



Prevalencia de hiperhomocisteinemia en un grupo de pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 en el estado de Yucatán, México

Carlos J Castro Sansores,* Dora M Lara Perera,** Francisco Solís Rodríguez**

RESUMEN

Antecedentes: las enfermedades cardiovasculares son algunas de las primeras causas de mortalidad en nuestro país. Los pacientes diabéticos tienen mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. El proceso responsable de las enfermedades cardiovasculares involucra a múltiples factores, entre ellos a la homocisteína.

Objetivo: determinar la prevalencia de hiperhomocisteinemia en un grupo de pacientes diabéticos y compararlo con un grupo sin diabetes.

Método: estudio transversal, prospectivo, de tipo casos y controles. A cada paciente se le determinaron los valores del perfil de lípidos, glucosa, creatinina y homocisteína. Se determinó la prevalencia de hiperhomocisteinemia en cada grupo y su asociación con las variables estudiadas.

Resultados: se estudiaron 98 sujetos, 50 pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 y 48 controles sanos pareados de acuerdo con edad y género. Los valores de homocisteína fueron mayores en el grupo control que en el grupo de pacientes diabéticos (9.8 vs 8.7 $\mu\text{mol/L}$, $p=0.4$). La homocisteína se relacionó de manera significativa con las concentraciones de creatinina sérica ($p=0.01$).

Conclusiones: la prevalencia de hiperhomocisteinemia en el grupo de diabéticos fue del 22%, factores diversos pudieron haber influido en este resultado. La hiperhomocisteinemia guardó correlación con el grado de función renal.

Palabras clave: homocisteína, hiperhomocisteinemia, diabetes, función renal.

ABSTRACT

Background: The cardiovascular diseases are the first cause of mortality in our country. The diabetic patients have increased the risk of cardiovascular disease. The process responsible for the cardiovascular disease involves multiple factors among them the homocysteine. The aim of this study was to determine the prevalence of hyperhomocysteinemia in a group of diabetic patients and to compare with a group of non-diabetic patients.

Methods: A case-control study was made. To each patient lipid profile, glucose, creatinine and homocysteine were determined. The prevalence of hyperhomocysteinemia in each group was determined and the variables associated to hyperhomocysteinemia were determined.

Results: We studied to 98 subjects, 50 diabetic patients and 48 controls paired according to age and gender. The values of homocysteine were majors in the group control that enters the group of diabetic patients (9,8 versus 8,7 $\mu\text{mol/L}$, $p=0.4$). The Hhcy was related with the creatinine levels ($p=0.01$).

Conclusions: The prevalence of hyperhomocysteinemia in the group of diabetics was of 22%. The presence of hyperhomocysteinemia kept correlation with the degree of renal function.

Key words: homocysteine, hyperhomocysteinemia, diabetes, renal function.

* Laboratorio de Enfermedades Crónico-Degenerativas, Unidad Interinstitucional de Investigación Clínica y Epidemiológica, Facultad de Medicina.

** Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, Universidad Autónoma de Yucatán.

Correspondencia: Dr. Carlos J Castro Sansores. Laboratorio de Enfermedades Crónico Degenerativas, Unidad Interinstitucional de Investigación Clínica y Epidemiológica, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Yucatán. Av Itzaes 498 por 59-A y 59,

Mérida 97000, Yucatán, México. Correo electrónico: castros@uady.mx ó ccastrosansores@gmail.com
Recibido: enero, 2010. Aceptado: marzo, 2010.

Este artículo debe citarse como: Castro-Sansores CJ, Lara-Perera DM, Solís-Rodríguez F. Prevalencia de hiperhomocisteinemia en un grupo de pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 en el estado de Yucatán, México. Med Int Mex 2010;26(3):207-212.

www.nietoeditores.com.mx

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados. La prevención primaria y el tratamiento consumen una importante proporción de recursos. El proceso responsable de estas enfermedades es común (la aterosclerosis) pero sus factores desencadenantes son múltiples y sus manifestaciones clínicas pueden ser diferentes, dependiendo del territorio vascular afectado.^{1,2}

La aterosclerosis juega un papel central en tres de las primeras cinco causas de mortalidad en México.³ Se trata de un proceso multifactorial causado por condiciones que dañan el endotelio vascular en forma crónica y existen factores de riesgo cardiovascular reconocidos en múltiples estudios *in vitro*, epidemiológicos y clínicos que contribuyen de manera sustancial a su desarrollo; las dislipidemias son las que tradicionalmente se han identificado como la principal causa de la aterosclerosis. Sin embargo, el proceso de aterosclerosis va más allá de las alteraciones de los ácidos grasos. Este proceso es multifactorial con intervención de diversos mecanismos, como la inflamación, la proliferación endotelial y las alteraciones de la hemostasia.⁴

Entre esta variabilidad de factores, la homocisteína se ha asociado con las enfermedades vasculares, proponiéndose para este aminoácido un papel en la causa de las lesiones ateroscleróticas.⁵

Múltiples estudios han demostrado la relación entre la hiperhomocisteinemia y la aterotrombosis. En el Estudio de Salud de los Médicos, con casi 15,000 médicos varones sin antecedentes aterotrombóticos conocidos, que fueron seguidos durante cinco años, se determinaron de manera inicial sus concentraciones de homocisteína. Se encontró que los médicos con valores de homocisteína por arriba del límite superior normal tuvieron tres veces más riesgo de sufrir un infarto del miocardio que quienes tuvieron concentraciones de homocisteína por debajo del rango normal, aun después de corregir otros factores de riesgo.⁶ En el estudio de Aksoy se midieron los valores de homocisteína en 700 pacientes con aterotrombosis y 800 sujetos normales, y se encontró que los valores de homocisteína en los primeros fueron estadísticamente superiores que en los controlados (11.25 $\mu\text{mol/L}$ vs 9.73 $\mu\text{mol/L}$, $p < 0.001$).⁷

Algunos estudios experimentales sugieren que el daño aterotrombótico atribuido a la hiperhomocisteinemia está mediado por la disfunción endotelial y la posterior

activación plaquetaria y formación del trombo. La hiperhomocisteinemia puede condicionar esta disfunción a través de varios mecanismos. Se ha propuesto que la hiperhomocisteinemia expone la matriz subendotelial, lo cual permite la activación plaquetaria.⁸ Celermajer demostró una disfunción en la vasodilatación mediada por el endotelio⁹ y Van den Berg señaló un daño en la función anticoagulante endotelial.¹⁰ Aunque aún no se conoce el mecanismo con exactitud, se cree que la homocisteína ejerce su efecto nocivo a través del daño oxidativo, ya que a concentración plasmática es auto-oxidada, produce peróxido y superóxido de hidrógeno, los cuales condicionan el daño vascular.¹¹

La diabetes mellitus tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares son las principales causas de mortalidad en nuestro país.³ Nos propusimos analizar cuál es la prevalencia de homocisteinemia en un grupo de pacientes adultos con diabetes mellitus tipo 2 en nuestra región y qué factores están asociados con ella.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio transversal, prospectivo, de tipo casos y controles efectuado en pacientes adultos de uno u otro género, con diagnóstico establecido de diabetes mellitus tipo 2 provenientes del Laboratorio de Enfermedades Crónicas Degenerativas de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Yucatán y de la consulta externa de Medicina Interna del Hospital Regional Mérida del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE). La determinación de homocisteinemia se realizó en el Área de Apoyo al Diagnóstico Clínico del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, de la Universidad Autónoma de Yucatán. Los valores obtenidos en los pacientes diabéticos se compararon con los de un grupo de sujetos sanos (por historia médica y análisis de laboratorio) sin diabetes mellitus tipo 2, que acudieron al Área de Apoyo al Diagnóstico Clínico del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, de la Universidad Autónoma de Yucatán para estudios de rutina.

A cada paciente se le aplicó un cuestionario en donde se recabaron sus datos clínico-epidemiológicos (edad, género, tiempo con diabetes mellitus tipo 2, tabaquismo, actividad física, tiempo a la semana de la actividad física, antecedentes de algún evento aterotrombótico [enfermedad vascular cerebral, infarto agudo del miocardio, trombo-

sis periférica]. También se recabaron de sus respectivos expedientes clínicos sus resultados más recientes de laboratorio (no más de un mes) (glucosa en ayunas, colesterol total, triglicéridos, C-LDL, C-HDL, creatinina sérica) y se calculó la depuración de creatinina sérica mediante la fórmula de Cockcroft-Gault.¹² Al grupo control se le aplicó un cuestionario en el que se recabaron datos de: edad, género, tabaquismo, actividad física, tiempo a la semana de la actividad física, antecedentes de algún evento aterotrombótico [enfermedad vascular cerebral, infarto agudo del miocardio, trombosis periférica], se les determinaron sus concentraciones de glucosa en ayunas, colesterol total, triglicéridos, C-LDL, C-HDL, creatinina sérica y se calculó la depuración de creatinina sérica mediante la fórmula de Cockcroft-Gault. Se excluyeron del grupo control y del de los pacientes quienes estaban recibiendo tratamiento con hipolipemiantes del tipo de los fibratos o complementos nutricionales que contuvieran ácido fólico, o multivitamínicos.

La determinación de homocisteinemia en ambos grupos se realizó mediante venopunción periférica para obtener una muestra sanguínea de 6 mL y de ésta se obtuvo el suero mediante la inducción de la retracción del coágulo a 37°C durante 15 minutos y por centrifugación a 800 G durante 10 minutos. La determinación se realizó mediante inmunoensayo con el equipo IMx Homocysteine (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA). Un valor de corte de homocisteína mayor de 12 $\mu\text{mol/L}$ se consideró hiperhomocisteinemia de acuerdo con lo establecido por la American Heart Association.¹³

Aspectos éticos. Todos los participantes fueron debidamente informados de los objetivos del estudio y dieron su consentimiento por escrito. El estudio fue diseñado de acuerdo con las normas de la Declaración de Helsinki y la Ley General de Salud de nuestro país. Fue sometido para su evaluación al Comité de Ética de nuestra institución.

Análisis estadístico. Los datos se capturaron y analizaron en una base de datos creada para el caso en el programa Epi-Info 2000. Se obtuvo la prevalencia de homocisteinemia en el grupo de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y en el grupo control. La prevalencia y las variables categóricas se expresan en valores porcentuales. Las variables continuas se expresan en promedios y desviación estándar. La asociación entre hiperhomocisteinemia y las variables clínico-epidemiológicas encuestadas se analizaron con χ^2 o prueba exacta de Fisher. Los valores promedio de los

pacientes y del grupo control se compararon con la prueba de la T de Student o Anova para variables continuas.

RESULTADOS

Se estudiaron 98 sujetos pareados por edad y género: 50 en el grupo con diabetes mellitus tipo 2 y 48 en el grupo control. En el grupo de diabéticos 27 (54%) eran mujeres y 23 (46%) hombres. En el grupo control hubo 26 (54%) mujeres y 22 (46%) hombres. El tiempo promedio de padecer diabetes en el grupo de pacientes fue de 8.9 ± 8 años. El promedio de edad de ambos grupos fue de 54 (37-77) años. En el grupo de diabéticos 9 (18%) eran hipertensos conocidos y en tratamiento farmacológico y 2 (4%) eran fumadores activos. En el grupo control no hubo hipertensos ni fumadores. En el grupo de pacientes diabéticos hubo 34 (68%) dislipidémicos, mientras que en el grupo control se encontró a 18 pacientes (38%) con dislipidemia ($p=0.04$). No hubo pacientes con antecedentes de algún evento aterotrombótico, ni tampoco alguno que hiciera ejercicio regularmente.

Entre los pacientes diabéticos las concentraciones promedio de C-HDL fueron inferiores a las del grupo control y el promedio de colesterol total, C-LDL y triglicéridos fue superior al de los controles; sin embargo, sólo en el promedio de triglicéridos esta diferencia fue estadísticamente significativa (237 ± 144 vs 166 ± 163 mg/dL, $p=0.01$). El valor promedio de la creatinina sérica fue similar en ambos grupos y la depuración de creatinina calculada fue menor en el grupo de diabéticos pero sin que hubiera una diferencia significativa (106 ± 14 vs 116 ± 43 mL/min, $p=0.4$).

La prevalencia global de homocisteinemia en este grupo de sujetos fue de 26% (25 sujetos). El valor promedio de la homocisteinemia fue mayor en el grupo control que en el grupo de pacientes diabéticos (9.8 vs 8.7 $\mu\text{mol/L}$, $p=0.4$). Hubo 11 (22%) pacientes hiperhomocisteinémicos (>12 $\mu\text{mol/L}$) en el grupo de diabéticos y 14 (29%) en el grupo de diabéticos ($p=0.3$) (Cuadro 1).

En el grupo de pacientes diabéticos las concentraciones de homocisteína fueron significativamente mayores en quienes tuvieron una depuración de creatinina menor de 90 mL/min que en quienes tuvieron una depuración de creatinina mayor a esta cifra (11.9 ± 4 vs 7.1 ± 2.4 $\mu\text{mol/L}$, $p=0.01$). En el grupo de controles esta diferencia no se observó (9.8 ± 2.1 vs 9.9 ± 5.2 $\mu\text{mol/L}$, $p=0.7$).

Cuadro 1. Características clínicas y de laboratorio de 50 pacientes diabéticos y 48 sujetos controles

	Diabéticos (n=50)	Controles (n=48)	Total (n=98)	p*
Mujeres	27 (54%)	26 (54%)	53 (54%)	
Hombres	23 (46%)	22 (46%)	45 (46%)	0.6
Hipertensos	9 (18%)	0 (0%)	9 (9%)	0.054
Antecedentes de tabaquismo	2 (4%)	0 (0%)	2 (2%)	0.5
Dislipidémicos	34 (68%)	18 (38%)	52 (53%)	0.04
Homocisteína mayor de 12 $\mu\text{mol/L}$	11 (22%)	14 (29%)	25 (26%)	0.3
Promedio edad (años)	54 (37-77)	54 (37-77)	54 (37-77)	0.9
Promedio glucosa (mg/dL)	169 \pm 73	96 \pm 25	133 \pm 66	<0.0001
Promedio CT (mg/dL)	188 \pm 46	182 \pm 45	185 \pm 45	0.3
Promedio TG (mg/dL)	237 \pm 144	166 \pm 163	201 \pm 156	0.01
Promedio C-LDL (mg/dL)	95 \pm 41	93 \pm 18	94 \pm 38	0.8
Promedio C-HDL (mg/dL)	41 \pm 13	55 \pm 10	43 \pm 13	0.1
Promedio creatinina (mg/dL)	0.81 \pm 0.26	0.81 \pm 0.07	0.81 \pm 0.19	0.3
Promedio de homocisteína ($\mu\text{mol/L}$)	8.7 \pm 3.7	9.8 \pm 4.8	9.3 \pm 4.3	0.4
Promedio de depuración de creatinina (mL/min)	106 \pm 14	116 \pm 43	111 \pm 32	0.4

*p= a través de la χ^2 , prueba exacta de Fisher o Anova.

Entre los pacientes diabéticos, los sujetos de más de 54 años tuvieron mayores concentraciones de homocisteína que los que eran menores de esa edad (11.3 \pm 3.9 vs 7.9 \pm 3.4, 0.07); sin embargo, esta diferencia no fue significativa.

En los pacientes diabéticos y controles con homocisteinemia, la única variable asociada con el análisis univariado a esta alteración fue la creatinina sérica. Los pacientes hiperhomocisteinémicos tenían mayor promedio de creatinina (0.91 \pm 0.18 vs 0.77 \pm 0.17 mg/dL, p=0.01) que los sujetos sin hiperhomocisteinemia (Figura 1).

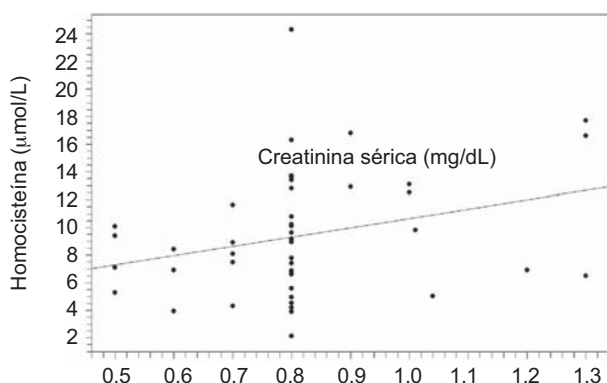


Figura 1. Correlación entre las concentraciones de homocisteína y creatinina sérica

DISCUSIÓN

La prevalencia global de hiperhomocisteinemia en los sujetos estudiados fue de 26%, y en el grupo de diabéticos de 22%. Esta prevalencia en diabéticos es similar a los reportes de Russo y col.¹⁴ (23%), algo inferior al trabajo de Essais y su grupo (28%)¹⁵ y marcadamente superior a lo reportado por Soinio (7%).¹⁶

Al igual que en otros estudios descritos en la bibliografía, los resultados encontrados en nuestro estudio resultan conflictivos ya que, aunque la mayoría refiere valores promedio de homocisteína superiores en los pacientes diabéticos, otros no reportan este hallazgo e incluso informan valores normales.¹⁷ Estos datos confusos pueden deberse a una serie de factores que influyen en el metabolismo de la homocisteína y, por consiguiente, en sus valores plasmáticos. Algunos de estos factores son la edad,^{18,19} la función renal,²⁰ el estado nutricional y las concentraciones de importantes coenzimas en el metabolismo de la homocisteína, como la vitamina B₁₂ (cobalamina) y el ácido fólico,²¹ así como el tabaquismo²² y algunos grupos de fármacos que pueden ser determinantes en las concentraciones plasmáticas de la homocisteína.

En este estudio se observó que la edad es un factor asociado con mayores concentraciones de homocisteína, como ya se describió. Aunque no se alcanzó significancia estadística, los pacientes diabéticos con mayor edad (más

de 54 años) tuvieron mayor promedio de homocisteína y, aunque por sí misma la edad no puede asociarse con este hecho, es probable que la disminución de la función renal vinculada con la edad, o una disminución del aporte vitamínico podrían, al menos parcialmente, explicar esta diferencia.^{19,20}

Aunque las diferencias de los valores de creatinina sérica y los de la depuración de creatinina endógena no fueron diferentes entre ambos grupos estudiados, cuando se estudiaron por separado en el grupo de pacientes diabéticos el promedio de homocisteína fue mayor cuando la tasa de filtrado glomerular estaba disminuida, hecho que no se observó en el grupo control. En otras palabras, en pacientes diabéticos la homocisteinemia se observa cuando la función renal empieza a deteriorarse significativamente.

Este hecho se explica porque existe una fuerte asociación entre la función renal y el metabolismo y aclaración de la homocisteína, donde el mayor deterioro de la función renal condiciona mayores concentraciones de homocisteína plasmática.¹⁹

Nuestro estudio tiene algunas limitantes. Una de ellas fue que no se analizaron las condiciones nutricionales de los pacientes, ni se realizaron las determinaciones séricas de cobalamina y ácido fólico. Tampoco se consideró para el análisis el uso de medicamentos como la metformina, que interfieren indirectamente en las concentraciones de homocisteína al disminuir las concentraciones de cobalamina.²³

Es factible, también, que nuestros resultados puedan deberse a que la dieta ingerida por los pacientes era un aporte suficiente de nutrientes, producto de las indicaciones nutricionales prescritas en su alimentación o, bien, como suele ocurrir en la práctica diaria, estos pacientes estuvieron tomando suplementos vitamínicos por automedicación que les aportaron una importante fuente de vitamina B₁₂ y folatos. Todo ello podría haber influido en que no se haya encontrado una diferencia significativa entre los dos grupos.

En conclusión, aunque no hubo diferencia en los valores de homocisteinemia entre ambos grupos estudiados, nuestros datos demuestran una importante prevalencia de homocisteinemia en el grupo de pacientes diabéticos.

Es notable que nuestros datos muestren que las concentraciones de homocisteína están asociadas con el grado de función renal, de tal suerte que en los pacientes con

nefropatía diabética es posible encontrar mayores concentraciones de homocisteína.

A pesar de las limitaciones de nuestro estudio, la evidencia reportada aquí debe servir para diseñar estudios prospectivos que definan con claridad el papel de la homocisteinemia, como un posible factor de riesgo cardiovascular en los pacientes diabéticos o, tal vez, sólo como un marcador de riesgo. Los estudios futuros deberán aclarar su significado.

REFERENCIAS

1. Cardiovascular Diseases: WHO: <http://www.who.int/ncd/cvd/CardioBroch.pdf> 2002.
2. Murray CJL, López A. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: global burden of disease study. *Lancet* 1997;347:1498-1504.
3. Principales causas de mortalidad general 2004. Secretaría de Salud. (http://www.salud.gob.mx/index_2004.html).
4. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr* 2006;83:456S-460S.
5. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;56:111-128.
6. Woodward M, Rumley A, Rumley A, Rumley C, et al. The association between homocysteine and myocardial infarction is independent of age, sex, blood pressure, cholesterol, smoking and markers of inflammation: the Glasgow Myocardial Infarction Study. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006;17:1-5.
7. Aksoy M, Basar Y, Salmayenli N, Ayalp K, et al. Hyperhomocysteinemia in patients with arterial occlusive disease. *Surg Today* 2006;36:327-331.
8. Giusti B, Marcucci R, Lapini I, et al. Role of hyperhomocysteinemia in aortic disease. *Cell Mol Biol* 2004;50:945-952.
9. Celermaier DS, Sorensen K, Ryalls M, et al. Impaired endothelial function occurs in the systemic arteries of children with homozygous homocystinuria but not in their heterozygous parents. *J Am Coll Cardiol* 1993;22:854-858.
10. Van den Berg M, Boers GH, Franken DG, et al. Hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction in young patients with peripheral arterial occlusive disease. *Eur J Clin Invest* 1995;25:176-181.
11. Heinecke JW, Kawamura M, Suzuki L, Chait A. Oxidation of low density lipoprotein by thiols: superoxide-dependent and -independent mechanisms. *J Lipid Res* 1993;34:2051-2061.
12. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976;16:31-41.
13. Malinow MR, Bostom AG, Krauss RM. Homocyst(e)ine, diet and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation* 1999;99:178-182.
14. Russo GT, Di Benedetto A, Giorda C, et al. Correlates of total homocysteine plasma concentration in type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 2004;34:197-204.

15. Essais O, Bouzid C, Ouni Z, et al. Factors influencing homocysteinemia in type 2 diabetes patients. *Tunis Med* 2006;84:279-281.
16. Soinio M, Marniemi J, Laakso M, Lehto S, Rönnemaa T. Elevated plasma homocysteine level is an independent predictor of coronary heart disease events in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2004;140:94-100.
17. Ndrepepa G, Kastrati A, Braun S, et al. Circulating homocysteine levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008;18:66-73.
18. Jacques PF, Rosenberg IH, Rogers G, et al. Serum total homocysteine concentrations in adolescent and adult Americans: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr* 1999;69:482-489.
19. Brattstrom L, Lindgren A, Israelsson B. Homocysteine and cysteine: determinants of plasma levels in middle-aged and elderly subjects. *J Intern Med* 1994;236:633-641.
20. Bostom AG, Culleton BF. Hyperhomocysteinemia in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:891-900.
21. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993;270:2693-2698.
22. Volleset SE, Nygard O, Kvale G, et al. The Hordaland Homocysteine Study: lifestyle and total plasma homocysteine in western Norway. In: Graham I, Refsum H, Rosenberg IH, Ueland PM, editors. *Homocysteine Metabolism from Basic Science to Clinic Medicine*. Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers, 1997;pp:177-182.
23. Pongchaidecha M, Srikusalanukul V, Chattananon A, Tanjariyaporn S. Effect of metformin on plasma homocysteine, vitamin B₁₂ and folic acid: a cross-sectional study in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Assoc Thai* 2004;87:780-787.