

Servicio de Laboratorio Clínico. Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”. La Habana

SOBRE LOS VALORES DE REFERENCIA DE LA HOMOCISTEÍNA SÉRICA EN INDIVIDUOS CON BAJO RIESGO ATEROESCLERÓTICO

Raiko Yasser Alfonso Font^{1†}, Reinaldo Denis de Armas^{2†}, Sergio Santana Porbén^{3‡}.

RESUMEN

Justificación: La homocisteína (Hcy) sérica ha cobrado importancia como indicador de riesgo cardiovascular (RCV). La correcta interpretación del RCV en un sujeto cualquiera depende de la contrastación de los valores obtenidos de Hcy con los esperados en la población de pertenencia. En Cuba no se cuenta con intervalos de referencia (IR) propios de Hcy, por lo que se apela al uso de estándares foráneos.

Objetivo: Establecer los intervalos de referencia de Hcy para sujetos cubanos con un riesgo aterosclerótico disminuido. **Locación de estudio:** Servicio de Laboratorio Clínico, Hospital Clínico-quirúrgico “Hermanos Ameijeiras” (La Habana, Cuba). **Serie de estudio:** Doscientas ochenta y un sujetos, donantes de sangre (Hombres: 56.6%; Edad promedio: 27.3 ± 10.3 años), atendidos en el Banco hospitalario de Sangre entre Julio del 2015 y Marzo del 2017. El bajo riesgo aterosclerótico se aseguró del interrogatorio sobre los antecedentes de salud, los tratamientos corrientes, y los estilos de vida. De cada paciente se extrajeron 20 mL de sangre venosa mediante punción antecubital después de una noche de ayunas. La Hcy se determinó en las muestras resultantes de suero mediante un método enzimático automatizado. **Métodos:** Se construyeron los intervalos de referencia (IR) al 95% para los valores originarios (“IR ingenuos”) y logaritmizados (“IR logaritmizados”) de Hcy. También se construyeron los IR al 95% para los valores de Hcy obtenidos mediante la transformación Box-Cox (“IR BoxCox”). El ajuste de los valores obtenidos de Hcy en cada paso a la distribución normal se evaluó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov (KS).

Resultados: Los valores promedio de la Hcy fueron 7.4 ± 3.3 μmol.L⁻¹ (Mínimo: 1.7 μmol.L⁻¹ vs. Máximo: 18.4 μmol.L⁻¹). Los valores de Hcy fueron independientes del sexo del sujeto: Hombres: 7.1 ± 3.3 μmol.L⁻¹ vs. Mujeres: 7.7 ± 3.3 μmol.L⁻¹ (Δ = +0.6; t-Student = 1.57; p > 0.05). Los valores de Hcy disminuyeron con la edad del sujeto (r² = 0.2386; p < 0.05). Los IR al 95% quedaron como sigue: “Ingenuos”: 0.9 – 14.9 μmol.L⁻¹ (Z_{KS} = 2.092; p < 0.05); “Logaritmizados”: 2.7 – 16.6 μmol.L⁻¹ (Z_{KS} = 0.950; p > 0.05); y “BoxCox”: 1.6 – 15.6 μmol.L⁻¹ (Z_{KS} = 1.061; p < 0.05); respectivamente. Los IR al 95% no paramétricos de la Hcy (basados en los percentiles de la serie ordenada de las observaciones originales) quedaron como 2.7 – 14.7 μmol.L⁻¹. **Conclusiones:** La no-normalidad de los datos originarios de la Hcy debe tenerse en cuenta para la construcción de IR al 95% que sean adecuados para la evaluación del RCV presente en el sujeto. **Alfonso Font RY, De Armas RD, Santana Porbén S. Sobre los valores de referencia de la homocisteína sérica en individuos con bajo riesgo aterosclerótico. RCAN Rev Cubana Aliment Nutr 2018;28(2):487-498. RNPS: 2221. ISSN: 1561-2929.**

Palabras clave: Homocisteína sérica / Aterosclerosis / Arteriosclerosis / Riesgo cardiovascular.

¹ Médico, Especialista de Primer Grado en Medicina General Integral. Especialista de Primer Grado en Laboratorio Clínico. ² Médico, Especialista de Segundo Grado en Laboratorio Clínico. Máster en Ciencias en el Laboratorio Clínico. Profesor Auxiliar. ³ Médico, Especialista de Segundo Grado en Bioquímica Clínica. Máster en Nutrición en Salud Pública. Profesor Asistente.

[†] Servicio de Laboratorio Clínico. Hospital Clínico-quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”.

[‡] Servicio de Laboratorio Clínico. Hospital Pediátrico Docente “Juan Manuel Márquez”. Marianao. La Habana.

Recibido: 4 de Noviembre del 2018. Aceptado: 13 de Diciembre del 2018.

Raiko Yasser Alfonso Font. Servicio de Laboratorio Clínico. Hospital Clínico-quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”. San Lázaro 701 e/t Marqués González y Belascoaín. Centro Habana. La Habana. Cuba.

Correo electrónico: raiko.alfonso@infomed.sld.cu

INTRODUCCIÓN

La enfermedad cardiovascular (ECV) representa hoy la causa principal de muerte en todo el mundo.¹ El muestreo del sujeto con un riesgo cardiovascular (RCV) incrementado mediante indicadores bioquímicos establecidos como los lípidos sanguíneos podría servir para una intervención médico-farmacológica temprana.²⁻³ Sin embargo, el elevado riesgo de mortalidad que comporta la ECV no se ha podido explicar totalmente por factores tenidos antes como tradicionales como las dislipidemias, el tabaquismo, la Diabetes y la hipertensión arterial.⁴

En años recientes la homocisteína (Hcy) sérica ha emergido como un factor novedoso e independiente de RCV.⁵ La Hcy es un aminoácido sulfurado derivado del metabolismo de la metionina y la cisteína, rutas metabólicas a su vez dependientes de la vitamina B₁₂ y el ácido fólico.⁶ Los valores esperados de Hcy en la sangre de un sujeto se encuentran entre 4.6 – 8.1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.⁷ Los sujetos con edades ≥ 30 años tienden a presentar valores aumentados (aunque todavía preservados) de Hcy.⁷ Niveles séricos elevados (aunque sea levemente) de la Hcy se asocian con un incremento de la ocurrencia de eventos cardiovasculares agudos y de la mortalidad a causa de los mismos.⁸⁻⁹ El aumento de la Hcy en 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ por encima de los valores esperados equivale (en términos de RCV) a una elevación de 20 mg.dL^{-1} ($\equiv 0.5 \text{ mmol.L}^{-1}$) por encima de la cifra deseada de colesterol total de 5.2 mmol.L^{-1} . La hiperhomocisteinemia se asocia con estados protrombóticos y proinflamatorios, endotelitis, aumento de la adhesividad plaquetaria, y el aumento de la deposición de partículas LDL peroxidadas en el endotelio vascular.⁸⁻⁹ En base a todo lo anteriormente dicho, varios cuerpos de expertos han avanzado que, junto con los indicadores

tradicionales del RCV, sean determinados también los valores séricos de Hcy.

La interpretación del RCV basado en la determinación de Hcy sérica conlleva la construcción de los intervalos de referencia (IR) correspondientes que delimiten el comportamiento esperado de este metabolito. Establecida una cota máxima de la esperanza biológica, todo valor de Hcy que la supere apuntaría hacia un inminente daño aterosclerótico ante el que se hace necesario intervenir.¹⁰⁻¹¹ La calificación del RCV se haría ante estados moderados de hiperhomocisteinemia, esto es: cuando los valores séricos de Hcy superan los 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Sería deseable que el comportamiento de la Hcy sea atribuible a los mecanismos de síntesis, producción y liberación a la sangre de este metabolito en ausencia de cualquier enfermedad, o (por extensión) cualquier otra noxa como el tabaquismo, el alcoholismo, y el consumo de drogas. Sin embargo, y aún controladas estas influencias, todavía subsisten influencias derivadas de la población de pertenencia del sujeto. No se debe soslayar tampoco que en el comportamiento “natural” de un metabolito también intervienen características individuales como la edad, el sexo y los estilos de vida (la alimentación y la actividad física entre ellos).

Dicho todo lo anterior, se condujo este trabajo que tuvo como objetivo primario la construcción de un IR con una cobertura especificada para los valores de Hcy observados en sujetos con riesgo cardiovascular disminuido como los donantes de sangre.

MATERIAL Y MÉTODO

Locación del estudio: Servicio de Laboratorio Clínico, Hospital Clínico-quirúrgico “Hermanos Ameijeiras” (La Habana, Cuba).

Diseño del estudio: Prospectivo, analítico. El diseño del estudio incorporó las directrices emitidas por la Federación Internacional de Química Clínica para la construcción de IR.¹²

Serie de estudio: Fueron elegibles para ser incluidos en la serie de estudio los adultos de cualquier sexo, con edades entre 18 – 59 años, que acudieron al Banco hospitalario de Sangre en calidad de donantes de sangre, y en los que se aseguró un bajo riesgo aterosclerótico después de un interrogatorio donde se comprobaba la ausencia de antecedentes de enfermedades crónicas no transmisibles, la ausencia de hábitos tóxicos, y el no consumo de medicamento alguno que fuera capaz de elevar los niveles de Hcy en sangre.

Determinación de las concentraciones séricas de Hcy: De cada paciente se obtuvo una muestra de sangre venosa por punción antecubital después de una noche en ayunas. La extracción de sangre se hizo en condiciones controladas en el Servicio hospitalario de Laboratorio Clínico

Las muestras de sangre se centrifugaron inmediatamente para la separación de los elementos formes respecto de la fase líquida. El suero resultante se decantó cuidadosamente en tubos de plásticos convenientemente rotulados, y se conservó a -20°C hasta el momento de la determinación. La Hcy se determinó mediante un método enzimático¹³ de distribución comercial (CPM+, Italia) implementado en un autoanalizador InLab 300 (CPM+, Italia).

Procesamiento de los datos y análisis estadístico-matemático de los resultados: Los datos demográficos y bioquímicos de los sujetos incluidos en la serie de estudio fueron vaciados en los formularios previstos por la investigación, e ingresados en un contenedor digital construido con EXCEL para OFFICE de WINDOWS (Microsoft, Redmon, Virginia, Estados Unidos). Los valores de Hcy se redujeron hasta

estadígrafos de locación (media) y dispersión (desviación estándar), y se dispusieron en un histograma de frecuencia. El ajuste de la distribución empírica (léase también muestral) de los valores de Hcy a la distribución normal se hizo mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.¹⁴⁻¹⁵ El paquete SPSS (SPSS Inc., Estados Unidos) de gestión estadístico se empleó en los cálculos matemáticos y estadísticos.

Un intervalo de confianza (IC) con una cobertura del 95% para los valores promedio de Hcy se puede construir mediante la expresión:¹⁶

$$[a, b] = \bar{Hcy} \pm 1.96 * \sigma_{Hcy} \quad [1]$$

En la expresión anterior: a, b son las cotas inferior y superior, respectivamente, del IC al 95%. Por su parte, el número 1.96 se corresponde con el percentil de la distribución normal para el cual el área bajo la curva de la distribución constreñida entre las cotas a, b equivale (precisamente) al 95% del área total de la curva. Los términos \bar{Hcy} , σ_{Hcy} representan la media y la desviación estándar de la distribución empírica de los valores de Hcy. Asimismo, un IC (semiconservativo) al 95% que esté basado en los rangos de los valores de Hcy se compondría con las cotas que ocuparan los percentiles 2.5 – 97.5 de la serie ordenada de valores.

Consideraciones éticas: La conducción de la presente investigación fue aprobada por el Consejo científico y el Comité de Ética de la institución. Los sujetos fueron tratados de conformidad con los principios recogidos en la Declaración de Helsinki.¹⁷ Se obtuvo el consentimiento informado de cada uno de los sujetos mediante la firma de la correspondiente acta. Se mantuvo en el anonimato la identidad de los sujetos, y se procuró el cumplimiento de

los principios de beneficencia, no maleficencia, autonomía y equidad. Antes de la extracción de sangre, se le explicó a cada uno de ellos los beneficios y riesgos de cada uno de los procedimientos incluidos en el diseño experimental de la investigación, y se les informó el resultado de la determinación en el plazo de tiempo establecido para ello. Adicionalmente, se le explicó a cada sujeto que la no participación en la investigación, o el abandono de la misma cuando lo deseara, no implicaría merma en la calidad de la atención médica recibida.

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra los IC al 95% para los valores séricos de Hcy en sujetos donantes de sangre (*Hombres*: 56.6%; *Edad promedio*: 27.3 ± 10.3 años) con bajo riesgo aterosclerótico que han sido construidos mediante las estrategias estadísticas seguidas en este trabajo. Se hace notar que el IC al 95% “ingenuo” (esto es: asumiendo que la distribución empírica de los valores de Hcy se ajusta a una distribución normal) no contiene al valor de $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ recomendado en todas partes como punto de corte para calificar al sujeto en RCV aumentado.

La Figura 1 presenta el gráfico biprobabilístico de los valores “originarios” de Hcy, junto con el examen de los residuales del modelo ajustado. Se comprueba la falta de ajuste de los valores determinados de Hcy a la distribución gaussiana ($Z_{KS} = 2.092$; $p < 0.05$). La no-normalidad de los valores de Hcy inhabilita la utilidad del IC “ingenuo”.

La Figura 1 también refleja otro hallazgo preocupante: la distribución empírica de los valores originarios de Hcy es en realidad bimodal. El presente trabajo no se extendió para esclarecer las causas de la bimodalidad de la distribución empírica de los valores de Hcy. Los valores de Hcy fueron independientes del sexo del sujeto:

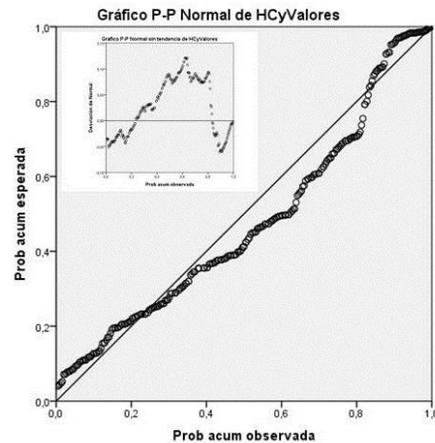
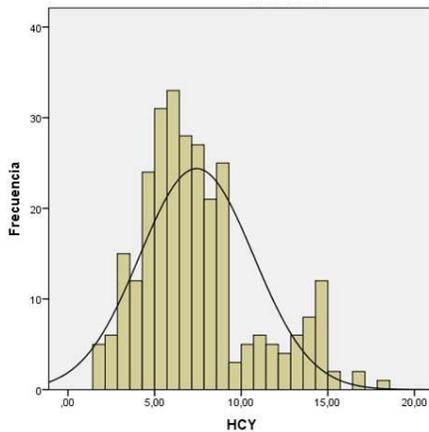
Hombres: $7.1 \pm 3.3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ vs. *Mujeres*: $7.7 \pm 3.3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ($\Delta = +0.6$; t-Student = 1.57; $p > 0.05$).

Tabla 1. Cotas de los intervalos de confianza al 95% para los valores de la homocisteína sérica en sujetos donantes de sangre con bajo riesgo aterosclerótico. Para más detalles: Consulte el texto del presente trabajo. Leyenda: IC: Intervalo de confianza.

Tratamiento estadístico	IC al 95%	
	Cota inferior	Cota superior
“Ingenuos”	0.9	14.9
Transformación logarítmica	2.7	16.6
Transformación Box-Cox	2.6	15.6
Percentiles	2.7	14.7

La Figura 2 muestra cómo cambian los valores de Hcy con la edad del sujeto: con cada incremento en la edad, la Hcy disminuye en 0.08 mmol.L^{-1} (Ecuación de regresión de mínimos cuadrados: $\text{Hcy} = 9.2582 - 0.0766 * \text{Edad}$ ($r^2 = 0.2386$; $p < 0.05$). Un sujeto de 18 años tendría como valor esperado $7.7 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Por el contrario, un sujeto de 60 años (igualmente con un riesgo aterosclerótico bajo) tendría $4.7 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (inferior en un 40% al observado en el sujeto joven). Luego, es probable que la distribución bimodal de los valores originarios de Hcy sea el resultado de la concurrencia en la misma serie de estudio de 2 subpoblaciones que difieren entre sí respecto de la edad. La primera de las subpoblaciones se correspondería con sujetos jóvenes (edades ≤ 35 años) que presentan valores de Hcy superiores a la media muestral (pero sin sobrepasar el punto de corte de $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$), mientras que, por el contrario, la segunda de las subpoblaciones estaría representada por sujetos adultos de mayor edad con valores de Hcy por debajo de la media muestral (datos no mostrados).

Figura 1. Distribución empírica de los valores de Hcy determinados en los sujetos donantes de sangre que fueron incluidos en la presente investigación. *Izquierda*: Histograma de frecuencias construido. Trazo continuo: Distribución normal anticipada para los estimados de la distribución empírica de la Hcy. $Z_{KS} = 2.092$ ($p < 0.05$). *Derecha*: Gráfico biprobabilístico. Se comprueba la desviación de la distribución empírica de los valores “originarios” de Hcy respecto de la distribución normal hipotetizada. Inserto: Examen de los residuales del modelo ajustado.



Fuente: Registros del estudio.
Tamaño de la serie: 281.

Se presenta ahora una disyuntiva: “producir” valores de referencia de Hcy para cada edad (o para distintos grupos etarios, por la misma razón); o remover la bimodalidad de la distribución empírica de Hcy mediante una transformación apropiada. La logaritmización de los valores originarios de Hcy siempre es una estrategia recomendada y redituable:¹⁸

$$y_i^\lambda = \log_e(y_i), \text{ para } \lambda = 0 \tag{2}$$

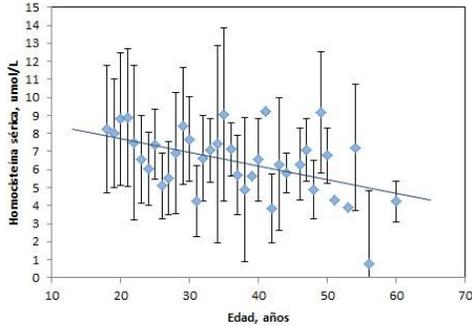
La Figura 3 muestra el gráfico biprobabilístico de los logaritmos naturales de los valores de Hcy. El valor del estadígrafo Z_{KS} es ahora de 0.950 ($p > 0.05$).

El nuevo IC al 95% se obtendría aplicando los anti-logaritmos como:

$$\begin{aligned} [a, b] &= [e^c, e^d] = \\ &= [e^{(1.91 - 1.96 \cdot 0.45)}, e^{(1.91 + 1.96 \cdot 0.45)}] = \\ &= [e^{1.03}, e^{2.81}] = \\ &= [2.7 - 16.6] \mu\text{mol.L}^{-1} \end{aligned} \tag{3}$$

Desafortunadamente, el punto de corte de $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para el diagnóstico de la hiperhomocisteinemia queda incluido dentro del nuevo IC al 95%, lo que afectaría la utilidad diagnóstica del mismo. Ello justificaría la búsqueda de otra estrategia de normalización de la distribución empírica de Hcy.

Figura 2. Influencia de la edad sobre el comportamiento de la Hcy en sujetos donantes de sangre con riesgo aterosclerótico disminuido.



Fuente: Registros del estudio.
Tamaño de la serie: 281.

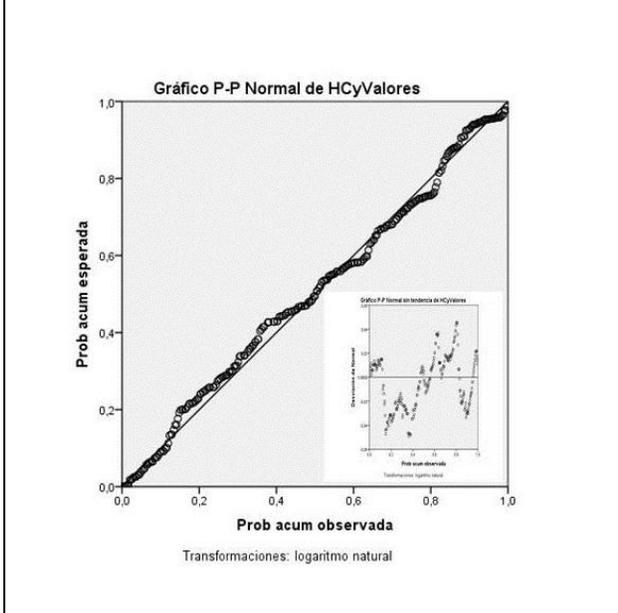
La transformación logarítmica es una de las varias incluidas dentro de la llamada transformación de Box-Cox:¹⁹

$$y_i^\lambda = \frac{(y_i^\lambda - 1)}{\lambda}, \text{ para } \lambda \neq 0 \quad [6]$$

Aunque el coeficiente λ puede asumir cualquier valor, el valor que finalmente adopte determinará la corrección de la asimetría de la distribución empírica de Hcy. Así, es posible generar una familia de valores λ , y encontrar aquel que se hace máximamente efectivo en la normalización de la variable de interés. La Figura 4 muestra la asimetría de la distribución empírica de los valores de Hcy como una función del coeficiente λ . La menor asimetría (*skewness* = -0.025) se obtuvo con un coeficiente $\lambda = 0.2$.

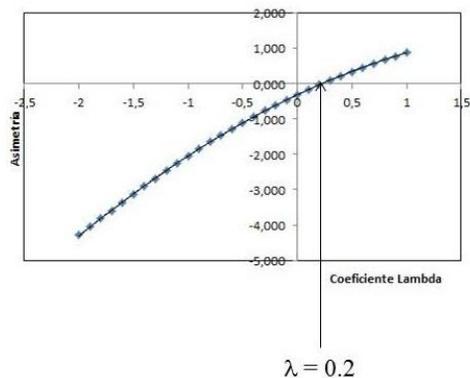
La Figura 5 muestra el gráfico biprobabilístico obtenido después de la transformación Box-Cox de la distribución empírica de Hcy. El valor del estadígrafo Z_{KS} fue de 1.061 ($p > 0.05$). El valor encontrado del coeficiente λ indica también que la transformación logarítmica no era la más efectiva (se hubiera anticipado que $\lambda = 0$) para la normalización de la distribución empírica de Hcy.

Figura 3. Gráfico biprobabilístico de la distribución empírica de los valores de homocisteína sérica después de transformación logarítmica. *Inserto:* Examen de los residuales del modelo ajustado.



Seleccionado el coeficiente λ , los valores originarios de Hcy se transformaron convenientemente, y el nuevo IC al 95% fue obtenido tras la reversión de la transformación Box-Cox. Se comprueba ahora que el punto de corte de $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ se ha convertido en la cota superior del IC al 95% para los valores de la Hcy en sujetos donantes de sangre con un bajo riesgo aterosclerótico.

Figura 4. Estrategia de selección del coeficiente λ requerida en la transformación Box-Cox de la distribución empírica de los valores de homocisteína sérica en sujetos donantes de sangre con un bajo riesgo de aterosclerosis.



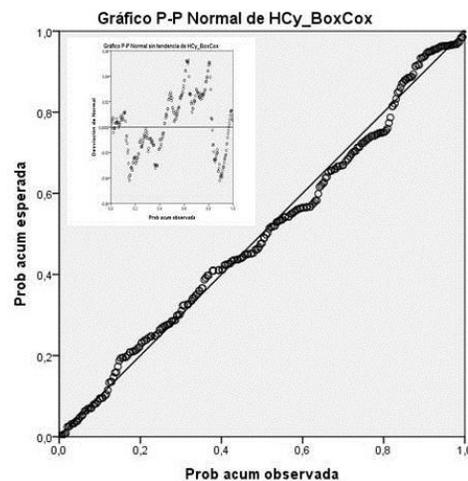
En la Tabla 1 se destaca el comportamiento de los IC al 95% construidos mediante una estrategia no paramétrica basada en los percentiles 2.5 y 97.5 de los valores de Hcy en una serie ordenada de forma creciente. Luego, siempre sería una estrategia costo-efectiva la obtención de IC al $100(1 - \alpha)$ no paramétricos para una variable de interés bioquímico, a fin de juzgar sobre las cotas del mismo en escenarios donde no siempre se puede asegurar la gaussianidad de las distribuciones empíricas.²⁰ Los IC no paramétricos funcionarían entonces como un chequeo numérico de las manipulaciones estadísticas que se emprendan después.²⁰

DISCUSIÓN

El problema de la construcción de un IR para un analito de interés ha sido discutido previamente para la creatinina urinaria y las variables espirométricas en sujetos cubanos.²¹⁻²³ La elaboración de

juicios diagnósticos sobre la condición de salud de un sujeto dado dependería (idealmente) de contar con valores del analito empleado como diagnóstico que no estén alterados por la enfermedad.²⁴⁻²⁵ Esta solución (casi) nunca está disponible para el médico, y debe apelarse entonces a poblaciones que compartan las características demográficas y epidemiológicas del sujeto en cuestión, en la esperanza de que el comportamiento del analito en la población muestreada sea congruente con un estado preservado de salud.

Figura 5. Gráfico biprobabilístico de la distribución empírica de los valores de homocisteína sérica después de transformación Box-Cox. *Inserto:* Examen de los residuales del modelo ajustado.



En este trabajo se ha apelado al comportamiento de la Hcy en una población de sujetos donantes de sangre, de los cuales se aseguró también que el riesgo aterosclerótico fuera bajo, para la construcción de los IR del analito. En ausencia de información anterior sobre el

comportamiento de la Hcy en sujetos adultos cubanos, se encontró que la distribución empírica de los valores encontrados del analito en esta subpoblación era bimodal, lo que sería el reflejo de influencias demográficas (e incluso culturales) actuando sobre la Hcy.²⁶ Estudios ulteriores deberían elucidar esta cuestión.

La bimodalidad de la distribución empírica de los valores de Hcy fue resuelta satisfactoriamente mediante una transformación Box-Cox, y el IC al 95% finalmente construido contiene los valores de Hcy comprendidos entre los 2.6 – 15.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, en congruencia con los resultados reportados para una población norteamericana con valores séricos reservados de la vitamina B12.²⁷ Como quiera que el estudio citado incluyó sujetos con edades ≥ 60 años, y en virtud del uso de la Hcy como un indicador de RCV en estas subpoblaciones, la cota superior del IC al 95% fue fijada en los 11.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ para los hombres, y 10.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ para las mujeres.²⁷

Adicionalmente, la eficiencia del IC “paramétrico” al 95% para la Hcy que se ha derivado en este trabajo fue comprobada después de la contrastación con el obtenido de forma no paramétrica recurriendo a los percentiles 2.5 y 97.5 de la serie ordenada de los valores originales; y la concordancia observada entre las cotas de ambos intervalos.

CONCLUSIONES

Un IC al 95% para la Hcy en sujetos adultos cubanos de cualquier sexo con bajo riesgo aterosclerótico obtenido tanto después de transformación Box-Cox de la distribución empírica de los valores obtenidos como los percentiles 2.5 y 97.5 de la misma, devolvió una cota superior de 15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$: congruente con lo anotado en la literatura internacional. Se espera que los IR propuestos en este ensayo sean útiles en el

reconocimiento del RCV de personas afectadas por enfermedades crónicas no transmisibles como la Diabetes mellitus, la hipertensión arterial y las dislipidemias.

Futuras extensiones

Investigaciones ulteriores deben documentar la efectividad del IC al 95% para la Hcy en la estimación del RCV en sujetos con enfermedades predisponentes. La documentación de la distribución de los valores de Hcy en subpoblaciones de alto RCV como la enfermedad renal crónica (ERC) también debería ser objeto de investigación. Igualmente, la efectividad del IC al 95% para la Hcy debería ser probada en enfermos que evolucionan después de sufrir una gran crisis aterosclerótica (GCA).

Paralelamente, se debería investigar el *status* sérico de las vitaminas que influyen sobre el comportamiento de la Hcy como el ácido fólico y la vitamina B₁₂. Si bien la determinación de las concentraciones séricas de estas vitaminas sería deseable, el *status* sérico de las mismas podría estimarse de los ingresos dietéticos de los sujetos examinados mediante encuestas de frecuencia de consumo de alimentos tenidos como fuentes de tales vitaminas.²⁸⁻²⁹

Limitaciones del estudio

El diseño del estudio limitó la edad del sujeto a aquellos menores de 60 años. Se han descrito valores elevados de Hcy en sujetos con edades ≥ 60 años con un *status* vitamínico preservado.³⁰ Investigaciones ulteriores deberían documentar el comportamiento de la Hcy en los adultos mayores y ancianos cubanos, habida cuenta que será en ellos donde se hará con mayor frecuencia la evaluación del RCV.

SUMMARY

Rationale: Serum homocystein (Hcy) has become important as a marker of cardiovascular risk (CVR). Correct interpretation of CVR in a given subject depends upon contrasting obtained Hcy values with those expected in the reference population. There are not Hcy reference values defined for Cuba, and use has to be made of foreign, imported standards. **Objective:** To establish the Hcy reference intervals for Cuban subjects with low atherosclerotic risk. **Study location:** Clinical Laboratory Service, "Hermanos Ameijeiras" Clinical Surgical Hospital (Havana City, Cuba). **Study serie:** Two-hundred and eighty-one blood donors (Males: 56.6%; Average age: 27.3 ± 10.3 years), assisted at the hospital Blood Bank between July 2015 and March 2017. Low atherosclerotic risk was assured by means of a questionnaire about health history, current medical treatments, and life styles. Twenty mL of venous blood were withdrawn from each subject by antecubital venipuncture after an overnight fasting. Hcy was determined in the sera resulting samples with an automatized enzymatic method. **Methods:** Ninety-five percent reference intervals (RI) for original ("naive IR") and logarithmically-transformed ("log IR") Hcy values were constructed. Ninety-five percent RI were also constructed for Hcy values obtained after BoxCox transformation ("BoxCox IR"). Fitting of Hcy values obtained in each step to the normal distribution was assessed by means of the Kolmogorov-Smirnov (KS) test. **Results:** Hcy average values were $7.4 \pm 3.3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Minimum: $1.7 \mu\text{mol.L}^{-1}$ vs. Maximum: $18.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Hcy values were sex-independent: Males: $7.1 \pm 3.3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ vs. Females: $7.7 \pm 3.3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ($\Delta = +0.6$; t -Student = 1.57; $p > 0.05$). Hcy values diminished with subject's age ($r^2 = 0.2386$; $p < 0.05$). Hcy 95% RI were as follows: "Naive IR": $0.9 - 14.9 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ($Z_{KS} = 2.092$; $p < 0.05$); "Log IR": $2.7 - 16.6 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ($Z_{KS} = 0.950$; $p > 0.05$); and "BoxCox IR": $1.6 - 15.6 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ($Z_{KS} = 1.061$; $p < 0.05$); respectively. Non-parametric 95% IR for Hcy (based upon percentiles of the ordered original values) were as $2.7 - 14.7 \mu\text{mol.L}^{-1}$. **Conclusions:** Non-normality of original Hcy data should be taken into account for the construction of 95% IR to be

adequate for assessing CVR present in a given subject. **Alfonso Font RY, De Armas RD, Santana Porbén S.** On the reference values for serum homocysteine in individuals with low atherosclerotic risk. *RCAN Rev Cubana Aliment Nutr* 2018;28(2):487-498. RNPS: 2221. ISSN: 1561-2929.

Subject headings: Serum homocysteine / Atherosclerosis / Arteriosclerosis / Cardiovascular risk.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mathers C, Stevens G, Hogan D, Mahanani WR, Ho J. Global and regional causes of death: Patterns and trends, 2000-15. En: Disease control priorities: Improving health and reducing Poverty [Editores: Jamison DT, Gelband H, Horton S, Jha P, Laxminarayan R, Mock CN, Nugent R]. Tercera Edición. The International Bank for Reconstruction and Development. The World Bank. Washington (DC): 2017. Capítulo 4.
2. Gaziano TA, Young CR, Fitzmaurice G, Atwood S, Gaziano JM. Laboratory-based versus non-laboratory-based method for assessment of cardiovascular disease risk: the NHANES I Follow-up Study cohort. *The Lancet* 2008;371(9616):923-31.
3. Cruz Gilarte Y. Sobre las asociaciones entre los lípidos séricos y el riesgo cardiovascular. *RCAN Rev Cubana Aliment Nutr* 2018;28:125-51.
4. Yeboah J, Young R, McClelland RL, Delaney JC, Polonsky TS, Dawood FZ, et al. Utility of nontraditional risk markers in atherosclerotic cardiovascular disease risk assessment. *J Am Coll Cardiol* 2016;67:139-47.
5. Chrysant SG, Chrysant GS. The current status of homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: A mini review. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2018;16:559-65.

6. Rosabal Nieves EL. Sobre el metabolismo de la homocisteína. Implicaciones para la nutrición. RCAN Rev Cubana Aliment Nutr 2016;26: 157-71.
7. 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;50:3-32.
8. Refsum H, Nurk E, Smith AD, Ueland PM, Gjesdal CG, Bjelland I; *et al.* The Hordaland Homocysteine Study: A community-based study of homocysteine, its determinants and associations with disease. J Nutr 2006;136(Suppl):S1731-S1740.
9. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: A meta-analysis. JAMA 2002;288:2015-22.
10. Cioni G, Marcucci R, Gori AM, Valente S, Giglioli C, Gensini GF, Abbate R, Boddi M. Increased homocysteine and lipoprotein(a) levels highlight systemic atherosclerotic burden in patients with a history of acute coronary syndromes. J Vasc Surg 2016 Jul;64:163-70.
11. Gensini GF, Comeglio M, Colella A. Classical risk factors and emerging elements in the risk profile for coronary artery disease. Eur Heart J 1998;19 (Suppl):A53-A61.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline. Tercera Edición. Wayne [Pennsylvania]: 2008.
13. 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;39:1764-79.
14. Kolmogorov A. Sulla determinazione empirica di una legge di distribuzione. G Inst Ital Attuari 1933;4:83.
15. Smirnov NV. Tables for estimating the goodness of fit of empirical distributions. Ann Math Stat 1948;19:279.
16. Horn PS, Pesce AJ. Reference intervals: An update. Clin Chimica Acta 2003;334: 5-23.
17. World Medical Association. Declaration of Helsinki on the ethical principles for medical research involving human subjects. Eur J Emergency Med 2001;8: 221-3.
18. Manning WG, Mullahy J. Estimating log models: To transform or not to transform? J Health Econom 2001;20: 461-94.
19. Box GEP, Cox DR. An analysis of transformations. J Roy Stat Soc B Series 1964;26:211-34.
20. Efron B. Nonparametric standard errors and confidence intervals. Canad J Stat 1981;9:139-58.
21. Barreto Penié J, Santana Porbén S, Consuegra Silverio D. Intervalos de referencia locales para la excreción urinaria de creatinina en una población adulta. Nutrición Hospitalaria [España] 2003;18:65-75.
22. Santana Porbén S. Valores locales de referencia para la excreción urinaria de creatinina: Una actualización. RCAN Rev Cubana Aliment Nutr 2014;24: 220-30.
23. Álvarez-Porbén S, González-Marrero A, Valdivieso-Valdivieso JP, Santana-Porbén S. Valores de referencia de las variables espirométricas en trabajadores cubanos supuestamente sanos. Rev Fac Med [Colombia: Bogotá] 2018;66: 179-85.
24. Geffré A, Friedrichs K, Harr K, Concordet D, Trumel C, Braun JP. Reference values: A review. Vet Clin Pathol 2009;38:288-98.
25. Fraser GG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. Crit Rev Clin Lab Sci 1989;27:409-37.

26. Rossi E, Beilby JP, McQuillan BM, Hung J. Biological variability and reference intervals for total plasma homocysteine. *Ann Clin Biochem* 1999; 36:56-61.
27. Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, Rogers G, Bowman BA, Gunter EW; *et al.* Serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey (1991 – 1994): Population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentrations. *Ann Intern Med* 1999; 131:331-9.
28. Green TJ, Allen OB, O'Connor DL. A three-day weighed food record and a semiquantitative food-frequency questionnaire are valid measures for assessing the folate and vitamin B-12 intakes of women aged 16 to 19 years. *J Nutr* 1998;128:1665-71.
29. Johansson I, Van BG, Hultdin J, Johansson M, Hallmans G, Stattin P. Validity of food frequency questionnaire estimated intakes of folate and other B vitamins in a region without folic acid fortification. *Eur J Clin Nutr* 2010;64: 905-13.
30. Brattström 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.

ANEXOS

Anexo 1. Formulario de recolección de los datos del sujeto donante de sangre que participó en la investigación reseñada en este estudio.

**HOSPITAL CLÍNICO QUIRÚRGICO “HERMANOS AMEIJERAS”
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA
PLANILLA DIAGNÓSTICA DEL ADULTO SANO**

No: _____

DATOS GENERALES DEL PACIENTE

Nombre del Paciente: _____ CI: _____

Dirección: _____

Teléfonos de localización: _____

Sexo: Masculino Femenino Color de la piel: Blanca Negra Mestiza Edad: 20 – 24 25 – 29 30 – 39 40 – 49 50 – 55 **Hábitos tóxicos:**Tabaco: Sí No Alcohol: Sí No Café: Menos de 2 tazas diarias Más de 2 tazas diarias

APP: _____

APF: _____

¿Gestante?: Sí No ¿Trasplantado?: Sí No

¿Ha recibido tratamiento en el último mes con? (Seleccione las correspondientes)

Metotrexate: Sí No Teofilina Sí No Tiacidas: Sí No Antiretrovirales: Sí No Ciclosporinas: Sí No Fenitoína: Sí No Anticonceptivos orales: Sí No Colestipol / Colestiraminas: Sí No Ácido nicotínico: Sí No Azatioprina: Sí No ¿Tiene un diagnóstico hecho de Enfermedad Vasculat Oclusiva?: Sí No **Examen físico**General: Normal Anormal Abdomen: Normal Anormal Sistema Respiratorio: Normal Anormal Sistema Cardiovascular: Normal Anormal Sistema Genitourinario: Normal Anormal Sistema Nervioso: Normal Anormal Homocisteína sérica: _____ μ moles/L**Otros exámenes complementarios:**

Hemoglobina: _____ Normal: 110 – 180 g/L

Leucograma: _____ Normal: 4 – 10 x 10⁹/L

Glicemia: _____ Normal: 3.6 – 6.1 mmol/L

Creatinina: _____ Normal: 47 – 113 μ mol/L

Colesterol: _____ Normal: 3.6 – 6.2 mmol/L

Triglicéridos: _____ Normal: 0.5 – 1.85 mmol/L

ALAT: _____ Normal: 0 – 40 U/L

ASAT: _____ Normal: 0 – 40 U/L