

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES EN EL DIAGNOSTICO DE
ENFERMEDADES METABOLICAS HEREDITARIAS EN OFTALMOLOGIA:
ORNITINA Y HOMOCISTEÍNA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEÚTICA BIOLOGA

PRESENTA

SOLEDAD QUEZADA MORENO

MÉXICO, D. F.

2006.



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 : Homero Hernández Montes

Vocal : Felipe Cruz García

Secretario : Isabel Ibarra González

1er Suplente: Adriana Camacho Villanueva

2º Suplente: Nayelli Najera García

Sitio donde se desarrollo el tema: INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA, UNIDAD DE GENETICA DE LA NUTRICIÓN/ INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Asesor del tema:

M en C. Isabel Cristina Ibarra González _____

Sustentante:

Soledad Quezada Moreno _____

AGRADECIMIENTOS

Gracias **DIOS** mío por ser guía de mi camino y por obsequiarme esta oportunidad de vida.

Gracias **Mamá** por tu fe en mi, por tu paciencia, comprensión, apoyo, pero sobre todo por tu amor y gran ejemplo de fortaleza, rectitud y perseverancia.

Gracias **Papá** el gran amor y por el consejo que siempre me haz dado.

A mis **Hermanas** Margarita, Isabel y Patricia quienes esperaron junto a mi con tanto anhelo este momento, las quiero mucho y en verdad las admiro profundamente.

A mis **Hermanos**, Juan por ser mi inspiración para ser Universitaria y a ti David por formar parte en mi vida.

A mis amados **Sobrinos** Alma, Chucho, Vero, Erick, Diana, Magda, Jorgito, Aleisa y David, quienes son la luz de mi vida.

A mis grandes **amigos** Paty, Montse, Rubén y Karina quienes me han permitido compartir con ellos el significado de la amistad.

Al **equipo representativo de fútbol** de la Facultad Química con quienes aprendí a vivir intensamente el espíritu Universitario.

De manera muy especial agradezco a mi asesora de tesis **M. C. Isabel Cristina Ibarra González** por todas sus enseñanzas y paciencia infinita, a la **Dra. Marcela Vela** y a toda la Unidad de Genética de la Nutrición por el apoyo brindado.

A esta maravillosa **Universidad** por permitirme ser parte de ella y a la cual siempre llevare en mi corazón.

EMMANUEL.

Este momento de mi vida lo quiero compartir especialmente contigo, es la culminación de uno de mis mas grandes anhelos, y se que así como yo, tu algún día cumplirás los tuyos. Esas alas que tanto deseas están en tu mente, pero sus raíces nacieron en tu corazón, por que es fuerte.

No puedo cambiar la dirección del viento, pero sí ajustar mis velas para llegar siempre a mi destino.

JAMES DEAM

Los sueños y la perseverancia son una poderosa combinación. Un esfuerzo más, y lo que iba a ser un fracaso, se convierte en un éxito.

WILLIAM LONGGOOD Y MURAT.

ÍNDICE

	PAG.
➤ ABREVIATURAS	4
➤ RESUMEN	5
➤ INTRODUCCIÓN	
▪ BIOMARCADORES	6
▪ ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO: Implicaciones Oftálmicas.	7
▪ ATROFIA GIRATA	8
▪ HOMOCISTINURIA	12
➤ JUSTIFICACIÓN	16
➤ OBJETIVOS	17
➤ METODOLOGÍA	18
➤ RESULTADOS	
▪ ATROFIA GIRATA	21
▪ HOMOCISTINURIA	24
➤ ANALISIS DE RESULTADOS	
▪ ATROFIA GIRATA	29
▪ HOMOCISTINURIA	33
➤ CONCLUSIONES	35
➤ RECOMENDACIONES	36
➤ BIBLIOGRAFÍA	38
➤ APÉNDICES	45

ABREVIATURAS

EIM	Errores innatos del metabolismo
EMH	Errores metabólicos hereditarios
AOT	Ornitina δ -aminotransferasa
CBS	Cistationina β -sintasa
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
SAM	S-adenosilmetionina
THF	Tetrahidrofurano
ACN	Acetonitrilo
OPA	O-ftaldehído
DTE	Ditioeritritol
UGN	Unidad de genética de la nutrición
INP	Instituto nacional de pediatría
IIB	Instituto de investigación biomédica
HPLC	Siglas en inglés de cromatografía de líquidos de alta resolución
A _x	Apéndices

RESUMEN

La ornitina, y la homocisteína son utilizados como biomarcadores de errores innatos del metabolismo con implicaciones oftalmológicas como la atrofia girata y la homocistinuria, respectivamente.

La elevación de los niveles plasmáticos de ornitina se debe a un bloqueo metabólico en la enzima ornitina aminotransferasa (OAT), dando como consecuencia la atrofia girata de corioide y retina, enfermedad metabólica hereditaria que se caracteriza básicamente por la disminución progresiva de la visión. Por otra parte, la elevación de los niveles plasmáticos de la homocisteína debido a un trastorno metabólico hereditario denominado hiperhomocistinemia se origina por la deficiencia enzimática de la enzima CBS y de la enzima MTHFR principalmente; sin embargo, pueden estar implicadas otras enzimas del metabolismo de la metionina. La homocistinuria clásica es el EIM en el que se observa mayormente manifestaciones clínicas a nivel oftálmico, los pacientes presenta miopía, sin embargo, como bioindicador característico se observa la dislocación del cristalino lo que ocasiona pérdida de la nitidez.

En este trabajo, se cuantificaron estos biomarcadores en el plasma de pacientes remitidos a la Unidad de Genética de la Nutrición INP-IIB, que presentaron sospecha diagnóstica de atrofia girata e hiperhomocistinemia, la cuantificación se realizó mediante la técnica de HPLC fase reversa.

INTRODUCCIÓN

Biomarcadores.

Los biomarcadores se definen como una respuesta medible objetivamente y evaluada como un indicador de procesos biológicos (bioindicador) normales, patogénicos o debido a respuesta farmacológica debido a intervención terapéutica (Lewin 2004).

Un biomarcador se considera como tal si: se mide mediante sistemas analíticos bien establecidos y si existe base científica de que la presencia de este es determinante en los resultados de los procesos fisiológicos, toxicológicos, clínicos, patológicos, farmacológicos o clínicos a prueba (Lewin 2004).

En algunos casos los biomarcadores tienen el potencial de ser usados como dispositivos de diagnóstico o pronóstico (Lewin 2004), debido a su alta especificidad y sensibilidad como indicadores de enfermedad (Bethesa group 2001).

Los cambios en las concentraciones intracelulares de metabolitos pueden revelar fenotipos de proteínas (Lewin 2004), la cuantificación de los metabolitos biomarcadores ayudan a relacionar los efectos del metabolito y caminos celulares con las respuestas clínicas o el estado de salud del paciente (Bethesa group 2001). En los últimos años los biomarcadores han sido muy utilizados como herramienta de investigación en el monitoreo y evaluación ambiental, procesos metabólicos, sustancias de abuso, trastornos psiquiátricos, epidemiología, exposición a sustancias tóxicas, desarrollo de líneas celulares, etc. (Melancon 1995).

Errores Innatos del Metabolismo (EIM): Implicaciones Oftálmicas.

El ojo humano es un órgano complejo altamente especializado, las posibles causas de atrofia ocular van desde traumatismo, a deficiencias nutricionales (como B12 o ácido fólico), toxicidad (como etambutol o cianida) hasta enfermedades metabólicas hereditarias (EMH) (Huizing 2005).

Las manifestaciones oculares ocupan el 4º lugar entre los sistemas más comúnmente afectados en las EMH (Costa 1985) y se asocian generalmente con la formación de productos tóxicos o bien por la acumulación de metabolitos normales que a elevadas concentraciones resultan dañinos para el ojo o alguno de sus componentes (Poll-The 2003).

Los fundamentos bioquímicos de los EIM son muy variados así como las manifestaciones, la severidad de los cuadros y el tratamiento, razón por la cual en el presente trabajo solo abordara la atrofia girata y la homocistinuria.

La atrofia girata y homocistinuria son clasificadas como atrofas ópticas secundarias debido a que el defecto genético afecta primero a las rutas metabólicas, a diversas células u órganos antes que el nervio óptico. El daño del nervio óptico ocurre secundariamente a estos cambios patológicos, que incluyen la acumulación o formación de intermediarios dañinos (Huizing 2005).

Atrofia girata.

La atrofia girata es un error innato del metabolismo con herencia autosómica recesiva (Barrett 1987, Kaiser-Kupfer 2004), el defecto primario es la deficiencia de la enzima (OAT) (EC 2.6.1.13), (Valle 1977, Shih 2000), lo que provoca la elevación de ornitina en plasma y otros líquidos biológicos, este aspecto bioquímico fue reportado por primera vez por Simelly colaboradores en 1973.

La atrofia girata es una enfermedad degenerativa muy poco frecuente, existen cerca de 150 casos bioquímicamente confirmados reportados en la literatura (Valle 2001), siendo particularmente frecuente en Finlandia (Sipilä 1979, Valle 1983).

El primer reporte esta enfermedad fue realizado por Jacobsohn en 1888, quién describe manchas en forma de racimos de uvas que invaden la superficie ocular de manera progresiva; se reporto como un caso atípico de retinitis pigmentosa, fueron Cutler y Fuchs en 1895 y 1896 los primeros oftalmólogos en diferenciar esta enfermedad (Valle 2001).

La historia clínica de la atrofia girata inicia usualmente a finales de la primer década de vida con ceguera nocturna y miopía severa, acompañada por atrofia corioretinal con áreas circulares perfectamente definidas (Shih 2000), estas áreas atróficas se observan en la periferia de la retina y con el tiempo las lesiones se incrementan en tamaño y numero, culminando en ceguera entre los 20 y 50 años (Ahmet 2006, Kaiser-Kupfer 2002).

Metabolismo de la ornitina.

La L-Ornitina es un aminoácido dibásico no proteico el cual tiene un importante rol en el metabolismos de la urea, creatina y poliaminas; además esta estrechamente relacionada con la ruta de síntesis de la prolina y el intercambio de moléculas entre el ciclo de la urea de de los ácidos tricarboxílicos (Valle 2001).

La mayor fuente es la arginina proteica proveniente de la dieta, los átomos de carbono de esta se incluyen en las proteínas como arginina, prolina, glutamato, α -cetoglutarato derivado de aminoácidos no esenciales, por la conversión de poliaminas y GABA y por la oxidación en el ciclo de los ácidos tricarboxilicos (Fernandes 2000).

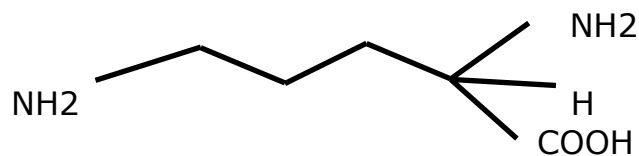


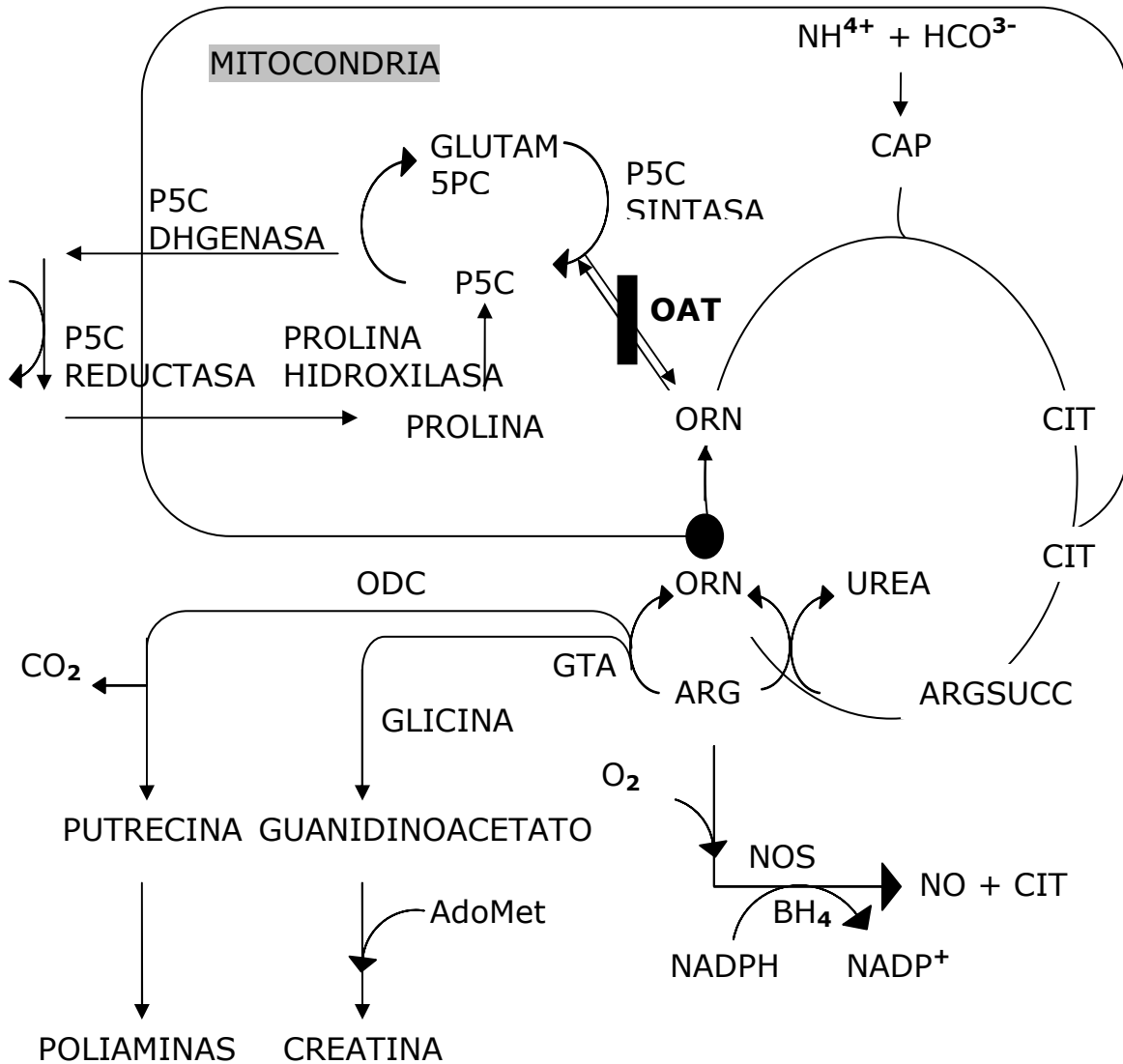
Figura 1. Molécula de la ornitina $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$

La ornitina es sustrato o producto de 5 enzimas y un transportador mitocondrial. Su metabolismo lo podemos dividir en cuatro secciones: ciclo de la urea, biosíntesis de poliaminas, síntesis de creatina y reacción de la OAT (figura 2) (Valle 2001).

La OAT es una transaminasa dependiente de piridoxal fosfato, el cual proviene de la vitamina B₆ (piridoxina), se expresa en la matriz mitocondrial (Fernandes 2000) de los principalmente en hígado, fibroblastos, linfocitos, el locus del gen se localiza en brazo largo del cromosoma 10 (10q26) y se han identificado mas de 60 mutaciones causantes de la enfermedad (Valle 2001).

La OAT cataliza la transaminación de la ornitina y α -cetoglutarato a γ -glutamilsemialdehído y pirrolina-5-carboxilato (Valle 2001).

Figura 2. Ruta metabólica de la ornitina (Valle 2001).



GTA=glicina transaminidasa; OTC=ornitna transcarbamilasa;
 ODC=ornitina descarboxilasa; OAT=ornitina aminotransferasa;
 NOS=óxido nítrico sintetasa; ARG=arginina; ORN=ornitina;
 ARGSUCC=ácido argnino succínico, CAP=carbamilfosfato;
 P5C=pirrolina-5-carboxilato; AdoMet=S-denosilmetionina;
 BH4=tetrahidrobiopterina; NO=óxido nítrico; CITRU=citrulina.

Manejo Clínico.

La terapéutica consiste en restricción de la ingesta de arginina proveniente de la proteína de la dieta (Kaiser-Kupfer 1980, Valle 1980). Una dieta baja en proteína puede disminuir la progresión de la enfermedad (Kaiser-Kupfer 2004 y Santinelli 2004), sin embargo, existen reportes contradictorios, en parte por la dificultad de evaluar las terapias para enfermedades raras y de lento progreso, así como la variabilidad genotípica y la edad de inicio del tratamiento (Kaiser-Kupfer 2002).

Se ha observado también la estimulación de la actividad residual de la AOT mediante la administración de dosis farmacológicas de piridoxal fosfato (500-1000 mg/día) (Shenoi 2001 y Bhaduri 2002).

Homocistinuria.

La homocistinuria clásica es la forma homocigota de la hiperhomocistinemia, es una enfermedad metabólica hereditaria de carácter autosómico recesivo, resultado de la deficiencia enzimática de la CBS (Matadamas 2003), su frecuencia en recién nacidos es de 1:200,000 (Matadamas 2003 y Refsum 2004) con una alta prevalencia en Irlanda y en Nuevo sur de Gales (Refsum 2004).

La homocistinuria se caracteriza por la elevación significativa en los niveles de homocisteína plasmática y urinaria (Lens 2004, Mudd 2001), esta elevación se da por el reciclamiento de la homocisteína a metionina través de la metionina sintasa (Aleman 2001), a nivel oftálmico provoca la oclusión de la arteria y vena retiniana, ocasionando visión borrosa o pérdida de la visión en forma súbita (Mudd 2001).

El bioindicador oftálmico característico de homocistinuria clásica es la dislocación del cristalino (Andria 2000, Refsum 2004, Mudd 2001) el 90% de los pacientes desarrollan esta patología (Poll-The 2003) la cual implica pérdida de la nitidez de las imágenes y miopía progresiva (Andria 2000, Refsum 2004, Mudd 2001).

Los primero reportes de pacientes con homocisteína en orina fueron reportados en 1962. Posteriormente en un espacio de 2 a 3 años, se descubrieron mas casos con las manifestaciones clínicas principales de la homocistinuria, y se demostró que la deficiencia de la enzima CBS (Mudd 2001).

Metabolismo de la homocisteína.

La homocisteína es un aminoácido azufrado no proteico y es el producto intermedio del metabolismo de la metionina y la cistina.

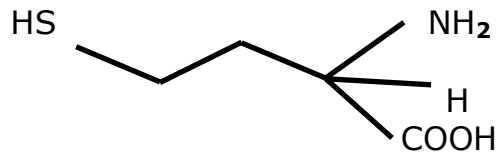


Figura 3. Molécula de la homocisteína H-S-CH₂-CH₂-CH-(NH₂) COOH

La homocisteína se sintetiza en el organismo a partir de la metionina. La metionina es la principal fuente de los iones sulfuro de las proteínas y aminoácido esencial precursor y componente de péptidos y proteínas, desempeña una importante función metabólica al participar en un sistema de transferencia de grupos metilos (Durand 2001).

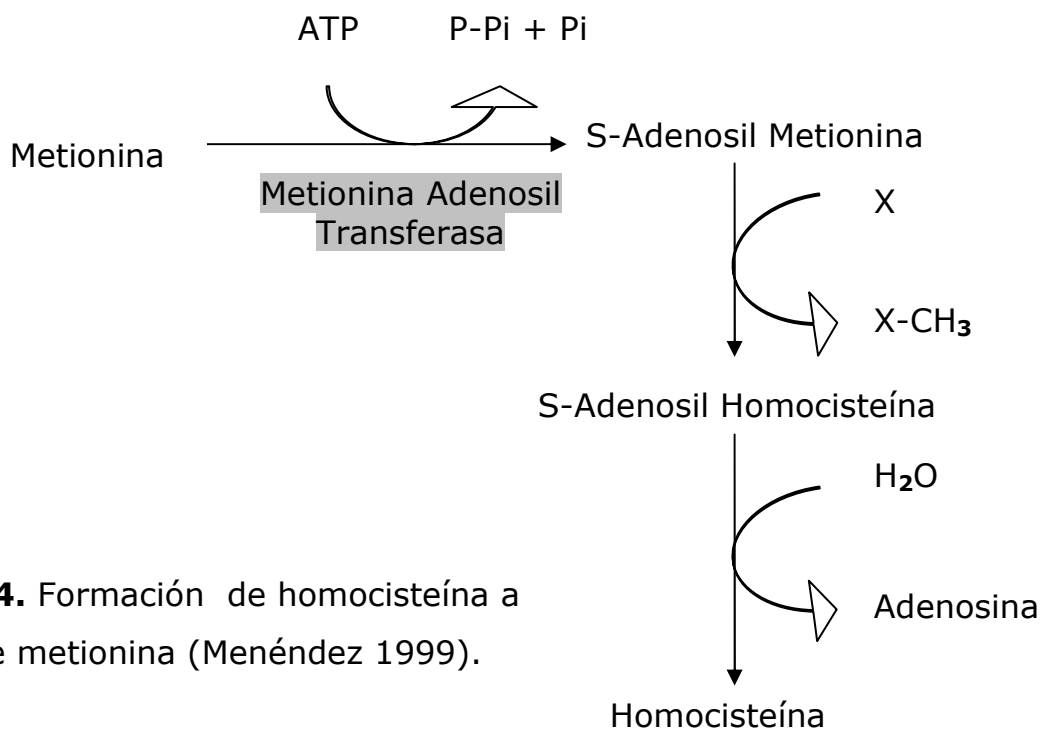


Figura 4. Formación de homocisteína a partir de metionina (Menéndez 1999).

La homocisteína formada es metabolizada por dos posibles vías: a) la vía de la transulfuración mediante la cual es catabolizada a cistationina y b) la vía de la remetilación en la cual es remetilada a metionina (Hoffer 2004).

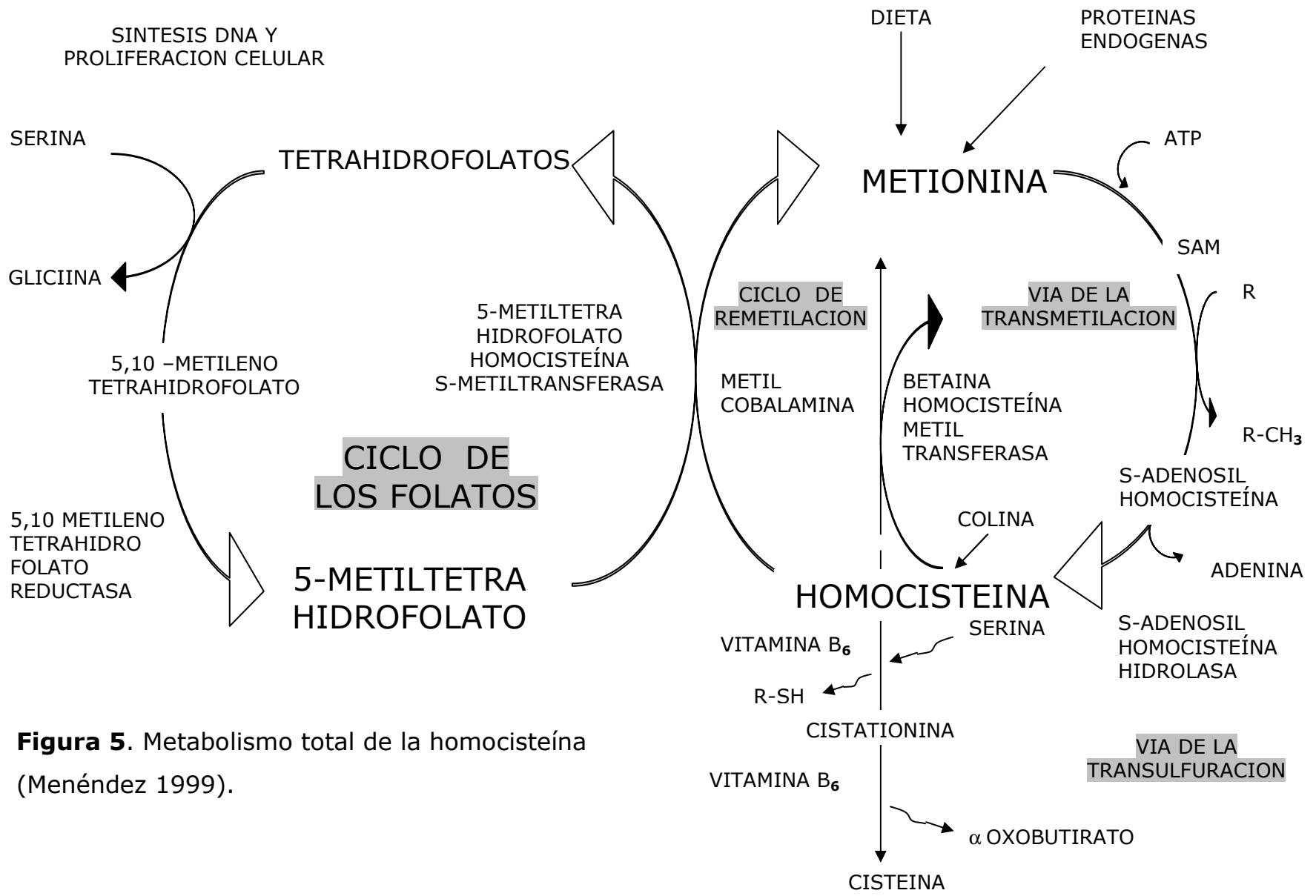


Figura 5. Metabolismo total de la homocisteína (Menéndez 1999).

En el metabolismo de la homocisteína la mayor alternativa de metilación es la condensación de esta con serina para formar cistationina. Esta reacción es catalizada por la CBS, una enzima dependiente piridoxal 5'-fosfato, que se expresa en fibroblasto de piel, hepatocitos y linfocitos (Mudd 2001).

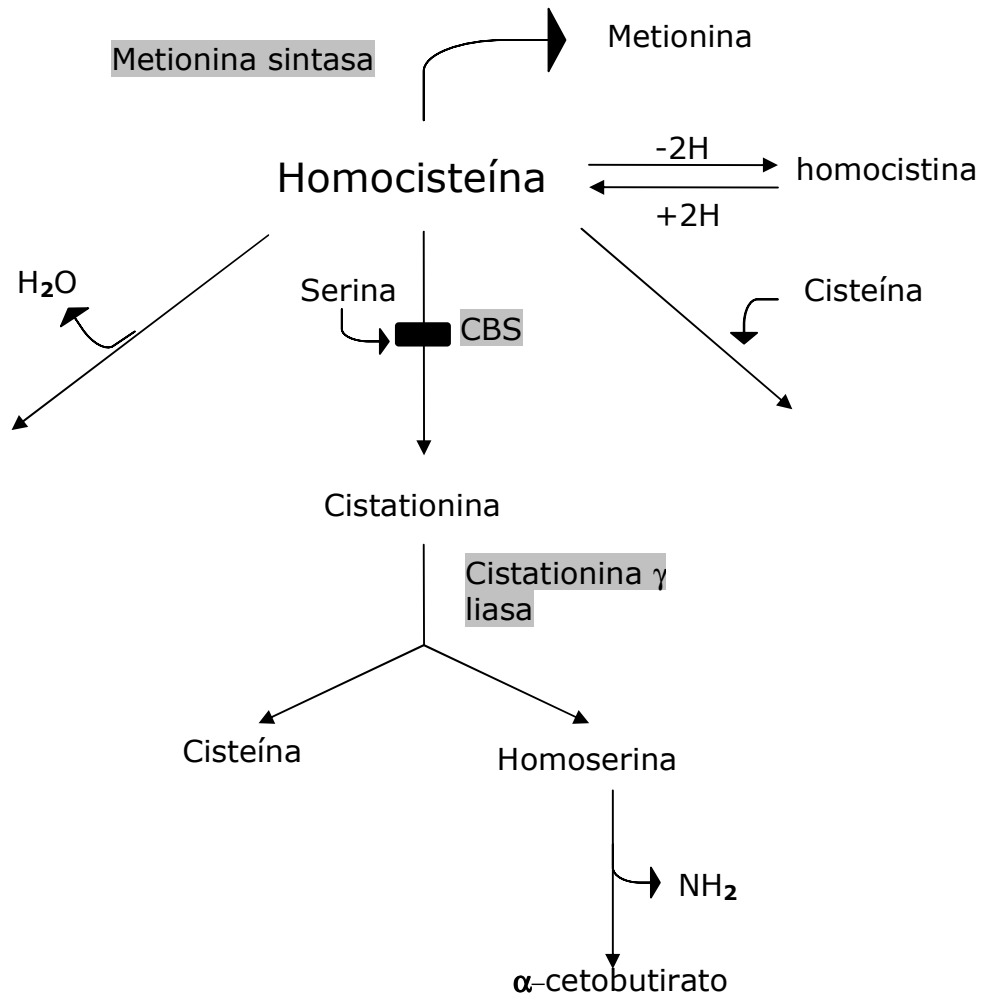


Figura 6. Bloqueo metabólico por la enzima CBS ██████

El gen de la CBS ha sido localizado en el cromosoma 21 (21q22.3) y se han descrito más de 60 mutaciones del gen. Las modificaciones más frecuentes son isoleucina por triptófano en la posición 278, y glicina por serina en la posición 307 (Matadamas 2003).

Defecto	Homocisteína	Metionina	Gen codificante
Deficiencia de CBS (homocistinuria clásica)	↑ ↑ ↑	↑ ↑ ↑	21 (mas de 60 mutaciones*)

(*sin sentido, deleciones e inserciones)

Manejo clínico.

La terapéutica homocistinuria consiste en una dieta restringida en cereales y proteína animal debido a su alto contenido de aminoácidos azufrados (Aleman 2001), lo que puede disminuir la progresión de la enfermedad, además de la suplementación de la dieta con altas dosis de piridoxina principalmente (Andria 2000 y Matadamas 2003) ya que se ha demostrado una asociación no lineal e inversa entre la concentración de homocisteína y este cofactor (Matadamas 2003). En 1967 Barber y Spaeth reportaron 3 pacientes con deficiencia de la CBS quienes respondieron a altas dosis de piridoxina (250-500 mg/día), lo que permitió que disminuyeran los niveles plasmáticos de metionina a niveles normales y virtualmente la desaparición de homocisteína en plasma y orina (Clayton 2006).

JUSTIFICACIÓN

La atrofia girata de corioide y retina, así como la homocistinuria clásica son EIM con implicaciones oftálmicas muy severas, los pacientes presentan problemas visuales a edades tempranas en ambos casos.

El diagnóstico de estas enfermedades se podría realizar a los neonatos mediante un tamiz neonatal ampliado, sin embargo este estudio no se aplica de manera rutinaria en nuestro país, por lo cual se desconoce su incidencia en la población. Estos pacientes generalmente son canalizados hasta que presentan manifestaciones clínicas que sugieren el padecimiento de la enfermedad.

Por lo expuesto anteriormente, es importante contar en México con las herramientas necesarias para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de estas enfermedades.

OBJETIVO GENERAL

- Utilizar biomarcadores como herramienta de diagnóstico en enfermedades metabólicas hereditarias con implicaciones oftálmicas.

OBJETIVO PARTICULAR

- Cuantificar las concentraciones ornitina y homocisteína en plasma de pacientes referidos a la Unidad de Genética de la Nutrición con problemas oftalmológicos que se sospecha tienen atrofia girata y homocistinuria clásica.

METODOLOGÍA

Población estudiada.

Pacientes remitidos a la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM que presentaron sospecha diagnóstica de atrofia girata y homocistinuria.

Espécimen.

El plasma de los pacientes mencionados en el párrafo anterior.

Equipo.

Los niveles plasmáticos de ornitina y homocisteína fueron cuantificados mediante un sistema HPLC marca Watters conformado por un módulo de separación modelo 2690, acoplado a un detector de fluorescencia modelo 474 scanning. Se utilizó el inyector automático modelo SM448M y para la separación se usó una columna Phenomenex, Kingsorb fase reversa C 18 de 15cm X 4.6cm de diámetro y 3 µm de diámetro de poro.

- Fase móvil.

Fase A: THF/ amortiguador de fosfatos 0.2892M/agua: 4%/5%/91%

Fase B: amortiguador de fosfatos 0.2892M/agua/ACN: 5%/40%/55%

- Disoluciones para la detección de ornitina.

Derivatizante: etanethiol/ OPA/metanol: 40µL/40mg/2mL

Solución sobresaturada de ácido bórico, pH 9.

Solución en metanol de p-fluorofenilalanina (estándar interno) 20µM.

- Reactivos para la medición de homocisteína.

Acido homocistéico (estándar interno) 0.372µM

Agente reductor: DTE 12µM (0.002g-0.003/1mL)

Ácido perclórico (HClO₄) 6% v/v en agua

Ácido iodoacético 50mM en HClO₄ 6%

Hidroxido de sodio (NaOH) 3M

Derivatizante: etanethiol/ OPA/metanol: 100µL/40mg/2mL

L- Homocistina

Procesamiento de las muestras para la cuantificación de la ornitina y la metionina.

Se tomaron 50 µL de las muestras, se les adicionó 1.0mL de metanol que contiene p-fluorofenilalanina a una concentración de 20µM, como estándar interno, se mezclaron mediante agitación con vórtex, se centrifugó por 5 minutos a 20000 rpm, se filtró y del sobrenadante se tomo una alícuota de 100µL a la cual se le adicionaron 20µL del amortiguador de boratos y 20µL del reactivo para derivatizar, se agito la mezcla y se inyectaron 10µL de ella al cromatógrafo.

Para la cuantificación de la ornitina se elaboró una curva estándar cuyas concentraciones fueron de 25, 285, 551, 958, 1220 y 1401µM.

Las condiciones del análisis fueron: temperatura de la columna 40°C, temperatura de la muestra 4°C, a una longitud de onda de excitación de 338nm y de emisión de 425nm, el gradiente de elusión se muestra en la siguiente tabla:

Tiempo (min)	%A	%B
Inicial	78	22
30	50	50
38	37	63
39	0	100
46	0	100
48	78	22

Procesamiento de las muestras para la cuantificación de la homocisteína.

Se tomaron 100µL de muestra, se les adicionaron 20µL del estándar interno y 20µL de DTE para la reducción de los puentes disulfuro, se

incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se adicionaron 300µL de ácido iodoacético en ácido perclórico para carboxilar la homocisteína y precipitar las proteínas presentes en la muestra. Las muestras fueron centrifugadas a 20000rpm/10min y el sobrenadante fue posteriormente filtrado. Se tomó una alícuota de 100µL del filtrado a la que se adicionaron 30µL de NaOH, la mezcla se agitó vigorosamente y se le añadieron 20µL del reactivo para derivatización (OPA), se agitó nuevamente y se inyectaron 10µL de la mezcla al cromatógrafo.

Se elaboró una curva estándar de homocisteína cuyas concentraciones fueron de 7, 15, 77, 96, 155, 193 y 232 µM. Las condiciones del análisis fueron las siguientes:

Las condiciones del análisis fueron: temperatura de la columna 40°C, temperatura de la muestra 4°C, a una longitud de onda de excitación de 338nm y de emisión de 425nm, el gradiente de elusión se muestra en la siguiente tabla:

Tiempo (min)	%A	%B
Inicial	78	22
7.0	70	30
7.5	0	100
13	0	100
14	78	22

RESULTADOS

Atrofia girata.

Se confirmó el diagnóstico de atrofia girata en cinco pacientes, todas de sexo femenino. El promedio de edad al momento del diagnóstico fue de 21 años con un intervalo de 9 a 36 años. Solo en un caso se documentó consanguinidad.

Los datos de la curva obtenidos para la cuantificación de ornitina son los siguientes:

Ecuación de la curva $y = 465.26x + 1,964.32$

Coefficiente de correlación $R^2 = 0.99956$

El promedio de la concentración de ornitina al momento del diagnóstico fue de $416\mu\text{M}$ (valores de referencia de la UGN, $21-48\mu\text{M}$). Los valores individuales se muestran en la tabla 1. Observándose elevaciones que van de 5 a 12 veces con respecto al valor máximo de referencia.

Tabla 1. Concentración de ornitina plasmática al momento del diagnóstico.

Paciente	Concentración de ornitina (μM)	Veces alterada con respecto al valor de referencia máximo
1	306	5
2	617	12
3	401	7
4	277	5
5	480	9

Todas las pacientes después de dar el diagnóstico bioquímico se sometieron a tratamiento con piridoxina $500\text{mg}/\text{día}$, se les realizaron cuantificaciones subsecuentes para el monitoreo bioquímico y evaluación de la respuesta al tratamiento (tabla 2 y gráfica 1), las

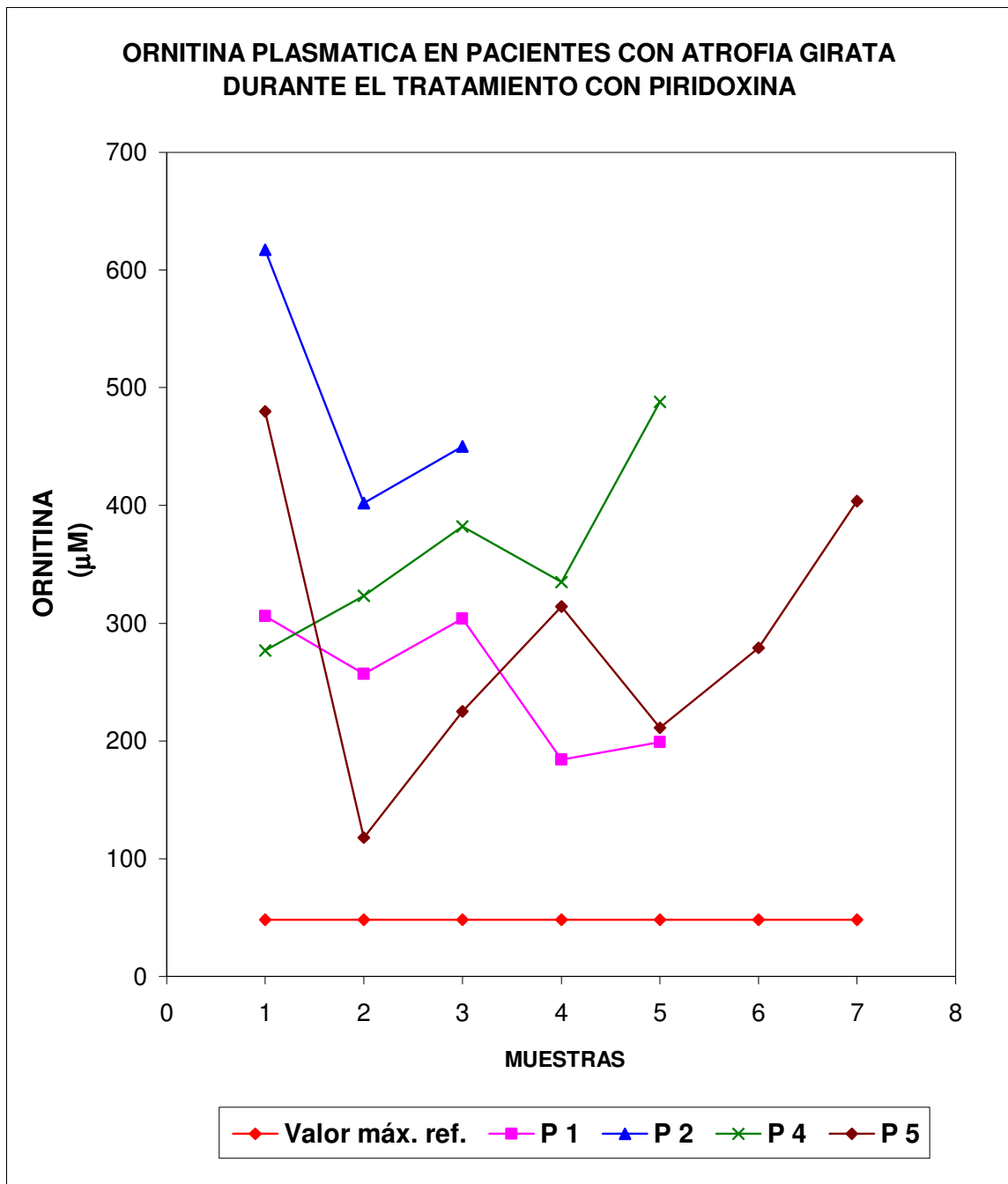
pacientes 1, 2 y 3, iniciaron además un tratamiento nutricional además del tratamiento con piridoxina. La paciente tres no regreso a seguimiento.

Tabla 2. Concentración subsecuentes de ornitina plasmática de pacientes con atrofia girata.

Paciente	Ornitina μM	Veces elevada
1 US	306*	5
	257	5
	304	6
	184	4
	199	4
2 PI	617*	12
	402	8
	450	9
4 ML	277*	5
	323	7
	382	8
	335	7
	488	10
5 OL	480*	9
	118	3
	225	5
	314	7
	211	4
	279	6
	404	8

*Valores de ornitina plasmática al diagnóstico.

Grafica 1. Perfil de las concentraciones plasmáticas de ornitina en las pacientes diagnósticas con atrofia girata.



En la gráfica 1 observamos que existe respuesta bioquímica variable al tratamiento con piridoxina así como al tratamiento nutricional.

Homocistinuria.

Mediante la cuantificación de los niveles de homocisteína y metionina se confirmó el diagnóstico de homocistinuria clásica en 8 pacientes

(en seis familias 2 pares de hermanos), 3 del sexo masculino y 5 del sexo femenino. El promedio de edad al momento del diagnóstico fue de 8 años con un intervalo de 5 a 11 años.

Los datos de la curva obtenidos para la cuantificación de homocisteína son los siguientes:

Ecuación de la curva **$y=526.59X+1950.8$**

Coefficiente de correlación **$R^2 = 0.9956$**

El promedio de la concentración de homocisteína al momento del diagnóstico fue de 56 μ M (valor de referencia ND-12 μ M, Bremer 1981).

Los valores individuales se muestran en la tabla 3. Observándose elevaciones que van de 2 a 5 veces con respecto al valor máximo de referencia.

Tabla 3. Concentración plasmática de homocisteína en pacientes con homocistinuria.

Pacientes	Concentración μ M muestras	Veces Alteradas
1	72	5
2	63	4
3	58	4
4	52	3
5	38	2
6	67	5
7	37	2
8	60	4

El promedio de la concentración de metionina al momento del diagnóstico fue de 550 μ M (valores de referencia 9-42 μ M, Bremer 1981).

Los valores individuales se muestran en la tabla 3. Observándose elevaciones que van de 3 a 22 veces con respecto al valor máximo de referencia.

Tabla 4. Concentración plasmática de metionina de pacientes con homocistinuria.

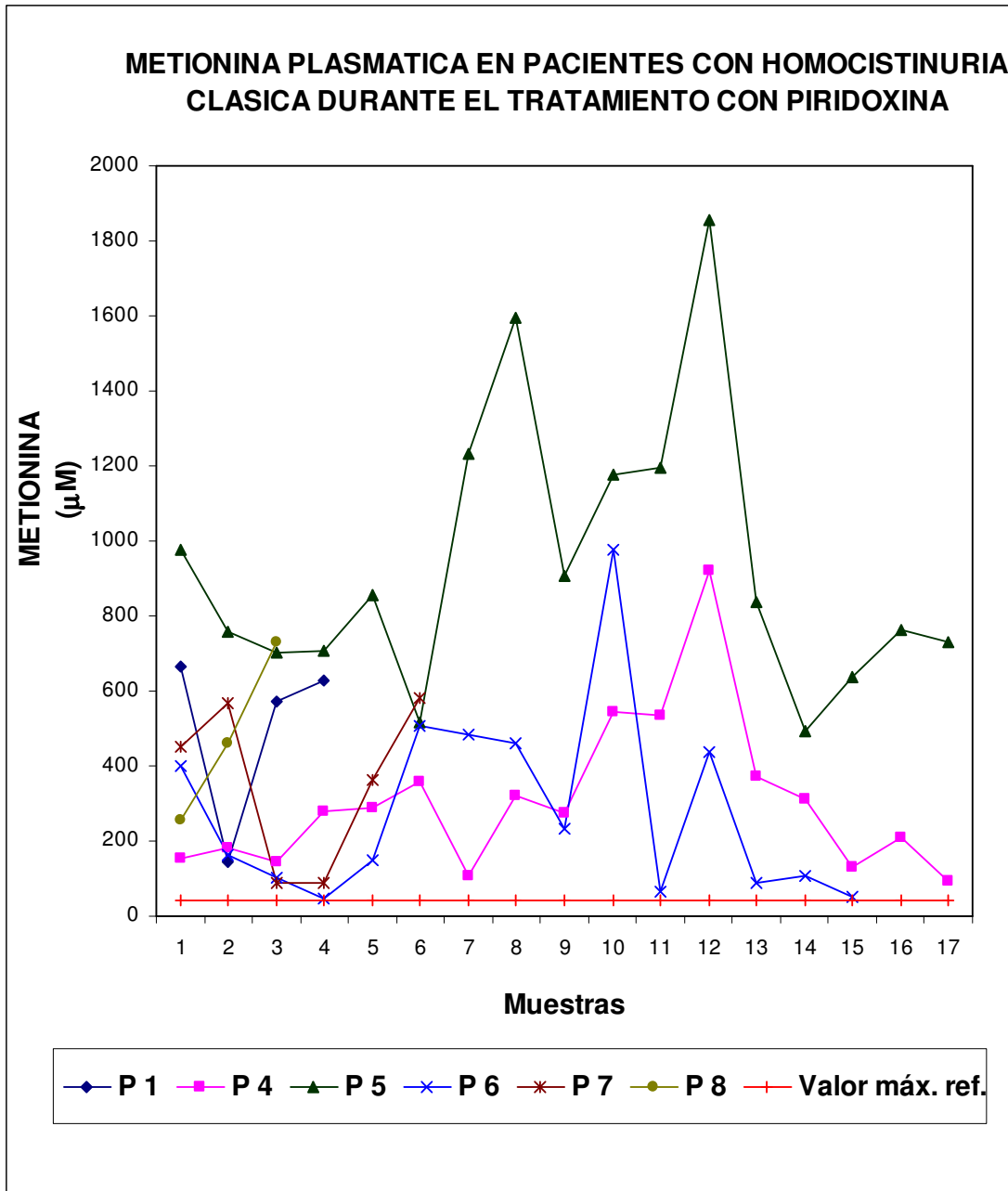
Pacientes	Metionina μM	Veces Alteradas
1	667	15
2	562	12
3	933	21
4	155	3
5	977	22
6	399	9
7	450	10
8	254	5

Todos los pacientes se sometieron a tratamiento con piridoxina, después de dar el diagnóstico bioquímico 500 mg/día, los pacientes 1, 4, 5, 6, 7 y 8, iniciaron además un tratamiento nutricional y se les realizaron cuantificaciones subsecuentes para el monitoreo bioquímico y evaluación de la respuesta al tratamiento (tabla 5 y grafica 2).

Tabla 5. Seguimiento de concentración plasmática de metionina en pacientes con homocistinuria.

Pacientes	Edad al momento del diagnóstico (años)	Concentración μM	Veces alterada
1	5	667* 142 570 627	15 2 13 14
4	11	155* 180 144 281 289 357 105 319 276 544 535 920 372 312 130 211 92	3 3 2 6 6 8 2 7 6 12 12 21 8 6 2 4 1
5	9	977* 760 704 709 857 517 1234 1595 905 1175 1194 1857 838 492 637 764 730	22 17 16 16 19 11 28 37 21 27 27 43 19 11 14 17 16
6	8	399* 161 103 47 150 508 484 460 233 977 66 439 87 106 51	9 3 1 0 3 11 11 10 5 22 1 9 1 2 0
7	9	450* 568 90 90 361 580	10 13 1 1 8 13
8	6	254* 460 732	5 10 16

Grafica 2. Concentraciones plasmáticas de metionina en los pacientes diagnosticados con homocistinuria clásica durante el tratamiento con piridoxina.



En la gráfica 2 observamos que la respuesta bioquímica al tratamiento con piridoxina y nutricional es irregular e inconsistente.

DISCUSIÓN

Atrofia girata.

En el presente estudio describimos 5 casos de pacientes que nos fueron remitidas por el servicio de oftalmología de diferentes instituciones, en los que se diagnosticó atrofia girata en base a los hallazgos oftalmológicos y bioquímicos. Es interesante hacer notar el hecho de que la cohorte de pacientes está conformada únicamente por mujeres a pesar de ser una enfermedad autosómica recesiva como fue demostrado por Barrett et al., 1987 y más recientemente en el 2004 por Kaiser-Kupfer et al.

La atrofia girata es una enfermedad potencialmente tratable, la identificación temprana de la enfermedad es deseable y crucial para el diagnóstico de la misma, por lo cual es necesario que oftalmólogos y pediatras tengan conocimiento claro de esta enfermedad. El proceso de diagnóstico debe incluir genetistas, neurólogos y otras especialidades para el adecuado manejo y prevención de la pérdida visual futura (Lee et al., 2005).

La atrofia girata clínicamente se caracteriza por la degeneración corioretinal progresiva, la pérdida gradual de la visión, la disminución del campo visual (Kaiser-Kupfer et al., 2002, Ohkubo et al., 2005), en la primera década de la vida se observa miopía y decremento en la visión nocturna, (Takki 1974) mismas que fueron referidas por todas nuestras pacientes.

A la paciente 1, quien tiene un seguimiento de 7 años, se le diagnosticó osteoporosis a la edad de 16 años. Ahmet y Serdar recientemente reportaron un caso semejante sugiriendo que es importante considerar la osteoporosis como uno de los hallazgos clínicos de la atrofia girata para iniciar el tratamiento de forma

temprana y evitar posibles complicaciones. Esta paciente presenta además debilidad muscular, misma que ha sido reportada como otras anormalidades presentes en estos pacientes (Ahmet y Serdar 2006).

La marca bioquímica en la presentación típica de la atrofia girata es una notable elevación de la ornitina plasmática (Shih y Stöcker-Ipsiroglu 2000), la concentración de ornitina se incrementa de 10 a 15 veces sobre el nivel normal en todos los líquidos biológicos (Santinelli et al., 2004), en la cohorte estudiada encontramos diferencias en las concentraciones de ornitina plasmática al momento del diagnóstico que van de 5 a 12 veces por encima del valor máximo de referencia, estas diferencias se pueden deber a diversos factores tales como la edad, la dieta y/o la actividad enzimática residual (Valle y Simell 2001 y Kaiser-Kupfer et al., 2002 y 2004). Existen casos reportados de neonatos en los que los niveles de ornitina plasmática se encuentran normales o disminuidos y estos pacientes presentaron como principal característica hiperamonemia neonatal (Cleary et al., 2005, Champion et al., 2002, Webster et al., 1999), sin embargo en nuestro grupo no se documentan estos problemas al nacimiento.

La diferencia en la concentración de ornitina plasmática y la progresión de los síntomas clínicos en pacientes con atrofia girata que siguen un mismo tratamiento depende tanto del apego al mismo, como de la actividad enzimática residual de la OAT, la cual varía dependiendo de la presencia de diferentes mutaciones (Santinelli et al., 2004 y Heianen et al., 1998). Las pacientes 1 y 2 tenían 9 años de edad al momento del diagnóstico, ambas se sometieron a tratamiento con suplementación de piridoxina, y fórmula médica Cyclinex (A_I), además de dieta hipoproteica, sin embargo la paciente 2 registró una concentración de ornitina plasmática visiblemente mayor que la paciente 1 en el mismo lapso de tiempo, esto podría

explicarse por diferencia en la actividad enzimática residual de la OAT, o bien el apego a la dieta.

Se han empleado varias terapias en AG tales como el uso de piridoxal fosfato el cual disminuye los niveles de ornitina en el plasma y la progresión de los hallazgos oftálmicos, sin embargo, son pocos los pacientes que responden al tratamiento (Bakker et al., 1991, Wirtz y Kennaway 1985, Kennaway et al., 1980). Una estricta dieta baja en proteína a demostrado ser eficiente para la disminución de las concentraciones plasmáticas de ornitina (Santinelli et al., 2004, Kaiser-Kupfer et al., 2002 y 2004), sin embargo, esto requiere una marcada alteración de la dieta normal, motivo por el cual únicamente una pequeña fracción de pacientes (cerca del 20%) son capaces de seguir este tratamiento (Wang 2000). En nuestro grupo solo la paciente 1 continua con un apego adecuado a la dieta, también es importante señalar que los alimentos especiales son costosos y difíciles de obtener a esto también podría atribuirse la falta de apego.

Se han empleado tratamientos alternos para la reducción de la concentración plasmática de ornitina, como el uso de suplemento alimenticio que contiene creatina (Vannas-Sulonen et al., 1985) y lisina (Peltola et al., 2000, Elpeleg y Norman 2001) en los que se ha observado una disminución de un 20 a 30% del nivel de ornitina, estos enfoques no tienen un seguimiento a largo plazo y no fueron empleados en ninguna de nuestras pacientes.

La piridoxina se administra en dosis farmacológicas para estimular la actividad residual de la OAT pero en pocos pacientes se ha reportado disminución importante de los niveles de ornitina plasmática (Hayasaka et al., 1981, Kennaway et al., 1980, Ohkubo et al., 2005), las pacientes 4 y 5 se trataron únicamente con piridoxina y no siguieron un tratamiento dietético. La paciente 4 no mostró disminución en la concentración plasmática de la ornitina, lo cual

indica que no respondió al tratamiento suministrado. La paciente 5 mostró una disminución visible de la concentración plasmática de ornitina registrada al momento del diagnóstico con respecto a la siguiente cuantificación, sin embargo los monitoreos subsecuentes mostraron un incremento lo que sugiere que la paciente no respondió al tratamiento con piridoxina ó probablemente dejo de seguirlo.

La paciente 1 tuvo buen apego al tratamiento dietético y los resultados de sus cuantificaciones de ornitina plasmática nos permiten observar la efectividad en la disminución de los niveles plasmáticos de ornitina, sin embargo las lesiones oculares han aumentado ligeramente. La eficiencia de este enfoque es controversial, algunos investigadores reportan una disminución en la progresión de las lesiones corioretinales (Kaiser-Kupfer et al., 1991), mientras otros reportan progresión (Vannas et al., 1978). La edad al tiempo del diagnóstico y por lo tanto la del inicio del tratamiento y el apego a la dieta podría al menos parcialmente explicar estos hallazgos diferentes, pero la heterogeneidad genética parece jugar un papel importante en la variabilidad fenotípica (Wirtz y Kennaway 1985).

Muchos de los pacientes con atrofia girata no tiene un diagnóstico correcto hasta la segunda o tercera década de vida (Kaiser-Kupfer et al., 2004, Ohkubo et al., 2005). Las pacientes 3, 4 y 5 fueron diagnosticadas a los 19, 25 y 36 años respectivamente, en donde se observa la progresión de los problemas oftálmicos y la aparición de nuevos. Este intervalo de tiempo que pasa entre la edad a la que iniciaron los problemas oftalmológicos versus la edad al momento de diagnóstico nos habla de la falta de conocimiento de estas enfermedades por parte del médico de primer contacto (pediatra oftalmólogo).

Homocistinuria.

La deficiencia de la enzima CBS origina una alteración en la vía de la transulfuración lo que da como resultado la acumulación plasmática de homocisteína y el reciclamiento de la homocisteína a metionina través de la metionina sintasa (Alemanes et al., 2001), por ello es que el diagnóstico bioquímico en nuestros pacientes fue mediante la cuantificación de homocisteína y metionina plasmática.

Las manifestaciones clínicas incluyen, alteraciones esqueléticas, retraso mental, tromboembolismo y aterosclerosis prematura grave (Matadazas et al., 2002). El bioindicador oftálmico característico es la dislocación del cristalino (Mudd et al., 2001, Refsum et al., 2004), manifestación clínica que presentaron todos los pacientes de este estudio, y en base a la sospecha clínica de homocistinuria se realizó diagnóstico bioquímico.

En la población de estudio tuvimos 2 casos de hermanos, los pacientes 2 y 3 (de 5 y 7 años de edad al diagnóstico respectivamente) y las pacientes 4 y 5 (de 11 y 9 años de edad al diagnóstico). En ningún caso de las 6 familias estudiadas se documento consanguinidad.

De los pacientes 2 y 3 las muestras fueron referidas al laboratorio por sospecha de homocistinuria, estos fueron diagnosticados por nuestro servicio pero no tratados, por lo que no se tiene mayor información.

Los otros 6 pacientes después de dar diagnóstico bioquímico se sometieron a tratamiento con piridoxina e iniciaron tratamiento nutricional.

La terapéutica para estos pacientes consistió básicamente en una suplementación con altas dosis de piridoxina (500 mg/día) y fórmula médica Hominex (A_{II}), además de una dieta restringida en cereales y proteína animal. La piridoxina ha mostrado una asociación no lineal e inversa entre la concentración de homocisteína (Matadamas et al., 2003) y los alimentos que se restringen en la dieta los cuales son los principales proveedores de metionina (Aleman 2001). Con el tratamiento se espera la disminución en la concentración plasmática de estos metabolitos y por lo tanto un retraso en la progresión de la enfermedad, sin embargo, los resultados del monitoreo bioquímico en los pacientes estudiados presentan en general, un comportamiento errático (tabla 5 y grafica 2), lo que sugiere que no hubo apego al tratamiento.

En los pacientes 1, 5 y 6 se observó inicialmente una respuesta satisfactoria al tratamiento, en la primera cuantificación de seguimiento, sin embargo, posteriormente se pierde esta tendencia ya que comienzan las fluctuaciones de manera aleatoria. Por el contrario los pacientes 4, 7 y 8 mostraron un incremento en la concentración de metionina plasmática lo que sugiere que desde el inicio no hubo apego al tratamiento.

En general los valores de metionina plasmática en los pacientes durante le seguimiento, mostraron un comportamiento inconsistente, lo que sugiere un apego inadecuado al tratamiento. Es importante señalar que la mayoría de los pacientes, al momento del diagnóstico mostraban retraso mental, lo que dificulta el apego al tratamiento.

La progresión de estas enfermedades es lenta, los pequeños cambios de la función ocular son difíciles de medir y por ello a su vez dificulta la evaluación objetiva de la enfermedad y la terapia de la misma, es por ello que los biomarcadores son útiles en el diagnóstico o

pronóstico de estas enfermedades, ya que debido a su alta especificidad y sensibilidad nos permiten medir los cambios en las concentraciones plasmáticas de los metabolitos como la ornitina en la atrofia girata y la homocisteína en la homocistinuria clásica.

CONCLUSIONES

- La cuantificación de los biomarcadores ornitina y homocisteína, resultó ser una herramienta fundamental en el diagnóstico bioquímico de la atrofia girata y la homocistinuria congénita.
- Los pacientes con atrofia girata presentaron valores de ornitina plasmática de 277 μ M a 617 μ M, estos valores van de 5 a 12 veces por encima del valor máximo normal de referencia.
- Los pacientes con homocistinuria clásica presentaron valores de homocisteína plasmática de 37 μ M a 72 μ M, estos valores van de 2 a 5 veces por encima del valor máximo normal de referencia; en tanto que los valores plasmáticos de metionina fueron de 155 μ M a 977 μ M, valores que van de 3 a 22 veces por encima del valor máximo normal de referencia.

RECOMENDACIONES

- La edad al diagnóstico de estas enfermedades es determinante en la progresión de las manifestaciones clínicas de las mismas, por lo cual, es necesario que se establezca en México un modelo de atención integral para los EIM, mismo que vaya desde el tamiz neonatal ampliado hasta el seguimiento a largo plazo y el consejo genético familiar.
- Desarrollar estudios enzimáticos y moleculares para estas enfermedades, nos permitiría conocer las características genéticas y bioquímicas de la población mexicana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta BP and Yannicelli S. The Ross Metabolic Formula System Nutrition Support protocols. Laboratorios Abbott. 2001; 379-85, 402.
2. Ahmet I and Serdar KS. Osteoporosis Associated with Gyrate Atrophy: a Case Report. Doc Ophthalmol. 2006.
3. Aleman G, Tovar RA and Torre N. Metabolismo de la homocisteína y riesgo de enfermedades cardiovasculares. Importancia del estado nutrición en ácido fólico, vitaminas B6 y B12. Rev Inv Clín. 2001; 53: 141-151.
4. Andria G, Fowler B and Sebastio G. Disorders of sulfur amino acid metabolism. In Fernandes J, Saudubray JM, Berghe GVD. Inborn Metabolic Disease: Diagnosis and Treatment. Springer-Verlag; Berlin. 2000; 18:225-29.
5. Bakker HD, Abeling NGGM, Schooneveld MJV, Wanders RJA and Gennio AHV. A far advanced case of gyrate atrophy in a 12 year old girl. J. Inher. Metab. Dis. 1999; 14: 379-81.
6. Barrett DJ, Bateman JB, Sparkes RS, Mohandas T, Klisak I and Inana G. Chromosomal localization of human ornithine aminotransferase gene sequences to 10q26 and Xp11.2. Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 1987; 28:1037-42.
7. Bhaduri G. Gyrate atrophy of choroid and retina. J Indian Med Assoc. 2002;100:196-7.
8. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther. 2001; 69: 89-95.

9. Bremer HJ, Duran M, Kamerling JP, Przyrembel H and Wadman SK. Disturbances of Amino Acid Metabolism: Clinical chemistry and diagnosis. Urban and Schwarzenberg Baltimore. 1981; 94, 305-6.
10. Champion MP, Bird S, Fensom T and Dalton RN. Ornithine aminotransferase deficiency (gyrate atrophy) presenting with hyperammonaemic encephalopathy. J Inher Metab Dis. 2002; 25: 29.
11. Clayton PT. B(6)-responsive disorders: A model of vitamin dependency. J Inher Metab Dis. 2006; 29:317-26.
12. Cleary MA, Dorland L, Koning TJ, Poll-The BT, Duran M, Mandell R, Shih VE, Berger R, Olpin SE and Belsey GTN. Ornithine aminotransferase deficiency: Diagnostic difficulties in neonatal presentation. J Inher Metab Dis. 2005; 28:673-679.
13. Costa T and Scriver B. Childs. The effects of mendelian disease on human health: a measurement. Am J Med Genet. 1985; 21: 231-42.
14. Durand P, Prost M, Loreau N, Loussier-Cacan S and Blache D. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. Lab Inv. 2001; 81: 645-672.
15. Elpeleg ON and Korman SH. Short Report: sustained oral lysine supplementation in ornithine δ -aminotransferase deficiency. J Inher Metab Dis. 2001; 24: 423-424.
16. Fernandes J, Saudubray JM, Berghe GVD. Inborn Metabolic Disease: Diagnosis and Treatment. Springer-Verlag; Berlin. 2000; 18:224.
17. Hayasaka S, Saito T, Nakajima H, Takaku Y, Shiono T, Mizuno K, Ohmura K and Tada K. Gyrate atrophy with hyperornithinaemia:

different types of responsiveness to vitamin B₆. Br. J. Ophthalmol. 1981; 65: 478-83.

18. Heianen K, Nanto-Salonen K, Leino L, Pulkki K, Heinonen O, Valle D and Simell O. Gyrate atrophy of the choroid and retina: Lymphocyte ornithine δ -aminotransferase activity in different mutations and carriers. Pediatr Res. 1998; 44: 381-385.

19. Hoffer L.J. Homocysteine remethylation and trans-sulfuration. Lady Davis Institute for Medical Research Montreal, Jewish General Hospital and Faculty of Medicine, McGill University. 2004.

20. Huizing M, Brook BP and Anikster Y. Optic atrophies in metabolic disorders. Molecular Genetics and Metabolism. 2005; 86: 51-60.

21. Ibarra González Isabel Cristina. Extracción y cuantificación por HPLC de aminoácidos en muestra de sangre total colectada en papel filtro. Tesis Facultad de Química UNAM. 2001.

22. Kaiser-Kupfer MI, Caruso RI C, Valle D and Reed GF. Use of an arginine restricted diet to slow progression of visual loss in patients with gyrate atrophy. Arch ophthalmol. 2004; 122: 982-84.

23. Kaiser-Kupfer MI, Caruso RC and Valle D. Gyrate atrophy of choroid and retina: further experience with long term reduction of ornithine levels in children. Arch ophthalmol. 2002; 120: 146-53.

24. Kaiser-Kupfer MI, Caruso RC and Valle D. Gyrate atrophy of choroid and retina: long term reduction of ornithine slows retinal degeneration. Arch ophthalmol. 1991; 109: 1539-48.

25. Kennaway NG, Weleber RG and Buist NRM. Gyrate atrophy of the choroid and retina with hyperornithinemia: biochemical and histologic studies and response to vitamin B₆. Am. J. Hum. Genet. 1980; 32: 529-541.

26. Lee AG, Chau FY, Golnik KC, Kardon RH and Wall M. the diagnosis yield of the evaluation for isolated unexplained optic atrophy. *Ophthalmology*. 2005; 112: 757-59.
27. Lens D. Patogenia de la hiperhomocistinemia. Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay. 2004; 42-45.
28. Lewin DA and Weiner MP. Molecular biomarkers in drug development. *DDT*. 2004; 9: 976-983.
29. Matadamas ZC, Pérez CE, Hernández JJ and Majluf CA. Nuevos factores de riesgo cardiovascular: hiperhomocistinemia. *Rev Med IMSS*. 2003; 41: 253-249.
30. Melancon MJ. Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. *Handbook of ecotoxicology*. In Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA, Cairns J Jr, Boca R Jr. (FL) CRC Press. 1995; 220-239.
31. Menéndez C y Fernández-Britto RJE. Metabolismo de la homocisteína y su relación con la aterosclerosis. *Rev Cubana Invest Biomed. Trabajos de Revisión Instituto Superior de Ciencias Médicas de Camagüey*. 1999; 18: 155-168.
32. Mudd S H, Levy C H and Kraus P J. Disorders of transulfuration. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Mc Graw Hill; New York. 2001; 88: 2016-2017, 2024.
33. Mulvihill A, Yap S, O'Keefe M, Howard PM, Naughten ER. Ocular findings among patients with late-diagnosed or poorly controlled homocystinuria compared with a screened, well-controlled population. *J American Ass Pediatr Ophthalmol and Strabismus*. 2001; 5:311-15.

34. Ohkubo Y, Ueta A, Ito T, Sumi S, Yamada M, Ozawa K and Togari H. Vitamin B₆-Responsive Ornithine Aminostransferase Deficiency with a novel mutación G237D. *Tohoku J. Exp. Med.* 2005; 205, 335-342.
35. Peltola K, Heinonen OJ, Nanto Salonen K, Pulkki K, Simell O. Oral lysine feeding in gyrate atrophy with hyperornithinemia a pilot study. *J Inherit Metab Dis.* 2000; 23: 305-7.
36. Poll-The BT, Wenniger-Prick LJMB, Barth PG and Duran M. The eye as a window to inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2003; 26: 229-44.
37. Ramírez Díaz Leticia. Determinación de homocisteína total en plasma, aplicación clínica. Tesis Facultad de Química UNAM. 2001.
38. Refsum H, Smith DA, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, Johnston C, Engbaek F, Scheede J, McPartlin C, Scott MJ. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: An expert opinion. *Clinical Chemistry.* 2004; 50: 8-32.
39. Santinelli R, Costagliola C, Tolone C, D'Alola A, D'Avanzo A, Prisco F and Guidice E M. Low protein diet and progression of retinal degeneration in gyrate atrophy of choroid and retina: A twenty-six-year follow-up. *J Inherit Metab Dis.* 2004; 27: 187-96.
40. Shenoi A, LN, Christopher R. Case reports: Hyperornithinemia Associated with Gyrate Atrophy of the choroid and retina in a child with myopia. *Indian Pediatr.* 2001; 38: 914-918.
41. Shih EV and Stöckler-Ipsiroglu S. Disorders of ornithine and creatine metabolism. In Fernandes J, Saudubray JM, Berghe G Van

Den. Inborn Metabolic Disease: Diagnosis and Treatment. Springer-Verlag; Berlin. 2000; 19: 233-36.

42. Sipila I, Simell O, Rapola J, Sainio K and Tuuteri L. Gyrate atrophy of the choroid and retina with hyperornithinemia: tubular aggregates and type 2 fiber atrophy in muscle. *Neurology*. 29: 996-1005, 1979.

43. Takki K. Gyrate atrophy of coroid and retina associated with hiperonithinaemia. *Br J Ophthalmol*. 1974; 58: 3-23.

44. Valle M D and Simell O. The hiperornithinemias. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill. 2001; 83: 1857-95.

45. Valle D and Simell O. The hyperornithinemias. In Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL and Brown MS. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill. 1983; 382-401.

46. Valle D, Walser M and Brusilow SW. Gyrate atrophy of the choroid and retina: amino acid metabolism and correction of hyperornithinemia with an arginine-deficient diet. *J. Clin. Invest*. 1980; 65: 371-378,.

47. Valle D, Kaiser-Kupfer, MI and Del Valle LA. Gyrate atrophy of the choroid and retina: deficiency of ornithine aminotransferase in transformed lymphocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 1977; 74: 5159-61.

48. Vannas A, Setala K, Ruusuvaara P. Corneal endothelial changes with epinephrine therapy. *Arch Ophthalmol*. 1978;96:543.

49. Vannas-Sulonen K, Sipila I, Vannas A, Simell O and Rapola J. Gyrate atrophy of the choroid and retina: A five year follo up of creatine supplementation. *Ophthalmology*. 1985; 92:1719-27.

50. Wang T, Steel G, Milam AH and Valle D. Correction of ornithine accumulation prevents retinal degeneration in a mouse model of gyrate atrophy of the choroid and retina. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2000; 97: 1224-29.
51. Webster M, Allen J, Rawlinson D, Brown A, Olpin S and Leonard JV . Ornithine aminotransferase deficiency presenting with hyperammonaemia in a premature newborn. *J Inherit Metab Dis.* 1999 ; 22: 80.
52. Wirtz MK and Kennaway NG. Heterogeneity and complementation analysis of fibroblasts from vitamin B₆ Responsive and non responsive patients with gyrate atrophy of the choroid and retina. *J Inherit Metab Dis.* 1985; 8: 71-4.

Apéndice I (A₁)

TABLE 22-4. Nutrient Composition of CYCLINEX®-1^{1,3} and CYCLINEX®-2^{2,3}

Nutrient	Cyclinex-1		Cyclinex-2	
	(per 100 g pwd)	(per g protein equiv)	(per 100 g pwd)	(per g protein equiv)
Energy, kcal	510	68	440	32
Protein equiv, g	7.50	1.000	15.00	1.000
Nitrogen, g	1.20	0.160	2.40	0.160
Amino acids, g	9.65	1.287	19.30	1.287
Cystine, g	0.30	0.040	0.60	0.040
Histidine, g	0.36	0.048	0.72	0.048
Isoleucine, g	1.28	0.170	2.56	0.170
Leucine, g	2.17	0.289	4.34	0.289
Lysine, g	1.11	0.148	2.22	0.148
Methionine, g	0.34	0.045	0.68	0.045
Phenylalanine, g	0.75	0.100	1.50	0.100
Threonine, g	0.75	0.100	1.50	0.100
Tryptophan, g	0.28	0.037	0.56	0.037
Tyrosine, g	0.88	0.117	1.76	0.117
Valine, g	1.43	0.190	2.86	0.190
Other Nitrogen-Containing Compounds				
L-Carnitine, mg	190	25.00	370	24.67
Taurine, mg	40	5.3	60	4.00
Carbohydrate, g	57.0	7.60	45.0	3.00
Fat, g	24.6	3.28	17.0	1.13
Linoleic acid, g	2.00	0.266	1.82	0.121
α-Linolenic acid, g	0.41	0.055	0.28	0.019
Minerals				
Calcium, mg	650	86	1,150	77
Chloride, mg/mEq	390/11.00	52.0/1.47	1,325/37.37	88.3/2.49
Chromium, µg	12	1.60	37	2.47
Copper, mg	1.25	0.167	1.30	0.09
Iodine, µg	80	10.67	150	10
Iron, mg	10.0	1.33	17.0	1.13
Magnesium, mg	55	7.3	300	20.0
Manganese, mg	0.50	0.067	1.00	0.07
Molybdenum, µg	13	1.73	40	2.67
Phosphorus, mg	455	60	1,020	68
Potassium, mg/mEq	760/19.44	101/2.59	1,800/46.03	120/3.07
Selenium, µg	25	3.33	37	2.47
Sodium, mg/mEq	215/9.35	28.7/1.25	1,175/51.11	78.3/3.41
Zinc, mg	9.5	1.27	17.0	1.13
Vitamins				
A, µg RE	480	64	908	61
D, µg	7.50	1.00	8.12	0.54
E, mg α-TE	11.40	1.52	16.11	1.10
K, µg	60	8.0	70	4.67
Ascorbic acid, mg	60	8	75	5
Biotin, µg	75	10	150	10
B ₆ , mg	0.85	0.113	1.75	0.12
B ₁₂ , µg	5.60	0.750	7.30	0.487
Choline, mg	100	13.3	130	8.7
Folate, µg	250	33.00	530	35.33
Inositol, mg	50	6.7	110	7.3
Niacin equiv, mg	16.70	2.23	30.3	2.02
Pantothenic acid, mg	7.80	1.040	10.90	0.726
Riboflavin, mg	1.0	0.133	2.4	0.160
Thiamin, mg	2.0	0.267	4.0	0.267

¹ Designed for infants and toddlers. ² Designed for children, adolescents, and adults.

³ Approximate packed weight of Cyclinex-1 and Cyclinex-2 in level, dry US standard household measures:

	Cyclinex-1	Cyclinex-2
1 Tbsp	8 g	8 g
1/4 cup	26 g	32 g
1/3 cup	35 g	41 g
1/2 cup	53 g	61 g
1 cup	105 g	117 g

Apéndice II (AII)

TABLE 8-4. Nutrient Composition of HOMINEX®-1^{1,3} and HOMINEX®-2^{2,3}

Nutrient	Hominex-1 ⁴		Hominex-2	
	(per 100 g pwd)	(per g protein equiv)	(per 100 g pwd)	(per g protein equiv)
Energy, kcal	480	32	410	13.7
Protein equiv, g	15.00	1.000	30.00	1.000
Nitrogen, g	2.40	0.160	4.80	0.160
Amino acids, g	17.67	1.178	35.34	1.178
Cystine, g	0.45	0.030	0.90	0.030
Histidine, g	0.42	0.028	0.84	0.028
Isoleucine, g	1.08	0.072	2.16	0.072
Leucine, g	1.68	0.112	3.36	0.112
Lysine, g	1.00	0.067	2.00	0.067
Methionine, g	trace	0	trace	0
Phenylalanine, g	0.88	0.059	1.76	0.059
Threonine, g	0.70	0.047	1.40	0.047
Tryptophan, g	0.17	0.011	0.34	0.011
Tyrosine, g	0.89	0.059	1.78	0.059
Valine, g	1.22	0.081	2.44	0.081
Other Nitrogen-Containing Compounds				
Carnitine, mg	20	1.33	40	1.33
Taurine, mg	40	2.67	50	1.67
Carbohydrate, g	53.0	3.53	35	1.17
Fat, g	21.7	1.45	14	0.47
Linoleic acid, g	2.00 ⁴	0.133	1.50 ⁵	0.050
α -Linolenic acid, g	0.36 ⁶	0.024	0.17 ⁷	0.006
Minerals				
Calcium, mg	575	38	880	29
Chloride, mg/mEq	435/12.27	29.0/0.82	1,160/32.72	38.7/1.09
Chromium, μ g	11	0.73	27	0.90
Copper, mg	1.10	0.073	1.00	0.033
Iodine, μ g	65	4.33	100	3.33
Iron, mg	9.0	0.60	13	0.43
Magnesium, mg	50	3.33	225	7.50
Manganese, mg	0.50	0.033	0.80	0.027
Molybdenum, μ g	12	0.80	30	1.00
Phosphorus, mg	400	27	760	25
Potassium, mg/mEq	675/17.26	45/1.15	1,370/35.04	45.7/1.17
Selenium, μ g	20	1.33	35	1.17
Sodium, mg/mEq	190/8.26	12.7/0.55	880/38.28	29.3/1.28
Zinc, mg	8.0	0.53	13	0.43
Vitamins				
A, μ g RE	420	28	680	22
D, μ g	7.50	0.50	7.50	0.25
E, mg α -TE	10.10	0.67	12.10	0.40
K, μ g	50	3.33	60	2.00
Ascorbic acid, mg	50	3.33	60	2.00
Biotin, μ g	65	4.33	100	3.33
B ₆ , mg	0.75	0.050	1.30	0.043
B ₁₂ , μ g	4.90	0.327	5.00	0.167
Choline, mg	80	5.33	100	3.33
Folate, μ g	230	15	450	15
Inositol, mg	40	2.67	70	2.33
Niacin equiv, mg	12.80	0.850	21.7	0.72
Pantothenic acid, mg	6.90	0.460	8.00	0.267
Riboflavin, mg	0.90	0.060	1.80	0.060
Thiamin, mg	1.90	0.127	3.25	0.108

¹ Designed for infants and toddlers. ² Designed for children, adolescents, and adults.

³ Approximate packed weight of Hominex in level, dry US standard household measures:

	Hominex-1	Hominex-2
1 tbsp =	7 g	8 g
1/4 cup =	26 g	32 g
1/3 cup =	35 g	41 g
1/2 cup =	53 g	61 g
1 cup =	105 g	117 g

⁴ Analytical data at manufacture = 4.32 g/100 g powder. ⁵ Analytical data at manufacture = 2.66 g/100 g powder.

⁶ Analytical data at manufacture = 0.40 g/100 g powder. ⁷ Analytical data at manufacture = 0.28 g/100 g powder.