

HIPERHOMOCISTEINEMIA EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 DE UNA UNIDAD DE MEDICINA FAMILIAR DE HERMOSILLO, SONORA

HYPERHOMOCYSTEINEMIA IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS FROM A FAMILY HEALTH CARE CENTER AT HERMOSILLO, SONORA

María del Carmen Candia Plata*¹, Alma Alicia Morales Zayas¹, Patricia Torres Chávez², Enrique Bolado Martínez³, Miriam Denisse García Villa¹, Claudia Celeste Molina Domínguez¹, Ramón Alberto Rascón Pacheco⁴, Gerardo Álvarez Hernández¹, Lucía G. Castellón Campaña³ y María del Refugio Robles Burgueño⁵.

¹Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora, Encinas y Rosales s/n. Hermosillo, Sonora, 83000. México. ²Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Encinas y Rosales s/n. Hermosillo, Sonora, 83000. México. ³Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Encinas y Rosales s/n. Hermosillo, Sonora, 83000. México. ⁴Instituto Mexicano del Seguro Social. ⁵Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Carretera a La Victoria. Km. 0.6. Hermosillo, Sonora 83000, México.

RESUMEN

Se ha sugerido que los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) presentan concentraciones séricas altas de homocisteína (Hcys). En este trabajo, se demostró hiperhomocisteinemia y descontrol metabólico en un grupo de 47 pacientes con DM2 de una unidad de primer nivel de atención médica de Hermosillo, Sonora. La Hcys se midió por HPLC con detector fluorométrico y los marcadores de control metabólico fueron estimados por métodos colorimétricos, el ácido siálico (SA) por un método enzimático, la proteína C reactiva (PCR) de alta sensibilidad por nefelometría, y la hemoglobina A1c (HbA1c) por inmunoafinidad. Los niveles de Hcys de los pacientes (15,55 $\mu\text{mol/L}$; RI = 11,6 - 18,8) fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) que los de un grupo de 17 adultos no diabéticos, pareados por sexo y edad (11,2 $\mu\text{mol/L}$; RI = 10,9 - 12,3). Solamente en los pacientes con DM2 se encontró asociación de la Hcys con el LDL-col y con la depuración de creatinina plasmática, además de niveles elevados de HbA1c, glucosa, triglicéridos, proteínas totales, PCR, SA y creatinina, sugestivos del descontrol metabólico e inflamación crónica de los pacientes. Se recomienda realizar nuevos estudios, para estimar el valor de la Hcys como factor de riesgo de complicaciones vasculares en los pacientes con DM2.

Palabras clave: Diabetes mellitus tipo 2, hiperhomocisteinemia, diabetes descontrolada.

ABSTRACT

It has been suggested that patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) have higher homocysteine (Hcys) serum concentration. In this study, we demonstrated hyperhomocysteinemia in a group of 47 patients with T2DM from a first level Unit Care of Hermosillo, Sonora, and evidences of uncontrolled diabetes were found. The Hcys was measured by HPLC with fluorometric detection and markers of metabolic control were estimated by colorimetric methods (sialic acid (SA) by an enzymatic method, high sensitivity C-reactive protein (CRP) by nephelometry, and hemoglobin A1c (HbA1c) by immunoaffinity). Hcys levels in patients (15.55 $\mu\text{mol/L}$, RI=11.6-18.8) were significantly higher ($p < 0.05$) than those from a group of 17 adults without diabetes (11.2 $\mu\text{mol/L}$, RI=10.9 - 12.3), matched by sex and age. An association between Hcys and LDL-chol or plasma creatinine clearance was only found in patients with T2DM. Also, high levels of HbA1c, glucose, triglycerides, total protein, CRP, SA, and creatinine were found, which suggested a state of uncontrolled diabetes and chronic inflammation. Further studies to estimate the value of Hcys as a risk factor for vascular complications in patients with T2DM is recommended.

Key words: Type 2 diabetes mellitus, hyperhomocysteinemia, uncontrolled diabetes.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un desorden plurimetabólico que se caracteriza por hiperglicemia crónica. Éste puede ser el único signo al diagnosticarse la enfermedad, pero progresivamente se deteriora de la función de órganos como los ojos, los riñones y el corazón (Fowler, 2011). Por ello, y porque la prevalencia de DM2 en México es muy alta (14.4%; ENSANUT, 2006), la diabetes es una de las principales causas de discapacidad prematura y muerte en adultos en México.

En los pacientes que sufren diabetes, la enfermedad macrovascular es de dos a seis veces más frecuente que en las personas normoglicémicas (ADA, 2011). 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, que al elevarse en el suero participa en la formación de compuestos oxidantes con poder aterogénico (Vasan *et al.*, 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 (Córdoba y Meneses, 2002; Spijkerman *et al.*, 2005). Por estas razones, la medición de Hcys sérica podría ser de utilidad para estimar el riesgo de complicaciones vasculares de la diabetes (Spijkerman *et al.*, 2005). Sin embargo, hasta ahora no se acepta a la hiperhomocisteinemia como marcador de complicaciones vasculares, porque en varios estudios no se ha observado 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 macrovascular (Pavia *et al.*, 2000). Es probable que las inconsistencias

entre las diferentes publicaciones se deban a que los estudios se han hecho sin considerar otros factores de riesgo macrovascular (Spijkerman *et al.*, 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, o bien a la influencia de factores étnicos.

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.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de 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 una Unidad de Medicina Familiar de Primer Nivel de Hermosillo, Sonora, México, para estimar la concentración sérica de Hcys y su potencial correlación 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. Se solicitó el consentimiento, escrito y voluntario, de los pacientes para participar en el estudio. Se excluyeron y/o eliminaron aquellos pacientes con hiperhomocisteinemia congénita, enfermedades hepáticas crónicas no relacionadas con la diabetes, cáncer, consumo de más de una copa de vino de mesa al día, o que hubieran tenido un consumo crónico de antioxidantes, multivitamínicos y/o ácido fólico, o alguna infección 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 a partir de la valoración clínica y de laboratorio de 188 adultos aparentemente sanos. Después de aplicar los mismos criterios de inclusión y exclusión, utilizados para formar el grupo de los pacientes, de los 188 sujetos 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[®] (U.S.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. CH204A) 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 inmunoafinidad. La estimación de proteína C reactiva (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

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico, para espectroscopía y/o HPLC. La DL-homocisteína, tri-n-butilfosfina (TBP), dimetilformamida (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, U.S.A.). 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, U.S.A.).

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., U.S.A.). Se realizaron 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).

Obtención de la muestra sanguínea. 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 *et al.*, 1994).



Preparación del suero. La determinación de Hcys se realizó en 500 μ L de suero problema (o control) descongelado. El suero fue incubado con 50 μ L de TBP al 10 % en DMF, en reposo, durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, se le añadieron 500 μ L de Na₂EDTA 1 mM, en TCA al 10%, mezclando vigorosamente por 10 segundos. Luego la mezcla se centrifugó a 1000 g durante 5 minutos a 4°C. Una alícuota de 200 μ L del sobrenadante fue incubada con 400 μ L de solución reguladora de boratos y 200 μ L de SBD-F (1mg/mL del fluorógeno en amortiguador de boratos 0,25 M, pH 9,5), en baño de agua 60°C, por 60 min. Después de enfriarse, se filtró la muestra derivatizada con filtros Millipore de 0,22 μ m 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, U.S.A.) en un intervalo de 0,05-10 μ g/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. A partir del estándar de 1 mg/mL, se prepararon las concentraciones de 0,05, 2, 6 y 10 μ g/mL. A 200 μ L 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 de agua, a 60°C, por 60 min; después se enfrió y se filtró con filtros Millipore de 0,22 μ m 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) y de los marcadores metabólicos restantes, se realizó el análisis estadístico de los resultados con el programa JMP versión 5.0.1 (SAS Institute, Carolina del Norte, U.S.A.). 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 los marcadores de control metabólico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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 México. En este trabajo, se cuantificó la concentración de Hcys sérica, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High Performance Liquid Chromatography, 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 estos 17 pacientes (11,8%) presentaron complicaciones renales, seis (32,3%) complicaciones oftálmicas y 10 (58,9%) complicaciones cardiovasculares.

La Hcys es un analito muy sensible a los cambios de pH y concentración de sal (Andersson *et al.*, 1992), pero además es muy sensible a la luz (Dudman *et al.*, 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 *et al.*, 1994).

La estimación de la concentración sérica de Hcys se realizó por HPLC según el método de Ubbink *et al.* (1991), utilizando una fase móvil con un pH ácido (pH = 2,1) para protonar los grupos carboxilo del complejo SBD-homocisteína, prolongar su tiempo de retención en la columna cromatográfica y obtener una mejor resolución. El pH utilizado en la fase móvil en dichas investigaciones se encuentra en el rango recomendado por algunas casas comerciales (entre 2,0 y 7,5) para preservar la integridad de la fase estacionaria (CosmoBio, Argentina).

El método cromatográfico se estandarizó partiendo de las condiciones analíticas originales de Ubbink *et al.*

(2001), con excepción del pH de la fase móvil, que se preparó a un pH ácido en el rango de 3,0 a 4,8, para lograr una buena repetibilidad. 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), pero con el pH ajustado a cinco diferentes valores: 3,0, 4,2, 4,4, 4,6 y 4,8 (Andersson *et al.*, 1992). En la figura 1, puede observarse que la resolución de la Hcys fue mejor a pH 3,0.

El análisis de la resolución del método, se realizó separando una mezcla de dos estándares: Hcys y glutatión; este último, es un tiol muy abundante en

el suero, por lo que la demostración de su separación óptima de la Hcys era un paso preliminar indispensable para aceptar el método estandarizado. Los resultados de este último ensayo pueden observarse en la figura 2, 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 (T_r) de la Hcys fue de 2,50 min, mientras que el T_r del glutatión fue de 5,03 min. En esta corrida cromatográfica, la resolución de los tioles fue similar a la obtenida por Ubbink *et al.* (2001).

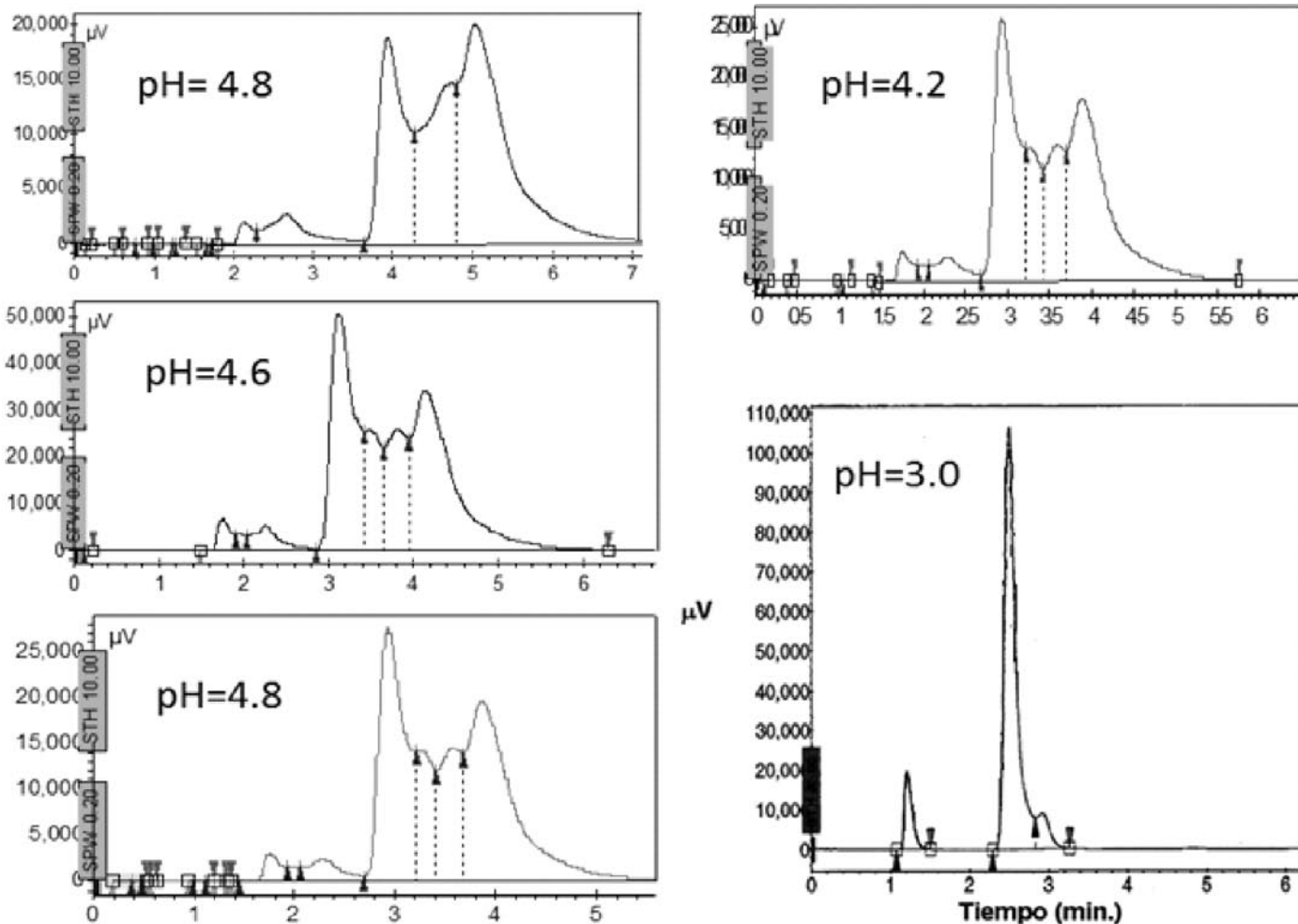


Figura 1 Corridas isocráticas realizadas con una fase móvil a cinco diferentes pH.

Figure 1 Chromatograms of homocysteine using one mobile phase at five different pH values.

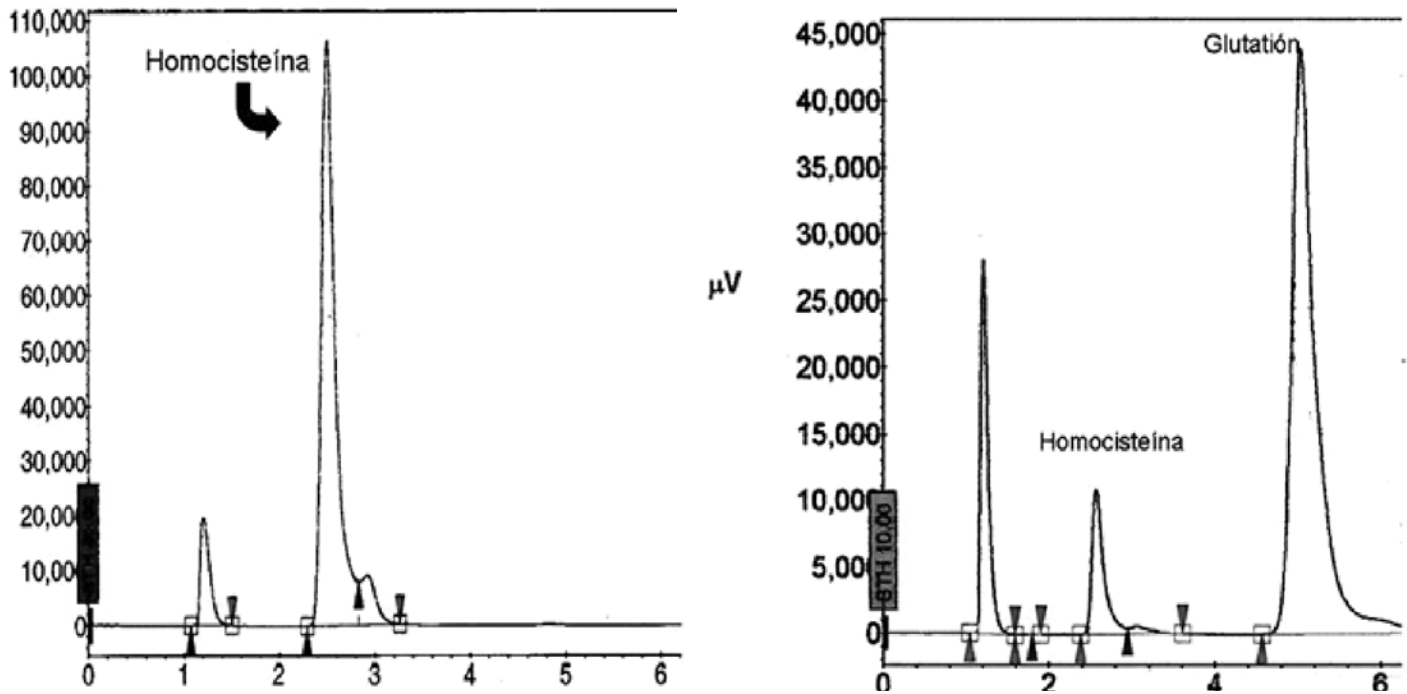


Figura 2 Corridos isocráticos realizados con el estándar de homocisteína y con una mezcla de estándares homocisteína-glutati3n.

Figure 2 Isocratic chromatography of a homocystein standard and a mixture of homocysteine-glutathione.

Con estos resultados, se obtuvo el tiempo de retenci3n esperado (2,5 min para la Hcys) para estimar la concentraci3n de Hcys de los sueros problema y control; la curva de calibraci3n de Hcys, obtenida con un gradiente lineal de 1,875 a 375 $\mu\text{mol/L}$, tuvo un coeficiente de correlaci3n de 0,99 y un coeficiente de variaci3n menor al 1%.

Los resultados de los parámetros bioquímicos analizados en los pacientes incluidos en este trabajo se presentan en la tabla 1. En dicha tabla, se puede observar que la concentraci3n 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 concentraci3n significativamente menor ($p < 0,05$) a la de los pacientes con diabetes, en quienes se observó que la concentraci3n 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 1). La concentraci3n mediana de Hcys en los pacientes corresponde, de acuerdo con Sober3n *et al.* (2004), a una hiperhomocisteinemia moderada. Se ha visto que los niveles de Hcys disminuyen significativamente cuando los pacientes toman suplementos vitamínicos, como vitamina B y ácido fólico (Fabian *et al.*, 2011), pero ni los pacientes ni los controles incluidos estuvieron influidos por este factor.

Soinio *et al.* (2004) hicieron un análisis prospectivo de siete años en el que evaluaron los niveles de Hcys en una poblaci3n finlandesa de pacientes con diabetes, con y sin eventos vasculares, para buscar la asociaci3n entre la concentraci3n de Hcys y los eventos vasculares. En sus resultados observaron que los hombres que habían padecido alguna complicaci3n mostraron una concentraci3n 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 $10,1 \pm 3,4$ 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, se demostró que la variable género no influyó los resultados de Hcys, porque el número de pacientes de sexo masculino y femenino fue similar entre los grupos de estudio; de los 47 pacientes con diabetes mellitus, 31 fueron mujeres (65,9%) y 16 fueron hombres, mientras que en el caso de los 17 controles, 11 fueron mujeres (64,7%) y seis hombres. Lo anterior, demuestra la homogeneidad de las dos poblaciones en cuanto al género se refiere.

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 (Fabian *et al.*, 2011), 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, lo que significa que la concentración superior de Hcys en los pacientes no fue debida a que su edad fue mayor que la de los controles.

No existen valores de referencia de la concentración de Hcys sérica en adultos mexicanos, 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 Soberón *et al.*, 2004, en el proyecto Acción Concertada Europea de Homocisteína y Enfermedades Vasculares. Esta concentración fue significativamente superior ($p < 0,05$) a la observada en los controles y puede clasificarse como hiperhomocisteinemia moderada.

Las implicaciones de la diferencia de concentración de Hcys entre los pacientes y los controles del presente estudio, podrían ser analizadas a la luz de otros estudios en los que se ha demostrado que una concentración menor a la recomendada por Soberón

et al. (2004), aunque significativamente superior a la de los sujetos sanos, podría ser un factor de riesgo de complicaciones de la diabetes. Munshi *et al.* (1996), detectaron hiperhomocisteinemia hasta en el 41% de los pacientes diabéticos, en asociación significativa con los eventos macrovasculares de estos pacientes. Dicha cifra fue mayor a la encontrada en el presente estudio, en el que se observó que el 36,2% de los pacientes tuvo complicaciones y de ellos, el 14,8 % presentó una concentración de Hcys sérica significativamente superior a la mediana de Hcys de los controles (Hcys $> 15,5 \mu\text{mol/L}$). Este porcentaje es similar al que reportaron Okada *et al.* (1999), utilizando un punto de corte para definir hiperhomocisteinemia (definida por Hcys $> 14 \mu\text{mol/L}$) inferior al sugerido por Soberón *et al.*, en el 2004. El 39,3% de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con estenosis coronaria, presentó una concentración de Hcys superior 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, lo que significaría que el 54% de los 47 pacientes incluidos en este estudio tienen un riesgo elevado de muerte por accidente cardiovascular (Hoogeveen *et al.*, 2000).

Aún más, es probable que este porcentaje sea mayor si comparamos 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 las concentraciones de Hcys menores de $14 \mu\text{mol/L}$ (Stabler *et al.*, 1999; Chico *et al.*, 1998; Buysschaert *et al.*, 2000; Hultberg *et al.*, 1991). Por ejemplo, en el estudio de Emoto *et al.* 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 $12,0 \pm 0,7 \mu\text{mol/L}$, significativamente mayor a la de los controles sanos de $8,7 \pm 0,3 \mu\text{mol/L}$. Alternativamente, la menor concentración observada



por estos investigadores, podría ser el resultado de la influencia de las diferencias poblacionales en la concentración de Hcys.

Con relación a las complicaciones microvasculares de la diabetes mellitus tipo 2, Brazionis *et al.* (2008), encontraron concentraciones de 11,5 μ mol/L y 9,6 μ 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 μ mol/L se incrementa el riesgo de padecer retinopatía diabética, pasando de 15% al 20% (Brazionis *et al.*, 2008). Por el contrario, se han publicado los resultados de investigaciones, como la de Tarkun *et al.* (2003), quienes no encontraron diferencias en la concentración de Hcys entre controles y pacientes con diabetes mellitus (9,66 \pm 3,23 vs 9,38 \pm 2,2, $p < 0,7$; respectivamente). Estos resultados sugieren que aún es necesaria la comparación de los niveles de Hcys en diferentes poblaciones.

Tabla 1. Comparación de los parámetros bioquímicos de los adultos sanos (controles) y los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 incluídos en este estudio.

Table 1. Basal levels of the analyzed parameters from healthy adults (controls) and patients with type 2 diabetes mellitus.

	Controles* Mediana (rango intercuartil)	Pacientes** Mediana (rango intercuartil)	p	Meta de control en los pacientes
Edad (años)	51,0 (44,2 - 63,8)	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 (6,1 - 7,1)	7,2 (6,9 - 7,9)	$p < 0,05$	
Hcys (μ mol/L)	11,2 (10,9-12,3)	15,5 (11,6 - 18,8)	$p < 0,05$	<14
Acidosiálico (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

*17 sujetos, 11 mujeres y 6 hombres; **47 sujetos, 31 mujeres y 16 hombres.

NS: Sin diferencias significativas, $p < 0,05$: diferencia significativa.

Tabla 2 Resultados del análisis de asociación entre la Hcys y los parámetros metabólicos en los pacientes diabéticos.

Table 2 Analysis of the association between Hcys and several metabolic parameters in studied patients.

Grupo Control		Grupo de Pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2	
Ecuación	r ²	Ecuación	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
HbA1c = 5.2559509 + 0.1097441 Hcys	0,034535	HhA1c = 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 creatinina = 142.0839 - 1.29528 Hcys	0,018432	Depuración de creatinina = 62,4524 + 1,537928 Hcys	0,112937 p=0,0224

Por otro lado, 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 2) 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 97mg/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.

Los niveles de Hcys correlacionaron negativamente con los de HDL de los pacientes con DM2. Este dato es relevante porque para algunos investigadores, la relación inversa entre ambas variables podría explicar por sí sólo la tendencia prematura de aterosclerosis en los pacientes con diabetes (Hoogeveen *et al.*, 1997; Meigs *et al.*, 2001). En nuestro estudio la concentración de HDL fue también similar entre pacientes y controles (Tabla 1) y no se observó correlación entre la HDL y la concentración de Hcys (Tabla 2). Tampoco observamos diferencias en la concentración de colesterol total y la lipoproteína de baja densidad (LDL) entre los pacientes y los controles (Tabla 1), lo que pudo haber sido el resultado de que el 44,68 % de los pacientes estaban con tratamiento a base de estatinas y/o fibratos. Interesantemente, la LDL mostró correlación (positiva) con la concentración de Hcys (Tabla 2) ($r^2=0,105$, $p=0,0258$). Este resultado es similar al publicado por Fridman *et al.* (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. Esto sugiere la necesidad de cuantificar la LDL oxidada, tanto en los pacientes normolipémicos como dislipidémicos.

La hipertensión también mostró alta prevalencia (49%) entre los pacientes de este estudio, pero a diferencia de otros estudios (Hoogeveen *et al.*, 1997; Meigs *et al.*, 2001), en este trabajo no encontramos relación entre esta variable y la concentración de LDL.

Los pacientes con disfunción renal avanzada, presentan niveles elevados de Hcys y creatinina plasmática (Stabler *et al.*, 1999; Soinio *et al.*, 2004; Millán *et al.*, 2011; Tarkun *et al.*, 2003), pero en etapas de daño renal incipiente, la Hcys plasmática suele estar en niveles normales o bajos (Van Guldener y

Stehouwer, 2002). En este estudio, aunque los pacientes tuvieron una concentración mediana de creatinina plasmática significativamente mayor ($p<0,05$) que los controles (1,1 g/dL; RI = 0,8 – 1,3 vs 0,8 g/dL; RI = 0,7 - 1), la concentración de creatinina estaba en el rango normal en ambos grupos. No se observó correlación entre las dos variables, de la manera en la que se observa cuando hay daño renal significativo (Tarkun *et al.*, 2003) sin embargo, al estimar la depuración de creatinina, a través de la fórmula de Cockcroft-Gault (Murillo, 2005), se demostró la diferencia entre los grupos, ya que la depuración mediana de creatinina de los pacientes fue significativamente ($p<0,05$) menor que la de los controles (70; RI = 55,0 -108,7 vs 109,3; RI = 91,5 – 137,8) (Tabla 2). Además se observó una correlación positiva entre la depuración de creatinina y la concentración de Hcys ($r^2=0,11$; $p=0,0224$, Tabla 2), similar a la observada por Emoto *et al.* (2001). No obstante estos resultados, cabe mencionar que el diseño del estudio no permite saber si la menor depuración de creatinina de los pacientes, es un factor de riesgo de complicaciones renales. Además, a pesar de que algunos estudios señalan que la elevación de Hcys contribuye al desarrollo de glomeruloesclerosis (Choet *et al.*, 2010), en este estudio no fue posible asociar la hiperhomocisteinemia con el 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 oral hipoglicemiente, sin embargo, el porcentaje de HbA1c se encontraba por arriba (concentración mediana de 8,6 %, RI = 7,2 – 11,1) de la meta terapéutica (HbA1c < 7%; ADA, 2011) en el 51 % de los pacientes. El descontrol glicémico de los pacientes diabéticos es muy frecuente a pesar del apego al tratamiento hipoglicemiente (Roca *et al.*, 2010) y por ello se les considera como pacientes con alto riesgo de sufrir accidentes vasculares.

La hiperglucemia conduce a las complicaciones de la diabetes mellitus por diversos mecanismos bioquímicos, que incluyen el estado inflamatorio

crónico (Rosado *et al.*, 2007). La inflamación es fundamentalmente una respuesta de carácter protector, cuyo objetivo 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 *et al.*, 2007; Rosado *et al.*, 2007) y el ácido siálico (SA) (Browning *et al.*, 2004), aunque son inespecíficos, son 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 los resultados se observó que los pacientes diabéticos presentaron una concentración alta de PCR (5,9 mg/L; RI = 3,4 – 18,4), por arriba del límite superior de referencia de 3,8 mg/L (MININEPH™, The Binding Site, CA, U.S.A.), mientras que los controles presentaron una concentración de 3,7 mg/L (RI = 1,4 – 6,8) (Tabla 1), que se ubica dentro de los valores de PCR normales. La producción elevada de PCR podría explicar la elevación significativa ($p < 0,05$; Tabla 1) de las proteínas totales séricas (PT) que presentó el grupo de pacientes diabéticos en este estudio (Zulet *et al.*, 2007).

En el caso del SA, también hubo diferencias entre los grupos, ya que los pacientes tuvieron una concentración 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 *et al.*, 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 fue similar a la concentración observada en otras poblaciones de pacientes y significativamente superior a la de los controles, constituyendo un factor de riesgo de complicaciones adicional al que representa por sí sola la hiperglicemia y el estado de estrés inflamatorio (Rigla *et al.*, 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 (Suárez *et al.*, 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 *et al.*, 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

En este trabajo se demostró hiperhomocisteinemia en un porcentaje alto de los pacientes con DM2 estudiados en una unidad de primer nivel de atención médica de Hermosillo, Sonora, México. Esta elevación estuvo asociada con el descontrol glicémico, así como con la concentración elevada de LDL-col, triglicéridos, PCR, SA y creatinina.

La concentración de Hcys correlacionó positivamente con la LDL a pesar de que la concentración de este analito estaba en los valores normales, sugiriendo con ello la necesidad de evaluar

el estado de oxidación de la lipoproteína de baja densidad. Además, un alto porcentaje de los pacientes que presentaron alguna complicación también presentaron hiperhomocisteinemia, motivo por el que serán necesarios nuevos estudios para estimar el valor de la Hcys como factor de riesgo de complicaciones vasculares en los pacientes con DM2 y profundizar en la búsqueda de estrategias para el control adecuado de los pacientes estudiados.

Agradecimientos. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Gobierno del Estado de Sonora por los recursos que proporcionaron para este trabajo a través del proyecto No. SON-2004-CO1-206 "Cuantificación Simultánea de Inmunoglobulina A1, Proteína C Reactiva y Homocisteína Plasmática, Para Evaluar el Riesgo de Complicaciones Vasculares en Pacientes con DM2".

BIBLIOGRAFÍA

- ADA (American Diabetes Association). 2011. Standards of medical care-2011. *Diabetes Care*. 34: 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. Chromatogr.* 422: 42-52.
- Brazionis, L., Rowley, K., Itsiopoulos, C., Harper, C. A., O'deam K. 2008. Homocysteine and diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 31:50-56.
- Browning, L. D., Krebs, J. D., Jebb, S. A. 2004. Discrimination ratio analysis of inflammatory markers: implications for the study of inflammation in chronic disease. *Metabolism*. 53: 899-903.
- Buysschaert, M., Wallemacq, P. E., Dramais, A. S., Hermans, M. P. 2000. Hyperhomocysteinemia in type 2 diabetes. Relationship to macroangiopathy, nephropathy, and insulin resistance. *Diabetes Care*. 23:1816-1822.
- Chico, A., Pérez, A., Córdoba, P. 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? *Diabetologia*. 41:684-693.
- Cho, E.H., Kim, E.H., Kim, W.G., Jeong, E.H., Kho, E.H., Lee, W.J., Kim, M. S., Park, J. Y., Lee, K. U. 2010. Homocysteine as a risk factor for development of microalbuminuria in type 2 diabetes. *Korean Diabetes J.* 34:200-206.
- Córdoba, P.A., Meneses, L.B.E. 2002. La hiperhomocisteinemia un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular, fácil de modificar. *Iatreia*. 15:17-21.
- Dudman, N.P.B., Wilcken, D.E.L., Wang, J., Lynch, J.F., 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.
- 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.
- ENSANUT (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición), Sonora. 2006. (<http://www.insp.mx/ensanut/norte/sonora.pdf>).
- Fabian, E., Kicking, A., Wagner, K. H., Elmadfa, I. 2011. Homocysteine and asymmetric dimethylarginine in relation to B vitamins in elderly people. *Wien. Klin. Wochenschr.* 123: 496-501.
- Fridman, O., D'eraimo, J. L., Finkelstein, A. E. 1997. Homocisteína plasmática: factor de riesgo independiente de afecciones vasculares oclusivas. *Rev. Argent. Cardiol.* 65: 571-581.
- Fowler, M. J. 2011. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clin. Diabetes*. 29: 116-122.
- Gómez, F.P., Ruiz, A., Conde, M.R., Campos, R., Vargas, J.C., Almaraz, M. 2004. Marcadores de inflamación vascular en la diabetes mellitus tipo 2 con hipertensión arterial y albuminuria. *Nefrología*. 24:67-69.
- Hadi, H.A., Suwadi, J.A. 2007. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc. Health. Risk. Manag.* 3: 853-876.
- Hoogeveen, E. K., Kostense, P., Jakobs, C., Bouter, L., Heine, R., Stehouwer, C. 1997. Does metformin increase the serum total homocysteine level in noninsulin-dependent diabetes mellitus? *J. Intern. Med.* 242: 389-394.
- Hoogeveen, E. K., Kostense, P. J., Eysink, P. E., Polak, B. C., Beks, P. J., Jakobs, C., Dekker, J. M., Nijpels, G., Heine, R. J., Bouter, L. M., Stehouwer, C. D. 2000. Hyperhomocysteinemia is associated with the presence of retinopathy in type 2 diabetes mellitus: The Hoorn Study. *Arch. Intern. Med.* 160: 2984-2990.
- Hultberg, B., Agardh, E., Andersson, A., Brattstrom, L., Isaksson, A., Israelsson, B., Agardh, C. D. 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.
- Malinow, M. R., Axthelm, M. K., Meredith, M. J., MacDonald, N. A., Upson, B. M. 1994. Synthesis and transsulfuration of homocysteine in blood. *J. Lab. Clin. Med.* 123: 421-442.
- Meigs, J.B., Jacques, P.F., Selhub, J. 2001. Fasting plasma homocysteine levels in the insulin resistance syndrome: The Framingham offspring study. *Diabetes Care*. 24:1403-10.

- Millán, N. J., Botet, M. J. P., Pintó, S. X., Hernández, M. A., Carey, V. J., Hermans, M. P., Sacks, F. M., Fruchart, J. C. 2011. The REALIST (Residual risk, Lipids and Standard Therapies) study: an analysis of residual risk attributable to lipid profile in acute coronary syndrome. *Endocrinol. Nutr.* 58:38-47.
- Munshi, M. N., 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, G. G. 2005. La Fórmula de Cockcroft-Gault. *Rev. Med. IMSS.* 43:69-70.
- 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.* 22:484-490.
- Pavia, C., Ferrer, I., Valis, C., Artuch, R., Colomé, C., Vilaseca, M. A. 2000. Total homocysteine in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 23:84-87.
- Pickup, J. C. 2004. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 27:813-823.
- Rigla, M., Pérez, A., Leiva, A. D. 2001. Disfunción endotelial, alteraciones de la coagulación e hiperhomocisteinemia en la diabetes mellitus. *Cardiovasc. Risk Factors.* 10: 296-302.
- Roca, R. M. M., Carral, S. L. F., Baena, N. G., Aguilar, D. M. 2010. Evaluación del grado de consecución de objetivos de control metabólico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Endocrinol. Nutr.* 57: 434-439.
- Rosado, P. J., Mendoza, N. V. M. 2007. Mini-revisión: inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica.* 32: 58-69.
- 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. *Anales de la Facultad de Medicina Univ. Nac. Mayor de San Marcos.* 65: 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.* 140:94-100.
- Spijkerman, A.M.W., Smulders, Y.M., Kostense, P.J., Henry, R.M.A., Becker, A., Teerlink, T., Jakobs, C., Dekker, J.M., Nijpels, G., Heine, R.J., Bouter, I.M., Stehouwer, C.D.A. 2005. S-adenosylmethionine 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, B.W., Cohen, J.A., Allen, R.H., Schrier, R. W. 1999. Total homocysteine is associated with nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* 48:1096-1101.
- Suárez, R., Campo, S. C., de la Morena, S., Ruilope, L. M. 2005. Evaluación del riesgo cardiovascular y nuevos factores de riesgo de aterosclerosis. *Hipertension.* 22:195-203.
- 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.
- Ubbink, J.B., Vermack, W.J.H., Bissbort, S. 1991. Rapid high-performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum. *J. Chromatog.* 565:441-446.
- Van Guldener, C., Stehouwer, C. D. 2002. Diabetes mellitus and hyperhomocysteinemia. *Semin. Vasc. Med.* 2: 87-95.
- Vasan, R.S., Beiser, A. D., Agostino, R.B., Levy, D., Selhub, J., Jacques, P.F., Rosenberg, I.H., Wilso, P.W. 2003. Plasma homocysteine and risk for congestive heart failure in adults without prior myocardial infarction. *JAMA.* 289: 1251-1257.
- Zulet, M. A., Puchau, B., Navarro, C., Martí, A., Martínez, J. A. 2007. Biomarcadores del estado inflamatorio: nexo de unión con la obesidad y complicaciones asociadas. *Nutr. Hosp.* 22:511-527.