



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS
Y DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS Y MUTACIONES DEL GEN DE LA ENZIMA
CISTATIONINA BETA SINTASA EN POBLACIONES MEXICANAS Y SU
ASOCIACIÓN CON HIPERHOMOCISTEINEMIA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:
ERIKA CORIA RAMIREZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ABRAHAM SALVADOR MAJLUF CRUZ
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS
Y DE LA SALUD

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:
DRA. MARIA DEL CARMEN MARTINEZ GARCIA
UNIDAD DE INVESTIGACION. HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FEDERICO
GOMEZ

DR. RAMON MAURICIO CORAL VAZQUEZ
CENTRO MEDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE, ISSSTE

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD DE MEXICO

FEBRERO DE 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE

| | |
|--|----|
| ABREVIATURAS..... | 4 |
| RESUMEN..... | 5 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 7 |
| Hiperhomocistinemia..... | 7 |
| Gen de la enzima cistationina- β -sintasa..... | 13 |
| 2. JUSTIFICACION..... | 21 |
| 3. PREGUNTAS DE INVESTIGACION..... | 22 |
| 4. HIPOTESIS..... | 22 |
| 5. OBJETIVOS..... | 22 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 23 |
| A. Universo de trabajo..... | 23 |
| B. Tipo de estudio..... | 23 |
| C.1. Criterios de inclusión..... | 23 |
| C.2. Criterios de no inclusión..... | 23 |
| C.3. Criterios de exclusión..... | 23 |
| D. Selección de la muestra..... | 23 |
| E. Descripción de variables..... | 24 |
| F. Definición de las variables..... | 24 |
| G. Grupos de estudio..... | 24 |
| H. Procedimiento..... | 25 |
| I. Análisis estadístico..... | 28 |
| 7. CONSIDERACIONES ÉTICAS..... | 28 |
| 8. FINANCIAMIENTO..... | 29 |
| 9. RESULTADOS..... | 30 |
| 10. DISCUSION..... | 41 |
| 11. CONCLUSIONES..... | 43 |
| 12. BIBLIOGRAFIA..... | 44 |
| 13. ANEXOS..... | 47 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| CBS | Cistationina- β -sintasa |
| COM | Carga oral de metionina |
| DE | Desviación estándar |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DTE | Ditioetritol |
| EOR | Especies reactivas de oxígeno |
| Hcy | Homocisteína |
| HHC | Hiperhomocistinemia |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta resolución |
| LDL | Lipoproteínas de baja densidad |
| Lp (a) | Lipoproteína (a) |
| MS | Metionina sintasa |
| MTHF | Metiltetrahidrofolato |
| MTHFR | Metiltetrahidrofolato reductasa |
| OPA | O-ftaldialdehído |
| PC | Proteína C |
| PS | Proteína S |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SAM | S-adenosil metionina |
| THcy | Homocisteína total |
| VNTR | Repetidos en tándem de número variable |

RESUMEN

Título

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS Y MUTACIONES DEL GEN DE LA ENZIMA CISTATIONINA BETA SINTASA EN POBLACIONES MEXICANAS Y SU ASOCIACIÓN CON HIPERHOMOCISTEINEMIA

Marco teórico

La enfermedad vascular trombótica constituye la principal causa de morbimortalidad en la mayor parte del mundo. La hiperhomocistinemia (HHC) ha recibido gran atención ya que es un factor de riesgo independiente para aterosclerosis y tromboembolismo venoso. La elevación moderada de homocisteína (Hcy) en el plasma se presenta en 5 a 7% de la población general. Para la evaluación de los niveles de Hcy se debe realizar su medición en ayuno y después de administrar una carga oral de metionina (COM). En nuestra población existe una alta prevalencia de hiperhomocistinemia postCOM, lo cual, sugiere que el metabolismo a nivel de la vía de la transulfuración se encuentra alterado pudiendo ser debido a mutaciones en la enzima cistationina-beta-sintasa (CBS). Debido a que la influencia genética en la HHC pos-COM se desconoce, es necesario realizar estudios genéticos para identificar si existe algún polimorfismo que genere una proteína CBS anormal en población mexicana que pudiera incrementar el riesgo cardiovascular. Ya que las poblaciones de mestizos mexicanos son heterogéneas genéticamente y, considerando el rol de los polimorfismos en la susceptibilidad genética a las enfermedades cardiovasculares se vuelve necesario la realización de estudios poblacionales para cuantificar los efectos de determinadas mutaciones en los niveles de Hcy.

Objetivos

- Determinar la frecuencia del VNTR de 31 pares de bases en el gen la enzima CBS en individuos mestizos mexicanos.
- Determinar la frecuencia del VNTR de 31 pares de bases en el gen la enzima CBS en individuos indígenas.
- Determinar la asociación entre el VNTR de 31 pares de bases en el gen de la enzima CBS con HHC postCOM en individuos mestizos mexicanos.

Material y métodos:

Se trata de un estudio observacional, transversal, analítico. En la población de sujetos mestizos-mexicanos sanos se determinaron las concentraciones de Hcy en ayuno y postCOM, vitamina B12 y ácido fólico. Se amplificó mediante PCR el repetido de 31 pares de bases (VNTR) en el gen de la enzima CBS y posteriormente se analizó por secuenciación. La información genética obtenida se comparó con un grupo de 90 sujetos indígenas. Se realizó análisis de distribución de genotipo para la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg y χ^2 para comparar las frecuencias de alelo y genotipo. Se realizó análisis de regresión lineal para establecer asociación entre las diferentes variables con la concentración de Hcy. Un valor de *P* menor a 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

Resultados:

Se incluyeron 189 sujetos mestizos mexicanos. La edad promedio de este grupo fue de 46.3 años con un rango de 18 a 90 años. La concentración de Hcy en ayuno fue de 11.66 $\mu\text{mol/L}$ (DE 11.86) y postCOM 38.38 $\mu\text{mol/L}$ (DE 24.42). La concentración de vitamina B12 y ácido fólico se encontró dentro de los valores normales y no se asoció con la concentración de Hcy. Se observó una correlación positiva entre la edad y la concentración de Hcy tanto en ayuno como postCOM pero el género no mostró asociación. Al realizar los estudios genéticos se observó que el VNTR de 31bp posee de 17 a 26 repetidos. En la población mestiza el VNTR de 22 repetidos en estado homocigoto fue el más prevalente

(66.7%) así como en la población indígena (78.9%). No se encontraron diferencias en la frecuencia de genotipo en ambas poblaciones. El VNTR de 31bp no se asoció con los niveles de Hcy en ayuno o postCOM.

Conclusiones:

La hiperhomocistinemia tanto en ayuno como postCOM es un factor de riesgo demostrado para aterotrombosis. La población mestizo mexicana presenta concentraciones elevadas de Hcy postCOM que pueden ser explicadas por el VNTR de 31bp de la enzima CBS de 22 repetidos en más del 60% de la población, este polimorfismo podría ocasionar una proteína anormal ocasionando HHC e incremento en el riesgo cardiovascular observado en nuestra población.

1. INTRODUCCION

Hiperhomocisteinemia (HHC).

La enfermedad vascular trombótica constituye la principal causa de morbimortalidad en la mayor parte del mundo y nuestro país no es la excepción. En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento y prevención de los factores de riesgo cardiovascular tradicionales: hiperlipidemia, tabaquismo, diabetes mellitus, hipertensión arterial e inactividad física. Sin embargo, sabemos ahora que no son suficientes para explicar la alta prevalencia de enfermedad vascular ya que hasta 25% de los pacientes con enfermedad vascular prematura no tiene factores de riesgo bien establecidos (1). En 1996, la 27 Conferencia Bethesda enlistó nuevos factores de riesgo cardiovascular: hipertrofia ventricular izquierda, aumento de lipoproteína (a) (Lp(a)), hipertrigliceridemia, hiperfibrinogenemia e hiperhomocisteinemia (HHC) (1,2). La HHC ha recibido gran atención recientemente ya que es un factor de riesgo independiente para aterosclerosis y tromboembolismo venoso (3,4,5,6,7). La elevación moderada de homocisteína (Hcy) en el plasma se presenta en 5 a 7% de la población general (8).

La Hcy es un aminoácido sulfurado que se sintetiza a partir de la metionina, única fuente en el humano. La metionina es indispensable en la síntesis de proteínas, la formación de adenosilmetionina, la síntesis de Hcy y el producto final de su catabolismo es la formación de cisteína. Metabólicamente, la Hcy es importante en el reciclamiento del folato intracelular, el catabolismo de colina, betaína y en la formación de cistationina y cisteína (9,10). Aproximadamente, 70% de la Hcy plasmática circula unida a residuos de cisteína de las proteínas, principalmente albúmina. La fracción no unida (30% de la Hcy total) es susceptible de oxidación a pH fisiológico y puede formar un homodímero (Hcy-Hcy) conocida como homocistina, o bien reaccionar con otros tioles, principalmente cisteína, para formar cisteína-Hcy, un heterodímero. Una pequeña cantidad circula como disulfuro con proteína (Hcy-proteína). Existen menos de 3 $\mu\text{mol/L}$ de Hcy en forma reducida libre en plasma (9). Hcy es un término genérico que se utiliza para referirse a todas las especies de homocisteína; la suma de las formas libre y unida a proteínas se refiere como Hcy total (tHcy) (11,12).

La Hcy se forma de la metionina teniendo como intermediarios a la S-adenosilmetionina y a la S-adenosil-Hcy que se forman en presencia de la metionina adenosiltransferasa y de Hcy-metiltransferasa, respectivamente. La hidrólisis de S-adenosil-Hcy catalizada por la S-adenosilhomocistina-hidrolasa libera adenosina y produce finalmente Hcy (13-15). La Hcy no está presente en la dieta y sólo pequeñas

cantidades se liberan de los tejidos al plasma; la excreción urinaria de Hcy es de 3.5-9.8 $\mu\text{mol}/\text{día}$ y está limitada debido a su unión a proteínas plasmáticas y a su alta reabsorción renal (15,16).

La Hcy tiene dos rutas metabólicas, la remetilación y la transulfuración (Figura 1). La primera regenera metionina y la segunda forma cisteína. En situaciones de balance negativo de metionina, la Hcy se metaboliza por remetilación para conservar metionina. En la mayoría de los tejidos, la Hcy es remetilada por la enzima metionina-sintasa (MS), dependiente de vitamina B12 como cofactor y N-5-metiltetrahidrofolato (MTHF) como co-sustrato y donador de grupos metilo. Esta vía requiere folato y de la enzima metileno-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Alternativamente, el grupo metilo puede ser donado por betaína que deriva de la colina la cual, a su vez, se obtiene de la dieta o se sintetiza en el organismo. Esta reacción está confinada al hígado y es independiente de vitamina B12; la enzima que cataliza esta reacción es la betaína-Hcy metil transferasa que se encuentra en hígado y riñón (15,17,10,18).

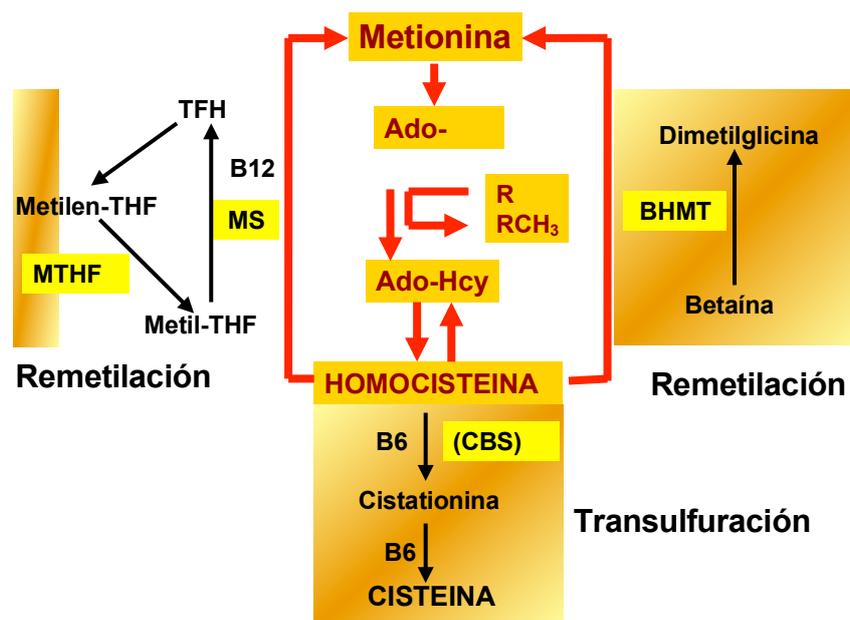


Figura 1. Metabolismo de la Hcy.

La vía de la transulfuración (Figura 1) se activa en situaciones en las que existe un exceso de metionina o cuando sus depósitos son adecuados; la Hcy se condensa con serina para formar cistationina, reacción irreversible catalizada por la enzima cistationina-B-sintasa (CBS), la cual requiere vitamina B6 como cofactor. Las enzimas de esta vía están en hígado, riñón, intestino delgado y páncreas siendo los únicos sitios donde se completa la

transulfuración (9). Además de sintetizar cisteína, la vía de la transulfuración es útil para catabolizar efectivamente el exceso de Hcy que no se requiere para transferir grupos metilo. Las alteraciones genéticas o adquiridas en cualquiera de las enzimas de las dos vías antes mencionadas o las deficiencias nutricionales de sus cofactores aumentan la Hcy plasmática, la dieta hipoproteica incrementa la remetilación y disminuye la transulfuración para conservar metionina. La concentración de S-adenosilmetionina regula la remetilación para conservar grupos metilo en forma de metionina o para incrementar la transulfuración que forma cisteína cuando no se necesitan grupos metilo. El consumo continuo de betaína disminuye el nivel plasmático de Hcy ya que incrementa la remetilación de la Hcy y su transulfuración subsiguiente (15,19,20).

Debido a un mecanismo excretor celular de Hcy, el plasma contiene sólo concentraciones pequeñas de Hcy (promedio 10 $\mu\text{mol/L}$). El mecanismo excretor complementa el catabolismo de la Hcy mediante la transulfuración manteniendo baja la concentración intracelular de Hcy citotóxica. En la HHC, la Hcy está elevada y, si exceptuamos la insuficiencia renal, su presencia indica que su metabolismo está alterado. El mecanismo excretor coloca a la Hcy en la sangre, de tal forma que limita la toxicidad intracelular pero aumenta la posibilidad de daño vascular por el efecto deletéreo de la HHC (21).

La Hcy se mide en plasma o suero por diferentes métodos, incluyendo polarización de fluorescencia, radioinmunoensayo, cromatografía de gas con espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y análisis de aminoácidos. La Hcy se mide tanto en ayuno como después de una carga oral de metionina (COM). Éste método es sensible para determinar alteraciones de la transulfuración, por deficiencia de vitamina B6 o deficiencia parcial de CBS. La Hcy post-COM se mide luego de administrar una dosis estándar de metionina (100 mg/Kg de peso corporal) para luego obtener sangre en intervalos diversos (de 2 a 8 horas). Si el metabolismo de la Hcy está intacto la tHcy aumentará (un promedio de 20 $\mu\text{mol/L}$), y regresará a los valores basales o de ayuno en un lapso de varias horas. Una COM es anormal cuando la Hcy plasmática es $>2\text{DE}$ arriba del valor basal (10,22-24).

Aunque la prueba post-COM tiene la desventaja de que no se conocen claramente sus límites de referencia estándar, ayuda a discriminar alteraciones de la transulfuración o remetilación; identifica pacientes con un metabolismo de Hcy alterado a pesar de tener una determinación basal en ayuno normal y que, por lo tanto, tienen un riesgo mayor para enfermedad vascular (24-26). La prueba post-COM puede identificar $>50\%$ de los sujetos con HHC por lo que es el método más sensible para detectar HHC moderada (27).

La concentración plasmática o sérica de Hcy se expresa en $\mu\text{mol/L}$ y varía con la raza, edad y sexo. El promedio de Hcy basal para hombres y mujeres adultos sanos es 10 y 11 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente. Sin embargo, el intervalo “normal” en la población sana va de 5 a 12 $\mu\text{mol/L}$. No hay consenso en la definición de HHC y existen diferencias sustanciales en los valores de referencia. El límite superior (percentil 95) de la población sana va de 15 a 16 $\mu\text{mol/L}$; sin embargo, la distribución de la concentración de Hcy sigue una distribución normal en ciertas poblaciones por lo que la definición de HHC en base a percentiles no siempre es apropiada (24). Así, la HHC usualmente se define usando 2DE arriba del valor promedio de la población normal. La HHC se define en las categorías leve (16 a 30 $\mu\text{mol/L}$); moderada (31 a 100 $\mu\text{mol/L}$) y grave (>100 $\mu\text{mol/L}$) (28,29,5). Su prevalencia depende del criterio utilizado; por ejemplo, con los criterios arriba mencionados es posible que hasta 5% de la población normal presente HHC (30,31).

En la tercera encuesta nacional de salud y nutrición de Estados Unidos se determinó que el sexo y la edad son los determinantes principales de las concentraciones de Hcy, reportándose que el valor promedio de Hcy plasmática en ayuno en hombres es de 10.5 $\mu\text{mol/L}$ (IC 95% de 10.2 a 10.9) y en mujeres de 10.3 $\mu\text{mol/L}$ (IC 95% de 10.0 a 10.7). En dicho estudio no se realizó COM para conocer los valores de Hcy postCOM en la población (32).

En un estudio realizado en Colombia los valores de Hcy en ayuno obtenidos en población sana fueron 10.1 (DE 2.3) y 10.9 (DE 2.6) $\mu\text{mol/L}$ para mujeres y hombres respectivamente; la Hcy obtenida 4 hrs postCOM fue 28 (DE 7.0) y 32.4 (DE 8.6) $\mu\text{mol/L}$ en mujeres y hombres respectivamente (33).

En otro estudio realizado en sujetos italianos se reportaron los valores normales de Hcy en ayuno así como postCOM para dicha población. Los valores de Hcy de acuerdo al percentil 97.5 se encontraron de la siguiente manera: en hombres menores de 45 años la Hcy en ayuno se determinó de 19.63 $\mu\text{mol/L}$ (IC 90% 16.5-22.9) y postCOM 40.1 $\mu\text{mol/L}$ (IC 90% 32.3-48.5); en hombres mayores de 45 años la Hcy en ayuno se determinó de 28.38 $\mu\text{mol/L}$ (IC 90% 22.39-35.38) y postCOM 36.48 $\mu\text{mol/L}$ (IC 90% 30.6-43.05); en mujeres menores de 45 años la Hcy en ayuno se determinó de 14.26 $\mu\text{mol/L}$ (IC 90% 12.29-16.11) y postCOM 28.31 $\mu\text{mol/L}$ (IC 90% 23.99-33.06); en mujeres mayores de 45 años la Hcy en ayuno se determinó de 22.49 $\mu\text{mol/L}$ (IC 90% 16.22-30.90) y postCOM 44.06 $\mu\text{mol/L}$ (IC 90% 31.26-50.70) (34).

En sujetos mexicanos sanos se determinó que el promedio de las concentración de Hcy en ayuno es de 7.92 $\mu\text{mol/L}$ y postCOM de 46.09 $\mu\text{mol/L}$, observándose que hasta el 60% de la población presenta HHC postCOM en comparación con el 4% de HHC en ayuno, lo que sugiere una alteración a nivel de la vía de la transulfuración del metabolismo de la Hcy (Majluf et al. estudio enviado a publicación).

Causas de HHC.

La HHC es el resultado metabólico de la interacción entre factores genéticos, dietarios y hormonales (Tabla 3):

Tabla 3. Causas de hiperhomocisteinemia.

| Padecimientos asociados |
|--|
| 1. Deficiencias y mutaciones enzimáticas Cistationina B-sintasa (CBS) Metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) Metionina sintasa |
| 2. Mutaciones en la vía de la vitamina B12 (cobalamina) |
| 3. Deficiencias nutricionales: Ácido fólico, vitamina B12, vitamina B6 |
| 4. - Enfermedades crónicas: Insuficiencia renal crónica Lupus eritematoso sistémico Hipotiroidismo Diabetes Mellitus Enfermedad Intestinal Inflamatoria Neoplasias Psoriasis |
| 5. Medicamentos: Anticonvulsivantes (hidantoína, carbamazepina) Hipolipemiantes (colestiramina, colestipol, ácido nicotínico) Metotrexate Teofilina Ciclosporina |
| 6. Dieta hiperproteica (aumento en consumo de metionina) |
| 7. - Reactante de fase aguda |

La asociación entre deficiencia nutricional e HHC es particularmente importante por la prevalencia de la primera en nuestra población y porque explica una buena parte de casos con HHC leve (hasta 60% de los casos). Además, permite establecer un tratamiento preventivo para la enfermedad vascular a bajo costo. Existe una asociación no lineal e inversa entre la concentración de Hcy con la de folato plasmático así como con la ingesta de esta vitamina. Existe una asociación inversa más débil con la

concentración de vitamina B12 y fosfato de piridoxal plasmáticos y con la ingesta de vitamina B6 pero no con la B12 (35). La Hcy en ayuno está elevada en >95% de las personas deficientes de ácido fólico y vitamina B12 (36-38).

La deficiencia de vitamina B6 se asocia primariamente con HHC post-COM. Los niveles plasmáticos bajos de folato y vitamina B12 se presentan en 60% de los pacientes con HHC. La mayoría de las HHC son atribuibles a niveles séricos bajos de folatos ya que esta deficiencia es más frecuente que la de vitamina B12 (38).

Mecanismos de daño vascular en la HHC.

El mecanismo probable de lesión vascular por la HHC es todo un tema de investigación. El endotelio ha recibido considerable atención como punto final de la lesión provocada por la HHC. Se sugiere que la trombogenicidad de la HHC reside en la modificación de la resistencia endotelial a la trombosis por varios mecanismos a los que siguen la activación plaquetaria y la formación de trombos. Entre estos mecanismos están la inducción de estrés oxidativo (que aumenta la expresión de factor tisular endotelial), el aumento en la producción de tromboxano por las plaquetas y la promoción del efecto antifibrinolítico de la Lp(a) (39,5).

Se sugiere que el daño endotelial se asocia a deterioro de la matriz extracelular por activación directa de la metaloproteínasa-2 por el grupo tiol de la Hcy (35). Otro mecanismo es que la Hcy acelera la aterosclerosis al incrementar los niveles de S-adenosilHcy, un inhibidor potente de la metiltransferasa en el endotelio lo cual inhibe la síntesis de DNA en las células endoteliales lo que detiene su crecimiento en la fase G1 del ciclo celular. Esto es, porque la Hcy disminuye la carboximetilación de p21-ras, un regulador de la fase G1, cuya actividad es regulada por metilación (15). Así, pareciera que el daño endotelial es secundario a las características químicas del grupo tiol (R-SH) de la Hcy, el cual se oxida para formar disulfuros (RSSR), en este proceso, el grupo tiol reacciona con el ión superóxido (O_2^-) en presencia de iones cobre, lo que produce peróxido de hidrógeno (“especies de oxígeno reactivas”), el cual promueve la peroxidación de lípidos, además, el grupo tiol reacciona con su propio grupo carbonilo en el carboxilo terminal para formar Hcy-tiolactona, la forma ciclizada altamente reactiva de la Hcy. La tiolactona homocisteiniliza diversas proteínas en condiciones fisiológicas; una de estas proteínas es la apoproteína B de las LDL, la cual tiene un papel fundamental en la aterogénesis ya que forma agregados que son captados por los macrófagos en la íntima arterial para formar células espumosas, placas fibrolipídicas, trombos y el desarrollo global de placas ateroscleróticas (15,40,41). El daño producido por la HHC involucra diversos

factores del sistema de coagulación y se apoya en la teoría clásica de la aterotrombosis: el problema iniciaría con la formación de radicales libres de oxígeno que producen daño vascular oxidativo, proliferación de músculo liso, alteración estructural y funcional endotelial y aumento de la trombogenicidad que finalmente conduce a aterotrombosis (Tabla 4).

Tabla 4. Patogénesis del daño vascular inducido por Hcy.

| |
|---|
| 1. Disfunción endotelial |
| Producción disminuida de óxido nítrico (ON) |
| Aumento en la producción de especies de oxígeno reactivas |
| Aumento del factor von Willebrand y trombomodulina |
| Aumento en la producción de factor tisular |
| Disminución en la producción de antitrombina (AT) |
| Engrosamiento de la íntima |
| 2. Estrés oxidativo |
| Producción aumentada de EOR |
| Disminución de la actividad antioxidante del plasma. |
| Aumento en la peroxidación de los lípidos |
| 3. Células del músculo liso vascular |
| Aumento en la proliferación |
| Aumento en la formación de células espumosas |
| 4. Lipoproteínas de baja densidad |
| Tiolación |
| Aumento en la peroxidación de los lípidos |
| Aumento en la captación de LDL por los macrófagos |
| 5. Vías hemostáticas |
| Aumento en la producción de tromboxano A ₂ por las plaquetas |
| Aumento en la actividad de los factores V y X |
| Aumento en el fibrinógeno plasmático |
| Inhibición de la activación de la PC |

ENZIMA CISTATIONINA BETA SINTASA (CBS)

La HHC moderada puede ser causada por defectos genéticos. Los genes de las enzimas MTHFR, MS y CBS juegan un rol importante en el metabolismo de la Hcy. La causa genética principal de HHC ha sido atribuida a mutaciones de la enzima MTHFR, reportándose a la variante termolábil C677T como el polimorfismo más comúnmente asociado con HHC (42,43).

Sin embargo, la enzima más frecuentemente afectada en el trastorno conocido como homocistinuria es la CBS (homocistinuria clásica), de la cual se han descrito más de 100 mutaciones que en estado heterocigoto pueden ocasionar HHC moderada (44,45).

El gen de la CBS humana.

El locus de la CBS humana fue mapeado en el cromosoma 21 a través de un estudio en híbridos de células hámster-humanas. Esta asignación se corroboró por estudios de hibridización *in situ* usando una sonda de DNA para la CBS. Este gen se localiza de manera más precisa en la región subtelomérica de la banda 21q22.3 del cromosoma 21 (46). El gen completo de la CBS fue clonado y secuenciado en 1998, reportando que 28,046 nucleótidos conformaban en su totalidad al gen de la CBS así como una secuencia de 5 kpb en el extremo 5' (47).

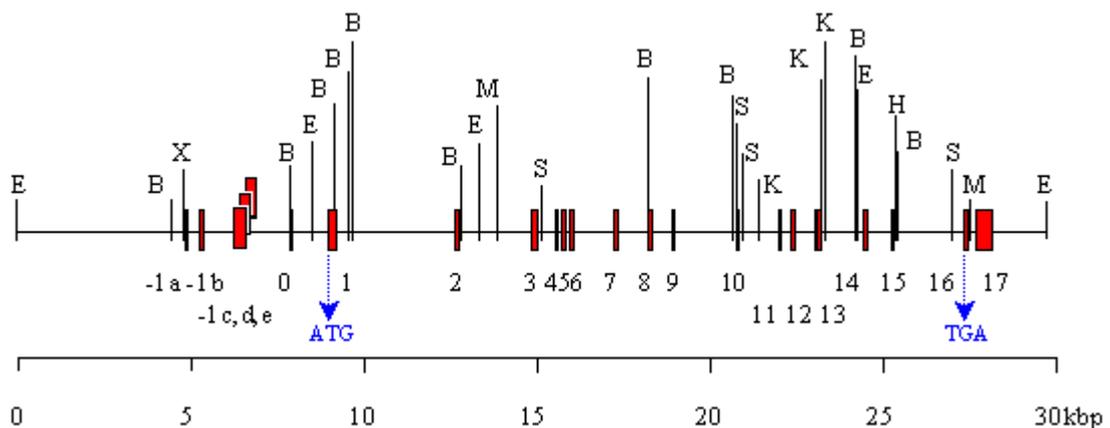


Figura 2. Gen de la enzima CBS

Procesamiento alternativo del pre-mRNA del gen CBS.

El gen de la CBS contiene 23 exones; el polipéptido de 551 aminoácidos es codificado por los exones 1-14 y 16. El exón 15 es procesado de manera alterna, codifica para 14 aminoácidos y se incorpora en relativamente pocas moléculas de mRNA maduras. El polipéptido de la CBS conteniendo al exón 15 no ha sido detectado en ninguno de los tejidos humanos que han sido examinados, por lo tanto, el significado biológico del exón 15 es desconocido (45). El 5'-UTR del mRNA de la CBS se forma por uno de cinco exones que se utilizan de manera alterna, designados de -1a a -1e, y uno presente de manera invariable, el exón 0; mientras que el 3'-UTR es codificado por los exones 16 y 17. De manera interesante, el intrón 16 parece estar conservado en el 3'-UTR de la mayoría del mRNA de los fibroblastos y las células del hígado (48).

Promotores de CBS.

Existen por lo menos dos promotores que se usan de manera alterna. Se localizan "corriente arriba" de los exones -1a y -1b. Son ricos en GC (80%) y contienen numerosos sitios de unión para Sp1, Ap1, Ap2 y c-myb, pero carecen de la caja TATA clásica.

La enzima CBS.

El primer producto traduccional del gen de la CBS es un polipéptido con un peso molecular de 63 kDa que forma tetrámeros u oligómeros mayores. La proteólisis limitada de la longitud de enzima produce el “dominio activo” de la CBS (residuos de aminoácidos 40-413). La reducción en el tamaño es acompañada por un incremento significativo en la actividad específica de la enzima y cambio de un tetrámero a un dímero. La enzima purificada contiene unido firmemente piridoxal 5-fosfato (PLP), del cual depende su actividad. Cada subunidad de 551 residuos de aminoácidos une, además de los dos substratos, tres ligandos adicionales: PLP, AdoMet (un activador alostérico) y sorprendente hem, sin embargo, el rol de este último para el funcionamiento de la enzima se desconoce hasta el momento. El dominio activo de la CBS se extiende desde Glu 37 a Arg 413 formando un dímero de subunidades de 45 kDa. El dominio activo de 45 kDa es la porción más homóloga con las enzimas relacionadas evolutivamente ya sea de plantas o bacterias. El dímero es dos veces más activo que el tetrámero y une los cofactores PLP y hem, pero no es activado por AdoMet (49).

Conservación evolutiva de CBS.

La secuencia de aminoácidos del dominio activo de la CBS humana comparte un alto grado de similitud estructural (52% de las sustituciones encontradas) con las O-acetil sulfhidrasas (cistein-sintasas) de las plantas y bacterias. Estas enzimas catalizan la síntesis de cisteína de sulfuro y acetilserina. El exón 3 es la región más altamente conservada con cerca de 50% de identidad con las enzimas bacterianas. La región más altamente conservada contiene lisina 119, el residuo de unión a PLP.

La segunda clase de enzimas que se encuentran estructuralmente relacionadas a CBS incluyen deaminasas hidroxil-aminoácidos (dehidratasas) de *E. coli*, levadura, rata e hígado humano. Hay 118 residuos idénticos entre CBS y treonina-deaminasa (21% de identidad) y 33% de similitud entre ellas incluyendo las sustituciones conservadas.

La tercera clase de proteínas relacionadas con CBS se representan por la cadena beta de la triptofano-sintasa compartiendo 113 residuos (28.5%) y la similitud global es casi del 36%. Como en las comparaciones anteriores, las regiones más conservadas se localizan en las regiones amino-terminal correspondiendo a los residuos 102-169 de la CBS.

Los “dominios de proteínas CBS” comprenden los residuos 416-469 de CBS, han sido identificados en un amplio rango de proteínas no relacionadas que incluyen a inosin-monofosfato dehidrogenasa, transportadores de glicina-betaína, numerosos canales de cloro y muchas otras proteínas. A pesar de que el rol del “dominio CBS” se desconoce,

podría estar involucrado en señalización citoplasmática, interacciones proteína-proteína y/o regulación de proteínas.

Varias enfermedades hereditarias (homocistinuria, retinitis pigmentosa, cardiomiopatía hipertrófica, miotonía congénita) son causadas por mutaciones en los dominios CBS de las enzimas CBS, inosin 5-monofosfato deshidrogenasa, AMP cinasa, y los canales de cloro, respectivamente. A pesar de su relevancia clínica, aún no se ha establecido la función precisa de los dominios CBS y cómo afectan a las propiedades estructurales o funcionales de una enzima o canal (50,51).

Mutaciones de CBS.

La mayoría de las mutaciones encontradas en pacientes con deficiencia de CBS son mutaciones sin sentido y la gran mayoría de ellas son mutaciones puntuales únicas, también se han reportado varias deleciones, inserciones y mutaciones en el procesamiento. Cerca de la mitad de todas las sustituciones puntuales en la región codificante de la CBS se originan de desaminaciones de las metilcitosinas en los dinucleótidos CpG. Se han reportado 71 mutaciones sin sentido en la CBS de pacientes con HHC, y se ha demostrado que disminuyen de manera significativa la actividad de CBS(47). Una cuarta parte de las mutaciones sin sentido se encuentran en el exón 3, la parte más conservada evolutivamente del polipéptido CBS. Las dos mutaciones más frecuentemente descritas, I278T y G307S se encuentran en el exón 8 (Tabla 1). La mutación I278T es panétnica y engloba una cuarta parte de todos los alelos homocistinúricos. Sin embargo, en algunos países, como en Holanda, representa más de la mitad de los alelos afectados (52). La mutación G307S es indudablemente la causa principal de homocistinuria en Irlanda (71% de los alelos afectados), también se ha detectado frecuentemente en pacientes de origen celta tanto en Estados Unidos como en Australia, incluyendo familias con antecesores irlandeses, escoceses, ingleses, franceses y portugueses (Figura 3).

Los estudios que han tratado de asociar estas dos mutaciones con HHC han mostrado que los portadores heterocigotos están presentes en menos del 1% de la población general descartándolas como causantes de las concentraciones moderadamente elevadas de Hcy (53,54).

Tabla 1. Mutaciones descritas en el exón 3 y 8 del gen de la enzima CBS.

| Posición | Cambio cDNA | Cambio Proteína | Nucleótido | Exón | Exón-intrón | Tipo de Mutación | Restricción | Total |
|-----------------|--------------------|------------------------|-------------------|-------------|--------------------|-------------------------|--------------------|--------------|
| 5824 | 325 T>C | C109R | 5824 T>C | 3 | EX3 | Miss | | 3 |
| 5840 | 341 C>T | A114V | 5840 C>T | 3 | EX3 | Miss | Mae II+ | 9 |
| 5845 | 346 | G116R | 5845 G>A | 3 | EX3 | Miss | | 1 |
| 5845 | 346 G>A | G116R | 5845 G>A | 3 | EX3 | Miss | | 4 |
| 5860 | 361 C>T | R121C | 5860 C>T | 3 | EX3 | Miss | | 2 |
| 5861 | 362 G>A | R121H | 5861 G>A | 3 | EX3 | Miss | | 2 |
| 5861 | 362 G>T | R121L | 5861 G>T | 3 | EX3 | Miss | | 2 |
| 5872 | 373 C>T | R125W | 5872 C>T | 3 | EX3 | Miss | Aci I - | 4 |
| 5873 | 374 G>A | R125Q | 5873 G>A | 3 | EX3 | Miss | Pst I+ | 11 |
| 5873 | 374 G>C | R125P | 5873 G>C | 3 | EX3 | Miss | Hpa II+ | 1 |
| 5875 | 376 A>G | M126V | 5875 A>G | 3 | EX3 | Miss | | 1 |
| 5883 | 384 G>C | E128D | 5883 G>C | 3 | EX3 | Miss | Mul I-,Fok I- | 1 |
| 5892 | 393 G>C | E131D | 5892 G>C | 3 | EX3 | Miss | | 1 |
| 5914 | 415 G>A | G139R | 5914 G>A | 3 | EX3 | Miss | | 1 |
| 5928 | 429 C>G | I143M | 5928 C>G | 3 | EX3 | Miss | TaqI- | 2 |
| 5929 | 430 G>A | E144K | 5929 G>A | 3 | EX3 | Miss | Taq I- | 12 |
| 5933 | 434 C>T | P145L | 5933 C>T | 3 | EX3 | Miss | | 1 |
| 5941 | 442 G>A | G148R | 5941G>A | 3 | EX3 | Miss | Msp I-,BstN I+ | 3 |
| 5941 | 442insG | N149fsX187 | 5941insG | 3 | EX3 | Ins | | 1 |
| 5950 | 451 G>A | G151R | 5950 G>A | 3 | EX3 | Miss | | 2 |
| 5950 | 451 | G151R | 5950 G>A | 3 | EX3 | Miss | | 1 |
| 9122 | 833 T>C | I278T | 9122 T>C | 8 | EX8 | Miss | Bsr I+ | 141 |
| 9151 | 862 G>A | A288T | 9151 G>A | 8 | EX8 | Miss | | 1 |
| 9158 | 869 C>T | P290L | 9158 C>T | 8 | EX8 | Miss | Alu I+ | 1 |
| 9181 | 892insC | Q298fsX329 | 9181insC | 8 | EX8 | Ins | | 1 |
| 9193 | 904 G>A | E302K | 9193 G>A | 8 | EX8 | Miss | | 5 |
| 9202 | 913 G>A | G305R | 9202 G>A | 8 | EX8 | Miss | | 1 |
| 9208 | 919 G>A | G307S | 9208 G>A | 8 | EX8 | Miss | Alu I+ | 87 |
| 9244 | IVS8+1G>A | del ex 8 | 9244G>A | 8 | IN8 | Other | | 2 |

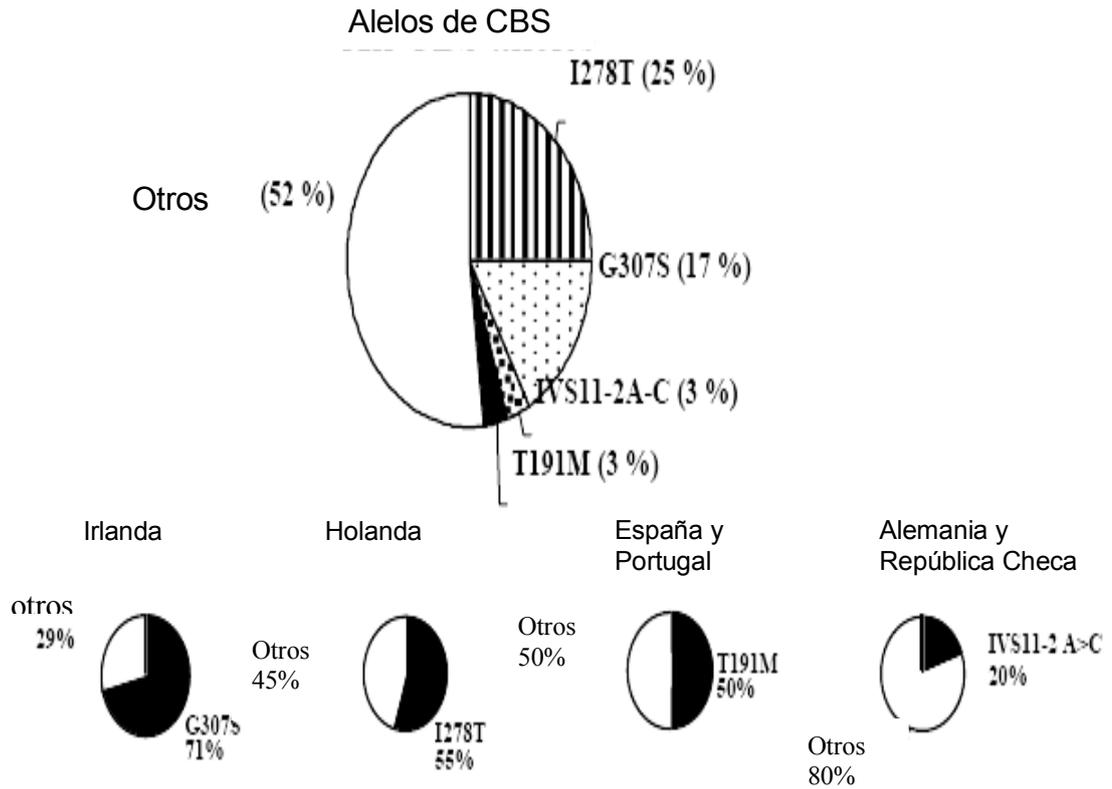


Figura 3. Distribución de las mutaciones más prevalentes de CBS en diferentes poblaciones del mundo. Datos calculados tomando como base la información reportada en <http://www.uhsc.edu/sm/cbs>

En un estudio realizado en México en 100 sujetos con HHC se buscaron las mutaciones más frecuentemente descritas en el gen de la CBS, I278T y G307S, las cuales no fueron encontradas (Majluf et al. estudio enviado a publicación).

Polimorfismos.

El locus de CBS contiene un número de secuencias de repetidos de DNA y variaciones de base únicas que son polimórficas en caucásicos (47). Tal variación recibe mención especial por su relativa alta incidencia en la población normal. La 844ins68 es un polimorfismo frecuente que ocurre en cerca del 5% de los alelos caucásicos (55), es el polimorfismo más prevalente del gen de la CBS en estado heterocigoto, consiste en la inserción de 68 pb; 53 pb son del intrón 7 y 15 pb del exón 8 lo que provoca una duplicación del sitio de splicing 3' entre el intrón 7 y el exón 8; sin embargo, genera un transcrito normal (56). Este polimorfismo fue reportado inicialmente en pacientes con homocistinuria; estudios subsiguientes mostraron que dicho polimorfismo no causa enfermedad y es común en la

población general con una frecuencia de 5-10% en caucásicos (57), y con una prevalencia más alta en la población negra (37.7% de heterocigotos y 4% de homocigotos) (58). Este polimorfismo se encontró con una frecuencia del 6.1% de sujetos mexicanos sin encontrarse asociación con HHC (Majluf et al. estudio enviado a publicación).

Se ha descrito que el número de repetidos de 31 pares de bases (VNTR) está asociado a HHC después de una COM. Abarca desde el límite del exón 13 al límite del intrón 13 del gen de la CBS. Consiste en 15, 16, 17, 18, 19 o 21 unidades repetidas y se asocia a un incremento significativo en las concentraciones de Hcy cuando aumenta el número de elementos repetidos; los experimentos de RTPCR han mostrado evidencia de un procesamiento alternativo en el sitio de unión del empalme en el exón 13-intrón 13 (59,60). Posteriormente, los mismos autores estudiaron esta secuencia de DNA no codificante en una población de 2598 individuos corroborando su asociación con HHC postCOM al aumentar los elementos repetidos, y al ajustar los resultados con la edad, género y estado nutricional no se encontraron diferencias. Por lo que concluyen que este cambio genético es un factor de riesgo cardiovascular (61).

En otro estudio realizado en población sana de Colombia se observó que la presencia de HHC postCOM es más frecuente que en ayuno. Se calcularon las frecuencias de las variantes alélicas c.699 C >T (exón 6) c.1080 C>T (exón 10) de la CBS, y de c.677 C>T (exón 1) de la MTHFR y se estudió la asociación entre estas variantes alélicas e HHC encontrando únicamente asociación con el polimorfismo en la enzima MTHFR y no con las variaciones en la enzima CBS (33).

La información obtenida hasta este momento es insuficiente para explicar la proporción de sujetos con HHC post COM ya que aún se desconoce si existen variaciones genéticas en población mexicana en el gen de la enzima CBS que pudieran explicar la alta prevalencia de HHC post COM.

MEDICINA GENOMICA EN MEXICO

Desde la conclusión del Proyecto del Genoma Humano se demostró que los seres humanos compartimos el 99.9% de la secuencia genética y que únicamente el 0.1% varía en cada individuo siendo las variaciones más comunes aquellas en que cambia una sola letra, conocidas como SNPs por sus siglas en inglés. Estas variaciones se encuentran a lo largo de toda la cadena, en promedio una cada 800 nucleótidos y hasta el momento se han

identificado cerca de 3.2 millones de estas variaciones. Identificar cómo se distribuyen estas variaciones genómicas entre las distintas poblaciones es tema de interés.

El gran número de posibles combinaciones de SNPs da lugar a la individualidad genómica que a su vez determina la individualidad bioquímica que confiere susceptibilidad o resistencia a enfermedades comunes tales como diabetes mellitus, hipertensión arterial sistémica, cáncer o tuberculosis, entre otras; así como variabilidad en la respuesta a medicamentos de uso común. Además del factor genómico, el medio ambiente tiene un papel fundamental en la aparición de estas enfermedades, y por ello, en aquellos individuos con susceptibilidad genómica a padecerlas, el estilo de vida es determinante para la aparición de las manifestaciones clínicas de estas enfermedades (62).

La medicina genómica, que se define como la identificación de las variaciones en el genoma humano que confieren riesgo a padecer enfermedades comunes, dará lugar a una práctica médica más individualizada, más preventiva y más predictiva. Esta nueva disciplina ofrece grandes beneficios para el cuidado de la salud, dado que permitirá identificar a los individuos con riesgo a desarrollar enfermedades comunes antes de que aparezcan los síntomas, y así evitar o retrasar sus manifestaciones, complicaciones y secuelas. Además, dará lugar a nuevas estrategias de tratamiento como la farmacogenómica que resultará en la generación de medicamentos más efectivos y menos tóxicos con base en la estructura genómica de cada población (63).

En México la población es heterogénea genéticamente, esto es el resultado de la mezcla de más de 65 grupos indígenas con españoles y africanos, originando un grupo de características únicas que conllevan susceptibilidades distintas a las enfermedades. Estos grupos se mezclaron a lo largo de 500 años dando lugar a la población Mestiza que representa cerca del 80% de los mexicanos de hoy. Esta historia demográfica hace importante caracterizar el rostro genético de las poblaciones mexicanas como un paso inicial para el desarrollo de la medicina genómica en México. Es por ello, que los productos y servicios que se generen en poblaciones anglosajonas, europeas o asiáticas, difícilmente podrán ser de utilidad plena para la población mexicana. La medicina genómica no podrá simplemente importarse de países desarrollados, cuya población sea diferente a la mexicana (64).

En un estudio realizado en poblaciones mestizo mexicano se identificaron variantes importantes en la diversidad genómica. Se analizaron 300 muestras de 6 estados de la República Mexicana así como de 4 grupos indígenas, encontrando diferencias importantes con respecto a las poblaciones reportadas en el Hap Map (65).

2. JUSTIFICACION.

La HHC está fuertemente asociada con enfermedad tromboembólica venosa y aterosclerosis. En México, estos trastornos constituyen la primera causa de muerte.

El nivel plasmático moderadamente elevado de Hcy, ya sea medido en ayuno o después de una COM, es un factor independiente para enfermedad coronaria. Sin embargo, el rol de la influencia genética en las concentraciones de Hcy plasmática no se sabe del todo. Se ha propuesto que la frecuencia de algunos polimorfismos en los genes involucrados en el metabolismo de la Hcy podrían ser mayores en las personas con eventos trombóticos de determinadas poblaciones.

Ya que alteraciones en el gen de la enzima CBS pudieran manifestarse con HHC postCOM, es importante investigar si existen cambios genéticos como el VNTR de 31 pares de bases en población mexicana que pudieran explicar el alto porcentaje de HHC postCOM que se ha observado.

Ya que las poblaciones de mestizos mexicanos son heterogéneas genéticamente y, considerando el rol de los polimorfismos en la susceptibilidad genética a las enfermedades cardiovasculares se vuelve necesario la realización de estudios poblacionales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que la COM activa la vía de la transulfuración, en la cual, la enzima reguladora es la CBS; estudios preliminares en mexicanos sugieren que la función de esta enzima posee una función subóptima, ocasionando la generación de HHC. Esta asociación sugiere la existencia de una proteína CBS anormal en población mexicana que podría incrementar el riesgo cardiovascular.

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACION.

- 3.1. ¿Cuál es la frecuencia del VNTR de 31 pares de bases en el gen de la enzima CBS en individuos mestizos mexicanos?
- 3.2. ¿Cuál es la frecuencia del VNTR de 31 pares de bases en el gen de la enzima CBS en individuos indígenas?
- 3.3. ¿Está asociada la presencia de HHC postCOM con el VNTR de 31 bp en el gen de la enzima CBS en individuos mestizos mexicanos?

4. HIPOTESIS.

- 4.1 El VNTR de 31 bp del gen de la enzima CBS se encontrará con una frecuencia mayor del 63% en individuos mestizos mexicanos.
- 4.2 El VNTR de 31 bp del gen de la enzima CBS se encontrarán con una frecuencia similar en individuos indígenas.
- 4.3 El VNTR de 31 bp en el gen de la enzima CBS estará asociado con HHC postCOM.

5. OBJETIVOS.

- 5.1. Determinar la frecuencia del VNTR de 31 pares de bases en el gen de la enzima CBS en individuos mestizos mexicanos.
- 5.2. Determinar la frecuencia del VNTR de 31 pares de bases en el gen de la enzima CBS en individuos indígenas.
- 5.3. Determinar la asociación entre el VNTR de 31 bp del gen de la enzima CBS con HHC postCOM en individuos mestizos mexicanos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

A. Universo de trabajo.

Individuos mestizos mexicanos que acudan al Hospital Regional No1 IMSS “Carlos MacGregor Sánchez”.

Individuos indígenas de quienes se cuenta con material genético disponible.

B. Tipo de estudio.

Observacional, transversal, analítico.

C. Criterios para ingresar al estudio.

C.1. Criterios de inclusión.

c.1.1. Sujetos indígenas: Se definirá como indígena cuando se cumplan los siguientes criterios: 1) hablar una lengua nativa como primera lengua con el Español como segunda lengua, 2) vivir en una región geográfica conocida como indígena, 3) que el individuo se considere a sí mismo como indígena, 4) portadores de grupo sanguíneo O-Rh positivo (66).

c.1.2. Sujetos mestizo-mexicanos dado por al menos tres generaciones de la familia en el país.

c.1.3. Con una edad comprendida entre 18 y 60 años.

c.1.4. Ambos sexos.

c.1.5. Aceptación del paciente para ingresar al estudio.

C.2. Criterios de no inclusión.

c.2.1. Cualquier enfermedad que provoque elevación de la Hcy: insuficiencia renal crónica, insuficiencia hepática, cáncer, hipotiroidismo, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus, enfermedad inflamatoria intestinal.

c.2.2. Pacientes que se encuentren bajo la administración de algún tipo de medicamento que incremente la concentración plasmática de Hcy: anticonvulsivantes, hipolipemiantes, inmunosupresores, teofilina.

c.2.3. Embarazo.

C.3. Criterios de exclusión.

c.3.1. Sujetos de quienes no se cuente con las determinaciones completas de Hcy, vitamina B12 y ácido fólico.

D. Selección de la muestra.

d.1. Sujetos mestizos mexicanos:

Se incluyeron de manera consecutiva a todos los sujetos que reunían los criterios de inclusión.

Liebers et al (60) reporta una frecuencia de 18/18 VNTR de 31 pares de bases de 63.2% en la población estudiada. Si se realiza el cálculo del tamaño de la muestra para comparar dos proporciones se tiene la siguiente fórmula:

$$n = \frac{[(Z_{\alpha} \sqrt{2J_c(1-J_c)}) - Z_{\beta} \sqrt{(J_t(1-J_t) + J_c(1-J_c))}]^2}{(J_t - J_c)^2}, \text{ donde:}$$

Z_{α} : es el valor de Z de dos colas relacionado con la hipótesis nula, siendo $\alpha=0.05$ es 1.96

Z_{β} : es el valor de Z de la cola inferior, relacionado con la hipótesis alterna, $\beta=0.80$ es -1.28

J_c : es la proporción en el grupo de referencia (proporción de pacientes en el estudio de Liebers et al), se espera una proporción de 0.63

J_t : es la proporción en el grupo de estudio (sujetos con HHC postCOM asociada al VNTR de 31 bp), se espera una frecuencia de 80% (0.80)

Se obtienen 157 sujetos más 20% de pérdidas: 188 sujetos.

d.2. Sujetos indígenas:

Se incluyeron a 100 sujetos con los criterios de definición de indígena, los cuales fueron obtenidos de un banco de muestras. Se analizaron individuos de las etnias Nahua, Mazahua, Mazateca y Zapoteca por su colindancia con el Distrito Federal.

E. Descripción de variables.

E.1. Independientes.

e.1.1. Presencia del VNTR de 31 pares de bases en el gen de la enzima CBS.

E.2. Dependientes.

e.2.1. Niveles de Hcy postCOM.

E.3. De confusión.

e.3.1. Concentración sérica de folato, vitamina B12 y vitamina B6.

e.3.2. Edad

F. Definición de las variables.

F.1. Definición conceptual.

f.1.1. VNTR de 31 pares de bases: Consiste en 15, 16, 17, 18, 19 o 21 unidades repetidas de 31 pares de bases abarcando desde el límite del exón 13 al límite del intrón 13 del gen de la CBS.

f.1.3. Hcy postCOM: Aumento en la concentración plasmática de Hcy igual o mayor a 15.0 $\mu\text{mol/L}$ 8 horas después de la administración de la COM.

f.1.4. Concentración plasmática de folato, vitamina B12: Cuantificación de la concentración plasmática de cada uno de estos tres vitamínicos.

f. 1.5. Edad: tiempo en años que una persona ha vivido.

F.2. Definición operacional.

| Variable | Definición operacional | Tipo | Escala de medición |
|--|---------------------------------------|---|--|
| VNTR de 31 pares de bases | La misma que la definición conceptual | Nominal dicotómica | Presente/ausente |
| Hcy postCOM | La misma que la definición conceptual | Nominal dicotómica Cuantitativa continua | Normal/HHC $\mu\text{mol/L}$ |
| Concentración plasmática de folato, vitamina B12 | La misma que la definición conceptual | Cuantitativa continua | Acido fólico en ng/mL Vitamina B12 en pg/mL |
| Edad | La misma que la definición conceptual | Cuantitativa discontinua | Años |

G. Grupos de estudio.

Dos grupos de estudio:

Sujetos mestizos mexicanos.

Sujetos indígenas.

H. Procedimiento.

Se incluyeron de manera consecutiva a todos los sujetos que reunían los criterios de inclusión.

Al grupo de individuos mestizos mexicanos se determinaron todas las variables previamente descritas.

Se buscó el VNTR de 31 bp en el gen de la enzima CBS en el grupo de individuos mestizos mexicanos y de indígenas. Se comparó la frecuencia de los cambios genéticos identificados en ambos grupos.

H.1. Medición de Hcy

Una vez reunidos los criterios para ingresar al estudio, informados y con carta de aceptación firmada, se les tomaron 3 mL de sangre en un tubo con EDTA en ayuno y luego de 8 h de una COM.

Para la COM se administraron 100mg/kg de peso de L-metionina en aproximadamente 200 mL de jugo de naranja a las 12:00 AM y la muestra se toma a las 8 AM del día siguiente. Las muestras sanguíneas se colocaron en hielo y se centrifugaron a 5000 x g durante 5 minutos, para obtener el plasma pobre en plaquetas. El supernadante fue almacenado en dos alícuotas a -80 ° C hasta su procesamiento. Una de ellas se utilizó para la medición de vitamina B12, B6 y ácido fólico, y la otra para la medición de Hcy por HPLC (Ver Anexo 4 y 5).

La capa de leucocitos obtenida fue transferida con una pipeta estéril a un tubo eppendorf estéril y se utilizó para la obtención del DNA.

H.2. Estudios de biología molecular

Obtención y Preservación de DNA genómico

El DNA genómico se obtuvo de linfocitos de sangre periférica anticoagulada con EDTA, mediante el método de altas sales. Aproximadamente 5-7 ml de sangre se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos y se separaron los glóbulos blancos de la interfase con una pipeta Pasteur. Los glóbulos rojos remanentes se eliminaron mediante lavados con solución de lisis RCBL (Tris-HCl 10 mM pH=7.6, MgCl₂ 5mM y Na Cl 10 mM). La pastilla de glóbulos blancos se resuspenderá con 180 µl de NaCl 5mM y se agregarán 100 µl de SDS al 10%, posteriormente se debe agitar e incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente agregar 600 µl de NaCl saturado, agitar e incubar a temperatura ambiente y centrifugar durante 15 minutos a 1500 rpm. Se debe transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf estéril y precipitar el DNA con dos volúmenes de etanol absoluto. El DNA se separó mediante centrifugación de la solución alcohólica y fue lavado con etanol al 70%. Posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente. Por último, el DNA se resuspendió con 50 µl de agua desionizada estéril y se almacenó a 4°C hasta su análisis.

A todas las muestras obtenidas se les realizó un análisis espectrofotométrico mediante lecturas a 260 y 280 nm. La concentración de DNA se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{DNA}(\text{ng}/\mu\text{l})] = (A_{260})(\text{dilución}^{-1})(50\text{ng}/\mu\text{l})$$

Considerando que 1 densidad óptica a 260 nm equivalen a 50 ng/μl de DNA.

La relación 260/280 indica la pureza del DNA obtenido. Se considera que las relaciones comprendidas entre 1.8 y 2.0 unidades de D.O₂₆₀ son las óptimas.

Para determinar la calidad de las muestras de DNA se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio [0.5μg/μl].

Reacción en Cadena de la Polimerasa

A partir de las muestras de ADN obtenidas, se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el DNA del VNTR de 31 bp que se localiza desde el límite del exón 13 al límite del intrón 13 del gen de la CBS, utilizando oligonucleótidos conocidos para las direcciones 5' – 3' de la cadena sentido y 5' – 3' de la cadena antisentido según Yang *et al* (59) en una reacción bajo las siguientes condiciones:

200 ng de ADN genómico

1.5 U de Taq polimerasa

10 pmol de cada uno de los primers

0.2 mM de dinucleotidos trifosfatados (dNTP's)

3 mM de Cloruro de Magnesio

Agua destilada a un volumen final de 25 μl

Condiciones de PCR (30 ciclos):

| Etapa | Temperatura °C | Tiempo |
|---------------------------|----------------|-----------|
| Desnaturalización inicial | 95 | 5 minutos |
| Desnaturalización | 95 | 1 minuto |
| Alineamiento | 55 | 1 minuto |
| Extensión | 72 | 1 minuto |

Análisis de secuenciación

Se realizó análisis de secuenciación automática para detectar la presencia del VNTR de 31 bp del producto de PCR para cada uno de los individuos del estudio.

Primero se llevó a cabo la purificación de cada uno de los productos de PCR empleando el Kit Rapid PCR purification system de Marligen Biosciences, siguiendo el manual de instrucciones.

Una vez purificados se enviaron al servicio de secuenciación del Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

I. Análisis estadístico.

Para la descripción de las características generales del grupo se utilizaron medidas de resumen así como de dispersión, media y desviación estándar, respectivamente, además de porcentajes. Para determinar la diferencia en las concentraciones de Hcy de acuerdo al grupo de edad se utilizó la prueba T de Student por presentar una distribución normal. Se realizó análisis de distribución de genotipo para la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg en todos los grupos. Para comparar las frecuencias de alelo y genotipo se utilizó la prueba de χ^2 . Se realizó análisis de regresión lineal (ANOVA) para evaluar la asociación entre las variables confusoras y las concentraciones de Hcy. Para obtener la diferencia de las concentraciones de Hcy entre los subgrupos de genotipo se realizó análisis de varianza. Se realizó análisis de correlación entre las variables predictoras con la concentración de Hcy. Un valor de p menor a 0.05 se consideró estadísticamente significativo. Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 20 para IBM.

7. CONSIDERACIONES ÉTICAS.

Se realizó una revisión con respecto a los aspectos éticos de investigación en grupos indígenas, encontrando que la Ley General de Salud contempla de manera general la investigación en seres humanos.

De acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud este proyecto comprende acciones que contribuyen al conocimiento de los vínculos entre las causas de enfermedad. En esta investigación prevalece el criterio del respeto a la dignidad de los sujetos de investigación así como la protección de sus derechos y bienestar.

El trabajo de investigación fue aprobado por el Comité Delegacional de Investigación de la institución.

Este estudio representa un riesgo mínimo debido a la toma de muestras sanguíneas. Debido a que se trata de un estudio observacional no se realizó ninguna maniobra experimental. Los pacientes fueron incluidos en el estudio sólo después de ser informados

acerca de su naturaleza y de otorgar su consentimiento por escrito para la utilización de sus muestras sanguíneas en la investigación.

Del material genético de grupos indígenas tomado de bancos de muestras previamente se había solicitado consentimiento informado para su resguardo y procesamiento, manteniendo siempre la confidencialidad de los datos.

8. FINANCIAMIENTO.

Se trabajó con financiamiento obtenido para el estudio de mutaciones en la enzima CBS:
FIS-IMSS-C2007-052

9. RESULTADOS

Se incluyeron 189 sujetos sanos mestizos mexicanos y se compararon con 90 sujetos indígenas. La edad promedio del grupo de mestizos fue de 46.3 años (desviación estándar 19.41) con un rango de 18 a 90 años.

Las características de la población de estudio se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1. Características de la población mestizo mexicano.

| | |
|--------------------------------|---------------------|
| Edad | 46.3 (18-90)** |
| Hcy en ayuno | 11.66 (11.86)* |
| Hcy postCOM | 38.38 (24.42)* |
| Hombres 18-60 años | 62 |
| Mujeres 18-60 años | 78 |
| Hombres >60 años | 18 |
| Mujeres >60 años | 31 |
| N | 189 |
| Hombres 18-60 años (Hcy ayuno) | 11.83 (8.32)* |
| Mujeres 18-60 (Hcy ayuno) | 8.62 (8.01)* |
| Hombres >60 (Hcy ayuno) | 18.86 (21.30)* |
| Mujeres >60 (Hcy ayuno) | 14.17 (15.85)* |
| Hombres 18-60 (Hcy postCOM) | 36.85 (16.70)* |
| Mujeres 18-60 (Hcy postCOM) | 32.97 (22.13)* |
| Hombres >60(Hcy postCOM) | 47.09 (28.59)* |
| Mujeres >60 (Hcy postCOM) | 47.35 (32.46)* |
| Vitamina B12 | 1486.03 (10941.91)* |
| Acido fólico | 11.94 (9.90)* |

*Media geométrica con desviación estándar

**Media y rango de edad

En la tabla 1 se encuentran las concentraciones de Hcy de acuerdo a género y edad. Las concentraciones de Hcy no mostraron diferencia estadísticamente significativa entre género (figura 1), sin embargo, se observó un incremento significativo a mayor edad en los sujetos mestizos. Las concentraciones de vitamina B12 y ácido fólico se encontraron dentro de los valores normales en todos los sujetos mestizos.

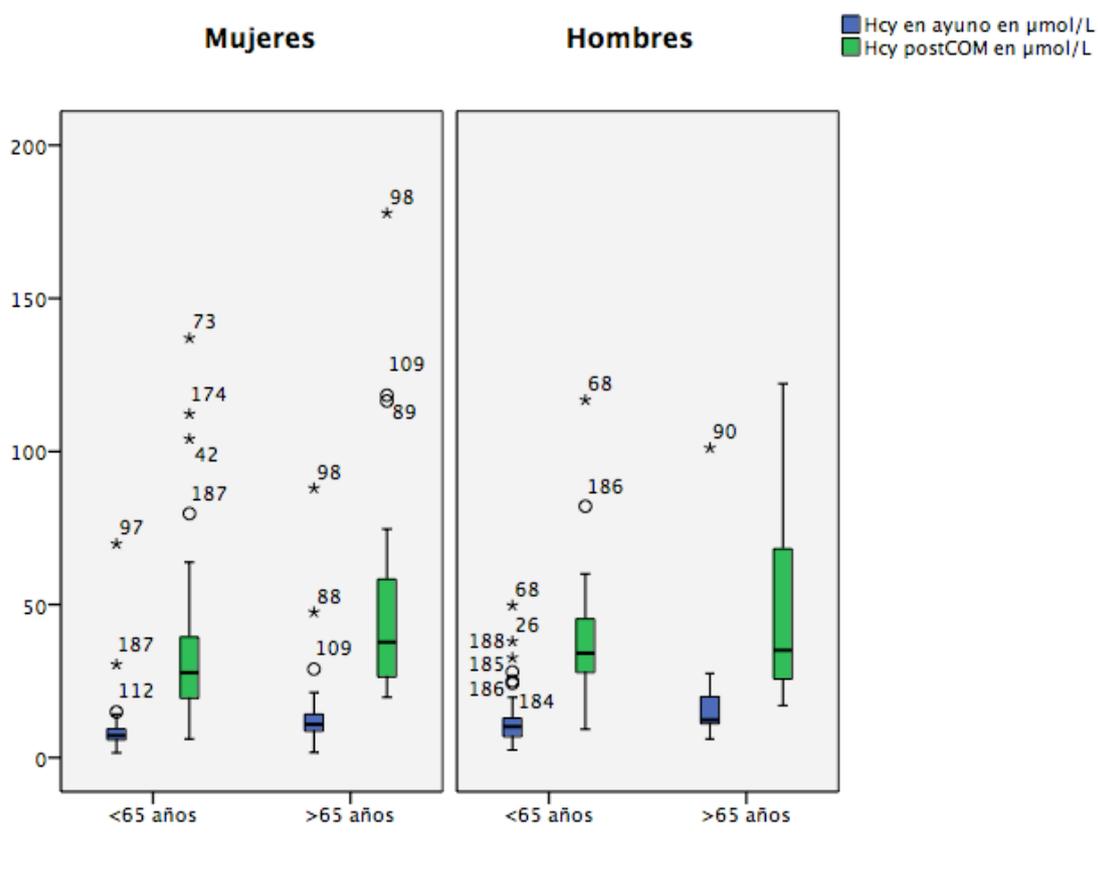


Figura 1. Diferencias en las concentraciones de Hcy de acuerdo a edad y sexo.

Se realizó análisis de regresión lineal ANOVA para evaluar la asociación de los niveles de vitamina B12, ácido fólico, el género y la edad con la concentración de Hcy en ayuno y postCOM, encontrando asociación estadísticamente significativa sólo con la edad, p 0.016 y p 0.026, respectivamente (tabla 2).

Tabla 2. Análisis multivariado entre variables predictoras y la concentración de Hcy en sujetos mestizos.

ANOVA^a

| Modelo | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|-------------|-------------------|-----|------------------|-------|-------------------|
| 1 Regresión | 977,376 | 4 | 244,344 | 1,615 | ,173 ^b |
| Residual | 24512,069 | 162 | 151,309 | | |
| Total | 25489,445 | 166 | | | |

a. Variable dependiente: Hcy

b. Variables predictoras: (Constante), Folico, Genotipo, B12, Edad

Coefficientes^a

| Modelo | Coefficients no estandarizados | | Coefficients tipificados | t | Sig. |
|---------------|--------------------------------|------------|--------------------------|-------|------|
| | B | Error típ. | Beta | | |
| 1 (Constante) | 6,361 | 2,902 | | 2,192 | ,030 |
| Genotipo | -,255 | ,358 | -,055 | -,713 | ,477 |
| Edad | ,127 | ,052 | ,190 | 2,438 | ,016 |
| B12 | ,000 | ,000 | -,050 | -,639 | ,523 |
| Folico | ,050 | ,094 | ,041 | ,535 | ,593 |

a. Variable dependiente: Hcy

Coefficientes^a

| Modelo | Coefficients no estandarizados | | Coefficients tipificados | t | Sig. |
|---------------|--------------------------------|------------|--------------------------|--------|------|
| | B | Error típ. | Beta | | |
| 1 (Constante) | 29,712 | 5,517 | | 5,385 | ,000 |
| Folico | ,113 | ,178 | ,049 | ,635 | ,526 |
| B12 | ,000 | ,000 | -,028 | -,356 | ,722 |
| Edad | ,223 | ,099 | ,174 | 2,248 | ,026 |
| Genotipo | -1,176 | ,681 | -,133 | -1,726 | ,086 |

a. Variable dependiente: Post

Se estableció la edad de \geq / \leq 60 años para evaluar su asociación con los niveles de Hcy. La prueba T de Student mostró diferencia en este punto de corte con un nivel de significancia estadística de 0.000. Se observó una correlación positiva entre la edad y las concentraciones de Hcy en ayuno (0.18, p 0.01) y postCOM (0.21, p 0.004) (figura 2).

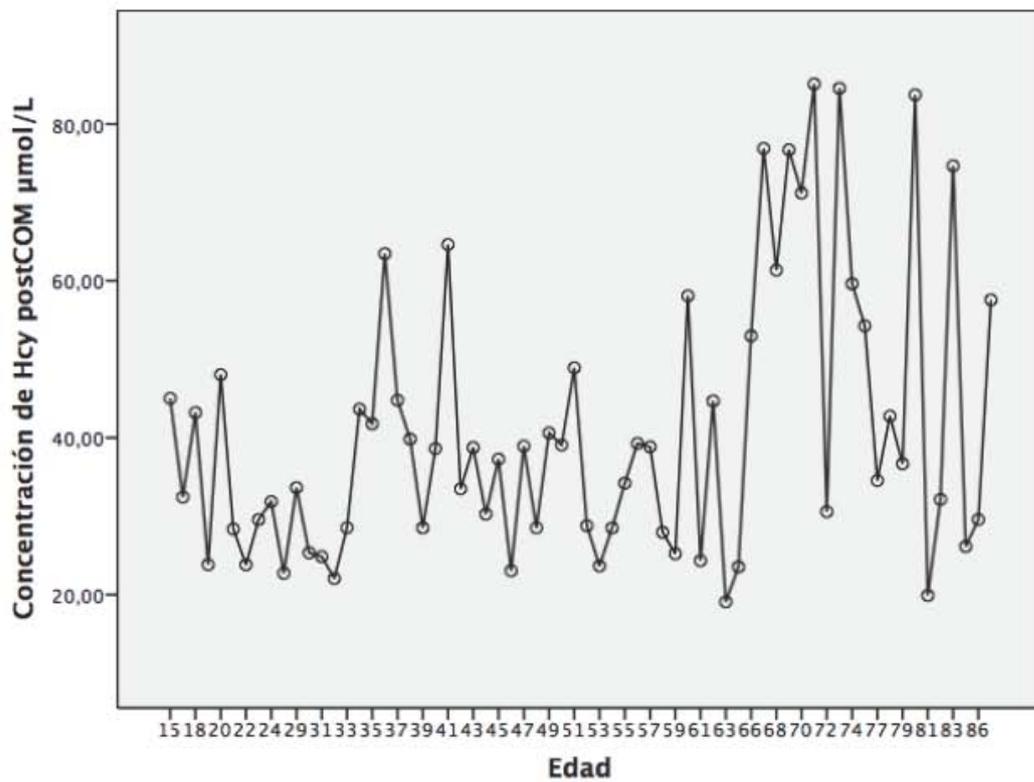
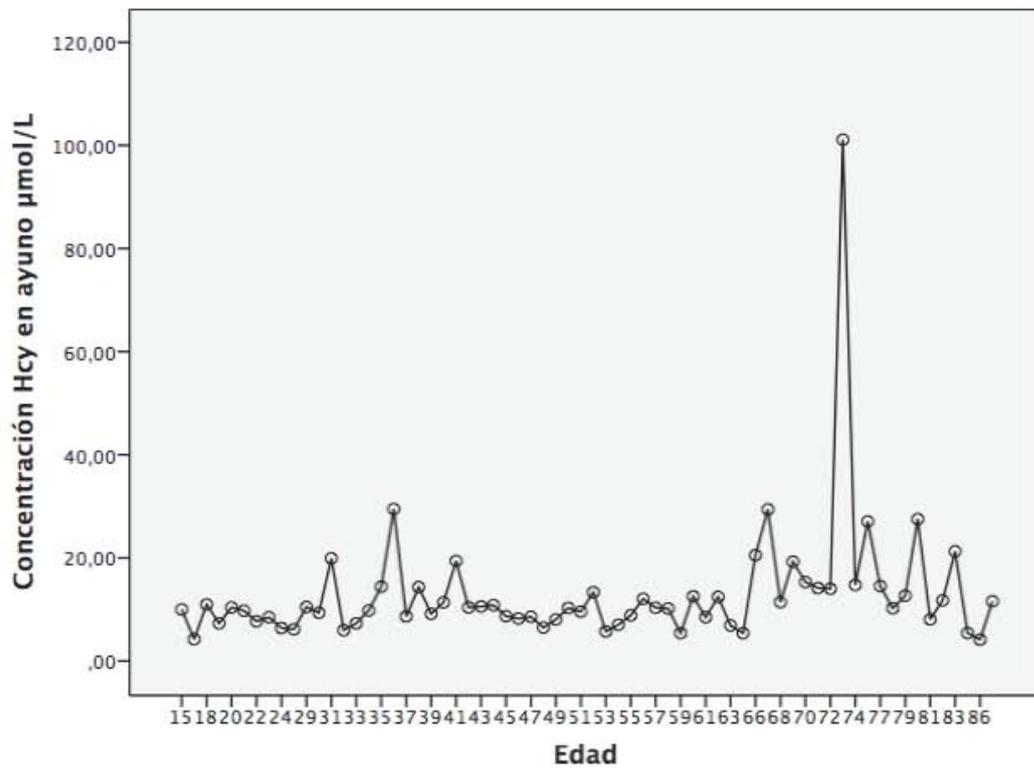


Figura 2. Concentración de Hcy de acuerdo a la edad en población mestiza.

Se obtuvo DNA para estudio en 168 sujetos de 189 de la población mestizo mexicana y se comparó con una población indígena de 90 sujetos. El análisis genético del VNTR de 31bp mostró 12 genotipos en el grupo de mestizos mexicanos y 8 genotipos en el grupo de indígenas. En la figura 3 se observa el amplificado del VNTR de 31bp que corresponde a 22 repetidos en tándem (genotipo 1), el cual se presentó en estado homocigoto en el 66.7% de la población mestiza y en el 78.9% de la población indígena.

La distribución de genotipo del VNTR de 31bp se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg. La tabla 3 y 4 muestra el número de repetidos y la frecuencia en cada población.

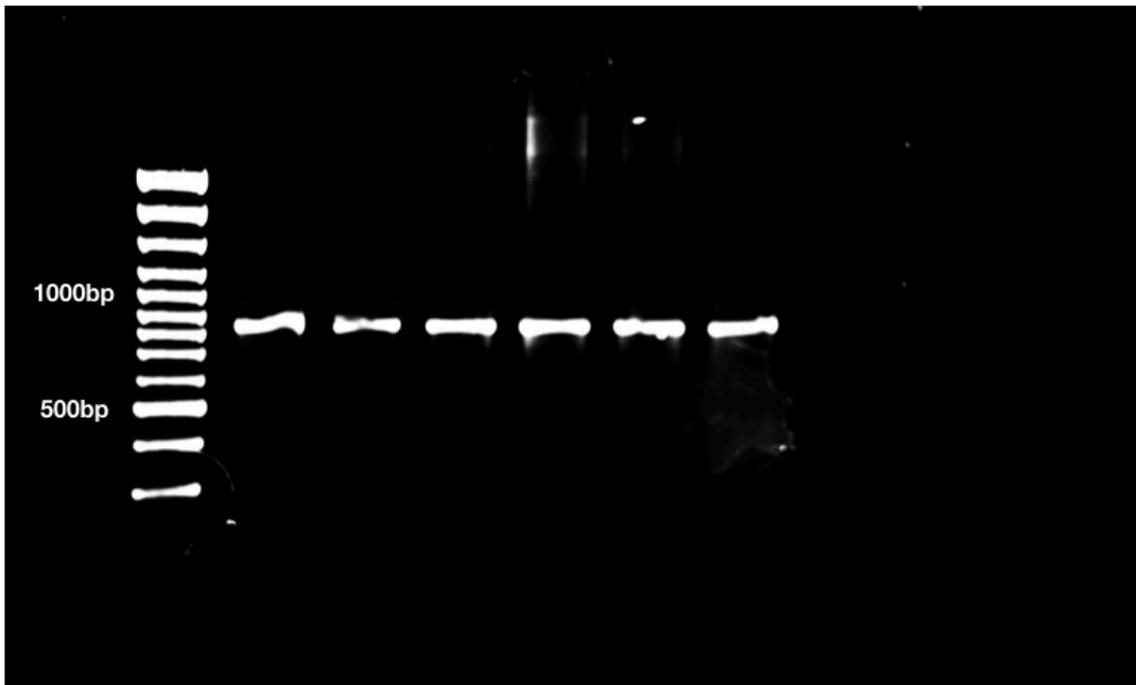


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 5% del amplificado del VNTR de 31bp de 6 sujetos. Se puede observar que el peso molecular corresponde a 850bp.

Tabla 3. Genotipos del VNTR de 31bp en sujetos mestizos mexicanos.

| Genotipo | Repetidos del VNTR de 31bp | Frecuencia | Porcentaje |
|----------|----------------------------|------------|------------|
| 1 | 22 | 112 | 66,7 |
| 2 | 22/17 | 4 | 2,4 |
| 3 | 22/20 | 1 | ,6 |
| 4 | 22/21 | 2 | 1,2 |
| 5 | 22/23 | 19 | 11,3 |
| 6 | 22/25 | 8 | 4,8 |
| 7 | 22/26 | 12 | 7,1 |
| 8 | 21 | 5 | 3,0 |
| 9 | 21/23 | 1 | ,6 |
| 10 | 21/26 | 1 | ,6 |
| 11 | 23/26 | 2 | 1,2 |
| 12 | 23/25 | 1 | ,6 |
| Total | | 168 | 100,0 |

No se observó diferencia significativa en la frecuencia de genotipos entre hombres y mujeres en población indígena (p 0.617). Los datos se presentan en la tabla 4, figura 4.

Tabla 4. Genotipos del VNTR de 31bp en sujetos indígenas.

| Genotipo | Repetidos del VNTR de 31bp | Frecuencia | Porcentaje | Mujeres* | Hombres* |
|----------|----------------------------|------------|------------|----------|----------|
| 1 | 22 | 71 | 78,9 | 38 | 33 |
| 4 | 22/21 | 1 | 1,1 | 0 | 1 |
| 5 | 22/23 | 8 | 8,9 | 4 | 4 |
| 6 | 22/25 | 2 | 2,2 | 1 | 1 |
| 7 | 22/26 | 1 | 1,1 | 0 | 1 |
| 8 | 21 | 2 | 2,2 | 0 | 2 |
| 12 | 23/25 | 4 | 4,4 | 2 | 2 |
| 13 | 23/17 | 1 | 1,1 | 0 | 1 |
| Total | | 90 | 100 | 45 | 45 |

*Chi-cuadrado de Pearson 0,617

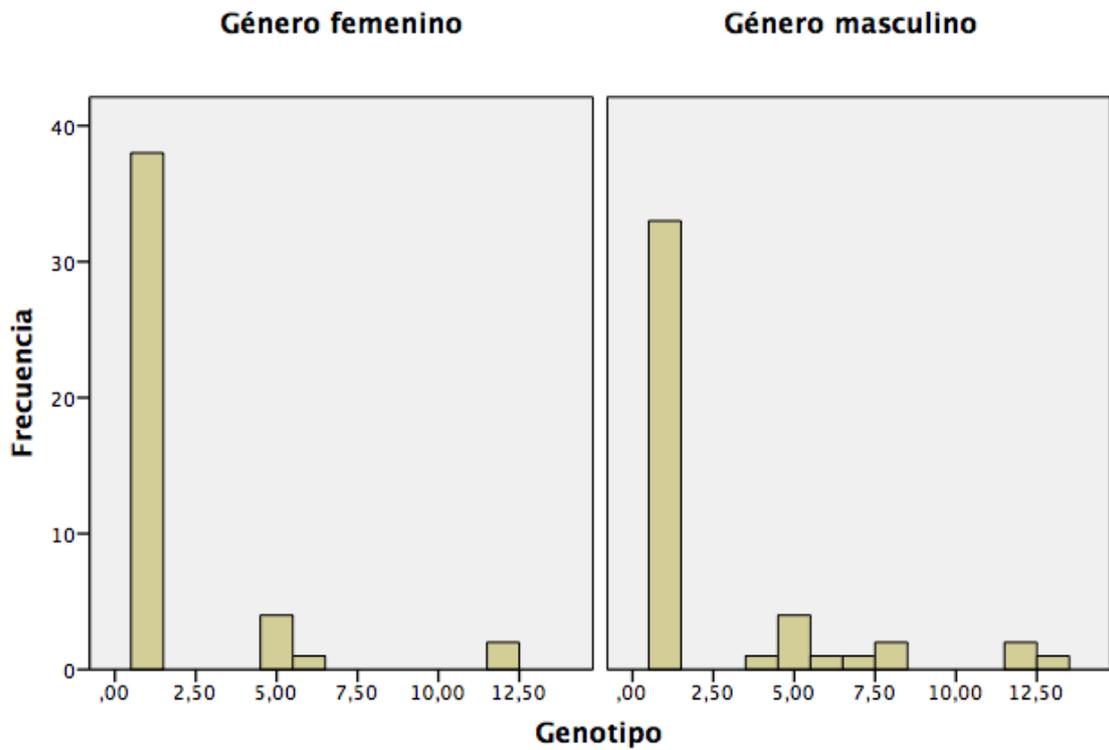


Figura 4. Frecuencia de genotipo según género en población indígena.

No se observó diferencia estadísticamente significativa en las frecuencias de genotipo del VNTR de 31bp entre la población mestizo mexicana y la población indígena (p 0.114), figura 5.

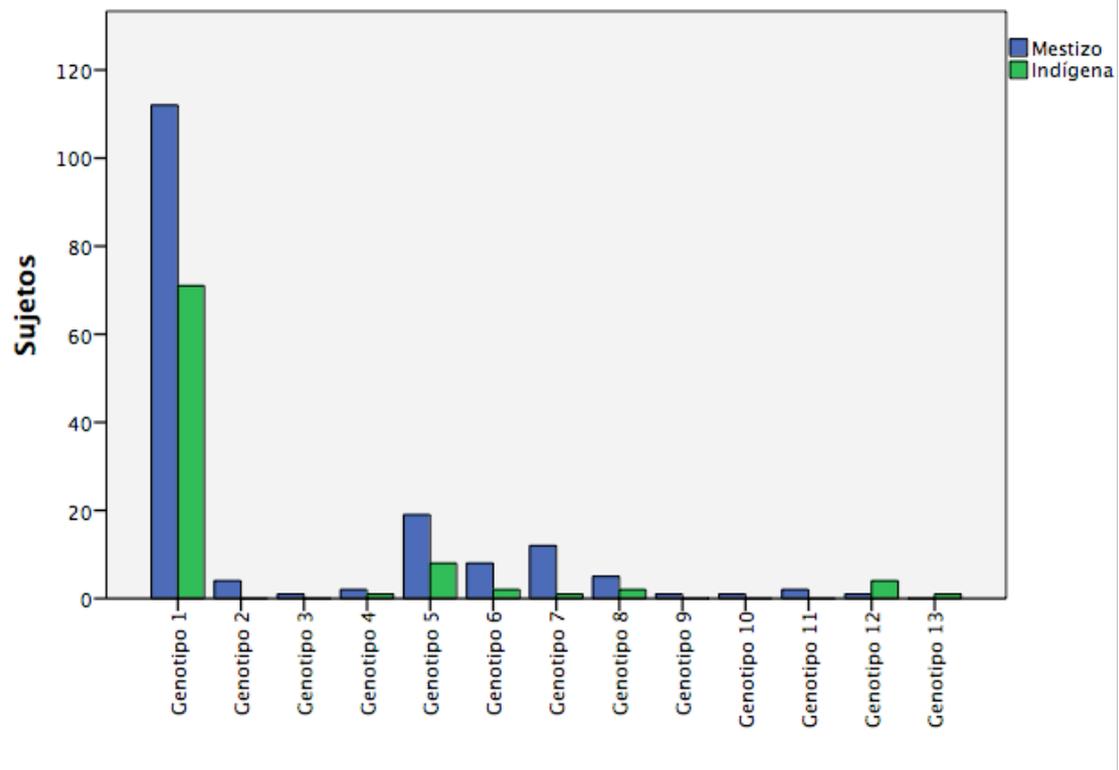


Figura 5. Distribución de frecuencias del VNTR de 31bp entre mestizos e indígenas. Prueba Chi-cuadrado de Pearson 0,114.

No se encontró correlación entre el número de repetidos del VNTR de 31bp con la concentración de Hcy en ayuno (-0.035, p 0.01) o postCOM (-0.117, p 0.01) (tabla 6, figura 6).

Tabla 6. Concentración de Hcy según genotipo del VNTR de 31bp en población mestiza.

| Genotipo | Porcentaje | Hcy ayuno μmol/L (media) | Desviación estándar | Hcy postCOM μmol/L (media) | Desviación estándar |
|----------|------------|-----------------------------|------------------------|----------------------------------|------------------------|
| 1 | 66,7 | 12.24 | 13.80 | 39.43 | 24.23 |
| 2 | 2,4 | 12.55 | 8.71 | 41.71 | 13.10 |
| 3 | ,6 | 6.42 | . | 22.84 | . |
| 4 | 1,2 | 11.71 | 4.32 | 48.32 | 5.00 |
| 5 | 11,3 | 11.03 | 10.80 | 38.84 | 31.75 |
| 6 | 4,8 | 7.01 | 2,96 | 22.57 | 6.89 |
| 7 | 7,1 | 10.18 | 4,34 | 35.15 | 17.94 |
| 8 | 3,0 | 18.28 | 17.41 | 23.69 | 12.31 |
| 9 | ,6 | 10.14 | . | 28.62 | . |
| 10 | ,6 | 9.96 | . | 33.39 | . |
| 11 | 1,2 | 11.09 | 4.70 | 37.50 | 24.49 |
| 12 | ,6 | 12.01 | . | 40.33 | . |

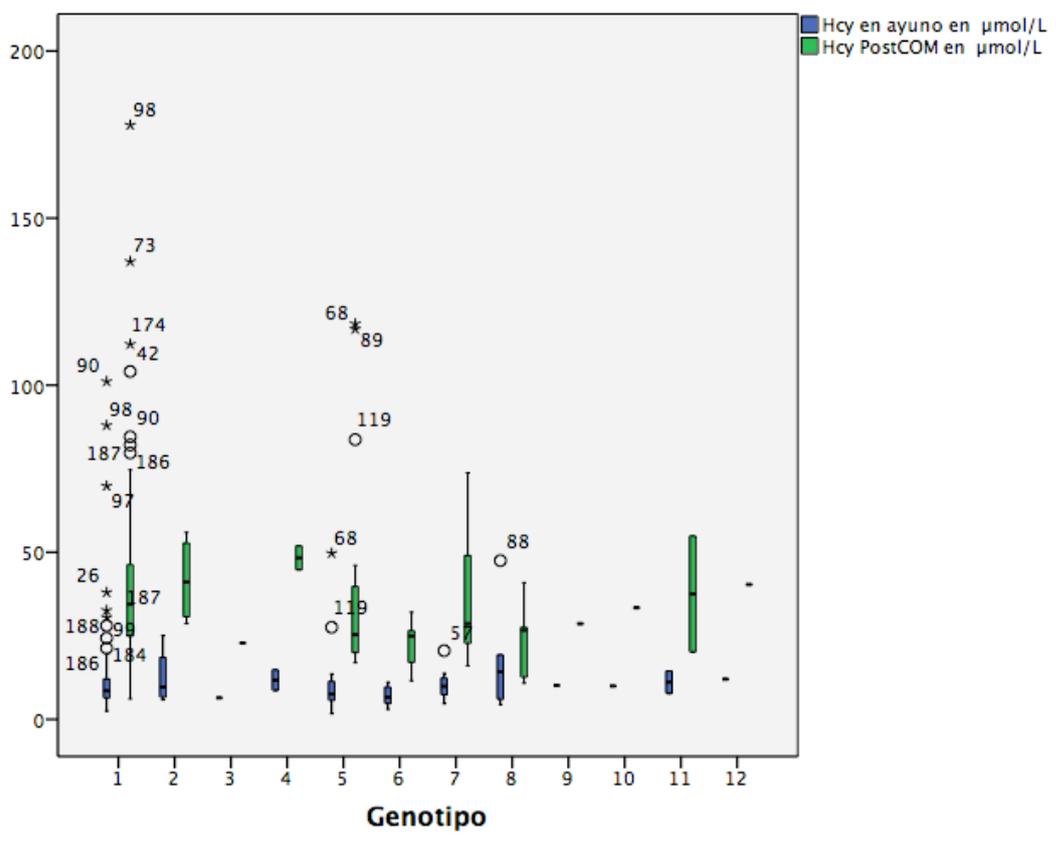


Figura 6. Concentración de Hcy en ayuno y postCOM de acuerdo a genotipo de VNTR de 31bp. Correlación de Pearson: Hcy ayuno (-0.035, p 0.01), Hcy postCOM (-0.117, p 0.01)

Se realizó secuenciación para comprobar la amplificación del VNTR de 31bp por PCR tanto en sentido 5'-3' como antisentido 3'-5', corroborando la presencia del repetido en tándem en el gen que codifica para la proteína CBS (figura 7).

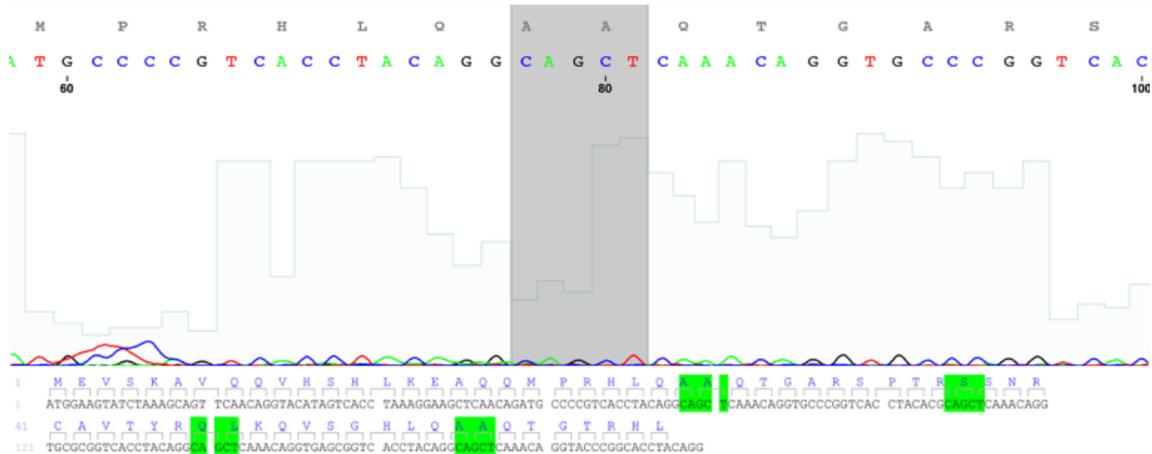


Figura 7. Secuencias del VNTR de 31bp en sentido 5'-3' y antisentido 3'-5' con los oligonucleotidos 5'-TGCAGCCGTCAGA-CCAAG-3' y 3'-TTAAGTCCCCAAAACACGG-5'.

Las secuencias del repetido en tándem se compararon con las principales bases de datos GenBank publicadas en pubmed NCBI Reference Sequence. Se identificó que esta secuencia se encuentra en el borde exón-intrón 15 con una concordancia del 95% para el gen que codifica para la proteína de la CBS (figura 8).

10. DISCUSION

A partir de que la Hcy se estableció como un factor de riesgo trombótico y de aterosclerosis, se buscaron alteraciones genéticas que demostraran relación causal con el desarrollo de HHC. La principal causa genética asociada es la mutación C677T en la enzima MTHFR, la cual ocasiona alteraciones en el proceso de remetilación.

En la población mestizo mexicana nuestro grupo de trabajo observó que las concentraciones de Hcy están elevadas, no sólo cuando se determina en ayuno sino principalmente después de una carga oral de metionina. Lo anterior hace suponer que alteraciones en la vía de la transulfuración cuya enzima responsable es la enzima CBS podrían justificar la HHC. Los niveles de Hcy moderadamente elevados se asociaron a mutaciones en estado heterocigoto en el gen de la enzima CBS. Estudios posteriores demostraron que dichas mutaciones se encuentran en menos del 1% de la población general.

Yang *F et al*, estudió las secuencias intrónicas de la enzima CBS en un grupo de pacientes con enfermedad arterial coronaria prematura y describió una modificación genética consistente en un repetido de 31 pares bases en tándem que se localiza en el borde exón-intron 13 (59). Se ha sugerido que este repetido podría ocasionar un splicing alternativo con un funcionamiento anormal de la proteína CBS (60). En nuestro estudio identificamos el VNTR de 31bp mediante secuenciación, sin embargo, al comparar en GenBank, identificamos que esta secuencia se encuentra en el borde exón-intrón 15, participando en las secuencias codificantes de la proteína así como en el sitio de splicing.

El VNTR de 31bp se asoció positivamente con HHC postCOM (60,61), sin embargo en otros estudios no se identificó diferencia en la concentración de Hcy de acuerdo al genotipo (59). En este estudio tampoco encontramos asociación entre la concentración de Hcy en ayuno o postCOM con el número de repetidos.

Tanto en población mestiza como en población indígena el VNTR de 31bp presentó de 17 a 26 repetidos, previamente sólo se había reportado de 15 a 21 repetidos (60) y de 15 a 20 repetidos (59), esto en población holandesa y del medio oeste de Estados Unidos, respectivamente. En el estudio realizado en sujetos descendientes de la cohorte de Framingham (61) también se observó de 15 a 21 repetidos.

Existen pocos estudios publicados acerca del VNTR de 31bp para comparar nuestros resultados. Identificamos que esta secuencia polimórfica posee un número alto de repetidos, incluso mayor a lo reportado previamente. El alelo con 22 repetidos fue el más prevalente y podría ser la causa de la HHC postCOM sugiriendo la presencia de una

proteína CBS anormal. En la población mestiza existe una correlación positiva entre las concentraciones de Hcy en ayuno y después de una COM con la edad, lo que podría explicarse por un funcionamiento alterado de la proteína CBS en el envejecimiento. Se estableció como punto de corte $>/<$ de 60 años con un nivel adecuado de discriminación.

En la población indígena se identificó el alelo 22 en estado homocigoto como el más prevalente. No haber encontrado diferencia en las frecuencias alélicas entre la población mestiza e indígena sugiere una alta conservación de estas secuencias a nivel poblacional, las cuales podrían servir de marcadores distintivos de una población.

Otras causas asociadas a HHC son las deficiencias en ácido fólico y vitamina B12. En este estudio no encontramos alteraciones en sus concentraciones con respecto al valor reportado como normal ni tampoco asociación con las concentraciones de Hcy.

11. CONCLUSIONES

La hiperhomocistinemia es un factor de riesgo demostrado para aterotrombosis.

En nuestra población existe una prevalencia elevada de enfermedad cardiovascular y se ha observado que las concentraciones de homocisteína plasmática en ayuno y postcarga oral de metionina son mayores en comparación con otras poblaciones. No se encontró asociación entre la concentración de Hcy con el género, los niveles de ácido fólico o vitamina B12, sin embargo, la edad tiene una asociación directa tanto con los niveles en ayuno como postCOM.

El repetido en tándem de 31 pares de bases en la enzima CBS en nuestra población presenta el número de repetidos más alto reportado en la literatura (22 repetidos) lo cual probablemente condicione las concentraciones elevadas de homocisteína.

El VNTR de 31 bp se encuentra en el borde exón-intrón 15 del gen de la enzima CBS, esta localización implica repercusiones tanto en las secuencias codificantes como en el sitio de splicing, lo cual puede ocasionar cambios en la estructura de la proteína condicionando alteraciones en su funcionamiento. Sería interesante realizar estudios de proteómica para aclarar si el funcionamiento de la enzima CBS se modifica con los diferentes repetidos en tándem.

Los 22 repetidos en tándem de 31 pares de bases de la enzima CBS es el alelo polimórfico más prevalente en la población mestiza e indígena y el resto de los alelos se encontraron con una frecuencia similar en ambas poblaciones.

El incremento en las concentraciones de Hcy asociado a un número elevado de elementos repetidos de 31bp en el gen de la enzima CBS podría predisponer a aumento en el riesgo de enfermedad cardiovascular.

12. BIBLIOGRAFIA.

1. Pasternak RC, Grundy SM, Levy D. 27th Bethesda Conference. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:978-990.
2. Harjai KJ. Potential new cardiovascular risk factors: Left ventricular hypertrophy, homocysteine, lipoprotein(a), triglycerides, oxidative stress, and fibrinogen. *Ann Intern Med* 1999;131:376-386.
3. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997; 337:230-236.
4. Taylor LM Jr, Moneta GL, Sexton GJ. Prospective blinded study of the relationship between plasma homocysteine and progression of symptomatic peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 1999; 48:1047-1051.
5. Antoniadis C, Antonopoulos AS, Tousoulis D, Marinou K, Stefanadis C. Homocysteine and coronary atherosclerosis: from folate fortification to the recent clinical trials. *Eur Heart J* 2009; 30: 6–15.
6. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2002;288:2015–2022.
7. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002;325:1202.
8. Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, as a risk factor for vascular disease: Plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med* 1989;114:473-477.
9. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine pathways and regulations. *Eur J Pediatr* 1998;157:S40-S44.
10. Maron BA, Loscalzo J. Homocysteine. *Clin Lab Med* 2006; 26: 591–609.
11. D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and thrombotic disease. *Blood* 1997;90:1-11.
12. Moghadasian MH, McManus BM, Frohlich J. Homocysteine and coronary artery disease. *Arch Intern Med* 1997;157:2299-2308.
13. Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr.* 1991;55:131-138.
14. Seshadri N, Robinson K. Homocysteine, B12 vitamin and coronary artery disease. *Clin Med North Am* 2000 (1): 219-241.
15. Alemán G, Tovar A, Torres N. Metabolismo de la homocisteína y riesgo de enfermedades cardiovasculares: importancia del estado nutricional en ácido fólico, vitaminas B6 y B12. *Rev Inv Clin* 2001;53:141-151.
16. Refsum H, Helland S, Ueland PM. Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin Chem* 1985;31:624-628.
17. Garrow TA. Purification, kinetic properties, and cDNA cloning of mammalian betaine-homocysteine methyltransferase. *J Biol Chem* 1984;271:22831-22838.
18. Marinou K, Antoniadis C, Tousoulis D, Pitsavos C, Goumas G, Stefanadis C. Homocysteine: a risk factor for coronary artery disease? *Hellenic J Cardiol* 2005; 46:59–67.
19. Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Chem* 1984;259:9508-9513.
20. Dudman NPB, Guo XW, Gordon RB. Human homocysteine catabolism. Three major pathways and their relevance to development of arterial occlusive disease. *J Nutr* 1996;126:1295S-1300S.
21. Van den Berg M, Boers GHJ. Homocystinuria: what about mild hyperhomocysteinemia?. *Postgrad Med J* 1996;72:513-518.
22. Bostom AG, Jacques PF, Nadeau MR. Post-methionine load hyperhomocysteinemia in persons with normal fasting total homocysteine. *Atherosclerosis* 1995; 116:147-151.
23. Graham IM, Daly LE, Refsum HM. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA* 1997;277:1775-1781.
24. De Vriese AS, De Sutter JH, De Buyzere M, Duprez D. Mild to moderate hyperhomocysteinemia in cardiovascular disease. *Acta Cardiol* 1998;53:337-334.
25. Guba SC, Fink LM, Fonseca V. Hyperhomocysteinemia an emerging and important risk factor for thromboembolic and cardiovascular disease. *Am J Clin Pathol* 1996;105:709-722.

26. Van der Griend R, Hass FJ, Duran M. Methionine loading test is necessary for detection of hyperhomocysteinemia. *J. Lab Clin Med* 1998;132:67-72.
27. Minniti G, Mannucci PM. Role of methionine load in detection of mild hyperhomocysteinemia. *J Inherit Metab Dis* 2003;26(Suppl 1):52-56
28. Kang SS, Wong PWK, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr* 1992;12:279-298.
29. Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem* 1998;44:1833-1843.
30. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998;338:1042-1051.
31. De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited thrombophilia: Pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood* 1996;87:3531-3544.
32. Ganji V, Kafai MR. Demographic, health, lifestyle, and blood vitamin determinants of serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Am J Clin Nutr* 2003;77:826–33.
33. Bermúdez M, Briceño I, Gil F, Bernal J. Homocisteína y polimorfismos de cistationina β sintasa y metilentetrahidrofolato reductasa en población sana de Colombia. *Colomb Med* 2006; 37 (1): 46-52.
34. Sassi S, Cosme B, Palareti G, Legnani C, Grossi G, Musolesi S, Coccheri S. Influence of age, sex and vitamin status on fasting and post-methionine load plasma homocysteine levels. *Haematologica* 2002; 87:957-964.
35. Bescond A., Augier T, Chareye C, Garcon D. Influence of homocysteine on matrix metalloproteinase-2: activation and activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;263:498-503.
36. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993;270:2693-2698.
37. Brattstrom L, Israelsson B, Lindgard F. Higher total plasma homocysteine in vitamin B12 deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionine B-synthase deficiency. *Metabolism* 1998;37:175-178.
38. Kang SS, Wong PWK, Norussis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism* 1987;36:458-62.
39. Harpel P, Chang VT, Borth W. Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhance the binding of lipoproteins (a) to fibrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;54:550-552.
40. McCully KS. Homocysteine, folate, vitamin B6 and cardiovascular disease. *JAMA* 1998;279:392-393.
41. Bland AD. Endothelial cell damage and homocysteine. *Atherosclerosis* 1994;94:89-91.
42. Geisel J, Zimbelmann I, Schorr H, Knapp JP, Bodis M, Hübner U, Herrmann W. Genetic Defects as Important Factors for Moderate Hyperhomocysteinemia. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39(8):698–704.
43. Morales JJ, Sánchez B, Verdejo J, Ponce de León S, Mutchinick OM. La hiperhomocysteinemia como factor de riesgo en una población mexicana. *Arch Cardiol Mex* 2003; 78 (1): S103-S105.
44. Urreiziti R, Balcalls S, Rodés M, Vilarinho L, Baldellou A, Couce ML, Muñoz C, Campistol J, Pintó X, Vilaseca MA, Grinberg D. Spectrum of CBS Mutations in 16 Homocystinuric Patients from the Iberian Peninsula: High Prevalence of T191M and Absence of I278T or G307S. *HUMAN MUTATION Mutation in Brief #624 (2003) Online*.
45. (<http://www.uchsc.edu/sm/cbs>)
46. Münke M, Kraus JP, Ohura T, Francke U. The gene for cystathionine β -synthase (CBS) maps to the subtelomeric region on human chromosome 21q and to proximal mouse chromosome 17. *Am.J.Hum.Genet* 1998; 42: 550-559.
47. Kraus JP, Oliveriusova J, Sokolova J, Kraus E, Vlcek C, de Franchis R, Maclean KN, Bao L, Bukovska G, Patterson D, Paces V, Ansorge W, Kozich V. The human cystathionine β -synthase (CBS) gene: complete sequence, alternative splicing and polymorphisms. *Genomics* 1998; 52: 312-324.
48. Bao L, Vlcek C, Paces V, Kraus JP. Identification and tissue distribution of human cystathionine beta-synthase messenger-RNA isoforms. *Arch.Biochem.Biophys* 1998; 350: 95-103.

49. Meier M, Janosik M, Kery V, Kraus JP, Burkhard P. Structure of human cystathionine b-synthase: a unique pyridoxal 5'-phosphate-dependent heme protein. *EMBO J* 2001; 20:3910-3916.
50. Ignoul S, Eggermont J. CBS domains: structure, function, and pathology in human proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 289: C1369–C1378.
51. Bateman A. The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria protein. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 12-13.
52. Kluijtmans LA, Boers GH, Kraus JP, van den Heuvel LP, Cruysberg JR, Trijbels FJ, Blom HJ. The Molecular Basis of Cystathionine beta-Synthase Deficiency in Dutch Patients with Homocystinuria: Effect of CBS Genotype on Biochemical and Clinical Phenotype and on Response to Treatment. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 59-67.
53. Gallagher PM, Meleady R, Shields DC, Soon TK, McMaster D, Rozen R, Alun E, Graham IM, Whitehead AS. Homocysteine and risk of premature coronary heart disease. Evidence for a common gene mutation. *Circulation* 1996; 94: 2154–2158.
54. Kluijtmans LA, van den Heuvel LPWJ, Boers GHJ, Frosst P, Stevens E, van Oost BA, den Heijer M, Trijbels FJ, Rozen R, Blom HJ. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996, 58: 35–41.
55. Kluijtmans LAJ, Boers GHJ, Trijbels FJM, van Lith-Zanders HMA, van den Heuvel LPWJ, Blom HJ. A common 844INS68 insertion variant in the cystathionine β -synthase gene. *Biochem.Mol.Med* 1997; 62: 23-25.
56. Sperandeo MP, de Franchis R, Andria G, Sebastio G. A 68-bp insertion found in a homocystinuric patient is a common variant and is skipped by alternative splicing of the cystathionine β -synthase mRNA. *Am.J.Hum.Genet* 1996; 59: 1391-139.
57. Romano M, Marcucci R, Buratt E, Ayala M, Sebastio G, Baralle E. Regulation of 3' Splice Site Selection in the 844 ins 68 Polymorphism of the Cistathionina β synthase Gene. *J. Biological Chemistry* 2002; 277: 43821-43829.
58. Franco RF, Elion J, Lavinha J, Krishnamoorthy R, Tavella M H. Heterogeneous ethnic distribution of the 844ins68 in the cystathionine beta-synthase gene, *Hum Hered* 1998; 48:338-342.
59. Yang F, Hanson NQ, Schwichtenberg K, Tsai MY. Variable Number Tandem Repeat in Exon/Intron Border of the Cystathionine Beta-Synthase Gene: A Single Nucleotide Substitution in the Second Repeat Prevents Multiple Alternate Splicing. *Am. J Med Genet* 2000; 95:385-390.
60. Lievers KJA, KluijtmansLAJ, Heil SG, Borres GHL, Verhoef P, van Oppenraay-Emmerzaal D, den Heijer M, Trijbels FJM, Blom HJ. A 31 bp VNTR in the cystathionine b-synthase (CBS) gene is associated with reduced CBS activity and elevated post-load homocysteine levels. *European Journal of Human Genetics* 2001; 9: 583-589.
61. Lievers KJA, Kluijtmans LAJ, Blom HJ, Wilson PW, Selhub J, Ordovas JM. Association of a 31 bp VNTR in the CBS gene with postload homocysteine concentrations in the Framingham Offspring Study. *European Journal of Human Genetics* 2006;14: 1125–1129.
62. Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS. A vision for the future of genomics research. *Nature* 2003;422:835-847.
63. Guttmacher AE, Collins FS. Wellcome to the genomic era. *N Engl J Med* 2003;349:996-998.
64. www.inmegen.gob.mx
65. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0903045106
66. Lisker R, Ramirez E, Babinsky V. Genetic structure of autochthonous populations of Meso-America: Mexico. *Hum Biol.* 1996, 68:395-404.
67. Bazzano LA, He J, Muntner P, Vupputuri S, Whelton PK. Relationship between Cigarette Smoking and Novel Risk Factors for Cardiovascular Disease in the United States. *Ann Intern Med.* 2003;138:891-897.
68. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, Johnston C, Engbaek F, Schneede J, McPartlin C, Scott JM. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem.* 2004;50:3-32.
69. Carducci C, Birarelli M, Nola M, Antonozzi I. Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of homocysteine in plasma samples. *J Chromatogr A.* 1999;18;846(1-2):93-100.

13. ANEXOS

ANEXO 1

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

Número:

Nombre:

Edad:

Sexo:

Area geográfica:

| | PRESENTE | AUSENTE | TIPO |
|---------------|---------------|---------|---------------|
| VTNR de 31 bp | | | |
| | PRESENTE | AUSENTE | CONCENTRACION |
| HHC en ayuno | | | |
| HHC postCOM | | | |
| | CONCENTRACION | | |
| Vitamina B12 | | | |
| Acido fólico | | | |

Comentarios: _____

México, D.F. a de de 20__.

HOJA DE INFORMACIÓN PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS Y MUTACIONES DEL GEN DE LA ENZIMA CISTATIONINA BETA SINTASA EN POBLACIONES MEXICANAS Y SU ASOCIACION CON HIPERHOMOCISTEINEMIA

Investigadores:

Dra. Erika Coria Ramírez y Dr. Abraham Majluf Cruz

Instituto Mexicano del Seguro Social

La siguiente información describe el protocolo y su papel como participante.

Estimado Sr. (a): Me permito solicitarle unos momentos de su atención para informarle de las características del estudio que estoy realizando. La hiperhomocistinemia es una enfermedad grave que puede afectar a cualquier individuo, consiste en el aumento en la sangre de un compuesto llamado homocisteína. La homocisteína se ha asociado con el desarrollo de trombosis venosa y aterosclerosis, esto puede deberse a múltiples causas y aunque se conocen muchas de ellas, otras no están perfectamente establecidas. El objetivo de nuestro estudio es conocer la frecuencia de mutaciones en una enzima conocida como cistationina beta sintasa, las cuales podrían ocasionar incremento de la homocisteína en la sangre, y secundariamente, trombosis arterial o venosa.

Si consiente en participar sucederá lo siguiente:

1. Se le tomará una muestra de sangre (5 mL) en ayuno.
2. Deberá ingerir una carga oral de metionina (COM). La cual consta de 100 mg/kg de peso de metionina disueltos en 200 mL de jugo de naranja. Esta se tomará a la media noche y se tomará una muestra de sangre de 3 mL a las 8:00 h del día siguiente.

Las molestias del estudio consisten exclusivamente en las punciones que se requieren para obtener la sangre y no tiene costo alguno. El único riesgo que existe es que después de ingerir la COM puede que se presente náusea o cefalea. También puede que presente dolor y amoratamiento en el sitio de extracción, los cuales desaparecerán en poco tiempo. Este

estudio no le proporciona ningún beneficio adicional a conocer los resultados que se obtengan al final del estudio, sin embargo, los resultados que se obtengan al final del estudio aportarán información nueva e importante sobre la frecuencia en la que se presentan las mutaciones en la proteína ya mencionada. Esto permitirá que se desarrollen medidas para la prevención de la hiperhomocistinemia en las personas que presenten este trastorno.

Las muestras sanguíneas obtenidas serán resguardadas por un período de 10 años. Los datos obtenidos de su persona son absolutamente confidenciales, no serán utilizados con otro fin diferente al de esta investigación.

Gracias anticipadas por su comprensión de la trascendencia de este estudio. El investigador contestará cualquier pregunta sobre esta forma o el estudio.

A T E N T A M E N T E.

Dra. Erika Coria Ramírez

Dr. Abraham Majluf Cruz.

Instituto Mexicano del Seguro Social

Unidad de Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis. HGR N°1. IMSS. México, D.F. Tel 55392822 ext 20855.

ANEXO 3

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Por medio de este conducto y luego de haber leído la carta de información pertinente, yo _____, hago de su conocimiento que libre y voluntariamente he aceptado en participar en el proyecto de investigación **“ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS Y MUTACIONES DEL GEN DE LA ENZIMA CISTATIONINA BETA SINTASA EN POBLACIONES MEXICANAS Y SU ASOCIACION CON HIPERHOMOCISTEINEMIA”** que se realizará en el Hospital General Regional No 1 de la Ciudad de México. Estoy consciente que para tal estudio es necesario que me sean extraídos 5 mL de sangre en una punción en ayuno y después de una carga oral de metionina; estoy enterado de los riesgos que esto implica. Es de mi conocimiento que la información que se obtenga de mi persona será confidencial , que las muestras sanguíneas se resguardarán por un período de 10 años y seré libre de retirarme del proyecto en el momento que yo así lo desee. También puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en este estudio.

A T E N T A M E N T E.

Nombre _____ Firma _____

Testigo _____ Testigo _____

Fecha _____

ANEXO 4

DETERMINACIÓN DE VITAMINA B12 Y ÁCIDO FÓLICO

La cuantificación de vitamina B12 y ácido fólico se llevará a cabo mediante un método nefelométrico utilizando el equipo comercial DADE-BERHING.

PROCEDIMIENTO PARA MEDIR ÁCIDO FÓLICO EN SUERO O PLASMA:

1. La muestra de suero debe recibir tratamiento para liberar el folato de las proteínas endógenas de fijación.
2. Después de neutralizar la mezcla, se añaden a la cubeta de reacción la proteína de unión a folato, proteína anti-folato de ratón, conjugado de ácido fólico-fosfatasa alcalina y anticuerpo de cabra anti-ratón unidos a partículas paramagnéticas. El folato en la muestra compite con el conjugado de ácido fólico-fosfatasa alcalina por los lugares de fijación sobre una cantidad limitada de proteína de fijación de folato.
3. Los complejos resultantes se fijan a la fase sólida a través de la proteína de fijación anti-folato de ratón.
4. La separación en un campo magnético y el lavado eliminan las moléculas no unidas a la fase sólida.
5. Se añade un sustrato quimioluminiscente, Lumi-Phos 530, a la cubeta de reacción y, utilizando un luminómetro, se mide la luz generada por la reacción. La producción de luz es inversamente proporcional a la concentración de folato en la muestra. La cantidad de analito en la muestra se determina por medio de una curva de calibración de puntos múltiples acumulada.

PROCEDIMIENTO PARA MEDIR VITAMINA B12 EN SUERO O PLASMA:

1. Se añade una muestra de plasma o suero a la cubeta de reacción junto con cianuro potásico alcalino y ditiotritol. Este tratamiento desnaturaliza las proteínas de unión a B12 y convierte todas las formas de vitamina B12 a la forma de cianocobalamina.
2. Después de la neutralización se añade a la muestra el factor conjugado con fosfatasa alcalina y partículas paramagnéticas revestidas con IgG anti-ratón: monoclonales de ratón anti-factor intrínseco. La vitamina B12 se une en la muestra

al conjugado del factor intrínseco impidiendo que el conjugado se una a la fase sólida del anti-factor intrínseco.

3. La separación en un campo magnético y el lavado eliminan los materiales no fijados a la fase sólida.
4. Se añade un sustrato quimioluminiscente, Lumi-Phos 530 a la cubeta de reacción y, utilizando un luminómetro, se mide la luz generada por la reacción. La producción de fotones es inversamente proporcional a la concentración de vitamina B12 en la muestra. La cantidad de analito en la muestra se determina por medio de una curva de calibración de puntos múltiples acumulada.

DETERMINACIÓN HOMOCISTEINA

La cuantificación de la Hcy plasmática se realizará en la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis del HGR Gabriel Mancera, utilizando cromatografía líquida de alta resolución de acuerdo a la técnica previamente descrita por Refsum y Carducci (68,69).

El plasma será separado de las células sanguíneas inmediatamente después de haberse obtenido la muestra, mediante centrifugación, y será almacenado a -80° hasta la determinación. Los niveles de Hcy total plasmática se determinarán con HPLC con detección de fluorescencia de acuerdo a la siguiente técnica:

1. Descongelar las muestras y tomar 100 μ L.
2. Adicionar 20 μ L del estándar interno (ácido homocisteico) y 20 μ L del agente reductor ditioetritol (DTE).
3. Agitar y esperar 10 minutos.
4. Precipitar las proteínas adicionando 300 μ L de ácido iodoacético 50 mM diluido en perclórico al 6%. La Hcy es carboximetilada con el iodoacetato antes de la derivatización con o-ftaldialdehído (OPA).
5. Centrifugar por 10 minutos a 15,000 RPM.
6. Filtrar el sobrenadante.
7. Colocar 100 μ L en un vial y añadir 30 μ L de NaOH 3N y agitar.
8. Añadir 20 μ L de OPA y agitar.
9. Mantener la temperatura de cada vial a 4 $^{\circ}$ C hasta su procesamiento.
10. Inyectar un volumen de 10 μ L.
11. Obtener el cromatograma para su análisis.

La determinación se llevará a cabo en un módulo de separación 2690 y un detector de fluorescencia (excitación de 338 nm, emisión de 425 nm), de Waters technologies Corp. La separación se efectuará en una columna analítica Kingsorb C18, 150 x 4.6 mm, 3 μ m (Phenomenex).

Se requieren dos disolventes, A: 0.02M de fosfato de sodio, amortiguar a pH 7, tetrahidrofurano 96:4 (100 mL NaPO_4^- , 80 mL de tetrahidrofurano y 820 mL de agua destilada). B: 0.02M de fosfato de sodio, amortiguar a pH 7, acetonitrilo 45:55 (100 mL de

PO₄, 400 mL de agua destilada y 1500 mL de acetonitrilo). La determinación de la Hcy se obtendrá mediante un gradiente lineal de disolventes, sus concentraciones son:

| Minuto | A | B |
|--------|-----|------|
| 0 | 78% | 22% |
| 7 | 70% | 30% |
| 13 | 0 | 100% |
| 16 | 0 | 100% |
| 17 | 78% | 25% |

Para la separación de los componentes de la muestra se requerirá un flujo de 1.3 mL/min a una presión menor a 3500 psi. La temperatura de la columna se mantendrá a 40 °C.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud

Dictamen de Autorizado

COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD 3609

FECHA **28/05/2010**

Estimado Abraham Salvador Majluf Cruz

P R E S E N T E

Tengo el agrado de notificarle que, el protocolo de investigación en salud presentado por usted, cuyo título es:

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS Y MUTACIONES DEL GEN DE LA ENZIMA CISTATIONINA BETA SINTASA EN POBLACIONES MEXICANAS Y SU ASOCIACION CON HIPERHOMOCISTEINEMIA.

fue sometido a consideración del Comité Local de Investigación en Salud, quien de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores consideraron que cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética médica y de investigación vigentes, por lo que el dictamen emitido fue de: **A U T O R I Z A D O**.

Habiéndose asignado el siguiente número de registro institucional

| |
|------------------------|
| No. de Registro |
| R-2010-3609-10 |

Atentamente

Dr(a). Carlos Ernesto Castillo Herrera
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud Núm 3609

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL