# Hiperhomocistinemia y polimorfismo 677C → T de la 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa en hijos de pacientes con enfermedad coronaria prematura

C. Mainou Cid[a], N. García Giralt[b], M.ªA. Vilaseca Buscà[c], I. Ferrer Codina[c], José F. Meco López[d], A. Mainou Pintó[a], X. Pintó Sala[d], D. Grinberg Vaisman[b] y S. Balcells Comas[b]

[a]Servicio de Pediatría. Hospital Universitario Sant Joan de Déu. Barcelona. [b]Departamento de Genética. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. [c]Servicio de Bioquímica. Hospital Universitario Sant Joan de Déu. Barcelona. [d]Unidad de Aterosclerosis. CSUB.

*(An Esp Pediatr 2002; 56: 402-408)*

## Antecedentes

**Los factores relacionados con la hiperhomocistinemia en la población pediátrica con historia de enfermedad coronaria prematura (ECP) no son bien conocidos.**

## Objetivos

**Evaluar la posible asociación entre la homocisteína plasmática, las vitaminas B (folatos, $B_{12}$ y $B_6$) y el polimorfismo 677C → T de la enzima 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en un grupo de hijos de progenitores con ECP.**

## Métodos

**Estudio transversal analítico de 80 hijos (5-18 años) de progenitores con ECP comparando sus valores con los de referencia de edades similares. homocisteína total y vitamina $B_6$: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección fluorimétrica; folato y vitamina $B_{12}$: radioinmunoanálisis; polimorfismo 677C → T de la MTHFR: amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y digestión con Hinfl. Estudio estadístico (SPSS, versión 10.0). Comparaciones: U de Mann-Witney y chi cuadrado; correlaciones de Spearman.**

## Resultados

**Los valores de homocisteína total de los hijos de progenitores con ECP mayores de 10 años fueron significativamente superiores ($p < 0,001$) a los valores de referencia, mientras que los de vitamina $B_{12}$ fueron inferiores ($p = 0,015$), aunque no los de folato y vitamina $B_6$. Se observó una correlación negativa ($p < 0,0001$) entre la homocisteína total y el folato ($r = –0,47$) y la vitamina $B_{12}$ ($r = –0,51$). El 80 % de los hijos con el genotipo TT de la MTHFR presentaron hiperhomocistinemia. Los valores subóptimos de vitaminas mostraron también una asociación el genotipo TT.**

## Conclusiones

**La hiperhomocistinemia de los hijos de pacientes con ECP de nuestro medio se asocian al genotipo TT de la MTHFR y a unas concentraciones bajas de folato. La posibilidad de corregir la hiperhomocistinemia mediante suplementación vitamínica sugiere el interés del estudio familiar de homocisteína en la ECP.**

## Palabras clave:

***Homocisteína. MTHFR. Folatos. Vitaminas $B_{12}$ y $B_6$. Enfermedad coronaria prematura. Niños.***

## HYPERHOMOCYSTINEMIA AND 677C → T METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE POLYMORPHISM AS A CARDIOVASCULAR RISK FACTOR IN CHILDHOOD

## Background

**Factors related to hyperhomocystinemia in the pediatric population of our geographical area with a parental history of premature coronary disease (PCD) are not well known.**

## Objectives

**To evaluate the possible association between plasma total homocysteine (tHcy), the B vitamins involved in its metab-**

***Correspondencia:*** Dr. C. Mainou Cid.
Servicio de Pediatría. Hospital Sant Joan de Déu.
P.º Sant Joan de Déu, 2. 08950 Esplugues. Barcelona.
Correo electrónico: mainou@medicina.ub.es

Recibido en julio de 2001.
Aceptado para su publicación en diciembre de 2001.

**olism (folate, vitamin $B_{12}$ and $B_6$), and 677C → T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in a group of children with a parental history of PCD.**

## Methods

**A cross-sectional analytical study of 80 children (aged 5-18 years old) with a parental history of PCD was performed. Values found in these children were compared with reference values for similar age groups. Plasma tHcy and vitamin $B_6$ were evaluated by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. Folate and vitamin $B_{12}$ concentrations were determined by radioimmunoassay. Detection of 677C → T polymorphism of MTHFR was performed using polymerase chain reaction amplification and Hinfl digestion. Statistical analysis was performed using the SPSS program, version 10.0. Concentrations of tHcy and vitamins were compared using the Mann-Whitney U-test and Spearman's correlation coefficient. The association between phenotype, hyperhomocystinemia and low vitamin concentrations was analyzed using the chi-squared test.**

## Results

**Plasma tHcy values in the children aged more than 10 years with a parental history of PCD were significantly higher ($p < 0.001$) than the reference values. Vitamin $B_{12}$ levels were significantly lower ($p = 0.015$), but neither folate nor vitamin $B_6$ levels differed from the reference values. A negative correlation ($p < 0.0001$) was observed between tHcy and folate ($r = –0.47$) and between tHcy and vitamin $B_{12}$ levels ($r = –0.51$). Eighty percent of the children with the TT genotype of MTHFR showed hyperhomocystinemia. Suboptimal vitamin B levels were also associated with the TT genotype of MTHFR.**

## Conclusions

**Hyperhomocystinemia detected in children with a parental history of PCD is associated with the TT genotype of MTHFR and with low folate levels. Because hyperhomocystinemia can be corrected by vitamin B supplementation, tHcy determination is recommended in the offspring of patients with PCD.**

## Key words:

***Homocysteine. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). Folate. Vitamin $B_{12}$ y $B_6$. Premature coronary disease. Children.***

## INTRODUCCIÓN

La determinación de los factores de riesgo cardiovasculares convencionales en los pacientes pediátricos tiene gran interés, ya que su diagnóstico precoz puede implicar la prevención del proceso aterogénico[1-4]. Sin embargo, la constatación de que estos factores de riesgo convencionales no explican por completo la etiopatogenia de la enfermedad cardiovascular, ha conducido a la búsqueda de nuevos factores. Entre ellos, la hiperhomocistinemia se ha asociado a la enfermedad cardiovascular en numerosos estudios[5-7].

La homocisteína es un aminoácido sulfurado, no proteinógeno, que se genera en el catabolismo de la metionina. La deficiencia de varias enzimas implicadas en su metabolismo causa la acumulación de elevadas concentraciones de este aminoácido en los tejidos y líquidos biológicos, conocida como homocistinuria[8]. En las primeras descripciones de pacientes afectados de homocistinuria clásica (causada por deficiencia de cistationina-β-sintasa, OMIM 236200) se observó la presencia de graves lesiones arterioscleróticas[9]. Por otra parte, se observaron alteraciones del metabolismo de la homocisteína en pacientes con accidentes cardiovasculares prematuros[10]. En la última década se han realizado numerosos estudios que han demostrado la importancia de la homocisteína como factor de riesgo cardiovascular[7,11,12].

La hiperhomocistinemia está determinada por numerosos factores genéticos y ambientales[13]. Entre los factores genéticos, uno de los más importantes es la homozigosidad del polimorfismo 677C → T en el gen que codifica la enzima 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa (MTHFR)[14]. Este polimorfismo causa la sustitución de una alanina por una valina en la posición 225, otorgando termolabilidad a la enzima y reduciendo su actividad catalítica en el 50%.

Como consecuencia de ello se interfiere la síntesis de 5-metiltetrahidrofolato (la forma mayoritaria de folato circulante que proporciona el grupo metilo indispensable para la remetilación de la homocisteína), lo que explica que esta variante enzimática predisponga a la hiperhomocistinemia moderada[15], en particular cuando la concentración de folato es deficiente[16]. Entre los determinantes adquiridos más importantes de hiperhomocistinemia se hallan el déficit de folato y de vitaminas $B_{12}$ y $B_6$, implicadas en el metabolismo de la homocisteína[17-19]. Si bien los estudios epidemiológicos realizados en pacientes adultos con enfermedad coronaria prematura (ECP) demuestran una asociación entre la hiperhomocistinemia y el riesgo vascular, también se ha descrito hiperhomocistinemia en la población pediátrica con progenitores o familiares afectados[2,20], así como una asociación entre la hiperhomocistinemia y los accidentes cerebrovasculares en la infancia[21,22]. El objetivo de este estudio es conocer la posible asociación entre las concentraciones plasmáticas de homocisteína, las vitaminas del grupo B implicadas en su metabolismo (folatos, $B_{12}$ y $B_6$) y la presencia del polimorfismo 677C → T de la MTHFR en los hijos de progenitores con ECP.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Sujetos de estudio

Estudio transversal analítico de 80 niños o adolescentes (43 de sexo femenino y 36 de sexo masculino), hijos de progenitores con ECP, que constituyen el grupo de estudio. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: *a)* edad comprendida entre 5 y 18 años; *b)* progenitor/a

afecto/a de cardiopatía isquémica precoz (definida por infarto de miocardio, angina de pecho o necesidad de *bypass* coronario antes de los 55 años). Los criterios de exclusión fueron: historia de diabetes mellitus, accidente cerebrovascular, anorexia nerviosa o malnutrición, anemia, error congénito del metabolismo y tratamiento con fármacos antiepilépticos o suplementación vitamínica.

Los valores de referencia para cada parámetro estudiado se llevaron a cabo en niños aparentemente sanos (por historia clínica y datos analíticos), de edades comprendidas entre 5-18 años, a los que se realizó un control bioquímico preoperatorio por intervenciones quirúrgicas menores.

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Sant Joan de Déu y se obtuvo el consentimiento informado de los padres de todos los participantes. Las muestras de sangre se obtuvieron de acuerdo con las normas de la Declaración de Helsinki de 1964, revisada en 1996.

## Estudios de laboratorio

Se recogieron muestras de sangre venosa después de 12 horas de ayuno en tubos protegidos de la luz. Se depositaron sobre hielo y se centrifugaron antes de 15 min. Se prepararon alícuotas para el estudio del perfil lipídico, función renal, homocisteína total, vitaminas y el polimorfismo 677C → T de la MTHFR. Las alícuotas se congelaron a –40 °C hasta el momento del análisis, que se realizó en el propio laboratorio del Hospital Sant Joan de Déu en los 15 días siguientes a la extracción.

### *Homocisteína*

La homocisteína total plasmática (suma de todas las formas plasmáticas oxidadas y reducidas capaces de generar homocisteína por reducción) fue valorada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección fluorimétrica de los derivados 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonate (SBDF)[23]. Como las concentraciones plasmáticas de homocisteína en edad pediátrica no varían con el sexo pero aumentan significativamente con la edad ($r = 0,53$; $p < 0,001$)[23], se agruparon los pacientes según su edad (A: 5-10 años, n = 17; B: 11-15 años, n = 30; C: 16-18 años, n = 28) para ser comparados con los valores de referencia de edades similares. Se definió la hiperhomocistinemia como los valores de homocisteína total superiores al percentil 95 ($P_{95}$) de la población pediátrica de referencia (5-10 años, 8,0 μmol/l; 11-15 años, 9,2 μmol/l; 16-18 años, 10,8 μmol/l).

TABLA 1. **Datos analíticos de los hijos de pacientes con enfermedad coronaria prematura**

| Parámetro | Media | DE (límites) |
|---|---|---|
| Edad (años) | 13,4 | 4,1 (5-18) |
| Sexo (V/M) | 44/36 | |
| Glucosa (mmol/l) | 5,07 | 0,45 (4,1-6,3) |
| Creatinina (μmol/l) | 78,3 | 19,5 (57-115) |
| Albúmina (g/l) | 50,8 | 4,1 (42-59) |
| Urato (μmol/l) | 268,6 | 65,9 (117-506) |
| Triglicéridos (mmol/l) | 0,84 | 0,43 (0,4-3,6) |
| Colesterol (mmol/l) | 4,44 | 0,79 (1,36-7,38) |
| HDL (mmol/l) | 1,29 | 0,3 (0,62-2,09) |
| LDL (mmol/l) | 2,80 | 0,57 (1,72-4,78) |
| Apo A1 (g/l) | 1,44 | 0,21 (1,01-2,03) |
| Apo B (g/l) | 0,80 | 0,13 (0,51-1,12) |
| Lp(a) (mg/l) | 254 | 199 (40-781) |

HDL: lipoproteínas de alta densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad; Apo A1: apoproteína A1; Apo B: apoproteína B; Lp(a): lipoproteína a.

### *Vitaminas*

La vitamina $B_{12}$ y el folato se determinaron mediante radioinmunoanálisis (Simultrac®, Becton Dickinson) y la vitamina $B_6$ por HPCL con detección fluorimétrica (Chromsystem® kit). Las concentraciones séricas de vitaminas se compararon con los valores de referencia (n = 100; 5-18 años; mediana, 13 años). Se consideraron valores subóptimos de vitaminas los inferiores al percentil 5 ($P_5$) de la distribución dentro de la población de referencia ($P_5$ folato, 9 nmol/l; $P_5$ vitamina $B_{12}$, 204 pmol/l; $P_5$ vitamina $B_6$, 23 nmol/l).

### *Detección del polimorfismo 677C → T de la MTHFR*

El ADN genómico se preparó a partir de leucocitos de sangre periférica. El análisis de la mutación 677C → T de la MTHFR se realizó por amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y digestión con Hinfl según procedimientos previamente descritos[14].

### *Análisis estadístico*

Como los valores de homocisteína total y vitaminas de los sujetos de estudio no mostraban una distribución gaussiana, dichos valores se compararon con los de referencia mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. La relación entre la homocisteína total y las vitaminas se analizó aplicando el coeficiente de correlación de Spearman. Se utilizó el test de chi cuadrado para analizar la asociación entre el fenotipo, la hiperhomocistinemia y las bajas concentraciones de vitaminas. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 10.0.

## RESULTADOS

Las características del grupo de hijos de progenitores con enfermedad cardiovascular prematura estudiados, así como los datos analíticos relacionados con el perfil lipídico y la función renal se resumen en la tabla 1.

Las concentraciones plasmáticas de homocisteína total de los hijos de progenitores con enfermedad cardiovascular prematura son significativamente superiores ($p < 0,001$) a los valores de referencia para edades similares, excepto en el grupo de 5-10 años, el de menor nú-

TABLA 2. **Homocisteína total y vitaminas en un grupo de hijos de progenitores con enfermedad coronaria prematura (ECP) comparados con nuestros valores de referencia**

| | Hijos de pacientes con ECP (mediana y rango) | | | Valores de referencia (mediana, $P_5$-$P_{95}$) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Número | 19 | 32 | 29 | 96 | 58 | 31 |
| Edad (años) | 5-10 | 11-15 | 16-18 | 5-10 | 11-15 | 16-18 |
| Homocisteína total (μmol/l) | 6,3[a] (4,5-9,3) | 8,2[b] (4,8-17,6) | 10,8[c] (5,0-32,7) | 5,8 (3,7-8,0) | 6,5 (5,1-9,3) | 8,0 (5,7-10,8) |
| Número | | 80 | | | 100 | |
| Folato (nmol/l) | | 13,2[d] (3,6-35,0) | | | 13,1 (9,0-26,7) | |
| Vitamina $B_{12}$ (pmol/l) | | 292[e] (157-700) | | | 350 (204-642) | |
| Vitamina $B_6$ (nmol/l) | | 54,2[d] (21,6-135,0) | | | 63 (23,0-106,6) | |

[a]p = 0,058 (NS); [b]p = 0,0003; [c]p = 0,0008; [d]no significativo; [e]p = 0,015.

mero de individuos, en donde no se alcanza la significación estadística (tabla 2) (fig. 1). La proporción de sujetos de estudio con hiperhomocistinemia (37,5%) fue significativamente superior (p < 0,0001) a la de la población de referencia (5%).

Las concentraciones de vitamina $B_{12}$ fueron significativamente inferiores en los sujetos de estudio comparados con los valores de referencia (p = 0,004), pero no las de folato y vitamina $B_6$, que fueron similares (tabla 2). Se observó una correlación negativa significativa entre las concentraciones de homocisteína total y las de folato (r = –0,4716; p < 0,0001) y vitamina $B_{12}$ (r = –0,5093; p < 0,0001), pero no entre las de homocisteína total y vitamina $B_6$ (fig. 2).

El genotipo TT en la posición 677 de la MTHFR se halló en 15 casos (18,7%) y, de éstos, 12 (80%) tenían la concentración de homocisteína total por encima del $P_{95}$ para su edad en comparación con sólo 9 de 40 (22%) que eran portadores del polimorfismo y 8 de 25 (32%) que no lo mostraron (fig. 3) ($\chi^2$ = 15.892; p < 0,0001). Los valores subóptimos de vitaminas (folato y vitamina $B_{12}$) mostraron también una asociación con el genotipo de la MTHFR, hallándose una frecuencia de valores subóptimos de folato del 40% (TT), 12,5% (CT) y 8% (CC) ($\chi^2$ = 7,881; p = 0,019) y para la vitamina $B_{12}$ del 20% (TT), 12,5% (CT) y 8% (CC) ($\chi^2$ = 1,234; p = 0,539, NS) (fig. 3).

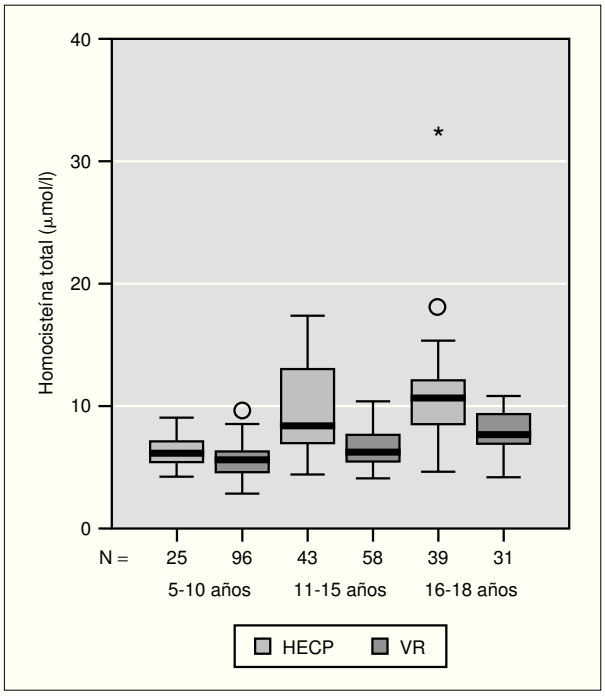


***Figura 1.*** *Diagrama de barras de las concentraciones plasmáticas de homocisteína total en los hijos de pacientes con enfermedad coronaria prematura (HECP) comparados con los valores de referencia (VR) para su edad.*

## Discusión

Los resultados confirman la existencia de una asociación entre la hiperhomocistinemia y la historia familiar de ECP sobre todo en la adolescencia. Estos resultados concuerdan con los hallados por otros autores en poblaciones no mediterráneas[24-27]. Cabe destacar que la elevada proporción de hijos de pacientes con enfermedad cardiovascular que presentan hiperhomocistinemia aumenta con la edad, ya que en el grupo de 5-10 años es de 15,8%, mientras que en los grupos de 11-15 y de 16-18 años es de 40,6 y 48,3%, respectivamente. Este aumento podría explicarse por la suma de determinantes de hiperhomocistinemia relacionados con el estilo de vida (tabaco, café, alcohol, vida sedentaria), que es mínima en la infancia, pero se incrementa en la adolescencia y mucho más en la edad adulta, en la que se pueden sumar otros determinantes (función renal, estrógenos)[13], y también otros factores convencionales de riesgo cardiovascular. Se ha postulado que la hiperhomocistinemia es un factor pronóstico negativo a corto plazo en pacientes con enfermedad preexistente, ya que interacciona con otros factores de riesgo con los cuales actuaría de modo sinérgico, en particular con el tabaquismo[28].

La determinación de las concentraciones plasmáticas de homocisteína total como factor de riesgo cardiovascular

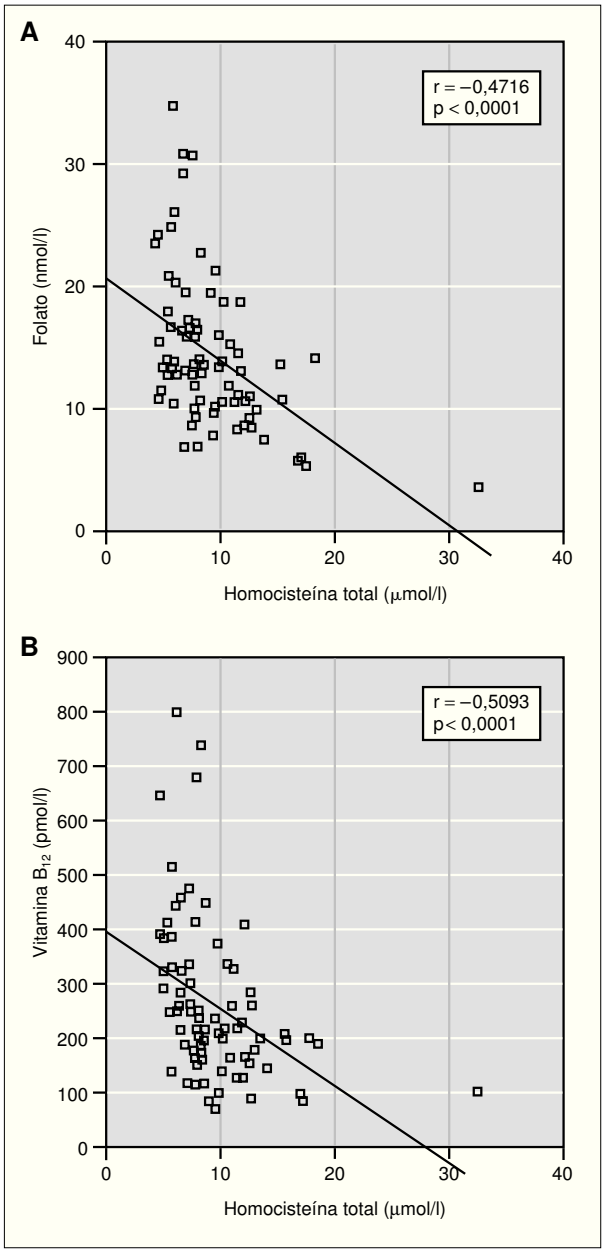


***Figura 2.*** *Correlación entre las concentraciones plasmáticas de homocisteína total frente a folato* ***(A)*** *y de homocisteína total frente a vitamina* $B_{12}$ ***(B)***.

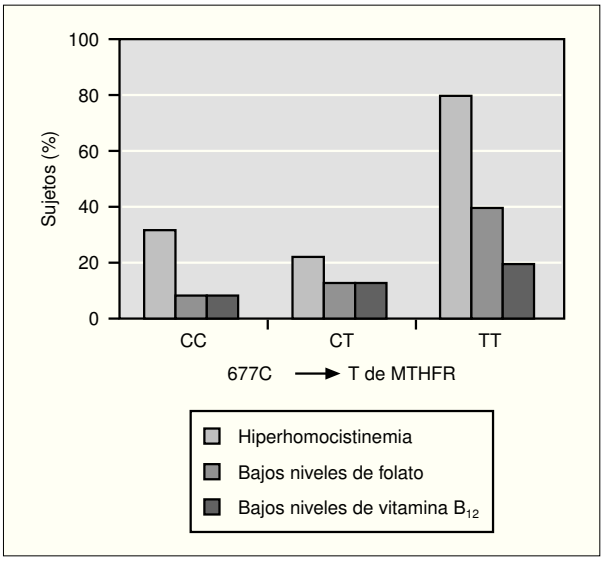


***Figura 3.*** *Porcentaje de casos con hiperhomocistinemia y bajos niveles séricos de folato y vitamina* $B_{12}$*, en relación con el genotipo 677C → T de la MTHFR (CC, CT, TT).*

en la infancia es importante, ya que la hiperhomocistinemia es modificable con la dieta[25]. No obstante, la interpretación de los resultados requiere no solamente su comparación con valores de referencia establecidos en una población pediátrica de edad similar y del mismo origen étnico[23], sino también el análisis paralelo de los principales determinantes nutricionales (folato y vitamina $B_{12}$) y genéticos, especialmente el polimorfismo 677C → T de la MTHFR. La prevalencia de dicho polimorfismo varía mucho en las distintas etnias[29,30], y resulta elevada en el área mediterránea[20,22,31]. También varían los hábitos alimentarios, ingestión de proteínas de origen animal, frutas y verduras, implicando un mayor aporte vitamínico, que puede normalizar la hiperhomocistinemia moderada determinada por la variante termolábil de la MTHFR[16]. En nuestro estudio se ha hallado una correlación significativa negativa entre las concentraciones séricas de folato y vitamina $B_{12}$ y la de homocisteína total, similar a las halladas en un estudio de población infantil escandinava[21]. También muestra unas concentraciones de vitamina $B_{12}$ significativamente inferiores a las de los valores de referencia de edades similares. Sin embargo, creemos que este factor no es el único determinante de hiperhomocistinemia en estos hijos de pacientes con ECP.

El hecho de que, siendo el genotipo TT de la MTHFR uno de los mayores determinantes de la hiperhomocistinemia, no se encuentre asociado al riesgo cardiovascular en muchos de los estudios realizados[32], aunque no en todos[33,34], ha determinado que se cuestionara la asociación entre hiperhomocistinemia y riesgo cardiovascular, considerando la posibilidad de que la elevación de las concentraciones de homocisteína fuera sólo un epifenómeno en el cual la homocisteína se comportaría como un reactante de fase aguda[32]. No obstante, la frecuencia de hiperhomocistinemia en hijos de pacientes con accidente cardiovascular, incluso en la edad pediátrica, apoya el carácter familiar de esta asociación[11]. La frecuencia de hiperhomocistinemia en hijos de pacientes es incluso mayor que la hallada en sus padres, ya que éstos en general han modificado sus dietas y estilo de vida tras el accidente cardiovascular[24].

Tanto la hiperhomocistinemia como los valores de vitaminas $B_{12}$ y folato inferiores al $P_5$ del rango normal se

hallan relacionados con la homozigosidad para el polimorfismo 677C → T de la MTHFR (v. fig. 3), pero no los niveles de vitamina $B_6$. Esta asociación es especialmente marcada para el folato, siendo las concentraciones de esta vitamina significativamente inferiores en los sujetos con el genotipo TT, en comparación con los portadores de los demás genotipos. Esta asociación se ha observado en poblaciones pediátricas de otras áreas geográficas[35].

En resumen, este estudio muestra que la hiperhomocistinemia moderada de los hijos mayores de 10 años de progenitores con enfermedad cardiovascular prematura de nuestro medio se asocia al genotipo TT de la MTHFR y a unas bajas concentraciones séricas de folato. La posibilidad de tratar el exceso de homocisteína mediante suplementos de folato o vitamina $B_{12}$ subraya el interés de su estudio en las familias con enfermedad cardiovascular prematura.

## Bibliografía


**1.** National Cholesterol Education Program (NCEP). Report of the expert panel on blood cholesterol levels in children and adolescents. Pediatrics 1992; 89: 525-584.

**2.** Mainou C, May ME, Palá MT, Ferrer I, Vilaseca MA. Factores de riesgo cardiovascular en la infancia. Nuevas perspectivas. Rev Esp Pediatr 1997; 53: 1-5.

**3.** Ortega RM. Utilidad y riesgos del seguimiento de pautas dietéticas encaminadas a disminuir el riesgo cardiovascular, desde la infancia. An Esp Pediatr 1999; 50: 576-580.

**4.** Rasanen M, Niinikoski H, Keskinen S, Tuominen J, Simell O, Viikari J et al. Nutrition knowledge and food intake of seven-year-old children in an atherosclerosis prevention project with onset in infancy: The impact of child-targeted nutrition counselling given to the parents. Eur J Clin Nutr 2001; 55: 260-267.

**5.** Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: The Hordaland Homocysteine Study. Am J Clin Nutr 1998; 67: 263-270.

**6.** Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, Rogers G, Bowman BA, Gunter EW et al. Serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey (1991-1994): Population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentrations. Ann Intern Med 1999; 131: 331-339.

**7.** Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. JAMA 1995; 274: 1049-1057.

**8.** Mudd SH, Levy HL, Skovby F. Disorders of transsulfuration. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle DL, ed. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th ed. Vol 1. New York: McGraw-Hill, 1995; 3111-3128.

**9.** McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: Implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. Am J Pathol 1969; 56: 111-128.

**10.** Wilken DEL, Wilken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. J Clin Invest 1976; 57: 1079-1082.

**11.** Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, Vollset SE. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. Am J Clin Nutr 2000; 72: 324-332.

**12.** Eikelboom JW, Lonn E, Genest J Jr, Hankey G, Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: A critical review of the epidemiologic evidence. Ann Intern Med 1999; 131: 363-375.

**13.** Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Villset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. Annu Rev Med 1998; 49: 31-62.

**14.** Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methilentetrahydrofolate reductase. Nat Genet 1995; 10: 111-113.

**15.** Engbersen AM, Franken DG, Boers GH, Stevens EM, Trijbels FJ, Blom HJ. Thermolabile 5,10-methylenetatrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. Am J Hum Genet 1995; 56: 142-150.

**16.** Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. Circulation 1996; 94: 2322-2323.

**17.** Guttormsen AB, Ueland PM, Nesthus I, Nygard O, Schneede J, Vollset SE et al. Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (> or = 40 micromol/liter). The Hordaland Homocysteine Study. J Clin Invest 1996; 98: 2174-2183.

**18.** Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in the elderly. JAMA 1993; 270: 2693-2698.

**19.** Ubbick JB, Vermaak WJ, Van der Merwe, Becker PJ. Vitamin $B_{12}$, Vitamin $B_6$, and Folate nutritional status in men with hypermocysteinemia. Am J Clin Nutr 1993; 57: 47-53.

**20.** Pinto X, Vilaseca MA, Garcia-Giralt N, Ferrer I, Pala M, Meco JF et al. Homocysteine and MTHFR 677C → T allele in Spanish patients with premature coronary artery disease. Case control and famili studies. Eur J Clin Invest 2001; 3: 24-30.

**21.** Cardo E, Vilaseca MA, Campistol J, Artuch R, Colomé C, Pineda M. Evaluation of hyperhomocysteinemia in children with stroke. Europ J Paediatr Neurol 1999; 3: 113-117.

**22.** Cardo E, Monros E, Colome C, Artuch R, Campistol J, Pineda M et al. Children with stroke: Polymorphism of the MTHFR gene, mild hyperhomocysteinemia, and vitamin status. J Child Neurol 2000; 15: 295-298.

**23.** Vilaseca MA, Moyano D, Ferrer I, Artuch R. Total-Homocysteine in a pediatric population. Clin Chem 1997; 43: 690-692.

**24.** Tonstad S, Refsum H, Sivertsen M, Cristophersen B, Osf L, Ueland PM. Relation of total homocysteine and lipid levels in children to premature cardiovascular death in male relatives. Pediatric Res 1996; 40: 47-52.

**25.** Tonstad S, Refsum H, Ueland PM. Association between plasma total homocysteine and parental history of cardiovascular disease in children with familial hypercholesterolemia. Circulation 1997; 96: 1803-1808.

**26.** Tonstad S, Refsum H, Ose L, Ueland PM. The 677C → T mutation in the metilenetetrahydrofolate reductase gene predisposes to hyperhomocysteinemia in children with familial cholesterolemia treated with cholestyramina. J Pediatr 1998; 132: 365-368.

**27.** Greenlund KJ, Srinivasan SR, Xu JH, Dalferes E Jr, Myers L, Pickoff A et al. Plasma homocysteine distribution and its association with parental history of coronary artery disease in black and white children: The Bogalusa Heart Study. Circulation 1999; 99: 2144-2149.

**28.** Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: The European concerted action project. JAMA 1997; 277: 1775-1781.

**29.** Fletcher O, Kessling AM. MTHFR association with arteriosclerotic vascular disease? Hum Genet 1998; 103: 11-21.

**30.** Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677 → T polymorphism. Trends Pharmacol Sci 2001; 22: 195-201.

**31.** Soriente L, Coppola A, Madonna P, Cerbone AM, Di Minno G, Orefice G et al. Homozygous C677 → T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene and hyperhomocysteinemia in Italian patients with a history of early-onset ischemic stroke. Stroke 1998; 29: 869-871.

**32.** Brattström L, Wilken DEL. Homocysteine and cardiovascular disease: Cause or effect? Am J Clin Nutr 2000; 72: 315-323.

**33.** Morita H, Taguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara Y et al. Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. Circulation 1997; 95: 2032-2036.

**34.** Ou T, Yamakawa-Kobayashi K, Arinami T, Amemiya H, Fujiwara H, Kawata K et al. Methylenetetrahydrofolate reductase and apolipoprotein E polymorphisms are independent risk factors for coronary heart disease in Japanese: A case-control study. Atherosclerosis 1998; 137: 23-28.

**35.** Delvin EE, Rozen R, Merouani A, Genest J, Lambert M. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase genotype, age, vitamin $B_{12}$ and folate status on plasma homocysteine in children. Am J Clin Nutr 2000; 72: 469-473.