameters and Diabetic Complications. *Turkish J Endocrinol Metabol*; 1: 11-17.
- Tsai J, Perrella M, Yoshizumi M, Hsieh C, Haber E, Schlegel R, Lee ME. Promotion of Vascular Smooth Muscle Cell Growth by Homocysteine. 1994. A link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci*; 91: 6369-6373.
- Ubbink JB, Vermack WJH, Bissbort S. 1991. Rapid High-Performance Liquid Chromatographic Assay for Total Homocysteine Levels in Human Serum. *J of Chromat*; 565:441-446.
- Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. 1993. Total Homocysteine in Plasma or Serum. Methods and Clinical Applications. *Clin Chem*; 39: 1764-79.
- Vasan RS, Beiser A, D'Agostino RB, Levy D, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, Wilso PW. 2003. Plasma Homocysteine and Risk for Congestive Heart Failure in Adults without Prior Myocardial Infarction. *JAMA*; 289: 1251-1257.
- Villar FM, San Frutos LL, del Rey SJM. 2001. Homocysteine and abnormal pregnancy. *Prog Obstet Ginecol*;44:149-158.
- Vita JA, Kaney JF, Raby KE, Morrow JD, Freedman JE, Lynch S. 1998. Low Plasma Ascorbic Acid Independently Predicts the Presence of an Unstable Coronary Syndrome. *J Am Coll Cardiol*; 31: 980-986.
- Warle EN. 1996. How Does Hyperglycaemia Predispose to Diabetic Nephropathy? *QJM*; 89: 943-951,

- Welch GN, Loscalzo J. 1998. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med*; 338: 1042-1050.
- Welch GN, Upchurch G, Loscalzo J. 1997. Homocysteine, oxidative stress, and vascular disease. *Hospital Practice* June 15,
- Wilken DEL, Wilcken B. 1976. The Pathogenesis of Coronary Artery Disease. A Possible Role for Methionine Metabolism. *J Clin Invest*; 57: 1079-82.
- Wollesen F, Brattstrom L, Refsum H, Ueland PM, Berglund L, Berne C. 1999. Plasma Total Homocysteine and Cysteine in Relation to Glomerular Filtration Rate in Diabetes Mellitus. *Kidney Int*; 55: 1028–35.
- Wong PWK, Kang SS. 1988. Accelerated Atherosclerosis. *Am J Med*; 84: 1093-1094.
- Yarema K. 2006. *The Sialic Acid Pathway in Human Cells*. Baltimore: John Hopkins University.
- Yeromenko Y, Lavie L, Levy Y. 2001. Homocysteine and Cardiovascular Risk in Patients with Diabetes Mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*; 11(2):108-16.
- Zulet MA, Puchau B, Navarro C, Martí A, Martínez JA. 2007. Biomarcadores del Estado Inflamatorio: Nexo de Unión con la Obesidad y Complicaciones Asociadas. *Nutr Hosp*; 22(5):511-27.