

Homocistinuria

Casos diagnosticados en Colombia

Martha Bermúdez, Jaime Bernal, Eugenia Espinosa, William Cornejo, Ignacio Briceño, Juan Prieto, Leopoldo Arrieta, Begonia Merinero, Celia Pérez, Magdalena Ugarte

RESUMEN

Introducción. La homocistinuria es un error innato del metabolismo causado por deficiencia de algunas de las enzimas que intervienen en el catabolismo de la metionina, entre éstas la metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR) o la cistationina b sintasa (CbS). La deficiencia de CbS es el defecto bioquímico más común para esta enfermedad y se han descrito 104 mutaciones en esta enzima.

Objetivo. Establecer una aproximación diagnóstica para la homocistinuria.

Material y métodos. Cuantificación de metionina y de homocisteína total en plasma y confirmación del defecto bioquímico que ocasiona la enfermedad en siete pacientes colombianos identificados clínicamente como homocistinúricos.

Resultados. La confirmación del defecto bioquímico se demuestra por cuantificación de la actividad de las enzimas estudiadas, siendo normal para la MTHFR en linfocitos mientras que la CbS extraída del cultivo de fibroblastos de estos pacientes fue deficiente, al compararla con los controles.

Conclusiones. Se establece un protocolo de estudio para pacientes con esta alteración bioquímica presente en mues-

tra población. Se adelantan estudios para establecer la causa molecular de esta enfermedad en Colombia (*Acta Neurol Colomb* 2003; 19: 63-68).

Palabras clave: homocistinuria, hiperhomocisteinemia, deficiencia de la cistationina b sintasa

SUMMARY

Introduction. The homocysteinuria is an inherited metabolic disease caused by deficiency of some of the enzymes that work in the catabolism of methionine, such as methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) or cystathionine b synthase (CbS). The CbS deficiency is the most common biochemical defect found for this disease and 104 mutations have been found for this enzyme.

Objective. To establish a diagnostic pathway for homocysteinuria.

Materials and methods. methionine and homocysteine total quantification in plasma, and the biochemical defect was confirmed for seven Colombian patients clinically identified before as homocysteinurics.

Results. The biochemical defect confirmation was done by studied enzyme activity quantification that was normal for MTHFR in lymphocytes, while for the extracted CbS from patient's fi-

broblast culture was deficient when it was compared with controls.

Conclusion. A study protocol was established for patients with the biochemical defect that has demonstrated being present in our population. Current studies are looking for the molecular cause for this disease in Colombia. (*Acta Neurol Colomb* 2003; 19: 63-68).

Key words: homocysteinuria, inherited metabolic disease, cystathionine b synthase.

INTRODUCCIÓN

La homocistinuria es un error innato del metabolismo (EIM) descrito por primera vez por Carson en 1962 (1); ocasionado con mayor frecuencia por la deficiencia de la enzima cistationina b sintasa CbS (MIM No. 236200), esta enzima interviene en el catabolismo del aminoácido esencial conocido como metionina. La CbS es dependiente del cofactor fosfato de piridoxal (PLP) y condensa la serina con la homocisteína para producir cistationina en un paso irreversible en el proceso de transulfuración de la metionina (2). Esta enfermedad se hereda de forma recesiva autosómica (3). La deficiencia de esta enzima produ-

Recibido: 27/04/2003. Sin modificación: 27/05/2003

Dr. Martha Bermúdez: Instituto de Genética Pontificia Universidad Javeriana, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; Jaime Bernal: Instituto de Genética Pontificia Universidad Javeriana; Eugenia Espinosa: Hospital Militar Neuropediatría. Universidad Militar Nueva Granada; William Cornejo: Facultad de Medicina Universidad de Antioquia; Dres. Ignacio Briceño, Juan Prieto, Leopoldo Arrieta: Instituto de Genética Pontificia Universidad Javeriana; Dres. Begonia Merinero, Celia Pérez, Magdalena Ugarte: Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares Universidad Autónoma de Madrid

Correspondencia: Dra. Martha Bermúdez, e-mail: martha.bermudez@javeriana.edu.co

ce una elevación de la homocisteína total en plasma, excreción de homocisteína en orina, elevados niveles de metionina en plasma y niveles disminuidos de cistationina y de cisteína. Las manifestaciones clínicas de la deficiencia de la CbS son variadas: hay diferentes sistemas del organismo afectados como son: ocular (severa miopía y *ectopia lentis*), esquelético (osteoporosis, escoliosis, hábitos marfanoides), vascular (arterioesclerosis prematura) y nervioso central (retardo mental, convulsiones y trastornos psiquiátricos) (4). Se estima en población blanca una frecuencia para la deficiencia de CbS entre 1:20,500 y 1:355,000 (4).

El diagnóstico se realiza con el cuadro clínico: subluxación del cristalino, alteraciones esqueléticas, dismorfias, enfermedad cerebrovascular temprana con hemiparesia secundaria, retardo mental, o trastornos del aprendizaje; los estudios iniciales se realizan mediante la identificación de metabolitos en orina utilizando nitroprusiato de sodio y de plata, separación de aminoácidos en orina y en plasma por cromatografía en capa fina, con posterior cuantificación de aminoácidos y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La cuantificación de la CbS en cultivo de fibroblastos permite confirmar el defecto en homocigotos pero no permite discriminar heterocigotos (5).

El tratamiento se realiza con la administración de vitamina B6 precursor del PLP (6). Algunos pacientes responden al tratamiento disminuyendo las concentraciones plasmáticas de homocisteína y mejorando su condición clínica, mientras que en otros casos los resultados del manejo no son eficaces; aquellos pacientes que no responden a la piridoxina por lo general están más afectados y pueden tra-

tarse con combinaciones de ácido fólico, hidroxicobalamina o betaina para estimular la remetilación de la homocisteína a metionina.

La diversidad clínica y la diferencia en las respuesta a la piridoxina sugieren diversidad genética en la deficiencia de CbS (7).

La CbS es un homotetrámero formado por subunidades de 63 Kda, cada una está unida a dos sustratos, el fosfato de piridoxal y la adenosilmetionina; el polipéptido tiene 551 aminoácidos (8). El gen ha sido mapeado en el cromosoma 21q22.3 (9). Tiene 28.046 nucleótidos y 23 exones. La proteína es codificada por los exones 1 al 14 y el 16; alternativamente el 15 codifica 14 aminoácidos incorporando en algunos mRNA de CbS humana y el polipéptido que contiene este exón no ha sido detectado en varios tejidos humanos. Se han identificado aproximadamente 104 mutaciones en el gen de la CbS (10, 11).

En el presente estudio se realiza una aproximación al diagnóstico de homocistinuria basado en las manifestaciones clínicas, y la relación con un caso índice en una familia, seguido de pruebas bioquímicas que han permitido confirmar el defecto metabólico.

Este es el primer trabajo que hace una descripción de pacientes con diagnóstico de homocistinuria en Colombia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Caso 1 SR. Escolar masculino de siete años al diagnóstico. Procedente del departamento de Antioquia. Fruto del primer embarazo de curso normal. Padres no consanguíneos. Parto prolongado, espontáneo. Con retardo en el desarrollo psicomotor, inició sedestación a los seis meses, gateó

a los 14, inició lenguaje a los cuatro años. Presentó *estatus* epiléptico y posteriormente epilepsia focal de lóbulo frontal, siendo las crisis de difícil manejo. Luxación del cristalino; posteriormente, pérdida del lenguaje y marcha. Como antecedentes familiares tiene una hermana con desarrollo psicomotor, pondoestatural y estudios bioquímicos normales, la madre refiere dos sobrinas con dificultades en el aprendizaje. Los abuelos y una tía materna muestran valores moderadamente aumentados de homocisteína. Como tratamiento recibe ácido valproico, clobazán y piridoxina 1.000 mg al día.

Caso 2 JSR. Paciente del sexo masculino con cinco años al diagnóstico. Procedente del departamento de Antioquia. Fruto del 5º embarazo, falleció a los nueve años de falla cardíaca. Embarazo normal. Padres no consanguíneos. Parto prolongado; con retardo en el desarrollo psicomotor inició sedestación a los seis meses, gateó a los 14 meses; marchó con apoyo a los seis años. Retardo del lenguaje. Presentó *estatus* epiléptico, seguido de crisis convulsivas de difícil manejo. Muy inquieto. Amaurosis unilateral. Fue remitido a la unidad de metabólicas con diagnóstico inicial de síndrome de Lennox Gastaut; tenía cinco hermanos aparentemente sanos, una de ellas con estrabismo y fondo de ojo normal. Un sobrino de la madre tiene una miopía importante y problemas de aprendizaje.

Caso 3 SCT. Escolar de sexo femenino al diagnóstico con 12 años de edad. Procedente del departamento de Cundinamarca. Fruto del primer embarazo, controlado. Padres consanguíneos. Parto por cesárea. Desarrollo psicomotor adecuado, inició marcha a los 14 meses. A la edad de seis años se le hace diagnóstico de miopía y astig-

matismo. Cursa un año de bachelato. Tiene una hermana con desarrollo psicomotor, pondoestatural y estudios bioquímicos normales. Como tratamiento recibe ácido fólico 30 mg/día y piridoxina 1.000 mg al día.

Caso 4 AH. Escolar masculino con nueve años al diagnóstico. Padres no consanguíneos. Es hermano del caso 5. Procedente del departamento de Caldas. Fruto del segundo embarazo. Como antecedentes familiares, varios miembros de la familia han muerto por problemas vasculares. Retardo del desarrollo psicomotor. Presentado luxación bilateral del cristalino. Miope, de talla alta y características marfanoides y con diagnóstico de epilepsia. Asiste a educación especial. Electrocardiograma ritmo sinusal normal, TSGO, TSGP y fosfatasa alcalina, colesterol y triglicéridos normales. Tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina normales. Electroencefalograma anormal. Recibe tratamiento con ácido fólico 30 mg/día, piridoxina 1.000 mg al día y ácido valproico.

Caso 5 SH. Escolar masculino de 16 años de edad al diagnóstico. Procedente del departamento de Caldas. Fruto del primer embarazo, padres no consanguíneos. Hermano del caso 4. Embarazo y parto

normales, gateó a los ocho meses, caminó a los 14 meses. Retardo en el desarrollo del lenguaje. Primeros años escolares con muchas dificultades, perdió 6° y 7° grados. Tiene buenas relaciones sociales a pesar de ser un poco tímido. Talla alta, con características marfanoides, Estudiante de regular rendimiento con déficit de atención, problemas de aprendizaje, en la actualidad cursa grado once. Tratamiento: 30 mg de ácido fólico y piridoxina 1.000 mg al día

Caso 6 LT. Paciente de sexo masculino, con siete años de edad al diagnóstico. Procedente del departamento de Caldas. Hijo de padres no consanguíneos. Fruto del primer embarazo. Ha presentado luxación bilateral del cristalino, retardo en el desarrollo psicomotor y talla alta. Asiste a educación especial. No refiere antecedentes familiares. Tratamiento: ácido fólico 30 mg/día y piridoxina 1.000 mg al día.

Caso 7 JGB. Escolar masculino con 10 años al diagnóstico. Procedente del departamento de Antioquia. Embarazo normal, parto normal. Se sentó a los siete meses, caminó a los 14. Dijo las primeras palabras a los ocho meses. Presentó luxación bilateral del cristalino. Talla alta, asistió a educación especial. Actualmente traba-

ja, en ocasiones manifiesta trastornos del comportamiento. Tratamiento: piridoxina 1.000 mg al día

ANÁLISIS BIOQUÍMICO

La identificación de metionina y de sus metabolitos (homocisteína) se realizó utilizando la técnica de nitroprusiato de sodio y de plata (12). El aumento de estos aminoácidos se evidenció por cromatografía en capa fina. Los ácidos orgánicos fueron estudiados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (13). La cuantificación de homocisteína, metionina y cisteína fue medida en un analizador de aminoácidos (14), la actividad de la CbS se realizó según el método utilizado por Fawler *et al* (15) en homogeneizados de fibroblastos procedente de biopsia de piel. La actividad de la MTHFR se realizó según el método utilizado por Kang *et al* (16) en leucocitos de sangre periférica. La proteína se cuantificó según el método utilizado por Lowry *et al* (17).

RESULTADOS

Las tablas 1 y 2 muestran las características de los pacientes según las pruebas de colorimetría y las cromatografías. La tabla 2 y la figura 1 muestran los hallazgos enzimáticos.

Tabla 1. Aproximación bioquímica al diagnóstico de un error innato del metabolismo en pacientes colombianos.

Paciente	Edad al diagnóstico	Género	Nitroprusiato de sodio	Nitroprusiato de plata	Cromatografía de aminoácidos en plasma	Cromatografía de ácidos orgánicos
1	7	M	+	+	Metionina aumentada	Normal
2	5	M	+	+	Metionina aumentada	Normal
3	12	F	+	+	Metionina aumentada	Normal
4	9	M	+	+	Metionina aumentada	Normal
5	16	M	+	+	Metionina aumentada	Normal
6	7	M	+	+	Metionina aumentada	Normal
7	10	M	+	+	Metionina aumentada	Normal

Tabla 2. Niveles de homocisteína total, metionina, cisteína al diagnóstico y actividad de cistationina b sintasa (CbS) y metiltetrahidrofolatorreductasa (MTHFR) en siete pacientes de seis familias colombianas.

Paciente	Hcis. Total µmoles/L	Metionina µmoles/L	Cisteína µmoles/L	CbS nmol cistationina/h/mg proteína	MTHFR nmol/ formaldehído/h/mg proteína
1	399	426	-	0.16	-
2	293	58	-	-	-
3	242	-	55	0.35	1.54
4	372	432	249	0.41	-
5	231	932	201	0.88	3.22
6	265	-	-	0.47	2.38
7	275	816	-	-	-
controles	<10	<35	>269	$\bar{\chi}$ 1.73	$\bar{\chi}$ 1.63

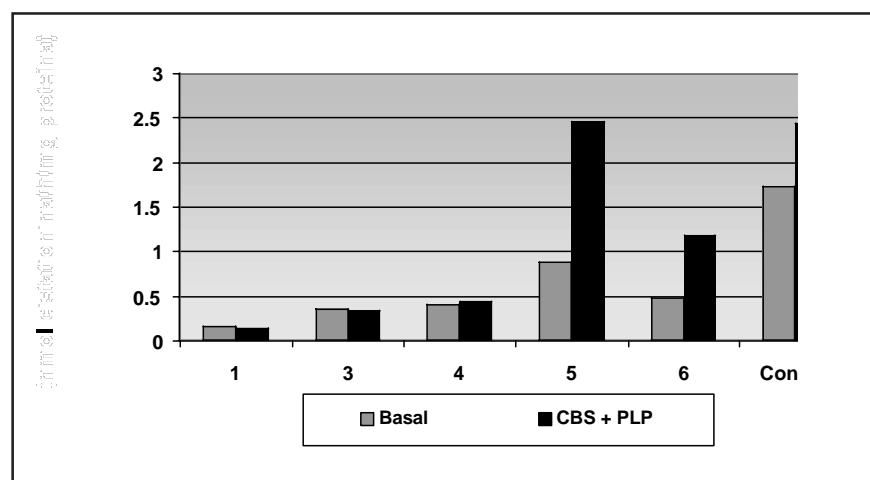


Figura 1. Actividad de CbS en fibroblastos de pacientes.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se describen las manifestaciones clínicas mostradas por los pacientes, que permiten sospechar la presencia de un error innato del metabolismo y la secuencia bioquímica utilizada para la confirmación de la homocistinuria en siete miembros de seis familias colombianas (Figura 2), siendo los primeros casos con esta enfermedad descritos en el país. Los fenotipos clínicos van desde el aparentemente cuadro clínico normal al severo. Las pruebas colorimétricas (nitroprusiato de sodio y de plata) y la cromatografía de aminoácidos evidenciaron la presencia de metionina y de metabolitos de ésta (homocisteína y homocistina). La cuantificación de aminoácidos mostró un aumento en la concentración de metionina y de homocisteína lo cual corresponde a una homocistinuria, por deficiencia funcional de la enzima CbS (18), de la MTHFR (19) de la metilmalonil-CoA mutasa, o la metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasa (20, 21), estas últimas por defecto en el metabolis-

mo de la cobalamina. En este caso la homocistinuria viene acompañada de aciduria metilmalónica lo cual fue descartado por la cromatografía de ácidos orgánicos acoplado a espectrometría de masas.

Para la confirmación del defecto bioquímico se cuantificó la enzima metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR) que mostró valores de actividad similar a los controles, mientras que la cuantificación radiométrica de cistationina b sintasa (CbS) en fibroblastos procedentes de biopsias de piel de estos pacientes fue deficiente al compararla con el grupo control.

En el caso 1 se evidenció un fenotipo severamente afectado, tanto clínica como bioquímicamente, mostrando 0,16 nmol cistationina/h/mg proteína (en los controles =1.73 cistationina/h/mg proteína) siendo la menor actividad cuantificada. El paciente menos afectado (caso 5) mostró una actividad de 0,88 nmol cistationina/h/mg proteína. Los pacientes 4 y 5 son hermanos y presentan un cuadro clínico diferente que se correlaciona con la actividad enzimática detectada.

En el caso 1 se evidenció un fenotipo severamente afectado, tanto clínica como bioquímicamente, mostrando 0,16 nmol cistationina/h/mg proteína (en los controles =1.73 cistationina/h/mg proteína) siendo la menor actividad cuantificada. El paciente menos afectado (caso 5) mostró una actividad de 0,88 nmol cistationina/h/mg proteína. Los pacientes 4 y 5 son hermanos y presentan un cuadro clínico diferente que se correlaciona con la actividad enzimática detectada.

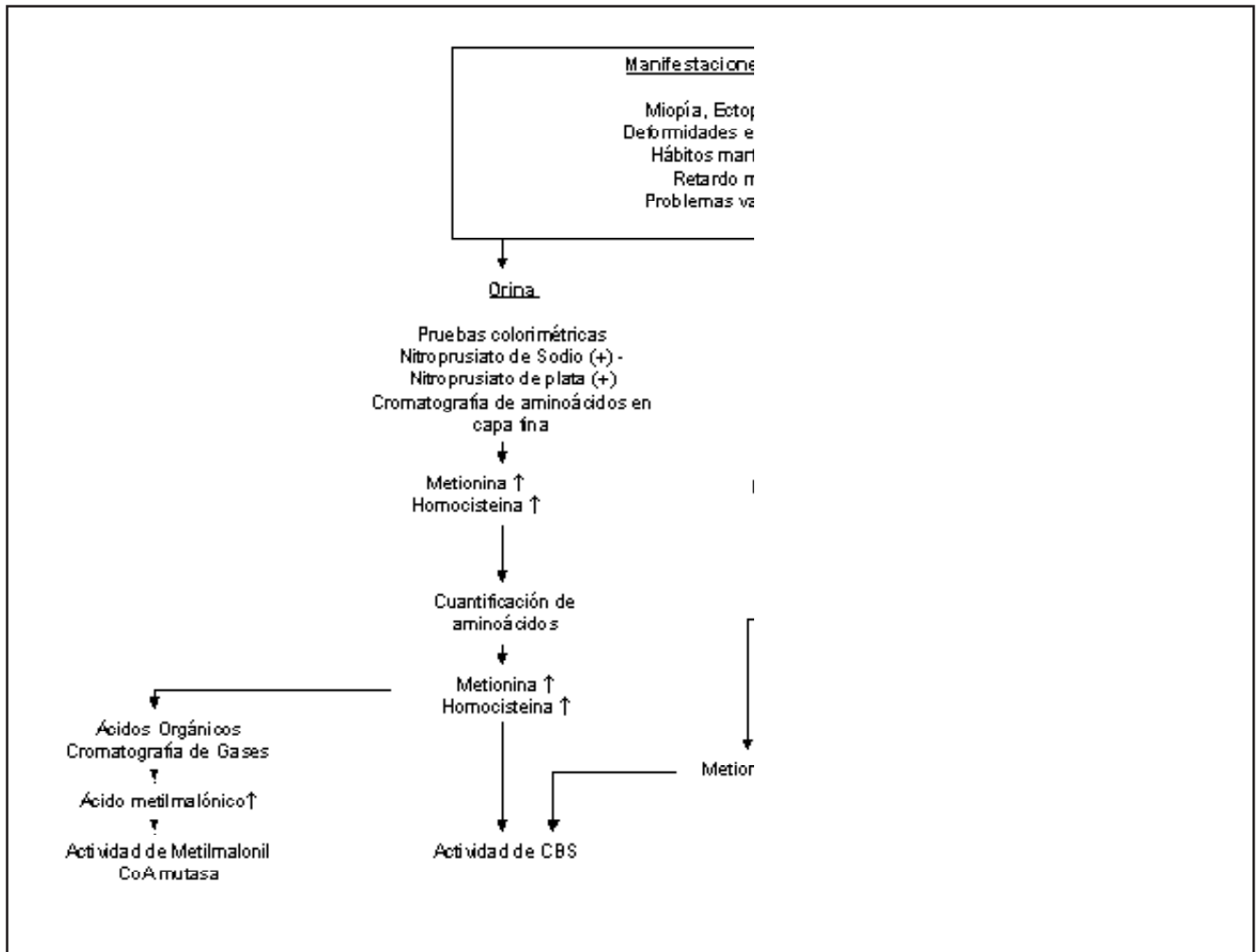


Figura 2. Diagrama para el diagnóstico de paciente con posible homocistinuria.

Los estudios moleculares que se adelantan mostrarán si la deficiencia de la CbS se debe a la misma mutación, con diferente expresión fenotípica como lo describe Kraus (22).

La variación de fenotipos entre pacientes con igual genotipo de CbS puede deberse a la dependencia de actividad de la CbS a otras rutas como la que envuelven la síntesis de cofactores, como adenosilmetionina, fosfato de piridoxal y el grupo hemo (23).

Al tratamiento con dosis farmacológicas de fosfato de piridoxal y ácido fólico, los pacientes 3, 4 y 5, (24) no responden bioquímica-

mente, la concentración de homocisteína no disminuye, sin embargo, se registra mejoría clínica.

In vitro la actividad de la CbS de los pacientes 1, 3, 4 no responde a la presencia del cofactor PLP, mientras que en el paciente 5 se observa un aumento de la actividad enzimática (Figura 1). *In vivo* probablemente el defecto molecular que produce una estructura terciaria o cuaternaria defectuosa de la CbS no le permite realizar un adecuado acople con el sustrato o con los cofactores, mientras que el empleo de condiciones experimentales como pH adecuado, temperatura óptima y utilización de sustrato sintético proporcionan las

condiciones para un respuesta eficiente de la CbS.

CONCLUSIÓN

La homocistinuria es una patología prevalente en los departamentos de Antioquia y Caldas, lo cual amerita un programa de detección temprana que conduzca a la identificación de afectados y portadores e instalación del tratamiento para evitar las secuelas que esta enfermedad produce(25). Adicionalmente la detección de portadores es importante por la relación que en la actualidad se tiene del desarrollo de enfermedades vasculares asociadas con hiperhomocisteinemia (26).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el apoyo financiero de la Pontificia Universidad Javeriana y COLCIENCIAS proyecto 1203-04-10199.

REFERENCIAS

1. **Carson N, Neill D.** Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in northern Ireland. *Arch Dis Childh* 1962; **37**: 505-513.
2. **Mudd DSH, Levy HL, Kraus JP.** Disorders of transsulfuration. In SCRIVER, BEAUDET, SLY & VALLE. The Metabolic and molecular bases of inherited disease Eds, 8th Edición. New York: McGraw Hill Inc. 2001. 2007-2056.
3. **Finkelstein JD, Mudd SH, Irreverre F, Laster L.** Homocystinuria due to cystathionine synthetase deficiency: the mode of inheritance. *Science* 1964; **146**: 785-787.
4. **Gaustadnes M, Wilcken B, Oliveriusova J, McGill J, Fletcher J.** The Molecular Basis of Cystathionine b synthase deficiency in Australian patients: genotype correlations and response to treatment. *Hum Mutat* 2002; **20**: 117-126.
5. **Fheisher LD, Tallan HH, Beratis NG, Hirschhorn K, Gaull GE.** Cystathionine synthase deficiency: heterozygote detection using cultured skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1973; **55**: 38-44.
6. **Shih V.** A Missense Mutation (I278) in the Cystathionine b synthase Gene Prevalent in Pyridoxine-Responsive Homocystinuria and Associated with Mild Clinical Phenotype. *Am J Hum Genet* 1995; **57**: 34-39.
7. **Franchis R, Sperandio M, Sebastio G Andria G.** Clinical aspects of cystathionine b synthase deficiency: How wide is the spectrum? *Eur J Pediatr* 1998; **157** (suppl 2): S 67-S70.
8. **Taoka S, West M, Banerjee R.** Characterization Of The Heme and Pyridoxal Phosphate Cofactors of Human Cystathionine Synthetase reveals Nonequivalent active Sites. *Biochem* 1999; **38**: 2738-2744.
9. **Münke M, Kraus JP, Ohura T, Francke U.** The gene for cystathionine b-synthase (CbS) maps to the subtelomeric region on human chromosome 21p and to proximal mouse chromosome 17. *Am Genet* 1988; **42**: 550-559.
10. **Kraus JP.** Biochemistry and molecular genetics of cystathionine b-synthase deficiency. *Eur J Pediatr Suppl* 1998; **2**: S88-S93.
11. **Kraus JP, Oliveriusova J, Sokolová J, Kraus E. et al.** The Human Cystathionine bSynthase (CbS) Gene Complete Sequence, Alternative Splicing, and Polymorphisms. *Genomics* 1998; **52**: 312-324.
12. **Thomas G, Rodney H.** Selected screening test for genetic metabolic disease :editorial Year book medical publishers, Inc. 1973. 205-210.
13. **Chalmers R, Lawson A.** Organic Acids in man. London New York Chapman and Hall. 1982: 297-326.
14. **Poele M, Berg M, Franken D, Boers G, et al.** The different methods for the determination of total homocysteine in plasma. *AnnClin Biochem*: 1995; **32**: 218-220.
15. **Fowler B, Kraus J, Packman S, Rosemberg LE.** Homocystinuria. Evidence of three distinct classes of cystathionine of synthase mutants in cultured fibroblast. *J Clin Invest* 1978; **61**: 645-653.
16. **Kang S.** Intermediate Homocysteinemia: A Thermolabile Variant of Methylene tetrahydrofolate Reductase. *Am J Human Genet* 1988; **43**: 414-421.
17. **Lowry O, Rosenberg N, Farr, A, Randall R.** Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**: 265-275.
18. **Laster L, Spaeth GL, Mudd SIT, Finkelstein JD.** Homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency. *Ann Intern Med* 1965; **63**: 1117-1142.
19. **Engbersen A, Franken D, Boers Ghj, Stevens M, et al.** Thermolabile 5-10 Methylene tetrahydrofolate Reductase. As a Cause of Mild Homocysteinemia: *Am J Human Genet* 1995; **56**: 142-150.
20. **Urbon A, Aldana J, Reig C, Nieto C, Merinero B.** Aciduria metilmalónica con homocistinuria de inicio neonatal: mejoría bioquímica clínica con betaina. *An Esp Pediatr* 2002; **56**: 337-341.
21. **Sweetman L, Leslie, J Holm J, et al.** Transcobalamin II deficiency presenting with methylmalonic aciduria and homocystinuria and abnormal absorption of cobalamin. *Am J of Med Genet.* 1990. 35: 222-8.
22. **Kraus JP.** Molecular Basis of Phenotype Expression in Homocystinuria. *J Inher Metab Dis* 1994; **17**: 383-390.
23. **Taoka S, West M, Banerjee R.** Characterization Of The Heme and Pyridoxal Phosphate Cofactors of Human Cystathionine Synthetase reveals Nonequivalent active Sites. *Biochem* 1999; **38**: 2738-2744.
24. **Kluijtmans L, Boers Ghj, Kraus J.** The molecular basis of Cystathionine b 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.
25. **Tsai M.** Moderate hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *J Lab Clin Med Online* 2000; **135**: 1.
26. **Maclean K, Gaustadnes M, Oliveriusova J, Janosk M, et al.** High Homocysteine and Thrombosis Without Connective Tissue Disorders Are Associated With a Novel Class of Cystathionine bSynthase (CbS) Mutations. *Hum Mutat* 2002; **19**: 641-655.