

# Influencia de factores bioquímicos y genéticos en las concentraciones de homocisteína

J.I. Gutiérrez Revilla<sup>a</sup>, F. Pérez Hernández<sup>b</sup>, M. Tamparillas Salvador<sup>a</sup> y M<sup>a</sup>T. Calvo Martín<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Bioquímica Clínica. Sección de Genética. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza.

<sup>b</sup>Farmacéutica de Atención Primaria. Gerencia Santander-Laredo. Santander. España.

## Antecedentes

En varios estudios se ha analizado la asociación entre el genotipo del gen metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) y las concentraciones de homocisteína plasmática, pero muy pocos estudios se han realizado en niños.

## Objetivo

Determinar la concentración plasmática de homocisteína total, ácido fólico, folato intraeritrocitario (FCR) y vitamina B<sub>12</sub> en un grupo de niños sanos y ver su posible relación con el genotipo *MTHFR*.

## Sujetos y métodos

Formaron parte del estudio 83 participantes (45 chicos y 38 chicas) de edad comprendida entre 1 semana y 18 años. Las muestras de plasma y sangre completa se almacenaron a -80 °C para su posterior determinación de los parámetros bioquímicos y moleculares. La determinación de homocisteína total se realizó mediante ensayo de inmunofluorescencia polarizada; mientras que la concentración sérica de ácido fólico, folato intraeritrocitario y vitamina B<sub>12</sub> se determinó mediante inmunoanálisis electroquimioluminiscente. El análisis molecular se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y posterior digestión enzimática, del ADN obtenido de las muestras de sangre.

## Resultados

Las concentraciones plasmáticas de homocisteína se correlacionaron negativamente con las de ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub> y FCR, pero positivamente con la edad ( $p < 0,005$ ). Se ha encontrado una interacción entre la edad-genotipo *MTHFR* y las concentraciones de ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub> y FCR, pero no con las concentraciones de homocisteína.

## Conclusiones

Nuestras observaciones sugieren que la concentración de homocisteína en la población pediátrica sana está más influida por factores bioquímicos como el ácido fólico, que genéticos.

## Palabras clave:

Homocisteína. Metilentetrahidrofolato reductasa. Ácido fólico. Vitamina B<sub>12</sub>. Folato intraeritrocitario.

## INFLUENCE OF BIOCHEMICAL AND GENETIC FACTORS ON HOMOCYSTEINE CONCENTRATIONS

### Background

Several studies have examined the association between the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) genotype and plasma homocysteine concentrations in adults but few studies have been performed in children.

### Objective

To determine plasma concentrations of total homocysteine, folate, vitamin B<sub>12</sub>, and red cell folate in a group of healthy children and to determine their possible relationship with the *MTHFR* genotype.

### Subjects and methods

Eighty-three subjects (45 boys and 38 girls), aged between 1 week and 18 years, were included in the study. Plasma and whole blood samples were stored at -80 °C for biochemical and molecular analysis. Plasma total homocysteine was determined by fluorescence polarization immunoassay. Serum concentrations of folate, vitamin B<sub>12</sub>, and red cell folate were measured by electrochemiluminescence immunoassay. Genotypic analysis was performed by polymerase chain reaction amplification of genomic DNA extracted from blood leukocytes.

### Results

Plasma homocysteine concentrations were negatively correlated with folate, vitamin B<sub>12</sub>, and red cell folate but were positively correlated with age ( $p < 0.005$ ). There was an association between age-*MTHFR* genotype and folic acid, vita-

*Correspondencia:* Dr. J.I. Gutiérrez Revilla.

Servicio de Bioquímica Clínica. Sección de Genética. Hospital Universitario Miguel Servet.

P<sup>o</sup> Isabel La Católica, 1 y 3. 50009 Zaragoza. España.

Correo electrónico: joseignaciogutierrez@redfarma.org

Recibido en marzo de 2003.

Aceptado para su publicación en noviembre de 2003.

min B<sub>12</sub>, and red cell folate, but not with homocysteine concentrations.

### Conclusions

Our results suggest that in a healthy pediatric population, homocysteine concentrations are determined by biochemical factors, such as folic acid, more than by genetic factors.

### Key words:

Homocysteine. Methylene tetrahydrofolate reductase. Folic acid. Vitamin B<sub>12</sub>. Red cell folate.

## INTRODUCCIÓN

La homocisteína es un aminoácido que se metaboliza a cisteína vía transulfuración o a metionina mediante el proceso de remetilación. Las alteraciones en estas rutas metabólicas, de causa genética o nutricional, pueden provocar hiperhomocisteinemia. Algunos estudios epidemiológicos muestran que un incremento mínimo de las concentraciones de homocisteína están asociados con un riesgo aumentado de sufrir enfermedades cerebrovasculares, cardiovasculares o neurológicas<sup>1-3</sup>. Además, existen numerosos estudios en los que se establece la aparición de enfermedades vasculares (trombosis venosas y arteriales, problemas coronarios, estenosis, etc.) con concentraciones elevadas de homocisteína<sup>4,5</sup>.

Uno de los factores que se deben considerar son las alteraciones genéticas presentes en torno a la ruta metabólica de la homocisteína (procesos de transulfuración y remetilación). A este respecto, está creciendo el interés por la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) que reduce 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, que es la principal forma circulante de folato y el principal grupo dador de grupos metilo utilizados en diversos procesos metabólicos.

En 1994, Goyette et al<sup>6</sup> aislaron el ADN complementario (ADNc) del gen *MTHFR*, descubriendo 9 mutaciones en este gen y entre ellas identificaron una variante polimórfica en la posición nucleotídica 677, que consistía en un cambio de base de citosina a timina produciendo la sustitución de alanina (GCC) por valina (GTC), denominando a dicho polimorfismo Ala225Val.

Entre el 5 y el 15% de las personas normales son homocigotas para la mutación C677T en el gen *MTHFR*<sup>1,2,7-10</sup>. Esta variante está relacionada con un incremento de la concentración de homocisteína en suero<sup>11,12</sup> y una redistribución de los folatos, aumento de los folatos en hematíes<sup>7,13</sup> y folato plasmático disminuido (en el nivel bajo del rango normal)<sup>2,7</sup>. Esta situación trae como consecuencia un riesgo aumentado de padecer una enfermedad cardiovascular, un riesgo de 3 a 7,2 veces mayor de tener descendencia afectada de defectos del tubo neural (DTN)<sup>5,7,14</sup>, así como su posible implicación en enfermedades como la esquizofrenia, la depresión y el cáncer<sup>2,15</sup>. Aunque en varios estudios se ha llegado a la conclusión de que el polimorfismo C677T es un factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular

(ECV)<sup>4,8,11,12</sup>, existen controversias al respecto<sup>5,16</sup>. En un metaanálisis realizado por Kluijtmans et al<sup>17</sup>, en el que se estudiaron 735 pacientes con ECV, se concluyó que el genotipo *MTHFR* era un factor de riesgo débil pero significativo para ECV. En otro metaanálisis realizado por Brattstrom et al<sup>18</sup>, en el que se estudiaron 5.869 pacientes con ECV y 6.644 controles, establecieron que aunque el genotipo C677T estaba implicado en la aparición de hiperhomocisteinemia débil, no se incrementaba el riesgo de ECV.

A pesar de que varios estudios<sup>4,8,11,12</sup> han confirmado el efecto del polimorfismo C677T en las concentraciones de homocisteína en adultos, existen pocos estudios que hayan analizado esta relación en niños<sup>3,4</sup>. El objetivo del presente estudio ha sido establecer la posible relación entre las concentraciones plasmáticas de homocisteína, ácido fólico, folato intraeritrocitario (FCR) y vitamina B<sub>12</sub> en un grupo de niños aparentemente sanos y el genotipo C677T del gen *MTHFR*.

## SUJETOS Y MÉTODOS

### Sujetos de estudio

Todos los niños participantes (45 chicos y 38 chicas) fueron seleccionados en el Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza y en el momento de realizar el estudio presentaron una edad comprendida entre 1 semana y 18 años. Existieron una serie de factores de exclusión como raza distinta a la caucásica, padecimiento de enfermedades vasculares y/o trastornos metabólicos y consumo de fármacos que afectasen al metabolismo de lípidos o proteínas (anticonceptivos orales o anticonvulsivantes), y presencia de fiebre 3 días o menos antes del estudio. Al conjunto de padres de todos los pacientes, se les informó acerca de las pretensiones del estudio mediante charla informativa y se pidió consentimiento escrito para la utilización de las muestras biológicas. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Miguel Servet.

### Métodos

Después de ayuno nocturno, se procedió a la recogida de las muestras de sangre en los 83 participantes (45 chicos y 38 chicas). La extracción de sangre se realizó en tubo con anticoagulante (ácido etilendiaminotetraacético [EDTA] tripotásico) y con sistema de vacío (Vacutainer; Becton Dickinson and Co, Orangeburg, NJ). Las muestras de plasma se obtuvieron tras centrifugación (3000 × g a 4 °C durante 10 min) y posterior alicuotación de las mismas en tubo eppendorf. Las muestras fueron congeladas a -80 °C hasta el momento de realizar la determinación de los distintos parámetros bioquímicos estudiados. La determinación de homocisteína total se realizó mediante ensayo de inmunofluorescencia polarizada (FPIA, Abbott Division Diagnostics, Oslo, Noruega); mientras que la concentración de ácido fólico, FCR y vitamina B<sub>12</sub> fue determinada mediante inmu-

noanálisis electroquimioluminiscente (ECLIA, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Como las concentraciones plasmáticas de homocisteína en edad pediátrica no varían con el sexo, pero aumentan significativamente con la edad<sup>3,19,20</sup>, se agruparon los participantes según la edad (A = 0- < 5 años, n = 48; B = 5- < 10 años, n = 21; C = 10- < 15 años, n = 7; D = 15- 18 años, n = 7) al igual que otros autores<sup>3,19,20</sup>.

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante métodos convencionales, mientras que el análisis del polimorfismo C677T se realizó según el método descrito por Frosst et al<sup>8</sup>. La mutación C677T crea una diana de restricción para la enzima de restricción *HinfI*, que fue confirmada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN genómico (PTC-100® Programmable Thermal Controller, Mj Research, Inc.), seguido por un análisis con la enzima de restricción *HinfI* en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio.

### Análisis estadístico

Debido a la asimetría en la distribución de las variables bioquímicas cuantitativas, se procedió a su transformación logarítmica consiguiéndose una distribución normal de éstas. El análisis estadístico fue realizado con las formas logarítmicas, aunque en las tablas aparecen representados los valores de concentración en su forma antilogarítmica.

Se aplicó la prueba de la t de Student para estudiar el efecto del sexo en las concentraciones de homocisteína, ácido fólico, FCR y vitamina B<sub>12</sub>. Por otra parte, se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) para estimar el efecto de los polimorfismos estudiados, las variables bioquímicas y la edad. Las comparaciones múltiples entre ambos grupos de edad y los genotipos de *MTHFR*, se realizaron mediante el test de Tukey. La proporción de chicos y chicas pertenecientes a los distintos grupos genotípicos establecidos, fue realizada mediante el test de la chi cuadrado ( $\chi^2$ ) cuadrado. Se consideraron valores estadísticamente significativos cuando la diferencia entre las variables fue  $p < 0,05$ .

Los cálculos estadísticos se realizaron con el programa SPSS para Windows (versión 10.0).

## RESULTADOS

En la tabla 1 se presenta la estadística descriptiva de las concentraciones de homocisteína, ácido fólico, FCR y vitamina B<sub>12</sub> en los 83 participantes de ambos sexos, estratificados en grupos de edad. Debido a que la distribución de los datos es asimétrica, se ha utilizado la media geométrica, rango e intervalo de confianza del 95% (IC 95%). Los participantes menores de 5 años presentaron unas concentraciones de ácido fólico ( $p = 0,0005$ ) y FCR ( $p = 0,003$ ) estadísticamente superiores a las presentes en el resto de grupos de edad. Por otra parte, se observó una tendencia a disminuir la concentración de vitamina B<sub>12</sub> al aumentar la edad, y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los < 5 años, 5- < 10 años y  $\geq 10$  años

TABLA 1. Concentración de homocisteína, ácido fólico, FCR y vitamina B<sub>12</sub> en participantes de ambos sexos

	Número	Media geométrica	IC 95 %	Rango
<b>Ácido fólico (ng/ml)</b>				
0- < 5 años	48	10,75	9,02-12,46	1,55-25,41
5- < 10 años	21	5,16	3,88-6,43	1,54-12,3
10- < 15 años	7	3,98	3,45-4,51	3,13-4,82
15-18 años	7	3,37	2,57-4,17	1,9-4,49
<b>Vitamina B<sub>12</sub> (pg/ml)</b>				
0- < 5 años	48	958	864-1.051	438-1.977
5- < 10 años	21	748	618-878	418-1.716
10- < 15 años	7	537	375-699	280-803
15-18 años	7	437	295-580	199-622
<b>FCR (ng/ml)</b>				
0- < 5 años	48	557	490-623	212-1149
5- < 10 años	21	340	292-387	211-673
10- < 15 años	7	344	259-429	237-472
15-18 años	7	309	253-366	199-373
<b>Homocisteína (<math>\mu</math>mol/l)</b>				
0- < 5 años	48	4,51	4,12-4,89	2,25-8,27
5- < 10 años	21	4,92	4,51-5,32	3,41-6,91
10- < 15 años	7	5,25	4,24-6,27	4-7,08
15-18 años	7	8,72	7,23-10,22	7,28-12,02

Los datos no siguen una distribución gaussiana, por lo que se han expresado en forma de media geométrica, rango e intervalo de confianza del 95% (IC 95%).

Factor de conversión a SI: nmol/l = ng/ml  $\times$  2,266;

pmol/l = pg/ml  $\times$  0,7378  $\mu$ g/l = 20,1  $\times$   $\mu$ mol/l.

FCR: folato intraeritrocitario.

TABLA 2. Correlación entre las concentraciones plasmáticas de homocisteína, ácido fólico, FCR, vitamina B<sub>12</sub> y edad

	r	p
Homocisteína y ácido fólico	-0,382	< 0,0001
Homocisteína y FCR	-0,205	0,033
Homocisteína y vitamina B <sub>12</sub>	-0,388	< 0,0001
Homocisteína y edad	0,567	< 0,0001

Se ha aplicado el test de correlación de Spearman para establecer las relaciones entre la concentración de homocisteína plasmática (variable dependiente) y las concentraciones de ácido fólico, FCR, vitamina B<sub>12</sub> y edad (variables independientes). FCR: folato intraeritrocitario.

( $p = 0,0005$ ). A diferencia del caso anterior, las concentraciones de homocisteína tienden a aumentar con la edad, siendo significativamente superiores en el grupo de edad de 15-18 años ( $p = 0,001$ ).

Al estratificar cada grupo de edad en función del sexo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros bioquímicos estudiados (ácido fólico,  $p = 0,95$ ; vitamina B<sub>12</sub>,  $p = 0,36$ ; FCR,  $p = 0,48$ ; homocisteína,  $p = 0,08$ ). Como se observa en la tabla 2, la concentración de homocisteína (variable dependiente) se correlaciona negativamente con la concentración de ácido fólico, FCR y vitamina B<sub>12</sub>, por el contrario se correlaciona positivamente con la edad. Mientras que la concentración de FCR

TABLA 3. Distribución del genotipo *MTHFR* en función del sexo

Genotipo	Número de chicos (%)	Número de chicas (%)	Total (%)
C/C	19 (54,3)	16 (45,7)	35 (100)
C/T	18 (52,9)	16 (47,1)	34 (100)
T/T	8 (57,1)	6 (42,9)	14 (100)

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al aplicar el test de la  $\chi^2$ . C/C: homocigoto para el alelo normal; C/T: heterocigoto; T/T: homocigoto para el alelo mutado; *MTHFR*: metilentetrahidrofolato reductasa.

y vitamina B<sub>12</sub> participan en un 3,5 y 8,5% de la variación, respectivamente, la edad y la concentración de ácido fólico participan de un 14,6 y 11,9% de la variación.

Del total de participantes estudiados, un 42,2% presentó genotipo C/C, un 41% presentó genotipo heterocigoto C/T y el 16,9% fue homocigoto para el alelo mutado (genotipo T/T). Cuando se analizó la distribución de los distintos genotipos en función del sexo (tabla 3), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,965$ ). Tampoco se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica del polimorfismo C677T en los distintos grupos de edad (test  $\chi^2$ ,  $p = 0,289$ ). Puesto que la concentración de homocisteína no presenta diferencias estadísticamente significativas hasta edades superiores a 15 años, se analizó la influencia del genotipo C677T sobre las concentraciones de homocisteína en los participantes menores de 15 años (fig. 1). No se han podido establecer diferencias en las concentraciones de homocisteína entre los distintos genotipos ( $p = 0,455$ ). Por el contrario, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos genotípicos y las concentraciones de FCR ( $p = 0,02$ ), presentando mayores concentraciones de FCR los sujetos con genotipo TT frente al resto de genotipos.

Ninguno de los participantes presentó una concentración de homocisteína superior a 15  $\mu\text{mol/l}$ , límite a partir del cual se considera la existencia de hiperhomocisteinemia leve, además sólo un participante presentó una concentración de homocisteína superior a 10  $\mu\text{mol/l}$  (paciente con genotipo C/T y con una concentración de ácido fólico de 1,9 ng/ml).

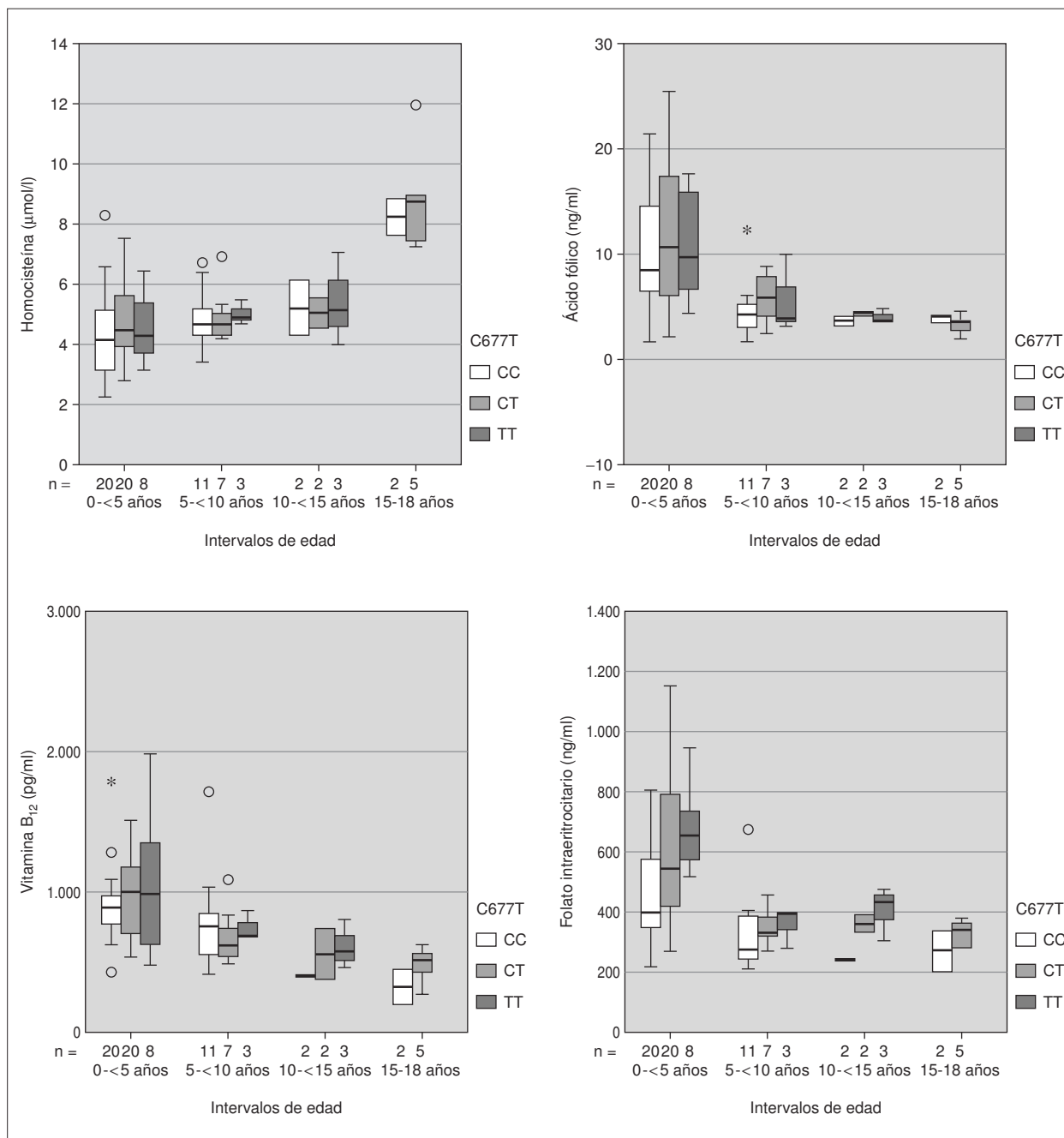
## DISCUSIÓN

Como ocurre con muchas variables biológicas humanas, la concentración de homocisteína se encuentra influida por factores medioambientales y genéticos. Las concentraciones plasmáticas elevadas de homocisteína total se consideran un factor de riesgo para la aparición temprana de enfermedad cardiovascular<sup>1,2,3,21</sup>. En muchos estudios epidemiológicos realizados en adultos y ancianos, se ha observado una influencia de la edad, sexo y estatus de ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub><sup>2,5</sup>. A diferencia de éstos, en el presente estudio han participado menores de 18 años sanos, estratificados en

grupos de edad de 5 años. Especial interés merece el grupo de edad menores de 5 años, que ha sido poco estudiado en otros estudios<sup>20</sup>. Todos los sujetos estudiados realizaron ayuno nocturno antes de proceder a la extracción de las muestras, puesto que las determinaciones bioquímicas estudiadas se ven influidas por la ingesta de alimentos<sup>22</sup>. Se realizó un cuestionario nutricional con el fin de determinar la ingesta de ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> en los días previos al estudio, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (datos no mostrados).

Las concentraciones medias de homocisteína concuerdan con las obtenidas por otros autores<sup>3,4,19,20</sup> en grupos de edad similares, apreciándose una tendencia a aumentar con la edad. Este incremento podría explicarse por la suma de determinantes relacionados con el estilo de vida (tabaco, café, alcohol, vida sedentaria), que es mínimo en la infancia, pero se incrementa en la adolescencia y está más acentuada en edad adulta, en la que se pueden sumar otros determinantes (función renal, estrógenos)<sup>3</sup>. Además, la interpretación de estos resultados requiere el análisis paralelo de los principales determinantes nutricionales (ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub>) y genéticos, especialmente el polimorfismo C677T del gen *MTHFR*. Como otros autores<sup>19,20,23</sup>, no se han observado diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de homocisteína al tener en cuenta el sexo en el grupo de pacientes menores de 15 años. A pesar de la tendencia a aumentar la concentración de homocisteína en función de la edad, sólo el grupo de edad de mayores de 15 años presentó concentraciones estadísticamente significativas con respecto al resto de grupos. Estos datos coinciden con los aportados por Greenlund et al<sup>23</sup>.

A diferencia de otros estudios<sup>3</sup>, se ha estudiado la distribución de la concentración de ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub> y FCR en función de los grupos de edad establecidos, encontrándose una tendencia a disminuir la concentración de éstas en función de la edad<sup>19</sup>. Esta tendencia podría dar respuesta a las diferencias en la concentración de homocisteína, encontradas en el grupo de edad de mayores de 15 años. En el estudio realizado por Delvin et al<sup>4</sup> sobre un grupo de chicos de 2-18 años, encontraron unas concentraciones de homocisteína total con un rango de 2,6-24,3  $\mu\text{mol/l}$ , una concentración de ácido fólico con un rango de concentraciones entre 4,14-17,5 ng/ml y un rango de concentración de vitamina B<sub>12</sub> de 151-1.175 pg/ml. El rango superior para la concentración de homocisteína total es el doble al encontrado en el presente estudio. Una de las razones atribuidas a estas diferencias pudiera estar en la edad de los participantes en el estudio, ya que en el presente participan sujetos de edades muy cortas y parece existir una relación directa entre la edad y las concentraciones de homocisteína<sup>19</sup>. Otra posible explicación pudiera estar en las diferencias existentes en los rangos de concentraciones de ácido fólico. En el presente estudio el rango superior de ácido fólico se sitúa en 25,41 ng/ml, mientras



**Figura 1.** Efecto de la interacción entre la edad y el genotipo de la MTHFR en las concentraciones de homocisteína, ácido fólico, FCR y vitamina B<sub>12</sub>.

que en el estudio realizado por Delvin et al<sup>4</sup>, éste se sitúa en 17,5 ng/ml. Al existir una fuerte relación inversa entre las concentraciones de ácido fólico y homocisteína, podrían explicarse estas diferencias<sup>19</sup>. A diferencia de lo que ocurre con las concentraciones de ácido fólico y homocisteína, no parecen existir diferencias con las concentraciones de vitamina B<sub>12</sub> obtenidas, siendo similares a las ya publicadas<sup>3,4</sup>.

Una característica diferencial realizada en el presente estudio ha sido el análisis de las concentraciones de FCR.

Aunque el ácido fólico es el indicador bioquímico más utilizado para evaluar el estado nutricional en ácido fólico, está muy influido por la ingesta reciente y no informa de las reservas corporales. El ácido fólico plasmático representa el ácido fólico tomado en la última semana, mientras que el FCR representa la ingesta a largo plazo. Las concentraciones en suero o plasma reflejan simplemente la concentración transitoria de la vitamina entre la absorción y la utilización o almacenamiento, siendo las menos adecuadas para estable-



cer el estatus de ácido fólico. Una concentración baja de ácido fólico es indicativa de balance negativo de folatos, y sólo si persiste baja más de un mes indica depleción de reservas y se asocia a disminución de FCR, el cual es mejor indicador de ingesta a largo plazo y de reservas hepáticas<sup>24</sup>. La concentración de FCR es relativamente estable y refleja de forma más real el estatus de folato medio de cada persona en el período de 3 meses<sup>24</sup>. Los valores de FCR en adultos están comprendidos entre 160-640 ng/ml, definiéndose el déficit como concentraciones inferiores a 140 ng/ml<sup>16,25</sup>. Además, las concentraciones de FCR inferiores a 200 ng/ml son indicativas de un balance de folato negativo<sup>25</sup>. En el presente estudio no se han encontrado participantes con concentraciones inferiores a 140 ng/ml y sólo el 1,2% ha presentado concentraciones inferiores a 200 ng/ml. Estos resultados vienen a corroborar los resultados obtenidos para el ácido fólico y a potenciar la hipótesis de que las bajas concentraciones de homocisteína son consecuencia de la concentración de ácido fólico y sus reservas, más que a la presencia del genotipo T677T.

Por otra parte, la frecuencia del genotipo 677TT en individuos sanos varía geográficamente en Europa desde el 6-10% en los países del norte, al 13-18% en la población mediterránea<sup>1,26</sup>. La frecuencia del genotipo homocigoto mutado para la variante termolábil (T/T) fue superior a las aparecidas en otros estudios<sup>16,26,27</sup>, aunque similares a las de otros<sup>24,28-31</sup>. Esta alta prevalencia del genotipo mutado, no puede ser explicada por la variabilidad étnica de la muestra en estudio, ya que todos los sujetos estudiados eran de raza caucásica. Cabe destacar que existe una concordancia entre los resultados obtenidos en estudios realizados en el ámbito mediterráneo<sup>3,28-31</sup>, donde la prevalencia del genotipo T/T parece ser superior a la encontrada en los países del norte de Europa<sup>1,2</sup>.

Se ha constatado que la edad y la concentración de ácido fólico presentan una fuerte asociación con las concentraciones de homocisteína plasmática, coincidiendo con los obtenidos por otros autores<sup>3,4,19,32,33</sup>. Balasa et al<sup>32</sup> demostraron, mediante análisis de regresión múltiple, que la homocisteína se relacionaba positivamente con la edad. Sin embargo, en su estudio el genotipo *MTHFR* participaba sólo en el 2,9% de la variación de las concentraciones de homocisteína y, además, no se estratificó el grupo de estudio en función de la edad ni se presentaron valores de ácido fólico, FCR y vitamina B<sub>12</sub>. A pesar de la asociación encontrada en algunos estudios<sup>3</sup> entre elevadas concentraciones de homocisteína y genotipo T677T, en el presente estudio no se ha podido observar dicha asociación en el grupo de edad de menores de 15 años. Se ha constatado la existencia de una interacción entre la edad-genotipo *MTHFR* sobre las concentraciones de ácido fólico, FCR y vitamina B<sub>12</sub> ( $p < 0,05$ ). Por el contrario, y al igual que otros autores<sup>4</sup>, no se ha encontrado una interacción significativa entre la edad y el genotipo de *MTHFR* con las concentraciones de homocisteína. Este hecho puede ser explicado por el pe-

queño tamaño de la muestra de sujetos homocigotos para la mutación y las relativamente altas concentraciones y reservas de ácido fólico presentes. Sin embargo, debido a los numerosos estudios en los que se ha establecido una asociación entre las concentraciones de homocisteína y enfermedad cardiovascular en adultos, se requieren nuevos estudios en los que se pueda identificar los factores que influyen en las concentraciones de homocisteína y, por lo tanto, permitir una detección precoz.

## BIBLIOGRAFÍA

- López-Quesada EL, Vilaseca MA, González S. Homocysteine and pregnancy. *Med Clin (Barc)* 2000;115:352-6.
- De Bree A, Verschuren WMM, Bjorke-Monsen AL, Van der Put NMJ, Heil SG, Trijbels FJM, et al. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C-T mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample. *Am J Clin Nutr* 2003;77:687-93.
- Mainou C, García N, Vilaseca MA, Ferrer I, Meco JF, Mainou A, et al. Hiperhomocistinemia y polimorfismo 677C-T de la 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa en hijos de pacientes con enfermedad coronaria prematura. *An Esp Pediatr* 2002;56:402-8.
- Delvin EE, Rozen R, Merouani A, Genest J, Lambert M. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase genotype, age, vitamin B<sub>12</sub>, and folate status on plasma homocysteine in children. *Am J Clin Nutr* 2000;72:1469-73.
- Gonzalez Ordóñez AJ, Medina Rodríguez JM, Fernández Álvarez CR, Sánchez García J, Fernández Carneira JM, Álvarez Martínez MV, et al. Lowering high levels of fasting total homocysteine with folic acid and vitamins B in patients with venous thromboembolism: Relationship between response and the C677T methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) genotype. *Med Clin (Barc)* 2000;114:7-12.
- Goyette P, Summer JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: Isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994;7:195-200.
- Van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJM, Eskes TKAB, Van den Heuvel LP, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995;21:1070-1.
- 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 methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
- De Franchis R, Buoninconti A, Mandato C, Pepe A, Sperandeo MP, Del Gado R, et al. *J Med Genet* 1998;35:1009-13.
- Papapetrou C, Lynch SA, Burn S, Edwards WH. Methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects. *Lancet* 1996;6:58.
- Kluijtmans LAJ, Van den Heuvel LPWJ, Boers GHJ, Frosst P, Stevens EMB, Van Oost BA, et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996;58:35-41.
- Harmon DL, Woodside JV, Yamell JWG, McMaster D, Young IS, McCrum EE, et al. The common "thermolabile" variant of methylenetetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinemia. *Q J Med* 1996;89:571-7.
- Molloy AM, Daly S, Mills JL, Kirke PN, Whitehead AS, Ramsbottom D, et al. Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: Implications for folate intake recommendations. *Lancet* 1997; 349:1591-3.

14. Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J, et al. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 1996;94:2410-6.
15. Shannon B, Gnanasampanthan S, Beilby J, Lacopetta B. A polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene predisposes to colorectal cancers with microsatellite instability. *Gut* 2002;50:520-4.
16. Hung J, Beilby JP, Knuiman MW, Divitini M. Folate and vitamin B<sub>12</sub> and risk of fatal cardiovascular disease: Cohort study from Busselton, Western Australia. *BMJ* 2003;326:131-7.
17. Kluijtmans LAJ, Kastelein JJP, Lindemans J, Boers GH, Heil SG, Bruschke AV, et al. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 1999;96:2573-7.
18. Brattstrom L, Wilken DEL, Ohrvik J, Brudin L. Common methylene-tetrahydrofolate reductase mutation leads to hyperhomocysteinemia but not vascular disease. The result of a meta-analysis. *Circulation* 1998;98:2520-6.
19. De Late C, Wautrecht JC, Brasseur D, Dramaix M, Boeynaems JM, Decuyper J, et al. Plasma homocysteine concentrations in a Belgian school-age population. *Am J Clin Nutr* 1999;69:968-72.
20. Vilaseca MA, Moyano D, Ferrer I, Artuch R. Total homocysteine in pediatric patients. *Clin Chem* 1997;43:690-2.
21. Osganian SK, Stampfer MJ, Spiegelman D, Rimm E, Cutler JA, Feldman HA, et al. Distribution of and factors associated with serum homocysteine levels in children. Child and adolescent trial for cardiovascular health. *JAMA* 1999;281:1189-96.
22. Tucker KL, Selhub J, Wilson PWF, Rosenberg JH. Dietary intake pattern relates to plasma folate and homocysteine concentrations in the Framingham Heart Study. *J Nutr* 1996;126:3025-31.
23. Greenlund KJ, Srinivasan SR, Xu JH, Dalferes E, Myers L, Pickoff A, et al. Plasma homocysteine distribution and its association with parental history of coronary artery disease in black and white children. *Circulation* 1999;99:2144-9.
24. Gibson RS. Nutritional assessment. A laboratory manual. New York: Oxford University Press, 1993.
25. Lewis CA, Pancharuniti N, Sauberlich HE. Plasma folate adequacy as determined by homocysteine level. *Ann N Y Acad Sci* 1998;669:360-2.
26. Muñoz-Morán E, Diéguez-Lucena JL, Fernández-Arcas N, Perán-Mesa S, Reyes-Engel A. Genetic selection and folate intake during pregnancy. *Lancet* 1998;352:1120-1.
27. Franco RF, Araujo AG, Guerreiro JF, Elion J, Zago MA. Analysis of the C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. *Thromb Haemost* 1998;79:119-21.
28. Koch MC, Stegmann K, Ziegler A, Schröter B, Ermert A. Evaluation of the *MTHFR* C677T allele and the *MTHFR* gene locus in a German spina bifida population. *Eur J Pediatr* 1998;157:487-92.
29. Papapetrou C, Lynch SA, Burn S, Edwards WH. Methylene tetrahydrofolate reductase and neural tube defects. *Lancet* 1996;6:58.
30. Mornet E, Muller F, Lenvoise-Furet A, Delezoide AL, Col JY, Simon-Bouy B, et al. Screening of the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in French patients with neural tube defects. *Hum Genet* 1997;100:512-4.
31. Boduroglu K, Alikasifoglu M, Anar B, Tuncbilek E. 677CT mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene is not a risk factor for neural tube defects in Turkey. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 1998;78:235.
32. Balasa VV, Gruppo RA, Glueck CJ, Stroop D, Becker A, Pillow A, et al. The relationship of mutations in the *MTHFR*, prothrombin, and PAI-1 genes to plasma levels of homocysteine, prothrombin and PAI-1 in children and adults. *Thromb Haemost* 1999;81:739-44.
33. Bates CJ, Mansoor MA, Gregory J, Pentiev K, Prentice A. Correlates of plasma homocysteine, cysteine and cysteinyl-glycine in respondents in the British National Diet and Nutritional Survey of young people aged 4-18 years, and a comparison with survey of people aged 65 years and over. *Br J Nutr* 2002;87:71-9.