

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(ÉNFASIS EN GENÉTICA HUMANA)**



**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE  
HIPERHOMOCISTEINEMIA EN UNA POBLACIÓN COLOMBIANA**

**Martha Bermúdez. Biol.**

**Bogotá, Colombia  
Noviembre de 2005**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(ÉNFASIS EN GENÉTICA HUMANA)**



**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE  
HIPERHOMOCISTEINEMIA EN UNA POBLACIÓN COLOMBIANA**

**Martha Bermúdez, Biol.**

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

para optar por el título de

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ÉNFASIS EN GENÉTICA  
HUMANA**

**Bogotá, Colombia**

**Noviembre de 2005**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(ÉNFASIS EN GENÉTICA HUMANA)**



**CARACTERIZACION BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE  
HIPERHOMOCISTEINEMIA EN UNA POBLACIÓN COLOMBIANA**

**Martha Bermúdez, Biol**

**Director:** Jaime Bernal Villegas. Ph. D.  
Instituto de Genética Humana  
Facultad de Medicina  
Universidad Javeriana

**Co-director:** Ignacio Briceño Ph. D  
Instituto de Genética Humana  
Facultad de Medicina  
Universidad Javeriana

**Bogotá, Colombia  
Noviembre de 2005**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por los Alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velara porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona, antes bien de buscar la verdad y la justicia. Artículo 23 de la Resolución N°13 de Noviembre de 1946.

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS  
PROGRAMA DE POSGRADO**

**CARACTERIZACION BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE  
HIPERHOMOCISTEINEMIA EN UNA POBLACIÓN COLOMBIANA**

**Marta Bermúdez, Biol**

---

Jaime Bernal Villegas. Ph. D  
Director de Tesis

---

Ignacio Briceño. Ph.  
Co-director

---

Sandra Ramirez. Ph. D  
Jurado

---

Patricia Landazuri. Ph. D  
Jurado

---

Gloria Osorio. Ph. D.  
Jurado

---

Germán Darío Díaz. Ph. D  
Jurado

---

Walter Villalobos. Ph. D  
Jurado

Bogotá, Colombia  
Noviembre de 2005

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS  
PROGRAMA DE POSTGRADO**

**CARACTERIZACION BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE  
HIPERHOMOCISTEINEMIA EN UNA POBLACIÓN COLOMBIANA**

---

Angela Umaña, MPhil.  
Decana Académica  
Facultad de Ciencias Básicas

---

Carlos Corredor Pereira.  
Director de Postgrado  
Facultad de Ciencias Básicas

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág</b>
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	7
2.1 HIPERHOMOCISTEINEMIA .....	11
2.2 METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA.....	12
2.3 CLASIFICACIÓN DE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA.....	14
2.3.1 Hiperhomocisteinemia moderada.....	14
2.3.2 Hiperhomocisteinemia severa.....	16
2.4 ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA HIPERHOMOCISTEINEMIA	16
2.4.1 Cistationina $\beta$ sintasa (CBS) Metilendetrahidrofolato reductasa (MTHFR) .....	17
2.4.2 Gen de la (CBS) y de la (MTHFR).....	22
2.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA.....	33
2.6 FISIOPATOLOGÍA DE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA.....	35
2.7 DIAGNÓSTICO DE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA.....	37
2.7.1 Diagnóstico Clínico.....	37
2.7.2 Diagnóstico Bioquímico .....	38
2.7.3 Diagnóstico Genético Molecular.....	42
2.8 TRATAMIENTO DE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA.....	44

	<b>Pág</b>
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
3.1 Materiales .....	46
3.1.1 Materiales químicos.....	47
3.1.2 Equipos.....	49
3.1.3 Materiales Biológicos.....	50
3.1.3.1 Metodología .....	50
3.1.3.2 Población.....	50
3.1.3.3 Muestras.....	50
3.2 MÉTODOS.....	53
3.2.1 Métodos Bioquímicos.....	53
3.2.2 Métodos Moleculares.....	61
3.2.3 Análisis Estadístico .....	67
4. RESULTADOS.....	68
4.1 POBLACIÓN ASINTOMÁTICA.....	68
4.1.1 Descripción de resultados bioquímicos.....	68
4.1.2 Descripción de resultados moleculares.....	72
4.2 PACIENTES.....	74
4.2.1 Descripción de los resultados clínicos y bioquímicos.....	74
4.2.2 Descripción de resultados Moleculares.....	76

	<b>Pág.</b>
4.3 Familiares de los Pacientes.....	80
4.3. 1 Descripción de los resultados bioquímicos .....	81
5. DISCUSIÓN.....	95
6. CONCLUSIONES.....	106
RECOMENDACIONES.....	109
REFERENCIAS.....	110
ANEXO 1.....	131
ANEXO 2.....	136
ANEXO 3.....	144
ANEXO 4.....	146

## INDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Características bioquímicas clínicas de la Hiperhomocisteinemia.....	5
Tabla 2. Primers y condiciones experimentales para la detección de mutaciones y polimorfismos de la CBS y un polimorfismo de la MTHFR.....	63
Tabla 3. Secuencia de primers utilizados para la mutagénesis dirigida.....	66
Tabla 4. Comparación de la homocisteína pos carga entre el grupo de los hombres y de las mujeres.....	69
Tabla 5. Niveles de homocisteína basal y pos carga de metionina. ..	70
Tabla 6. Comparación entre concentración de homocisteína en ayuno (basal) hábito de fumar, ejercicio y dieta.....	71
Tabla 7. Individuos con homocisteína normal en ayuno y sus respectivos genotipos.....	73
Tabla 8. Individuos con hiperhomocisteinemia pos carga de metionina y sus respectivos genotipos .....	73
Tabla 9. Descripción de las características clínicas de los pacientes con diagnóstico presuntivo de hiperhomocisteinemia severa (homocistinuria).....	77
Tabla 10. Resultados bioquímicos de los pacientes con diagnóstico presuntivo de hiperhomocisteinemia severa (homocistinuria).....	79

	<b>Pág.</b>
Tabla 11. Actividad de la CBS proteína híbrida expresada en <i>E.coli</i> ....	82
Tabla 12. Resultados bioquímicos y moleculares de los pacientes homocistinúricos colombianos.....	92
Tabla 13. Haplotipos asociados con la mutación T191M.....	93
Tabla 14. Comparación entre las frecuencia de los haplotipos asociados con las mutaciones p.A288T, p.R121H, p.T191M de la CBS y los encontrados en la población asintomática .....	94

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Homocisteína y sus derivados bisulfuros en el plasma humano. ....	13
Figura 2. Metabolismo de la homocisteína.....	15
Figura 3. Formación de L-Cistationina.....	17
Figura 4. Estructura tridimensional de un monómero la enzima CBS (63kDa).....	21
Figura 5. Estructura Funcional de la CBS.....	21
Figura 6. Organización genómica de la Cistationina $\beta$ sintasa (CBS) humana.....	24
Figura 7. Polimorfismo c.844 inserción 68 pb de la CBS.....	28
Figura 8. Mutaciones de la cistationina $\beta$ sintasa (CBS) humana.....	32
Figura 9. Protocolo de diagnóstico de la hiperhomocisteinemia severa.....	52
Figura 10. Esquema del proceso para obtener el extracto libre de células a partir del cultivo de fibroblastos de piel.....	56
Figura 11. Esquema para medir la actividad de la enzima Cistationina $\beta$ Sintasa (CBS).....	58
Figura 12. Esquema del plásmido de expresión p HCS .....	66
Figura 13. Distribución de la concentración en ayuno (basal) de homocisteína en una población asintomática.....	69
Figura 14. Actividad de la CBS. ....	78

	<b>Pág.</b>
Figura 15. Secuencia genómica la mutación p.A288T.....	81
Figura 16. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos en CBS de diferentes especies (mutación p.A288T).....	82
Figura 17. Secuencia genómica de la mutación p.R121H.....	84
Figura 18. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de varias CBS (mutación p.121H).....	85
Figura 19. Análisis de la Mutación p.T191M de la CBS por RLFP.....	85
Figura 20. Secuencia genómica de mutación p.T191M .....	87
Figura 21. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de varias CBS (mutación p.T191M).....	88
Figura 22. Tamizaje del polimorfismo c.699C/T de la CBS.....	88
Figura 23. Tamizaje del polimorfismo c.1080C/T de la CBS.....	89
Figura 24. Amplificación del polimorfismo c.844 inser 68 pb de la CBS.....	89
Figura 25. Análisis del polimorfismo c.677C/ T de la MTHFR.....	90

## INDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>ANEXO 1. Tablas.</b>	
Tabla 1. Resultados de homocisteína basal y pos carga de metionina en los pacientes portadores de las mutaciones p. A288T, p.R121H y p.T191M.....	131
Tabla 2. Relación entre homocisteína total y cisteína en portadores de la mutación p.R121H y p.T191M de la CBS..	132
Tabla 3. Haplotipos descritos en la población normal que incluyen el polimorfismo c.844INS68 de la CBS .....	133
Tabla 4. Haplotipos descritos en los familiares de los hiperhomocisteinémicos severos que incluyen el polimorfismo c.844INS68 de la CBS .....	134
Tabla 5. Características bioquímicas y moleculares de los pacientes homocistinúricos colombianos y sus familias	135
<b>Anexo 2 Protocolos</b>	
2.1. Protocolos Bioquímicos .....	136
2.1.1 Nitroprusiato de sodio.....	136
2.1.2 Nitroprusiato de plata .....	137
2.1.3 Cromatografía de aminoácidos en capa fina .....	138
2.1.4 Extracción de ácidos orgánicos. ....	139

	<b>Pág.</b>
2.2 Protocolo biología molecular .....	140
2.2.1 Extracción de ADN.....	140
2.2.2. Amplificación de ADN.....	141
2.2.3. Coloración de plata.....	142
2.2.4. Preparación de geles poliacrilamida.....	143

### **ANEXO 3. Fotos**

Figura 1. Pacientes homocistinúricos. Familia N° 3.....	144
Figura 2. Pacientes homocistinúricos. Familia N° 9.....	145

### **ANEXO 4. Árboles genealógicos.**

Figura 1. Familia 1.....	146
Figura 2. Familia 2.....	147
Figura 3. Familia 3.....	148
Figura 4. Familia 4.....	149
Figura 5. Familia 5.....	150
Figura 6. Familia 6.....	151
Figura 7. Familia 7.....	152

	<b>Pág.</b>
Figura 8. Familia 8.....	153
Figura 9. Familia 9.....	154
Figura 10. Familia 10.....	155
Anexo 5 Consentimiento informado.....	
Anexo 6 Encuesta.....	

## ABREVIATURAS

- Grupo tiol o sulfhidrilo (Incluye homocisteína) RSH
- Homocistina Hcy-Hcy
- Homocisteína \_Cisteína Hcy-Cys
- Homocisteína\_ RSH mezcla de disulfuro Hcy-SR
- Homocisteína Hcy
- Homocisteína libre f Hcy
- Homocisteína unida b Hcy
- Homocisteína total t Hcy
- Metilendetrahydrofolato reductasa MTHFR
- Sistema nervioso central SNC
- Fosfato de piridoxal PLP
- S\_adenosilmetionina SAM
- Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción RLFP
- Homocigoto silvestre, normal. Wt/ Wt
- Cuentas por minuto CPM
- Cistationina  $\beta$  sintasa C  $\beta$  S
- Receptores N-metil, ácido aspártico NMDA

## RESUMEN

La hiperhomocisteinemia es una enfermedad metabólica que se caracteriza por el aumento en los niveles de homocisteína total del plasma y está relacionada con la edad, sexo, estilo de vida, factores genéticos, ambientales y es clasificada como moderada, intermedia y severa. Las manifestaciones clínicas de la hiperhomocisteinemia incluyen deformidades esqueléticas, alteraciones oculares, retardo mental y complicaciones vasculares. Es conocido que la deficiencia de la metiléntetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y con mayor frecuencia de la cistationina  $\beta$  sintasa (CBS), son causa de hiperhomocisteinemia severa y variantes polimórficas de los genes que codifican para estas proteínas se han asociado a la hiperhomocisteinemia moderada. En este estudio se evalúa si la presencia de polimorfismos en los genes CBS Y MTHFR influencia los niveles séricos de homocisteína en pacientes colombianos. Se encontró que el nivel de homocisteína basal ( $x + 2DS$ ,  $10.52 \pm 5.72 \mu M$ ) y pos carga de metionina ( $x + 2DS$ ,  $30.14 \pm 16.2 \mu M$ ) en 102 individuos asintomáticos, mostró una diferencia significativa ( $p=0.006$ ) pos carga entre el grupo mujeres ( $n =53$ ) y hombres ( $n =49$ ) y como resultado se identificaron ocho personas hiperhomocisteinémicas moderadas. En forma adicional se encontró en diez familias no relacionadas, once pacientes

hiperhomocisteinémicos severos y 17 hiperhomocisteinémicos moderados. La actividad enzimática de la CBS en pacientes hiperhomocisteinémicos severos (homocistinúricos) se cuantificó, utilizando un sustrato marcado radiactivamente y se obtuvieron valores entre 0.16 y 0.88 nmoles de cistationina /h/mg de proteína (V R = 1.73 nmoles de cistationina /h/mg de proteína). Mediante análisis de restricción se hallaron las frecuencias alélicas de los polimorfismos del gen que codifica para la MTHFR; los intragénicos c.699 C>T en el exón 6, el c.1080 C>T en el exón 10, y el polimorfismo c.844 inser 68 de la CBS. Los portadores T/T del polimorfismo c.677 C>T de la MTHFR, presentaron un riesgo de 5.14 ( $p = 0.034$ ) de ser hiperhomocisteinémicos moderados. Se identificaron por análisis de restricción y se confirmaron por secuenciación, las mutaciones p.R121H, exón 3, la p.T191M exón 5 y una nueva mutación, la p.A288T; la funcionalidad de la enzima con esta mutación, se evaluó induciendo mutagénesis en el vector que contiene la CBS silvestre (pHCS<sub>3</sub>) que luego se expresó en *E.coli*. Los pacientes hiperhomocisteinémicos severos mostraron una alta prevalencia (70%) del genotipo p.T191M/p.T191M y los familiares de estos que fueron hiperhomocisteinémicos moderados, el genotipo p.T191M/silvestre.

Los pacientes fueron tratados con 5 mg/ día de ácido fólico y dosis de vitamina B<sub>6</sub> entre 150 y 1000 mg/día dependiendo de la edad en que fue hecho el diagnóstico, a los dos meses luego de iniciar el tratamiento, se cuantificaron los niveles de homocisteína en los pacientes

hiperhomocisteinémicos y, se estableció si responden o no a la piridoxina. La relación genotipo-fenotipo en los homocigotos p.T191M fue muy variable, mostró un cuadro clínico de moderado a severo. Se encontró criptorquidia en tres de los pacientes hiperhomocisteinémicos, uno de ellos asociado al síndrome de Klinefelter (47 XXY). Hasta ahora, este es el primer reporte sobre un estudio en Colombia que demuestra deficiencias en el catabolismo de homocisteína, y la asociación entre la hiperhomocisteinemia y los polimorfismos antes mencionados; con lo que se definió el espectro mutacional (82%) de los hiperhomocisteinémicos severos e igualmente se identificó y evaluó la funcionalidad de una mutación nueva de la CBS.

## ABSTRACT

Hyperhomocysteinemia is defined as an increase in plasma homocysteine level; it has been related with age, gender, lifestyle, environment and genetic factors. Hyperhomocysteinemia can be moderate, intermediate and severe. The clinical features include bone malformations, ocular alterations, mental retardation and vascular disease. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) deficiency and more frequently Cystathionine  $\beta$  synthase (CBS) deficiency are a common cause of homocystinuria and polymorphic variants have been associated with moderate homocystinuria. The aim of this study was to evaluate if the polymorphisms of the genes CBS and MTHFR are associated with blood levels of homocysteine in Colombian patients. Medium levels ( $\pm 2$  DS) of homocysteine were: basal  $10.52 \mu\text{M} \pm 5.72 \mu\text{M}$  and post methionine load  $30.14 \pm 16.20 \mu\text{M}$  in 102 asymptomatic patients. A significant difference was observed ( $p=0.006$ ) between females ( $n=53$ ) and males ( $n=49$ ). Eight individuals with moderate hyperhomocysteinemia were identified. The present study was performed in ten families, eleven severe hyperhomocysteinemic (homocystinuric) and seventeen moderately hyperhomocysteinemic patients were found. The enzymatic activity of the

CBS in severe hyperhomocysteinemic patients was quantified using a radioactivity marked substrate and values between 0.16 and 0.88 nmoles of cystathionine/h/mg. (RV=1.73 nmoles of cystathionine/h/mg of protein). By restriction analysis the polymorphisms c.699 C>T exon 6, c.1080 C>T exon 10 and c.844 inser 68 of the CBS and c.677 C>T of the MTHFR were found. Mutations p.R121H, p.T191M were confirmed by direct sequencing. A new "missense" mutation (p.A288T) was found, by inducing mutagenesis in a vector containing the wild type of CBS (pHCS<sub>3</sub>) and later expressing it in *E.coli*, a functional enzyme alteration was confirmed. Homocystinuric patients had a high prevalence (70%) of the genotype p.T191M/p.T191M while moderate hyperhomocysteinemic individuals had the genotype p.T191M/wild type. Treatments consisted in 5mg/per day of folic acid and vitamin B6 between 150 and 1000 mg/day depending on the age of diagnosis, after starting the treatment homocysteine levels were quantified to establish if they were pyridoxine responders. The correlation genotype-phenotype in homozygous p.T191M was very variable, from moderate to severe. Cryptorchidism was found in three of the patients with Hyperhomocysteinemia, one of them associated with Klinefelter syndrome (47XXY) this is the first report in Colombia that demonstrates deficiencies in homocysteine catabolism and the association between hyperhomocysteinemia and the polymorphisms previously described. This defines the mutational spectrum (82%) of the hyperhomocysteinemic patients and evaluates the function of the new CBS mutation.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Pontificia Universidad Javeriana, por brindarme los medios para realizar este sueño.

A la Dra Angela Umaña, por creer en mí y darme el apoyo que permitió realizar este trabajo.

Debo reconocer mi deuda de gratitud con el Dr Jaime Bernal por la confianza, el respaldo y la orientación que me brindó a lo largo de este trabajo.

Al Dr Ignacio Briceño, por su paciencia, orientación y amistad.

Al Dr Ignacio Zarante, por el respaldo en el desarrollo de este trabajo.

A los pediatras y neuropediatras que enviaron los pacientes y cuya colaboración fue invaluable en este proceso.

A mis compañeros del Instituto de Genética Humana, por su apoyo y actitud crítica ante los resultados de este trabajo.

A los Drs Juan Carlos Prieto y Victoria Villegas, por su crítica constructiva, compañerismo y amistad.

A Colciencias, por el apoyo financiero en las diferentes etapas del desarrollo de esta investigación.

Al Departamento de Genética de la Universidad de Barcelona, al Centro de Diagnóstico de enfermedades moleculares de la Universidad Autónoma de Madrid, al Dr Kraus y al personal del laboratorio del Departamento de Pediatría de la Universidad de Colorado, en Denver, por acogerme en sus laboratorios y por la generosidad con la que compartieron sus conocimientos.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por el apoyo y respaldo en momentos claves de este trabajo.

A todos hago extensivo mi reconocimiento y gratitud.

## **DEDICATORIA**

A mi familia, quien con su compromiso, compañía, actitud crítica y comprensión, fueron la motivación constante que me condujo a la culminación de este trabajo.

A los pacientes y especialmente a sus familias, con el deseo de que estos resultados contribuyan a mejorar su calidad de vida.

## 1. INTRODUCCIÓN

La hiperhomocisteinemia es el incremento en la concentración de homocisteína total en el plasma, se han relacionado diversos factores de riesgo, entre los que cuentan la edad, sexo masculino, fumadores, sedentarismo y factores genéticos implicados en el metabolismo de la metionina, como la baja o nula actividad de las enzimas cistationina  $\beta$  sintasa (CBS) o de la metiléntetrahydrofolato reductasa (MTHFR) y como resultado se produce una elevación de la homocisteína total y de metionina en plasma, excreción de homocistina, niveles disminuídos de cistationina y de cisteína en orina (Nygard, *et al.*, 1995). En el ciclo de la metionina se obtiene la homocisteína, la cual se condensa con la serina para producir cistationina, que luego es catabolizada a cisteína por la vía de transulfuración con la intervención de dos enzimas dependientes de vitamina B<sub>6</sub>, cistationina  $\beta$  sintasa CBS (MIM#236200) y cistationasa (EC 4 41.1). En el proceso de remetilación se obtiene metionina a partir de homocisteína, utilizando la enzima 5,10-metiléntrahydrofolato reductasa (MTHFR) (MIM #236250, EC 1.5.1.20) dependiente del ácido fólico y la vitamina B<sub>12</sub>. Esta enzima cataliza la conversión de 5,10 metiléntetrahydrofolato, en una reacción dependiente de NADPH, a 5-metiltetrahydrofolato; este metabolito que es producido en una reacción fisiológica irreversible, corresponde a uno de los tres dadores

del grupo metilo en la conversión de homocisteína a metionina por la enzima metionina sintasa (Selhub y Miller, 1992).

La hiperhomocisteinemia se clasifica en moderada (17-30  $\mu\text{M}$ ), intermedia (30-100  $\mu\text{M}$ ) y severa ( $> 100 \mu\text{M}$ ) (Refsum, *et al.*, 1998). Al mismo tiempo y de manera independiente, Carson y Neill, (1962) en Irlanda y Gerritsen, *et al.*, (1962) en USA, describieron por primera vez la hiperhomocisteinemia severa, también conocida como homocistinuria, se produce por deficiencia en las enzimas CBS Y MTHFR y se hereda en forma autosómica recesiva. Las manifestaciones clínicas de la deficiencia de la enzima CBS (tabla N°1), incluye alteraciones visuales (severa miopía y *ectopia lentis*), esqueléticas (osteoporosis escoliosis hábitos marfanoides), vasculares (arteriosclerosis prematura) y del sistema nervioso central (SNC) (retardo mental, convulsiones y trastornos psiquiátricos) (Mudd, *et al.*, 2001). La hiperhomocisteinemia moderada y la enfermedad vascular se relacionaron (tabla N°1) desde 1969 cuando McCully, en la autopsia de dos pacientes con hiperhomocisteinemia severa, encontró trombosis arterial extensa y aterosclerosis; esto lo llevó a postular a la homocisteína como una sustancia tóxica para el sistema vascular. A partir de estos resultados otros investigadores han puesto en evidencia la relación entre la hiperhomocisteinemia moderada y los eventos vasculares, (Kang, *et al.*, 1988, Clarke, *et al* 1991, Sebastio, *et al.*,1995, Selhub, *et al.*,1995, Boushey, *et al.*, 1995) esto ha motivado estudios de la relación entre el origen de la

enfermedad y la causa genética (Boers, *et al.*, 1985 b, Stamfer, *et al.*, 1992, Nygard, *et al.*, 1997). De esta forma se ha relacionado la hiperhomocisteinemia moderada con mutaciones y polimorfismos en los genes implicados en la vía del catabolismo de la metionina. Por ejemplo Franchis, *et al.*, (2000) encontraron una asociación positiva entre el aumento de la homocisteína plasmática y los polimorfismos c.844ins 68 en el exón 8 de la CBS, mientras Aras, *et al.*, (2000) encontraron asociación entre la hiperhomocisteinemia y los polimorfismos c.699 C>T en el exón 6 y c.1080 C>T en el exón 10 de la CBS.

La enfermedad cardiovascular es una de las causas más importantes de mortalidad en el mundo occidental (WHO, 2002), igualmente, se estima que aproximadamente cinco colombianos presentan un evento coronario por hora y, al día ocurren 45 muertes relacionadas con esta enfermedad (Bohórquez, e Isaza, (1999). La alta frecuencia de presentación de eventos cardiovasculares en nuestro medio, contribuye de una manera importante a la morbimortalidad, constituyéndose en un problema de salud pública. Es conocido que existe una clara asociación entre el tipo de mutación que produce la hiperhomocisteinemia severa, la respuesta al tratamiento con vitamina B<sub>6</sub> y la severidad de la enfermedad. Por otra parte el diagnóstico de los pacientes con hiperhomocisteinemia severa que se realiza en Colombia, se hace cuando la enfermedad se encuentra instalada y las graves secuelas que produce ya son manifiestas. Dado que las consecuencias de la

hiperhomocisteinemia se pueden prevenir si la enfermedad se detecta de forma temprana, y se realiza un correcto manejo terapéutico y que la mayoría de los pacientes estudiados con hiperhomocisteinemia severa pertenecen a zonas geográficas específicas, sería importante considerar el poder implementar el programa de tamizaje bioquímico y molecular descrito en este trabajo, para identificar afectados y portadores con el fin de instaurar un tratamiento temprano antes que la enfermedad se manifieste. Por otra parte conocer los niveles de homocisteína basal, pos carga de metionina y las frecuencias alélicas de los polimorfismos c.844 ins 68 en el exón 8, c.699 C>T en el exón 6 y c.1080 C>T en el exón 10 de la enzima CBS y de c.677 C>T en la MTHFR, en una población sin factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular, permitirá hacer comparaciones con pacientes que han sufrido estos eventos y buscar haplotipos que identifiquen personas en riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular. Sin embargo, para verificar en nuestra población la asociación existente entre los genotipos de la CBS, MTHFR, la hiperhomocisteinemia moderada y el riesgo de la enfermedad vascular, es necesario diseñar un estudio caso-control utilizando los polimorfismos estudiados en este trabajo. Luego de realizar la cuantificación de homocisteína en pacientes egresados de las unidades de cuidados intensivos con diagnóstico de infarto agudo del miocardio, analizar los marcadores polimorficos en búsqueda de haplotipos que identifiquen personas en riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular.

**Tabla 1. Características bioquímicas y clínicas de la hiperhomocisteinemia.**

Tipo de hiperhomocisteinemia	Concentración de Homocisteína (µM)	Sistema ocular	Sistema Músculo esquelético	Sistema vascular	Sistema Nervioso Central	
					Retraso del desarrollo sicomotor	Retraso mental
Severa (Homocistinuria)	>100	Miopía <i>Ectopia lentis</i> Glaucoma	Escoliosis <i>Pectus excavatum</i> <i>Genu valgum</i> Habitos marfanoides	Eventos tromboembólicos arteriales y venosos	Retraso motor retraso del lenguaje	Leve Moderado Severo
Moderada	17-30			Enfermedad coronaria prematura. Estenosis de la arteria carotida. Infarto del miocardio. Trombosis venosa profunda. Enfermedad cardiovascular. Desarrollo de aterosclerosis.		

## **HIPÓTESIS**

El tipo, la edad de presentación y la severidad de la hiperhomocisteinemia en Colombia difieren por la presencia de polimorfismos en los genes CBS y MTHFR.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar si la presencia de polimorfismos en los genes CBS Y MTHFR influye en los niveles séricos de homocisteína en pacientes colombianos.

### **Objetivos específicos**

1. Identificar y confirmar una población de hiperhomocisteinémicos severos e hiperhomocisteinémicos moderados por medio de pruebas bioquímicas cualitativas y cuantitativas.
2. Determinar la presencia de polimorfismos y mutaciones en los genes de la CBS y MTHFR en pacientes hiperhomocisteinémicos severos y moderados.
3. Describir las frecuencias alélicas de los polimorfismos c.699 C>T (exón 6), c.1080 C>T (exón 10) de la cistationina  $\beta$  sintasa (CBS) y de la c.677 C>T (exón 1) de la 5,10-metiléntrahidrofolato reductasa (MTHFR) en una población colombiana.

## 2. ANTECEDENTES

La hiperhomocisteinemia severa fue descrita de manera independiente por Gerritsen, *et al.*, (1962) y Carson y Neill, (1962); este último grupo realizó un estudio en una institución de niños con retardo mental y encontró un par de hermanas de 5 y 7 años con *ectopia lentis*. El tamizaje de rutina con nitroprusiato de sodio fue positivo, indicando la presencia de aminoácidos sulfurados en orina, de igual forma la cromatografía de aminoácidos permitió identificar la homocisteína en orina (homocistinuria).

En 1964 Mudd *et al.*, estudiaron un paciente de sexo masculino de 8 años y con características clínicas similares a las descritas por Carson: como retardo mental, *ectopia lentis*, fino cabello rubio, ojos verdes, y genu valgum, el análisis de muestra de orina mostró aumento de homocisteína y pruebas en plasma revelaron aumento de metionina, estos investigadores también hallaron una deficiencia en la actividad de la cistationina  $\beta$  sintasa (CBS) enzima involucrada en el metabolismo de la metionina. La actividad de la CBS en los padres de los pacientes mostró una disminución del 52% con respecto a los controles lo que permitió concluir que el defecto enzimático es de tipo autosómico recesivo, Finkelstein, *et al.*, (1964). En 1978 Kraus quien purificó la enzima CBS y evidenció que para que la enzima sea funcional

debe estar constituida por cuatro subunidades de 63 kDa formando un complejo homotetramérico. Muncke en 1988 mapeó por hibridación *in situ*, el gen humano para la CBS en la región subtelomérica en el cromosoma 21 q22.3. Por otra parte, en 1992 Kozich y Kraus clonaron en un vector de expresión para *E.coli*, el pKK 388.1 un inserto del gen que codifica para la CBS con la mutación que produce un cambio del aminoácido isoleucina por treonina en la posición 278 y es causada por la transición de T>C en el nucleótido 833. El anterior sistema de expresión permitió evaluar, el efecto de las diferentes mutaciones que se han identificado en el gen que codifica para la CBS, sobre la funcionalidad de la enzima (Franchis, *et al.*, 1994). La mutación 833 T>C frecuente en poblaciones de diferentes grupos étnicos se reportó como piridoxina sensible y se asoció con un grupo de pacientes homocistinúricos homocigotos cuyas manifestaciones clínicas corresponden a un fenotipo leve. Se identificó una mutación más severa como la causada por la transición G>A en el nucleótido 919 que produce un cambio del aminoácido glicina por serina en la posición 307 (G307S) cuya expresión fenotípica es severa y fue descrita en alelos de pacientes homocistinúricos de origen Céltico (Gallagher, *et al.*, 1998). Adicionalmente Tsai, *et al.*, (1996 b) encontraron una alta prevalencia del polimorfismo c.844 inser 68 en el exón 8 de la CBS, en una población procedente del centro de los Estados Unidos y se demostró que esta mutación no afecta la actividad de la enzima. El ADNc de la enzima CBS fue clonado y secuenciado por Kraus, *et al.*, (1993) quienes describieron que el gen contiene 23 exones y en total 28046

nucleótidos y que codifica para una proteína de 551 aminoácidos. En la actualidad se tienen reportadas 132 mutaciones en el gen de la enzima CBS (Kraus, *et al.* 1999, <http://www.uchsc.edu/cbs>).

La asociación entre hiperhomocisteinemia y enfermedad vascular se evidenció en 1969, cuando el Dr Kilmer McCully observó lesiones vasculares avanzadas en niños fallecidos, quienes tenían diagnóstico de homocistinuria. En 1985 Mudd, *et al.*, realizaron un estudio con 629 pacientes para definir la historia natural de la homocistinuria, causada por la deficiencia de la enzima CBS y, evaluar el tratamiento. En este estudio se mostró que la posibilidad de sufrir un evento vascular antes de los 20 años era del 30%, que se incrementa hasta un 50% a los 30 años y que los pacientes que no respondieron al tratamiento estaban más afectados que los que mostraron una respuesta a la piridoxina. Estos pacientes fueron tratados con combinaciones de ácido fólico, hidroxicobalamina y, betaína que estimulaban la remetilación de homocisteína a metionina demostrándose la importancia de las dosis de piridoxina como factor que reduce el número inicial de eventos tromboembólicos.

Es este estudio Mudd predijo que el 82% de los afectados por homocistinuria padecerían de *ectopia lentis* a los 10 años de edad, el 27% a los 15 años sufrirían complicaciones tromboembólicas, y el 54% a la misma edad presentarían evidencias radiológicas de osteoporosis, y 23% tendrían una esperanza de vida inferior de 30 años. Posteriormente otros estudios retrospectivos caso – control también relacionaron a la homocisteína con la

enfermedad vascular (Clarke, *et al* 1991, Boers, *et al.*, 1985 b, Kang, *et al.*, 1988 Sebastio, *et al.*, 1995, Selhub, *et al.*, 1995, Boushey, *et al.*, 1995) y prospectivos (Stamfer, *et al.*, 1992, Nygard, *et al.*, 1997). La primera terapia para la hiperhomocisteinemia severa que se ensayó, consistió en la administración de dosis altas de piridoxina (Piridoxal fosfato, PLP) que es el cofactor de la CBS, y reduce las concentraciones plasmáticas de homocisteína (Barber y Spaeth, 1967).

Los niveles de homocisteína detectados luego del tratamiento permitieron establecer si los pacientes presentaban un fenotipo que responde (denominados también homocistinúricos sensibles a la piridoxina) o no a la piridoxina. De forma adicional reportes de Wilcken y Wilcken en 1997 revelaron que el tratamiento para disminuir las concentraciones de homocisteína en plasma a su vez reduce el riesgo cardiovascular tanto en pacientes que son sensibles a la piridoxina, como en aquellos resistentes a ella.

En Colombia a partir de 1992 el laboratorio Pregon ha realizado tamizaje bioquímico para la identificación de pacientes homocistinúricos y más recientemente el Instituto Materno Infantil y el Instituto de Genética de la Universidad Javeriana, los pacientes identificados en estas instituciones participaron en el presente estudio.

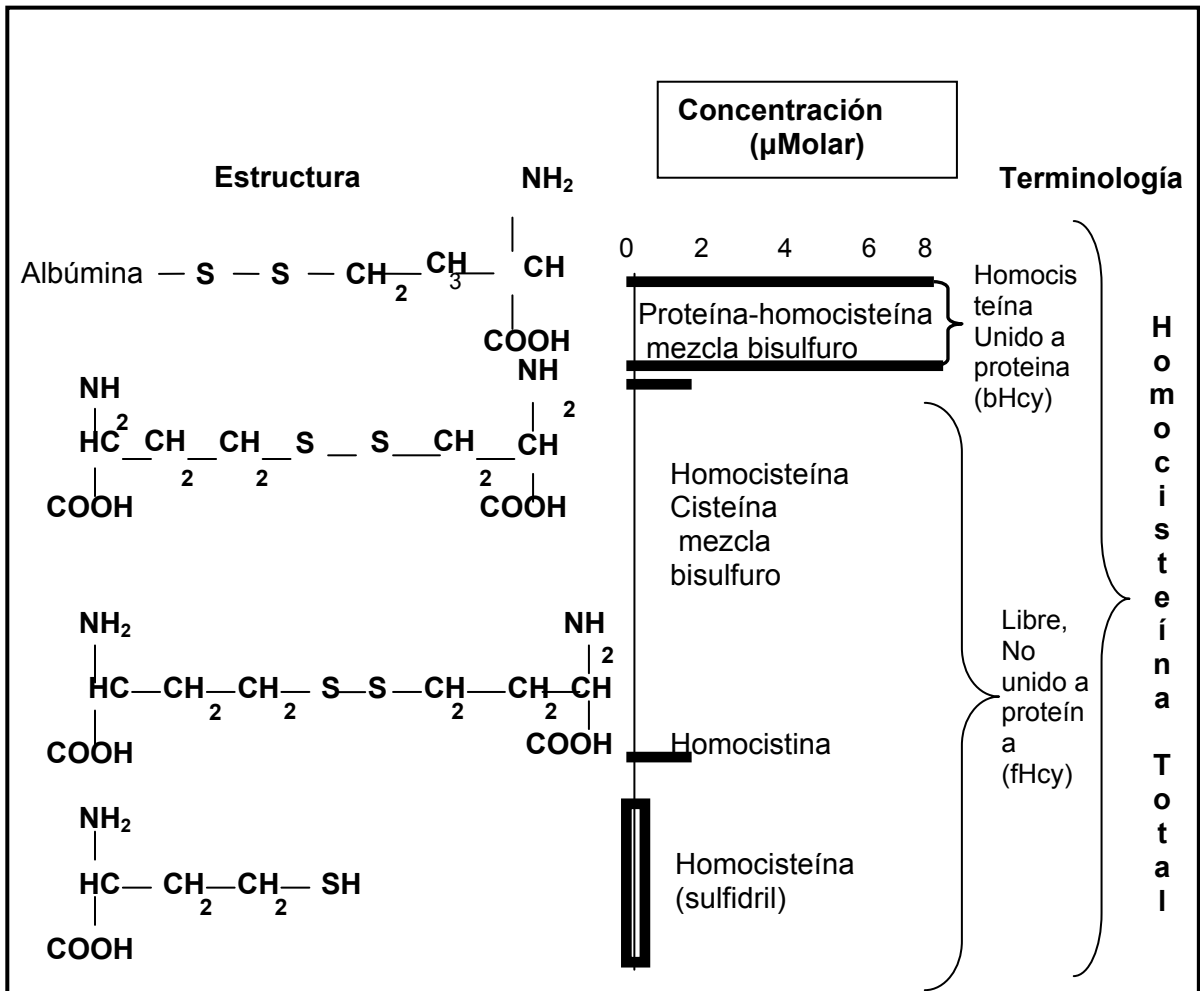
## 2.1 HIPERHOMOCISTEINEMIA

La hiperhomocisteinemia es el aumento del aminoácido sulfurado homocisteína en la sangre. La homocisteína (Hcy) es un aminoácido trombogénico, y tiene una función importante en el metabolismo de la metionina, de la cisteína y de la adenosilmetionina Mudd *et al.*, (2001). En eucariotes, para la síntesis de cisteína, se utiliza el átomo de azufre de la metionina y la cadena carbonada con el grupo amino de la serina. La cisteína es el principal precursor del glutatión, metabolito importante para el equilibrio redox de la célula; la homocisteína contiene un grupo tiol que le confiere la posibilidad de múltiples interacciones con otras moléculas (Kraus, 1998b). La homocisteína total se encuentra en forma libre en un 1-2%, en un 98% en forma de bisulfitos. El 75% de la concentración de homocisteína en sangre se encuentra unido a través de puentes bisulfuro con las cisteínas presentes en las proteínas, especialmente en la albúmina. El 25% restante se encuentra formando complejos bisulfitos homocisteína- cisteína, y homocisteína – cisteinglicina (Mudd, *et al.*, 2000) (Figura 1). En 1998 Refsum, *et al.*, clasificaron la hiperhomocisteinemia en tres niveles; moderada cuando la homocisteína total en plasma esta en el rango de 17-30  $\mu\text{M}$ , la intermedia cuando el rango es de 30-100  $\mu\text{M}$  y severa cuando el valor supera los 100  $\mu\text{M}$ . Los niveles de homocisteína total en plasma dependen de la interacción de factores epigenéticos como el estado nutricional, la edad, el sexo, el estilo de vida y de factores genéticos como la deficiencia de

algunas de las enzimas o coenzimas que intervienen en el metabolismo de la metionina. Las enzimas involucradas en la hiperhomocisteinemia son la CBS y la MTHFR como se indica en la Figura 2.

## **2.2 METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA**

Las ínter conversiones entre metionina y homocisteína son importantes para la metilación de las proteínas, ADN, ARN y neurotransmisores. La remetilación de la homocisteína a metionina hace posible la síntesis de folato indispensable para el crecimiento celular (Ugarte, 2000). La deficiencia de alguna de estas enzimas o de sus coenzimas produce acumulación de homocisteína (Figura 2). La homocisteína participa en la vía de transulfuración en la que interviene la enzima cistationina  $\beta$  sintasa (CBS), y el cofactor fosfato de piridoxal para formar cistationina, o puede ser remetilada a metionina, en el proceso en el cual interviene la enzima 5,10-metiléntrahidrofolato reductasa (MTHFR) que cataliza la conversión de 5,10-metilenetetrahidrofolato a 5-metilenehidrofolato.



**Figura 1. Homocisteína y sus derivados bisulfuros en el plasma humano.**

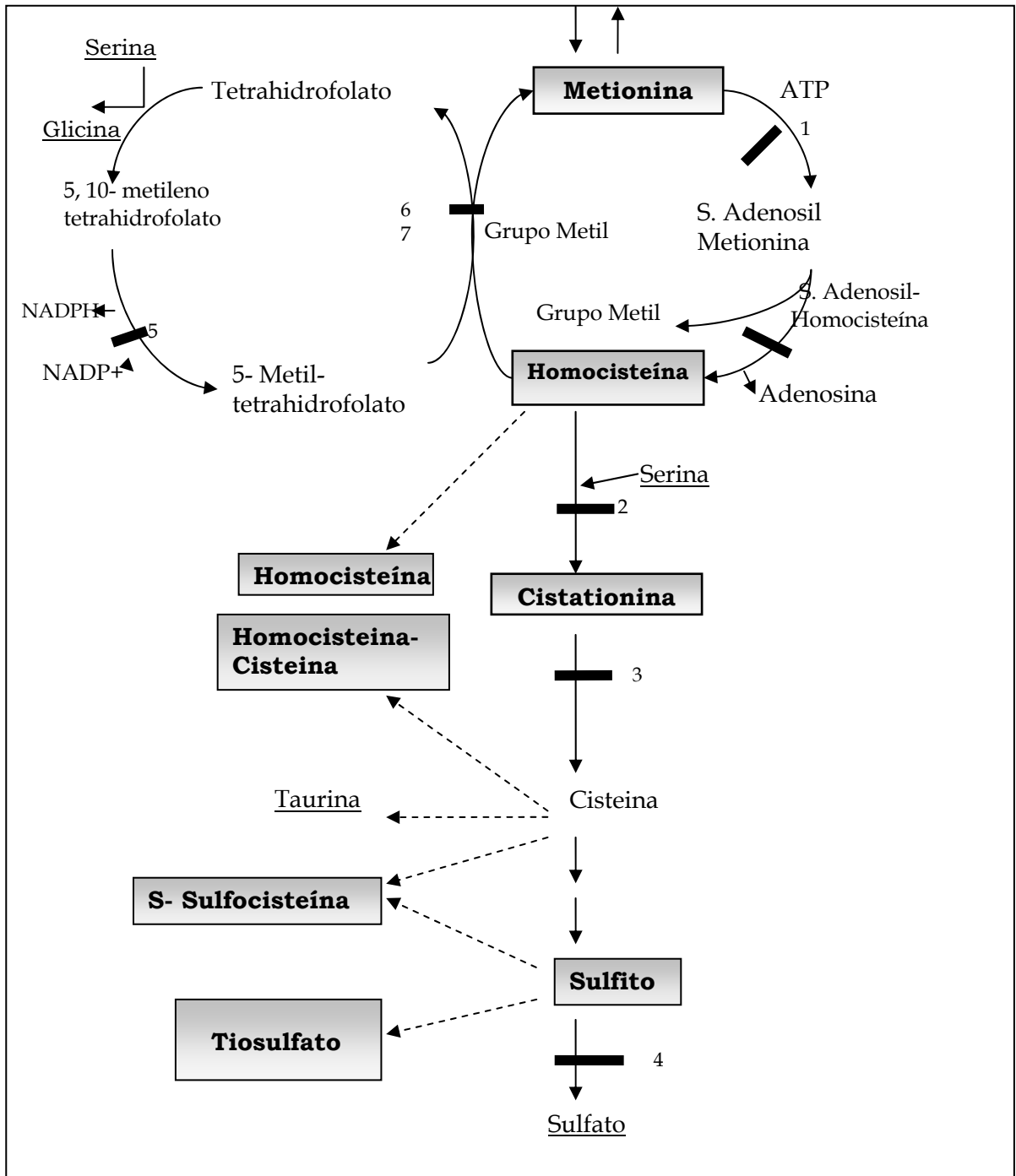
Las formas en que se encuentra la homocisteína en el plasma humano son: Homocisteína libre (fHcy) es la que no está unida a proteína, también es llamada homocisteína ácido-soluble y corresponde a un 2% de la homocisteína total. Homocisteína unida (bHcy) corresponde a la homocisteína unida a proteína por enlaces disulfuro. Homocisteína Total (tHcy) es la homocisteína total presente en la sangre humana después del clivaje de los enlaces disulfuros. Modificado de Mudd, *et al.*, (2000).

## 2.3 CLASIFICACIÓN DE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA

### 2.3.1 Hiperhomocisteinemia moderada

Se define como hiperhomocisteinemia moderada cuando la concentración de homocisteína total en el plasma es  $X \pm 2DS$  basal  $>17 \mu\text{M}$  y pos carga de metionina  $> 46 \mu\text{M}$ . Se produce hiperhomocisteinemia moderada por anomalías en el transporte o metabolismo de cobalamina ( $B_{12}$ ), alteraciones en la actividad de la enzima MTHFR y con mayor frecuencia a la deficiencia de la enzima CBS. Kang, *et al.*, (1988) reportaron que los niveles de homocisteína se incrementan cuando se reduce la actividad de la enzima MTHFR. Brattstrom y Wilcken (2000) encontraron un incremento de 20% en los niveles de homocisteína plasmática en los portadores homocigotos T/T del polimorfismo 677 en el gen de la MTHFR; adicionalmente, se encontró que este polimorfismo está asociado con la actividad reducida de esta enzima (Frosst, *et al.*, 1995).

Otra causa importante de hiperhomocisteinemia es el estado heterocigoto de la CBS. En 1991 Clarke, *et al.*, demostraron que aproximadamente un tercio de los pacientes con enfermedad vascular prematura tienen hiperhomocisteinemia tras la carga de metionina y son portadores heterocigotos de alelos mutantes del gen de la CBS.



**Figura 2. Metabolismo de la homocisteína**

La homocisteína es metabolizada por la vía de transulfuración con las enzimas Cistationina β sintasa CBS (2), Cistationasa (3), Sulfito oxidasa (4), y por la vía de la remetilación con las enzimas Metiléntetrahidrofolato reductasa, MTHFR (5), Metionina sintasa (6) y de Betaína – homocisteína metiltransferasa (7). Modificado de Skovby (1996).

### **2.3.2 Hiperhomocisteinemia severa.**

En la hiperhomocisteinemia severa conocida también como homocistinuria la concentración de homocisteína total en plasma es mayor a 100  $\mu$  M y corresponde a una alteración bioquímica no específica, que significa presencia del aminoácido homocisteína en orina, término propuesto por Mudd, *et al.*, 2000 para definir un Error Innato del Metabolismo (EIM) caracterizado por marcada elevación de homocisteína total en plasma o suero. Se produce hiperhomocisteinemia severa cuando existe una deficiencia en la cantidad funcional en la enzima CBS en la MTHFR o en los cofactores vitamina B<sub>6</sub>, vitamina B<sub>12</sub> o de ácido fólico. Se estima, según el tamizaje bioquímico que la frecuencia de la homocistinuria por deficiencia de CBS en Caucásicos oscila entre 1:65.000 y 1:344.000 (Yap, 2003). Sin embargo, el estimado basado en tamizaje molecular de ADN en recién nacidos, es mucho más alto 1:6.000 (Refsum, *et al.*, 2004a).

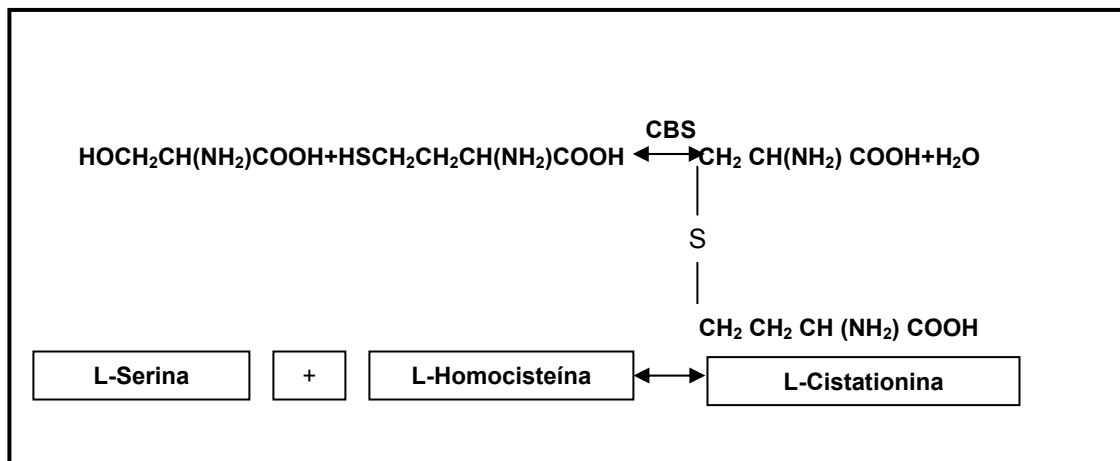
### **2.4 ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA HIPERHOMOCISTEINEMIA**

La homocisteína es metabolizada por la vía de transulfuración con las enzimas Cistationina  $\beta$  sintasa CBS, Cistationasa hasta sulfitos y sulfatos y por la vía de la remetilación con las enzimas Metiléntetrahidrofolato reductasa, MTHFR, Metionina sintasa y de Betaína – homocisteína metiltransferasa (Skovby, 1996).

### 2.4.1 Cistationina β Sintasa (CBS) y Metiléntetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

La hiperhomocisteinemia se produce como consecuencia de una actividad deficiente de las enzimas Cistationina β Sintasa (CBS), Metiléntetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y metionina sintasa, por alteración en la estructura proteica de alguna de estas enzimas o por deficiencia en algunos de sus cofactores (vitamina B<sub>6</sub> o vitamina B<sub>12</sub> o del ácido fólico).

La cistationina β sintasa CBS (EC .4.2.1.22 MIM# 236200) es una proteína citoplasmática que cataliza la condensación de L-homocisteína y serina a cistationina en un paso irreversible en la vía de transulfuración, (Fig 3)



**Figura 3. Formación de L-Cistationina**

La figura muestra la formación de la L-cistationina en una reacción catalizada por la enzima (CBS) en la cual el grupo tiol de la homocisteína se une a la L-serina por el extremo del grupo hidroxilo, la reacción pierde una molécula de agua como se muestra en la ecuación.

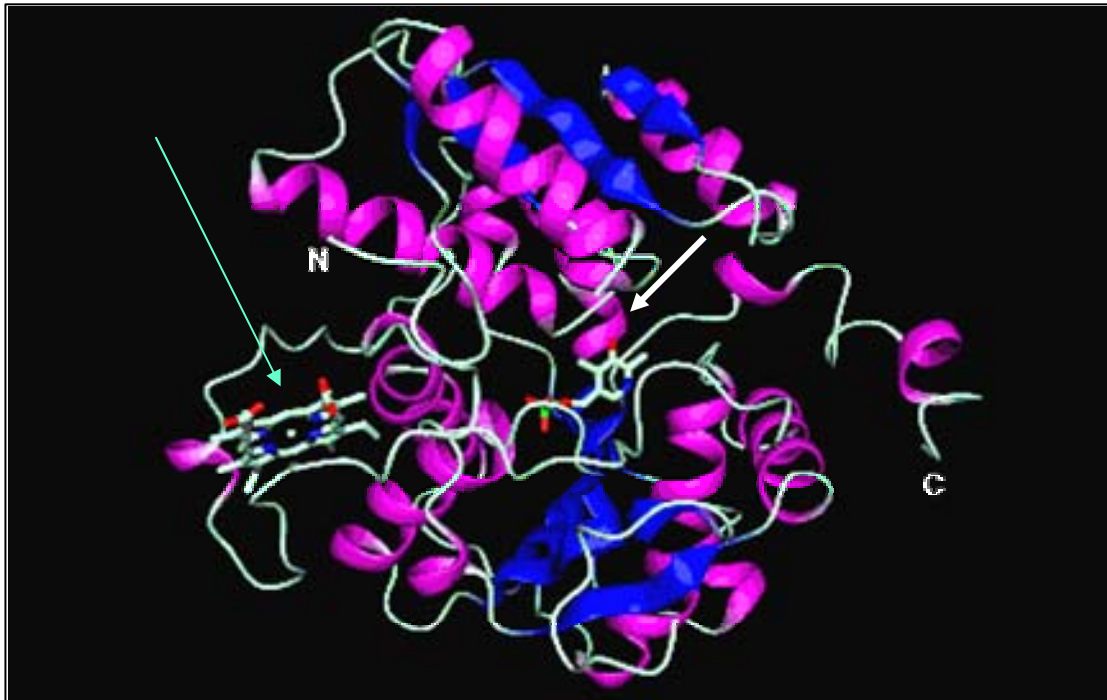
La enzima CBS es de estructura terciaria tipo globular, catalíticamente activa cuando está en forma de homotetrámero, cada subunidad pesa 63 kDa y tiene 551 aminoácidos, se une a una molécula de fosfato de piridoxal derivado de la vitamina B<sub>6</sub> y también a un anillo de hemo (Hierro protoporfirina IX). La enzima en la región N-terminal se une al grupo hemo sobre los aminoácidos cisteína 52 e histidina 65, Meier, *et al.*, (2001). Aún no es conocido cual es la función del hemo; por mutagénesis dirigida se estableció que la deleción de los aminoácidos 1-39 de la región N-terminal de la CBS humana, no afecta de manera significativa la actividad de la enzima Oliveriusova, *et al.*, (2002). Sin embargo, mutaciones en la región 1-70 disminuye su capacidad de unir el grupo hemo y produce disminución en la actividad enzimática (Mosharov, *et al.*, 2000). Por otra parte se ha propuesto que el anillo hemo puede actuar como regulador en el equilibrio red-ox de la CBS, ya que en un ambiente reductor la enzima pierde gran parte de su actividad (Taoka, *et al.*, 1998 y 1999).

La CBS posee un centro activo entre los aminoácidos 71 y 412, esta región de aproximadamente 45 kDa tiene homología de secuencia con enzimas relacionadas en plantas y bacterias. En el centro activo de la CBS, el cofactor PLP se une a la Lisina 119 a través del grupo amino en posición  $\epsilon$  (último carbono de la cadena lateral del aminoácido) y el nitrógeno del anillo de pirimidina forma un puente de hidrógeno con la serina 349 y otro con la asparragina 149 (Kery, *et al.*, 1994) (Figura 4). La coenzima PLP se asocia a una región de la CBS en forma de hendidura, entre los dominios N-terminal y

C-terminal y, es accesible sólo a través de un estrecho canal. En esta región, la unión del PLP provoca un cambio de la conformación abierta a la forma más cerrada que mantiene el PLP unido al centro activo (Figura 4). En la región comprendida entre los residuos 186 y 222, el esqueleto de carbonos  $\alpha$  (el carbono que puede unirse a cuatro grupos de átomos) de la CBS presenta gran semejanza estructural a la conformación abierta del dominio móvil (o bisagra) de las O-acetilserina sulfhidrilasa (OASS) y de *Salmonella typhimurium* (Bateman, 1997).

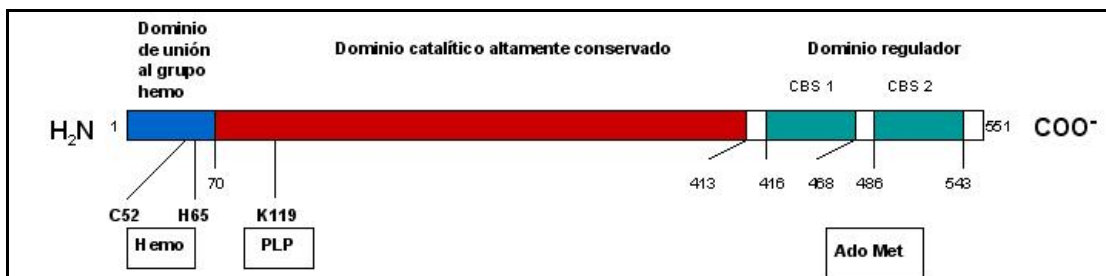
La región C-terminal de la CBS se extiende desde el residuo 413 hasta el 551 y contiene el dominio "CBS" (o dominio de plegamiento) entre los aminoácidos 415 y 468, los cuales son principalmente hidrofóbicos. Este dominio se le ha asociado una función de autoinhibidor y ha sido descrito en otras proteínas como la inosina 5'-monofosfato-deshidrogenasa y en proteínas estructurales de los canales de cloro (Bateman, 1997). La CBS es activada alostéricamente por la S-adenosilmetionina (SAM) molécula formada por la transferencia de la adenosina del ATP, al aminoácido metionina por la enzima metionina adenosiltransferasa; esta molécula transportadora de grupos metilo, es clave en las reacciones de metilación de los neurotransmisores, proteínas de mielina y del ADN. SAM se une al dominio CBS localizado en el extremo C-terminal y se ha propuesto que ésta unión provocaría un cambio conformacional en el dominio auto inhibidor incrementando cerca de tres veces la actividad de la CBS (Revisado en Wilson y Kraus, 2004) (Figura 5).

Otra de las enzimas involucradas en la hiperhomocisteinemia es la MTHFR enzima de 77 kDa, la cual es una flavoproteína, inhibida por SAM (Kutzbach, y Stokstad, 1971) y cataliza la conversión de 5,10 metiléntetrahidrofolato a 5 metiltetrahidrofolato. Este metabolito es la mayor forma de circulación del folato el cual en la forma 5 metil, participa en la síntesis de nucleótidos; en la síntesis de Adenosilmetionina, en la remetilación de homocisteína a metionina, metilación del ADN, proteínas de mielina y en la metilación de neurotransmisores (Rosenblatt, 2000).



**Figura 4. Estructura tridimensional de un monómero de la enzima CBS (63kDa)**

Se observa las láminas  $\beta$  plegada de color azul y las alfa hélices de color magenta en una subunidad de CBS. La flecha blanca señala la molécula de PLP, la flecha verde el grupo hemo. La N corresponde al dominio amino ( $\text{NH}_2$ ) terminal y C al dominio carboxilo ( $\text{COO}^-$ ) terminal. Modificado de KrausLab Homepage, University of Colorado, Health Sciences Center <http://www.uchsc.edu/sm/cbs/>



**Figura 5. Estructura Funcional de la CBS.**

La enzima CBS humana muestra el dominio N-terminal sitio de unión del grupo hemo, el dominio catalítico y el dominio regulador C-terminal conteniendo los dominios CBS1 y CBS2. Modificado de Wilson y Kraus, 2004.

#### **2. 4. 2 Gen de la (CBS) y de la (MTHFR)**

La hiperhomocisteinemia puede ser causada por mutaciones en uno o varios de los genes que intervienen en el metabolismo de la homocisteína (Kang, *et al.*, 1991a, Kang, *et al.*, 1991b, Smolin y Benevenga, 1984). La homocistinuria es una enfermedad con un patrón de herencia autosómico recesivo. El gen de la enzima CBS fue mapeado en el segmento subtelomérico del cromosoma 21( 21q22). Munke, *et al.*, (1988). El ADNc de la CBS fue clonado por Kraus, *et al.*, (1993) y codifica un monómero proteico de 63 kDa el cual forma un homotetrámero funcional. El gen tiene 28.046 pares de bases; 23 exones, con tamaños entre 42 pb el exón 15, hasta 455 pb el exón 17. El tamaño de los intrones en la enzima CBS varia entre 95 pb para el intrón 4 y 3.3 k b para el intrón 1, todos los demás intrones tiene un tamaño entre 114 y 2.9 kb.

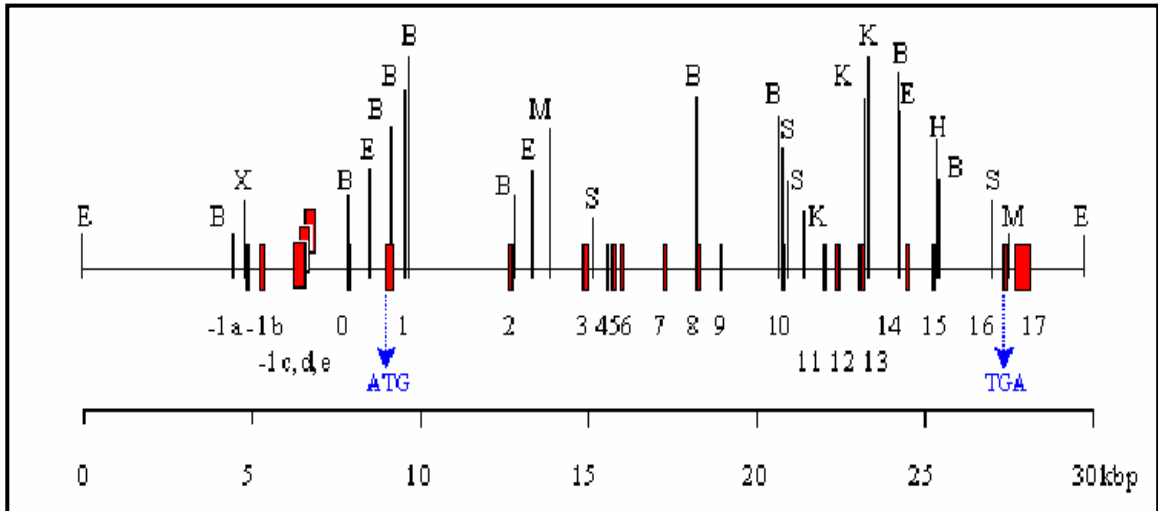
Hacia la región 5'UTR el gen esta formado por cinco posibles exones -1 (a, b, c d, e), el exón 0 y un pequeño fragmento del exón 1, (Figura 6) (Kraus, 1998a). Con la presencia del exón -1 son 5 posibles ARNm, también se ha observado que estas distintas formas tienen cierta especificidad de tejido, aunque las cinco se expresan en páncreas e hígado. Hacia la región 3'UTR se encuentran los exones 16 y 17 identificados por Kraus, (1998b).

El gen de la 5,10-metiléntrahidrofolato MTHFR está localizado en el cromosoma 1 en 1p36.3 y codifica para una proteína de 77 kDa, que

constituye una enzima clave en el metabolismo del folato y la homocisteína. El ADNc tiene 2.2 kb y 11 exones; (Goyette, *et al.*, 1996).

- **Variantes por splicing del gen de la CBS humana**

El Análisis de los ADNc de la CBS en humanos indica que durante el procesamiento del ARNm (splicing) se remueven solo algunas regiones de los intrones, las zonas retenidas pueden ser identificadas cuando el ARN es purificado y a partir de este se sintetiza el ADNc que luego es secuenciado y comparado con el ADN genómico (Kraus *et al.*, en 1998b). En un estudio con 15 pacientes homocistinúricos predominantemente checos y eslovacos se detectó de manera consistente pequeñas cantidades de productos de ADNc con tamaño anormal. En la porción 5' del ADNc de la CBS en linfocitos y fibroblastos se encontraron dos variantes de procesamiento (splice) que retienen diferentes porciones del intrón 2 (Revisado en Kraus *et al.*, en (1998b).



**FIGURA 6. Organización genómica de la Cistationina  $\beta$  sintasa (CBS) humana.**

La Figura muestra todos los exones de la CBS humana, inclusive los alternativos 1 a, b, c, d,e y el 15, por barras sólidas. El comienzo y el final de la región codificante esta indicada con los codones ATG y TGA respectivamente. Los sitios de restricción son B, BamI; E, EcoR I; H Hind II; K, Knp I; M, Mlu; S, Sfi I y X, Xba I 8. Mudd *et al.*, 2001.

- **Polimorfismos de la CBS**

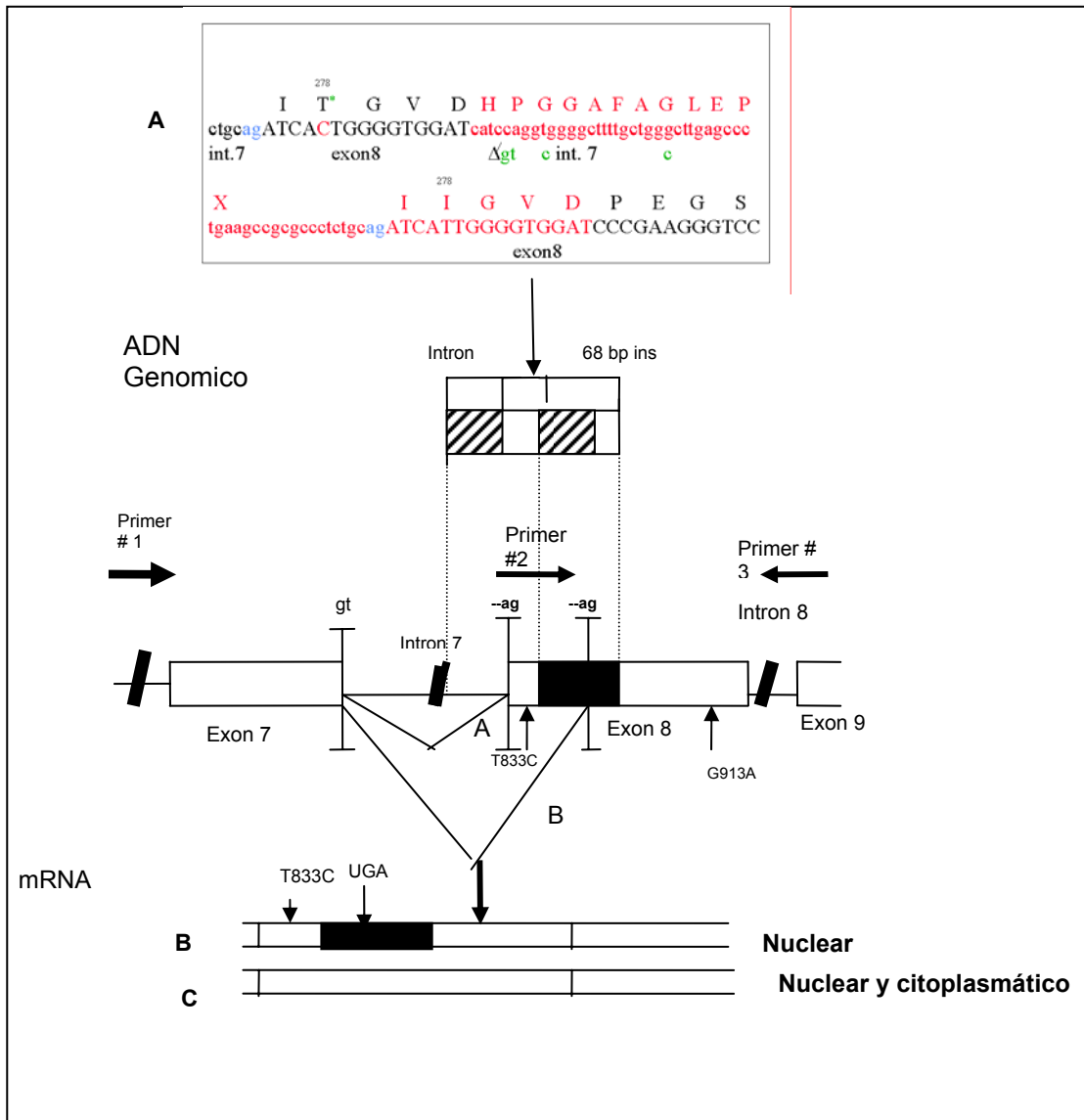
Se han publicado tres polimorfismos, el c.699 C>T, c.1080 C>T y c.1985 T>C, en el ADNc de la CBS con una alta prevalencia de estos en un alelos de origen caucásico (Kraus, *et al.*, 1993). Por otra parte en 1995, se encontró un cambio en el exón 8 de la CBS (844 ins 68), este consistió en una inserción de 68 pb así: 53 pares de bases del intrón 7 y 15 pares de bases del exón 8 (Figura 7A) (Sebastio *et al.*, 1995). Esta es una duplicación que genera dos aceptores de splicing del intrón 7, de esta manera se producen una isoforma anormal de ARNm (Figura 7B) detectada en el núcleo de fibroblastos cultivados que retiene la inserción de 68 pb y produce una terminación prematura de la transcripción; la isoforma normal usa el segundo aceptor (Figura 7C), este ARNm es exportado al citoplasma (Sperandeo, *et al.*, 1996b). Al encontrar esta inserción en un paciente con hiperhomocisteinemia severa se pensó que ésta era la causa de la enfermedad. Sin embargo estudios posteriores mostraron que la secuencia insertada era eliminada a través del splicing de la parte distal del intrón 7 – exón 8; lo que produce como resultado un tamaño normal de ARNm de CBS (Tsai, *et al.*, 1996 b). Esta variante alélica descrita en población caucásica normal se encontró en un estudio con población norteamericana con una prevalencia del 11% de la población (Tsai, *et al.*, 1996 b). Un análisis adicional encontró asociación significativa entre este polimorfismo y enfermedad arterial oclusiva prematura (Orendac, *et al.*, 1999).

Este polimorfismo ha sido investigado como factor de riesgo en la enfermedad oclusiva arterial e hiperhomocisteinemia, los resultados son contradictorios; para algunos investigadores entre ellos Kluijtmans, *et al.*, (1998) quienes luego de analizar un grupo de 184 casos no encuentran asociación entre este polimorfismo y la enfermedad vascular. Para otros como Orendac, *et al.*, (1999) encontraron una alta prevalencia del polimorfismo 844 ins 68 de la CBS en forma heterocigota, en un grupo de 161 pacientes con enfermedad oclusiva arterial periférica. Este hallazgo es considerado como un factor de riesgo moderado para la enfermedad, mientras otros como Franchis, *et al.*, 2000 reportaron que la presencia en estado heterocigótico del polimorfismo c. 844 ins68 no es *per se* un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad oclusiva prematura, pero si este polimorfismo se encuentra en combinación con otros genotipos, incrementa cuatro veces el riesgo de enfermedades oclusivas por aumento del grado de hiperhomocisteinemia.

Las mutaciones sinónimas o los polimorfismos han sido relacionado con la expresión de las enzimas y, la estabilidad del transcrito, que da como resultado una actividad reducida de la CBS, algunos autores han encontrado que los polimorfismos sinónimos del gen de la CBS (c.699 C>T en el exón 6 y c.1080 C>T en el exón 10) muestran una asociación con hiperhomocisteinemia pos carga de metionina y estos investigadores proponen que puede estar implicado un desequilibrio de ligamiento de estos

polimorfismos silentes con elementos regulatorios de la transcripción del gen de la Cistationina  $\beta$  Sintasa, de esta forma se aumentan los niveles plasmáticos de homocisteína, Aras, *et al.*, (2000).

En un estudio de 381 controles y 190 pacientes con enfermedad cardiovascular se evaluó la relación entre los polimorfismos sinónimos del gen de la CBS (c.699 C>T en el exón 6 y c.1080 C>T en el exón 10) con los niveles de homocisteína; y no se encontró ningún genotipo definido por estas variantes que estuviera asociado con elevadas concentraciones de homocisteína. Sin embargo observaron ligamiento entre las tres variantes CBS estudiadas, Lievers, *et al.*, (2003).



**Figura 7. Polimorfismo c.844 inserción 68 pb de la CBS**

En la parte A de la figura se observa la secuencia de 15 pares de bases (en letras mayúsculas) del exón 8 con la mutación T833C que han sido insertada en el intrón 7, y la duplicación de 53 pares de bases (en letras minúsculas) del intrón 7, esta duplicación genera sitios alternativos de procesamiento, y se producen dos isoformas de ARN. Cuando el primer aceptor es usado el resultado es la isoforma anormal de ARN (B) con terminación prematura de la transcripción, únicamente es detectado en el núcleo de las células, de esta forma se elimina la mutación c. 833 T C. En el núcleo y citoplasma se observa el ARN con la secuencia normal (C). Modificado de Sperandio, *et al.*, (1996b).

- **Polimorfismos de la MTHFR**

En el gen de la *MTHFR* el polimorfismo c.677 C>T reduce la actividad de la enzima, el cambio de una citosina por una timina en el exón 4 resulta en la sustitución del aminoácido alanina por una valina. Cuando este polimorfismo está presente, la actividad de la enzima se ve disminuida *In vitro* a una temperatura de 37°C y esto conduce a un incremento de la homocisteína total en plasma. La frecuencia del polimorfismo c.677 C>T ha mostrado tener variaciones étnicas y regionales. En Italia y entre hispanos que viven en California la frecuencia es alta, para los afroamericanos y en zonas del sur del Sahara es baja. En los hispanos este polimorfismo parece ser muy común (Mutchinick, *et al.*, 1999).

- **Mutaciones de la CBS humana**

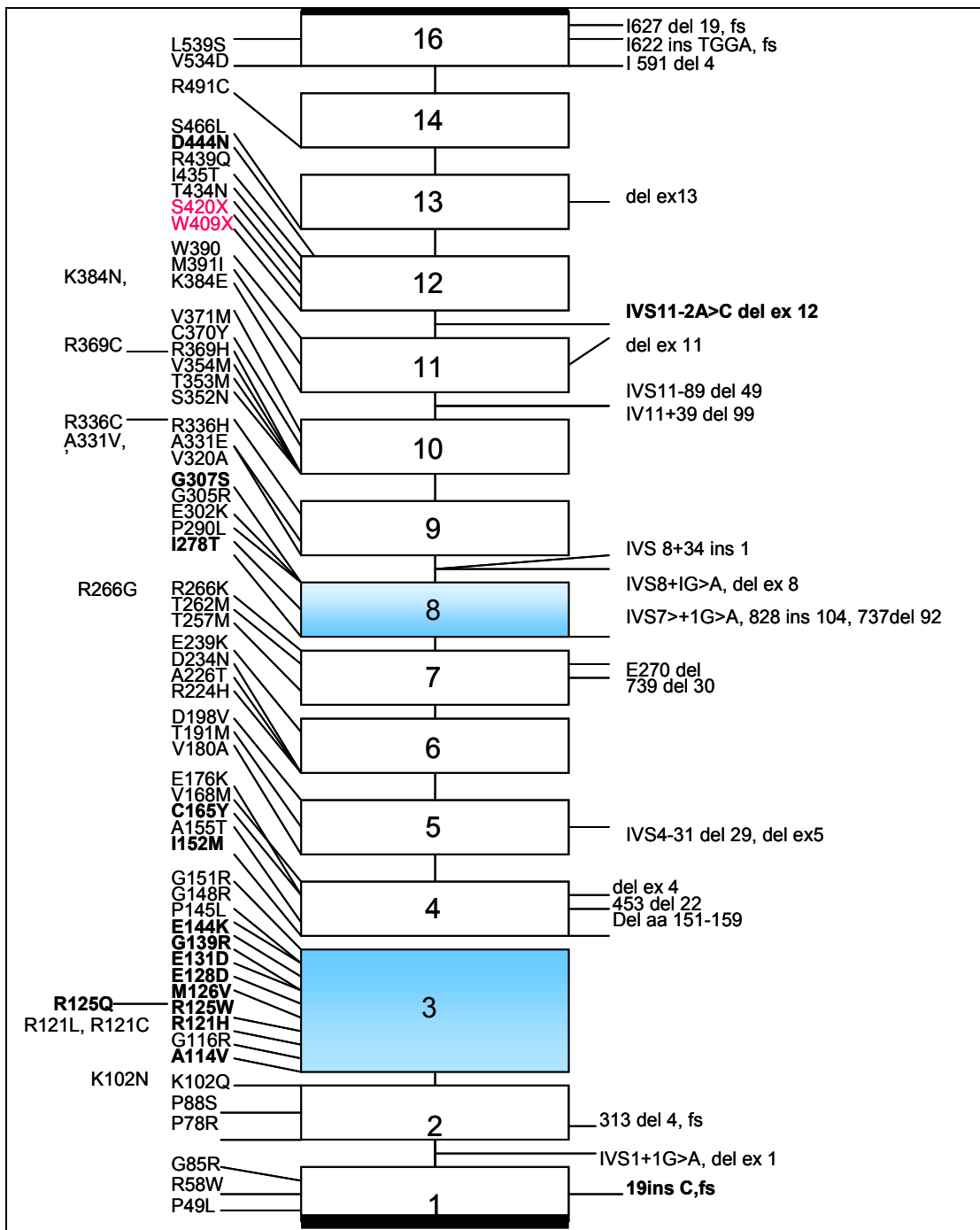
Se han reportado 132 mutaciones asociadas a la homocistinuria en 450 alelos homocistinúricos (Kraus, *et al.*, 1999, <http://www.uchsc.edu/cbs> ) La mayoría de estas mutaciones son *missense*; una de las dos mutaciones más frecuente es la p.G307S. Los fenotipos clínicos observados en los pacientes con esta mutación son diferentes, Kraus, (1994) describieron que aun cuando los pacientes con esta mutación no tienen actividad de CBS en fibroblastos y, no se detectan subunidades de la enzima en los extractos y, que algunos disminuyen los niveles de homocisteína con el tratamiento,

generalmente pacientes con la mutación p.G307S no responden al tratamiento, esta mutación ha sido detectada en pacientes americanos y australianos de origen “celta” y es la causa de homocistinuria más común en Irlanda (Figura 8). La segunda mutación más frecuente es p.I278T, que produce un fenotipo que responde a la piridoxina (Shih, *et al.*, 1995). La tercera mutación más frecuente es la mutación producida en el exón 12 por ausencia de “splicing” en el intrón 11 (IVS11-2AC) encontrada únicamente en el 20% de la población de origen germano y turco. Esta mutación no ha sido detectada en ninguna otra población de Europa central.

Las mutaciones producidas por la desaminación de metilcitosinas (CpG) representan el 53% de todas las sustituciones puntuales en la región del gen de la CBS (Kraus, *et al.*, 1999).

Las bases moleculares de la deficiencia del gen de la CBS fueron investigadas en 29 pacientes holandeses pertenecientes a 21 familias no relacionadas, se estudio la posible relación genotipo- fenotipo con la expresión bioquímica, clínica y la respuesta al tratamiento; se detectaron 10 mutaciones diferentes y la (c.833T>C) p.I278T fue la más predominante (55%) de 42 alelos independientes. Al momento del diagnóstico los 12 homocigotos para esta mutación mostraron niveles de homocisteína más altos que los 17 pacientes con otros genotipos, con manifestaciones clínicas similares. Los homocigotos para la mutación p.I278T responden a la piridoxina, en estos pacientes los valores de homocisteína se disminuyeron cuando se administró tratamiento con dosis farmacológicas de piridoxina, 5

mg/día de ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub>, (Kluijtmans, *et al.*1999). Una nueva clase de mutaciones “*missense*” p.P422L y p.S466L (Figura 5) localizadas en la región no catalítica C terminal de la CBS que producen enzimas que son catalíticamente activas pero no responde al S adenosilmetionina (SAM) estas fueron identificadas, en pacientes que sufren trombosis prematura y tienen niveles de homocisteína similares a homocistinúricos pero sin compromiso del tejido conjuntivo. Estos hallazgos ilustran la importancia de SAM en la regulación del metabolismo de la homocisteína y son consistentes con la posibilidad que los cambios a nivel del tejido conectivo observado en los homocistinúricos no sean producidos por la elevación de la homocisteína, (Maclean *et al.*, 2002). Por otra parte, han sido descritas mutaciones de la CBS encontradas en 16 pacientes de la península ibérica, la mutación p.T191M se encontró en el 50% de los alelos estudiados mientras que el resto corresponde a mutaciones diferentes (Urreizti, *et al.*, 2003). En cada uno de los grupos estudiados se encontraron una o dos mutaciones más frecuentes para el 32 al 70% del total de alelos, el remanente corresponde a mutaciones propias de cada población haciendo difícil el tamizaje en la población en general Figura 8 (Kraus, *et al.*, 1999).



**Figura 8. Mutaciones de la cistationina  $\beta$  sintasa (CBS) humana.**

La Figura muestra la localización de las mutaciones de la cistationina  $\beta$  sintasa CBS humana. Los exones se muestran a escala pero no los intrones. A la derecha se muestran las deleciones e inserciones y a la izquierda las mutaciones *missense* y *nonsense*, Kraus *et al.*,1999.

## 2. 5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA

La hiperhomocisteinemia severa (homocistinuria) es un trastorno multisistémico de inicio lento y de curso progresivo. Los niños afectados son normales al nacimiento y en el periodo lactante pueden presentar síntomas inespecíficos; alteración del crecimiento y retraso en el desarrollo sicomotor. Una vez desarrollado el cuadro clínico, la sintomatología es muy característica. Las manifestaciones clínicas incluyen deformidades esqueléticas (osteoporosis, escoliosis hábitos marfanoides) alteraciones oculares (miopía, hipermetropía, *ectopia lentis*, glaucoma), retardo mental, complicaciones vasculares (prematura arterioesclerosis), sistema nervioso central (SNC) (retardo mental, convulsiones y trastornos psiquiátricos) (Kennedy, *et al.*, 1965, Mudd, *et al.*, 2001). Estas manifestaciones clínicas dependen de la edad del diagnóstico, cuando éste se realiza en la época neonatal se previenen las alteraciones oculares, esqueléticas, complicaciones vasculares y se logra el normal desarrollo de la inteligencia, cuando el diagnóstico se realiza en la infancia o la juventud se previenen las complicaciones vasculares y se mejora la calidad de vida de los pacientes (Yap, 2003).

La hiperhomocisteinemia produce consecuencias clínicas variadas como son los eventos asociados a hipercoagulabilidad expresada clínicamente como trombosis arterial y venosa. La enfermedad cardiovascular se origina por la

interacción entre los genes y el medio ambiente y se crea un gradiente de susceptibilidad a la enfermedad. En 1969 McCully observó lesiones vasculares en niños con hiperhomocisteinemia severa (homocistinuria) esto lo llevo a proponer la hipótesis de la hiperhomocisteinemia como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad vascular. El elevado riesgo de mortalidad por enfermedad cardiovascular no puede ser totalmente explicado por los factores de riesgo como hiperlipidemia, tabaquismo e hipertensión; actualmente la hiperhomocisteinemia moderada es reconocida como un factor de riesgo independiente en el desarrollo de esta enfermedad, (Boers, *et al.*, 1985b, Kang, *et al.*, 1991b, Graham, *et al.*, 1997, Alpert, 1999, Welch y Lozcano , 1998, Wilcken, 2003). Hasta el momento se han realizado numerosos estudios epidemiológicos buscando el origen genético de la relación entre hiperhomocisteinemia y enfermedad vascular. Para algunos autores existe una fuerte correlación entre el genotipo T/T del polimorfismo c.677C>T de la MTHFR y la hiperhomocisteinemia moderada (Goyette, *et al.*, 1996, Hanson, *et al.*, 2001). Mientras que otros demostraron que los niveles de homocisteína total y el genotipo T/T del polimorfismo c.677C>T de la MTHFR están fuertemente asociados en pacientes con disección de la arteria cervical (Pezzini, *et al.*, 2002). Alteraciones en el metabolismo de la metionina, como el producido por ser heterocigoto para la deficiencia de CBS, puede ser la causa de la hiperhomocisteinemia detectada luego de una carga de metionina en cerca del 30 % de los pacientes con enfermedad arterial periférica oclusiva y cerebro vascular coronaria (Boers *et al.*, 1985b).

## 2.6 FISIOPATOLOGÍA DE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA

El efecto del aumento en la concentración de homocisteína es el factor responsable de las principales manifestaciones clínicas de la homocistinuria (Mudd, *et al* 1985). Hasta el momento no se conoce con exactitud cual es el efecto de la homocisteína sobre el tejido conjuntivo, posiblemente éste aumento de homocisteína se relacione con la inhibición de la síntesis y entrecruzamiento de las moléculas de colágeno (Ugarte, *et al.*, 2000), la homocisteína se transforma en homocisteína tiolactona y esta inhibe a la enzima lisil-oxidasa (Haedecke, *et al.*, 1999), la función de esta enzima es producir aldehídos, por oxidación de los grupos amino terminal de la lisina e hidroxilisina; estos aldehídos van a formar los enlaces intra e intermoleculares del colágeno maduro (Sittman, 1993).

Adicionalmente, la fibrilina, proteína formadora de tejido conjuntivo, es una glicoproteína rica en residuos de cisteína; los enlaces disulfuro son necesarios para mantener la estructura integral de esta proteína. Al estar alterado el metabolismo de la metionina que conduce a la síntesis de cisteína, se disminuye la síntesis de fibrilina (Revisado en Haedecke, *et al.*, 1999).

Por otra parte el daño sobre el sistema nervioso central es atribuido al ácido homocisteico (derivado de la homocisteína) el cual ejerce una acción agonista sobre el ácido glutámico en su sitio de unión a los receptores N-metil, ácido aspártico (NMDA). Se sabe que la excesiva estimulación sobre

estos receptores produce daño y muerte neuronal (Lipton, *et al.*, 1997). Adicionalmente la hipometilación de las proteínas de la mielina y de los neurotransmisores contribuye al retardo mental observado en los pacientes con diagnóstico de hiperhomocisteinemia severa. Hasta el momento no es conocido con exactitud como la hiperhomocisteinemia contribuye al desarrollo de la enfermedad cardiovascular, ni cuales son los factores que desencadenan el aumento de homocisteína observado en estos pacientes (Pezzini, *et al.*, 2002). Para algunos investigadores la homocisteína promueve la agregación plaquetaria por inhibición del óxido nítrico (Lentz, 1998). Por otra parte, otros autores encontraron una asociación entre hiperhomocisteinemia y daño de la regulación endotelial (Tsai, *et al.*, 1994 Woo, *et al.*, 1997). Adicionalmente varios grupos han demostrado que la homocisteína estimula la proliferación del músculo liso de los vasos y proponen que el efecto puede estar mediado por mecanismos oxidativos (Tsai, *et al.*, 1996c); mientras otros investigadores encuentran una correlación positiva entre la homocisteína del plasma y la peroxidación de los lípidos lo cual sugiere que el posible rol de la homocisteína sea el de liberar especies reactivas de oxígeno (Moselhy y Demerdash 2004); las especies oxidativas pueden ser  $H_2O_2$ , anión súper óxido y radical hidroxilo. Recientemente fue reportado que la homocisteína produce una doble estimulación del crecimiento celular e incremento de 1.5 veces de la síntesis de ADN en células musculares tratadas con catalasa en una vía independiente de la producción de  $H_2O_2$  (Ozer, *et al.*, 2003).

## **2.7 DIAGNÓSTICO DE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA**

El diagnóstico de la hiperhomocisteinemia severa y de la hiperhomocisteinemia moderada se realiza a partir de la historia clínica, seguido de los análisis bioquímicos (determinación de metabolitos en los fluidos biológicos orina, sangre, confirmación del defecto enzimático) y el estudio genético molecular (De Lucca y Casique, 2004).

### **2.7.1 Diagnóstico Clínico**

El cuadro clínico consiste en: subluxación del cristalino (*ectopia lentis*), miopía que en ocasiones precede a la luxación y el glaucoma que se debe al bloqueo pupilar por el cristalino luxado. Las alteraciones esqueléticas, como la osteoporosis desde la niñez produce escoliosis, fracturas patológicas y colapso vertebral. Pueden presentar otras deformidades óseas como *genu valgum*, *pectus excavatum* o *carinatum* y pies cavos. Estos pacientes pueden presentar un grado variable de retraso mental y trastornos del aprendizaje. Las alteraciones vasculares son frecuentes y es común la presentación de enfermedad cerebro vascular de forma temprana con hemiparesia secundaria (Mudd, *et al.*, 2001).

## 2. 7 2. Diagnóstico Bioquímico

- **Medida de metabolitos**

Los estudios bioquímicos iniciales se realizan mediante la identificación de homocistina en orina, se utiliza nitroprusiato de sodio y de plata, separación de aminoácidos en orina y en plasma por cromatografía en capa fina, con posterior cuantificación de aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico (autoanalizador) y el sistema IMx, el método de inmunoensayo de polarización fluorescente (Shipchandler y Moore, 1995). Adicionalmente, cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas para descartar un aumento de ácido metilmalónico como consecuencia de la deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>. Algunos países como Irlanda (Yap y Naughten, 1998) han incluido en los programas de tamizaje en el recién nacido, la determinación de metionina en papel de filtro, por un método de ensayo de inhibición bacteriana.

En Colombia, instituciones privadas como Pregen utilizan la prueba de nitroprusiato de sodio y cromatografía de aminoácidos en orina para la detección de posibles afectados. El tamizaje para identificar hiperhomocisteinémicos debe ser considerado en pacientes con alto riesgo de enfermedad vascular aterosclerótica (Stein y McBride 1998). La cuantificación de homocisteína basal y pos carga de metionina debe realizarse en el periodo de convalecencia de un evento coronario (Meiklejohn, *et al.*, 2001). Durante la fase aguda del accidente cardiovascular

se bajan los niveles de albúmina y se ha visto que las concentraciones de homocisteína disminuyen, posiblemente por que la homocisteína va unida a la albúmina plasmática (Egerton, *et al.*, 1996). En esta fase puede presentarse stress oxidativo con producción de radicales libres y cambios en la tasa de eliminación de los tioles que incluye a la homocisteína (Lindgren, *et al.*, 1995). Una primera aproximación en el diagnóstico de la hiperhomocisteinemia moderada, consiste en conocer los niveles de homocisteína basal y pos carga de metionina. Cuando existe deficiencia en folato, la concentración de homocisteína basal en estos individuos es 10 veces mayor que la concentración de homocisteína en los controles, esta concentración no aumenta con la carga de metionina, mientras que los individuos que tengan alteración en los niveles de homocisteína por disminución de vitamina B<sub>6</sub> no se detectan al cuantificar la homocisteína basal pero si al suministrar la carga de metionina, como fue demostrado en trabajos con ratas deficientes de vitamina B<sub>6</sub> donde los niveles de homocisteína basal encontrados no fueron diferentes a los controles como se demostró en el trabajo de Miller, *et al.*, (1994), por el contrario al suministrar la carga de metionina, se puso de manifiesto la deficiencia de vitamina B<sub>6</sub> en estas ratas, por un incremento de más de un orden de magnitud en la concentración de homocisteína plasmática con respecto a los controles.

Con el suministro de la carga de metionina son detectados los individuos que tengan alteración en los niveles de homocisteína por disminución de folato

como fue demostrado en las ratas deficientes de esta vitamina. Este resultado es fuerte evidencia que la respuesta a la carga de metionina difiere según la ruta de catabolismo de la metionina que se encuentre alterada (Smolin y Benevenga 1984). La Adenosilmetionina (SAM) es un efector en la regulación del metabolismo de la metionina, lo cual implica que si la concentración de SAM es alta, se activa la transulfuración de la homocisteína y la remetilación es inhibida, como fue propuesto por Miller, *et al.*, (1992). La síntesis *de novo* de la metionina y SAM es controlada para mantener la concentración de homocisteína a niveles no tóxicos en la célula. Cuando la transulfuración o la metilación están deficientes, la célula exporta la homocisteína a la sangre y se produce la hiperhomocisteinemia.

La transulfuración de la homocisteína es inhibida por defecto en la estructura de la CBS o por deficiencia de vitamina B<sub>6</sub>, pero la remetilación continúa (Rosenblatt, 2000). Sin embargo, en este caso solamente una ruta del catabolismo de homocisteína es defectuosa y no se observa una concentración elevada de homocisteína basal. Cuando existe deficiencia de vitamina B<sub>6</sub> y se dá carga de metionina se incrementa la síntesis de SAM, este metabolito es un conocido inhibidor de la MTHFR. El aumento de SAM y la disminución en la actividad de MTHFR aumentan la síntesis de homocisteína y produce hiperhomocisteinemia. El folato es cofactor de la MTHFR al estar disminuido altera la actividad de la enzima y se disminuye la síntesis de metionina y ocurre la hiperhomocisteinemia. Tras carga de metionina se incrementa la síntesis de SAM y de homocisteína, se activa la

CBS pero la consecuencia de ese incremento es diferente a lo observado en deficiencia de vitamina B<sub>6</sub>.

En humanos Park y Linkswiler, (1970), han detectado homocisteína en la orina de hombres deficientes en vitamina B<sub>6</sub> y, en mujeres deficientes en vitamina B<sub>6</sub> encontraron una homocisteína elevada solamente después de una carga de metionina. Por otra parte se encontró hiperhomocisteinemia luego de la carga de metionina en pacientes con enfermedad cardiovascular quienes tenían disminuidos los niveles de vitamina B<sub>12</sub> o de folato en las células rojas o los dos (Brattstrom y Wilcken, 2000).

- **Cuantificación enzimática**

La caracterización enzimática de los pacientes con hiperhomocisteinemia severa (homocistinuria) puede realizarse mediante el estudio directo utilizando sustratos marcados radiactivamente. La actividad de la CBS cataliza la condensación de homocisteína y serina en presencia de fosfato de piridoxal. Su actividad se puede medir en extracto de células obtenido del cultivo de fibroblastos de piel o en biopsia hepática en presencia y ausencia de Fosfato de piridoxal (PLP) o de S-adenosilmetionina, utilizando L-[U-<sup>14</sup>C] serina y homocisteína como sustratos de la reacción. El producto [<sup>14</sup>C] cistationina, se separa del sustrato mediante cromatografía en papel (Fowler, et al., 1978).

La actividad de la MTHFR cataliza la reducción de 5,10-metiléntetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato. El ensayo mide la reacción en sentido inverso y, determina la oxidación del [5-<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>] tetrahidrofolato a [<sup>14</sup>C] formaldehído y ácido tetrafólico tanto en presencia como en ausencia de Flavin adenosin dinucleotido (FAD). Así mismo la actividad enzimática se puede medir en extracto de células obtenido del cultivo de fibroblastos de piel o en biopsia hepática y estudiar la termolabilidad de la enzima a 46 °C. Los pacientes con deficiencia severa en MTHFR presentan actividad residual que varia desde no detectable a 20% con respecto a los controles.

### **2.7.3 Diagnóstico Genético Molecular**

El diagnóstico genético se puede realizar luego de aislar el ADN por cualquiera de los métodos recomendados fosfato cálcico o fenol cloroformo (Maniatis *et al.*, 1982), por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando primers que amplifican los exones 3, 5 y 8 donde han sido reportados el mayor número de mutaciones o la mutación de interés. La genotipificación es la metodología más recomendada, como lo demuestra un estudio realizado en un grupo de 500 niños daneses nacidos vivos quienes participaron en un estudio para analizar la mutación más común en esta población, la c.833CT, se detectó una prevalencia de hiperhomocisteinemia severa de 1/ 20500 (Gaustadnes *et al.*, 1999). Por otra parte en una población de 1133 muestras de niños noruegos el tamizaje molecular de las

6 mutaciones de la CBS, encontradas en esta población (c.785CT, c.797GA, c.833TC, c.919GA, c.959TC, c.1105CT), mostró una prevalencia de hiperhomocisteinemia severa de 1/6000 nacidos vivos. (Refsum *et al.*, 2004 a). Siendo estas frecuencias más altas que las encontradas por tamizaje bioquímico 1/58.000 a 1 / 1000000 (Mudd, *et al.*, 2001).

- **Detección de las mutaciones y de polimorfismos**

Las mutaciones y los polimorfismos se pueden detectar por: Análisis de restricción (RFLP). Muchas mutaciones alteran dianas de restricción para endonucleasas permitiendo dicho análisis (Desviat, *et al.*, 2001). Se utilizan enzimas, que van a reconocer una secuencia específica de nucleótidos o sitio de restricción y, se separan los fragmentos generados mediante electroforesis en geles de agarosa o acrilamida. También se puede hacer por secuenciación directa de los productos amplificados.

- **Identificación de heterocigotos**

La identificación de heterocigotos se realiza por medio de ensayos enzimáticos, medida de metabolitos y genotipificación. La actividad de las enzimas se puede medir en biopsia de hígado, linfocitos estimulados con fitohemaglutinina en extracto de células obtenido del cultivo de fibroblastos de piel o en biopsia hepática. No obstante estas determinaciones han mostrado solapamiento entre los valores bajos de los controles con los

portadores (Tsai, *et al.*, 1996a, Boers, *et al.*, 1985a). Por otra parte, se pueden determinar metabolitos en orina y plasma en ayuno y pos carga de metionina (Sperandeo, *et al.*, 1996a). Otros investigadores sugieren que la relación entre la concentración de homocisteína y cisteína puede ser un buen discriminante, dado que siendo la homocisteína precursora de la cisteína si la relación entre el nivel de homocisteína y el nivel de cisteína es mayor que el valor de referencia puede indicar que el nivel de homocisteína aumentó o que la cisteína no se está sintetizando, como consecuencia de un defecto en la actividad de la CBS (Boddie, *et al.*, 1998).

## **2.8 TRATAMIENTO DE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA**

La hiperhomocisteinemia puede ser tratada efectivamente por suplementación dietaria con vitamina B<sub>6</sub>. (Barber y Spaeth, 1967, Mudd *et al.*, 2001), algunos pacientes responden al tratamiento disminuyendo las concentraciones plasmáticas de homocisteína y se mejora su condición clínica, mientras que en otros casos los resultados del manejo no son eficaces. Aquellos pacientes que no responden a la piridoxina presentan más anormalidades y pueden ser tratados con combinaciones de ácido fólico, hidroxicobalamina o betaína para estimular la remetilación de la homocisteína a metionina (Smolin, *et al.*, 1981). De esta manera se ha reportado que los altos niveles de homocisteína, predictores de mortalidad por enfermedad cardiovascular, fueron significativamente disminuidos con un

adecuado tratamiento, (Nygard, *et al.*, 1997). Nugent y colaboradores (1998) reportaron el caso de un paciente de 50 años diagnosticado con homocistinuria a la edad de 8 años que recibió tratamiento sin interrupción desde esta edad, con piridoxina y ácido fólico, presentando niveles normales de homocisteína ( $<10\mu\text{M}$ ) sin evidencia de problemas cardiovasculares, función renal estable aunque disminuída, agudez visual de 6 /60 lo que es equivalente a una décima parte de el valor de referencia normal. Por otra parte otros investigadores reportaron que suministrando 0.5 mg de ácido fólico durante dos meses a mujeres homocigotas para la mutación c.677C>T del gen MTHFR, se reduce la concentración de homocisteína en ayunas en un 27%, (Nelen, *et al.*, 1998). El suplemento, ingesta de alimentos ricos en folato y vitamina B<sub>6</sub> y adecuado procesamiento de los alimentos disminuye el riesgo de isquemia coronaria en 16%, trombosis venosa en 25% e infarto en 24% en USA (McCully, 1998, Wald, *et al.*, 2002). La disminución del evento vascular puede ser explicada por la disminución de 3  $\mu\text{mol/ L}$  en la concentración de homocisteína, como también al nivel de lípidos y lipoproteínas que han sido encontrados en un grupo de pacientes homocistinúricos que han sido tratados con piridoxina, ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> (Moat, *et al* 1999).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

Los materiales, reactivos y equipos utilizados en este trabajo fueron suministrados por el Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana, la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana, Colciencias, el Department of Pediatrics, University of Colorado School of Medicine (Denver, Colorado, Estados Unidos), y Departamento de Genética de la Universidad de Barcelona, (Barcelona España).

#### **3.1 MATERIALES.**

##### **3.1.1 Materiales químicos**

Reactivos

##### **Pruebas bioquímicas cualitativas y cuantitativas para identificar metabolitos de la metionina.**

- Cianuro de Sodio (Sigma, S3296).
- Nitroprusiato de sodio (Sigma, S 0501).
- Amonio concentrado (Merck 28-30%).
- Cianuro de Sodio (Sigma, S3296).
- Nitrato de Plata (Sigma, S0139).

- Cromatoplasmas de Celulosa (Merck, Ref. 1.05552).
- Ninhidrina (Sigma, N 1632).
- Acetato de Etilo.
- Cloruro de sodio.
- Acido Fenil Butirico.

### **Cuantificación enzimática.**

- Fosfato de piridoxal: (PLP) (Sigma, P6280).
- Homocisteína tiolactona: (Sigma, H6503)
- N hexadecano (Merck, 820633)
- Parafina (Merck, 7161)
- Ditioneitol (Merck, 111474)
- Serina (Sigma, S 4500)
- S-Adenosil- L- Metionina. SAM (Sigma, 2408)
- Cistationina (Sigma, C7505)
- Albúmina (Calbiochem, 126615)
- Líquido de centelleo (optiphase highsaf 2 MBV AG XSC-9195).
- Placas de sílica gel (Merck, F<sub>254</sub>).
- Alcohol butílico (Sigma, B 1417).
- Acetona (Merck, 100014).
- Ácido acético (Merck, 62).

- LU serina 14 C (Sigma, S9971).
- Cistationina marcada <sup>14</sup> C (Sigma, H6503).
- NaOH (Merck, 9956).

### **Análisis molecular**

- Wizarf Plus SV Minipreps ADN Purification System de Promega
- Taq ADN Polimerasa (Promega, M1865).
- MgCl<sub>2</sub> (Promega, A351B).
- Nucleotidos: dATP, cATP, dGTP, dTTP. (Promega, U1330).
- Agarose Seakem Bam (Biowhittaker, A61915).
- Bromuro de Etidio (Merck, Ref. 102243).
- Acrilamida (Gibco, 1024756).
- N, N'-Methylene-Bis-Acrylamide (Sigma, M2022).
- Temed (N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine) (Sigma).
- Persulfato de Amonio (Promega)
- Ácido Bórico (Merck, K25248665).
- EDTA. (Sigma, 35h0356).
- Tris. (Gibco, Ref. 449105).
- Etanol (Merck,6100)
- Ácido Nítrico (Mallinek, Ref: 2704-45).
- Ácido Acético Glacial. (Merck, Ref. 2504-05).
- Formaldehído 37%( Sigma, Ref. F-1635.).
- Carbonato de Sodio (Merck, Ref. 1.06392).

- Nitrato De Plata (Carlo Erba, Ref. 423952).

### **Mutagénesis inducida**

- Kit para mutagénesis dirigida. (Stratagene, 200518)
- Albúmina Bovina (Sigma, A7906).
- Kit para secuencia:Termo Sequence cy5.5 (Amersham Biosciences)
- Formamida (Merck, Ref. 61 S 53).
- Hidróxido de Amonio concentrado (Sigma, A6899).

### **3.1.2 Equipos**

- Termociclador: BIO-RAD: modelo: Cycler Termal Cycler:
- Cámara de electroforesis horizontal: : BIO-RAD: modelo: ADN sub cell: fuente de poder: serie: P500A:
- Cámara De Electroforesis Vertical: serie: 125BR. voltaje: 600VDC.
- Fuente de Poder: Bio-Rad.Modelo: PowerPac 1000,
- Centrífugas Refrigeradas: Hermle-Labortechnik modelo Hermle Z200m/H
- Hermle-Labortechnik Modelo: Hermle Z323
- Shaker: New Brunswick Scientific: Modelo: G24. Environmental Incubator Shaker.Poder: 0-500rpm.
- Baños Precisión Scientific Group.Modelo: Water Bath.
- Incubadora.
- Camara de flujo laminar.

### **3.1.3 Materiales Biológicos**

Se estudió una población de 102 personas asintomáticas, 11 pacientes y 28 familiares de estos.

#### **3.1.3.1 Metodología**

Estudio piloto de corte transversal.

#### **3.1.3.2 Población**

Población asintomática, pacientes con un rango de edad entre 8 meses hasta los 16 años, con diagnóstico clínico de hiperhomocisteinemia severa; igualmente se incluyeron algunos familiares de los pacientes.

#### **3.1.3.3 Muestras**

Ciento dos voluntarios asintomáticos provenientes de la población general, con edades entre 18 y 50 años con residencia en la ciudad de Bogotá, once pacientes con hiperhomocisteinemia severa remitidos del laboratorio Pregon, Instituto Materno Infantil, Universidad de Antioquia e Instituto de Genética de la Pontificia Universidad Javeriana y 28 familiares de los pacientes.

- **Recolección de las muestras**

Previa aceptación del consentimiento informado, se tomó una muestra de sangre de 102 voluntarios sanos provenientes de la población general, con

edades entre 18 y 50 años. No se estratificó por procedencia, grupo étnico, o nivel socio económico. Se aplicó un cuestionario sobre datos de historia clínica para obtener información sobre antecedentes familiares de enfermedades vasculares, estilo de vida, (hábito de fumar, ejercicio, dieta). Así mismo fueron obtenidas muestras de sangre, orina y biopsia de piel de 11 pacientes colombianos en los que se incluyó una pareja de hermanos y 28 personas procedentes de diez familias no relacionadas, con diagnóstico clínico de hiperhomocisteinemia severa (homocistinuria) .

- **Criterios de inclusión.**

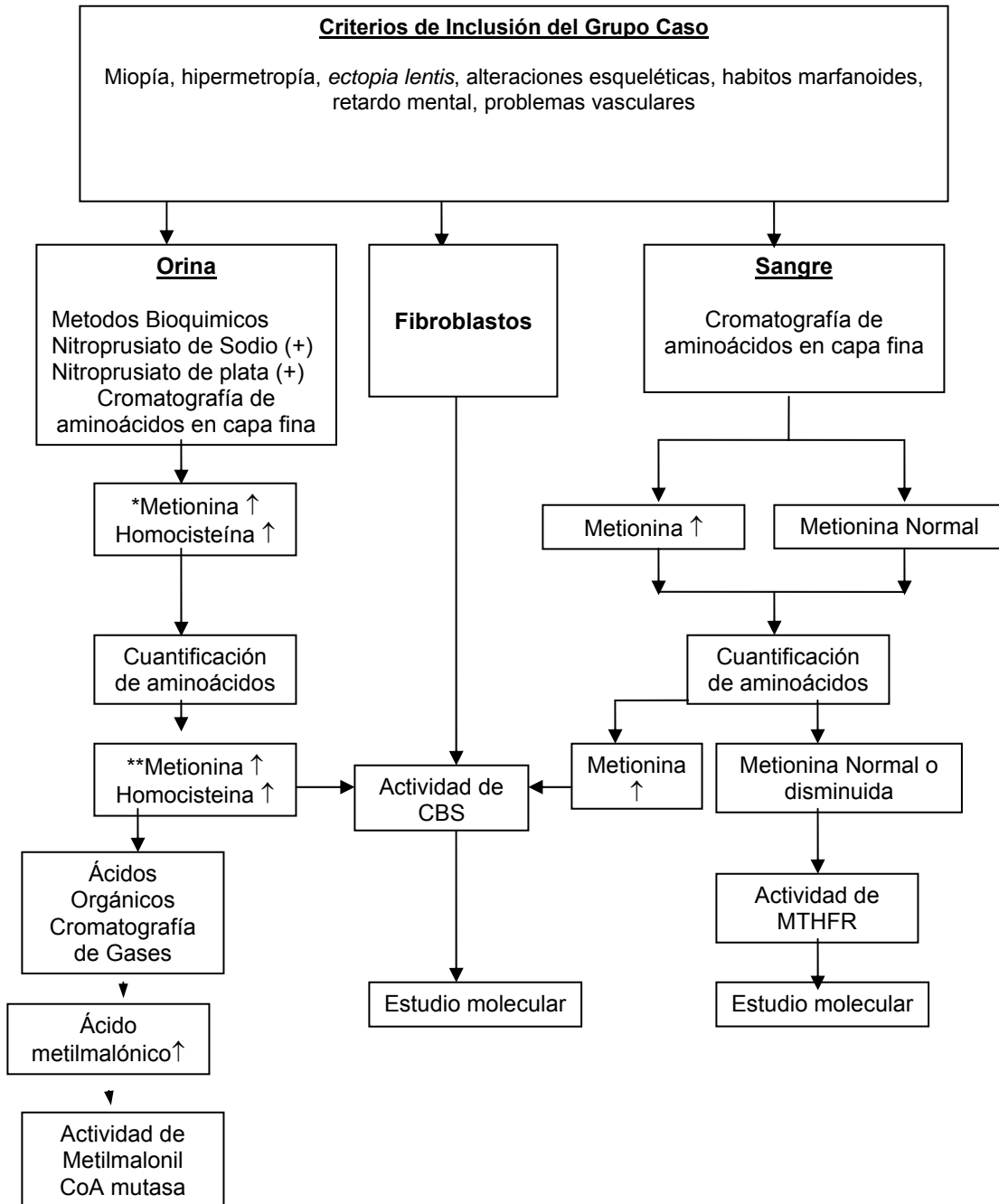
Para el grupo de casos se incluyeron pacientes con alteraciones oculares (miopía, hipermetropía, *ectopia lentis*), alteraciones esqueléticas, hábitos marfanoides, retardo mental, problemas vasculares y familiares de estos pacientes.

Para el grupo control se incluyeron personas de ambos sexos aparentemente sanas con edades entre 18 y 50 años.

- **Criterios de exclusión.**

Se excluyeron individuos con colesterol mayor a 200 mg/dl o triglicéridos mayor a 150 mg/dl, hipertensión arterial mayor de 120/80 o con niveles de glucosa menor de 70mg/dl o mayor de 110 mg/dl.

El esquema del trabajo general fue el siguiente:



**Figura 9. Protocolo de diagnóstico de la hiperhomocisteinemia severa (Homocistinuria).**

El diagnóstico de un error innato del metabolismo se realiza a partir de la sospecha clínica, seguido de la identificación de metabolitos aumentados en los fluidos biológicos, cuantificación de la enzima involucrada y la identificación de la mutación que produce el defecto enzimático. \* obtenidos cualitativamente. \*\*prueba cuantitativa. Modificado de Bermúdez, *et al.*, 2003.

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Métodos Bioquímicos**

La identificación de homocisteína, en orina, se realizó utilizando la técnica de nitroprusiato de sodio y de plata (Thomas y Rodney 1973).

- **Nitroprusiato de sodio**

EL ensayo del nitroprusiato es utilizado para la detección de desórdenes metabólicos asociados con un aumento de la excreción de grupos sulfhídricos oxidados. Estos compuestos como la homocistina o cistina al ser inicialmente reducidos con cianuro de sodio, reaccionan con el nitroprusiato de sodio (con grupos sulfhídricos libres), producen una coloración de rosa a púrpura (Thomas y Rodney 1973) Anexo 2.

- **Nitroprusiato de plata**

Este método permite diferenciar la homocistina de la cistina. La homocistina es oxidada por el nitrato de plata y reacciona con el nitroprusiato de sodio dando un complejo de color magenta (Thomas y Rodney, 1973) Anexo 2.

- **Cromatografía de aminoácidos en capa fina**

Los aminoácidos de las muestras de sangre, en ayunas colectados en tubos con EDTA o heparina y orina se separan, por partición entre una fase

estacionaria (cromatoplasmas de acetato de celulosa) y una fase móvil constituida por una mezcla de solventes: Acetona, alcohol butírico, ácido acético glacial, agua destilada en las siguientes proporciones: 14:14:2.8:9.2: Los aminoácidos son revelados con una solución de ninhidrina. Ver anexo 2.

- **Cuantificación de aminoácidos.**

La homocisteína y la metionina se cuantificaron utilizando un analizador de aminoácidos en el centro de Diagnóstico de enfermedades Moleculares de la Universidad Autónoma de Madrid, España. En Colombia la homocisteína se cuantificó por el sistema IMx de Abbott. Este método (IMx de Abbott) se basa en un inmunoanálisis de polarización de la fluorescencia (FPIA) (Shipchandler y Moore, 1995).

La homocisteína y las formas de homocisteína como disulfuro mixto y unidas a proteínas (HCY-SS-HCY, Proteína-SS-HCY) presentes en la muestra se reducen con DTT y se forma homocisteína libre.

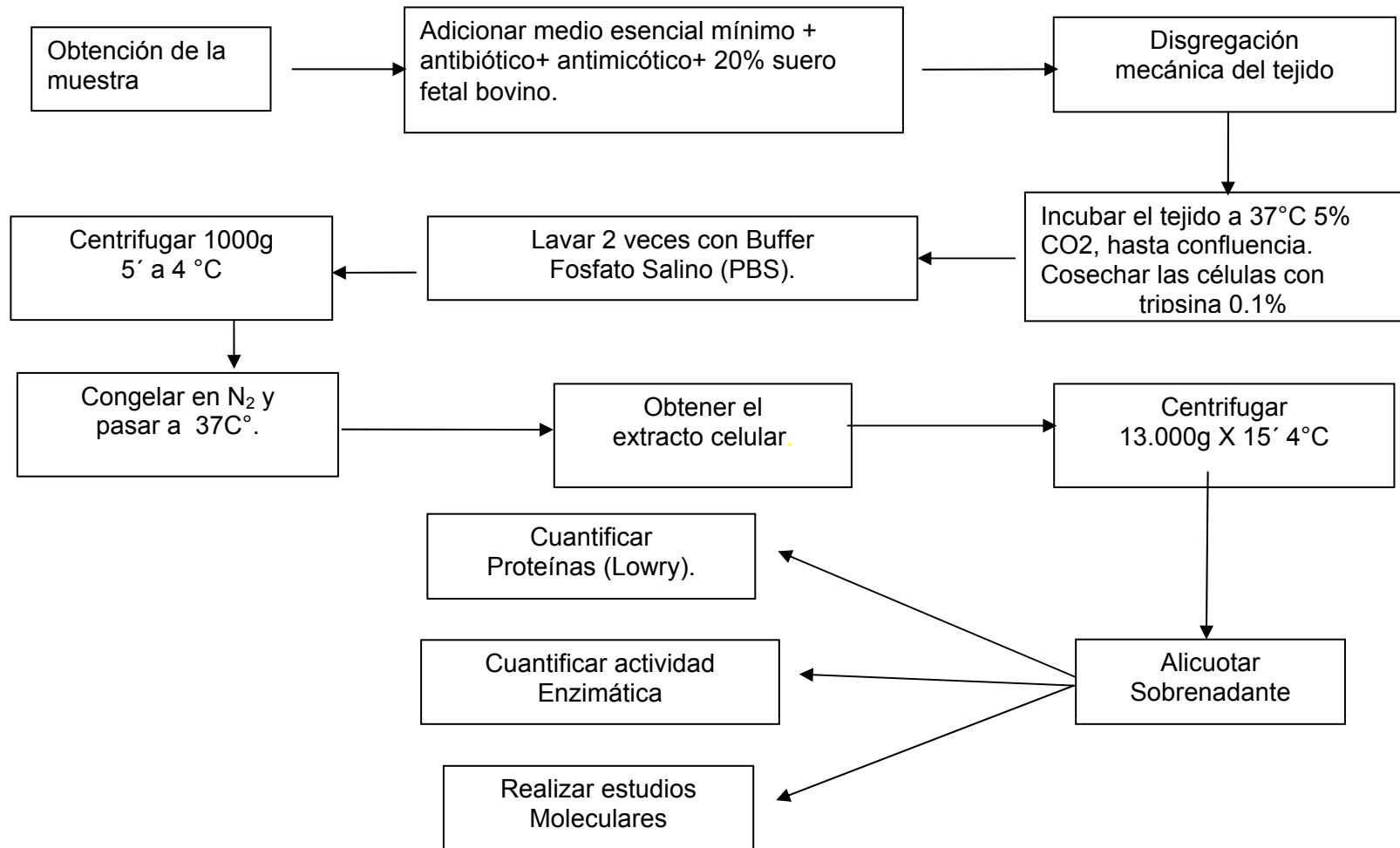
Se utiliza SAH hidrolasa y exceso de adenosina para convertir la homocisteína total libre en S-adenosil-L-homocisteína (SAH). Posteriormente se adiciona SAH marcada con un compuesto fluorescente más el anti SAH. Al competir la SAH de la muestra y la marcada por el antiSAH, se detecta una disminución de la luz polarizada, que será directamente proporcional a la cantidad de SAH de la muestra. (Abbott Laboratorios, 1994, Refsum, *et al.*, 2004b)

- **Estudio de ácidos orgánicos**

La prueba para detectar alteración en la producción de los ácidos orgánicos se realizó extrayendo, separando e identificándolos a partir de muestra de orina, por cromatografía de gases en un equipo Hewlett Packard 6890 acoplado a detector de masas 5793 (Chalmers y lawson 1982) Anexo 2.

- **Cuatificación de la actividad de la enzima CBS.**

Para la cuantificación de la actividad de la enzima se inicia con la toma de muestra de tejido para el cultivo de fibroblastos, esta toma fue realizada por cada uno de los médicos tratantes de los pacientes. Los controles se obtuvieron del Instituto materno Infantil. En condiciones de máxima asepsia, el cirujano obtiene una porción de piel (2-3 mm de diámetro). Las biopsias fueron colocadas en frascos estériles con 5 ml de medio de cultivo MEM, 20% de suero fetal bovino y una mezcla de antibiótico y antimicótico. Luego se procedió según la secuencia descrita en la Figura 10 (Bermúdez, *et al.*, 2003) y el método descrito por Arrieta, 2002.



**Figura 10. Esquema del proceso para obtener el extracto libre de células a partir del cultivo de fibroblastos de piel. Modificado de Bermúdez, et al., 2003.**

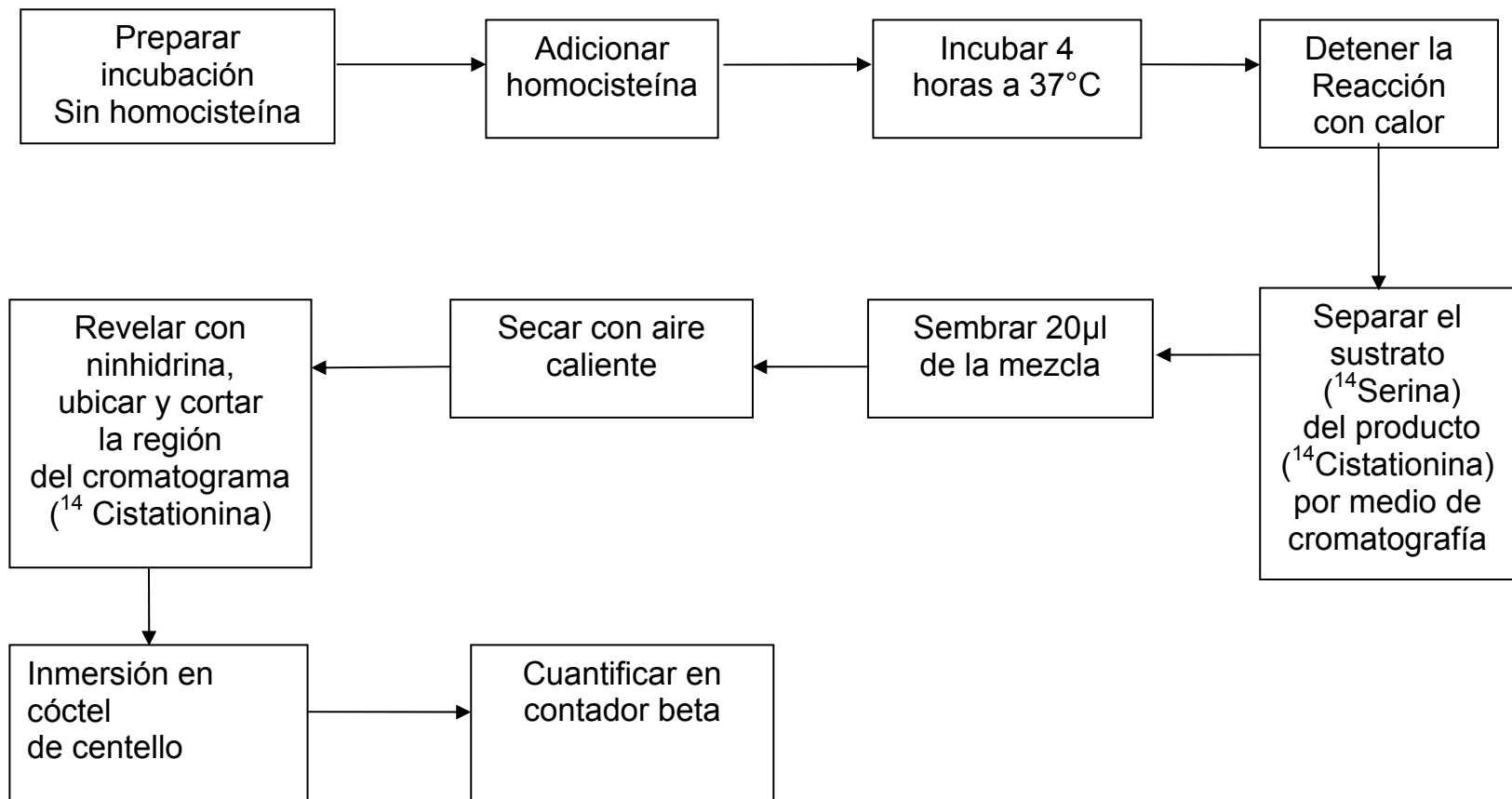
Luego de la cosecha se procedió a cuantificar la proteína según el método de Lowry (1951) y determinar la actividad enzimática con el protocolo que se describe a continuación.

La actividad CBS cataliza la condensación de homocisteína y serina en presencia de fosfato de piridoxal (PLP). Se puede medir en extracto de células obtenido del cultivo de fibroblastos de piel, utilizando el método radioisotópico de Fowler, *et al.*, (1978) que consta de 3 fases: la primera, preparación de la mezcla de incubación con L-U-<sup>14</sup>C serina y homocisteína como sustrato de la reacción. La segunda, el ensayo de la actividad enzimática como tal y la tercera cromatografía para separar la L-U serina <sup>14</sup>C de la cistationina <sup>14</sup>C mediante cromatografía en papel o en capa fina. Para cada uno de los homogenizados libres de células, la reacción se realizó con o sin adición de PLP, con SAM solamente o con la presencia de ambos

Figura 11.

- **Mezcla de incubación**

La mezcla de incubación se llevó a un volumen final de 0.2 ml que contenía L-serina (25 mM), 0.8- 1.5  $\mu$  Ci de serina <sup>14</sup>C; buffer tris/ HCL , pH 8.6 (0.1 M); extracto de fibroblastos con 200 -700  $\mu$ g de proteína y L homocisteína (15mM) que se preparó antes de su utilización con 30.72 mg de la tiolactona incubada en 0.2 ml de NaOH 5M a 37° C por tres minutos; el pH fue ajustado a 8.6; luego se agregó 0.1 ml de ditiotreitól y agua hasta un volumen final de 1 ml.



**Figura 11. Esquema para medir la actividad de la enzima Cistationina β Sintasa (CBS). Modificado de Bermúdez, *et al.*, 2003.**

- **Ensayo de la actividad enzimática.**

Se prepararon 8 tubos eppendorf de un mililitro, para cada uno de los paciente, 8 tubos eppendorf para los controles y 4 tubos eppendorf para los blancos que se realiza en ausencia de homogenizado y en su lugar se usa albúmina , para un total de 20 tubos eppendorf. En cada tubo eppendorf se colocó: 25  $\mu$ l de homogenizado y 21,25  $\mu$ l de a uno de las siguientes mezclas:

Mezcla 1: sin suplemento. Mezcla 2+ PLP. Mezcla 3+ SAM y Mezcla 4+ SAM + PLP, se preincubaron por 5 minutos a 37° C, se adicionó 3.75  $\mu$ L de solución de L- homocisteína 0.2 M y 100  $\mu$ l de n- hexadecano parafina, luego se incubó durante cuatro horas a 37° C, la reacción se detuvo colocando los tubos a 98°C por 5 minutos.

- **Cromatografía**

El tercer paso en la cuantificación de la actividad enzimática consiste en realizar la cromatografía en papel Whatman N°3 o placas de celulosa para separar el producto (cistationina <sup>14</sup> C) del sustrato (serina <sup>14</sup> C), este proceso se realiza de la manera siguiente: se siembran alícuotas de 20  $\mu$ L de cada uno de los tubos con el homogenizado y, 2  $\mu$ L del patrón de cistationina fría (1mg/ml). Una vez hecha la separación se deja secar, se revela con ninhidrina, se deja secar nuevamente y se procede a cortar o a raspar el espacio cubierto por cada una de las regiones adonde se ubique la L- cistationina <sup>14</sup> C marcada, cada porción de papel cortado (o el raspado

obtenido de las placas de celulosa) Figura 12, se sumerge en 3 ml de líquido de centelleo, optiphase highsafe y, se mezcla en un vortex por espacio de 1 minuto para homogenizar y disolver en el líquido de centelleo .

La cistationina  $^{14}\text{C}$  es igual a la suma de las cuentas por minuto (cpm) de los tubos de la actividad de CBS de cada paciente menos las cpm de los tubos blancos. Se multiplica por 2,5 la cantidad de cpm obtenidas en cada ensayo (de la mezcla de reacción con un volumen de 50  $\mu\text{L}$  se colocó 20  $\mu\text{L}$  en la cromatografía). Se divide por el factor (estándar 1nmol= 5030 cpm) para obtener los nmol en cuatro horas, y se divide entre los mg de proteína. La actividad enzimática se expresó como nmol de cistationina formada / hora / mg de proteína.

- **Protocolo de la carga oral de metionina**

El protocolo de este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana, anexo 4. La carga oral de metionina fue aplicado a los 102 individuos aparentemente sanos participantes en el estudio. Se tomó 10 ml de sangre periférica en ayunas. Luego se suministró una carga oral de metionina (100 mg /kg de peso) (Dudman, *et al.*, 1993, Krupková, *et al* 2002) en jugo de naranja. Transcurridas 4 horas se tomó una segunda muestra de sangre (5 ml en tubo seco).

### 3.2. 2 Métodos Moleculares

Las técnicas de biología molecular utilizadas fueron las siguientes: El ADN fue extraído de sangre periférica por el método de precipitación salina, Maniatis, *et al.*, (1982) y se amplificaron los exones, 3, 5, 6., 8, 10, 12. Se utilizaron los primers y condiciones descritas en la Tabla 2. Luego por RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) utilizando enzimas que van a reconocer una secuencia específica de nucleótidos en el producto amplificado del ADN usualmente son de 4 a 10 pb denominándose diana de restricción y cortan el ADN en esa zona, (Desviat, *et al.*, 2001). La separación de los fragmentos obtenidos se realizó en un gel de PAGE al 12%. La visualización de las bandas se realizó utilizando la coloración con bromuro de etidio y coloración con plata.

- **Polimorfismo c.699C>T del gen CBS**

Para el estudio del polimorfismo c.699C >T se amplificó el exón 6 del gen que codifica para la CBS, se utilizaron los primers: con sentido 5' CAGCAACCCCCTGGCTCAGT3' y antisentido 5' CAGCCATGCCCTGTGTTTGCTATT3'. Las condiciones de PCR utilizadas fueron: a 95°C por 20 segundos, luego 35 ciclos de (95°C por 5 segundos, 66 °C por 30 segundos y 68 °C por 40 segundos), finalmente a 68°C por 10 minutos. El tamaño del fragmento amplificado fue de 465 pares de bases. Al digerir con la enzima de restricción BstUI y separar los productos en gel de

poliacrilamida del 12% se obtienen fragmentos de 219,178, 68 y 20 pares de bases cuando el genotipo es C/C; la presencia de T hace que se pierda un punto de corte con la enzima de restricción produciendo los fragmentos 246 y 219 (modificado de Lievers, *et al.*, 2003).

- **Polimorfismo 1080C>T del gen CBS**

El Polimorfismo c.1080 C >T de la CBS se amplifica con los primers con sentido 5' CAGTGCCACCCCAGTCATTA 3' y antisentido 5' GGCCTCCTCCCCTCCCAGTTCT 3.' Las condiciones de PCR utilizadas fueron: a 95°C por 20 segundos, luego 35 ciclos de (95°C por 5 segundos, 66 °C por 30 segundos y 68 °C por 40 segundos), finalmente a 68°C por 10 minutos. Se obtuvo un fragmento con un tamaño de 465 pares de bases. Al digerir con la enzima de restricción BstUI y separar los productos en gel de poliacrilamida al 12% se observaron fragmentos de 219,178, 68 y 20 pares de bases cuando el genotipo es C/C; el polimorfismo T hace que se pierda un punto de corte con la enzima de restricción produciendo los fragmentos 246 y 219 (modificado de Lievers, *et al.*, 2003).

**Tabla 2. Primers y condiciones experimentales para la detección de mutaciones y polimorfismos de la CBS y un polimorfismo de la MTHFR**

	Primers con sentido Primers antisentido	Fragmen -to (bp)	Anillamiento temperatura (°C)	Enzima de restricción (gana + o pierde - )
Exón 3 <sup>a</sup>	5'GCAGGTGTAGGGGAGGTGAGT GGAGA3' 5'GCCCCGAATGCTGGTCAAAGG AAG3'	489	94X2 35X(94X10seg, 56X20Seg 70X20 Seg) 72X5 Seg	-AclI
Exón 5 <sup>b</sup> y 6 <sup>a</sup>	5'CACTGGGGGCTGAGATTGTGA GCA 3' 5'CAGCCATGCCCTGTGTTTGCTA TT3'	533	94°CX3 Min 35X94°C 0.5 Min 64°C 1 Min 72°C 30 Seg 72°C 7 Minutos	+Hsp92II
Exón 8 <sup>a</sup>	5'CCGCAGGGTGGTCTGTCTGGA CTG3' 5'AGCCCCACTGAGCATCCGTGT GAC3	805	94X 2 Min 35X( 94X 10 Seg, 60X25 Seg, 72X30 Seg) 72X5Min	+BsrI
Polimorfis mo 699C/T <sup>c</sup>	5'CAGCAACCCCCTGGCTCAGT 3' 5'CAGCCATGCCCTGTGTTTGCTA TT3'	289	92°C X 3Min 35(92 X1Min, 64°CX1 Min 72°30 Seg) 72°C X 7 Min	-RsaI
Polimorfis mo 1080 <sup>c</sup> C/T	5'CAGTGCCCACCCAGCTCATTA 3' 5'GGCCTCCTCCCCTCCCAGTTCT 3'	465	95 X 20Seg 35(95°C 5Seg 66X 30Seg 68 X40 Seg) 68X 10 Min	-BstUI
MTHFR 677 C/T <sup>d</sup>	5'TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGG GA3' 5'AGGACGGTGCGGTGAGTG3'	198	94°*X (3 Min) 35 ( 94°(0.5Min 62°CX1 Min 72 °CX30Seg) 72°C*7 Min	+TaqI

Según Gaustadnes, *et al.*, 1998, Departamento de Genética de la Universidad de Barcelona<sup>b</sup>, Lievers, *et al.*, 2003<sup>c</sup>, Mutchinick, *et al.*, 1999<sup>d</sup>.

- **Polimorfismo c.677C>T del gen MTHFR**

Polimorfismo c.677C >T de la MTHFR. Se utilizaron los primers: Con sentido: 5' TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA3' y antisentido: 5' AGGACGGTGCGGTGAGTG 3' con las siguientes condiciones experimentales: 94°C por 3 minutos; 35 ciclos (94°C por 0.5 minutos, 62°C por 1 minuto y 72 °C por 30 seg.) y finalmente 72°C por 7 minutos. Se obtuvo un producto de 198 pares de bases que no es cortado por la enzima de restricción Taq I. La presencia del polimorfismo crea sitio de restricción y se generan los fragmentos 177 y 21 pares de bases que fueron separados en gel de poliacrilamida poliacrilamida al 12% (modificado de Mutchinick, *et al.*, 1999).

- **Secuenciación**

Se usó el kit Termo Sequence cy 5.5 de Amersham Biosciences y el equipo Visible Genetics.

- **Mutagénesis dirigida**

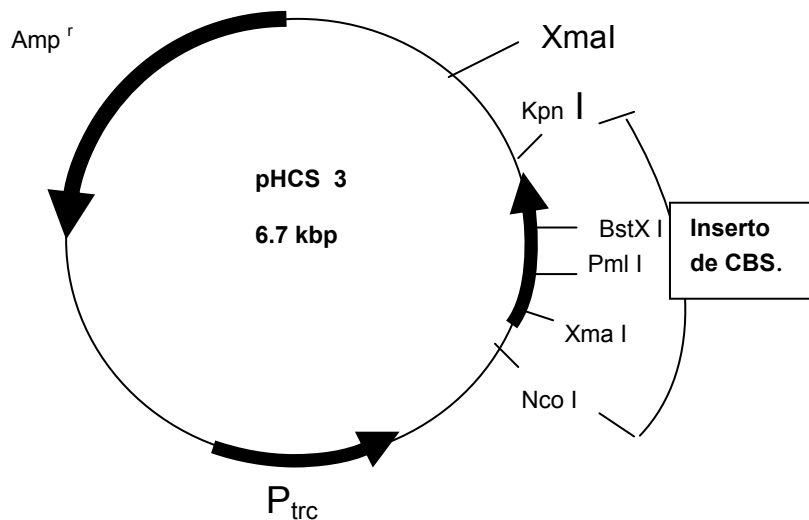
A partir del constructo que contiene además del gen de resistencia a la ampicilina (Figura 13), el gen que codifica para la CBS humana (pHCS3), el cual fue suministrado por los doctores Jan P Kraus y Viktor Kozich de la University of Colorado School of Medicine, Denver, Colorado (USA) se indujo la mutación p.A288T. Luego de diseñar los primers adecuados (Tabla 3), se

amplificó por PCR con las siguientes condiciones 95 °C X 1 minuto; 12 ciclos de (95 °C X 30 segundos, 55 °C X 1 minuto) 68°C X 13 segundos. El producto amplificado se cortó con la enzima Dpn I para obtener el fragmento de ADN que contiene la cistationina  $\beta$  sintasa humana mutada, luego se transformaron las células competentes XL1-Blue. Se sembraron las células sobre placas con medio de cultivo Luria Bertani (L.B) más ampicilina y se incuban toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se toma una muestra de una colonia y se siembra en 3 ml de medio L.B más ampicilina se incubaba toda la noche a 37 °C. Se extrajo el ADN plasmídico con Minipreps (Wizarf Plus SV Minipreps ADN Purification System de Promega), y luego se chequeó en agarosa al 0.8%. Se secuenció el ADN plásmidico para verificar que el vector contenía la mutación p.A288T.

Se transformó una cepa de *E.coli* con los vectores de expresión normal y mutado y se sembraron en 25 ml de medio SOB (Bacto tryptona, extracto de levadura NaCL) durante dos horas a 30°C hasta alcanzar una D.O de 0.5 leída a 600 nm. Se adicionó IPTG (0.33 mM) durante una hora a 37°C para inducir la expresión del vector. Para preparar los extractos celulares se centrifugaron los cultivos a 3800 g X 5 min a 4°C. El precipitado se lavó con PBS 1X. Luego se sonicó, centrifugó 13.000 rpm., el sobrenadante se alicuotó y se cuantificó la proteína obtenida por el método de Lowry. Para verificar la funcionalidad de la proteína mutada que fue expresada se cuantificó la actividad de la CBS según el método modificado de Fowler, *et al.*, (1978).

**Tabla 3. Secuencia de primers utilizados para la mutagénesis dirigida**

Primer con sentido	5' GGGTCCATCCTCACAGAGCCGGAGG3'
Primer antisentido	5' CCTCCGGCTCTGTGAGGATGGACCC3'



**Figura 12. Esquema del plásmido de expresión p HCS 3.**

La figura muestra el vector de expresión construido a partir del plásmido pKK 388.1 el cual contiene el gen de resistencia a la ampicilina ( $Amp^r$ ). El ADNc de la CBS humana fue cortado con las enzimas de restricción  $Nco I$  y  $Kpn I$  (New England Biolabs), los fragmentos de 1674 pb fueron purificados con Strataclean (Stratagene). Estos fragmentos de ADNc purificados se insertaron en el vector cortado con la enzimas de restricción  $Nco I$  y  $Kpn I$ , mediante incubación a  $16^{\circ}C$  por 16 horas, una reacción catalizada por la ligasa  $T_4$  ADN (Promega) Kozich y Kraus (1992).

### 3.2.3 Análisis estadístico

Para detectar si existe diferencia, por sexo, entre las concentraciones promedio de homocisteína en ayunas (basal) y pos carga de metionina se utilizó la prueba t de student. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado significativo. Se ajustó un modelo de regresión lineal múltiple con el objetivo de evaluar de manera conjunta las diferencias por sexo, edad, ejercicio y dieta. Las diferencias entre las frecuencias del alelo raro se obtuvieron por aplicación de la prueba de proporciones para muestras independientes. Para el análisis estadístico de la información fue empleado el programa STATA versión 8.2. Los valores son expresados como media  $\pm$  2DS. Para la cuantificación de la asociación entre el genotipo 677 C>T y el nivel de homocisteína (individuos con valores normales e individuos hiperhomocisteinémicos) se calculó el OR con un intervalo de confianza del 95%; a partir una tabla de 2x2.

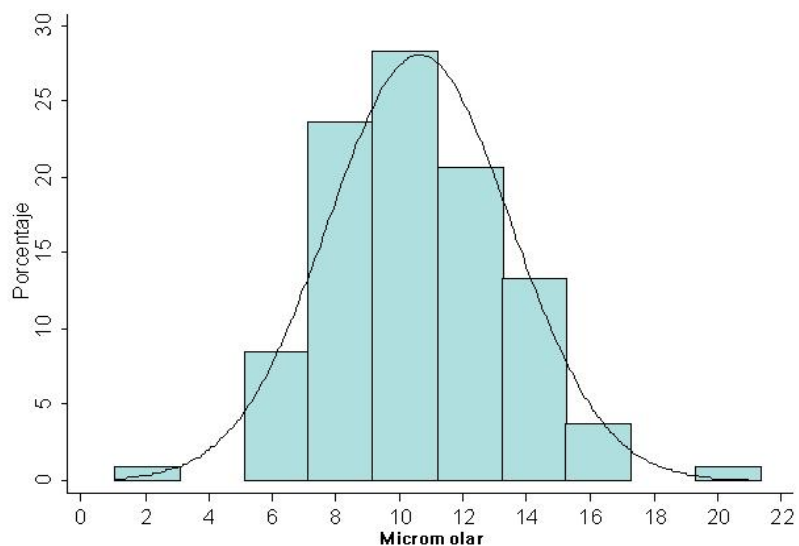
## 4 RESULTADOS

### 4.1 POBLACIÓN ASINTOMÁTICA.

#### 4.1.1 Descripción de resultados bioquímicos

Se estudió una población de 102 personas voluntarias sanas, 53 mujeres y 49 hombres quienes firmaron el consentimiento informado. Por medio de encuestas se obtuvo información sobre el hábito de fumar, dieta, ejercicio, antecedentes vasculares e historia familiar de eventos cardiovasculares. Posterior a un ayuno de 12 horas, se cuantificaron los niveles de homocisteína estos valores se distribuyeron normalmente entre 1.0 a 22  $\mu$  M. (Figura 14). Para el cálculo del valor normal de homocisteína basal se tomó como criterio la media  $\pm$  2DS de los 102 individuos, obteniendo como resultado un valor de 16.32  $\mu$ M. En una persona en ayuno se encontró una concentración de homocisteína de 21 $\mu$ M, la cual fue considerada como hiperhomocisteinémica moderada de acuerdo a la clasificación de Refsum, *et al.*, (1998) la comparación entre el nivel promedio de homocisteína entre el grupo de los hombres (n = 49) y de las mujeres (n = 53) se realizó con la prueba t de student, la diferencia no fue significativa (p = 0.09).

Posterior a la administración de metionina (100mg/Kg de peso) se encontró una diferencia significativa (p=0.006) en el aumento de homocisteína total entre mujeres (28.03 $\pm$ 7.02) y hombres (32.43 $\pm$  8.64) Tabla 4.



**Figura 13. Distribución de la concentración en ayuno (basal) de homocisteína en una población asintomática**

El nivel de homocisteína basal en el grupo de los 102 individuos asintomáticos fue de ( $X \pm 2DS$ ,  $10.52 \pm 5.72$ ) en el grupo de mujeres ( $n=53$ ) ( $X \pm 2DS$ ,  $10.15 \pm 5.22$ ) con intervalo de confianza del 95% (9.4-10.87) y para el grupo de los hombres ( $n= 49$ ) ( $X \pm 2DS$ ,  $10.91 \pm 6.18$ ) con intervalo de confianza del 95% (10,02-11.80).

**Tabla 4. Comparación de la homocisteína pos carga entre el grupo de los hombres y de las mujeres**

Homocisteína Pos carga de Metionina ( Hombres v s Mujeres)		
	Mujeres ( n = 53)	Hombres (n = 49)
Media	28.03	32.43
Desviación Estándar	7.02	8.64
Intervalo de confianza	26.10-29.97	29.95-34.91
P	0.006	

La comparación de los valores promedio de homocisteína tras la carga de metionina entre el grupo de los hombres y de las mujeres fue diferente de forma significativa.

Se consideraron hiperhomocisteinémicos pos carga, a las personas con valores de homocisteína  $X + 2 DS$ , mayor a 46,34  $\mu M$  (Tabla 5); con este criterio se identificaron 7 individuos con valores superiores a este punto de corte. En este estudio en total se detectaron 8 personas hiperhomocisteinémicas moderadas; 7 pos carga de metionina y uno con hiperhomocisteinemia basal (siete hombres y una mujer). Al comparar los valores de homocisteína basal, el delta y las veces que el valor de homocisteína aumentó, con el hábito de fumar, el ejercicio y la dieta no se encontraron diferencias significativas con el grupo de personas que no fuman, no hacen ejercicio, ni dieta. Se ajustó un modelo de regresión lineal múltiple con el objetivo de evaluar de manera conjunta las diferencias por sexo, edad, ejercicio y dieta (Tabla 6).

**Tabla 5. Niveles de homocisteína basal y pos carga de metionina**

	Homocisteína basal (n=102) $\mu M$	Homocisteína pos carga de metionina (n=102) $\mu M$
Media	10.52	30.14
Desviación Estándar	2.86	8.10
Media + 2 DS	16.24	46.34

Para la población asintomática se estableció un valor de homocisteína basal >de 17  $\mu M$  y poscarga de metionina de > 46  $\mu M$ .

**Tabla 6. Comparación entre concentración de homocisteína en ayuno (basal) hábito de fumar, ejercicio y dieta.**

	n	X <sup>a</sup> Aumento <sup>b</sup> Delta <sup>c</sup>	D.E <sup>d</sup>	I.C <sup>e</sup>	P <sup>f</sup>
Hábito de fumar					
Si	34	10.64 <sup>a</sup> 2.92 <sup>b</sup> 19.95 <sup>c</sup>	2.1 <sup>a</sup> 0.69 <sup>b</sup> 6.85 <sup>c</sup>	9.91-11.38 <sup>a</sup> 2.68-3.16 <sup>b</sup> 17.56-22.34 <sup>c</sup>	0.75 <sup>a</sup>
No	68	10.45 <sup>a</sup> 3.08 <sup>b</sup> 19.44 <sup>c</sup>	3.19 <sup>a</sup> 1.74 <sup>b</sup> 6.47 <sup>c</sup>	9.68-11.23 <sup>a</sup> 2.87-3.51 <sup>b</sup> 17.87-21.00 <sup>c</sup>	0.50 <sup>b</sup> 0.71 <sup>c</sup>
Ejercicio					
Si	43	10.28	3.15	9.31-11.25	0.42
No	23	10-91	2.64	9.76-12.05	
Dieta					
Si	12	10.81	2.49	9.22-12.40	0.7
No	89	10.47	2.93	9.85-11.09	

El número de individuos (n). X<sup>a</sup> El promedio de homocisteína basal. Aumento<sup>b</sup> las veces que aumentaron los niveles de homocisteína pos carga de metionina con respecto a la homocisteína en ayuno. Delta<sup>c</sup> la diferencia entre el nivel de homocisteína pos carga de metionina y el nivel basal de homocisteína. D.E<sup>d</sup> Desviación estándar. I.C<sup>e</sup> Intervalo de confianza. p<sup>f</sup> <0.05 significativa.

#### **4.1.2 Descripción de resultados moleculares**

Se analizaron los polimorfismos c.699C>T, c.844 inserción 68 y c.1080 C>T de la CBS y c.677 C>T de la MTHFR. El polimorfismo c.844 inserción 68 está presente en la población en muy baja frecuencia. Al comparar el polimorfismo c.699 C>T en el grupo de personas con hiperhomocisteinemia pos carga (homocisteína > 46,34  $\mu$ M) y los que muestran valores normales (homocisteína < 46,34  $\mu$ M) se encontró para ambos grupos que el genotipo homocigoto silvestre ( W/W) , tiene una mayor frecuencia alélica con respecto a los genotipos heterocigoto wild tipe/ mutado ( W/M) y el genotipo homocigoto mutado (M/M), mientras que en el polimorfismo c.677 C>T el genotipo M/M corresponde a 0.71 en hiperhomocisteinémicos (homocisteína >46.34) contra 0.51 en individuos con valores normales de homocisteína (<46.34) como se muestran en las Tablas 7 y 8.

**Tabla 7. Individuos con homocisteína normal en ayuno y sus respectivos genotipos**

	Genotipos observados Homocisteína < 46,34 N =95			Frecuencia
	W/W <sup>a</sup>	W/M	M/M <sup>b</sup>	Alelo M
699.C>T	58	34	3	0.21
1080 C>T	16	23	56	0.71
844 inser 68 <sup>c</sup>	90	5	0	0.026
677C>T	22	49	24	0.51

W/W<sup>a</sup> Homocigoto para el alelo normal. W/M, Heterocigoto. M/M<sup>b</sup> Homocigoto para el alelo mutado. Polimorfismo c.844 inser 68<sup>c</sup> de la CBS

Se muestra el número y la frecuencia de los genotipos homocigotos normales, heterocigotos y homocigotos mutados para los polimorfismos intragénico c.699C>T, c.1080 C>T, c.844 inser 68 de la CBS y el c.677C>T de la MTHFR y las frecuencias del alelo mutado de los polimorfismos en individuos con homocisteína normal en ayuno.

**Tabla 8. Individuos con hiperhomocisteinemia pos carga de metionina y sus respectivos genotipos.**

	Genotipos observados Homocisteína >46.34µM(n =7)						Frecuencia	P del alelo
	W/W <sup>a</sup>	%	W/M	%	M/M <sup>b</sup>	%	Alelo M	M
699C>T	4	57.1	3	42.8	0		0.42	p =0.20
1080 C>T	4	57.1	1	14.3	2	26.6	0.35	p =0.047
844 inser 68 <sup>c</sup>	7	0	0	0	0	0	0	0
677C>T	1	14.3	2	28.6	4	57.1	0.71	p =0.310

W/W<sup>a</sup> Homocigoto para el alelo normal. W/M, Heterocigoto. M/M<sup>b</sup> Homocigoto para el alelo mutado. Polimorfismo c.844 inser 68<sup>c</sup> de la CBS.

Se muestra la frecuencia de los genotipos homocigotos normales, heterocigotos y homocigotos mutados para los polimorfismos intragénicos c.699C>T, c.1080 C>T, c.844 inser 68 de la CBS y el c. 677C>T de la MTHFR y las frecuencias del alelo mutado de los polimorfismos en individuos con hiperhomocisteinemia pos carga de metionina.

## 4.2 PACIENTES

### 4.2.1 Descripción de los resultados clínicos y bioquímicos

Los pacientes con diagnóstico clínico de hiperhomocisteinemia severa (homocistinuria) fueron remitidos de diferentes centros de diagnóstico de errores innatos del metabolismo en Colombia (Instituto Materno Infantil, Laboratorio Pregon, e Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Instituto del Seguro Social de Medellín, Departamento de Genética de la Universidad de Antioquia, Fundación Tobías Emmanuel de Calí). Once pacientes presentaban características de hiperhomocisteinemia severa (homocistinuria) (Tabla 9).

Con excepción de uno, todos ellos presentaban alguna alteración músculo esquelética ( Escoliosis, *pectum excavatum*, *genu valgum*, habitus marfanoides, alteraciones en rodillas y tobillos), con una edad de aparición entre los 4 hasta los 10 años, la alteración del sistema nervioso central fue evidente con el retardo del lenguaje, en todos los pacientes se presentó variable grado de retardo mental categorizado en leve, moderado o severo, según presente uno, dos o tres de los siguientes discriminantes (falla en la escolaridad, autonomía para realizar las funciones básicas como lavado de los dientes, vestirse, alimentarse por si mismo, y la interacción social), con edad de aparición a partir de los 6 años. La mayoría de ellos mostraron alteraciones oculares (miopía, *ectopia lentis*, glaucoma) con aparición desde los 2 años de edad y dos pacientes presentaron eventos tromboembólicos

(casos 2 y 4 Tabla 9). Adicionalmente a la hiperhomocisteinemia severa el paciente de la familia 6 presentó síndrome de Klinefelter confirmado por cariotipo 47, XXY.

Los niveles de homocisteína total en plasma se muestran en la Tabla 10; estos valores van desde 110  $\mu\text{M}$  hasta 399  $\mu\text{M}$  (VR < 17.  $\mu\text{M}$ ). Los niveles de metionina plasmática fueron encontrados entre 30 y 932  $\mu\text{M}$  (VR < 27 + 7  $\mu\text{M}$ ). La cromatografía de ácidos orgánicos fue normal para todos los pacientes con hiperhomocisteinemia severa, al no encontrarse aumento de ácido metilmalónico se descartó deficiencia de cobalaminas (CBL, C, D, F). Se confirmó que estos pacientes no responden bioquímicamente a la piridoxina por que luego de la administración del tratamiento con vitamina B<sub>6</sub> y ácido fólico no disminuyen la concentración de homocisteína hasta niveles normales (<http://www.uchsc.edu/cbs>). La hiperhomocisteinemia severa fue confirmada en el 100% de los pacientes con diagnóstico clínico que fueron estudiados, al encontrar niveles > 100  $\mu\text{M}$  de homocisteína plasmática. Se encontró aumento de metionina plasmática por cromatografía de aminoácidos en capa fina en todos los pacientes estudiados y se confirmó este aumento por cuantificación de metionina en plasma en el el 50% de los pacientes analizados. Se tomaron biopsias de piel en el 64% (7) de los pacientes, el 9% (1) de los pacientes había fallecido antes de la toma de la muestra, y en el 27% (3) de los casos los padres no autorizaron la toma de la muestra. Del 64% de las biopsias cultivadas el 18% se contaminó y no fue

posible tomar nueva muestra. La cuantificación de la actividad de la enzima CBS en el extracto libre de células procedentes del cultivo de fibroblastos de biopsia de piel, fue deficiente en cinco de los pacientes con hiperhomocisteinemia severa. La concentración aumentada de homocisteína y de metionina en sangre en todos los pacientes analizados, indicaron hiperhomocisteinemia severa por deficiencia de CBS, lo cual se pudo comprobar por métodos bioquímicos en el 46% de los casos (Tabla 10).

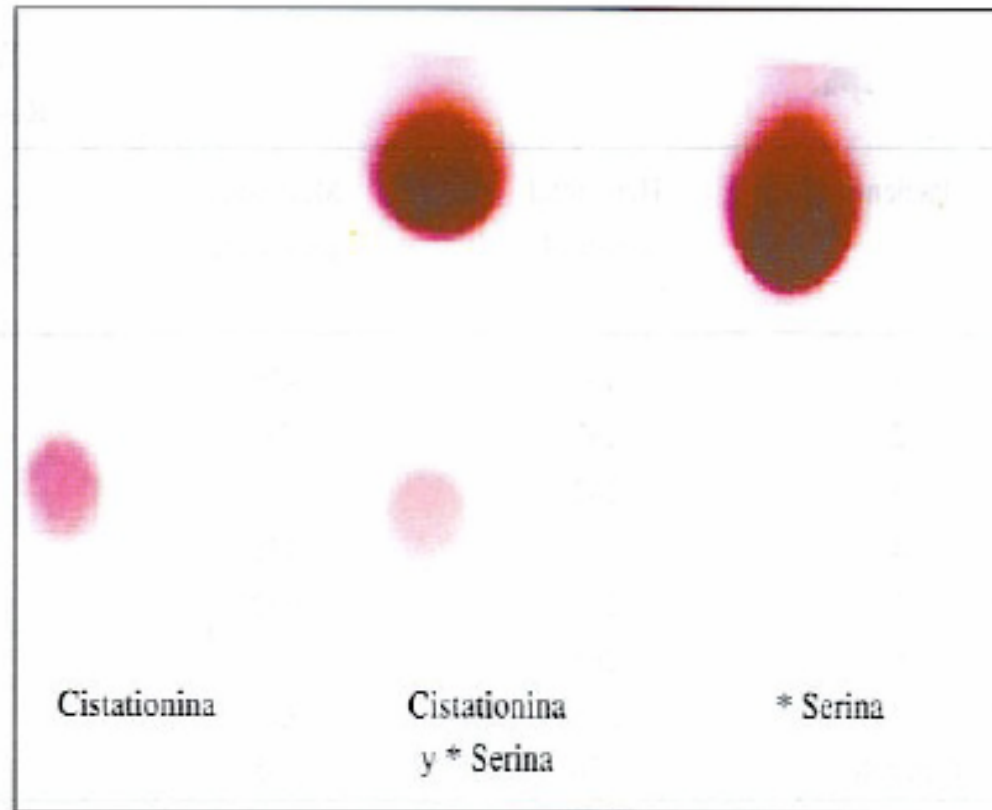
#### **4.2.2 Descripción de los resultados moleculares**

Para la identificación de las mutaciones presentes en los pacientes con diagnóstico clínico y bioquímico de hiperhomocisteinemia severa (homocistinuria) se inició la búsqueda de las mutaciones p.I287T y p.G307S (exón 8) descritas como las más frecuentes, a nivel mundial, en el gen de la CBS (Moat, *et al.*, 2004). Luego de amplificar y purificar el producto se continuó con la secuenciación. Estas mutaciones no fueron encontradas en los pacientes estudiados. En el probando de la familia N° 1 de origen mestizo, el exón 8 mostró una transición de G por A en el nucleótido 862, que produce cambio del residuo aminoácido alanina por treonina en la posición 288 de la proteína. En este paciente se encontró la mutación p.A288T “missense” en estado heterocigoto (Figura 15).

Tabla 9. Descripción de las características clínicas de los pacientes con diagnóstico presuntivo de hiperhomocisteinemia severa (homocistinuria).

I.D	Edad <sup>a</sup> /Sexo	Sistema ocular			Sistema Músculo esquelético					Sistema Vascular	Sistema Nervioso Central					Otros
		Miopia	Ectopia lentis	Glaucoma	Escoliosis	Pectus excavatum	Genu valgum	Habitus Marfanoides	Otros <sup>e</sup>		Convulsiones	Retardo motor	Retardo del lenguaje	Retardo global	Retardo Mental	
1 <sup>b</sup>	7a/M	+2 a	++2 <sup>a</sup>	-	+4a	-	-	+4a	+	-	+4a	+1a	+4a	+4 <sup>a</sup>	+++	-
2 <sup>c</sup>	5a/M	-	+2 <sup>a</sup>	+4a	+4a	+4a	+4a	+4a	-	+9a	+ 10m	++1a	++2a	++2a	+++	Criptorq. <sup>f</sup>
3 <sup>d</sup>	10a/M	+3a	+3 <sup>a</sup>	-	+6a	+6a	+6a	+6a	-	-	+6a	+1a	+4a	+4a	++	-
3.1	16 <sup>a</sup> /M	-	-	-	+13a	+13a	-	+13a	+13a	-	-	-	+4a	-	+	Criptorq. <sup>f</sup>
4	7 <sup>a</sup> /M	+4a	++4 <sup>a</sup>	++4a	-	-	-	+4a	-	++18a	-	+2a	-	-	+	-
5	16a/M	+4a	-	-	+4a	+4a	+4a	+4a	-	-	-	-	+3a	-	-	Asma
6	10a/M	+5a	+5 <sup>a</sup>	-	+5a	+5a	+5a	+5a	-	-	-	+2a	+2a	+2a	++	Klinefelter. <sup>f</sup> Criptorq. Asma
7	14a/M	+2a	+2 <sup>a</sup>	-	+5a	+5a	+5a	+5a	-	-	+6a	+1a	+5a	+5a	++	-
8	10a/M	+2a	+2 <sup>a</sup>	-	+5a	+5a	+5a	+5a	+5a	-	-	+2a	+2a	+2a	++	-
9	14a/F	+8a	+8 <sup>a</sup>	-	+10a	-	-	+10a	-	-	-	-	+5a	-	+	-
10	8m/M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+3a	-	-	-

I.D Identificación. <sup>a</sup> Edad del diagnóstico (a= años, m= meses). <sup>b</sup> Muere a los 12 años <sup>c</sup> Muere a los 9 años. <sup>d</sup> Casos 3 y 3.1 son hermanos. <sup>e</sup> Alteración en tobillos o rodillas. El grado de severidad indicado por (-) no afectado, (+) algún grado de afectación (++) afectado. Edad en que aparecen los signos (a =años). Retardo mental definido como falla en la escolaridad, autonomía, interacción social, categorizado como leve (+), moderado (++) y severo (+++). <sup>f</sup> Criptorquidea



**Figura 14. Actividad de la CBS.**

Separación del sustrato  $^{14}\text{C}$  Serina y del producto  $^{14}\text{C}$  Cistationina por cromatografía en capa fina. Modificado de Fowler *et al.* 1978

**Tabla 10. Resultados bioquímicos de los pacientes con diagnóstico presuntivo de hiperhomocisteinemia severa (homocistinuria)**

Identificación	Edad <sup>a</sup> / Sexo	T Hcy <sup>b</sup>  T Hcy <sup>c</sup>  ( $\mu$ M)	Metionina <sup>d</sup> $\mu$ M	Cromatografía de ácidos orgánicos	Actividad de la CBS <sup>e</sup> $\mu$ mol de cistationina/h/mg de proteína	Tratamiento
(1)	7/M	399 280	427 *	Normal	0.16	600mg de piridoxina +5mg de ácido fólico
(2)	5/M	293 270	**57*	Normal	ND	500mg de piridoxina +5mg de ácido fólico
(3)	10/M	372 250	431*	Normal	0.41	600mg de piridoxina +5mg de ácido fólico
(3.1) <sup>†</sup>	16/M	231 200	932*	Normal	0.88	600mg de piridoxina +5mg de ácido fólico
(4)	7/M	268 235	ND*	Normal	0.47	1000mg de piridoxina +5mg de ácido fólico
(5)	16/M	226 202	ND*	Normal	ND	250mg de piridoxina +5mg de ácido fólico
(6)	10/M	281 240	175*	Normal	ND	600mg de piridoxina +5mg de ácido fólico
(7)	14/M	275 240	816*	Normal	ND	400mg de piridoxina +5mg de ácido fólico
(8)	10/M	200 170	ND*	ND	ND	600mg de piridoxina +5mg de ácido fólico
(9)	14/F	242 200	ND*	ND	0.35	500mg de piridoxina +5mg de ácido fólico
(10)	8m/M	110 6	30*	ND	ND	200mg de piridoxina +5mg de ácido fólico+3g de betaina

Edad<sup>a</sup>, edad al diagnóstico en años, m= meses. THcy<sup>b</sup>, Concentración de homocisteína total en plasma antes del tratamiento, THcy<sup>c</sup>, Concentración de homocisteína después del tratamiento, valor de referencia < 17 $\mu$ M, Metionina<sup>d</sup>, metionina en plasma, valor de referencia = 27+7 $\mu$ M. <sup>e</sup> Actividad de CBS. Valor de referencia = 1.73  $\mu$ mol de cistationina/h/mg de proteína. Tomado de Arieta, L., 2002.<sup>†</sup> 3 y 3.1 son hermanos. \* Aumento de metionina detectado por cromatografía de aminoácidos en capa fina.\*\* Cuantificación luego de tratamiento.ND. No determinada.

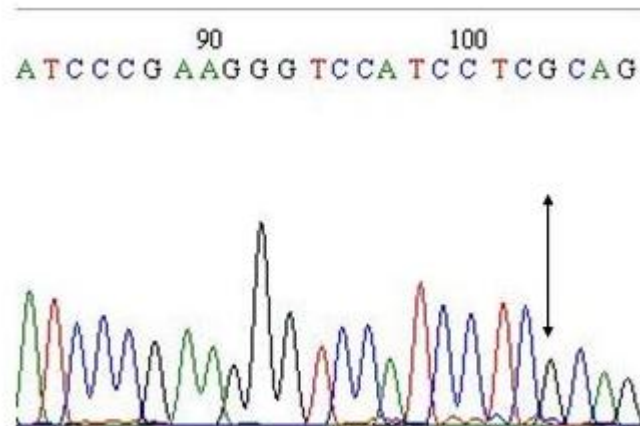
Está localizada en una zona de la proteína altamente conservada en varias especies, lo cual puede indicar la posible relevancia del aminoácido en la función de la proteína (Figura 16). El fenotipo clínico producido por esta mutación se caracterizó por severo retardo mental y el paciente falleció a la edad de doce años. La proteína mutada a partir del vector con la mutación p.A288T fue producida en *E. coli*, su funcionalidad se ensayó *In vitro* cuantificando la actividad enzimática por el método de Fowler, *et.al.*, (1978) y fue mostrado que no tiene actividad catalítica, ni responde a la piridoxina ni a la adenosil metionina (SAM) (Tabla 11). Ésta mutación se encontró en estado heterocigoto en el padre y en una hermana del paciente quien es claramente asintomática. La p.A288T no había sido reportada antes en la literatura y no se encontró en los demás pacientes del estudio. La tabla 12 resume los resultados bioquímicos, moleculares y lugar de procedencia de los pacientes estudiados.

### **4.3 FAMILIARES DE LOS PACIENTES**

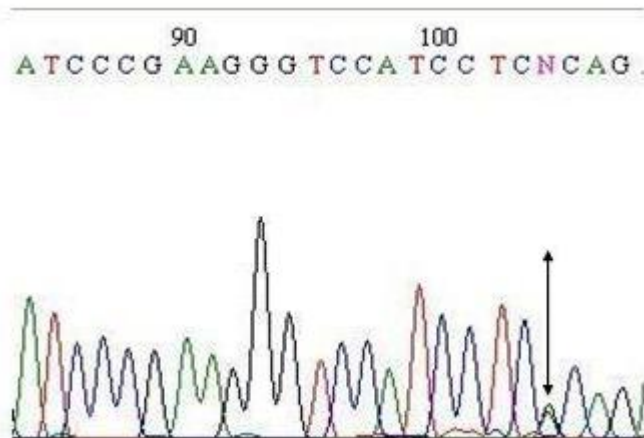
#### **4.3.1 Descripción de resultados bioquímicos**

Se estudiaron 28 personas pertenecientes a 10 familias que presentaban uno o dos miembros con hiperhomocisteinemia severa; el 60% de los familiares quienes no presentaban características fenotípicas de homocistinuria fueron hiperhomocisteinémicos moderados ( $>17\mu\text{M}$ ) Tabla 13.

### Control normal



### Mutación p.A288T



**Figura 15. Secuencia genómica la mutación p.A288T**

La Figura muestra el exón 8 de la CBS de un individuo normal y el caso índice de la familia N°1 heterocigoto para la mutación p.A288T, esta se produce por un cambio de una G por A en el nucleótido 862 del cADN de la CBS

↓

```

CBS HS      239 EILQQCDG-----KLDMLVASVGTGGTITGIARKLK--EKCPGCRIGWDP-EGSILAEP 290
CBS SC      174 EIQRQLEDLNLFDNLRVAVAGAGTGGTISGISKYLK--EQNDKIQIVGADP-FGSILAQP 230
CBS RN      236 EILQQCDG-----KVDMLVASAGTGGTITGIARKLK--EKCPGCKIIGWDP-EGSILAEP 287
CYSK EC     157 EIWQQTGG-----RITHFVSSMGTGTITGVSRFMR--EQSKPVTIIVGLQPEEGSS---- 205
CYSK ST     159 EIWEDTDG-----QVDVFISGVGTGGTLTGVIRYIKGKTKGKTDLITVAVEPTDSPVIAQA 213
CSYN SO     167 EIWKGTGG-----KIDIFVSGIGTGGTITGAGKYLK--EQNPDVKLIGLEPVESAVLSSG 219
  
```

**Figura 16. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos en CBS de diferentes especies (mutación p.A288T).**

Se muestra el residuo que es afectado por la mutación p.A288T en la CBS Humana y las abreviaturas corresponden a: CBS HS (*Homo sapiens*); CBS SC, CBS de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*); RN, CBS de rata; CYSK EC, *E.coli* O- acetilserine liasa (*Escherichia coli*); CYSK ST acetilserine liasa (*Salmonella typhimurium*), CYSN SO, spinach cisteina sintasa (*Spinacia oleracea*).

**Tabla 11. Actividad de la CBS proteína híbrida expresada en *E.coli*.**

Muestra	Actividad de la CBS (% de respuesta con respecto a pCBSH3 )
pKK	
pCBSH3 -PLP	0.16
pCBSH3+PLP	100
pCBSH3+PLP+SAM	197
A288T- PLP	0
A288T+PLP	0
A288T+PLP+SAM	0

Se muestra la actividad de la enzima CBS humana insertada en el plásmido (pCBSH3), sin fosfato de piridoxal (pCBSH3-PLP), con fosfato de piridoxal (pCBSH3+PLP), con fosfato de piridoxal mas adenosilmetionina (SAM) (pCBSH3+PLP+ SAM), el inserto utilizado como control corresponde a CBS Humana (CBSH3) y el otro a la mutación p.A288T.

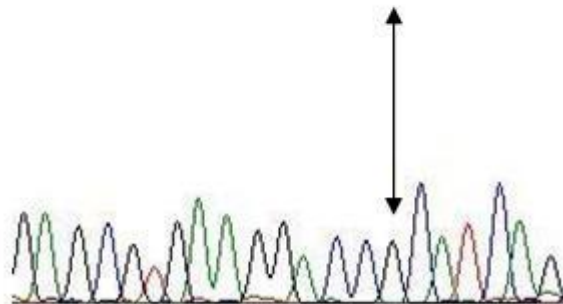
La mutación p.R121H en el exón 3 fue detectada en el otro alelo del probando de la familia N 1, corresponde a la transición de G por A en el nucleótido 362 que conduce a un cambio del residuo aminoácido de arginina por histidina en la posición 121 (Figura 17). La mutación también está en una zona altamente conservada en varias especies (Figura 18).

La otra mutación evaluada fue la p.T191M, que es muy frecuente en España. La p.T191M no se podía evaluar por RFLPs por que no se encontró una enzima apropiada, por este motivo se usó primer mismatch (Tabla 2) y posteriormente este producto fue cortado con la enzima *Hsp92II* (Figura 19).

El protocolo usado fue modificado a partir de la técnica empleada en el departamento de Genética de la Universidad de Barcelona. Ocho de los pacientes descritos aquí fueron homocigotos para este cambio (Tabla 12), estos genotipos fueron confirmados por demostración de la condición de portadores de los padres. Esta mutación fue confirmada por secuencia directa del gen de CBS (Figura 20). La p.T191M se encuentra en el dominio móvil o bisagra (residuos 186 al 122) cuya función está relacionada con la retención del PLP. El residuo aminoácido es conservado en las CBS de eucariotas (Figura 21). El análisis de los polimorfismos comunes c.699 C>T (Figura 22) c.1080 C>T (Figura 23) y c.844 inser 68 (Figura 24) de la CBS, mostró que los homocigotos para la mutación p.T191M y el heterocigoto para la mutación p.A288T son c.699 CC, c.1080 TT y wt/ wt. En los probandos de las familias 9 y 10 a quienes no se les ha detectado la

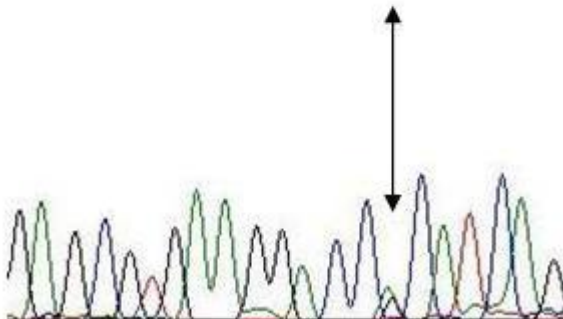
Control normal

120                      130                      140  
GA G CGTGAA GGA C CGCAT CAG



Mutación p.R121H

120                      130                      140  
GA G CGTGAA GGA C CA CAT CAG



**Figura 17. Secuencia genómica de la mutación p.R121H**

Secuencia del exón 3 de un individuo normal y del probando de la familia N° 1, heterocigoto para la mutación p.R121H, esta produce por un cambio de una G por A en el nucleótido 362 del cADN de la CBS

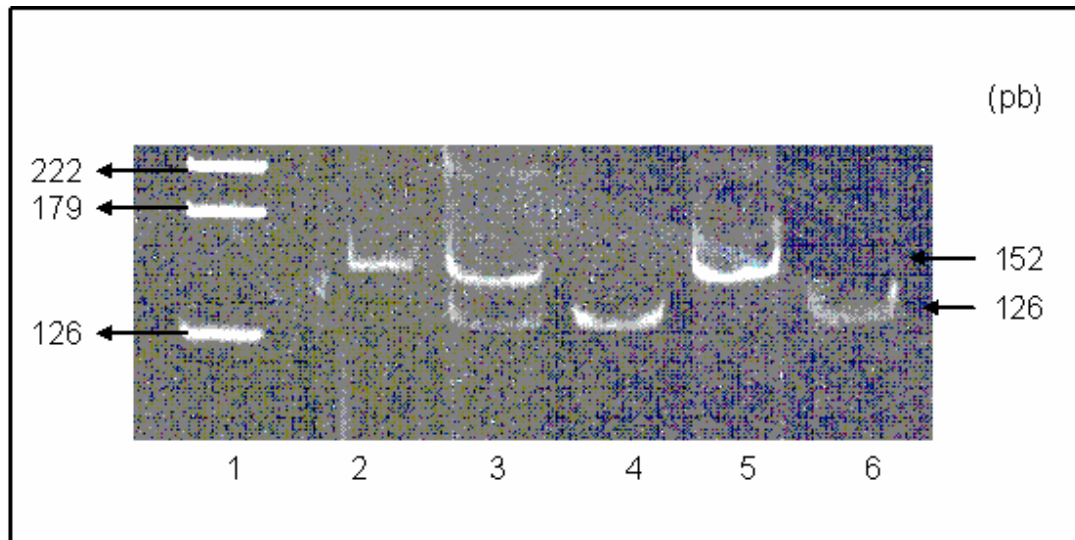
↓

```

CBS HS121 RISLRMIEDERDGLTKPGDTIIEPTSGNTGIGLALAAAVRGYRCIIVMPEKMSSEKVD 179
CBSSC55  RIAKSMVEEAEASGRIHPSRSTLIEPTSGNTGIGLALIGAIKGYRTIITLPEKMSNEKVS1
CBSRN118 RISLRMIEDERAGTLKPGDTIIEPTSGNTGIGLALAAAVKGYRCIIVMPEKMSMEKVD1
CYSKEC43 RAALSMIVEAEKRGEIKPGDVLIEATSGNTGIALAMIAALKGYRMKLLMPDNMSQERRA1
CYSK43  RIGANMIWDAEKRGVLKPGVELVEPTNGNTGIALAYVAAARGYKLTLTMPETMSIERRK101
  
```

**Figura 18. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de varias CBS (mutación p.R121H).**

Se muestra el residuo que es afectado por la mutación p.R121H en la CBS Humana las abreviaturas corresponden a: CBS HS: (Homo *sapiens*); CBS SC, CBS de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*); RN, CBS de rata; CYSK EC, *E.coli* O- acetilserine liasa (*Escherichia coli*); CYSK ST acetilserine liasa (*Salmonella typhimurium*), CYSN SO, spinach cisteina sintasa (*Spinacia oleracea*).



**Figura 19. Análisis de la Mutación p.T191M de la CBS por RLFP.**

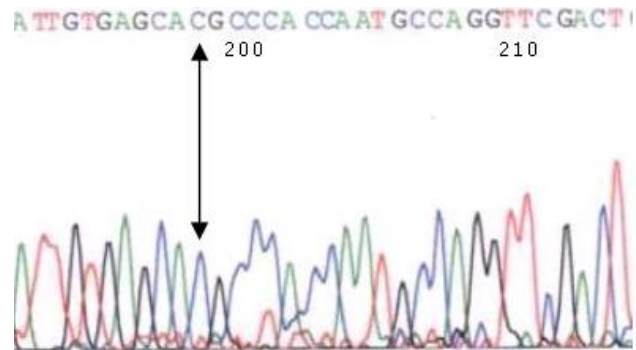
La mutación p.T191M de la CBS genera sitio de restricción para la enzima Hsp92II. Las condiciones del ensayo se dan en la Tabla N 2. Los fragmentos fueron analizados en PAGE al 12%. La distribución es la siguiente: Carril 1. Marcador de peso molecular (pGEM), Carril 2 y 5 wt/wt Carril 3. wt/m. Carril 4.y 6 m/m.

mutación, los polimorfismos son c.699 TT, c.1080 CC; la c.844 inser 68 no fue encontrada en este par de pacientes (Tabla 12).

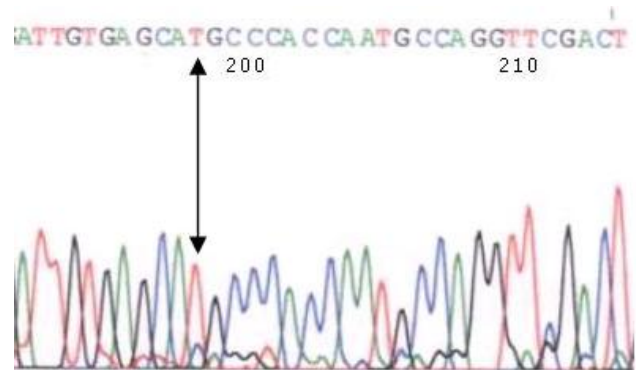
En el grupo de los hiperhomocisteinémicos severos, el polimorfismo c.677C>T (A222V) (Figura 25) reveló la presencia del alelo TT de la MTHFR 677 solamente en un caso. Por otra parte cinco pacientes tuvieron el alelo 677 CC y otros cinco poseían el alelo 677 CT (Tabla 12). Para estudiar el origen de la mutación p.T191M se abordó el análisis de los polimorfismos intragénicos descritos en el gen de la CBS: c.699 C> T, c.1080 C>T y c.844 inser 68 en los pacientes y sus familiares. Fueron encontrados un total de 11 haplotipos entre la población control y los portadores de las mutaciones de la CBS (Tabla 13 y 14). Los alelos normales muestran predominio de los haplotipos VI, se identificaron 37 individuos (36,27%) seguido del haplotipo IV (12,74 %) el resto es heterogéneo algunos ocurren una sola vez, mientras los alelos mutados muestran un 35,71 % del haplotipo III seguido del haplotipo IV (Tabla 14).

Al suministrar una carga de metionina a 6 portadores de la mutación p.T191M, a un portador de la mutación p.A288T, a un portador de la mutación p.R121H y a un grupo control de 102 individuos sanos sin enfermedades hepáticas, renales, sin las mutaciones (p.191M y p.A288Ty p.R121H) y cuantificar la homocisteína basal y pos carga de metionina se encontraron valores desde 9,38  $\mu$ M hasta 27,06  $\mu$ M (valor de referencia < 17  $\mu$ M); los valores pos carga están entre 43,92  $\mu$ M y 96,56  $\mu$ M (Valor de referencia < 46,34  $\mu$ M) (Tabla 1 del anexo 3).

### Control normal



### Mutación p.T191M



**Figura 20. Secuencia genómica de mutación p.T191M**

Secuencia del exón 5 de un individuo normal y de los pacientes con la mutación p.T191M, esta se produce por un cambio de una C por T en el nucleótido 572 del ADNc de la CBS.

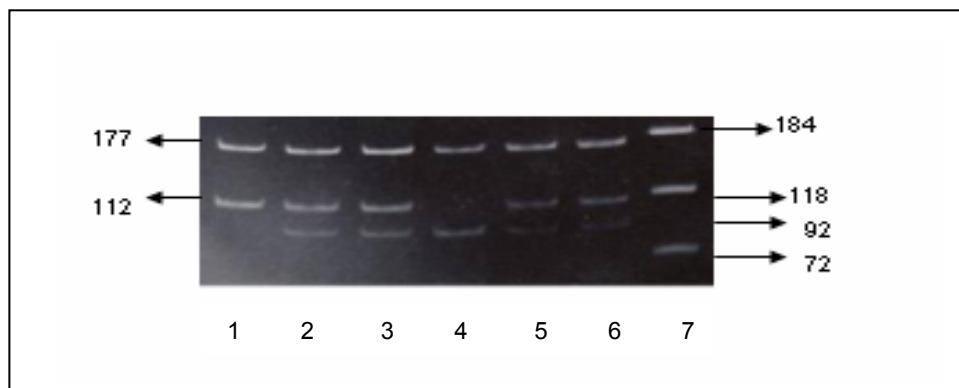
↓

```

CBSHS180VLRALGAEIVRTPTNARFDSPESHVGVAVRLKNEIPNSHILDQYRNASNPLAHYDTTAD
CBSSC115VLKALGAEIIRTPTAAAWDSPESHIGVAKKLEKEIPGAVILDQYNNMMNPEAHYFGTGR
CBSRN177VLRALGAEIVRTPTNARFDSPESHVGVAVRLKNEIPNSHILDQYRNASNPLAHYDDTAE
CYSKEC10MRAYGAELILVTKEQGMEG-ARDLALEMANRGEGKLLDQFNNPDNPYAHYTTTGP
CYSKST102LKALGANLVLTEGAKGMKGAIQKAEEIVASDPQKYLLLQQFSNPANPEIHEKTTG
  
```

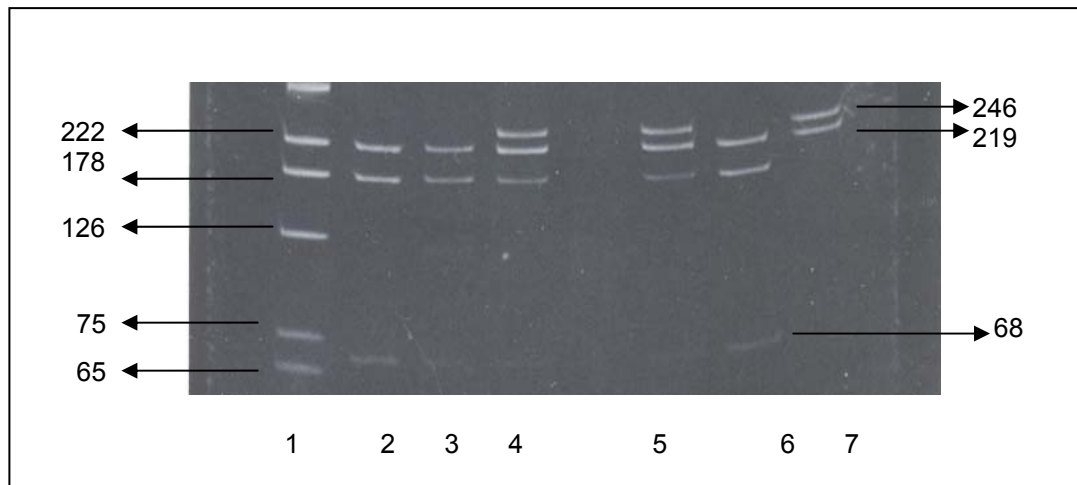
**Figura 21. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de varias CBS (mutación p.T191M).**

Se muestra el residuo que es afectado por la mutación p.T191M en la CBS Humana y las abreviaturas corresponden a: CBS HS: CBS (*Homo sapiens*); CBS SC, CBS de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*); RN, CBS de rata; CYSK EC, *E.coli* O- acetilserine liasa (*Escherichia coli*); CYSK ST acetilserine liasa (*Salmonella typhimurium*), CYSN SO, spinach cisteina sintasa (*Spinacia oleracea*).



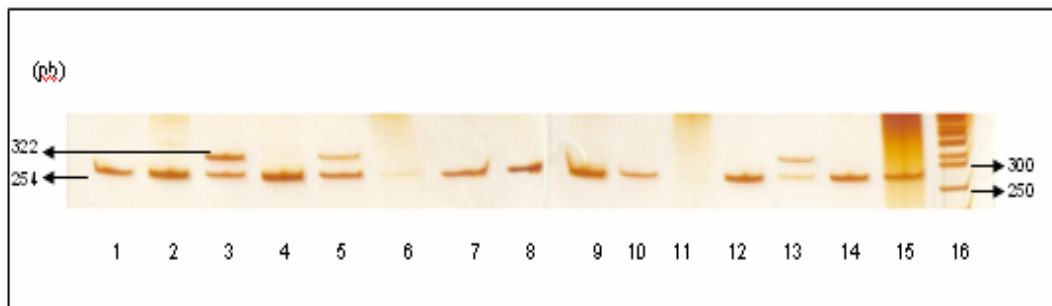
**Figura 22. Tamizaje del polimorfismo c. 699C/T de la CBS.**

El polimorfismo elimina un sitio de restricción cuando se digiere con la enzima RsaI. Los fragmentos obtenidos son visualizados en un gel de PAGE al 12%. Carril 2, 3, 5, 6, C/T. Carril 1, T/T. Carril 4 C/C. Carril 7 Marcador de peso molecular, (p GEM).



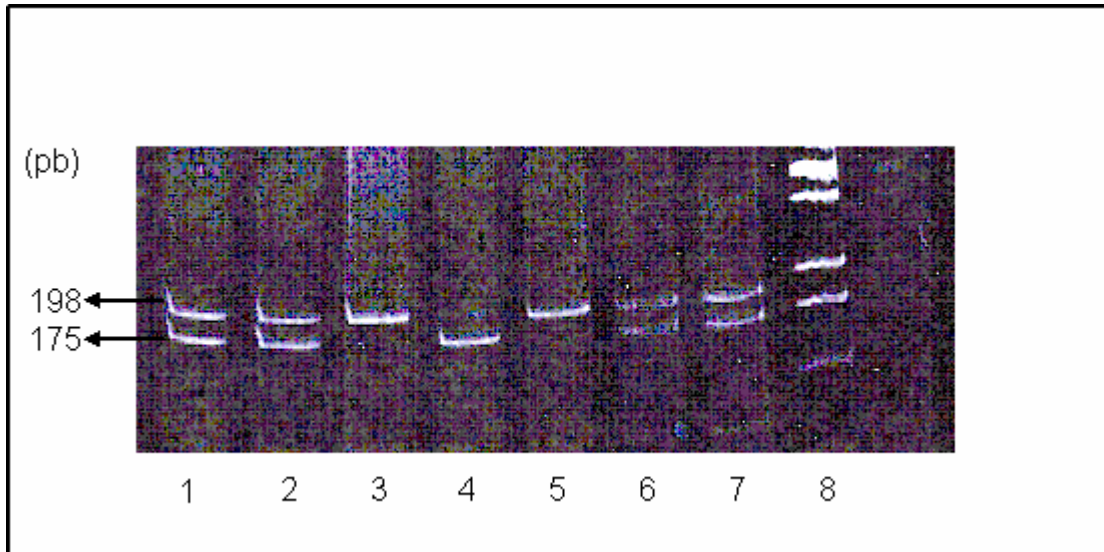
**Figura 23. Tamizaje del polimorfismo c.1080C/T de la CBS**

El polimorfismo elimina un sitio de restricción para la enzima BstUI. Los fragmentos obtenidos son visualizados en un gel de poliacrilamida al 12%. Carril 1. Marcador de peso molecular (p GEM). Carril 2, 3 y 6. C/T. Carril 4 y 5. C/C. Carril 7, T/T.



**Figura 24. Amplificación del polimorfismo c.844 inser 68 pb de la CBS.**

Un fragmento de 254 pb normal y a un fragmento de 322 correspondiente a la inserción. Gel de poliacrilamida al 12%: Los carriles 3, 5 y 13 tiene la inserción, 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 y 15 son normales; 16 corresponde al peso molecular. Las condiciones de la PCR se dan en la Tabla 2.



**Figura 25. Análisis del polimorfismo c.677C/ T de la MTHFR**

Las condiciones del PCR se dan en la tabla N 2. El polimorfismo TT crea un sitio de restricción. La Figura ilustra los fragmentos de ADN obtenidos luego de la digestión con la enzima de restricción Taq I en gel de poliacrilamida al 12%. Los carriles 1, 2, 6 y 7 son C/T, carril 4 es T/T. Los carriles 3 y 5 son C/C. El carril 8 corresponde al marcador de peso molecular (p GEM).

La madre del paciente de la familia N°1, portadora de la mutación p.R121H mostró homocisteinemia basal (20.6  $\mu\text{M}$ ) y pos carga de metionina (43.92  $\mu\text{M}$ ). Todos los heterocigotos p.T191M fueron hiperhomocisteinémicos pos carga de metionina, sin embargo, mostraron variabilidad en las veces de aumento de la homocisteína lo cual se estimó en el rango de 2.03 hasta 7.82, mientras la portadora de la mutación p.A288T mostró un aumento de 2.6 (VN= 2.78). La comparación entre estos grupos se muestra en la Tabla 1 del anexo 3. La diferencia entre la cantidad de homocisteína en ayuno y la cisteína en los portadores de las mutaciones p.R121H y p.T191M de la CBS va desde 0,086 hasta 0,12 (VR <0,053).

Es decir, esta relación permite identificar portadores, como fue propuesto en 1998 por Boodie *et al.* En la familia N° 9 se observó que la madre tuvo niveles normales de homocisteína basal y disminuídos de cisteína, la relación entre homocisteína y cisteína está dentro del rango normal, mientras la hermana, quien es asintomática, con valores normales de homocisteína basal y cisteína disminuída muestra una relación de 0,069 VR < 0,053 es decir corresponde al estado portador (Tabla 2 del anexo 3). El polimorfismo c.844 inser 68 se encontró en el padre del probando N° 1 portador de la mutación p.A288T, en la abuela del caso índice N° 3 homocigoto para la mutación p.T191M y en cuatro miembros de familia N° 9 cuyo probando no se le ha identificado la mutación en la CBS. Los haplotipos asociados a este polimorfismo difieren de los encontrados en la población normal (Tabla 3 del anexo 3).

**Tabla 12. Resultados bioquímicos y moleculares de pacientes homocistinúricos en una población colombiana**

Número	Edad <sup>a</sup> / Sexo	Mutacion de la CBS	Polimorfis mo c.677 C>T de la MTHFR	T Hcy <sup>b</sup>	Metionina <sup>c</sup>	Polimorfismos de la CBS			Origen etnico y geografico
						c.844INS68	699 C/T	1080 C/T	
(1) <sup>d</sup>	7/M	A288T/ R121H	C/T	399	427	Wt/ Wt	C/C	T/T	Mestizo Antioquia
(2) <sup>e</sup>	5/M	p.T191M/ p.T191M	C/T	293	57	Wt/ Wt	C/C	T/T	Mestizo Antioquia
(3) <sup>f</sup>	10/M	p.T191M/ p.T191M	C/T	372	431	Wt/ Wt	C/C	T/T	Mestizo Caldas
(3.1) <sup>f</sup>	16/M	p.T191M/ p.T191M	C/T	231	932	Wt/ Wt	C/C	T/T	Mestizo Caldas
(4)	7/M	p.T191M/ p.T191M	T/T	268		Wt/ Wt	C/C	T/T	Mestizo Caldas
(5)	16/M	p.T191M/ p.T191M	C/C	226		Wt/ Wt	C/C	T/T	Mestizo Antioquia
(6)	10/M	p.T191M/ p.T191M	C/C	281	175	Wt/ Wt	C/C	T/T	Mestizo Valle
(7)	14/M	p.T191M/ p.T191M	C/C	275	816	Wt/ Wt	C/C	T/T	Mestizo Antioquia
(8)	10/M	p.T191M/ p.T191M	C/C	200		Wt/ Wt	C/C	T/T	Mestizo Antioquia-Valle
(9)	14/F	ND <sup>g</sup> /ND <sup>g</sup>	C/T	242		Wt/ Wt	T/T	C/C	Mestizo Boyaca
(10)	8/M	ND <sup>g</sup> /ND <sup>g</sup>	C/C	110	30	Wt/ Wt	T/T	C/C	Mestizo Tolima

Edad<sup>a</sup>, edad al diagnóstico. THcy<sup>b</sup>, Concentración de homocisteína total en plasma antes del tratamiento, valores de referencia < 17µM, Metionina<sup>c</sup>, metionina en plasma, valores de referencia = 27+7µM.<sup>f</sup> 3 y 3.1 son hermanos. <sup>d</sup> muere a los 12 años, <sup>e</sup> muere a los 9 años\* p.T191M /p.T191M. homocigotos la mutación p.T191M. p.A288T / p.R121H heterocigoto compuesto.WT/WT , homocigotos normales con respecto a c.844 inser 68. C/C homocigotos normales, C/T, heterocigotos, T/T homocigotos con los polimorfismos c.699C/T, o c.1080 C/T de la CBS. CBS, Cistationina β Sintasa. ND<sup>g</sup> no determinada, no p.T191M. p.A288T ni p.R121H.

**Tabla 13. Haplotipos asociados a la mutación p.T191M**

Numero de Familia	Edad <sup>a</sup> / Sexo	Mutacion de CBS		T Hcy <sup>b</sup> <16μ M	Res B6	Polimorfismos de la CBS			Haplotipo	
						844INS68	699 C>T	1080 C>T		
2	5/M	p.T191M/ p.191M	Caso Indice	293	No	Wt/ Wt	C/C	T/T	I	
	44/M	p.191M/wt	Madre(2)	21		Wt/ Wt	C/C	T/T	I	
	2/F	p.T191M/wt	Sobrino (2)	11		Wt/ Wt	C/T	C/C	II	
3	10/M	p.T191M/ p.T191M	Caso Indice	372	No	Wt/ Wt	C/C	T/T	I	
	3.1	16/M	p.T191M/ p.T191M	Caso Indice	231	No	Wt/ Wt	C/C	T/T	I
	44/M	p.T191M/wt	Padre(3y3.1)	31		Wt/ Wt	C/T	C/T	III	
	44/F	p.T191M/wt	Madre(3y3.1)	17		Wt/ Wt	C/T	C/T	III	
4	7/M	p.T191M/ p.T191M	Caso Indice	268	No	Wt/ Wt	C/C	T/T	I	
	42/M	p.T191M/wt	Padre (4)	39		Wt/ Wt	C/C	C/T	IV	
	41/M	p.T191M/wt	Madre (4)	32		Wt/ Wt	C/T	C/T	III	
	42/F	p.T191M/wt	Tia (4)	10		wt/wt	C/T	T/T	V	
5	16/M	p.T191M/ p.T191M	Caso Indice	226	No	Wt/ Wt	C/C	T/T	I	
	45/M	p.T191M/wt	Padre ( 5)	12		Wt/ Wt	C/C	C/T	IV	
	41/F	p.T191M/wt	Madre (5)	12		Wt/ Wt	C/T	C/T	III	
	42/F	p.T191M/wt	Tia (5)	19		Wt/ Wt	C/C	C/T	IV	
6	10/M	p.T191M/ p.T191M	Caso Indice	281	No	Wt/ Wt	C/C	T/T	I	
	40/M	p.T191M/wt	Padre (6)	24		Wt/ Wt	C/C	T/T	I	
	41/F	p.T191M/wt	Madre (6)	17		Wt/ Wt	C/T	C/T	III	
7	14/M	p.T191M/ p.T191M	Caso Indice	275	No	Wt/ Wt	C/C	T/T	I	
	40/M	p.T191M/wt	Padre (7)	12						
	41/F	p.T191M/wt	Madre (7)	23						
8	10/M	p.T191M/ p.T191M	Caso Indice	200	No	Wt/ Wt	C/C	T/T	I	
		p.T191M/wt	Padre (8)	9		Wt/ Wt	C/C	C/T	IV	
		p.T191M/wt	Madre (9)	4		Wt/ Wt	C/C	T/T	I	

Edad <sup>a</sup>, edad al diagnóstico. T Hcy <sup>b</sup> Concentración de homocisteína total en plasma. CBS, Cistationina β Sintasa.

**Tabla 14. Comparación entre la frecuencia de los haplotipos asociados a las mutaciones p.A288T, p.R121H, p.T191M de la CBS y los encontrados en la población asintomática.**

Haplotipo	Polimorfismos de la CBS			Normales <sup>a</sup> n =102	% <sup>b</sup>	p.T191M <sup>c</sup> N =14	% <sup>d</sup>	p.A288T <sup>e</sup>	pR121H <sup>f</sup>
	c.844 INSER 68	c.699 C>T	1c.080 C>T						
I	WT/WT	C/C	T/T	9	8,82	3	21.42	1	1
II	WT/WT	C/T	C/C	18	17,64	1	7.14		
III	WT/WT	C/T	C/T	8	7,84	5	35.71		
IV	WT/WT	C/C	C/T	13	12.74	4	28.5		
V	WT/WT	C/T	T/T	9	8.82	1	7.14		
VI	WT/WT	C/C	C/C	37	36.27				
VII	WT/WT	T/T	C/C	2	1.96				
VIII	844 INSER 68	T/T	T/T	2	1.96				
IX	844 INSER 68	C/C	C/C	1	0.98				
X	844 INSER 68	C/C	C/T	2	1.96			1	
XI	844 INSER 68	C/T	C/C	1	0.98				

Normales <sup>a</sup> Frecuencia de los haplotipos en población asintomática.

% <sup>b</sup> Porcentaje de haplotipos en población asintomática.

p.T191M <sup>c</sup> Individuos portadores de la mutación p.T191M.

% <sup>d</sup> Porcentaje de haplotipos en portadores de la mutación p.T191M.

p.A288T <sup>e</sup> Portadores de la mutación p.A288T.

p.R121H <sup>f</sup> Portadores de la mutación p.R121H.

WT/WT , homocigotos normales con respecto a c.844 inser 68. C/C homocigotos normales, C/T, heterocigotos, T/T homocigotos con los polimorfismos c.699C/T, o c.1080 C/T de la CBS. CBS, Cistationina β Sintasa.

## 5. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio en Colombia en donde se cuantifica la homocisteína basal y pos carga de metionina en una misma población. Se analizó el nivel de homocisteína antes y después del tratamiento en pacientes, lo cual permitió detectar deficiencias en el catabolismo de homocisteína, un aminoácido trombogénico, bien sea por alteración molecular de las enzimas que participan en su catabolismo o por deficiencia de las coenzimas. El hallazgo de un 7,84 % de hiperhomocisteinemia moderada en la población sana estudiada muestra que este factor, considerado de riesgo para el desarrollo de la enfermedad vascular, se encuentra presente en un porcentaje importante de una población asintomática. La concentración de homocisteína en ayuno (basal) en la población sana fue de distribución normal con valores similares a los reportados por Refsum, *et al.*, (1998) y Cordoba *et al.*, (2002). Los pacientes identificados como hiperhomocisteinémicos moderados después de la carga de metionina fueron 87%, en contraste Graham *et al.*, (1997) en un estudio con 1500 participantes reportaron que con este protocolo se identifica un 27% de pacientes hiperhomocisteinémicos, y Bostom, *et al.*, (1995) en un estudio con 274 participantes hallaron un valor de 40%. El resultado obtenido puede corresponder a que la hiperhomocisteinemia tiene un origen nutricional (deficiencia de vitamina B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> o de folato) o genético (termolabilidad de la MTHFR o heterocigocidad de la deficiencia de CBS) y

de acuerdo con esto, es posible que la población estudiada tenga bajos niveles de vitamina B<sub>6</sub> en comparación con las poblaciones analizadas por Graham *et al.*, (1997) y Bostom, *et al.*, (1995). Sin embargo, esta concentración de vitamina permite una buena tolerancia a la metionina de la dieta, el déficit de vitamina B<sub>6</sub> se hace evidente cuando se somete el organismo a una sobre carga de metionina, debido a que este aminoácido se transforma en S-adenosilmetionina, conocido inhibidor de la MTHFR y activador de la CBS, de esta forma la vía de transulfuración se estimula con la carga de metionina (Candito, *et al.*, 1999). En los niveles de homocisteína pos carga de metionina el grupo de los hombres mostró una diferencia significativa ( $p = 0.006$ ) con respecto al de las mujeres, estos resultados indican una posible deficiencia de vitamina B<sub>6</sub>, mayor en los hombres que en las mujeres; este efecto es también evidenciado al comparar las veces que aumentó la homocisteína luego de la carga de metionina en el grupo de hombres y de mujeres. En el futuro la cuantificación de la vitamina B<sub>6</sub> en el grupo de estudio permitirá evaluar si el aumento de homocisteína pos carga se debe a una deficiencia de vitamina B<sub>6</sub> mayor en el grupo masculino que en el femenino. Por otra parte, la hiperhomocisteinemia en ayuno se puede atribuir a una alteración en la remetilación de homocisteína a metionina por deficiencia de metilendetrahidrofolato reductasa, de vitamina B<sub>12</sub> o de ácido fólico, en estos casos no se observa aumento de la hiperhomocisteinemia luego de la carga de metionina (Ubbink, *et al.*, 1996). En la deficiencia de folato está alterada la remetilación, esto resulta en un decrecimiento en la

síntesis de SAM. Como consecuencia se inhibe la actividad de la CBS y se modifica el catabolismo de la homocisteína de manera significativa. Dado que las dos rutas de catabolismo están alteradas se observa hiperhomocisteinemia en condiciones de ayuno (Kim, *et al.*, 1997).; en este estudio se identificó un individuo con este comportamiento. El alto porcentaje de hiperhomocisteinémicos (87%) que fueron detectados luego de suministrar la carga de metionina, sugieren que la población estudiada tiene factores nutricionales (deficiencia de vitamina B<sub>6</sub>) o genéticos (polimorfismos) que pueden modificar los niveles de homocisteína, como la respuesta a la prueba funcional. Con base en lo anterior en investigaciones futuras es importante considerar el suministro de metionina para la detección de la hiperhomocisteinemia, como factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad vascular en la población colombiana. La presencia del polimorfismo c.844 inserción 68 de la CBS que ha mostrado resultados contradictorios en diferentes grupos de investigación, en este estudio se encontró con una frecuencia de 0,026 % en los individuos asintomáticos con homocisteína normal tras la carga de metionina, mientras que en los individuos hiperhomocisteinémicos no se detectó este polimorfismo, lo cual estaría de acuerdo con lo reportado por Tsai, (2000), quienes relacionan la existencia de este polimorfismo con un efecto protector de hiperhomocisteinemia. La frecuencia del alelo raro (T) del polimorfismo c.699C>T no se relacionó con los niveles de homocisteína ( $p= 0.2$ ), contrario

a lo reportado por (Hanson, *et al.*, 2001), mientras el polimorfismo c.1080 C/T mostró diferencia significativa cuando se comparó la frecuencia del alelo raro entre el grupo de las personas hiperhomocisteinémicas con los normales. En la población estudiada se observó una frecuencia para el alelo T de 0.5, comparable con (0.487) el obtenido por Camacho *et al.*, (1998). En este estudio la población con niveles normales de homocisteína se encontró todavía más alta (0.71) en los pacientes hiperhomocisteinémicos moderados. Adicionalmente estos individuos homocigotos T/T para la variante termolábil de la c.677C>T mostraron un riesgo (Odds ratio) de 5.14 ( $p = 0.034$ ) de ser hiperhomocisteinémicos, posiblemente debido a que el polimorfismo c.677C>T responsable de la variante termolábil de la enzima metiléntrahidrofolato reductasa produce una actividad reducida de esta y como consecuencia, niveles aumentados de homocisteína. La presencia de este polimorfismo puede aumentar significativamente la susceptibilidad al desarrollo de enfermedad vascular en esta población (Kolling, *et al.*, 2004). De acuerdo con la literatura, el polimorfismo c.677C>T responsable de la variante termolábil de la enzima MTHFR, las frecuencias varían para el alelo T y el genotipo TT entre 0.11/0,00 en afro americanos y 0,59/0,35 en población mexicana (Mutchinick, *et al.*, 1999).

Otro factor que puede predisponer a la manifestación de enfermedad es la hiperhomocisteinemia moderada (niveles de homocisteína en el rango de 17 a 39  $\mu\text{M}$ ), esta ha sido observada en portadores de la deficiencia en la

actividad de la CBS (Tsai, *et al.*, 1996a, Sperandio, *et al.*, 1996a y Boers, *et al.*, 1985c). En este estudio se observó claramente que de los 28 familiares de pacientes con hiperhomocisteinemia severa analizados, el 61 % (17) fueron hiperhomocisteinémicos moderados, sin características de homocistinuria. Sin embargo, llaman la atención los niveles de homocisteína elevados en ayuno que fueron detectados en estos individuos, contrario a lo reportado por Guttormsen *et al.* (2001), se especula que este efecto puede corresponder al tipo de mutación que portan, o a factores epigénicos como puede ser el tipo de alimentación y estilo de vida. La cuantificación de los niveles de homocisteína basal permitió identificar el 37,5% de los portadores y la homocisteína pos carga de metionina identificó el 87,5 % de estos, mientras Dudman, *et al.*, (1993) suministró carga de metionina e identificó el 57 % de portadores obligados, lo cual puede indicar que la identificación de portadores de la mutación p.T191M por cuantificación de homocisteína luego del suministro de carga de metionina, puede ser un método apropiado para la detección de heterocigotos de esta mutación. Sin embargo cuando ya se tienen identificadas las mutaciones más comunes en una población, el estudio molecular es el método más adecuado para detectar portadores como lo proponen Guttormsen, *et al.*, (2001), Refsum *et al.*, (2004a). Por otra parte la respuesta a la carga de metionina los portadores de la mutación (p.T191M) de las familias 3, 4 y 5, aumentó 3.35, 3 y 4,16 veces ( $V R = 2,4$ ), esta variabilidad puede ser atribuida a la acción de genes modificadores de la actividad de CBS, o factores ambientales implicados en la síntesis de

cofactores como la SAM, el fosfato de piridoxal y el grupo hemo como fue propuesto por MacLean, *et al.*, (2002).

Se estudiaron las características clínicas, bioquímicas de once pacientes hiperhomocisteinémicos severos (homocistinúricos) colombianos. La cuantificación de aminoácidos mostró un aumento en la concentración de metionina y de homocisteína en plasma, lo cual correspondió a una hiperhomocisteinemia severa por deficiencia de la enzima CBS (Mudd, S., *et al.*, 2001); los niveles altos de metionina en plasma y la ausencia de aciduria metilmalónica, permitieron descartar a priori defectos en las enzimas MTHFR (Rosenblatt, 2000), metionina sintasa (MS), metionina sintasa reductasa (MSR) o en el metabolismo de las cobalaminas (CBL C, D, F) (Anderson y Aspira, 1998, Barshop, *et al.*, 1990).

El estudio mostró ocho pacientes con el genotipo (p.T191M/p.T191M) quienes manifestaron una interesante variedad de características fenotípicas: miopía, *ectopia lentis*, glaucoma, escoliosis, *pectum excavatum*, *genu valgum*, hábitos marfanoides alteración a nivel de las rodillas y tobillos, tromboembolismo, convulsiones, retardo del lenguaje, retardo global del desarrollo y retardo mental, con diferente grado de alteración y edad de la manifestación del signo. Esta variabilidad se manifiesta inclusive entre dos hermanos (casos 3 y 3.1), quienes muestran diferencia en la presentación del signo como se observó a nivel del sistema ocular, edad de presentación, alteraciones en el sistema músculo esquelético y diferente grado de retardo mental definido como grado alcanzado en la escolaridad, autonomía para

realizar su auto cuidado y variable grado de interacción social. Casos similares de fenotipos discordantes entre hermanos afectados han sido reportados por Franchis, *et al.*, (1994) y Kraus, J., (1994). Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de otros factores aparte de las mutaciones en la CBS, que pueden contribuir a la heterogeneidad clínica observada. Los homocigotos p.T191M de este estudio manifestaron mejoría clínica, pero no disminuyeron de manera significativa el nivel de homocisteína plasmática luego del tratamiento con piridoxina y ácido fólico. Los afectados con esta mutación no respondieron bioquímicamente a la piridoxina, posiblemente porque la mutación afecta el residuo treonina 191 y este se encuentra en el dominio móvil o bisagra (residuos 186 al 222, Meier, M *et al.*, 2001) implicado en la retención del PLP. Este cofactor no podría mantenerse unido a la enzima y la actividad catalítica estaría disminuida o ausente. El residuo p.T191M está altamente conservado en varias especies, indicando la importancia de este residuo en la funcionalidad de la proteína. Igualmente otra de las mutaciones encontrada, la p.R121H, está cerca de la p.T191M, el PLP se une al residuo Lisina 119, posiblemente la unión del cofactor se afecte con estas mutaciones. Dos pacientes de los ocho homocigotos p.T191M tienen problemas vasculares que consisten en eventos trombóticos (casos 2 y 4). Uno de ellos tiene el genotipo MTHFR c.677 T/T que es un factor adicional de riesgo trombótico (Kluijtmans, *et al.*, 1998). La familia de este paciente tiene historia de trombosis, enfermedad coronaria y mala

formación renal. En este estudio ninguno de los otros pacientes es homocigoto para el alelo c.677 TT de la MTHFR.

En el probando de la familia N° 6 se encontraron características clínicas como la hiperhomocisteinemia severa (homocistinuria), *ectopia lentis*, miopía, escoliosis, hábitos marfanoides y además criptorquidia y síndrome Klinefelter. La criptorquidia también fue observada en el caso índice de la familia N° 2 y en uno de los hermanos afectados de la familia N° 3. La criptorquidia es de etiología multifactorial, involucra factores genéticos y ha sido observada en otros pacientes con síndrome de Klinefelter (Kamischke, *et al.*, 2003).

Al expresar en *E coli* la proteína con la mutación nueva p.A288T no se detectó actividad de la enzima CBS. La mutación p.A288T resulta de la transición de G por A en el nucleótido 862, y conduce a un cambio de la alanina, aminoácido apolar, por la treonina, aminoácido polar, proponemos la hipótesis de que este cambio posiblemente altere la conformación tridimensional de la proteína y por esta razón se afecte la actividad catalítica de la enzima. Las mutaciones p.I278T y la p.G307S frecuentes en Europa (Moat, *et al.*, 2004) no fueron encontradas en nuestros pacientes. La p.T191M fue la mutación más frecuente en esta población de pacientes colombianos. De los 20 alelos estudiados 14 son p.T191M. La frecuencia de homocigotos p.T191M es del 72%, siendo la más alta en pacientes hiperhomocisteinémicos severos reportada hasta el momento en la literatura.

Mientras que en la península Ibérica el estudio de un grupo de 16 hiperhomocisteinémicos severos mostró una frecuencia del 50% de homocigotos p.T191M (Urreizti, *et al.*, 2003), en Venezuela la frecuencia en 7 pacientes hiperhomocisteinémicos severos fue del 20% (De Lucca y Casique, 2004) y en el Brasil el estudio de una población de 14 pacientes hiperhomocisteinémicos severos la frecuencia fue del 7% (Porto, *et al.*, 2005). Los resultados mostraron que la p.T191M presenta el mismo haplotipo que los pacientes españoles, lo que podría indicar que posiblemente esta mutación llegó a la población colombiana durante la conquista y la alta frecuencia puede deberse a un efecto fundador; mientras los portadores de la mutación p.T191M muestran haplotipos distintos explicados probablemente por procesos de recombinación, conversión genética o por recurrencia. En este estudio la frecuencia de los haplotipos entre normales y portadores de las mutaciones del gen de la CBS es diferente, ningún haplotipo se llegó a relacionar con el estado portador de las mutaciones. Las personas hiperhomocisteinémicas moderadas detectadas en la población asintomática no son portadoras de la mutación p.T191M (frecuente en el 72% de los homocistinúricos severos) ni de la p.A288T, es posible que el nivel de vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, de ácido fólico o el haplotipo los haga susceptibles al desarrollo de la hiperhomocisteinemia. Las limitaciones del estudio se presentaron cuando se asumió que los pacientes se adherieron adecuadamente al tratamiento, consumiendo los medicamentos ordenados a pesar de tener que ingerir un número elevado de pastillas hasta completar la

dosis diaria requerida y disminuyendo el consumo de alimentos ricos en metionina. Otra de las limitaciones de esta investigación se presentó con el número de personas aparentemente sanas que participaron en el estudio. Finalmente, en los pacientes hiperhomocisteinémicos severos que no responden a la piridoxina al suministrar betaína (trimetilglicina) que es un donador del grupo metilo se elimina el efecto tóxico de la homocisteína al ser remetilada a metionina. Por otra parte la detección temprana e instauración del tratamiento adecuado en los afectados permite mejorar el pronóstico de la enfermedad reduciendo en un 80 a 90 % el riesgo cardiovascular (Yap, *et al.*, 2001). Al probando de la familia N° 10 se le detectó hiperhomocisteinemia severa a los 8 meses de edad iniciando el tratamiento con piridoxina, ácido fólico y betaína, al ser evaluado a los 6 años de vida, se encontró un leve retardo del lenguaje y no manifiesta ninguna de las características clínicas mostradas por pacientes hiperhomocisteinémicos severos. A nivel mundial la realización del tamizaje molecular (Gaustadnes *et al.*, 1999, Refsum, *et al.*, 2004 a) para detectar afectados con hiperhomocisteinemia severa ha mostrado ser 11 veces más efectivo para identificar hiperhomocisteinémicos severos que el número calculado a partir del tamizaje bioquímico selectivo (Sokolová, *et al.*, 2001). Sin embargo en estos países el espectro de mutaciones es amplio y esto dificulta en parte la realización del tamizaje molecular (Kraus, *et al.*, 1999). La frecuencia con que se encontró la mutación que conduce a la hiperhomocisteinemia severa en Colombia, y la metodología molecular con RLFP (sencilla y económica)

desarrollada en este trabajo podría facilitar el tamizaje molecular selectivo en la población de riesgo, que permita detectar los afectados e instaurar el tratamiento de forma temprana antes que la enfermedad se manifieste.

Este estudio mostró que el tipo de hiperhomocisteinemia, la edad de presentación y la severidad de la hiperhomocisteinemia, difieren en la población analizada y se debe continuar en la búsqueda de los factores epigenéticos que pueden influir en la heterogeneidad clínica observada y en aquellos que modulan el efecto de los polimorfismos en los genes CBS y MTHFR aumentando la susceptibilidad para el desarrollo de problemas vasculares y de esta forma proponer un esquema de prevención y manejo al desarrollo de las manifestaciones clínicas de la hiperhomocisteinemia severa y moderada.

## 6. CONCLUSIONES

1. Las pruebas bioquímicas (cualitativas y cuantitativas) utilizadas en este estudio fueron adecuadas para identificar y confirmar hiperhomocisteinemia en una población colombiana, estos métodos pueden constituirse en una herramienta útil para la identificación de la enfermedad en forma temprana e iniciar el tratamiento antes de que esta se manifieste.
2. Se detectaron mutaciones de la CBS en el 82% de los pacientes con hiperhomocisteinemia severa. De los detectados, la mutación p.T191M correspondió al 72%, siendo para esta mutación la frecuencia más alta reportada hasta el momento en pacientes hiperhomocisteinémicos severos.
3. En un número importante de homocigotos para la mutación p.T191M se encontró una amplia heterogeneidad al hacer la correlación genotipo-fenotipo, siendo este hallazgo útil en la consejería genética porque permite ilustrar a los padres sobre los signos que se pueden presentar en el caso de recurrencia de la patología en futuros embarazos.

4. La alta frecuencia (72%) de la mutación p.T191M de la CBS en una población de colombianos con diagnóstico clínico y bioquímico de hiperhomocisteinemia severa, permitió proponer una metodología molecular que puede ser de gran utilidad en el tamizaje molecular selectivo.
5. El hecho de encontrar una mutación nueva, la p.A288T, en el exón 8 del gen de la CBS que elimina la actividad catalítica de la enzima, como fue demostrado con la expresión en *E. coli* de la CBS mutada y que produce un fenotipo muy agresivo y devastador, es importante por que además de aportar conocimiento acerca del gen CBS también puede indicar que esta zona es una región muy importante para que el producto del este gen sea funcional y que debe ser secuenciado en estudios futuros de tamizaje de mutaciones en la CBS.
6. Las mutaciones p.T191M y p.A288T, producen un fenotipo que no responde al tratamiento con piridoxina, por lo tanto es muy importante iniciar en los afectados, una terapia que incluya el medicamento betaína, conocido dador de grupos metilo, que disminuye el efecto tóxico de la homocisteína, induciendo de manera rápida un cambio en la historia natural de la enfermedad.

7. Se identificaron las frecuencias alélicas de los polimorfismos c.699 C>T (exón 6), c.1080 C>T (exón 10) de la cistationina  $\beta$  sintasa (CBS) y de la c.677 C>T (exón 1). Estos hallazgos son relevantes dado que permiten tener datos de la estructura genética de la población colombiana lo que permite diseñar estudios de asociación entre estos polimorfismos y las enfermedades multifactoriales.
  
8. Se encontró en una población colombiana que las frecuencias alélicas del polimorfismo c.677C/T, son altas al compararlas con los reportes de la literatura. La asociación detectada entre el polimorfismo c.677C>T de la MTHFR y el riesgo de hiperhomocisteinemia moderada podría indicar aumento de la susceptibilidad al desarrollo de eventos tromboembólicos en la población colombiana. Este conocimiento permite implementar medidas preventivas tales como el suministro de vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y ácido fólico que impidan el desarrollo de la enfermedad.

## RECOMENDACIONES

1. Realizar la identificación de homocigotos con la mutación p.T191M utilizando de tamizaje molecular selectivo, como el descrito en este trabajo, para iniciar el tratamiento que minimice las graves secuelas que está enfermedad produce. Adicionalmente, la detección de portadores es importante por la relación que en la actualidad se conoce del desarrollo de enfermedades vasculares asociadas con hiperhomocisteinemia moderada.
2. Es importante realizar continuar este estudio incluyendo un mayor número de personas para establecer con mayor exactitud el número de hiperhomocisteinémicos moderados, suministrar vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, ácido fólico y determinar si suplementos disminuyen los niveles de homocisteína.
3. Es necesario confirmar la asociación entre los niveles de homocisteína, los polimorfismos analizados en este trabajo y la enfermedad vascular, estudiando pacientes egresados de las unidades de cuidados intensivos con diagnóstico de infarto agudo del miocardio lo que permitirá establecer los haplotipos que identifiquen personas en riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular

## REFERENCIAS

1. Abbott Laboratorios., División diagnóstica, Imx System, Manual del operador, operaciones del sistema, Abbott park, IL USA, 1994.
2. Alpert, A., 1999. Homocyst (e) ine, atherosclerosis, and Thrombosis. *Southern Medical Journal*. 92(9): 858-864.
3. Andersson, H., Shapira, E., 1998. Biochemical and clinical response to hydroxocobalamin versus cyanocobalamin treatment in patients with methylmalonic acidemia and homocystinruia (cbIC). *J Pediatric*. 132:121-4.
4. Aras, Ö., Hanson, NQ., Yang, F., Tsai, M., 2000. Influence of 699C→T and 1080 C→T polymorphisms of the cystathionine β-synthase gene on plasma homocysteine leves. *Clin Gent*. 58: 455-459.
5. Arrieta, L., 2002. Estudio bioquimico en familias colombianas con hiperhomocisteinemia. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá. Colombia.
6. Barber, W., Spaeth, L., 1967. Pyridoxine therapy in homocistinuria. *Lancet*. 11:337.
7. Barshop, BA., Wolff, J., Nyhan, WL., Yu, A., Prondanos, C., Jones, G., Sweetman, L., Leslie, J., Holm, J., Green, R., Jacobsen, DW.,

- Cooper, BA., Rosenblatt, D., 1990. Transcobalamin II deficiency presenting with methylmalonic aciduria and homocystinuria and abnormal absorption of cobalamin. *Am J of Med Genet.* 35: 222-228.
8. Boushey,CJ, Beresford, SAA, Omenn,GS, Motulsky, AG.1995. A quantitative assessment of plasma homocysteine as risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intake. *JAMA.* 274:1049-1057
  9. Bateman, A, 1997. The structure of a domain common to archaebacteria and the homocystinuria protein. *Trends Biochem.Sci.* 22: 12-13
  10. Bermúdez, M. Bernal, J. Espinosa, E. Cornejo, W. Briceño, I. Prieto, J. Arrieta, L. 2003. Propuesta para un protocolo de diagnóstico bioquímico de homocistinuria. *Universitas Médica* Volumen de ISSN: 00419095
  11. Boers, G., Fowler, B., Smals, A., Trijbels, F., Kleijer, W., Kloppenborg, P., 1985a. Improved identification of heterozygotes for homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency by the combination of methionine loading and enzyme determination in culture fibroblasts. *Hum Genet.* 69:164-169.
  12. Boers, G., Smal, A., Trijbels, F., Leermakers, A., Kleijer, W., Kloppenborg, P., 1985b. Unique efficiency of methionine metabolism in premenopausal women may protect against vascular disease in the reproductive years. *J. Clin.Invest.* 72: 1971-1976.

13. Boers, G., Smals, A., Trijbels, F., Fowler, B., Bakkeren, J., Schoonderwaldt, H., Kleijer, W., Kloppenborg, P., 1985c. Heterozygosity for Homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. *The New Engl. J Med.* 313(12): 709-715.
14. Bohorquez, R., Isaza, D., 1999. Diagnóstico y Tratamiento del Infarto Agudo del Miocardio. *En Texto de Cardiología.* SCC. 450-466.
15. Boodie, AM., Steen, MT., Sullivan, KM., Pasquali, M., Dembure, PP., Coates, R J., Elsas, LJ., 1998. Cystathionine- $\beta$  synthase deficiency: detection of heterozygotes by the ratios of homocysteine to cysteine and folate. *Metabolism.* 47(2): 207-211.
16. Bostom, AG., Jacques, PF., Nadeau, MR., Williams, RR., Curtis, R., Selhub, J., 1995. Post – Methionine load hyperhomocysteinemia in persons with normal fasting total plasma homocysteine: initial results from the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis.* 116:147-151.
17. Brattstrom, L., Wilcken, D., 2000. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect. *Am J Clin Nutr.* 72: 315 -323.
18. Camacho, O., Giusti, B., Restrepo, CM., Abate, R., Pepe, G., 1998. Frequency of factor V (FV) Leiden and C677T methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations in Colombians. *Thromb Haemost.* 79:883-884

19. Candito, M., Bedoucha, P., Gibelin, P., Jambou, D., Franchis, R., Sadoul, JL., Chatel, M., Obberghen, EV. , 1999. Fasting, postprandial, and post-methionine-load homocysteinemia and methylentetrahydrofolato reductase polymorphism in vascular disease. *J Inhe Metab Dis.* 22: 588-592.
20. Carson, N., Neill, D., 1962. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland, *Arch. Dis. Child.* 505-513.
21. Chalmers, R. Lawson, A. 1982. Organic Acids in man. London New York Chapman and Hall. Pag. 297-326
22. Clarke, R., L. Daly, K. Robinson, E. Naughten,S. Cahalane, B. Fowler, Graham. 1991. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N. Engl. J. Med.* 324:1149-1155
23. Córdoba, A., Arbelaez, L., Castañeda, S., 2002. Concentración plasmática de homocisteína en ayunas. *Acta Medica Colombiana.* 27:196-197.
24. De Lucca, M., Casique, L., 2004. Characterization of cystathionine beta-synthase gene mutations in homocystinuric Venezuelan patients: identification of one novel mutation in exon 6. *Mol. Genet. Metab.* 81: 209-215.
25. Desviat, LR., Perez, B., Ugarte, M. 2001. Bases moleculares de las enfermedades metabólicas hereditarias. En Diagnostico y tratamiento de las enfermedades metabolicas hereditarias. Pablo Sanjurjo y Antonio Baldellou. Madrid. Ediciones Ergon S.A. 1-13.

26. Dudman, NP. Wilcken, DE. Wang, J., Lynch, J., Macey, D., Lundberg, P., 1993. Disordered methionine/homocysteine metabolism in premature vascular disease. *Arterioscler. Thromb.* 13(9) :1253-1260.
27. Egerton, W., Silberberg, J., Crooks, R., Ray, C., Xie, L., Dudman, N., 1996. Serial measures of plasma homocyst(e)ine after acute myocardial infarction. *The Am. J. Card.* 77:759-761.
28. Finkelstein, J., Mudd, S., Irreverre, F., Laster, L. 1964. Homocystinuria due to cystathionine synthetase deficiency: the mode of inheritance. *Science* .146:785-787.
29. Fowler, B., Kraus, J., Packman, S., Rosemberg, L., 1978. Homocystinuria. Evidence of three distinct classes of cystathionine of  $\beta$  synthase mutants in cultured fibroblast. *J. Clin. Lab. Invest.* 61:645-653.
30. Franchis, R., Kozich, V., McInnes, R., Kraus, JP., 1994. Identical genotypes in siblings with different homocystinuric phenotypes: identification of three mutations in cystathionine  $\beta$ -synthase using an improved bacterial expression system. *Human Molecular Genetics.* 3(7):1103-1108.
31. Franchis, R., Fermo, I., Mazzola, G., Sebastio, G., Minno, G., Coppola, A., Andria, G., Angelo, A., 2000. Contribution of the cystathionine  $\beta$  synthase gene (844ins68) polymorphism to the risk of early-onset venous and arterial occlusive disease and of fasting hyperhomocysteinemia. *Thromb. Haemost.* 84:576-582.

32. Frosst, P., Blom, H., Renate, M., Goyette, P., Sheppard, C., Matthews, R., Boeres, G., Kluijtmans, L., Lambert, P., Heuvel, J., Rozen, R. 1995. A Candidate Genetic Risk Factor for Vascular Disease: A Common Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase. *Nature Genetics*.10: 111-113.
33. Gallagher,P.,Naughten,E.,Hanson.N.Schwichtenberg,k.,Bignell,M.,Yuan,M.,Ward,P.Yap,S.,Whitehead,A.Tsai.,M.1998. Characterization of Mutations in the Cystathionine  $\beta$  Synthase Gene in Irish patients with Homocystinuria. *Mol. Genet. Metab*.65:298-302
34. Gaustadnes, M., Kluijtmans, LA., Jensen, OK ., Rasmussen, K., Heil, SG., Kraus, JP., Blom, HJ., Ingerslev, J., Rudiger, N., 1998. Detection of a novel deletion in the cystathionine  $\beta$  synthase (CBS) gene using an improved genomic ADN based method. *FEBS letters*. 431:175-179.
35. Gaustadnes, M., Ingerslev, J., Rutiger, N., 1999. Prevalence of congenital homocystinuria in Denmark. *N. Engl J. Med*. 340:1513-1532.
36. Gerritsen, T., Vaughn, J. Waisman, H. 1962. The identification of homomocisteien in the urine. *Biochem.Biophys.Res.Comm*.Vol 9, N°6, 493-496.
37. Goyette, P., Christensen, B. , Rosenblatt , D., Rozen, R. 1996. Severa and mid mutation in cis the Methylenetetrahydrofolate Reductase. (MTHFR) Gene is and descripton of Novel Mutation in MTHFR. *Am .J .Human Genet* 59: a368-1275.

38. Graham, IM., Daly, LE., Refsum, HM., Robison, K., Brattsrom, LE., Ueland, PM., Palma-Reis, RJ., Boers, GH., Sheahan, RG., Israelsson, B., Uiterwaal, CS., Meleady, R., McMaster D., Vehoef, P., Wittema, J., Rubba, P., Bellet, H., Wautrecht, JC., de Valk, HW., Sales Luis, AC., Parrot-Roulaud, FM., Tan, K., Higgins, I., Garcon, D., Medrano, MJ., Candito, M., Evans, AE., Andria, G., 1997. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA*. 277(22):1777-1781.
39. Guttormsen, A., Ueland, P., Kruger, W., Kim, C., Ose, L., Folling, I., Refsum, H., 2001. Disposition of homocysteine in subjects heterozygous for homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ - synthase deficiency: relationship between genotype and phenotype. *American Journal of Medical Genetics*. 100:204-213.
40. Haedecke, C., Anders, J., Kellner, H., Weiss, N., 1999. Multifocal bursitis in a patient with homozygous homocystinuria. *J. Inher. Metab. Dis*. 22:185-186.
41. Hanson, N., Aras, O., Yang, F., Tsai, M., 2001. C677T and A 1298 C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene : incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-Methionine load homocysteine in vascular disease. *Clin Chem*. 47:661-666.
42. Kamischke, A., Baumgardt, A., Horst, J., Nieschlag, E., 2003. Clinical and diagnostic features of patients with suspected klinefelter's syndrome. *Journal of Andrology*. 24(1):41-48.

43. Kang, S., Zhou, J., Wong, P., Kowalisyn, J., Strokosch, G. 1988. Intermediate Homocysteinemia: A Thermolabile Variant of Methylenetetrahydrofolate Reductase. *Am J Human Genet.* 43: 414-421
44. Kang, S., Wong, P., Otto, H., Horwitz, A., Grix, A., 1991a. Intermediate hyperhomocysteinemia resulting from compound heterozygosity of methylenetetrahydrofolate reductase mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 48:546-551.
45. Kang, S., Wong, P., Susmano, A., Sora, J., Norusis, M., Ruggie M. 1991b. Thermolabile methylenetetrahydrofolate Reductase: An Inherited risk factor for coronary artery disease. *Am.J.Hum. Genetic.* 48:536-545.
46. Kennedy, C., Shih, Rowland, L. 1965. Homocystinuria: a report in two siblings. *Pediatrics.* 36(5):736-741.
47. Kery, V., Bukovska, G., Kraus, J., 1994. Transsulphuration depends on heme in addition to piridoxal 5- phosphate. *The Journal of Biological Chemistry.* 41:25283-25288.
48. Kim, C., Gallagher, P., Guttormsen, A., Refsum, H., Ueland, P., Folling, I., Whitehead, A., Tsai, M., Kruger, W., 1997. Funtional modeling of vitamin responsiveness in yeast: a common pyridoxine-responsive cystathinine B-synthase mutation in homocystinuria. *Hum. Mol. Gene.* 6(13):2213-2221.

49. Kluijtmans, L., Verhoef, P., Boers, G., Heijer, M., Huevel, L., Trijbels, F. 1998. Cystathionine  $\beta$  Synthase and mild hyperhomocysteinemia: an association study. *Neth J Med*, 52:34.
50. Kluijtmans, L., Boers G., Kraus, JP. 1999. The molecular basis of Cystathionine  $\beta$  synthase deficiency in Dutch Patients with homocystinuria: Effect of CBS Genotype on Biochemical and Clinical Phenotype and on Response to treatment.. *Am J Hum Genet*.65:59-67.
51. Kolling, K., Ndrepepa, G., Koch, W., Braun, S., Mehilli, J., Schomig, A., Kastrati, A., 2004. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphisms, plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 levels and the extent of coronary artery disease. *Am. J. Cardiol*. 93:1201-1205.
52. Kozich, V., Kraus JP., 1992. Screening for mutations by expressing patient cADN segments in E.coli: Homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency. *Hum Mutat*. 1:113-123.
53. Kraus, J., Packman, S., Fowler, B., Rosenberg, E., 1978. Purification and properties of cystathionine  $\beta$ -synthase from human liver. *J. Biol Chem*. 253:6523-6528.
54. Kraus, J., Le, K., Swaroop, M., Ohura, T., Tahara, T., Rosenberg, L., Roper, M., Kozich, V., 1993. Human cystathionine  $\beta$ -synthase cADN: sequence, alternative splicing and expression in cultured cells. *Hum. Mol. Genet*. 2(10):1633-1638.

55. Kraus, J., 1994. Molecular basis of phenotype expression in homocystinuria. *J. Inher. Metab. Dis.* 17:383-390.
56. Kraus, J., 1998a. Biochemistry and molecular genetics of cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency. *Eur. J. Pediatr.* 157Suppl 2: S50-S53.
57. Kraus, J.P., Oliveriusova, J., Sokolova, J., Kraus, E., Vlcek, C., de Franchis, R., Maclean, K., Bao, L., Bukovska, G., Patterson, D., Paces, V., Ansorge, W., Kozich, V., 1998b. The human cystathionine B-synthase (CBS) gen: complete sequence alternative splicing, and polymorphisms. *Genomics.* 52:312-324.
58. Kraus, J., Janošik, M., Kožich, V., Mandell, R., Shih, V., Sperandeo, M., Sebastio, M., De Franchis, R., Andria, G., Kluitjmans, L., Blom, H., Boers, G., Gordon, R., Kamoun, P., Tsai, M., Kruger, W., Koch, H., Ohura, T., Gaustadnes, M., 1999. Cystathionine  $\beta$ -Synthase mutations in homocystinuria. *Hum. Mutat.* 13:362-375.
59. Krupková, L., Veselá, K., Vitová, A., Janosiková, B., Anđel, M., Kožich, V., 2002. Methionine – loading test: evaluation of adverse effects and safety in an epidemiological study. *Clinical nutrition.* 21(2): 151-156.
60. Kutzbach, C., Stokstad, E., 1971. Mamalian methylenetetrahydrofolate reductasa partial purification, properties, and inhibition by s- adenosylmethionine. *Biochim. Biophys. Acta.* 250. 459-477.
61. Lentz, S. 1998. Mechanisms of thrombosis in hyperhomocysteinemia. *Curr Opin hematol* 5(5):343-349.

62. Lievers, K., Kluijtmans, L., Heil, S., Boers, G., Verhoef, P., den Heijer, M., Trijbels, F., Blom, H., 2003. Cystathionine B-synthase polymorphisms and hyperhomocysteinaemia: an association study. *Eur. J. Hum. Genet.* 11(1): 23-29.
63. Lindgren, A., Brattstrom, L., Norrving, B., Hultberg, B., Andersson, A., Johansson, B., 1995. Plasma homocysteine in the acute and convalescent phases after stroke. *Stroke.* 26:795-800.
64. Lipton, S., Kim, W., Choi, Y., Kumar, S., D'Emilia, D., Rayudu, P., Arnelle, D., Stambler, J., 1997. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D- aspartate receptor. *Pro.Natl. Acad. Sci.USA.* 94:5923-592.
65. Lowry, O., Rosenberg, N., Farr, A., Randall, R. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem;* 193:265-75.
66. MacLean, K., Gaustadnes, M., Oliveriusová, J., Janošik, M., Kraus, E., Kožich, V., Kery, V., Skovby, F., Rudiger, N., Ingerslev, J., Stabler, S., Allen, R., Kraus, JP., 2002. High homocysteine and thrombosis without connective tissue disorders are associated with a novel class of cystathionine  $\beta$ - synthase (CBS) mutations. *Hum. Mutat.* 19:641-655.
67. Maniatis , T., Fritsch, E., Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning: a laboratory manual.Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor,NY

68. McCully, K. 1969. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for pathogenesis of arteriosclerosis. *Am. J. Pathol.* 56:111-128.
69. McCully, K., 1998. Homocysteine, folate, vitamin B6 and cardiovascular pathology. *JAMA.* 279(5):392-393.
70. Meier, M., Janosik, M., Kery, V., Kraus, JP., Burkhard, P., 2001. Structure of human cystathionine B-synthase: a unique pyridoxal 5`-phosphate-dependent hem protein. *EMBO J* 20:3910-3916
71. Meiklejohn, D., Vickers, M., Dijkhuisen, R., Greaves, M., 2001. Plasma homocysteine concentrations in the acute and convalescent periods of atherothrombotic stroke. *Stroke.* 32:57-62.
72. Miller, J., Mercado-Ribaya, J., Russell, R., Shepard, C., Morrow, F., Cochary, E., Sadowski, J., Gershoff, S., Selhub, J., 1992. Effect of vitamin B6 deficiency on fasting plasma homocysteine concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* 55:1154-1160.
73. Miller, J., Nadeau, M., Smith, J., Smith, D., Selhub, J., 1994. Folate-deficiency-induced homocysteinaemia in rats: disruption of s-adenosylmethionine`s co-ordinate regulation of homocysteini metabolism. *Biochemical.* 289:415-419.
74. Moat, S., Bonham, J., Allen, J., Powers, H., McDowell, I., 1999. Decresed circulating plasma lipids in patients with homocystinuria. *J. Inher. Metab. Dis.* 22:243-246.

75. Moat, S., Bao, L., Fowler, B., Bonham, J., Walter, J., Kraus, J., 2004. The molecular basis of cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) deficiency in UK and US patients with homocystinuria. *Hum. Mutat.* 685, Online.
76. Moselhy, S., Demerdash, S., 2004. Plasma homocysteine and oxidative stress in cardiovascular disease. *Disease Markers.* 19:27-31.
77. Mosharov, E., Cranford, M., Banerjee, R., 2000. The Quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry.*39:13005-13011.
78. Mudd, Finkelstein, F. Irreverre, Laster, L. (1964) Homocystinuria: an enzymatic defect. *Science* 143:1443-1445
79. Mudd, SH., Skovby, F., Levy, H., Pettigrew, K., Wilchen, B., Pyeritz, R., Andria, G., Boers, G., Bromberg, I., Cerone, R., Fowler, B., Grobe, H., Schmidt, H., Schweitzer, L., 1985. The natural history of homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ - synthase deficiency. *Am. J. Hum. Genetic.* 37:1-31.
80. Mudd, H., Finkelstein, J., Refsum, H., Ueland, P., Malinow, R., Lentz, S., Jacobsen, D., Brattstrom, L., Wilcken, B., Wilcken, D., Blom, H., Stabler, S., Allen, R., Selhub, J., Rosenberg, I. 2000. Homocysteine and its disulfide derivatives a suggest consensus terminology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*20:1704-1706.

81. Mudd, S., Levy, H., Kraus, JP. 2001. Disorders of transsulphuration, in: "Scriver, C.R. Beaudet, A.L., Valle, D. Sly W (Eds.), The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th Edition, McGraw Hill International Book Co, New York, NY, 2016-2050.
82. Munke, M., Kraus, J., Ohura, T., Francke, U., 1988. The gene for cystathinine B-synthase (CBS) maps to the subtelomeric region on human chromosome 21q and to proximal mouse chromosome17. *Am. J. Hum.Genet.* 42:550-559.
83. Mutchinick, OM., Lopez, MA. Luna, L., Waxman, J., Babinsky, V., 1999. High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defect. *Mol. Genet. Metab.* 68:461-467.
84. Nelen, W., Blom, H.,Thomas, M.,Steegers,E., Boers, G.,Eskes, T.,1998. Methylenetetrahydrofolate Reductase polymorphism affects the Change in Homocysteine and Folate Concentrations resulting from Low Dose Folic Acid Supplementation in Women with Unexplained.*J.Nutr.*128:1336-1341.
85. Nugent, A., Hadden, D., Carson, N.,1998. Long-term survival of homocistinuria: the first case. *Lancet.* 352:624-625.
86. Nygard, O., Vollset E., Refsum, H., Stensvold, I., Tverdal, A., Nordrehaug, J., Ueland, M., Kvale, G., 1995. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. *JAMA.* 274(19):1526-1529.

87. Nygard, O., Nordrehaug, J., Refsum, H., Ueland, P., Farstad, M., Vollset, E. 1997. Plasma Homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*; 337: 230-236
88. Oliveriusova, J., Kery, V., Maclean, K., Kraus, J.P., 2002 Deletion Mutagenesis of Human Cystathionine  $\beta$  Synthase *J. Biol. Chem.* 277,48386-48394
89. Orendac, M., Muskova, B., Richrerova, E., Zvarova, J., Stefek, M., Zaykova, E., Kraus, J.P., Stribny, J., Hyaneek, J., Kozich, V., 1999. Is the common 844ins68 polymorphism in the cystathionine  $\beta$ -synthase gene associated with atherosclerosis *J. Inher. Metab. Dis.* 22:674-675.
90. Ozer, N., Negis, Y., Aytan, N., 2003. Molecular mechanisms of cholesterol or homocysteine effect in the development of atherosclerosis: role of vitamin E. *BioFactors.* 19:63-70.
91. Park, Y., Linkswiler, H., 1970. Effect of vitamin B6 depletion in adult man on the excretion of cystathionine and other methionine metabolites. *J Nutr*;100:110-116
92. Pezzini, A., De Zotto, E., Archetti, A., Negrini, R., 2002. Plasma homocysteine concentration, C677T MTHFR genotype, and 844 ins 68 pp CBS genotype in young adults with spontaneous cervical artery dissection and atherothrombotic stroke. *Stroke.* 33:664-667.
93. Porto MP, Galdieri LC, Pereira VG, Vergani N, da Rocha JC, Micheletti C, Martins AM, Perez AB, V DA 2005. Molecular analysis

of homocystinuria in Brazilian patients. *Clin Chim Acta*. Artículo en prensa.

94. Refsum, H., Ueland, M., Nygard, O., Vollset, E., 1998. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu. Rev. Medicine*. 49:31-62
95. Refsum, H., Fredriksen, A., Meyer, K., Ueland, P., Kase, BF., 2004a. Birth prevalence of homocystinuria. *J. Pediatr*. 144:830-832.
96. Refsum, H., Smith, A., Ueland, PM., Nexo, E., Clarke, R., McPartlin, J., Johnston, C., Engbaek, F., Schneede, J., McPartlin, C., Scott, J., 2004b. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin. Chem*. 50:3-32.
97. Rosenblatt, D. 2000. Inherited disorders of folate transport and metabolism. En Scriver, CR, Beaudet AL, Sly WS eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York, NY: McGraw-Hill Book Company,
98. Sebastio, G., Sperandio, M., Panico, M., de Francis, R., Kraus, JP., Andria, G., 1995. The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine  $\beta$  synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations. *Am. J. Hum. Genet*. 56:1324 -1333.
99. Selhub, J., Jacques, P., Bostom, A., D'agostino, R., Wilson, P., Belanger, A., O'Leary, M., Wolf, P., Schaefer, E., Rosenberg, I., 1995. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N. Engl. J. Med*. 332(5):286-291.

100. Selhub, J., Miller, J., 1992. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am. J. Clin. Nutr.* 55:131-138.
101. Sokolová, J., Janosikova, B., Terwilliger, J., Freiburger, T., Kraus, J., Kozich, V., 2001. Cystathionine B-synthase deficiency in central Europe: discrepancy between biochemical and molecular genetic screening for homocystinuric alleles. *Hum. Mutat.* 466 Online
102. Shih, V., Fringer, J., Mandell, R., Kraus, JP., Berry, G., Heidenreich, R., Korson, M., Levy, H., Ramesh, V., 1995. A missense mutation (I278T) in the cystathionine  $\beta$  synthase gene prevalent in pyridoxine-responsive homocystinuria and associated with mild clinical phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 57:34-39.
103. Shipchandler, M., Moore, E., 1995. Rapid, fully automated measurement of plasma homocyst(e)ine with the Abbott IMx analyzer. *Clin Chem*: 41(7): 991-994.
104. Sittman, D., 1993 Protein Structure-Function Relationships. In Biochemistry. Davidson, V., Sittman, D., Harwal Publishing
105. Skovby, F. 1996. Disorders of sulfur amino acids. In Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases. Edition, Chapman&Hall.189-200.

106. Smolin, L., Benevenga, N.J., Berlow, S., 1981. The use of betaine for the treatment of homocystinuria. *J. Ped.* 99(3):467-472.
107. Smolin, L., Benevenga, N., 1984. Factors affecting the accumulation of homocyst(e)ine in rats deficient in vitamin B6. *J. Nutr.* 114:103-111.
108. Sperandio, M., Candito, M., Sebastio, G., Rolland, M., Turc-Carel, C., Giudicelli, H., Dellamonica, P., Andria, G., 1996a. Homocysteine response to methionine challenge in four obligate heterozygotes for homocystinuria and relationship with cystathionine B-synthase mutations. *J. Inher. Metab. Dis.* 19:351-356.
109. Sperandio, M., Franchis, R., Andria, G., Sebastio, G., 1996b. A 68bp insertion found in a homocystinuric patient is a common variant and is skipped by alternative splicing of the cystathionine  $\beta$  synthase mRNA. *Am. J. Hum. Genet.* 59:1391-1393.
110. Stamfer, M., Malinow, R., Willett, W., Newcomer, L.; Upson, B., Ullmann, D., Tishler, P., Hennekens, Ch:1992. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA*;268:877-881
111. Stein, J., McBride, E., 1998. Hyperhomocysteinemia and atherosclerotic vascular disease. *Arch. Intern Med.* 158:1301-1306.
112. Taoka, S., Ohja, S., Shan, X., Kruger, W., Banerjee, R., 1998. Evidence for heme-mediated redox regulation of human cystathionine B-synthase activity. *J. Biol. Chem.* 273(39):25179-25184.

113. Taoka, S., Wet, M., Banerjee, R., 1999. Characterization of the heme and pyridoxal phosphate cofactors of human cystathionine B-synthase reveals nonequivalent active sites. *Biochemistry*. 38:2738-2744.
114. Thomas, G., Rodney, H. 1973. Selected screening test for genetic metabolic disease: Year Book Medical Publishers, Inc, 205-210.
115. Tsai, M., Perrella, M., Yoshizumi, M., Hsieh, C., Haber, E., Shlegel, R., Lee, M., 1994. Promotion of vascular smooth muscle growth by homocysteine: A link to atherosclerosis. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:6369-6373.
116. Tsai, M., Garg, U., Key, N., Hanson, N., Suh, A., Schwichtenberg, K., 1996a. Molecular and biochemical approaches in the identification of heterozygote for homocystinuria. *Atherosclerosis*. 122:69-77.
117. Tsai, M., Bignell, M., Schwichtenberg, K., Hanson, N., 1996b. High prevalence of a mutation in the cystathionine  $\beta$ -synthase gene. *Am. J. Hum. Genet.* 59:1262-1267.
118. Tsai, J., Wang, H., Parrella, M., Yoshizumi, M., Sibinga, N., Tan, L., Haber, E., Chang, T., Schlegel, R., Lee, M., 1996c. Induction of cyclin a gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J Clin. Invest.* 97:146-153.
119. Tsai, M., 2000. Moderate hiperhomocysteinemie and cardiovascular disease. Minneápolis. *Lab. Clin. Med.* (6):41-45.

120. Ubbink, J., Van der Merwe, A., Delport, R., Allen, R., Stabler, S., Riezler, R., 1996. The effect of a subnormal vitamin B6 status on homocysteine metabolism. *J. Clin. Invest.* 98(1):177-184.
121. Ugarte, M. 2000. Introducción a la Patología Molecular de la Homocisteína. III Symposium SHS sobre errores congénitos del metabolismo.. Barcelona , 17 de Noviembre
122. Urreizti R, Balcells S, Rodes M, Vilarinho L, Baldellou A, Luz Couce M, Munoz C, Campistol J, Pinto X, Antonia Vilaseca M and others. 2003. Spectrum of CBS mutations in 16 homocystinuric patients from the Iberian Peninsula: High prevalence of p.T191M and absence of I278T or G307S. *Hum Mutat* 22(1):103.
123. Wald, D., Law, M., Morris ,J., 2002. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis.*BMJ* 325: 1202-1206
124. Welch, G., Lozano, J., 1998. Homocysteine and atherothrombosis. *N. Eng. J. Med.* 338(15): 1042-1050.
125. WHO: The World Health Report 2002 The World Health Report 2002: reducing risks, promoting healthy life. Geneva: WHO,2002. <http://www.who.int/whr/2002/en>
126. Wilcken, D., Wilcken, B., 1997. The natural history of vascular disease in homocystinuria and the effects of treatment. *J. Inherit. Metab. Dis.* 20:295-300.

127. Wilcken, D., 2003. Overview of inherited metabolic disorders causing cardiovascular disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 26:245-257.
128. Wilson, E., Kraus, J., 2004. Cystathionine  $\beta$ -Synthase: Structure, Function, Regulation, And location of homocystinuria-causing mutations. *J. Biol. Chem.* 279 (29): 29871-29874
129. Woo K, Chook, P., Lolin, Y., Cheung, AS., Chan, L., Sun, Y., Sanderson, J., Metreweli, C., Celemajer, D., 1997. Hyperhomocyst (e)inemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans. *Circulation.* 96; 2542-2544.
130. Yap, S., Naughten, E. 1998. Homocystinuria due to cystathionine  $\beta$  synthase deficiency in Ireland: 25 years experience of a newborn screened and treated population with reference to clinical outcome and biochemical control. *J. Inher. Metab. Dis.* 21: 738-747.
131. Yap, S., Boers, G., Wilcken, B., Wilcken, D., Brenton, D., Lee, P., Walter, J., Howard, P., Naughten, E., 2001. Vascular outcome in patients with homocystinuria due to cystathionine  $\beta$  synthase deficiency treated chronically a multicenter observational study. *Arterioscler thromb vasc Biol.* 21:2080-2085.
132. Yap, S. 2003. Classical homocystinuria: vascular risk and its prevention. *J. Inherit Metab. Dis.* 259-265.

**Tabla 1. Resultados de homocisteína basal y pos carga de metionina en los pacientes portadores de las mutaciones p.A288T, p.R121H y p.T191M**

Nombre	Edad	Homocisteína basal	Homocisteína Poscarga de Metionina	Delta	Aumento	Mutacion en CBS	Polimorfismo CBS			Haplótipo	Polimorfismo c.6776 77C>T MTHFR
							844INS68	699 C>T	1080 C>T		
Familia 1											
Padre	44	18	47	29	2,6	p.A288T	Wt/ 844INS68	C/C	C/T	X	C/T
Madre	43	23	44	21	1,9	p.R121H	Wt / Wt	C/C	T/T	I	C/T
Familia 3											
Madre	44	17	57	40	3,35	p.T191M	Wt/ Wt	C/T	C/T	III	C/C
Familia 4											
Madre	41	32	96	64	3	p.T191M	Wt/ Wt	C/T	C/T	III	C/T
Familia 5											
Padre	45	12	55	43	4,58	p.T191M	Wt/ Wt	C/C	C/T	X	C/T
Madre	41	12	50	38	4.16	p.T191M	Wt/ Wt	C/T	C/T	III	C/C
Familia 6											
Padre	40	24	53	29	2,2	p.T191M	Wt/ Wt	C/C	TT	I	C/C
Madre	41	17	48	31	2,8	p.T191M	Wt/ Wt	C/T	C/T	III	C/T
Valores de referencia		<17µM	<46.34	Hombres= 3.04 Mujeres= 2.78							

**Tabla 2. Relación entre homocisteína total y cisteína en portadores de la mutación p.R121H y p. T191M de la CBS**

	Homocisteína	Cisteína	Homocisteína/Cisteína
Madre(1)	23	249	0,092
Madre(3y3.1)	17	197	0,086
Padre (4)	39	336	0,12
Madre (4)	32	354	0,09
Madre (9)	9	215	0,041
Hermana	7,8	113	0,069
VR	16	298+29	<0.053

La tabla muestra los niveles de homocisteína y de cisteína encontrados en familiares de hiperhomocisteinémicos severos. La relación homocisteína / cisteína < 0.053 permite detectar portadores, Boddie, et al., 1998.

**Tabla 3. Haplotipos descritos en la población normal que incluyen el polimorfismo c.844 INS68 de la CBS**

Número	Edad <sup>a</sup> / Sexo	tHcy <sup>b</sup>	tHcy <sup>c</sup> Pos carga	Polimorfismos de la CBS			Haplotipo	Polimorfismo c.677T C>T de la MTHFR
				c.844IN S68	c.699 C/T	c.1080 C/T		
38	34/F	1 1	27	844 inser68/ wt	T/T	T/T	VIII	T/T
77	20/F	7	21	844 inser68/ wt	T/T	T/T	VIII	T/T
80	9/M	1 2	30	844 inser68/ wt	C/C	C/T	X	C/T
86	19/M	7	23	844 inser68/ wt	C/C	C/C	IX	C/C
97	30/M	1 1	36	844 inser68/ wt	C/T	C/C	XI	C/T

Edad<sup>a</sup>, edad al diagnóstico. THcy<sup>b</sup>, Concentración de homocisteína total en ayuno, valor dereferencia < 17µM. THcy<sup>c</sup>, Concentración de homocisteína tras carga de metionina, valor de referencia < 46µM. CBS Cistationina β Sintasa. 844 inser 68./wt heterocigoto con la inserción 844 inser 68. C/C homocigotos normales, C/T, heterocigotos, T/T homocigotos con los polimorfismos c.699C/T, o c.1080 C/T de la CBS. CBS, Cistationina β Sintasa. MTHFR, metiléntetrahidrofolato reductasa.

**Tabla 4. Haplotipos descritos en los familiares de los hiperhomocisteinémicos severos que incluyen el polimorfismo c. 844INS68 de la CBS**

Numero	Edad <sup>a</sup> / Sexo	tHcy <sup>b</sup>	Mutacion de CBS	Polimorfismos de la CBS			Haplotipo	Polimorfismo c.677C>T de la MTHFR
				c.844INS68	699 C/T	1080 C/T		
Familia1 Padre	44/M	18	A288T/wt	844 inser68/ wt	C/C	C/T	X	C/T
Familia3 Abuela	74/F	13		c.844inser68/wt	C/T	C/C	XI	T/T
Familia 9 Madre	50/F	9	ND <sup>c</sup>	c.844inser68/wt	C/T	C/C	XII	C/T
Hermana	15/F	8		c.844inser68/wt	C/C	C/T	X	T/T
Tia	66/F	15		c.844inser68/wt		C/C		C/T
Tio	59/M	16		c.844inser68/wt	C/C	C/T	X	C/T

Edad<sup>a</sup>, edad al diagnóstico. tHcy<sup>b</sup>, Concentración de homocisteína total en ayuno, valor de referencia < 17µM. C. 844 inser 68./wt heterocigoto con la inserción 844 inser 68. C/C homocigotos normales, C/T, heterocigotos, T/T homocigotos con los polimorfismos c.699C/T, o c.1080 C/T de la CBS. CBS, Cistationina β Sintasa. MTHFR, metiléntetrahidrofolato reductasa. ND<sup>c</sup> no determinada pero no p.T191M, p.A288T ni p.R121H.

**Tabla 5. Características bioquímicas y moleculares de los pacientes homocistinúricos colombianos y sus familias.**

Número		Edad <sup>a</sup> /Sexo	Mutación De CBS	Polimorfismo c.677677C>T MTHFR	tHcy <sup>b</sup>	Respuesta a la B-6
(1) <sup>d</sup>	Caso Indice	7/M	A288T/ R121H	C/T	399	No
	Padre (1)	44/M	A288T/wt	C/T	18	
	Madre(1)	43/F	R121H/wt	C/T	23	
	Hermana	5/F	A288T/wt	C/T	12.32	
	Tía(1)	21/F		C/T	27	
(2) <sup>e</sup>	Caso Indice	5/M	p.T191M/ p.T191M	C/T	293	No
	Padre(2)	38/M	p.T191M/wt	T/T	26	
	Madre(2)	44/M	p.T191M/wt	T/T	21	
	Hermana(2)	20/F	p.T191M/wt		17	
	Hermana(2)	19/F	p.T191M/wt		18	
	Sobrino(2)	5/M	p.T191M/wt		12	
	Sobrina(2)	2/F	p.T191M/wt	T/T	11	
(3) <sup>f</sup>	Caso Indice	10/M	p.T191M/ p.T191M	C/T	372	No
(3.1) <sup>f</sup>	Caso Indice	16/M	p.T191M/ p.T191M	C/T	231	No
	Padre(3y3.1)	44/M	p.T191M/wt	T/T	31	
	Madre(3y3.1)	44/F	p.T191M/wt	C/C	17	
(4)	Caso Indice	7/M	p.T191M/ p.T191M	T/T	268	No
	Padre (4)	42/M	p.T191M/wt		39	
	Madre (4)	41/F	p.T191M/wt	C/T	32	
	Tia (4)	43/F	p.T191M/wt	T/T	10	
(5)	Caso Indice	16/M	p.T191M/ p.T191M	C/C	226	No
	Padre ( 5)	45/M	p.T191M/wt	C/T	12	
	Madre (5)	41/F	p.T191M/wt	C/C	12	
	Tia (5)	45/F	p.T191M/wt	C/C	19	
(6)	Caso Indice	10/M	p.T191M/ p.T191M	C/C	281	No
	Padre (6)	40/M	p.T191M/wt	C/C	24	
	Madre (6)	41/F	p.T191M/wt	C/T	17	
(7)	Caso Indice	14/M	p.T191M/ p.T191M	C/C	275	No
	Padre (7)	40/M	p.T191M/wt		12	
	Madre (7)	41/F	p.T191M/wt		23	
(8)	Caso Indice	10/M	p.T191M/ p.T191M	C/C	200	No
	Padre (8)		p.T191M/wt	C/T	9	
	Madre (8)		p.T191M/wt	C/T	4	
(9)	Caso Indice	14/F	ND <sup>g</sup> /ND <sup>g</sup>	C/T	242	No
	Padre (9)	46/M		T/T	28	
	Madre (9)	45/F		C/T	9	
(10)	Caso Indice	8mM	ND <sup>g</sup> /ND <sup>g</sup>	C/C	110	
	Padre (10)	41/M		C/T	14	
	Madre (10)	36/F		C/T	26	

<sup>a</sup> Edad al diagnóstico. <sup>b</sup> Concentración de homocisteína total en plasma. <sup>c</sup>ND no determinada pero no p.T191M, p.A288T ni p.R121H. <sup>d</sup> Muere a la edad de 12 años. <sup>e</sup> Muere a la edad de 9 años. <sup>f</sup> 3 y 3.1 son hermanos. CBS Cistationina β Sintasa. MTHFR metiléntetrahidrofolato reductasa.

## ANEXO 2

### 2.1 PROTOCOLOS BIOQUÍMICOS

#### 2.1.1 Nitroprusiato de sodio

- Procedimiento

	Control Negativo	Muestra	Control Positivo
Cianuro de Na 5%	250 (µl)	250 (µl)	250 (µl)
Hidróxido de amonio al 3%	50 (µl)	50 (µl)	50 (µl)
Muestra		500 (µl)	
Control	500 (µl)		500 (µl)
Reposo por 10 min			
Nitroprusiato 5%	50 (µl)	50 (µl)	50 (µl)

- Interpretación

La reacción se considera positiva cuando se forma un complejo coloreado que va de un color rosa a púrpura. Ocasionalmente las orinas normales dan un color café pálido a color rosa tenue. Las muestras positivas deben ser evaluadas con la prueba del Nitroprusiato de plata, esta técnica permite diferenciar una cistinuria de una homocistinuria ya que la homocistina reacciona con el nitrato de plata y produce coloración magenta mientras que la cistina no.

### 2.1.2 Nitroprusiato de plata

- Procedimiento

	Control Negativo	Muestra	Control Positivo
Muestra saturada con NaCl		2500 (µl)	
Control Positivo			2500 (µl)
Control Negativo	2500 (µl)		
Nitrato de Plata en Hidróxido de amonio al 3%	250 (µl)	250 (µl)	250 (µl)
Reposo por 1 min			
Nitroprusiato 1%	250 (µl)	250 (µl)	250 (µl)
Cianuro de Na 0.7%	250 (µl)	250 (µl)	250 (µl)

- Interpretación

La reacción se considera positiva cuando se forma un complejo coloreado púrpura o rosa inmediatamente.

### **2.1.3. Cromatografía de aminoácidos en capa fina**

- Procedimiento.

1. Preparar las placas de Acetato de celulosa, con la distribución de las muestras a analizar.
2. Incluir en la placa mínimo 2 controles de suero y orina normales, el patrón total de aminoácidos y un control positivo.
3. Adicionar con un aplicador de cromatografía 2uL de las muestras a una distancia de 1.5cm del borde inferior de la placa, en un espacio de 0.5cm. Se debe dejar entre muestra y muestra un espacio de 0.5 cm.
4. Activar la placa por 5 minutos a 45 °C.
5. Colocar en cámara colcar 10 mL de solvente por cada placa de 10 cm. Saturar con el solvente media hora antes de dejar correr la placa.
6. Depositar la placa en la cámara y permitir que el cromatograma se desarrolle aproximadamente hasta 1.5 cm del borde superior.
7. Sacar la placa y dejar secar a una temperatura de 50°C
8. Agregar la solución reveladora (Ninhidrina) a la cámara cromatográfica 1ml por cada 10mL de solvente y dejar correr como se mencionó anteriormente.
9. Sacar la placa y dejar secar, como se indica anteriormente en paso 7.

- Interpretación

Lectura e interpretación por comparación entre la distancia de migración de cada de los aminoácidos de la muestra con los controles positivos y negativos.

#### **2.1.4 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS ORGANICOS.**

- Procedimiento.
  1. Preparar tubos con 1g de NaCl cada uno según el número de muestras.
  2. Medir los 6 ml de orina de orina necesarios para obtener 0,85 mg de creatinina por mililitro.
  3. Adicionar 20  $\mu$ l del estandar interno (1mg/ml).
  4. Ajustar la orina a pH ácido con HCl 0.1 N.
  5. Adicionar 2,5 ml de acetato de etilo. Mezclar muy bien durante 5 minutos.
  6. Centrifugar a 3000 rpm durante 8 minutos sin freno.
  7. Transferir el sobrenadante a otro tubo previamente marcado.
  8. Repetir el paso 5.
  9. Evaporar con nitrógeno gaseoso.
  10. Adicionar 20  $\mu$ l de silante.

11. Llevar a 110 C° por 10 minutos.

12. Inyectar 2 en el cromatografo de gases.

- Interpretación.

La presencia del ácido metilmalonico se identifica según el tiempo de retención y el patrón de masas 147 y 73.

## **2.2 Protocolo Biología Molecular**

### **2.2.1 Extracción de ADN**

- **Procedimiento.**

1. Medir ml 6 ml de buffer de lisis de glóbulos rojos (RBC 1x) en un tubo de falcón de 15 y sobre éste adicionar con una pipeta de transferencia plástica 2 ml de sangre total. Mezclar muy bien.
2. Agitar fuertemente en una plataforma (shaker) durante 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Centrifugar a 3000 rpm durante 8 minutos sin freno.
4. Descartar el sobrenadante y conservar el pellet.
5. Mezclar vigorosamente el pellet (vortex) en el líquido residual.
6. Adicionar 2.5ml de buffer de lisis celular y mezclar cuidadosamente con pipeta con bulbo chupa plástica varias veces. Dejar al menos 30 minutos

a temperatura ambiente. En este paso se puede suspender el paso incluso hasta el día siguiente.

7. Adicionar 800ul de solución precipitante de proteínas.

8. Centrifugar a 4000 rpm durante 20 minutos, sin freno.

Se recomienda repetir este paso.

9. Verter el sobrenadante en un tubo falcon de 15 ml que contenga 2.4 ml de isopropanol frío (alcohol isopropilico). Mezclar por inversión hasta precipitar el ADN.

10. Pescar el ADN con pipeta pasteur y llevarlo a etanol al 70%, dejar secar a temperatura ambiente y llevar a un eppendorf que contenga T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (50-500 µl) de acuerdo a la cantidad de ADN recuperado.

11. Colocar en plataforma (shaker) toda la noche a temperatura ambiente para resuspender por completo el ADN.

### **2.2.2. Amplificación de ADN**

- Procedimiento.

1. Preparar la mezcla 1 que consiste en 5ul de buffer de PCR (promega 10x), 5ul de dNTPs (2mM) y 15ul de agua estéril para un volumen final de 25ul.

2. Para una sola muestra de amplificación se toma de la mezcla 1, 10ul para realizar la mezcla 2 a esta se le agrega 1ul del primer “con sentido”, 1.5ul del primer “antisentido”, 1.2 de MgCl<sub>2</sub> (Promega) a una concentración de 25 mM de promega corporation, 4.1ul de agua estéril y por ultimo 0.2ul de

Taq polimerasa (Thermophilic ADN) de Promega corporation, esto para un volumen final de 18ul. La Taq polimerasa se debe mantener congelada y solo se debe retirar de allí en el momento que se agrega a la mezcla 2.

3. Agregar los 18ul de la mezcla 2 en el tubo de PCR más los 2 ul de ADN para un volumen final de 20 ul y homogenizar.
4. Llevar al termociclador y amplificar según el programa estandarizado para las condiciones experimentales establecidas en la tabla N 2
5. Verificar mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% el fragmento obtenido tomando 5ul de buffer de carga más 5ul de producto de PCR.
6. Colorear con bromuro de etidio (10 ng/ ul) por 20 minutos.
7. Observar en el transiluminador y fotografiar.

### **2.2.3 Coloración de plata.**

- Procedimiento.
  - Es una alternativa a la tinción rutinaria de geles de ácidos nucleicos, por su facilidad de uso y su gran sensibilidad (entre 50 y 100 veces más sensible que la tinción con Azul de Coomasie).
  - Colocar el gel en etanol (10 %) con agitación durante 5'-10'.
  - Colocar 3' en HNO<sub>3</sub>, lave 2 veces con H<sub>2</sub>O desionizada por 30''. Lavar 2 veces con H<sub>2</sub>O destilada

Revelado:

Colocar  $\text{NaCO}_3$ , y esperar uno segundos hasta que oscurezca el gel, retirar la solución de carbonato y agregar de la misma solución una cantidad equivalente más hasta observar la aparición de las bandas.

- Adicionar ácido acético 10% durante 5'-10' para detener la reacción y colocar los geles en agua y glicerol y envolver en papel de celofán frío y dejar secar de un día para otro.

#### 2.2.4 Preparacion de geles poliacrilamida

SOLUCION DE ACRILAMIDA STOCK (30:1)

Para 7ml al 12%:

Solución de acrilamida (30:1).....	2.8ml
TBE 10X.....	0.7 ml
Agua destilada.....	3.5ml
APS.....	47ul
Temed.....	4.7ul

ACRILAMIDA proporción 30:1 es 30 g. de acrilamida + 1 g. De bis-acrilamida, llevarla a 100 ml con agua estéril.

Anexo 3

**Figura 1. Pacientes homocistinúricos. Familia N° 3**



La fotografía muestra dos pacientes hiperhomocisteinémicos severos. Se observan las alteraciones músculo esqueléticas (*Genu valgum*, *pectum excavatum* y hábitos marfanoides).

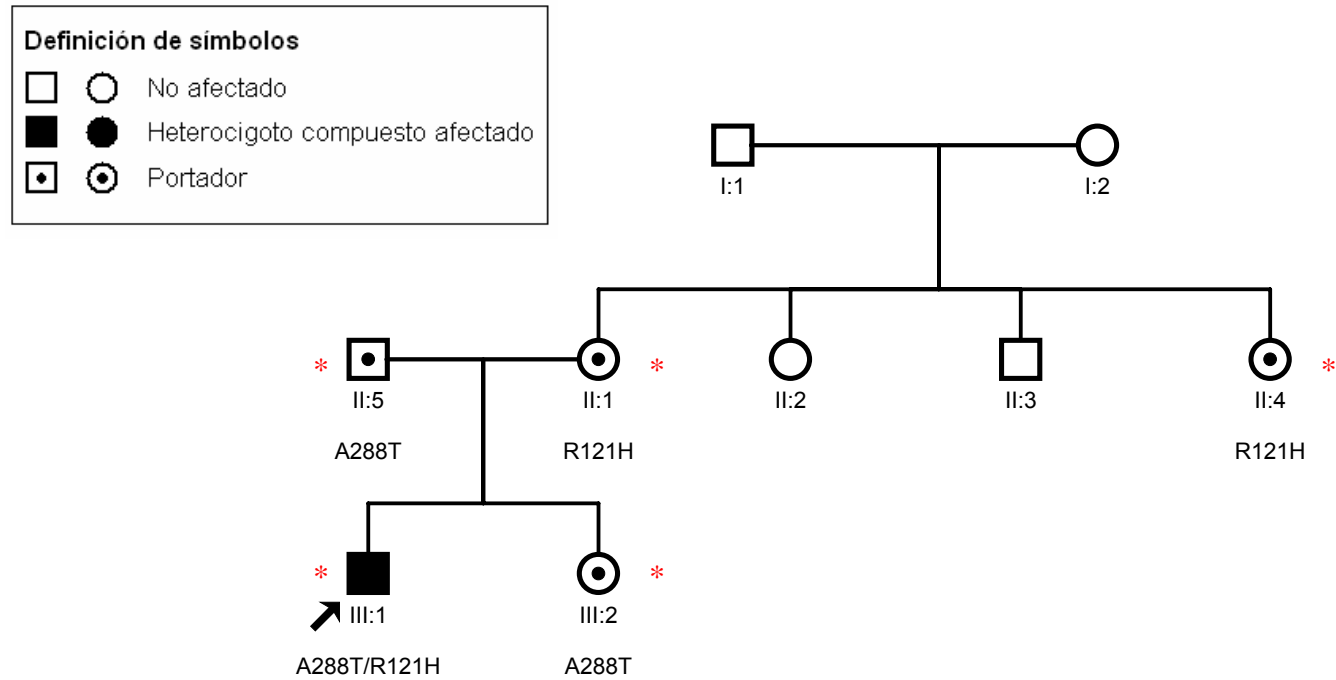


Figura 2. Paciente homocistinúrica. Familia N° 9

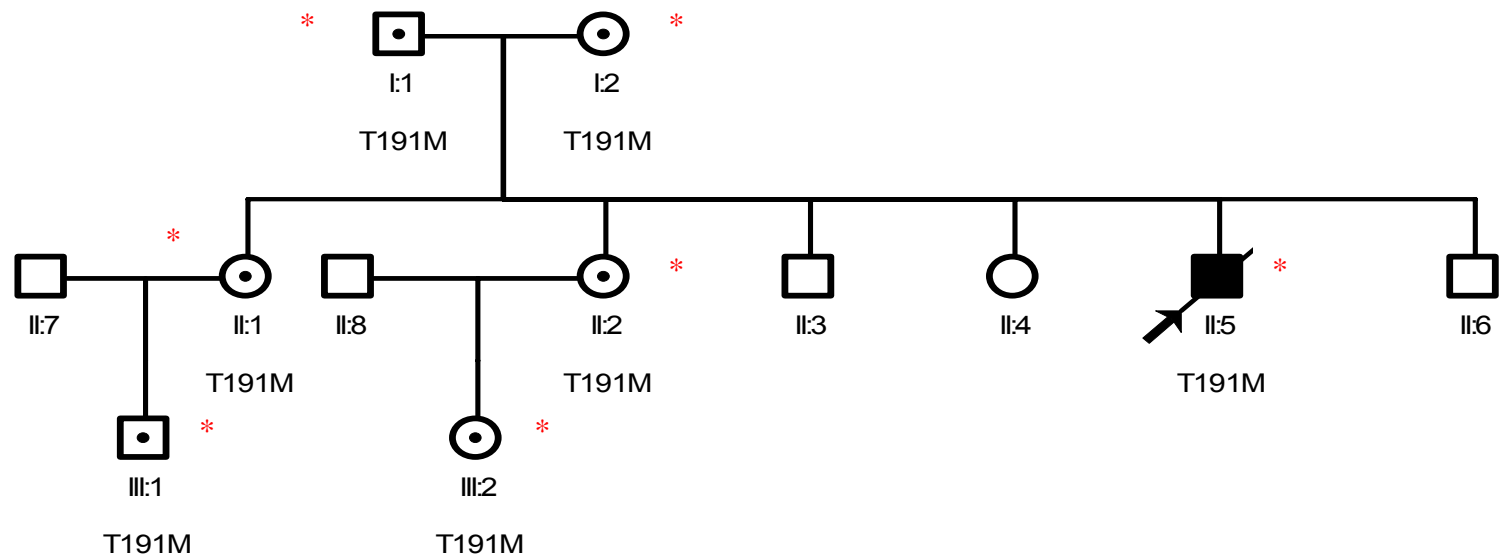
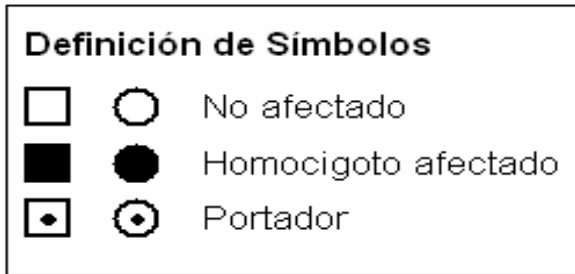
La fotografía corresponde a una joven hiperhomocisteinémica severa. A la izquierda se observan las canas prematuras y a la derecha pliegue palmar único.

## ANEXO 4. Arboles Genealógicos

Familia N° 1

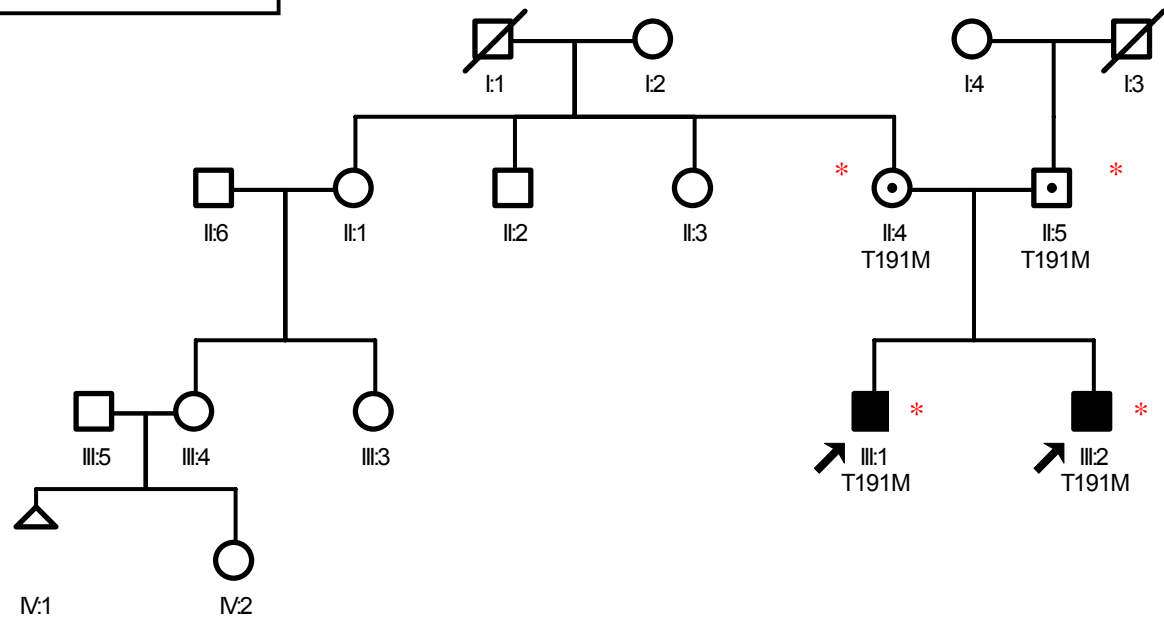
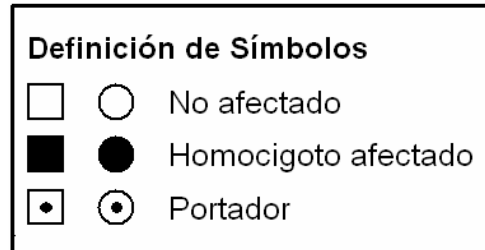


La figura muestra la genealogía de la familia a la cual pertenece el paciente N° 1, hiperhomocisteinémico severo y heterocigoto compuesto.



La figura muestra la genealogía de la familia N° 2 donde se observa una alta frecuencia de la mutación p.T191M que produce hiperhomocisteinemia moderada y severa.

Familia N°3

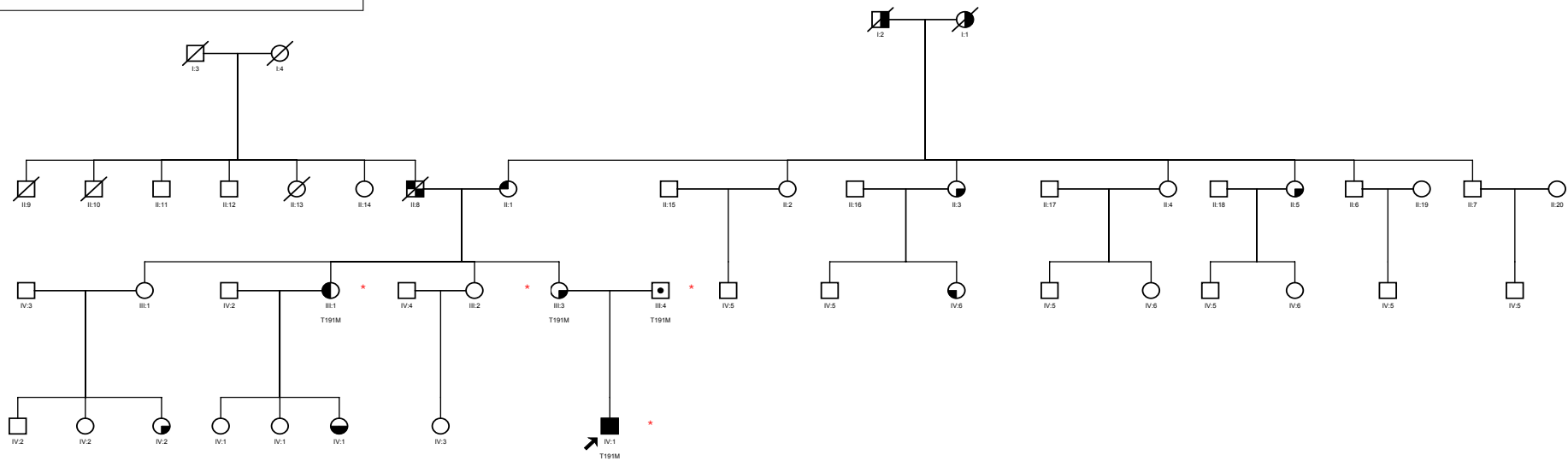


La figura muestra la genealogía de la familia N° 3. Los hermanos afectados por la misma mutación muestran características fenotípicas diferentes.

## Familia N°4

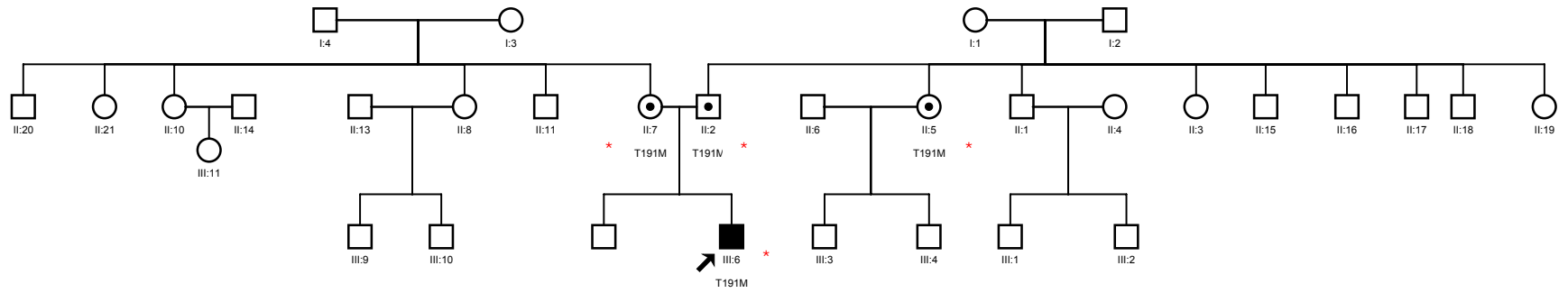
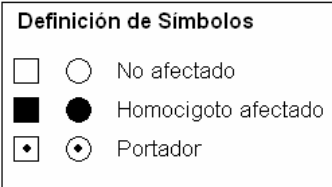
**Definición de Símbolos**

□	○	No afectado
■	●	Homocigoto Afectado
◻	◐	Malformación Renal
◻	◑	Malformación Renal y Miastemia Gravis
◻	◒	Malf. renal, triple ureter, angina pecho
◻	◓	Trombosis
◻	◔	Miastemia Gravis
◻	◕	IAM
◻	◖	F. Raynaud



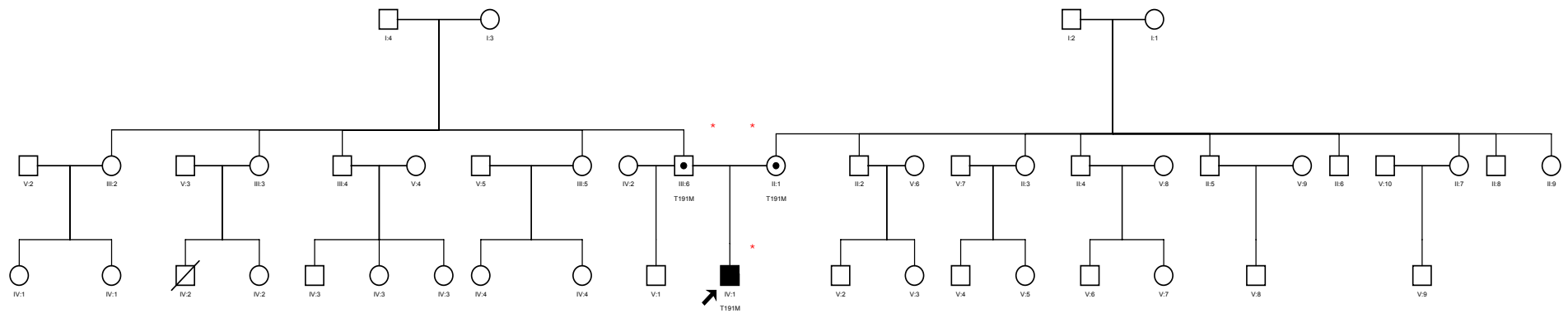
La figura muestra la genealogía de los miembros de la familia N° 4 con alteraciones en la formación renal, y afectados por eventos tromboticos e hiperhomocisteiemia severa.

## Familia N° 5

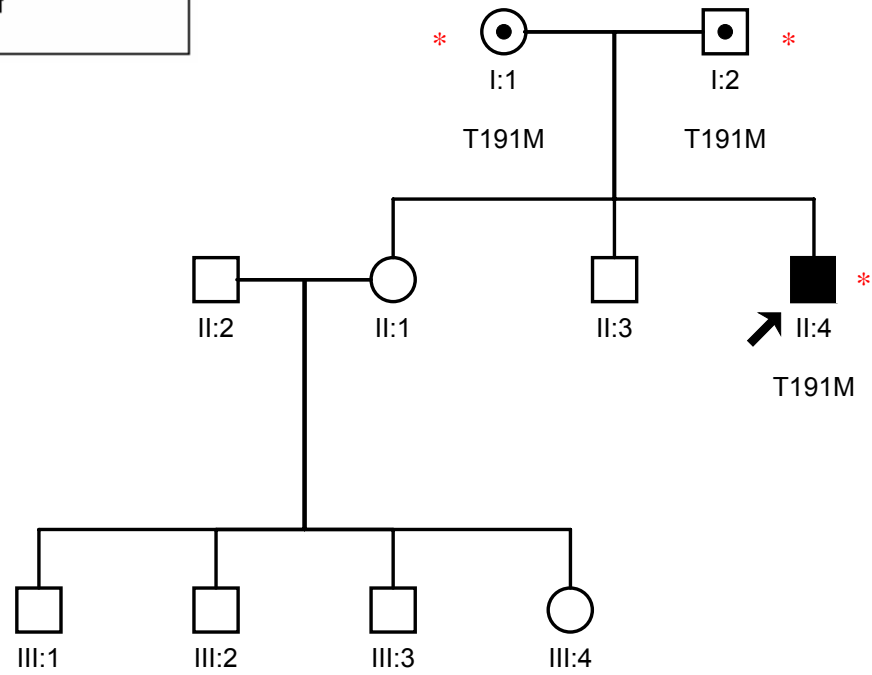
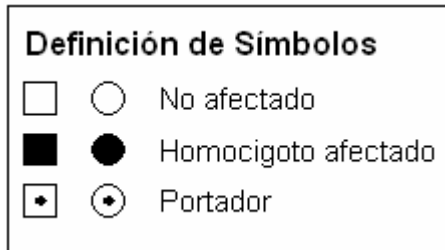


# Familia N° 6

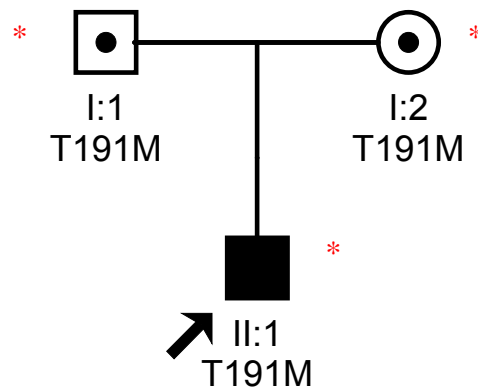
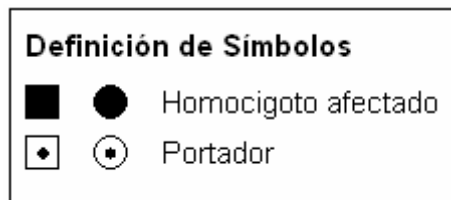
Definición de Símbolos	
□ ○	No afectado
■ ●	Homocigoto afectado + Klinefelter
◻ ◉	Portador



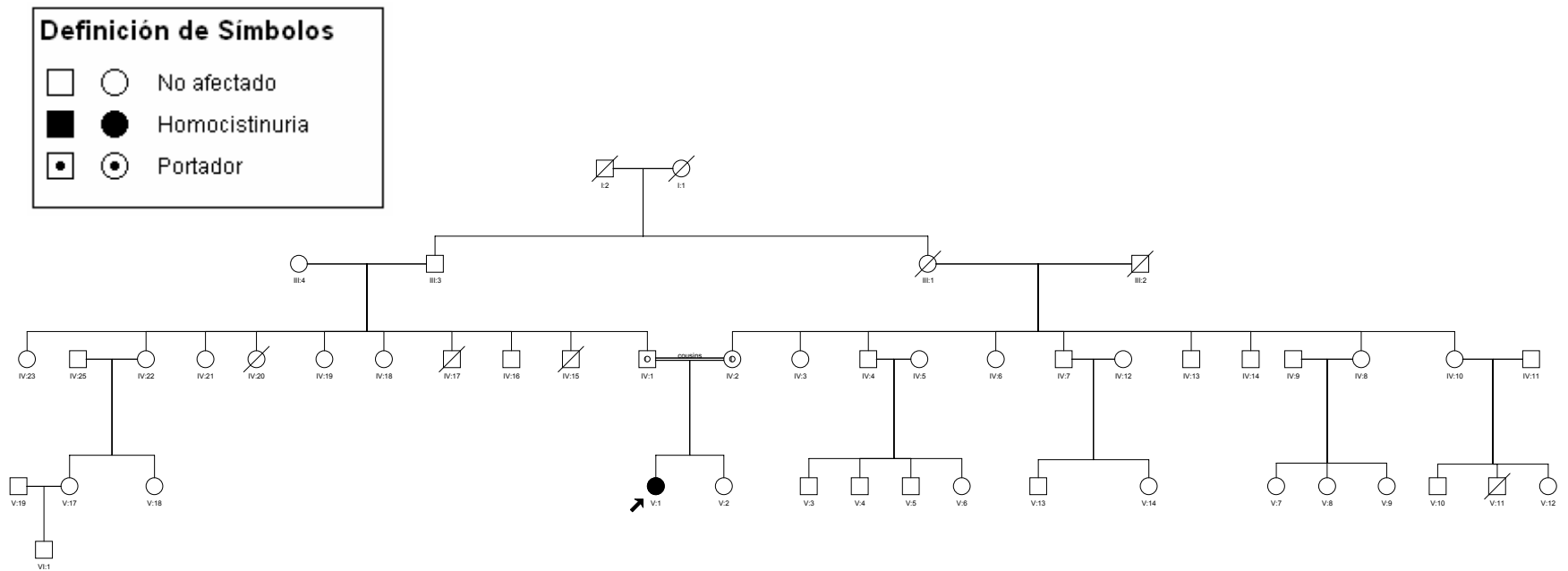
Familia N° 7



Familia N° 8

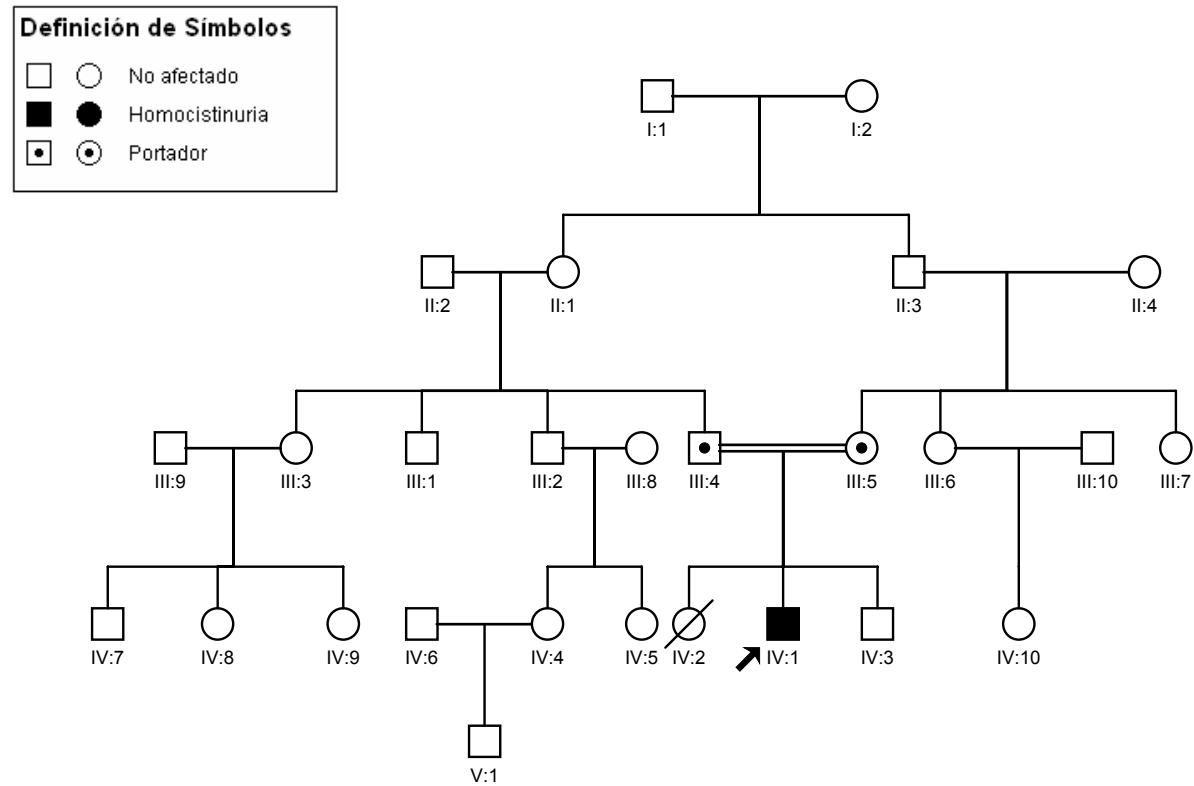


## Familia N° 9



La figura muestra la genealogía de los miembros de la familia N° 9 con la enfermedad autosómica recesiva conocida como hiperhomocisteinemia severa. Se observa consanguinidad en la segunda generación y un miembro afectado en la tercera generación.

## Familia N° 10



La figura muestra la genealogía de los miembros de la familia N° 10 con la enfermedad autosómica recesiva conocida como hiperhomocisteinemia severa. Se observa consanguinidad en la tercera generación y un miembro afectado en la cuarta generación.