



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE HOMOCISTEINA TOTAL EN PLASMA. APLICACION CLINICA

2001

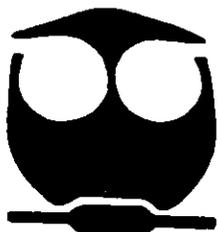
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

LETICIA DIAZ RAMIREZ



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Marisol López López
Vocal	Prof. Laura Peniche Villalpando
Secretario	Prof. Isabel Ibarra González
1er Suplente	Prof. Alicia Cervantes Peredo
2º Suplente	Prof. María del Rocío Gómez Ortega

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Instituto Nacional de Pediatría, SS.

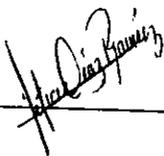
Asesor del tema:

M. en C. Isabel Ibarra González



Sustentante :

Leticia Díaz Ramírez



AGRADECIMIENTOS

*A Gloria por su apoyo, dedicación
y por ser una gran madre.*

A Rocío por ser la mejor hermana.

*A Lety, Tama, Vicky, Luz María, Claudia, Vero, Laura
Por regalarme su amistad y por compartir conmigo el tiempo en
la Facultad.*

A Isabel por los conocimientos compartidos, por su ayuda y dedicación.

A la Unidad de Genética de la Nutrición por brindarme su espacio.

*Hagamos de manera que en todo momento
hayamos vivido lo bastante*
Séneca

*Basta que una cosa haya de suceder algún día
para que ese día pueda ser hoy*
Séneca

RESUMEN

La homocisteína es un aminoácido sulfurado. Su metabolismo es la intersección de dos rutas metabólicas: remetilación, en la cual la homocisteína adquiere un grupo metilo a partir del N-5-metil tetrahidrofolato o de la betaina para formar metionina; y transulfuración, mediante la cual la homocisteína es catabolizada al condensarse con serina para formar cistationina y alfa-cetobutirato. Entre las causas conocidas que generan hiperhomocisteinemia se encuentran los defectos genéticos de las enzimas relacionadas con el metabolismo de la homocisteína (cistationina β sintasa, MTHFR y metionina sintasa), alteraciones en el metabolismo de la cobalamina y factores adquiridos (carencia de las vitaminas que participan en dicho metabolismo, enfermedad renal y algunos medicamentos).

Las técnicas para cuantificar homocisteína mediante HPLC consisten en la reducción de los puentes disulfuro que forma la homocisteína en el plasma, carboximetilación del grupo tiol del aminoácido, precipitación de las proteínas plasmáticas y derivatización del aminoácido con diferentes reactivos fluorogénicos. En este proyecto se adaptó la metodología para cuantificar homocisteína mediante cromatografía líquida de alta resolución, en la cual se evaluaron parámetros tales como: límite de detección y cuantificación, linealidad, reproducibilidad, y porcentaje de recobro.

Se evaluaron los niveles de este aminoácido en individuos control, en pacientes con acidemia metilmalónica para realizar un diagnóstico diferencial entre alteraciones del metabolismo de la cobalamina y deficiencia de la enzima metilmalonil CoA mutasa; y en pacientes con homocistinuria con el fin de realizar su diagnóstico y seguimiento.

INTRODUCCION

La homocisteína es un aminoácido sulfurado que presenta un grupo tiol libre en su molécula y no forma parte estructural de proteínas. Este aminoácido fue descubierto en 1932 por DeVigineaud, como el producto de demetilación de la metionina (1).

El metabolismo de la homocisteína representa la intersección de dos rutas metabólicas: remetilación y transulfuración. Para la remetilación, la homocisteína adquiere un grupo metilo del N-5-metiltetrahidrofolato o de la betaina, para formar metionina. La enzima que cataliza la síntesis de metionina a partir del N-5-metiltetrahidrofolato es la metiltetrahidrofolato homocisteína metiltransferasa (metionina sintasa); el N-5-metiltetrahidrofolato es generado a partir de 5,10 metiléntetrahidrofolato por una enzima dependiente de vitamina B12 la metiléntetrahidrofolato reductasa (MTHFR). La otra enzima que participa en la síntesis de metionina, la betaina:homocisteína metiltransferasa, utiliza betaina (a su vez formada en el catabolismo de la colina) como donador de grupos metilo (2). La reacción de remetilación a partir del N-5-metiltetrahidrofolato, dependiente de la vitamina B12, se lleva a cabo en todos los tejidos, mientras que la reacción catalizada por la enzima betaina:homocisteína metiltransferasa se lleva a cabo principalmente en el hígado, y es independiente de la vitamina B12 (3).

Una gran proporción de la metionina formada es convertida a S-adenosilmetionina (SAM) por la enzima dependiente de ATP metionina S-adenosiltransferasa. SAM actúa principalmente como donador de grupos metilo en gran variedad de reacciones de transmetilación, originando compuestos metilados importantes, como son la creatinina y DNA metilado. El co-producto de estas reacciones de transmetilación, la S-adenosilhomocisteína, es hidrolizada por la enzima S-adenosil homocisteína hidrolasa, regenerando la homocisteína, que de este modo está disponible para iniciar otro ciclo de remetilación (3).

En la ruta de transulfuración, la homocisteína es catabolizada al condensarse con el aminoácido serina, dando lugar a cistationina. Esta condensación es catalizada por una enzima dependiente del piridoxal-5-fosfato (vitamina B6), la cistationina β

sintasa. La cistationina es posteriormente hidrolizada por una segunda enzima dependiente de piridoxal-5-fosfato, la γ cistationasa, para formar cisteína y α -cetobutirato. EL exceso de cisteína es oxidado a taurina, sulfatos inorgánicos o excretado por la orina. (Fig. 1)

Regulación del metabolismo de la homocisteína

El organismo es capaz de discriminar entre las rutas de remetilación y transulfuración, y así adaptarse a las diferentes cantidades de metionina contenidas en la dieta. La coordinación entre estas rutas se lleva a cabo mediante dos mecanismos.

El primer mecanismo se debe a la capacidad de SAM para actuar como inhibidor alósterico de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y como activador de la enzima cistationina β sintasa (3). Esto implica que SAM suprime la síntesis de un sustrato importante (N-5-metiltetrahidrofolato) requerido para la ruta de remetilación, y promueve la reacción inicial de la transulfuración (síntesis de cistationina).

El segundo mecanismo consiste en la regulación de la concentración intracelular de SAM. En el hígado, la síntesis de SAM es catalizada por dos grupos de isoenzimas: El primer grupo presenta gran afinidad por la metionina y se cree que actúa bajo condiciones fisiológicas normales, en tanto que el segundo grupo posee menor afinidad por la metionina, y probablemente es activado cuando existe un alto consumo de este aminoácido (3).

Coenzima

La vitamina B12 (cobalamina) es sintetizada sólo por ciertos microorganismos que crecen en el agua, suelo, rumen o intestino. Los alimentos en la dieta que contienen vitamina B12 son de origen animal como huevo, leche y carne.

La cobalamina derivada de los alimentos es liberada en el ambiente ácido del estómago por digestión peptídica, para unirse a un grupo de glicoproteínas denominadas proteínas R. Su absorción en el íleon requiere del factor intrínseco (FI), con el cual forma un complejo estable (Cb1-FI), que interacciona con

receptores específicos en la mucosa del íleon, y es transportado mediante un mecanismo endocítico; una vez disociado el complejo Cb1-FI, la cobalamina es transportada a la sangre. En el plasma la vitamina B12 se une principalmente a dos proteínas transportadoras, llamadas transcobalamina I y II (4). Las funciones conocidas de las transcobalaminas incluyen: prevenir la pérdida de vitamina B12 por la orina, sudor y otros líquidos biológicos, así como el transporte de cobalamina a través de las membranas (5)

Dos cobalaminas importantes en el metabolismo de las células animales son los alquil derivados sintetizados a partir de la vitamina B12, ya que actúan como coenzimas. La metilcobalamina, cuyo grupo alquilo es un metilo, participa en la síntesis de metionina catalizada por la enzima metiltetrahidrofolato homocisteína metiltransferasa. Esta ruta, además de ser una forma de adquirir metionina sirve también como un mecanismo para convertir el N-5-metiltetrahidrofolato a tetrahidrofolato (5).

La adenosilcobalamina contiene un grupo 5'-deoxi-5'-adenosil (adenosil en forma abreviada), y participa en la reacción catalizada por la enzima metilmalonil CoA mutasa dentro de la ruta metabólica del propionato (5).

Las alteraciones en el metabolismo de la cobalamina incluyen defectos en la absorción y transporte, así como defectos en la síntesis de adenosil y metilcobalamina (AdoCb1 y MetCb1).

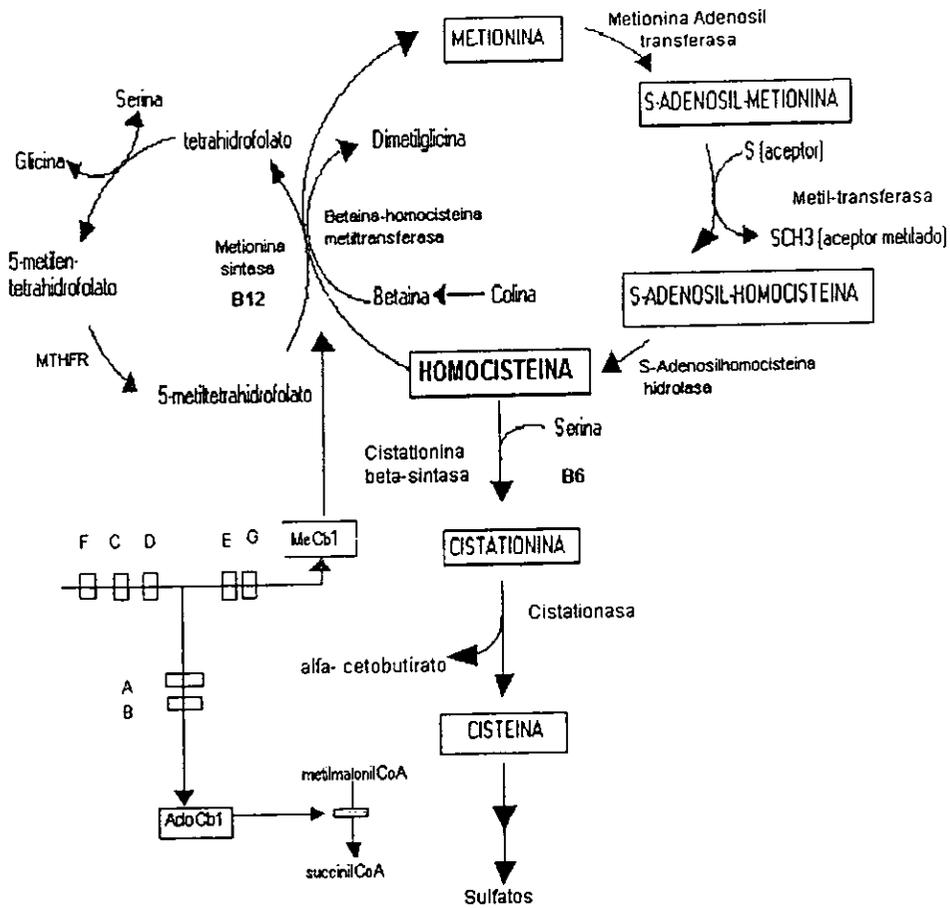


Fig 1. Metabolismo de la homocisteina

□ Grupos de complementación correspondientes a defectos en la síntesis de MeCb1 y AdoCb1

HIPERHOMOCISTEINEMIA

Entre las causas conocidas que generan un incremento en los niveles de homocisteína en plasma, se encuentran los defectos genéticos de las enzimas relacionadas con el metabolismo de la homocisteína y de la cobalamina, así como factores adquiridos, tales como carencia de las vitaminas que participan en dicho metabolismo, enfermedad renal, tabaquismo y algunos medicamentos (6).

La forma más común de hiperhomocisteinemia se asocia con la deficiencia de cistationina β sintasa (CBS). Esta deficiencia se hereda de modo autosómico recesivo y su prevalencia es de alrededor de 1:200,000 personas en el mundo (1).

La deficiencia de la enzima CBS altera la ruta de transulfuración en el metabolismo de la homocisteína, mientras que otras formas de hiperhomocisteinemia de origen genético se deben al deterioro en la ruta de remetilación, debido a alteraciones de las enzimas metionina sintasa y 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR); así como a trastornos en el consumo, transporte, y metabolismo de la vitamina B12 (1). En la tabla 1 se muestran las patologías asociadas a hiperhomocisteinemia.

A continuación se describen las alteraciones metabólicas y genéticas del metabolismo de la homocisteína en las rutas de transulfuración y remetilación.

Transulfuración

Cuando la ruta de transulfuración se encuentra deteriorada, como es el caso de la deficiencia de cistationina β sintasa (CBS), existe desviación de la homocisteína hacia la ruta de remetilación, elevando temporalmente la velocidad de síntesis de metionina. Se origina así aumento en la concentración de SAM hasta un nivel en el cual actúa como inhibidor de la enzima MTHFR, alterando la ruta de remetilación. La deficiencia de CBS ocasiona deterioro de ambas rutas del metabolismo de la homocisteína, generando hiperhomocisteinemia severa (3).

El gen de la enzima cistationina β sintasa se localiza en el cromosoma 21. Se han encontrado más de noventa y dos mutaciones (mutaciones sin sentido, deleciones o inserciones), responsables de la deficiencia de la enzima (2).

En el estado homocigoto de la deficiencia de la enzima cistationina β sintasa, su actividad es de 0 al 2% del valor control; los heterocigotos obligados presentan menos del 50% de actividad enzimática (4).

Remetilación

Síntesis de N-5-metiltetrahidrofolato

La consecuencia de un deterioro en la síntesis de N-5-metiltetrahidrofolato, ya sea por deficiencia de ácido fólico o por un defecto genético de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), es la disminución en la síntesis de metionina. Esta deficiencia origina la desviación de la homocisteína destinada a remetilación hacia la ruta de transulfuración que es incapaz de metabolizar el exceso de homocisteína. Como resultado, la homocisteína acumulada en la célula es exportada hacia la sangre generando hiperhomocisteinemia.

Se han descrito dos alteraciones genéticas de esta enzima:

- Deficiencia de MTHFR, en la cual la actividad enzimática puede disminuir en un intervalo de cero a 20% de la actividad normal, y de la cual se han descrito nueve mutaciones asociadas con diferentes niveles de actividad (2).
- La variante termolábil, que resulta de una mutación puntual en un sitio polimórfico, consistente en la sustitución de alanina por valina en la enzima (3).

Metionina sintasa

El deterioro de la ruta de remetilación puede ser la consecuencia de la deficiencia de la enzima metionina sintasa, carencia de vitamina B12, o defectos en las enzimas relacionadas con la síntesis de metilcobalamina.

La deficiencia de la enzima metionina sintasa resulta en disminución de la síntesis de metilcobalamina, por lo que dicha deficiencia es considerada como una alteración del metabolismo de la cobalamina. El gen que codifica la enzima metionina sintasa se localiza en el sitio cromosómico 1q43. Los pacientes que

presentan mutaciones en este gen comprenden el grupo de complementación Cb1G; su fenotipo incluye anemia megaloblástica, elevación de la homocisteína plasmática total, homocistinuria e hipometioninemia. El grupo de complementación Cb1E incluye pacientes con fenotipo similar al grupo Cb1G y que presentan deficiencias funcionales de la enzima metionina sintasa, debido a una alteración que impide mantener a la cobalamina asociada con la enzima en un estado de reducción adecuado (4).

Por otra parte, existe un deterioro de la actividad de la enzima metionina sintasa como un fenómeno secundario a un procesamiento intracelular defectuoso de la cobalamina. Los grupos de complementación relacionados son: grupo Cb1F que incluye a individuos que presentan una liberación defectuosa de cobalamina por los lisosomas; y los grupos Cb1C/Cb1D que presentan un deterioro en la síntesis de metil y adenosilcobalamina. Existen además los grupos de complementación Cb1A y Cb1B, que agrupan a aquellos individuos que presentan una síntesis deteriorada de adenosilcobalamina (4).

Los pacientes con deterioro en la formación de adenosilcobalamina presentan acidemia metilmalónica, pero no homocistinuria; en cambio, la formación deteriorada de metilcobalamina, resulta en hiperhomocisteinemia, homocistinuria, cambios megaloblásticos, síntomas neurológicos, hipometioninemia, pero no se presenta acidemia metilmalónica. Los pacientes con defectos en la formación de ambas coenzimas presentan acidemia metilmalónica hiperhomocisteinemia y una combinación variable de otros signos y síntomas (1).

Tabla 1 Patologías asociadas a hiperhomocisteinemia

DEFECTO	Homocisteína	Metionina	Acido metilmalónico
Deficiencia de CBS (homocistinuria clásica)	↑↑↑	↑↑↑	N
Deficiencia de MTHFR Mutaciones asociadas a diferentes niveles de actividad enzimática	↑↑	↓ ó N	N
Variante termolábil MTHFR Mutación puntual en un sitio polimórfico	↑	↓ ó N	N
Grupo de complementación Cb1F Liberación defectuosa de Cb1 por los lisosomas	↑	↓	↑
Grupo de complementación Cb1C/Cb1D Deficiencia de las enzimas: reductasa citosólica de la Cb1 o Cb1-transferasa que resulta en el deterioro en la síntesis de metil y adenosil cobalamina	↑↑	↓	↑
Grupo de complementación Cb1G y Cb1E Deficiencia de la enzima metionina sintasa que resulta en síntesis deteriorada de Metcb1	↑↑	↓	N
Deficiencia nutricional de Vitamina B12	↑↑	↓ ó N	↑
Grupo complementación Cb1A /Cb1B Deficiencia de la enzima reductasa mitocondrial y de la enzima adenosiltransferasa que resulta en el deterioro en la síntesis de adenosilcobalamina	N	N	↑↑↑

N = valores normales

*Tomado de Scriver 2001; Bremer 1981.

MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA HOMOCISTINURIA

La homocistinuria debida a deficiencia de cistationina β sintasa se caracteriza por una gran variedad de anormalidades clínicas. Los principales sistemas involucrados son cuatro: esquelético, vascular, nervioso central y ocular.

Sistema esquelético: la osteoporosis es el cambio esquelético más consistente, muy común en la espina dorsal seguida por la de huesos largos. El tiempo en el cual se encuentra evidencia de osteoporosis espinal en pacientes no tratados es al final de la segunda década de vida.

Otras anormalidades esqueléticas son adelgazamiento y alargamiento de huesos largos (dolicoctenomelia), lo que produce que estos pacientes sean individuos altos y delgados.

Sistema vascular: la principal causa de morbilidad y la principal causa de muerte en la deficiencia de CBS es el tromboembolismo. La oclusión vascular puede ocurrir en cualquier vaso incluyendo la vena porta y se manifiesta a cualquier edad incluyendo la infancia.

Sistema nervioso: la anormalidad más frecuente en sistema nervioso central es el retraso mental que también representa el primer signo de deficiencia de cistationina β sintasa, y que se caracteriza por un desarrollo retardado durante el primer o segundo año de vida.

Sistema ocular: el hallazgo más consistente en la deficiencia de CBS es la dislocación de lente ocular (ectopia lentis). El tiempo de aparición de la dislocación ocular en pacientes sin tratamiento es aproximadamente a la edad de dos años (4).

Las manifestaciones clínicas de los pacientes con alteraciones en el metabolismo de la cobalamina comprenden principalmente síntomas neurológicos y anemia megaloblástica (8).

Tratamiento

Aproximadamente 50% de los pacientes con hiperhomocisteinemia generada por deficiencia de cistationina β sintasa responden al tratamiento con piridoxina. Los

que no responden a dicho tratamiento pueden ser tratados con ácido fólico y betaína, con el fin de mejorar la remetilación de la homocisteína.

Aquellos con homocistinuria debida a deficiencia de la enzima MTHFR responden al tratamiento con folato, betaína o una combinación de piridoxina (vitamina B6), cobalamina (vitamina B12) y ácido fólico.

La homocistinuria debida a defectos en el metabolismo de la cobalamina puede ser tratada mediante la administración de hidroxicobalamina y betaína (1).

Por otra parte, los pacientes pueden ser sometidos a un control dietético con el fin de regular el consumo de metionina.

HOMOCISTEINA TOTAL EN PLASMA Y SU DETERMINACIÓN

El plasma humano contiene especies oxidadas y reducidas de homocisteína. La forma reducida (referida como homocisteína) se encuentra en cantidades nanomolares y corresponde aproximadamente al 1% de la homocisteína total (Fig. A). Entre las formas oxidadas (a las cuales se les denomina homocistina) se encuentra la homocisteína unida a proteínas mediante puentes disulfuro y la homocisteína de disulfuros mixtos (Fig. B), las cuales representan 98% de la homocisteína total. De este porcentaje, 70 a 90% de las formas oxidadas se halla unida a proteínas séricas principalmente albúmina (6).

Forma Reducida

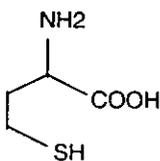


Figura A

Formas Oxidadas

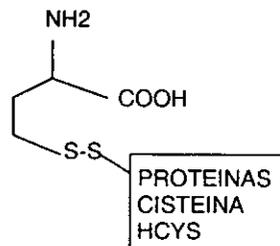


Figura B

Figura 2. Especies de Homocisteina que existen en plasma.

La determinación de homocisteína en plasma se ve fuertemente influenciada por la redistribución entre la fracción libre y la fracción unida a proteínas, por lo que el procesamiento y conservación de la muestra representa un paso crítico en su determinación. Después de la toma de muestra ocurre liberación de homocisteína por las células sanguíneas dando lugar a incremento de la cantidad de homocisteína total en plasma a razón de 15 a 20 % por hora, que puede evitarse mediante congelación de la muestra sanguínea. Si se eliminan las células sanguíneas, la homocisteína plasmática es estable 4 días a temperatura ambiente, 2 semanas a 2°C, e incluso puede ser estable por años si se mantiene congelada a -20 °C (9).

En cuanto a su unión a proteínas, la homocisteína libre se enlaza progresivamente a proteínas *ex vivo*, esta redistribución se lleva a cabo en 24 horas a temperatura ambiente, al igual que en muestras congeladas. Por esta razón la determinación de homocisteína libre requiere la inmediata desproteinización del plasma (8).

Metodología

Las metodologías para cuantificar homocisteína se dividen en cinco tipos: ensayos enzimáticos, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica, HPLC con detección por fluorescencia previa derivatización de la muestra y analizadores de aminoácidos (9).

A pesar de las diferencias en los principios de separación y detección en las metodologías utilizadas para cuantificar homocisteína, todos estos ensayos requieren la reducción de los enlaces disulfuro entre la homocisteína y otros tioles presentes en el plasma. La selección del agente reductor depende del sistema de separación y detección utilizado. Entre los reductores empleados con mayor frecuencia se encuentran: ditioeritriol, ditiotreitól, mercaptoetanol y borohidruro de sodio (8).

La metodología más utilizada es quizá la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección por fluorescencia, por derivarse de la metodología

comúnmente utilizada para cuantificar aminoácidos en plasma. Las diferentes técnicas publicadas consisten en la reducción de los puentes disulfuro que forma la homocisteína en el plasma; la carboximetilación del grupo tiol del aminoácido mediante la adición de ácido iodoacético (con el fin de evitar su re-oxidación), precipitación de las proteínas plasmáticas, y derivatización del aminoácido con diferentes reactivos fluorogénicos como SBD-F, monobromobimano y *o*-oftaldialdehído (8).

OBJETIVOS

- Adaptar la metodología para cuantificar homocisteína total en plasma mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Evaluar los niveles de homocisteína total en plasma en individuos control.
- Evaluar los niveles de homocisteína total en plasma en pacientes con diagnóstico de homocistinuria y con diagnóstico de acidemia metilmalónica adscritos a la Unidad de Genética de la Nutrición

MATERIAL Y METODO

Población estudiada

➤ **Pacientes adscritos a la Unidad de Genética de la Nutrición:**

Se evaluaron los niveles de homocisteína total en ocho pacientes con diagnóstico de hiperhomocisteinemia y en seis pacientes con diagnóstico de acidemia metilmalónica.

➤ **Controles.-** cuarenta y seis individuos escogidos al azar entre donadores altruistas de sangre.

De cada uno de ellos se obtuvieron 3ml de sangre en tubos de vidrio con EDTA (9:1 v/v). Las muestras se centrifugaron inmediatamente a 5000 g por 5 min. El plasma obtenido se almaceno a -20°C hasta su procesamiento.

Muestras de sujetos control

Para las muestras de sujetos control se evaluaron los niveles de homocisteína pre y post-carga oral de metionina, a razón de 0.1 g/kg. Ocho horas después de la carga se obtienen 3 ml de sangre venosa periférica para la determinación de homocisteína.

Metodología

La metodología empleada en el presente trabajo es una modificación de la técnica reportada por Hyland y Fermo (10), adecuándola a los reactivos y equipo con que cuenta la UGN como a continuación se describe.

EQUIPO

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters constituido por 2 bombas modelo 510, controlador automático de gradiente modelo 680, inyector Rheodyne 7010, integrador modelo 740 y columna C-18 Kingsorb 150 × 4.6 mm ID 3μ.

- La detección se realizó por medio de un detector de fluorescencia Waters modelo 420 con una longitud de onda de excitación de 338 nm y longitud de onda de emisión de 425 nm.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

- Fase móvil A : amortiguador de fosfatos 0.02M pH 7.0, tetrahidrofurano y agua (91:5:4).
- Fase móvil B : amortiguador de fosfatos 0.02M pH 7.0, agua, acetonitrilo (40:5:55).

Gradiente

TIEMPO	% A	% B
INICIAL	70	30
8.0	50	50
9.0	0	100
13.0	0	100

Todas las corridas se realizaron a temperatura ambiente.

REACTIVOS

Etanetiol al 20% preparado en solución amortiguadora de boratos 1M pH 11.0

Acido perclórico 6% v/v en agua

Acido iodoacético 50mM preparado en ácido perclórico 6%

NaOH 3 M

Reactivo Derivatizante (OPA).- 40 mg *o*-oftaldialdehido en 2mL de metanol y 100µL de etanetiol

Acido homocisteico 2mM

L-Homocistina

Procesamiento de la muestra

A una alícuota de 200 μL de plasma se le agregan 10 μL de ácido homocisteico (estándar interno), y 200 μL de etanetiol al 20%. Con el fin de llevar a cabo la reacción de carboximetilación y precipitar proteínas del plasma se agregan 500 μL de ácido iodoacético 50mM preparado en ácido perclórico. Se centrifuga la muestra por cinco minutos a 2500 rpm. Se derivatizan 100 μL de sobrenadante agregando 20 μL de sosa y 40 μL de reactivo derivatizante (OPA).

CURVAS ESTANDAR

Se realizaron dos curvas estándar: en medio acuoso y en medio plasmático.

Las concentraciones utilizadas fueron: 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2 μM del estándar de L-homocistina.

EVALUACIÓN DEL METODO

- Linealidad.
- Reproducibilidad.
- Porcentaje de recobro.
- Cantidad mínima detectable.
- Cantidad mínima cuantificable.

RESULTADOS

LINEALIDAD

El método es lineal en el intervalo probado de 2 a 200 μM .

Medio	Ecuación de la curva	Coefficiente de correlación
acuoso	$y = 0.009059 X + 0.00851$	0.9995
plasma	$y = 0.009046 X + 0.0651$	0.9994

- Probar estadísticamente que el estimador $a = 0$ para un nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Hipótesis nula $H_0 : a = 0$

Hipótesis alterna $H_i : a \neq 0$

Estadígrafo de prueba

$$t = \frac{a - \alpha}{S_e} [n S_{xx} / S_{xx} + n (X)^2]^{1/2}$$

Se rechaza la hipótesis nula si $t < -t_{\alpha/2}$ ó $t > t_{\alpha/2}$ donde $t_{\alpha/2}$ es el valor de la t student para un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ con $n-2$ grados de libertad.

$$t_{\alpha/2} = 2.015$$

$$t \text{ calc} = 1.134$$

Por lo que se acepta la hipótesis nula.

- Probar estadísticamente que el estimador $b \neq 0$ para un nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Hipótesis nula $H_0 : b = 0$

Hipótesis alterna $H_i : b \neq 0$

Estadígrafo de prueba

$$t = \frac{b - \beta}{S_e} (S_{xx})^{1/2}$$

Se rechaza la hipótesis nula si $t < -t_{\alpha/2}$ ó $t > t_{\alpha/2}$ donde $t_{\alpha/2}$ es el valor de la t student para un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ con $n-2$ grados de libertad.

$$t_{\alpha/2} = 2.015$$

$$t \text{ calc} = 105.9$$

Por lo que se rechaza la hipótesis nula.

Comparación de la curva estándar en medio acuoso y plasmático

- Probar estadísticamente que el estimador $b_1 = b_2$ para un nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Hipótesis nula $H_0 : b_1 = b_2$

Hipótesis alterna $H_i : b_1 \neq b_2$

Estadígrafo de prueba

$$t = \frac{m_1 - m_2}{S_{y/x1} + S_{y/x2} [\sum x^2 - (\sum x_1/n) + \sum x^2 - (\sum x_2/n)]^{1/2}}$$

Se acepta la hipótesis nula si $t_{\alpha/2} > t$ donde $t_{\alpha/2}$ es el valor de la t student para un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ con $(n_1 + n_2) - 4$ grados de libertad.

$$t_{\alpha/2} = 2.23$$

$$t_{\text{calc}} = 0.0506$$

Por lo que se acepta la hipótesis nula, no hay diferencia significativa entre las pendientes de las curvas estándar en medio acuoso y medio plasmático.

REPRODUCIBILIDAD

Se evaluó la reproducibilidad intraensayo procesando alícuotas de una muestra de plasma ocho veces consecutivas en un día y la reproducibilidad interensayo procesando las alícuotas durante ocho días.

Coeficiente de variación CV	
Intraensayo	5.8 %
Interensayo	9.5 %

LIMITE DE DETECCION Y CUANTIFICACION

Para determinar los límites de detección y cuantificación se analizaron diez muestras de blancos independientes medidos a la vez.

De acuerdo a los criterios del Eurachem (11) el límite de detección se expresa como la concentración de homocisteína correspondiente al promedio de los valores blanco más tres desviaciones estándar.

El límite de cuantificación se expresa como la concentración de homocisteína correspondiente a los valores del blanco más seis desviaciones estándar.

Concentración de homocisteína μM	
Límite de detección	0.514
Límite de cuantificación	1.968

PORCIENTO DE RECOBRO

El porcentaje de recobro se determinó analizando muestras adicionadas con L-homocistina. Las muestras se procesaron por triplicado, los resultados se expresan como el promedio del porcentaje de recobro a diferentes concentraciones.

Homocisteína adicionada ($\mu\text{mol/l}$)	Porcentaje
10	102
20	97
50	105

CONTROLES

Se procesaron muestras de 46 individuos control, antes y después de recibir una carga oral de metionina.

Los valores de homocisteína total pre-carga de metionina se encuentran en un intervalo de no detectable (ND) a 6 μM con una mediana de 1.3 μM . Los valores post-carga se encuentran en un intervalo de ND a 20.5 μM con una mediana de 6.1 μM . (Fig. 1)

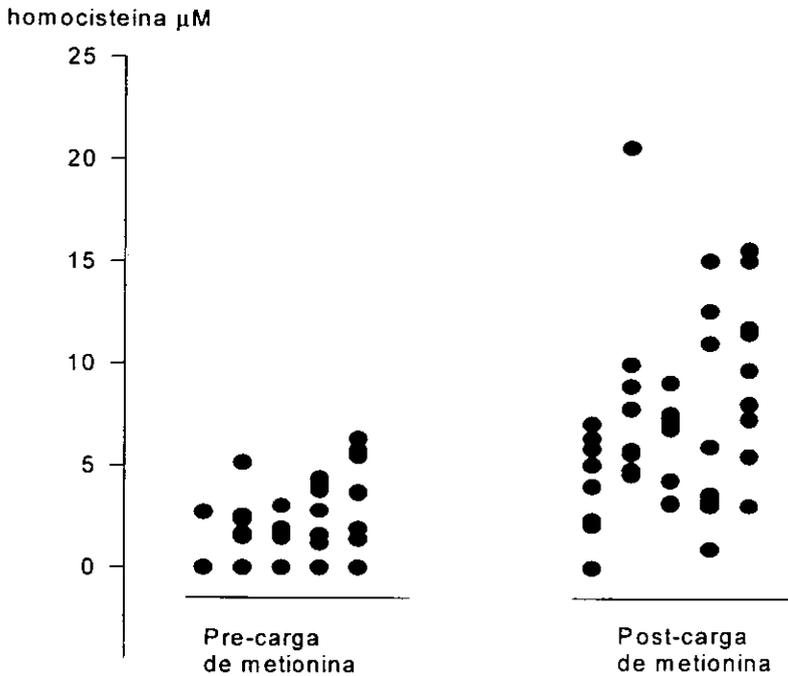


Figura 1. Valores de homocisteína total en plasma pre y post carga de metionina en individuos control.

PACIENTES CON HOMOCISTINURIA

Se evaluaron los niveles de homocisteína en plasma de pacientes diagnosticados con homocistinuria. La edad de los pacientes se encuentra en un intervalo de 5 a 13 años. Para el diagnóstico de los pacientes se evalúan además de homocisteína total, los niveles de metionina. (Tabla 1)

Los pacientes con homocistinuria presentan valores de homocisteína total 3 a 6 veces alterados con respecto a los valores de referencia reportados. (Fig. 2)

Se determinaron los niveles de homocisteína y metionina en muestras de un paciente diagnosticado en el año de 1999 del cual se tiene seguimiento. Las muestras analizadas corresponden a la de año de diagnóstico y los dos años posteriores. (Fig. 3)

PACIENTE	HOMOCISTEINA	METIONINA *
	μM	μM
1	72	667
2	63	652
3	58	933
4	52	357
5	38	1234
6	67	66
7	37	568
8	60	460

Tabla 1 Valores de homocisteína y metionina en pacientes con diagnóstico de homocistinuria.

*La concentración de metionina en plasma se determinó en la UGN mediante cromatografía líquida de alta resolución.

‡ Valores de referencia de metionina: 9-42 μM *

¶ Valores de referencia de homocisteína: no detectable (ND) -12 μM *

* Los valores de referencia fueron tomados de Bremer y Duran, 1981.

PACIENTES CON ACIDEMIA METILMALONICA

Pacientes adscritos a la Unidad de Genética de la Nutrición diagnosticados mediante la determinación de ácidos orgánicos urinarios. De seis pacientes evaluados solo dos presentaron niveles de homocisteína mayores a los valores de referencia (*Fig. 2*)

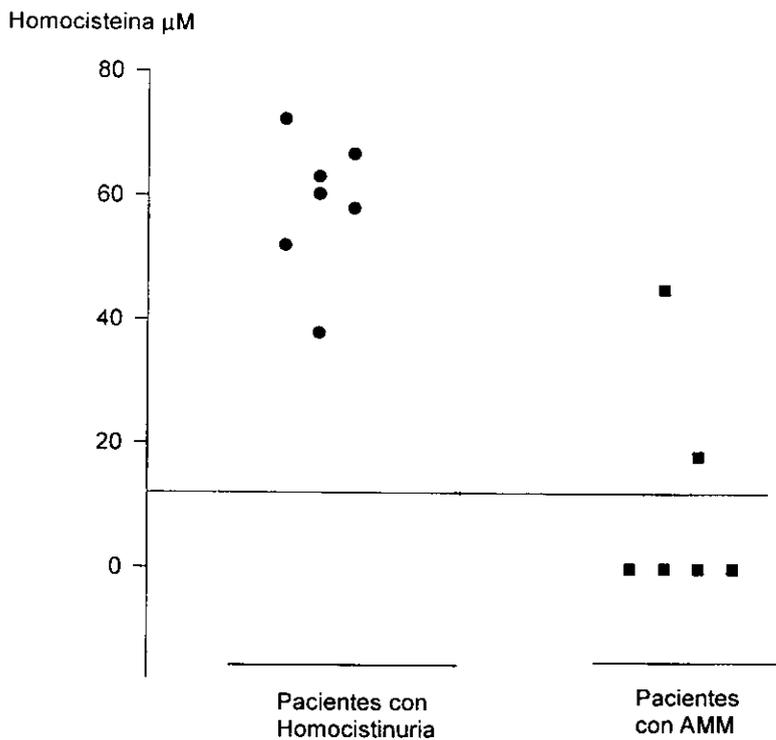


Figura 2 Valores de homocisteína total en plasma en pacientes con homocistinuria y en pacientes con acidemia metilmalónica

Homocisteína
 μM

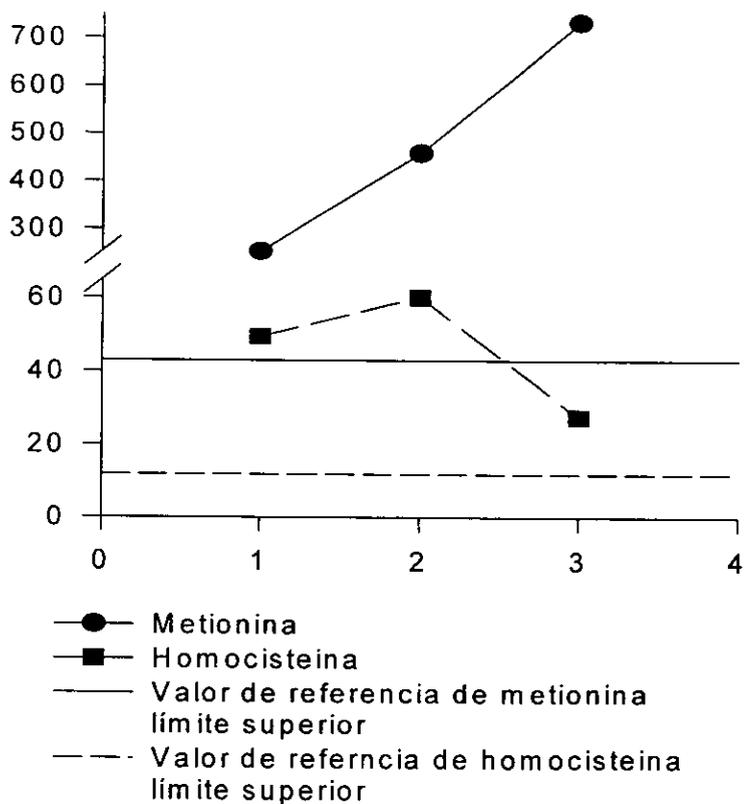


Figura 3 Valores de homocisteína y metionina de seguimiento en un paciente con diagnóstico de homocistinuria.

DISCUSION

En la adaptación de la metodología para la cuantificación de homocisteína total en plasma las variables más importantes a controlar son pH y la reacción de carboximetilación, para que se lleven a cabo las reacciones de reducción y derivatización se requiere un pH básico mayor a 9 (12) que se obtuvo mediante el uso de amortiguador de boratos para la reacción de reducción; mientras que para la derivatización fue necesario el uso de NaOH 3M ya que el sobrenadante obtenido al precipitar proteínas presentaba un pH muy ácido. La adición de NaOH posterior a la desproteínización asegura un alto porcentaje en la derivatización del aminoácido (13). Con respecto a la reacción de carboximetilación, la adición de ácido iodoacético debe ser inmediata a la reducción con el fin de evitar la reoxidación de los grupos tiol (14) por esta razón en el procesamiento de la muestra se utilizó un reactivo ácido iodoacético / ácido perclórico, que permitiera la eliminación de proteínas al mismo tiempo que se lleva a cabo la carboximetilación de los grupos tiol libres.

En cuanto a la evaluación del método, los parámetros evaluados son aceptables y coincidentes con valores reportados en la literatura para la determinación de homocisteína mediante cromatografía de líquidos con el uso o-offdialdehído como agente derivatizante (10,13,15) para la prueba de reproducibilidad se obtuvieron coeficientes de variación de 5.8% intraensayo y 9.5% interensayo, los valores reportados en la literatura se encuentran en un intervalo de 2 a 6 % y de 4 a 10% respectivamente (10,15,16). De acuerdo a las pruebas de hipótesis realizadas el método tiene una linealidad adecuada para el intervalo de trabajo utilizado. El límite de cuantificación calculado de acuerdo a los criterios de la Eurachem (11) de $2\mu\text{M}$ permite la determinación de homocisteína en diferentes grupos de individuos ya que los niveles del aminoácido reportados en personas sanas se encuentran en un intervalo entre 1 y $12\mu\text{M}$ (8) y en pacientes con alteraciones del metabolismo de la homocisteína o cobalamina los niveles son superiores (7).

La determinación de homocisteína pre y post carga de metionina se realiza con el propósito de evaluar la hiperhomocisteinemia generada y asociarla con posibles alteraciones del metabolismo de la homocisteína (principalmente relacionadas con la enzima CBS y con deficiencia de vitamina B6) (3). Los valores obtenidos post carga de metionina en los individuos control se encuentran en un intervalo entre ND a 20 μM con una mediana de 6.1 μM , mientras que los valores pre carga tienen una mediana de 1.3 μM , estos valores podrán ser comparados con los niveles pre y post carga de metionina en pacientes con antecedentes de afecciones cardiovasculares con el fin de determinar la frecuencia de hiperhomocisteinemia en este grupo de individuos.

La determinación de homocisteína plasmática en pacientes de la UGN con diagnóstico de acidemia metilmalónica permite realizar un diagnóstico diferencial entre la deficiencia de la enzima metilmalonil CoA mutasa y alteraciones en el metabolismo de la cobalamina (4). De seis pacientes evaluados con este diagnóstico aquellos que presentaron hiperhomocisteinemia (fig.2), pueden pertenecer a los grupos de complementación cb1F o cb1C/cb1D en los cuales existe el deterioro de la síntesis de ambas coenzimas, metilcobalamina y adenosilcobalamina (4). Este es el caso de dos pacientes que presentaron niveles mayores a los normales, uno de ellos en el momento del diagnóstico presentó una elevación de 4 veces el nivel normal de homocisteína, después de recibir tratamiento que consiste en administrar dosis farmacéuticas de vitamina B12 los niveles de homocisteína se normalizaron sin requerir control dietético, estos pacientes son catalogados como acidemia metilmalónica que responde a vitamina B12 (4). Por otra parte, aquellos que no presentaron elevación de homocisteína plasmática (cuatro) pueden presentar deficiencia en la síntesis de adenosilcobalamina (grupo de complementación cb1A/cb1B) o deficiencia de la enzima metil malonil CoA mutasa.

Los pacientes con hiperhomocisteinemia adscritos a la UGN presentan niveles elevados de homocisteína y metionina, por lo que su diagnóstico corresponde a homocistinuria clásica (Tabla 1).

La cuantificación de homocisteína en plasma en pacientes con homocistinuria clásica es una herramienta útil en su diagnóstico y seguimiento. Se determinaron los niveles de homocisteína total en muestras que corresponden al momento del diagnóstico y posteriores de un paciente adscrito a la UGN observándose que los niveles de metionina han aumentado y los niveles de homocisteína presentan inicialmente un aumento, disminuyendo en la última muestra analizada. Los niveles de estos aminoácidos en los pacientes dependen de la actividad residual de la enzima CBS así como del apego a su tratamiento con el cual se busca regular la metionina contenida en la dieta y suplementarla con las vitaminas que actúan como coenzimas en el metabolismo de la homocisteína.

PERSPECTIVAS

Los pacientes con homocistinuria presentan enfermedad cardiovascular siendo adultos jóvenes o incluso en la niñez. En base a esto McCully formuló la teoría de la homocisteína y la aterosclerosis en el año de 1969 (18).

A partir de los años ochenta diversos estudios prospectivos y retrospectivos han sido publicados, la gran mayoría indican que un incremento moderado en los niveles de homocisteína plasmática total se asocian con un incremento en el riesgo de enfermedad cardiovascular, trombosis e infarto, sin embargo, si la homocisteína *per se* es el agente causal en la aterogénesis y trombogénesis aún no ha sido determinado, así como su posible mecanismo fisiopatológico. Dentro de los mecanismos implicados se sugieren: efecto citotóxico sobre las células endoteliales a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (6), disminución de la vida media plaquetaria y alteración de varios factores de la cascada de coagulación (18).

Se ha planteado la existencia de interacciones entre factores de riesgo ya establecidos de enfermedad cardiovascular como son hipertensión, hiperlipidemia y diabetes con la hiperhomocisteinemia, indicando que niveles altos de homocisteína en plasma elevan el riesgo conferido por los factores convencionales (18).

Sin embargo, estudios realizados en los últimos quince años han demostrado la correlación entre defectos moderados del metabolismo de la homocisteína y la ocurrencia de enfermedad vascular oclusiva, implicando a la hiperhomocisteinemia como un factor de riesgo independiente para enfermedad trombótica arterial y venosa, ya que esta se encuentra sin la presencia de otros factores de riesgo asociados como hipertensión, diabetes mellitus, tabaquismo, hipercolesterolemia, etc (18).

Una causa de hiperhomocisteinemia moderada es la mutación puntual en el gene de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) que genera una variante termolábil. Los individuos homocigotos presentan niveles elevados de homocisteína cuando existen niveles bajos de folato, dicha mutación también ha

sido asociada con un incremento en el riesgo de presentar enfermedad cardiovascular (18).

Es importante resaltar la relación entre los niveles de homocisteína y ácido fólico, vitamina B12 y vitamina B6 ya que en muchos individuos un consumo óptimo de estas vitaminas representa un medio efectivo para mantener niveles bajos de homocisteína en plasma que resulta en un efecto protector contra enfermedad cardiovascular (19).

Las variantes más graves de las afecciones cardiovasculares por su repercusión en todos los ámbitos (pérdida de la productividad, deterioro de la calidad de vida, aplicación de servicio curativos y la administración de numerosos procedimientos diagnósticos) son el infarto agudo del miocardio (IAM), los infartos cerebrales y la enfermedad arterial periférica, 3 de las 5 principales causas de muerte en el mundo. De estas tres patologías, existen numerosos estudios que demuestran que la hiperhomocisteinemia predispone a padecerlas con mayor frecuencia y gravedad en edades más tempranas.

De acuerdo a lo anterior la determinación de homocisteína en plasma es una herramienta importante en estudios que permitan determinar el papel de dicho aminoácido en afecciones cardiovasculares, por lo que la aplicación inmediata de la metodología utilizada para este proyecto de tesis es la determinación de los niveles de homocisteína en pacientes que han presentado enfermedad cardiovascular.

CONCLUSIONES

La metodología utilizada permite cuantificar homocisteína total en muestras de plasma en un intervalo entre 2 y 200 μM ; esta determinación hace posible el abordaje diagnóstico apropiado y confiable para la distinción entre deficiencias hereditarias de las enzimas relacionadas con el metabolismo de la homocisteína, (cistationina β sintasa, metiléntetrahidrofolato reductasa y metionina sintasa) y las causas no genéticas, por ejemplo, carencia de las vitaminas B12, B6, folatos y algunos estados asociados a enfermedad.

En pacientes con homocistinuria la cuantificación de metionina y homocisteína total permite establecer un mejor diagnóstico ya que es posible evaluar alteraciones en ambas rutas del metabolismo de la homocisteína (remetilación y transulfuración). Además la determinación de la concentración de estos aminoácidos es de utilidad en el seguimiento y evaluación de los pacientes.

En el caso de los pacientes con acidemia metilmalónica la cuantificación de homocisteína total permite realizar un diagnóstico diferencial entre la deficiencia de la enzima metilmalonil CoA mutasa y alteraciones del metabolismo de la cobalamina.

BIBLIOGRAFIA

1. Ueland P.M. and Refsum H., Plasma homocysteine a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease and drug therapy, *J. Lab. Clin. Med.*, 114 (1989) 473-501.
2. Fowler B., Disorders of homocysteine metabolism, *J. Inher. Dis.*, 20 (1997) 270-285.
3. Selhub J., Homocysteine Metabolism, *Annu. Rev. Nutr.*, 19 (1999) 217-246.
4. Scriver C.R., Beaudet A.L., Valle M.D., Sly W.S., *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8a edición, Mc Graw Hill, 2001
5. Williams W.J. , Beutler E., Ersleu A.J., Lichtman M.A., *Hematology*, 3a edición, Mc Graw Hill, 1983
6. Jacobsen D.W., Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease, *Clin. Chem.*, 44 (1998) 1833-1843.
7. Bremer H.J, Durann M., *Disturbances of Amino Acid Metabolism. Clinical Chemistry and Diagnosis*, Urban & Schwarzenberg, 1981.
8. Ueland P.M., Refsum H., Stabler S.P., Malinow M., Andersson A., Allen R.H., Total Homocysteine in Plasma or Serum: Methods and Clinical Applications, *Clin. Chem.*, 39 (1993) 1764-1779.
9. Refsum H., Fiskerstrand T., Guttormsen A.B., Ueland.P.M., Assessment of homocysteine status, *J. Inher. Metab. Dis.*, 20 (1997) 268-294.
10. Hyland K. and Bottiglieri T., Measurement of total plasma and cerebrospinal fluid homocysteine by fluorescence following high-performance liquid chromatography and precolumn derivatization with *o*-phthaldialdehyde, *J. Chromatogr.*, 579 (1992) 55-62.
11. Eurachem A Focus For Analytical Chemistry in Europe. Guía de laboratorio para la validación de métodos y tópicos relacionados. Traducción libre elaborada por Pedrero M.E. Centro Nacional de Metrología. 1ª Edición en Inglés, 1998.
12. Seiler N., *Handbook of Derivatives for Chromatography*, 2a edición, Wiley,1993.

13. Fermo I., Arcenolli C., De Vecchi E., Vigano S., Paroni R., High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of total homocysteine in plasma, *J. Chromatogr.*, 593 (1992) 171-176.
14. Cooper and Turnell, Fluorescence detection of cystine by *o*-phthalaldehyde derivatisation and its separation using high-performance liquid chromatography, *J. of Chromatogr.*, 227 (1982) 158-161.
15. Carducci C., Birarelli M., Nola M., Antonozzi I., Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of homocysteine en plasma samples, *J. Chromatogr. A*, 846 (1999) 93-100.
16. Fermo I., Arcelloni C., Mazzola G., D'Angelo A., Paroni R., High-performance liquid chromatographic method for measuring total plasma homocysteine levels, *J. Chromatogr. B*, 719 (1998) 31-36.
17. Ueland P.M., Refsum H., Beresford S.AA., Vollset S.E., The controversy over homocysteine and cardiovascular risk, *Am. J. Clin. Nutr.*, 72 (2000) 324-332.
18. Langman L.J., Cole D.E., Homocysteine: cholesterol of the 90s, *Clin. Chim. Act.*, 286 (1999) 63-80.
19. Miller J.C., Miller J.N., *Estadística para Química Analítica*, 2a edición, Addison Wesley Iberoamericana, Estados Unidos, 1993.
20. Miller I., Freund J.E., *Probabilidad y Estadística para Ingenieros*, 4a edición, Prentice Hall Hispanoamericana, México, 1992.