

## Revisiones

### HOMOCYSTEINE, METABOLISM AND DIETARY FACTORS

Homocysteine (Hcy) is a sulfur-containing amino acid with a free thiol group that is not found in dietary proteins but is exclusively produced as an intermediate product of methionine and cysteine metabolism. Therefore, the only source of this amino acid is methionine. Hcy concentration is secondary to complex interaction among multiple external and genetics factors and is modified by a series of physiological determinants such as age, sex, menopause, pregnancy and race. Genetic defects can also modify Hcy concentrations and 3 defects have been described: cystathionine- $\beta$ -synthase deficiency (CBS), N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-methylene tetrahydrofolate reductase deficiency (MTHFR) and methionine synthase deficiency (MS). Among the dietary factors that can influence Hcy concentrations are vitamin status, smoking and alcohol consumption, dietary protein intake, and exercise. The consumption of certain drugs, as well as manipulation of the sample obtained, can also influence Hcy levels. All of these factors should be taken into account when determining Hcy concentrations.

*Key words:* Diet. Homocysteine. Metabolism.

## Homocisteína, metabolismo y determinantes higienicodietéticos

D.A. DE LUIS, N. FERNÁNDEZ Y R. ALLER

*Servicio de Endocrinología y Nutrición. Unidad de Apoyo a la Investigación. Hospital Universitario Río Hortega. Instituto de Endocrinología y Nutrición. Facultad de Medicina. Valladolid. España.*

La homocisteína es un aminoácido azufrado caracterizado por la presencia de un grupo tiol libre, que no está presente en las proteínas de la dieta sino que se forma exclusivamente como producto intermediario en el metabolismo de la metionina a cisteína. Por tanto, la única fuente de homocisteína en el organismo es el aminoácido esencial metionina. La concentración de homocisteína total es producto de una compleja interacción entre múltiples factores genéticos y ambientales. En su concentración influyen una serie de determinantes fisiológicos, como la edad, el sexo, la menopausia, el embarazo y la raza. Los defectos genéticos también pueden influir en las concentraciones de homocisteína; existen 3 déficit descritos: deficiencia de cistationina- $\beta$ -sintasa, deficiencia de la N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metilentetrahidrofolato reductasa y deficiencia de metionina sintasa. Dentro de los determinantes dietéticos que pueden influir en los valores de homocisteína podemos citar el estatus vitamínico, el consumo de alcohol y tabaco, el contenido de metionina de las proteínas de la dieta y el ejercicio. El consumo de determinados fármacos, así como la manipulación de la muestra obtenida, también puede influir en las concentraciones de este aminoácido.

Es necesario tener en cuenta todos estos determinantes higienicodietéticos a la hora de valorar una determinación aislada de homocisteína.

*Palabras clave:* Dieta. Homocisteína. Metabolismo.

### INTRODUCCIÓN

La homocisteína es un aminoácido azufrado caracterizado por la presencia de un grupo tiol libre, que no está presente en las proteínas de la dieta sino que se forma exclusivamente como producto intermediario en el metabolismo de la metionina a cisteína. Por tanto, la única fuente de homocisteína en el organismo es el aminoácido esencial metionina<sup>1</sup>.

Debido al valor del pKa (constante de activación) de su grupo tiol (pKa = 8,9) al pH fisiológico, la homocisteína se oxida rápidamente para formar distintos tipos de disulfuros. Así, en plasma se diferencian distintas especies circulantes de homocisteína: un compuesto libre reducido y 3 oxidados, en los que un monómero de homocisteína se encuentra unido a otro compuesto mediante puentes disulfuro: el heterodímero homocisteína-cisteína, el homodímero de homocisteína (homocistina) y la homocisteína unida a proteínas<sup>2</sup>. La suma de todas ellas se denomina homocisteína total.

Correspondencia: Dr. D.A. de Luis.  
Instituto de Endocrinología y Nutrición.  
Los Perales, 16 (urbanización Las Aceñas). 47130 Simancas. Valladolid. España.  
Correo electrónico: Dadluis@yahoo.es

Manuscrito recibido el 8-7-2003; aceptado para su publicación el 17-11-2003.

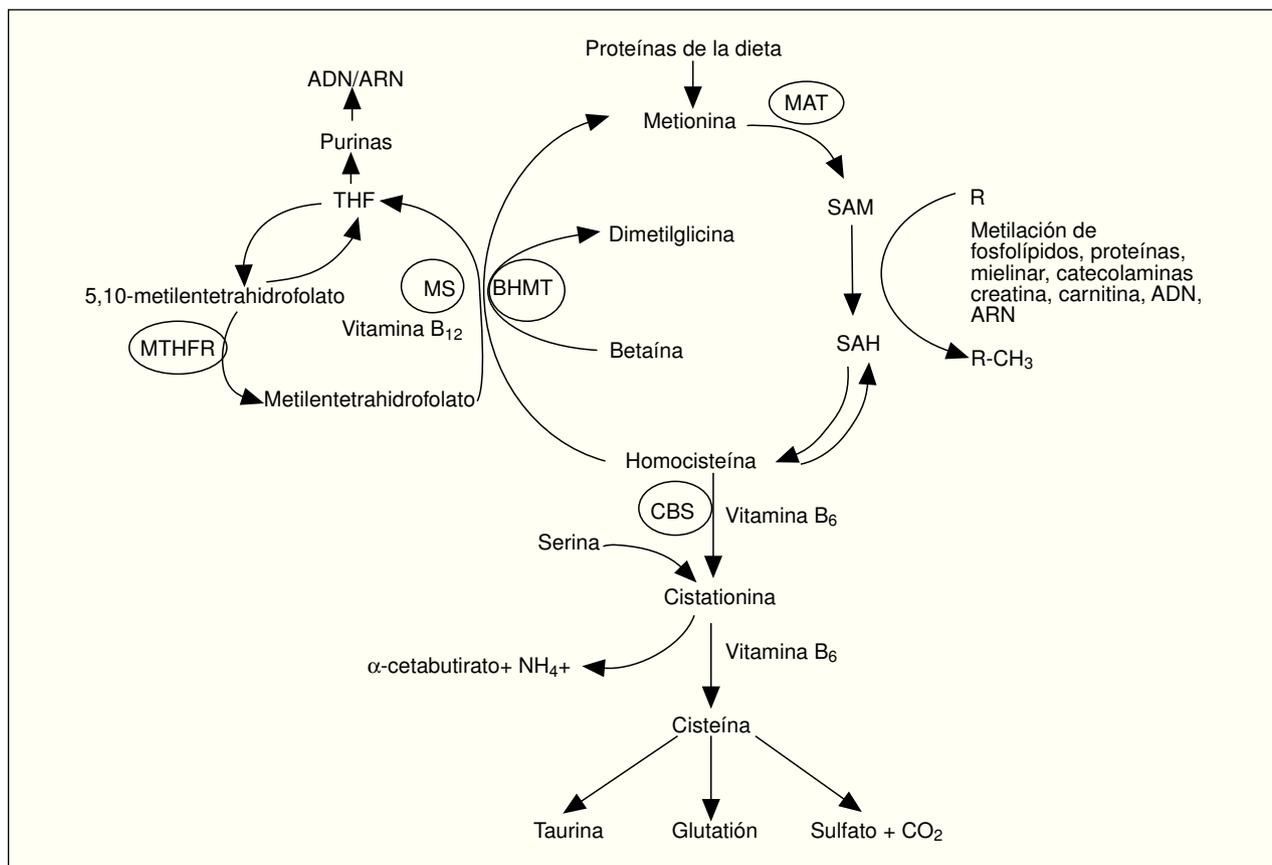


Fig. 1. Metabolismo de la homocisteína. BHMT: betaína-homocisteína metiltransferasa; CBS: cistationina- $\beta$ -sintetasa; MAT: metionina adenosiltransferasa; MS: metionina sintasa; MTHFR:  $N^5,N^{10}$ -metilentetrahidrofolato reductasa; SAH: S-adenosilhomocisteína; SAM: S-adenosilmetionina; THF: tetrahidrofolato.

La concentración de homocisteína libre en plasma es muy baja y supone menos de un 2% de la homocisteína plasmática total<sup>3</sup>. Los dímeros homocisteína-cisteína y homocistina suponen un 10-15% de la homocisteína total, mientras que la fracción mayoritaria está formada por la homocisteína unida a proteínas, principalmente albúmina, fracción que representa un 80-85% de la homocisteína total<sup>4</sup>.

En esta última década, la determinación de los valores séricos de homocisteína se ha convertido en un área de interés debido a su relación con el riesgo cardiovascular.

## METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA

La síntesis de la homocisteína como producto intermediario del metabolismo de la metionina requiere de la acción de diversas enzimas (fig. 1), entre ellas la metionina adenosiltransferasa (MAT), que convierte la metionina en S-adenosilmetionina (SAM), el principal donante biológico de grupos metilo, que interviene en numerosos e importantes procesos celulares (formación de creatinina, metilación de los fosfolípidos, metilación de ácidos nucleicos, síntesis de catecolami-

nas...)<sup>5</sup>. Posteriormente, mediante la acción de varias metiltransferasas encargadas de desmetilar la SAM, se obtiene la S-adenosilhomocisteína (SAH), precursor inmediato de la homocisteína. Ésta, una vez formada puede seguir 2 rutas:

1. Vía de la remetilación. Permite que la homocisteína sea reciclada a metionina tras sufrir un proceso de metilación. Esta etapa puede llevarse a cabo con la participación de 2 enzimas diferentes:

– Metionina sintasa o 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína-S-metiltransferasa (MS). Es la enzima que cataliza la remetilación en la mayoría de los tejidos debido a su ubicuidad. Esta enzima utiliza la vitamina  $B_{12}$  como cofactor y el 5-metiltetrahidrofolato como donante de grupos metilo. A su vez, el metiltetrahidrofolato se forma mediante la acción de la enzima  $N^5,N^{10}$ -metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) dependiente de vitamina  $B_{12}$ .

– Betaína-homocisteína metiltransferasa (BHMT). Utiliza la betaína como donante de grupos metilo, pero probablemente esta reacción está limitada al hígado, el riñón y las glándulas suprarrenales.

2. Vía de la transulfuración. Implica la acción de enzimas dependientes de la vitamina  $B_6$  que conducen a la degradación de la homocisteína a cisteína. La pri-

**TABLA 1. Factores que influyen en las concentraciones de homocisteína**

Elevan	Disminuyen
Edad avanzada	Adolescencia
Varón	Mujer
Raza caucásica	Raza negra y asiática
Menopausia	Tratamiento hormonal sustitutivo
Déficit enzimáticos	Ejercicio físico
Déficit de vitaminas B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , ácido fólico	Suplementación con vitamina B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , ácido fólico
Vino, bebidas alta graduación	Cerveza
Sobrecarga de metionina	
Fármacos	

**TABLA 2. Medidas que se deben tomar en la extracción de la muestra para determinar la homocisteína**

Tubo EDTA
Transporte en hielo
Procesamiento en menos de 4 h
Cena ligera
Posición del paciente en decúbito supino

EDTA: ácido etilendiaminotetracético.

mera de ellas, la cistationina-β-sintetasa (CBS), se encarga de condensar la homocisteína con serina para formar cistationina, que posteriormente, por acción de la cistationina-γ-liasa es escindida en cisteína y α-ce-tobutirato. La cisteína, así generada, puede utilizarse en la síntesis de proteínas o como precursor del antioxidante glutatión. Este proceso de transulfuración es irreversible y dirige la homocisteína al catabolismo hacia su producto final, los sulfatos.

En circunstancias metabólicas normales, existe un balance estricto entre la formación de homocisteína y su eliminación. Normalmente el 50% de la homocisteína formada se remeta a metionina; sin embargo, cuando hay un exceso de ingesta proteínica o de metionina, el porcentaje que se cataboliza por la vía de la transulfuración es superior. Si la producción de homocisteína se incrementa en relación con su consumo, la homocisteína se excreta de las células, hecho que se puede detectar como un aumento de la concentración de homocisteína en el plasma, el suero o la orina.

Debido a que la concentración de homocisteína libre es muy variable y está influida por múltiples variables preanalíticas y circunstancias fisiológicas, la determinación de homocisteína total es la que resulta de interés a la hora de valorar su función como factor de riesgo.

## CONCENTRACIONES DE HOMOCISTEÍNA

Los términos más empleados que hacen referencia a las concentraciones de homocisteína son:

– Hiperhomocisteinemia: concentración elevada de homocisteína total en sangre. Se puede dividir en débil (15-30 μmol/l), intermedia (30-100 μmol/l) y grave (> 100 μmol/l)<sup>6</sup>.

– Homocistinuria: presencia de homocisteína en orina a consecuencia de una hiperhomocisteinemia grave originada por defectos congénitos en el metabolismo de la homocisteína.

– Concentraciones deseables de homocisteína < 1 μmol/l.

La concentración de homocisteína total es función de una compleja interacción entre múltiples factores genéticos y ambientales.

## Determinantes fisiológicos (tabla 1)

1. Edad. Las concentraciones de homocisteína se elevan a lo largo de la vida en ambos sexos. Antes de la pubertad, todos los niños presentan concentraciones bajas y similares, en torno a los 5 μmol/l. Durante la pubertad, estos valores se elevan considerablemente, más en los niños que en las niñas, de modo que, a los 40 años de edad, existe una diferencia de unos 2 μmol/l entre ambos sexos, con valores medios en torno a los 11 μmol/l en los varones y 9 μmol/l en las mujeres<sup>7</sup>. Posteriormente, a medida que se eleva la edad, aumenta la homocisteína total, hecho que puede relacionarse con la disminución de la filtración glomerular<sup>8</sup>, los déficit vitamínicos<sup>9</sup> y la malabsorción intestinal<sup>10</sup>.

2. Sexo. Los varones presentan concentraciones de homocisteína total superiores a las mujeres. Esta situación se mantiene hasta que las mujeres alcanzan edades próximas a los 60 años, el período posmenopáusico, momento a partir del que los valores de homocisteína total entre ambos sexos tienden a igualarse. La diferencia entre sexos podría deberse a diferencias en la masa muscular<sup>11</sup>, ya que la síntesis de creatina es superior en los varones que en las mujeres, y existe una correlación significativa entre la homocisteína total plasmática y la concentración de creatina plasmática<sup>12</sup>.

3. Raza. La concentración de homocisteína muestra diferencias entre las distintas razas. Un estudio interétnico realizado en Los Ángeles mostró valores de homocisteína total menores en la raza negra y en los asiáticos que en las personas de raza blanca, mientras que los latinoamericanos tenían concentraciones intermedias<sup>13</sup>. No obstante, en todas las etnias, los varones presentaban concentraciones de homocisteína superiores a las de las mujeres. Es posible que estas diferencias observadas entre razas se expliquen por la mayor o la menor prevalencia de las mutaciones en los genes que codifican las enzimas involucradas en el metabolismo de la homocisteína total<sup>14</sup>. Por ejemplo, el polimorfismo en el gen de la MTHFR, que predispone a aumentos en la homocisteína total plasmática en condiciones de alteración en el estatus de folato, muestra importantes diferencias étnicas. En la raza blanca aparece con una elevada frecuencia (un 10% en el genotipo TT), mientras que casi está ausente en los afroamericanos<sup>15</sup>.

4. Menopausia y embarazo. Las mujeres posmenopáusicas presentan una elevación media del 20% en las concentraciones de homocisteína total en ayunas con respecto a las premenopáusicas<sup>16</sup>; sin embargo, aque-

illas sometidas a terapia hormonal sustitutiva consiguen reducir su homocisteína total<sup>17</sup>. En el embarazo, la concentración de la homocisteína total disminuye entre un 30-50%, para normalizarse a los 2-4 días posparto.

### Determinantes genéticos

Los defectos genéticos en las enzimas involucradas en el metabolismo de la homocisteína conducen a elevaciones, de leves a graves, en la concentración de homocisteína.

1. Deficiencia de la CBS. Es la causa más frecuente de homocistinuria. Se hereda de forma autosómica recesiva. Sus manifestaciones clínicas incluyen retraso mental, anomalías esqueléticas y trombosis, tanto arteriales como venosas prematuras. Bioquímicamente, incluye elevación, de moderada a importante, de las concentraciones de homocisteína total en plasma y orina. En los sujetos homocigotos (homocistinuria congénita), éstas pueden ser superiores a 400  $\mu\text{mol/l}$  en ayunas, mientras que en los heterocigotos oscilan entre 20 y 40  $\mu\text{mol/l}$ , debido a la actividad residual de la enzima.

2. Deficiencia de la MTHFR.

– Deficiencia grave. Es muy poco frecuente y origina una elevación muy marcada de la concentración de homocisteína total en sangre y orina, así como la disminución de la concentración de metionina en sangre. La gravedad de las manifestaciones clínicas es paralela al grado de deficiencia enzimática.

– Presencia de la variable termolábil de la MTHFR. Se origina por la presencia de una mutación puntual (C677T) en el gen de esta enzima que conlleva el cambio de una alanina por valina, y genera una enzima con sensibilidad térmica (46 °C) que la diferencia claramente de la enzima presente en la mayoría de la población y la de los pacientes con deficiencia grave. Esta variante termolábil se caracteriza por tener una actividad reducida que le impide convertir el 5,10-metilen-THF a 5-metil-THF a la velocidad adecuada, hecho que incrementa la susceptibilidad de desarrollar hiperhomocisteinemia, en particular, cuando las concentraciones de folato son escasas.

El polimorfismo de la MTHFR se observa con una frecuencia del 10-15% en los caucásicos, aunque las diferencias interétnicas son notables. La prevalencia es baja (0-2%) en indios, africanos o canadienses<sup>18</sup> y llega al 20% o más en los asiáticos e italianos del norte<sup>19</sup>. Su presencia se correlaciona con concentraciones altas de homocisteína total, con la enfermedad arterial coronaria y con la gravedad de las estenosis<sup>20</sup>.

3. Deficiencia de la MS. La deficiencia funcional de esta enzima es consecuencia de las alteraciones nutricionales y/o genéticas que afectan a la formación de la metilcobalamina y del ácido 5-metiltetrahidrofólico.

### Determinantes de estilo de vida

La influencia de diversos aspectos del estilo de vida en las concentraciones de homocisteína total se han

estudiado en el Hordaland Homocysteine Study, un estudio poblacional a gran escala realizado en Noruega<sup>21</sup>. Entre los principales factores implicados se encuentran los siguientes:

1. Estatus vitamínico. Los déficit de ácido fólico, vitamina B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub>, más frecuentes en las personas mayores, son la principal causa de hiperhomocisteinemia<sup>22</sup>. Este hallazgo está avalado por la presencia de bajas concentraciones de homocisteína total en los sujetos que habitualmente toman suplementos vitamínicos, así como por la asociación negativa entre los valores plasmáticos de homocisteína<sup>23</sup> y las concentraciones plasmáticas o la ingesta de estas vitaminas<sup>24</sup>. La gran influencia de estas vitaminas en la concentración de homocisteína se debe a su intervención como cofactores, en distintos ámbitos, en el metabolismo de la homocisteína<sup>25</sup>.

2. Contenido en metionina de las proteínas de la dieta. A las 8 h de realizar una comida rica en proteínas, la homocisteína total aumenta un 14%<sup>26</sup>. Sin embargo, la respuesta de la homocisteína tras sobrecarga de metionina o en ayunas no parece relacionarse con la metionina o la ingesta proteínica de la dieta<sup>27</sup>. Por el contrario, los estudios recientes sugieren que una ingesta proteínica o de metionina elevada puede reducir la homocisteína total basal debido, posiblemente, al elevado contenido en vitamina B<sub>12</sub> de muchos de los alimentos ricos en metionina<sup>28</sup>. Aunque lo más probable es que la disminución de la homocisteína total se deba a diferencias en el estatus vitamínico, más que a los efectos directos de un superior consumo de metionina, hecho corroborado por la observación de que la elevación de la homocisteína total no es frecuente en sujetos con elevado consumo de carne<sup>29</sup>. En los vegetarianos se ha detectado elevación de las concentraciones de homocisteína total<sup>30</sup>.

3. Consumo de café. Fue uno de los determinantes del estilo de vida más fuertemente relacionado con la homocisteína total en el estudio Hordaland, donde se observa una marcada relación dosis-respuesta entre la homocisteína total y el consumo de café<sup>21</sup>. Los sujetos que consumían más de 6 tazas de café al día presentaron concentraciones de homocisteína total 2-3  $\mu\text{mol/l}$  más altas que los que no las tomaban. Incluso en algunos trabajos se ha demostrado que el procesamiento del café también puede influir en las concentraciones de homocisteína<sup>31</sup>.

4. Tabaco. La concentración de homocisteína total es superior en los fumadores que en los no fumadores<sup>32</sup>, y se observa una fuerte relación dosis-respuesta entre el número de cigarrillos y la homocisteína total, independiente de la edad y el sexo. Entre las diversas causas que podrían explicar este efecto están: el consumo de una dieta menos sana, con más grasa y menos vegetales que los no fumadores<sup>33</sup> y la producción, al fumar tabaco, de abundantes radicales libres que originan un estrés oxidativo que afecta al estatus redox de los tioles<sup>34</sup>, entre los que se incluye la homocisteína total.

5. Ejercicio físico. El ejercicio parece reducir la homocisteína total. En el estudio Hordaland, su

práctica fue un determinante débil pero significativo de la homocisteína total<sup>21</sup>.

6. Alcohol. El consumo crónico de bebidas alcohólicas se asocia con la elevación de la homocisteína total. En contraste, un consumo moderado parece asociarse con concentraciones inferiores<sup>35</sup>. El tipo de bebida consumida también influye en la homocisteína total. Al comparar una ingesta de 40 g de alcohol/día con la ingesta libre de agua, se observa un aumento de la concentración de homocisteína total de un 8% si lo que se consume es vino tinto y de un 9% si son licores. En cambio, nuestro grupo ha demostrado que el consumo de cerveza en diabéticos se correlaciona con una disminución de las concentraciones de homocisteína circulante<sup>36,37</sup>.

### Fármacos

Numerosos fármacos influyen en la concentración de la homocisteína total. El mecanismo implicado, en la mayoría de ellos, es la interferencia con alguna de las etapas del metabolismo de la homocisteína. Se diferencian:

1. Medicamentos que conducen a la elevación de la homocisteína:

– Metotrexato. Antagonista del folato, inhibe la dihidrofolato reductasa y depleciona las células de folatos reducidos. Este efecto se puede revertir con altas dosis de ácido fólico.

– Óxido nitroso. Por su efecto antagonista de la vitamina B<sub>12</sub> e inhibidor de la MS, eleva la concentración de la homocisteína.

– Ciclosporina. Inmunosupresor que ocasiona elevaciones moderadas de la homocisteína total.

– Fármacos que interfieren en la absorción del ácido fólico y la vitamina B<sub>12</sub>, como la metformina y el omeprazol.

– Anticonvulsivos. Interfieren en el metabolismo del folato.

– Fármacos que interfieren con la función de la vitamina B<sub>6</sub> por un mecanismo común que implica la inhibición de la piridoxal cinasa, la niacina, la azarabina y la teofilina.

– Fenofibrato, al intervenir en el metabolismo del folato.

2. Fármacos que disminuyen la concentración de homocisteína:

– Tamoxifeno y algunos anticonceptivos orales.

– Aminotioles (penicilamina, acetilcisteína e ifosfamida/mesna), al aumentar el aclaramiento renal o por desplazar a la homocisteína de sus sitios de unión a proteínas, reducen la homocisteína.

### Determinantes relativos a la obtención de la muestra

La determinación de homocisteína se realiza en plasma (tabla 2). La muestra de sangre empleada para su obtención se recoge en tubos con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) que deben conservarse en hielo has-

ta el momento de su centrifugación a 4 °C, proceso que no se debe demorar más de 1 h desde el momento de la extracción. El motivo que obliga a tomar estas medidas es la liberación, el tiempo y la temperatura dependiente de la homocisteína de las células sanguíneas, después de la toma de la muestra que origina una elevación artificial a temperatura ambiente de la concentración de homocisteína total de un 15-20% por hora<sup>38</sup>. Este artefacto se previene manteni-endo la sangre total en hielo o adicionando un estabilizador como el fluoruro sódico o el citrato. Una vez separado el plasma de las células, la concentración de homocisteína total en plasma es estable al menos 4 días a temperatura ambiente, 2 semanas a 0-2 °C y meses o años a -20 °C.

Se recomienda que el sujeto esté en ayunas para la toma de la muestra, pero no hay motivo para tal. Sería más importante tener en cuenta el tiempo transcurrido desde la ingesta de la última comida rica en proteínas, por ello se recomienda una cena ligera la noche anterior a la extracción, que debe tener lugar no más de 3 h después de un desayuno continental normal y antes de la comida<sup>39</sup>.

En principio, cabe esperar que la ingesta de alimentos que contengan el aminoácido esencial metionina eleven la homocisteína total. Diversos estudios se han llevado a cabo con el fin de valorar la influencia de la ingesta sobre la concentración de homocisteína total:

– Influencia del desayuno: la homocisteína total disminuye 2-3 h después de un desayuno con una concentración de proteínas normal/alta, entre 15-32 g de proteínas<sup>26</sup>.

– Influencia de la cena: tras una ingesta de unos 50 g de proteínas la homocisteína comienza a aumentar lentamente a partir de las 3 h postingesta, y se observa un máximo a las 6-8 h, sin que a la mañana siguiente los valores consigan llegar a los previos a la cena.

De estos estudios, se deduce que la homocisteína total se elimina lentamente del plasma con una semivida de 3-4 h. Esta observación predice su elevación plasmática durante las 12-20 h posteriores a una comida rica en proteínas<sup>26</sup>. La disminución observada tras el desayuno parece que podría atribuirse a la eliminación de la homocisteína total plasmática derivada de la cena rica en proteínas de la noche anterior.

La postura del sujeto durante la extracción de la muestra debe tenerse en cuenta, porque la concentración de albúmina, proteína que une la mayor parte de la homocisteína en el plasma, es menor al estar recostado que en posición supina. En diversos estudios realizados en sujetos sanos, se observa, tras la permanencia de los sujetos durante 30 min en posición horizontal, reducciones en la homocisteína total entre el 6,3 y el 19%<sup>40</sup>.

En resumen, ante un nuevo factor de riesgo cardiovascular, como la homocisteína, es necesario tener en cuenta todos los determinantes genéticos y ambientales que pueden influir en sus concentraciones para evitar errores de interpretación y falsas asociaciones estadísticas (interacción y confusión).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990;1:228-37.
2. Ueland PM. Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem* 1995;41:340-2.
3. Mansoor MA, Svardal AM, Schneede J, Ueland PM. Dynamic relation between reduced, oxidized, and protein-bound homocysteine and other thiol components in plasma during methionine loading in healthy men. *Clin Chem* 1992;38:1316-21.
4. Refsum H, Helland S, Ueland PM. Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin Chem* 1985;31:624-8.
5. Mato JM, Álvarez L, Ortiz P, Pajares MA. S-Adenosylmethionine synthesis: molecular mechanism and clinical implications. *Pharmacol Ther* 1997;73:265-80.
6. Kang S-S, Wong PWK, Malinow MR. Hyperhomocystein(e)mia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Ann Rev Nutr* 1992;12:279-98.
7. Nygård O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, et al. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* 1995;274:1526-33.
8. Wollesen F, Brattstrom L, Refsum H, Ueland PM, Berglund L, Berne C. Plasma total homocysteine and cysteine in relation to glomerular filtration rate in diabetes mellitus. *Kidney Int* 1999;55:1028-35.
9. Ubbink JB. Should all elderly people receive folate supplements? *Drugs Aging* 1998;13:415-20.
10. Carmel R. Cobalamin, the stomach, and aging. *Am J Clin Nutr* 1997;66:750-9.
11. Brattstrom L, Lindgren A, Israelsson B, Andersson A, Hultberg B. Homocysteine and cysteine: determinants of plasma levels in middle-aged and elderly subjects. *J Intern Med* 1994;236:633-41.
12. Andersson A, Isaksson A, Hultberg B. Homocysteine export from erythrocytes and its implication from plasma sampling. *Clin Chem* 1992;38:1311-5.
13. Carmel R, Green R, Jacobsen DW, Rasmussen K, Florea M, Azen C. Serum cobalamin, homocysteine, and methylmalonic acid concentrations in a multiethnic elderly population: ethnic and sex differences in cobalamin and metabolite abnormalities. *Am J Clin Nutr* 1999;70:904-10.
14. Ubbink JB, Vermaak WJ, Van der Merwe A, Beckr PJ. The effect of blood sample aging and food consumption on plasma total homocysteine levels. *Clin Chem Acta* 1992;207:119-28.
15. Refsum H, Ueland PM, Nygård O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998;49:31-62.
16. Van der Moren MJ. Homocysteine: influences of menopausal status and postmenopausal hormone replacement therapy. *Neth J Med* 1998;52S:44.
17. Mijatovic V, Netelenbos C, Van der Mooren MJ, De Valk-de Roo GW, Jakobs C, Kenemans P. A randomized controlled study of the effects of 17- $\beta$ -estradiol-dydrogesterone on plasma homocysteine in postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 1998;91:432-6.
18. Hegele RA, Tully C, Young TK, Connelly PW. V677 mutation of methylenetetrahydrofolate reductase and cardiovascular disease in Canadian Inuit. *Lancet* 1997;349:1221-2.
19. Franco RF, Araujo AG, Guerreiro JF, Elion J, Zago MA. Analysis of the 677 C $\rightarrow$ T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. *Thromb Haemost* 1998;79:119-21.
20. Hiroyuki M. Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as risk factor for coronary artery disease. *Circulation* 1997;95:2032-6.
21. Nygård O, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 1998;67:263-70.
22. Ubbink JB, Van der Merwe A, Delport R, Allen RH, Stabler SP, Riezier R, et al. The effect of a subnormal vitamin B<sub>6</sub> status on homocysteine metabolism. *J Clin Invest* 1996;98:177-84.
23. Nagata C, Shimizu H, Takami R, Hayashi M, Takeda N, Yasuda K. Soy product intake is inversely associated with serum homocysteine level in premenopausal Japanese women. *J Nutr* 2003;133:797-800.
24. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA* 1997;277:1775-81.
25. Ganji V, Kafai MR. Third National Health and Nutrition Examination Survey. Demographic, health, lifestyle, and blood vitamin determinants of serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Clin Nutr* 2003;77:826-33.
26. Guttormsen AB, Schneede J, Fiskerstrand T. Plasma concentrations of homocysteine and other aminothiols are related to food intake in healthy human subjects. *J Nutr* 1994;124:1934-41.
27. Den Heijer M, Bos GM, Brouwer IA, Gerrits WB, Blom HJ. Variability of the methionine loading test: no effect of a low protein diet. *Ann Clin Biochem* 1996;33:551-4.
28. Stolzenberg-Solomon RZ, Miller ER 3rd, Maguire MG, Selhub J, Appel LJ. Association of dietary protein intake and coffee consumption with serum homocysteine concentrations in an older population. *Am J Clin Nutr* 1999;69:467-75.
29. Mann J, Dudman N, Guo XW, Clarke P, Mann J, Simpson JF, et al. The effect of diet on homocysteine levels in healthy male subjects. *Neth J Med* 1998;52:S10.
30. Herrmann W, Schorr H, Obeid R, Geisel J. Vitamin B<sub>12</sub> status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. *Am J Clin Nutr* 2003;78:131-6.
31. Verhoef P, Pasman WJ, Van Vliet T, Urgert R, Katan MB. Contribution of caffeine to the homocysteine-raising effect of coffee: a randomized controlled trial in humans. *Am J Clin Nutr* 2002;76:1244-8.
32. Bergmark C, Mansoor MA, Swedenborg J, De Faire U, Svardal AM, Ueland PM. Hyperhomocysteinemia in patients operated for lower extremity ischaemia below the age of 50- effect of smoking and extent of disease. *Eur J Vasc Surg* 1993;7:391-6.
33. Preston AM. Cigarette smoking-nutritional implications. *Prog Food Nutr Sci* 1991;15:183-217.
34. Eiserich JP, Van der Vliet A, Handelman GJ, Halliwell B, Cross CE. Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage: a complex interaction. *Am J Clin Nutr* 1995;62:S1490-500.
35. Vollset SE, Nygård O, Kvåle G, et al. The Hordaland Homocysteine Study lifestyle and total plasma homocysteine in Western Norway. En: Graham I, Refsum H, Rosenberg IH, Ueland PM, editors. Homocysteine metabolism: from basic science to clinical medicine. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1997; p. 177-82.
36. De Luis DA, Fernandez N, Aller R, Arranz M, Izaola O. Relation between total homocysteine levels and beer consumption in diabetics type 2 patients. *Annals of Nutrition* 2003;47:119-23.
37. Mennen LI, De Courcy GP, Guillard JC, Ducros V, Zarebska M, Bertrais S, et al. Relation between homocysteine concentrations and the consumption of different types of alcoholic beverages: the French Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals Study. *Am J Clin Nutr* 2003;78:334-8.
38. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, et al. Total homocysteine in plasma or serum. Methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993;39:1764-79.
39. Refsum H, Fiskerstrand T, Guttormsen AB, Ueland PM. Assessment of homocysteine status. *J Inher Metab Dis* 1997;20:286-94.
40. Rasmussen K, Møller J, Lyngbak M. Withinperson variation of plasma homocysteine and effects of posture and tourniquet application. *Clin Chem* 1999;45:1850-5.