

Reconocimiento a la trayectoria del Prof. Dr. Juan Miguel Castagnino†

Implicancias fisiopatológicas de la hiperhomocisteinemia

► Irene Quintana^{1a}, Valeria Genoud^{2a*}

¹ Licenciada en Ciencias Químicas. Doctora de la Universidad de Buenos Aires, área Ciencias Químicas.

² Licenciada en Ciencias Biológicas. Doctora de la Universidad de Buenos Aires, área Química Biológica.

^a Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

* Autora para correspondencia.

Resumen

A través de numerosos estudios clínicos a gran escala se han descrito diversas enfermedades y/o condiciones asociadas con concentraciones elevadas de homocisteína plasmática (hiperhomocisteinemia); las más evaluadas han sido las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, defectos del tubo neural, enfermedad de Alzheimer y demencia, enfermedad de Parkinson, alteraciones del desarrollo cognitivo y las relacionadas con la edad avanzada, desórdenes del espectro autista y degeneración macular, entre otras. A partir de los resultados obtenidos, se propuso a la hiperhomocisteinemia como factor de riesgo de la enfermedad vascular. Considerando que las asociaciones arriba mencionadas no implican necesariamente causalidad, se han implementado estudios de intervención terapéutica (suplementación con ácido fólico y/o vitaminas del grupo B) con el objetivo de determinar si el descenso de los niveles de homocisteína disminuye el riesgo planteado. En la actualidad, aún no hay respuesta contundente al interrogante de que si la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo causal para determinada patología o si sólo es un marcador de otro factor asociado a dicha enfermedad. Sin embargo, existen fuertes evidencias que sugieren que disminuir los niveles de homocisteína plasmática a valores menores de 10 $\mu\text{mol/L}$ sería beneficioso para la salud humana.

Palabras clave: Hiperhomocisteinemia; Factor de riesgo; Biomarcador; Valores de corte

Pathophysiological implications of hyperhomocysteinemia

Abstract

Through numerous large-scale clinical studies, different diseases and/or conditions associated with elevated plasma homocysteine concentrations (hyperhomocysteinemia) have been described; the most evaluated have been cardiovascular and cerebrovascular diseases, neural tube defects, Alzheimer's disease and dementia, Parkinson's disease, cognitive development disorders and those related to advanced age, autism spectrum disorders and macular degeneration, among others. Based on the results obtained, hyperhomocysteinemia was proposed as a risk factor for vascular disease. Considering that the associations mentioned above do not necessarily imply causality, therapeutic intervention studies (supplementation with folic acid

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

and/or group B vitamins) have been implemented with the aim of determining whether the decrease in homocysteine levels reduces the risk proposed. At present, there is still no conclusive answer to the question of whether hyperhomocysteinemia is a causal risk factor for a certain pathology or if it is only a marker of another factor associated with that disease. However, there is strong evidence to suggest that lowering plasma homocysteine levels to values below 10 $\mu\text{mol/L}$ would be beneficial to human health.

Keywords: Hyperhomocysteinemia; Risk factor; Biomarker; Cutoff values

Implicações fisiopatológicas da hiperhomocisteinemia

Resumo

Através de numerosos estudos clínicos em larga escala, várias doenças e/ou condições associadas a concentrações elevadas de homocisteína plasmática (hiperomocisteinemia) foram descritas; as mais avaliadas foram as doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, defeitos do tubo neural, doença de Alzheimer e demência, doença de Parkinson, distúrbios do desenvolvimento cognitivo e relacionados à idade avançada, transtornos do espectro autista e degeneração macular, entre outros. Com base nos resultados obtidos, a hiperomocisteinemia foi proposta como fator de risco para doença vascular. Considerando que as associações mencionadas acima não implicam necessariamente causalidade, estudos de intervenção terapêutica (suplementação com ácido fólico e/ou vitaminas do grupo B) têm sido implementados com o objetivo de determinar se a diminuição dos níveis de homocisteína reduz o risco apresentado. Atualmente, ainda não há uma resposta conclusiva para a questão se a hiperomocisteinemia é um fator de risco causal para determinada patologia ou se é apenas um marcador de outro fator associado à referida doença. No entanto, há fortes evidências que sugerem que a redução dos níveis plasmáticos de homocisteína para valores abaixo de 10 $\mu\text{mol/L}$ seria benéfica para a saúde humana.

Palavras chave: Hiperomocisteinemia; Fator de risco; Biomarcador; Valores de corte

Introducción

La homocisteína (Hcy) fue aislada por primera vez a partir de un cálculo de vejiga, por Vincent du Vigneaud en 1933 (1). En 1969 Kilmer McCully estudió a dos niños con homocistinuria que presentaban un grado avanzado de aterosclerosis (2). A partir de estos hallazgos se planteó la hipótesis que relaciona los niveles de Hcy plasmática (homocisteinemia) elevados con la patología vascular prematura. En 1976 D. Wilcken (3) publicó un estudio caso-control donde por primera vez se comprobó la asociación entre la concentración elevada de Hcy plasmática, denominada hiperhomocisteinemia (HHcy) y la patología arterial coronaria. En el transcurso de todos estos años se han publicado más de 27 000 trabajos sobre Hcy. Estos incluyen estudios clínicos y de investigación en modelos *in vitro*, *ex vivo* y en animales, que han avalado la relación entre altos niveles de Hcy plasmática y episodios aterotrombóticos. En particular, hace más de tres décadas, se postuló que la HHcy constituye un factor de riesgo independiente para la enfermedad aterotrombótica que afecta al sistema vascular coronario, cerebral y periférico, como también al venoso (4) (5) (6) (7). Generalmente el término “factor de riesgo” implica causalidad, sin embargo, no debe considerarse como tal si no existe evidencia sólida de la relación. Principalmente, se requieren datos de ensayos clínicos que demuestren que

bajar los niveles de Hcy en plasma previene el desarrollo de las patologías en estudio. Dado que los factores de riesgo asociados a una determinada condición o patología no implican necesariamente una relación causa-efecto, algunos investigadores han planteado la idea de considerar a la HHcy como un “biomarcador” de la enfermedad en estudio. Por lo tanto, existe una dualidad en el concepto de si la concentración elevada de Hcy plasmática es un agente responsable del incremento en el riesgo de la enfermedad evaluada o si es un marcador de otro factor asociado a dicho riesgo.

Biosíntesis y metabolismo de la homocisteína

La Hcy es un aminoácido no esencial que contiene un grupo sulfhidrilo o tiol en su molécula. Este aminoácido está íntimamente relacionado con el metabolismo de la metionina (MET), que proviene principalmente de la degradación de proteínas de origen dietario y endógenas. Para activar al grupo metilo, la MET es convertida a S-adenosilmetionina (SAM) mediante la incorporación de adenosina trifosfato (ATP) y la acción catalizadora de la metiltransferasa (MT) (8). La SAM es la molécula más importante como donante de grupos metilo en seres humanos. En la acción de

transferencia de estos grupos, la SAM se convierte en S-adenosilhomocisteína (SAH) y el metilo cedido, altamente reactivo, puede ser aceptado por diversos sustratos tales como ácidos nucleicos (ADN, ARN), proteínas, fosfolípidos, polisacáridos, etc. (9). Estas reacciones de transmetilación son catalizadas por metiltransferasas y debido a que la SAH es un inhibidor competitivo de estos procesos, la actividad enzimática depende de la relación SAM/SAH. En consecuencia, para asegurar la generación de los productos metilados esenciales, se requiere que los niveles intracelulares de SAH sean mínimos. Esto se logra por la acción de la SAH-hidrolasa (enzima ampliamente distribuida en los tejidos de mamíferos), que convierte reversiblemente la SAH en Hcy y adenosina. Si bien, termodinámicamente esta reacción está favorecida hacia la biosíntesis de SAH, en condiciones normales la Hcy y la adenosina son removidas rápidamente para evitar la acumulación de SAH, lo cual inhibiría potencialmente los procesos de transmetilación en la célula. Las reacciones de metilación de ADN y de proteínas (histonas) son importantes características epigenéticas que juegan un rol crítico en la

expresión y regulación de genes. Cuando ocurre la desregulación epigenética se favorece el desarrollo de diversas patologías (10). La Hcy puede ser metabolizada a través de tres caminos alternativos: I) puede ser degradada irreversiblemente en la vía de la transulfuración, II) remetilada a MET por la vía de la remetilación y III) convertida enzimáticamente a homocisteína-tiolactona (HTL) (11) (Fig. 1).

I) La transulfuración de la Hcy tiene lugar sólo en determinados tejidos, fundamentalmente hígado, riñón y cerebro (12). En este camino metabólico la Hcy se condensa con serina para formar cistationina, reacción catalizada por la cistationina-β-sintetasa (CBS), la que a su vez requiere fosfato de piridoxal (vitamina B₆) como cofactor. Posteriormente, la cistationina es hidrolizada a cisteína y α-cetobutirato por acción de la γ-cistationasa, que también utiliza vitamina B₆ como coenzima. Por otra parte, la cisteína puede convertirse en taurina, utilizarse en la síntesis de glutatión o bien metabolizarse a sulfato y excretarse por orina.

II) Alternativamente, la Hcy puede aceptar un grupo metilo y reconvertirse a MET (remetilación). En este

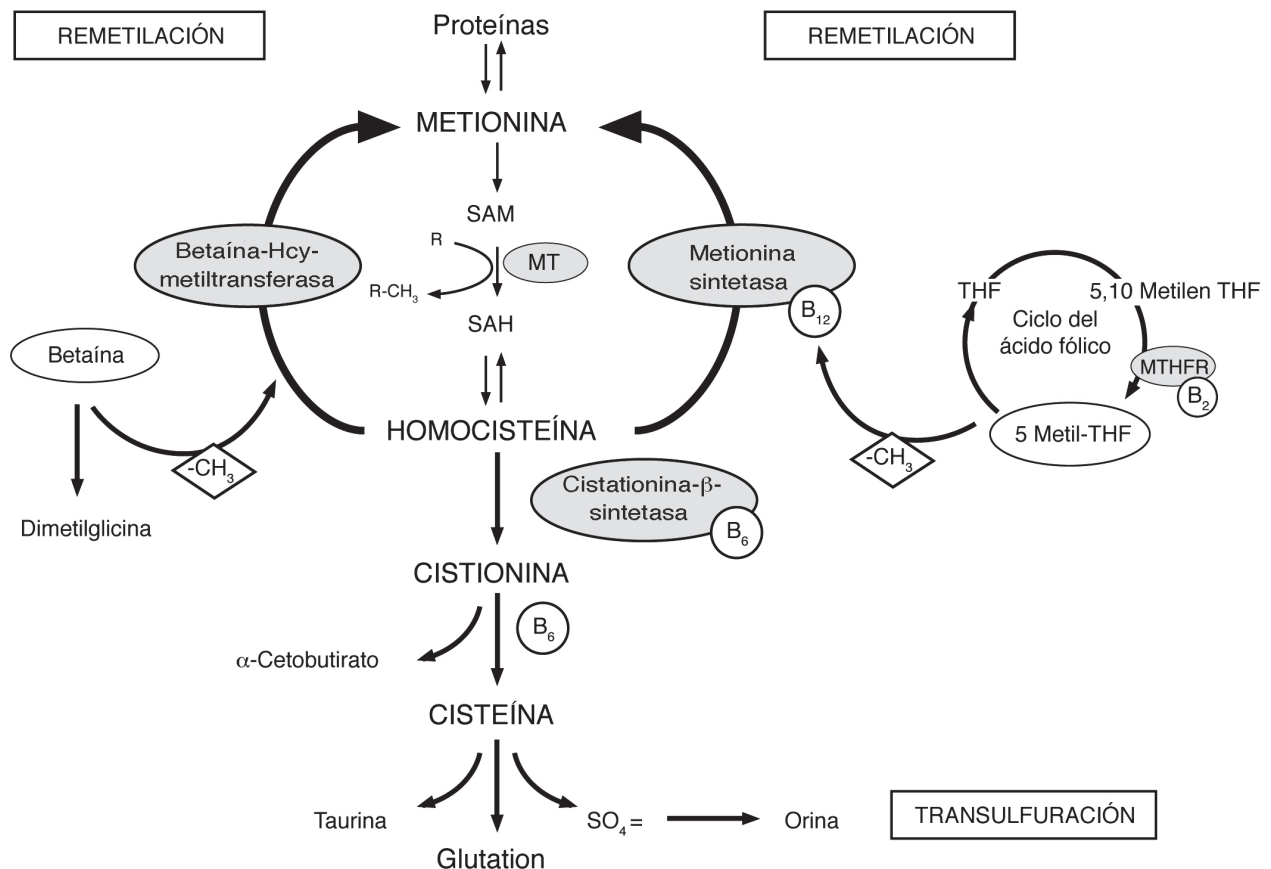


Figura 1. Metabolismo de la homocisteína.

SAM: S-adenosil metionina; SAH: S-adenosil homocisteína; THF: tetrahidrofolato; MT: metiltransferasa; MTHFR: metilentetrahidrofolato reductasa

proceso el donante del metilo puede ser el 5-metilte-trahidrofolato (5-metilTHF) o la betaína. En el primer caso, la reacción es catalizada por la metionina sintetasa (MS); la vitamina B₁₂ actúa como coenzima y se generan MET y tetrahidrofolato (THF). Por otra parte, cuando el metilo es cedido por la betaína (producto de la oxidación de la colina) la reacción está mediada por la betaína homocisteína metiltransferasa (BHMT) (13).

Dado que la MS se distribuye en casi todas las células del organismo mientras que la BHMT se encuentra principalmente en el hígado, la vía más importante de remetilación de Hcy a MET es la que utiliza MS como enzima catalizadora. Además, este camino está íntimamente relacionado con los ciclos metabólicos de la vitamina B₁₂ y del ácido fólico. La MS convierte la forma circulante de folato (5-metilTHF) en THF, el cual interviene en diversas reacciones celulares fundamentales. Luego, el THF es convertido a 5,10-metilenTHF el que, a su vez, por acción de la metilentetrahydrofolato reductasa (MTHFR) y de riboflavina (vitamina B₂) como cofactor, es reducido a 5-metilTHF. Cabe destacar que este ciclo metabólico es fuertemente dependiente de la disponibilidad de cobalamina, ya que esta vitamina es la aceptora del metilo aportado por el 5-metilTHF. Así, la metilcobalamina generada es la molécula intermediaria responsable de ceder el grupo metilo a la Hcy, reconvirtiendo el aminoácido a MET. Esta interacción entre folato y cobalamina es esencial para la síntesis normal de purinas y pirimidinas y, por lo tanto, de ADN, como así también del control de los niveles de MET y de 5-adenosilMET (metabolitos esenciales para la metilación de lípidos, proteínas, ADN, etc.). Dada la estrecha interrelación entre los ciclos metabólicos descriptos, las deficiencias de folato y/o de vitamina B₁₂ afectarían las reacciones mencionadas. Además, el déficit de vitamina B₁₂ limita la disponibilidad de folato ya que éste quedaría "atrapado" como metiltetrahydrofolato ("hipótesis de la trampa de folato").

III) Cuando existen deficiencias genéticas y/o nutricionales que afectan la acción de las enzimas CBS, MS o MTHFR, las vías de remetilación o de transulfuración están alteradas, por lo que se favorece la vía de la conversión enzimática de la Hcy a HTL por la metionil-tRNA sintetasa (MetRS), enzima presente en todos los órganos (14) (Fig. 2).

La Hcy es un aminoácido que no forma parte de las proteínas, pero por su semejanza estructural con la metionina ingresa al primer paso de la biosíntesis de proteínas y allí es convertida a HTL (éster cíclico de Hcy) por un mecanismo de edición de la MetRS (*error-editing*). De esta manera se evita que la Hcy forme parte de la nueva proteína sintetizada. Este mecanismo altamente conservado es común a todos los organismos vivos incluyendo bacterias, levaduras, plantas, ratones y seres humanos (15). Dentro de la célula, la HTL es hidrolizada y convertida nuevamente en Hcy por acción de la enzima bleomicina hidrolasa (Blmh); extracelularmente esta

reacción es catalizada por la paraoxonasa 1 (Pon1). La distribución tisular de todas las enzimas involucradas, la afinidad de éstas por sus sustratos y la concentración de los mismos, regulan las distintas vías metabólicas. Por lo tanto, alteraciones en la actividad enzimática, deficiencias de los cofactores tales como el ácido fólico y las vitaminas B₁₂, B₆ y B₂, entre otros, pueden provocar un desbalance metabólico con consecuencias perjudiciales. Así, la concentración intracelular de Hcy puede alcanzar niveles potencialmente tóxicos y, por lo tanto, el aminoácido es exportado fuera de la célula y pasa a la circulación. Tanto la Hcy como la HTL son moléculas altamente reactivas en los sistemas biológicos y el respectivo estereoisómero *L* (levógiro) es el único que muestra reactividad. Si bien dentro de la célula la Hcy se encuentra principalmente en forma reducida, en sangre, el alto contenido de oxígeno y la presencia de otras moléculas con grupos sulfhidrilos o tioles inducen la oxidación del aminoácido, generando distintos compuestos azufrados. Así, el aminoácido se encuentra principalmente unido a residuos cisteína (Cys) de las proteínas, a través de puentes disulfuro (reacciones de *S-homocisteinilación*). También, la Hcy puede reaccionar con tioles de bajo peso molecular para generar el homodímero Hcy-S-S-Hcy (homocistina) y el heterodímero Cys-S-S-Hcy (16). Por otra parte, cuando la HTL pasa a circulación, el grupo carbonilo del tioéster puede formar irreversiblemente una unión amida con el grupo ε-amino de los residuos lisina de las proteínas, generando aductos (reacciones de *N-homocisteinilación*). En este proceso se generan grupos sulfhidrilo con alta reactividad para interactuar con distintas moléculas biológicas (17) (18). Tanto los procesos de *S-homocisteinilación* como los de *N-homocisteinilación* pueden provocar modificaciones proteicas postraduccionales que conducen a cambios estructurales y funcionales a nivel molecular y celular. En particular, las proteínas *N-homocisteiniladas* pueden sufrir daño oxidativo y agregación (19), provocando efectos citotóxicos e inmunogénicos (20). Se ha establecido que los cambios estructurales producidos

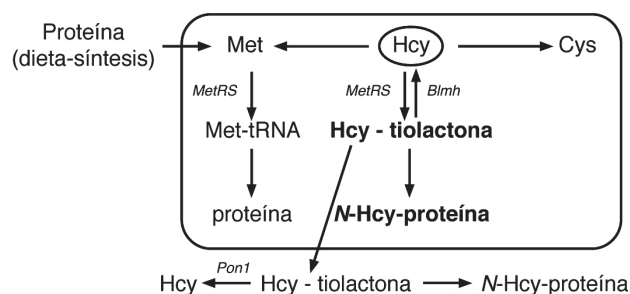


Figura 2. Metabolismo de HTL

Met: metionina; Hcy: homocisteína; Cys: cisteína; Blmh: bleomicina hidrolasa; Pon1: paraoxonasa 1; MetRS: metionil tRNA sintetasa

por acción de la HTL sobre las proteínas provocarían un plegamiento incorrecto de las mismas y la formación de agregados amiloides tóxicos. Genoud *et al.* concluyeron que, en ensayos *in vitro*, la HTL provocaba alteraciones estructurales en la molécula de fibrinógeno y enlentecimiento en el proceso de coagulación generando, además, coágulos de fibrina más compactos. Teniendo en cuenta que estas características se han relacionado con la alteración del proceso fibrinolítico, las reacciones de N-homocisteinilación podrían estar involucradas en los efectos protrombóticos asociados a la HHcy (21) (22). Asimismo, la modificación proteica inducida por N-homocisteinilación sería uno de los mecanismos responsables de la condición neurodegenerativa (23). Se ha demostrado que la HTL y las proteínas N-homocisteiniladas modulan la expresión de numerosos genes involucrados en la homeostasis vascular. Algunas de las vías afectadas incluyen modificaciones en la organización de la cromatina y sus histonas, contribuyendo a la disfunción endotelial y al proceso aterotrombótico. Además, la N-homocisteinilación interfiere en el metabolismo de lípidos y de aminoácidos azufrados, así como en el proceso de coagulación (24).

Homocisteinemia

La Hcy plasmática se encuentra en forma oxidada (alrededor del 98-99%) y aproximadamente sólo el 1% como especie reducida o libre. En el primer caso, la Hcy se une a los grupos sulfhidrilos presentes en los residuos de cisteína de las proteínas (principalmente albúmina) y también reacciona con moléculas pequeñas generando homo y heterodímeros. Por consenso internacional (25) se ha definido el término Hcy total como la sumatoria de las concentraciones de las formas oxidadas de la Hcy y de la molécula reducida del aminoácido, presentes en el plasma según acaba de describirse. A partir del análisis del metabolismo de la metionina y por ende, la generación de Hcy, fácilmente pueden detectarse los factores genéticos y adquiridos que condicionan los niveles intracelulares de Hcy y consecuentemente los de homocisteinemia.

Entre los factores genéticos que determinan el nivel de Hcy se encuentran las variaciones de secuencia en el gen de la MTHFR. Este gen, que se encuentra en el cromosoma 1 región 1p36.3, presenta dos polimorfismos de simple nucleótido en los exones 4 y 7, denominados C677T (Ala222Val, rs1801133) y A1298C (Glu429Ala, rs1801131) respectivamente. La variación de secuencia C677T disminuye la actividad enzimática en un 75% para el genotipo homocigota, mientras que la A1298C (Glu429Ala, rs1801131) también la afecta, pero en menor grado (26). La actividad reducida de la MTHFR inhibe la producción de 5-metiltetrahidrofolato, lo que conduce a la acumulación de su sustrato 5,10-metilente-

trahidrofolato. Los niveles reducidos del producto de la vía de la MTHFR provocan el aumento de Hcy y disminución de los niveles de folato, generando menor disponibilidad para la síntesis y reparación del ADN. Por lo tanto, la MTHFR proporciona un vínculo clave entre el consumo de folato y la metilación del ADN. Las dos variaciones de secuencia en el gen de la MTHFR, C677T (rs1801133) y A1298C (rs1801131), están fuertemente asociadas con el riesgo de enfermedad cardiovascular y accidente cerebrovascular (27). Los individuos con genotipo T/T y bajo nivel de folato sérico presentan concentraciones más altas de Hcy plasmática debido a un efecto sinérgico entre ambas condiciones (28). La causa genética más común de HHcy grave son las variaciones de secuencia en la cistationina β -sintetasa (CBS) que se asocia con homocistinuria clásica o congénita y aumentos de hasta 40 veces en los niveles de Hcy plasmática. Una de las variaciones de secuencia más comunes es la inserción de 68 pb en el exón 8 del gen CBS (844ins68), que provoca la introducción de 2 codones sin sentido en el mismo exón. Se ha registrado una prevalencia de 14-19,8% de heterocigotas en la población general y una de 7,5% de homocigotas (30). Hasta la fecha, se han descrito más de 150 variaciones de secuencias causantes de diferentes enfermedades en el gen CBS y debido a la alta heterogeneidad genotípica, la mayoría de los pacientes con deficiencia de CBS son heterocigotas compuestas.

Por otro lado, existen factores adquiridos que también regulan los valores de homocisteinemia. Es fundamental un apropiado estado vitamínico del individuo; principalmente influyen los niveles de folatos y de las vitaminas B₁₂, B₆ y B₂, cofactores fundamentales involucrados en el metabolismo de la Hcy. Deficiencias de estas vitaminas causadas por un bajo aporte nutricional y/o por interferencia en la absorción de las mismas, pueden conducir a un aumento de la concentración plasmática de Hcy (31). La presencia de ciertas patologías tales como falla renal, artritis reumatoidea, ciertas neoplasias y síndromes de mala absorción (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn o enfermedad celíaca) también se asocian a un estado de HHcy (28). Además, el uso terapéutico de ciertas drogas (metotrexato, fenitoína, niacina, entre otras), el tabaquismo y el consumo elevado de alcohol y café inducirían un incremento en los niveles de Hcy. Se ha descrito que a mayor edad aumentan los valores de homocisteinemia y que los hombres presentan concentraciones plasmáticas de Hcy significativamente mayores que las mujeres (32) (33).

Determinación de homocisteinemia

La Hcy total es la suma de todas las formas de la Hcy en plasma que incluye formas libres y unidas a proteínas. Por

lo tanto, antes de proceder a la medición y detección, es necesario realizar pasos previos para obtener toda la Hcy en su forma libre y realizar los procesos de derivación de la muestra, específicos para cada técnica analítica. Existen numerosos métodos para determinar la homocisteinemia. La cromatografía de alta resolución (HPLC) es el “*gold standard*”, con sus diversos tipos de detección (fluorescencia, ultravioleta y electroquímica); el más sensible y específico es la cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masa (LC-MS-MS; del inglés *liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry*). Por otro lado, se ha desarrollado la técnica de ensayo competitivo a partir de la conversión enzimática de Hcy a SAH y su posterior reconocimiento por anticuerpos monoclonales de ratón anti SAH. Los resultados obtenidos con esta técnica fueron reproducibles y comparables con los obtenidos por HPLC como fuera publicado por Quintana *et al.* (34). Este método tiene una ventaja práctica sobre otros ya que utiliza equipamiento accesible y disponible en la mayoría de los laboratorios de análisis clínicos. En los últimos años se ha descrito la utilización de la electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masa para la determinación de Hcy y sus metabolitos (35). Teniendo en cuenta que múltiples factores genéticos y adquiridos, como así también el sexo y la edad, influyen directa y/o indirectamente sobre los niveles de homocisteinemia, el rango de valores normales para la Hcy total en una población general, es muy amplio. La variabilidad observada se explicaría fundamentalmente por las diferencias en las poblaciones evaluadas, tamaño y procesamiento de las muestras y en las metodologías utilizadas. Además, individuos sanos (requisito indispensable para ser incluido en un estudio de valores de referencia) pueden presentar deficiencias subclínicas de ácido fólico y vitamina B₁₂, que conducen a niveles de Hcy aumentados. Inicialmente se estableció el intervalo 5-15 µmol/L (36) como rango de referencia; sin embargo, dado que una concentración plasmática de Hcy mayor del límite superior del intervalo no necesariamente refleja la presencia de una patología sino un riesgo asociado a la misma, se han propuesto valores de corte que evalúan la asociación entre los niveles de homocisteinemia y el desarrollo o agravamiento de la patología estudiada. Así, Kordich *et al.* determinaron que a valores de homocisteinemia mayores de 12 µmol/L aumentaba el riesgo de trombosis venosa (37). Piao *et al.* (38) recomendaron que, para minimizar el riesgo de eventos cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares (ACV) e hipertensión, los valores óptimos de corte deberían ser 12,1 µmol/L, 13,4 µmol/L y 9,1 µmol/L, respectivamente. Por otro lado, existen evidencias de que valores plasmáticos de Hcy por encima de 11 µmol/L estarían asociados a la presencia de alteraciones cognitivas, enfermedad de Alzheimer y demencia (39). En relación con eventos coronarios, recientemente se ha publicado que niveles de Hcy mayores de 9,4 µmol/L se asocian con un incremento en la calcificación de las ar-

terias coronarias (40). Por lo tanto, puede advertirse que en los últimos años, los valores propuestos para definir un estado de HHcy han disminuido significativamente respecto del nivel establecido inicialmente (15 µmol/L).

Patologías asociadas a la hiperhomocisteinemia

En la década del '90, en el laboratorio de análisis clínicos, se optimizaron y estandarizaron diversos métodos analíticos para la determinación de homocisteinemia de manera accesible y reproducible. Esto permitió llevar a cabo un número muy importante de estudios epidemiológicos retrospectivos, transversales y prospectivos que ya a fines del siglo veinte, mostraron una fuerte relación entre la HHcy y el desarrollo y evolución de la enfermedad vascular oclusiva a nivel arterial y venoso (41) (42) (43). Los niveles plasmáticos elevados de Hcy se han asociado con más de 100 enfermedades y síndromes; sin embargo, no deben ignorarse algunos trabajos en los que no se halló dicha asociación (44) (45). A continuación se describen algunas de las patologías claramente relacionadas con la HHcy.

Enfermedad cardiovascular

En años recientes se ha informado que valores de Hcy plasmática por encima de 10 µmol/L se consideran como un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad cardiovascular (46). En particular, se observó que la elevada Hcy plasmática era un factor de riesgo para el desarrollo y progresión de la calcificación vascular severa (47). Además, se encontró que en pacientes con síndrome coronario agudo, la HHcy incrementó significativamente el riesgo de infarto de miocardio y muerte (48). McCully ha descrito exhaustivamente los mecanismos subyacentes involucrados en el rol de la Hcy en la patología arterioesclerótica (49). La Hcy podría causar enfermedad cardiovascular a través de diversos mecanismos tales como el daño oxidativo que conlleva a la disfunción e injuria endotelial, la alteración del balance procoagulante-anticoagulante del endotelio normal, la alteración en la biodisponibilidad del óxido nítrico que afecta la vasodilatación y el aumento en la proliferación y migración de células musculares lisas de la pared celular que provocan un estrechamiento de los vasos sanguíneos, entre otros (50). La oxidación de la Hcy, que produce homocisteína y heterodímeros y proteínas S-homocisteiniladas, genera paralelamente especies oxigenadas altamente reactivas tales como peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos y superóxidos (51). La injuria endotelial, inducida entre otras causas por la HHcy, favorecería la activación plaquetaria y del sistema de coagulación, alterando las funciones antitrombóticas del endotelio y el normal

comportamiento de los inhibidores fisiológicos y del sistema fibrinolítico. Los efectos enumerados conducirían a un estado hipercoagulable (52). Respecto a la biodisponibilidad disminuida del óxido nítrico se ha propuesto que la HHcy induciría un incremento en la concentración plasmática de dimetil-arginina asimétrica (ADMA). Esta molécula es un inhibidor endógeno de la óxido nítrico sintetasa endotelial, que compete con su sustrato natural la *L*-arginina, limitando así la formación de óxido nítrico (53) (54).

Enfermedad cerebrovascular

Hace 30 años se iniciaron los estudios epidemiológicos a gran escala y a partir de los resultados obtenidos se postuló que los niveles elevados de Hcy constituyen un importante factor de riesgo independiente para la enfermedad vascular aterosclerótica a nivel coronario, cerebral y periférico (42) (55) (56). La magnitud del riesgo resultó similar a la de otros factores tales como hipercolesterolemia, hipertensión, tabaquismo y diabetes. Se encontró que la HHcy se relacionaba con el ACV, tanto isquémico como hemorrágico. En el primer caso, se postuló que la Hcy induciría aterosclerosis y aterotrombosis a nivel cerebral, mientras que el episodio hemorrágico se debería a una sobreexpresión, mediada por la Hcy, de metaloproteinasas-9 (MMP-9) de la matriz extracelular involucradas en la inestabilidad y ruptura de la placa aterosclerótica (57). En años posteriores se llevaron a cabo diversos trabajos que evaluaron la relación entre los niveles de Hcy plasmática y la incidencia de ACV, algunos de los cuales se comentan a continuación. Huo *et al.* llevaron a cabo el primer estudio a gran escala que evaluó los efectos del tratamiento con ácido fólico en 20 000 pacientes hipertensos. Los resultados mostraron una eficacia significativa en la prevención del ACV isquémico, pero no hemorrágico (58). Un análisis posterior del mismo trabajo concluyó que el grado de disminución en los valores de homocisteinemia es un marcador muy útil que permite predecir la efectividad de la terapia con ácido fólico para prevenir el primer episodio de ACV (59). También se encontró relación entre los niveles elevados de Hcy plasmática y la enfermedad cerebral, tanto en pacientes con aterosclerosis a nivel de vasos pequeños como de grandes arterias; en particular, en este último trabajo la HHcy sería un fuerte predictor de mortalidad (38) (60). Los resultados de un importante metaanálisis realizado en 30 estudios de intervención terapéutica con ácido fólico y/o vitaminas del grupo B, en un total de 80 000 pacientes, mostraron una reducción del 10% en el riesgo de sufrir episodios de ACV (61). En el año 2020, otro metaanálisis que evaluó 13 estudios, e incluyó un total de 2243 pacientes que sufrieron ACV isquémico, determinó que los niveles plasmáticos de Hcy fueron significativamente mayores en los pacientes que en los controles, lo que refuerza el postulado de que la HHcy sería un factor de riesgo para ACV (62). Respec-

to a la asociación entre HHcy y ACV hemorrágico existen escasos trabajos que hayan investigado dicha relación. Se ha descrito que en pacientes que sufrieron un episodio agudo de hemorragia cerebral, los valores de homocisteinemia correlacionaron positivamente con el volumen del hematoma, marcador independiente de mal pronóstico y mortalidad posterior al episodio hemorrágico (63). Se ha postulado que la Hcy induciría disfunción endotelial, afectando la permeabilidad cerebrovascular con daño en estructuras elásticas e injuria en la lámina basal. La evaluación de un metaanálisis avaló la hipótesis de que la concentración plasmática elevada de Hcy se asocia positivamente con la incidencia de hemorragia intracerebral (64). Bernstein *et al.* estudiaron posibles marcadores inflamatorios y no inflamatorios como predictores y potenciales objetivos terapéuticos para la hemorragia intracerebral. Los resultados mostraron que los niveles de Hcy, entre otros, correlacionaron significativamente con el tamaño de la hemorragia intracerebral en los ganglios basales de los pacientes. Los autores sugirieron que aplicar las terapias de intervención para disminuir la homocisteinemia podrían reducir el riesgo y/o severidad del ACV hemorrágico (65).

Defectos del tubo neural

La mayoría de los trabajos realizados han establecido que el nivel elevado de Hcy (66) (67) y/o concentraciones bajas de ácido fólico (68) (66) (69) y de cobalamina (66) (70) son factores de riesgo para la etiología de los defectos en el desarrollo del tubo neural, pero unos pocos trabajos no hallaron dicha asociación. Un metaanálisis reciente (69) reveló que el nivel elevado de Hcy es un factor de riesgo para el desarrollo de defectos del tubo neural. Se observó una fuerte correlación en la población asiática, pero en la población caucásica los niveles de la Hcy plasmática mostraron un efecto menor, al igual que en la población africana. Desde hace mucho tiempo se determinó que la suplementación con ácido fólico previene los defectos del tubo neural (71); sin embargo, los mecanismos involucrados aún no están completamente dilucidados. El ácido fólico es esencial para diferentes procesos celulares como la división celular, la replicación y la metilación del ADN, entre otros (72) (73) (74). La metilación adecuada del ADN es necesaria para el mantenimiento de la estructura cromosómica y la expresión génica y ambas son cruciales para el desarrollo normal del feto (75). Considerando que los niveles bajos de folato sérico y el polimorfismo de la MTHFR C677T contribuyen a un aumento de la Hcy plasmática, se ha sugerido que este hecho afectaría el patrón de metilación del ADN y su síntesis, interfiriendo con los genes que regulan el cierre del tubo neural (76). Además, una mayor concentración de Hcy intracelular es tóxica y genera radicales libres por autooxidación que son tóxicos para el feto (77).

Enfermedad de Alzheimer y demencia

Hace ya 20 años desde que dos estudios de casos y controles encontraron que la Hcy total elevada estaba asociada con la enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular (78). Como ya se comentó previamente las vitaminas del grupo B y el folato son los principales determinantes de los niveles de Hcy; se descubrió que los niveles bajos de folato en los glóbulos rojos y suero y los niveles séricos disminuidos de vitamina B₁₂ estaban asociados con la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, se plantea el interrogante acerca de si la Hcy total elevada es una causa directa del deterioro cognitivo o si sólo es un marcador de otros factores tales como un estado vitamínico deficitario y/o un estilo de vida no saludable. La mayoría de los estudios prospectivos han encontrado que la Hcy total elevada permaneció asociada con el deterioro cognitivo, incluso después de ajustar el estado de vitamina B, consistente con que la HHcy es un factor de riesgo fuerte y modificable para el deterioro cognitivo y la demencia, independientemente del nivel vitamínico del grupo B. A partir de estos conceptos se pueden establecer algunas implicancias potenciales para la salud pública. Si ensayos de mayor potencia y correctamente diseñados confirman que la reducción de los niveles plasmáticos de Hcy ralentiza el desarrollo de la demencia, entonces la detección de Hcy debería incluirse como *screening* para individuos mayores de 65 años (edad en que la tasa de deterioro cognitivo en la población comienza a acelerarse) y consecuentemente, implementar terapias con suplementos de vitaminas del grupo B en pacientes con HHcy. Además, existen numerosos datos clínicos y preclínicos que respaldan firmemente a la Hcy como un mediador clave a nivel vascular que contribuye al deterioro cognitivo y la demencia (39).

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa progresiva más común en adultos mayores. La mayoría de los estudios encontraron un vínculo entre Hcy y Parkinson (79); sin embargo, otros trabajos no hallaron una asociación tan clara. Los pacientes con enfermedad de Parkinson presentaron una concentración de Hcy más alta y niveles de folato y vitamina B₁₂ más bajos que los individuos sanos (controles). Por lo tanto, el nivel plasmático de Hcy se correlacionó inversamente con los valores plasmáticos de folato y vitamina B₁₂ en pacientes con Parkinson (80). El rol de la HHcy en el desarrollo y la progresión de la enfermedad de Parkinson involucra múltiples vías de acción: defectos genéticos, apoptosis de las células nerviosas, estrés oxidativo y daño del ADN. La detección de niveles elevados de Hcy y la posterior intervención terapéutica permitirían el control de la progresión de la enfermedad, mejorando el pronóstico y la calidad de vida de

los pacientes. Estos estudios ofrecen estrategias para el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad (81).

Alteración del desarrollo cognitivo y desórdenes del espectro autista

Está ampliamente difundida la importancia del estado nutricional de la mujer durante el embarazo, ya que puede afectar importantes procesos fisiológicos, en particular, la correcta metilación del ADN, que influye en el desarrollo neurológico y el rendimiento cognitivo de la descendencia. Numerosos estudios han analizado los niveles de vitaminas y de Hcy en embarazadas y han hallado una correlación entre los niveles elevados de este último analito y la deficiencia en estudios cognitivos. Las concentraciones de la Hcy plasmática materna mayores de 15,0 µmol/L durante el segundo trimestre del embarazo, se asociaron con un rendimiento cognitivo más bajo, lo que afecta al lenguaje expresivo y, en el tercer trimestre de gestación, con el lenguaje expresivo y la motricidad fina, al desarrollo psicomotor. Existe un creciente número de trabajos que confirman los efectos del estado nutricional materno prenatal en el desarrollo neuronal y el rendimiento cognitivo en los niños (82) (83). Recientemente se ha postulado que la neurotoxicidad de la Hcy también podría contribuir de manera importante a la aparición de los trastornos del espectro autista y podría agravar las manifestaciones clínicas de los mismos. Los mecanismos específicos involucrados son complejos y aún no han sido dilucidados por completo. Un metaanálisis mostró una asociación significativa entre los niveles elevados de Hcy plasmática y manifestaciones de los trastornos del espectro autista en niños. Estos hallazgos fortalecen las evidencias clínicas de un perfil de Hcy alterado en niños autistas (84).

Alteraciones cognitivas asociadas a la edad

Los cambios en la función cognitiva relacionados con la edad, que van desde la pérdida de memoria hasta la demencia, son muy comunes en los adultos mayores. En los últimos años hay evidencia creciente de que los niveles más altos de Hcy están involucrados en la neurodegeneración y conducen al deterioro cognitivo relacionado con la edad (85). La asociación establecida por numerosos trabajos sigue siendo fuerte, incluso después de ajustar el análisis estadístico con el estado vitamínico y la función renal. Si bien los mecanismos etiopatogénicos responsables de las alteraciones cognitivas no han sido identificados de manera concluyente, los trastornos del sistema nervioso central relacionados con la HHcy podrían explicarse por tres posibles procesos (54) (86). En primer lugar, al promover el estrés oxidativo, la Hcy puede producir neurotoxicidad directa, alterar la neurotransmisión e inducir citotoxicidad

neuronal, apoptosis, acumulación de proteína beta-amiloide e hiperactivación de los receptores NMDA (87); en segundo lugar, también se ha observado que la alteración del metabolismo de la Hcy puede afectar la síntesis de neurotransmisores y en tercer lugar, la HHcy induciría daño en la pared del vaso sanguíneo y alteraciones de la coagulación, características de la enfermedad vascular oclusiva. En un trabajo de revisión, Setién-Suero *et al.* (88) establecieron una tendencia positiva entre el deterioro cognitivo y el aumento de las concentraciones plasmáticas de Hcy en la población general y en pacientes con deterioro cognitivo previo. Estas observaciones podrían explicarse parcialmente por el efecto acumulativo de la HHcy en ancianos, que conlleva al daño endotelial y la aterosclerosis (89).

Degeneración macular

La degeneración macular relacionada con la edad es una de las principales causas de ceguera a nivel mundial. Esta patología se asocia con niveles elevados de Hcy y niveles reducidos de vitamina B₁₂ (90). Actualmente se sugiere que la Hcy plasmática podría actuar como un modulador del riesgo de degeneración macular. Es interesante observar que aparentemente existe una relación entre la enfermedad cardiovascular, la aterosclerosis y la degeneración macular; estos hallazgos implicarían una vía causal común y la HHcy jugaría un papel etiológico central generando la inducción de lesión endotelial y aterosclerosis implicadas en estas enfermedades. Si bien los mecanismos que subyacen a la HHcy en la degeneración macular no han sido completamente esclarecidos hay crecientes evidencias que los relacionan con el estrés oxidativo. En particular, la retina es muy susceptible a las especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a I) la exposición directa a la luz, II) el alto consumo de oxígeno y III) las altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados en los fotorreceptores (91). La Hcy es un agente oxidante activo y por lo tanto puede exacerbar las lesiones inducidas por el estrés oxidativo. Además, el aumento de los niveles de Hcy podrían causar daño epitelial directo y alteración de la unión del epitelio pigmentario de la retina, que pueden conducir a la neovascularización. Dado que el nivel plasmático de Hcy se ha relacionado con la progresión de la enfermedad, se ha propuesto que podría ser un biomarcador de degeneración macular de utilidad para el monitoreo del estado de la patología (92).

Conclusiones

Se han descrito numerosas enfermedades y/o condiciones asociadas con la HHcy; las más evaluadas han sido las enfermedades cardiovasculares y del sistema

nervioso central, como así también condiciones del desarrollo neurológico y relacionadas con la edad avanzada. Debe advertirse que las asociaciones mencionadas no implican necesariamente causalidad. Para contribuir al esclarecimiento del rol de la HHcy en las patologías evaluadas se han implementado estudios de intervención terapéutica (suplementación con ácido fólico y/o vitaminas del grupo B) con el objetivo de determinar si el descenso de los niveles de Hcy disminuía el riesgo planteado. Estos trabajos muestran resultados no concluyentes. Sin embargo, es importante destacar que el reanálisis de varios de los estudios, realizado con posterioridad a la publicación final de los mismos, demostró que algunos de los resultados previamente informados no eran correctos. Por ejemplo, en años recientes se reanalizaron trabajos de intervención muy importantes, como el VISP, el HOPE-2 y el VITATOP, los que demostraron que en 4643 pacientes con enfermedad vascular, se había producido una reducción del 29% en el riesgo de ACV en aquellos individuos que habían recibido una terapia con suplemento vitamínico (resultado contrapuesto a las conclusiones inicialmente publicadas). De todas maneras, queda planteado el interrogante de si la HHcy es un factor de riesgo causal para determinada patología o si sólo es un marcador de otro factor asociado a dicha enfermedad. Es decir, ¿las patologías asociadas al aumento de Hcy son causadas por la propia Hcy elevada, por los bajos niveles vitamínicos o por ambos factores? Independientemente de la respuesta a esta pregunta, la determinación de los niveles plasmáticos de Hcy sería recomendable, ya que el hallazgo de HHcy alerta no sólo acerca de la presencia de un posible factor de riesgo de enfermedad vascular, sino también sobre probables deficiencias de las vitaminas involucradas en el metabolismo de la Hcy. Además, en particular, la determinación de homocisteinemia resultaría especialmente útil en la población anciana, que con frecuencia presenta deficiencias vitamínicas asociadas a alteraciones de la absorción. Un tópico muy importante en el presente trabajo es establecer los valores de corte para definir el estado de HHcy. Si bien inicialmente se propuso el intervalo 5-15 $\mu\text{mol/L}$ como rango de referencia, en los últimos años se recomendaron valores de corte significativamente menores ($\leq 10 \mu\text{mol/L}$).

Cuando se disponga de resultados concluyentes de estudios clínicos de intervención vitamínica que muestren los valores de homocisteinemia a partir de los cuales disminuye efectivamente el riesgo asociado a la enfermedad evaluada, se podrán establecer de manera contundente los niveles de Hcy plasmática apropiados para la salud humana.

Fuentes de financiación

El presente trabajo fue realizado sin haberse recibido una financiación específica.

Conflictos de intereses

Las autoras declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Correspondencia

Dra. VALERIA GENOUD
Intendente Güiraldes 2160, Pabellón II, piso 4.
Ciudad Universitaria C1428EGA Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
Correo electrónico: valgen@qb.fcen.uba.ar

Referencias bibliográficas

- Loriaux DL. A biographical history of Endocrinology. Chapter 75: Vincent du Vigneaud (1901-1978). Wiley; 2016. p. 333-4.
- McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56 (1): 111-28.
- Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992 Jan 23; 326 (4): 242-50.
- Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Ullmann D, Tishler PV, *et al.* A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992 Aug 19; 268 (7): 877-81.
- Brattstrom L, Lindgren A. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for stroke. *Neurol Res* 1992; 14 (2 Suppl.): 81-4.
- De Jong SC. Hyperhomocysteinemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39 (8): 714-6.
- D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and thrombotic disease. *Blood* 1997; 90 (1): 1-11.
- Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Adaptation to methionine excess. *J Biol Chem* 1986; 26 (4): 1582-7.
- Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, *et al.* S-adenosylmethionine and methylation. *FASEB J* 1996; 10 (4): 471-80.
- Handy DE, Castro R, Loscalzo J. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation* 2011; 123 (19): 2145-56.
- Jakubowski H. Homocysteine modification in protein structure/function and human disease. *Physiol Rev* 2018; 99 (1): 555-604.
- Kery V, Bukovskas G, Krausp JP. Transsulfuration depends on heme in addition to pyridoxal 5'-phosphate. *J Biol Chem* 1994; 269 (41): 25283-8.
- Finkelstein JD. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26 (3): 219-25.
- Jakubowski H. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61 (4): 470-87.
- Jakubowski H. Quality control in tRNA charging [Internet]. Vol. 3, Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. 2012. p. 295-310. Disponible en: http://www.actabp.pl/pdf/2_2011/149.pdf (Fecha de acceso: 9 de marzo de 2017).
- Blom HJ. Consequences of homocysteine export and oxidation in the vascular system. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26 (3): 227-32.
- Jakubowski H. Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J* 1999; 13 (15): 2277-83.
- Genoud V, Quintana I. Reacciones de *N*-homocisteinilación asociadas a hiperhomocisteinemia. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2016; 50 (4): 679-85.
- Genoud V, Castañón M, Lauricella AM, Quintana I. Characterization of *N*-homocysteinylated albumin adducts. *Protein J* 2014; 33 (1): 85-91.
- Undas A, Perła J, Łacinski M, Trzeciak W, Kaźmierski R, Jakubowski H. Autoantibodies against *N*-homocysteinylated proteins in humans: implications for atherosclerosis. *Stroke* 2004; 35 (6): 1299-304.
- Genoud V, Quintana PG, Gionco S, Baldessari A, Quintana I. Structural changes of fibrinogen molecule mediated by the *N*-homocysteinylated reaction. *J Thromb Thrombolysis* 2018 Jan; 45 (1): 66-76.
- Genoud V, Lauricella AM, Kordich LC, Quintana I. Impact of homocysteine-thiolactone on plasma fibrin networks. *J Thromb Thrombolysis* 2014; 38 (4): 540-5.
- Sharma GS, Kumar T, Dar TA, Singh LR. Protein *N*-homocysteinylated: from cellular toxicity to neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1850 (11): 2239-45.
- Gurda D, Handschuh L, Kotkowiak W, Jakubowski H. Homocysteine thiolactone and *N*-homocysteinylated protein induce pro-atherogenic changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Amino Acids* 2015 Jul 24; 47 (7): 1319-39.
- Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, *et al.* Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004; 50 (1): 3-32.
- Meneses-Sánchez P, García-Hernández SC, Porchia LM, Pérez-Fuentes R, Torres-Rasgado E, Del Angel Soto A, *et al.* C677T and A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and breast cancer susceptibility among Latinos: a meta-analysis. *Breast Cancer* 2019; 26 (5): 602-11.
- Masud R, Khan AUH, Anjum AF, Jawwad G, Azeem Z, Baqai HZ, *et al.* The connotation of variances in the risk predictors, medications, homocysteine, and homocysteine pathway gene polymorphisms with CVA/stroke. *Glob Med Genet* 2020; 7 (4): 113-20.
- Osadnik T, Pawlas N, Lejawa M, Lisik M, Osadnik K, Fronczek M, *et al.* Genetic and environmental factors associated with homocysteine concentrations in a population of healthy young adults. Analysis of the MAGNETIC study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2020; 30 (6): 939-47.

29. Tsai MY, Bignell M, Schwichtenberg K, Hanson NQ. High prevalence of a mutation in the cystathionine β -synthase gene. *Am J Hum Genet* 1996; 59 (6): 1262-7.
30. Kluijtmans LAJ, Boers GHJ, Trijbels FJM, Van Lith-Zanders HMA, Van Den Heuvel LPWJ, Blom HJ. A common 844INS68 insertion variant in the cystathionine β -synthase gene. *Biochem Mol Med* 1997; 62 (1): 23-5.
31. Castañon MM, Lauricella AM, Genoud V, Quintana IL. Importancia de la determinación de homocisteinemia y metilentetrahidrofolato reductasa C677T. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2006; 40 (3): 335-9.
32. Janson JJ, Galarza CR, Murúa A, Quintana I, Przygoda PA, Waisman G, *et al.* Prevalence of hyperhomocysteinemia in an elderly population. *Am J Hypertens* 2002; 15 (5): 394-7.
33. Cohen E, Margalit I, Shochat T, Goldberg E, Krause I. Gender differences in homocysteine concentrations, a population-based cross-sectional study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2019; 29 (1): 9-14.
34. Quintana I, Freeman D, Galarza C, Murúa A, Spence JD, Kordich L. Validation of an enzyme immunoassay for the determination of total homocysteine in plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000; 11 (3): 235-8.
35. Cieslarova Z, Lopes FS, do Lago CL, França MC, Colnaghi Simionato AV. Capillary electrophoresis tandem mass spectrometry determination of glutamic acid and homocysteine's metabolites: potential biomarkers of amyotrophic lateral sclerosis. *Talanta* 2017 Aug 1; 170: 63-8.
36. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993; 39 (9): 1764-79.
37. Castañon MM, Lauricella AM, Kordich L, Quintana I. Plasma homocysteine cutoff values for venous thrombosis. *Clin Chem Lab Med* 2007 Jan 1; 45 (2): 232-6.
38. Piao X, Wu G, Yang P, Shen J, De A, Wu J, *et al.* Association between homocysteine and cerebral small vessel disease: a meta-analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2018 Sep; 27 (9): 2423-30.
39. Price BR, Wilcock DM, Weekman EM. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for vascular contributions to cognitive impairment and dementia. *Front Aging Neurosci* 2018 Oct 31; 10: 350.
40. Joo NS, Jung S, Kim YN, Choi BH. Cut-off value of serum homocysteine in relation to increase of coronary artery calcification. *J Investig Med* 2021; 69 (2): 345-50.
41. Ray JG. Meta-analysis of hyperhomocysteinemia as a risk factor for venous thromboembolic disease. *Arch Intern Med* 1998; 158 (19): 2101-6.
42. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995; 274 (13): 1049-57.
43. Nygård O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farsstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997; 337 (4): 230-7.
44. Fallon UB, Ben-Shlomo Y, Elwood P, Ubbink JB, Smith GD. Homocysteine and coronary heart disease in the Caerphilly cohort: a 10 year follow up. *Heart* 2001 Feb; 85 (2): 153-8.
45. Voutilainen S, Lakka TA, Hämelehti P, Lehtimäki T, Poulsen HE, Salonen JT. Plasma total homocysteine concentration and the risk of acute coronary events: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *J Intern Med* 2000; 248 (3): 217-22.
46. Ostrakhovitch EA, Tabibzadeh S. Homocysteine and age-associated disorders. *Ageing Res Rev* 2019; 49: 144-64.
47. Karger AB, Steffen BT, Nomura SO, Guan W, Garg PK, Szklo M, *et al.* Association between homocysteine and vascular calcification incidence, prevalence, and progression in the MESA Cohort. *J Am Heart Assoc* 2020; 9 (3): 1-9.
48. Miñana G, Gil-Cayuela C, Fácila L, Bodi V, Valero E, Mollar A, *et al.* Homocysteine and long-term recurrent infarction following an acute coronary syndrome. *Cardiol J* 2021; 28 (4): 598-606.
49. McCully KS. Homocysteine and the pathogenesis of atherosclerosis. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2015; 8 (2): 211-9.
50. Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001; 104 (21): 2569-75.
51. Mujumdar VS, Aru GM, Tyagi SC. Induction of oxidative stress by homocyst(e)ine impairs endothelial function. *J Cell Biochem* 2001; 82 (3): 491-500.
52. Litvinov RI, Peshkova AD, Le Minh G, Khaertdinov NN, Evtugina NG, Sitdikova GF, *et al.* Effects of hyperhomocysteinemia on the platelet-driven contraction of blood clots. *Metabolites* 2021 Jun 1; 11 (6): 354.
53. Stühlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmölzer I, Upson BM, Kapoor O, *et al.* Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2003; 108 (8): 933-8.
54. Esse R, Barroso M, Tavares de Almeida I, Castro R. The contribution of homocysteine metabolism disruption to endothelial dysfunction: state-of-the-art. *Int J Mol Sci* 2019 Feb 17; 20 (4): 867.
55. Bots ML, Launer LJ, Lindemans J, Hoes AW, Hofman A, Witteman JCM, *et al.* Homocysteine and short-term risk of myocardial infarction and stroke in the elderly: The Rotterdam Study. *Arch Intern Med* 1999; 159 (1): 38-44.
56. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J, Bowman BA, Gunter EW, *et al.* Serum total homocysteine concentration is related to self-reported heart attack or stroke history among men and women in the NHANES III. *J Nutr* 2000; 130 (12): 3073-6.
57. Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf BM, Tanji N, *et al.* Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest* 2001; 107 (6): 675-83.
58. Huo Y, Li J, Qin X, Huang Y, Wang X, Gottesman RF, *et al.* Efficacy of folic acid therapy in primary prevention of stroke among adults with hypertension in China:

- the CSPPT randomized clinical trial. *JAMA* 2015; 313 (13): 1325-35.
59. Xiao H, YouBao L, Ping L, JianPing L, HuiHui B, Yan Z, *et al.* Association between percent decline in serum total homocysteine and risk of first stroke. *Neurology* 2017; 89 (20): 2101-7.
 60. Shi Z, Guan Y, Huo YR, Liu S, Zhang M, Lu H, *et al.* Elevated total homocysteine levels in acute ischemic stroke are associated with long-term mortality. *Stroke* 2015; 46 (9): 2419-25.
 61. Li Y, Huang T, Zheng Y, Muka T, Troup J, Hu FB. Folic acid supplementation and the risk of cardiovascular diseases: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Heart Assoc* 2016; 5 (8): 1-19.
 62. Zhang T, Jiang Y, Zhang S, Tie T, Cheng Y, Su X, *et al.* The association between homocysteine and ischemic stroke subtypes in Chinese: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2020 Mar; 99 (12): e19467.
 63. Zhou F, Chen B, Chen C, Huang J, Chen S, Guo F, *et al.* Elevated homocysteine levels contribute to larger hematoma volume in patients with intracerebral hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2015; 24 (4): 784-8.
 64. Zhou Z, Liang Y, Qu H, Zhao M, Guo F, Zhao C, *et al.* Plasma homocysteine concentrations and risk of intracerebral hemorrhage: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2018; 8 (1): 1-8.
 65. Bernstein JE, Browne JD, Savla P, Wiginton J, Patchana T, Miulli DE, *et al.* Inflammatory markers in severity of intracerebral hemorrhage II: a follow up study. *Cureus* 2021; 13 (1): 1-8.
 66. Candito M, Rivet R, Herbeth B, Boisson C, Rudigoz RC, Luton D, *et al.* Nutritional and genetic determinants of vitamin B and homocysteine metabolisms in neural tube defects: a multicenter case-control study. *Am J Med Genet Part A* 2008; 146 (9): 1128-33.
 67. Ceyhan ST, Beyan C, Atay V, Yaman H, Alanbay I, Kaptan K, *et al.* Serum vitamin B₁₂ and homocysteine levels in pregnant women with neural tube defect. *Gynecol Endocrinol* 2010; 26 (8): 578-81.
 68. Aydin H, Arisoy R, Karaman A, Erdoğdu E, Çetinkaya A, Geçkinli BB, *et al.* Evaluation of maternal serum folate, vitamin B₁₂, and homocysteine levels and factor V Leiden, factor II g.20210G>A, and MTHFR variations in prenatally diagnosed neural tube defects. *Turkish J Med Sci* 2016; 46 (2): 489-94.
 69. Yadav U, Kumar P, Rai V. Maternal biomarkers for early prediction of the neural tube defects pregnancies. *Birth Defects Res* 2021; 113 (7): 589-600.
 70. Godbole K, Gayathri P, Ghule S, Sasirekha BV, Kanitkar-Damle A, Memane N, *et al.* Maternal one-carbon metabolism, MTHFR and TCN2 genotypes and neural tube defects in India. *Birth Defects Res Part A - Clin Mol Teratol* 2011; 91 (9): 848-56.
 71. Kirke PN, Molloy AM, Daly LE, Burke H, Weir DC, Scott JM. Maternal plasma folate and vitamin B₁₂ are independent risk factors for neural tube defects. *Q J Med* 1993; 86 (11): 703-8.
 72. James SJ, Pogribny IP, Pogribna M, Miller BJ, Jernigan S, Melnyk S. Mechanisms of DNA damage, DNA hypomethylation, and tumor progression in the folate/methyl-deficient rat model of hepatocarcinogenesis. *J Nutr* 2003 Nov; 133 (11): 3740-7.
 73. Morrison K, Papapetrou C, Hol FA, Mariman ECM, Lynch SA, Burn J, *et al.* Susceptibility to spina bifida: an association study of five candidate genes. *Ann Hum Genet* 1998; 62 (5): 379-96.
 74. Pogribny IP, James SJ, Jernigan S, Pogribna M. Genomic hypomethylation is specific for preneoplastic liver in folate/methyl deficient rats and does not occur in non-target tissues. *Mutat Res* 2004; 548 (1-2): 53-9.
 75. Razin A, Kantor B. DNA methylation in epigenetic control of gene expression. *Prog Mol Subcell Biol* 2005; 38: 151-67.
 76. Blom HJ, Shaw GM, Den Heijer M, Finnell RH. Neural tube defects and folate. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7 (9): 724-31.
 77. Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005 Dec; 289 (6): H2649-56.
 78. Smith AD, Refsum H, Bottiglieri T, Fenech M, Hooshmand B, McCaddon A, *et al.* Homocysteine and dementia: an international consensus statement. *J Alzheimer's Dis* 2018; 62 (2): 561-70.
 79. Capasso R, Sambri I, Cimmino A, Salemme S, Lombardi C, Acanfora F, *et al.* Homocysteinylated albumin promotes increased monocyte-endothelial cell adhesion and up-regulation of MCP1, Hsp60 and ADAM17. *PLoS One* 2012; 7 (2): 1-12.
 80. Dong B, Wu R. Plasma homocysteine, folate and vitamin B₁₂ levels in Parkinson's disease in China: a meta-analysis. *Clin Neurol Neurosurg* 2020 Jan; 188 105587.
 81. Fan X, Zhang L, Li H, Chen G, Qi G, Ma X, *et al.* Role of homocysteine in the development and progression of Parkinson's disease. *Ann Clin Transl Neurol* 2020; 7 (11): 2332-8.
 82. Murphy MM, Fernandez-Ballart JD, Molloy AM, Canals J. Moderately elevated maternal homocysteine at preconception is inversely associated with cognitive performance in children 4 months and 6 years after birth. *Matern Child Nutr* 2017; 13 (2): 1-13.
 83. Srinivasan K, Thomas T, Kapanee ARM, Ramthal A, Bellinger DC, Bosch RJ, *et al.* Effects of maternal vitamin B₁₂ supplementation on early infant neurocognitive outcomes: a randomized controlled clinical trial. *Matern Child Nutr* 2017; 13 (2): 1-11.
 84. Guo B-Q, Li H-B, Ding SB. Blood homocysteine levels in children with autism spectrum disorder: an updated systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Res* 2020 Sep; 291: 113283.
 85. Kado DM, Karlamangla AS, Huang MH, Troen A, Rowe JW, Selhub J, *et al.* Homocysteine *versus* the vitamins folate, B₆, and B₁₂ as predictors of cognitive function and decline in older high-functioning adults: MacArthur studies of successful aging. *Am J Med* 2005; 118 (2): 161-7.

86. Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2003; 26 (3): 137-46.
87. Moretti R, Caruso P. The controversial role of homocysteine in neurology: from labs to clinical practice. *Int J Mol Sci* 2019 Jan 8; 20 (1): 231.
88. Setién-Suero E, Suárez-Pinilla M, Suárez-Pinilla P, Crespo-Facorro B, Ayesa-Arriola R. Homocysteine and cognition: a systematic review of 111 studies. *Neurosci Biobehav Rev* 2016; 69: 280-98.
89. Wu J, Uchino M, Sastry SM, Schaumburg DA. Age-related macular degeneration and the incidence of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014 Mar 28; 9 (3): e89600.
90. Gopinath B, Flood VM, Rochtchina E, Wang JJ, Mitchell P. Homocysteine, folate, vitamin B₁₂, and 10-y incidence of age-related macular degeneration. *Am J Clin Nutr* 2013 Jul; 98 (1): 129-35.
91. Huang P, Wang F, Kumar Sah B, Jiang J, Ni Z, Wang J. *et al.* Homocysteine and the risk of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2015 Jul 21; 5: 10585.
92. Pinna A, Zaccheddu F, Boscia F, Carru C, Solinas G. Homocysteine and risk of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Acta Ophthalmol* 2018; 96 (3): e269-76.

Recibido: 10 de julio de 2022

Aceptado: 26 de enero de 2023