

Causas moleculares de la hiperhomocisteinemia

Alfonso Córdoba, Jairo B. Ceballos · Medellín, Colombia
Beatriz E. Meneses · Barcelona, España

Objetivo: revisar minuciosamente las investigaciones más relevantes de las causas tanto genéticas como ambientales que explican el aumento de la concentración de homocisteína en sangre (hiperhomocisteinemia).

Fuentes: se realizó una búsqueda en el Medline entre los años 1962 y 1998 de las investigaciones relacionadas con las causas moleculares que inducen hiperhomocisteinemia tanto en animales de experimentación como en humanos.

Selección de las investigaciones: se encontraron 380 resúmenes y de éstos fueron seleccionadas 151 que identificaban las causas de hiperhomocisteinemia.

Extracción de los datos: los datos informados en esta revisión fueron sacados de aquellos estudios experimentales cuyos objetivos y estrategias de investigación permitían identificar algunas de las causas de hiperhomocisteinemia tanto en ayunas como después de una sobrecarga oral de metionina.

Resultados: estos estudios han permitido profundizar en el conocimiento del metabolismo de la homocisteína y desvelar algunas de las causas y mecanismos responsables del aumento de la homocisteína en sangre. Estas causas incluyen los factores genéticos que afectan la actividad de la enzima cistationina β -sintasa, la metilnotetrahidrofolato reductasa, la metionina sintasa o cualquiera de las enzimas involucradas en la formación de una de las formas activas de la vitamina B₁₂ (coenzima, metilcobalamina) o los factores ambientales que ocasionen una disminución de la concentración en sangre de ácido fólico, vitamina B₆ o vitamina B₁₂. En todos los casos, el aumento de homocisteína es proporcional al grado de alteración de la actividad enzimática o al déficit vitamínico.

Conclusiones: la hiperhomocisteinemia puede ser detectada tras un análisis en ayunas y/o tras una sobrecarga de metionina. Estas determinaciones informan sobre la vía metabólica afectada y permiten seleccionar la estrategia terapéutica por emplear (*Acta Med Colomb* 2000;25:122-133).

Palabras clave: homocisteína, hiperhomocisteinemia, cistationina β -sintasa, metilnotetrahidrofolato reductasa, betaína:homocisteína metiltransferasa.

Introducción

La homocisteína (Hey) y su metabolismo han sido objeto de especial interés a partir de los años sesenta, cuando se describió que un grupo de pacientes con un defecto genético presentaba un aumento en la excreción urinaria de homocistina (dímero de homocisteína), por lo que se le denominó homocistinuria (1-3). Estos pacientes presentaban frecuentemente luxación del cristalino, compromiso óseo y neurológico, así como trombosis arteriales y venosas (4). El defecto molecular de la forma más frecuente de homocistinuria, denominada clásica, es la deficiencia de la enzima cistationina β -sintasa (CbS). Las oclusiones vasculares en esta enfermedad son graves y causan la muerte de aproximadamente el 50% de los individuos comprometidos antes de los 30 años de edad (4, 5). Los pacientes que

responden al tratamiento con vitamina B₆ tienen mejor pronóstico respecto a los que no responden.

La observación inicial que relacionó la concentración de Hcy plasmática y la enfermedad cardiovascular aterotrombótica la realizó McCully, a partir del estudio postmortem de un paciente con homocistinuria ocasionada por un defecto enzimático del metabolismo de la cobalamina. En dicho estudio se observó arterioesclerosis severa, similar a la observada en la homocistinuria causada por deficiencia

Dr. Alfonso Córdoba Porras: PhD, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia. Servei de Bioquímica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau; Dra. Beatriz E. Meneses Londoño: Universitat Autònoma de Barcelona, Departamento de Bioquímica i Biologia Molecular, de Barcelona, España; Dr. Jairo B. Ceballos Escobar: Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia.

de la enzima CbS. En ambos defectos enzimáticos el aumento de la concentración de Hcy en sangre fue la anomalía común; a partir de estas observaciones, McCully propuso que la elevación de la Hcy estaba relacionada con aterotrombosis (6, 7). Desde entonces un número creciente de estudios clínicos y epidemiológicos demuestran que la elevación moderada de la concentración de Hcy plasmática es un factor de riesgo independiente para enfermedad cardiovascular (8-13), con compromiso tanto del sistema vascular periférico (10-12) como del coronario (11, 13) y el cerebral (9-11).

El aumento moderado de la Hcy en sangre suele ser debido a una disminución en la actividad de las enzimas metionina sintasa, CbS y la metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (4, 14). Esta disminución puede ser ocasionada por alteraciones en su estructura primaria (defectos hereditarios) o a déficits de sus coenzimas, la metilcobalamina (metionina sintetasa) y la vitamina B₆ (CbS) o del sustrato del ácido metileno tetrahidrofolato (de la MTHFR) (9, 15, 16). Por ello, el tratamiento con estas vitaminas es efectivo en la disminución de la concentración de Hcy en sangre (17, 18).

Por tanto, la hiperhomocisteinemia (HHM) es un nuevo factor de riesgo de enfermedad vascular, que es posible modificar mediante intervención dietética o farmacológica. Por este motivo la Hcy constituye un parámetro analítico de utilización creciente en la práctica clínica, en pacientes con enfermedad cardiovascular. La determinación de la concentración de Hcy en sangre es de interés en otros casos, tales como en el diagnóstico y monitorización de la respuesta al tratamiento de anemias por deficiencia de vitamina B₁₂ y/o ácido fólico (19, 20), o en la valoración del riesgo de padecer defectos del tubo neural o en casos de aborto espontáneo, sobre todo en aquellos repetitivos (21).

A continuación se describen y se analizan las investigaciones realizadas sobre las causas moleculares y metabólicas de la HHM, el interés diagnóstico de la determinación de Hcy, así como los métodos utilizados para su determinación.

Material y métodos

De los 380 resúmenes encontrados en el Medline, 130 informaban acerca del metabolismo de la homocisteína y las causas de hiperhomocisteinemia, por lo cual procedimos a la recopilación y análisis de los estudios originales, con el objetivo de escribir esta revisión. Para ello, se analizaron ocho estudios que profundizaban en el conocimiento del metabolismo de la homocisteína y sus mecanismos de control y en los 122 estudios restantes se determinaban las causas que motivan el aumento de la homocisteína en ayunas (remetilación) o después de una sobrecarga oral con metionina (transulfuración) en animales y en humanos. El criterio empleado para definir el diagnóstico de hiperhomocisteinemia tanto basal como postsobrecarga oral de metionina fue: una concentración de homocisteína supe-

rior al promedio más dos desviaciones estándar (DE) del valor encontrado en los controles.

Metabolismo de la homocisteína

El aminoácido precursor de la Hcy es la metionina. El exceso de ésta proveniente de la dieta o del recambio de las proteínas endógenas que no se incorpora a las proteínas es metabolizada según se describe en la Figura 1. En la primera parte del metabolismo, la metionina se transforma en homocisteína mediante dos reacciones sucesivas. Dicha transformación se conoce con el nombre de transmetilación y se produce un metabolito muy importante en la regulación del metabolismo de la Hcy, la S-adenosilmetionina (SAM) o "metionina activa" y que, además, participa como donante de grupos metilos en un importante número de reacciones que tienen que ver con biosíntesis de colina, creatina, adrenalina, melatonina, sarcosina, así como para la metilación del ADN y ARN. Tras la desmetilación del SAM éste se transforma en S-adenosilhomocisteína y luego en Hcy y adenosina. Esta reacción es la única fuente de Hcy en vertebrados (22). El metabolismo de la Hcy se bifurca, bien sea hacia la formación de cisteína (transulfuración) o hacia la formación de metionina (remetilación). En la transulfuración, la Hcy se transforma en cisteína mediante dos reacciones dependientes de vitamina B₆. La primera de estas reacciones es catalizada por la CbS y en ella la Hcy se condensa con una molécula de serina para formar cistationina, y en la segunda reacción, la cistationasa γ -liasa cataliza la formación de cisteína y α -cetobutirato a partir de la cistationina (22).

En la ruta de la remetilación, la Hcy se metila para formar metionina mediante dos rutas metabólicas independientes, en las que participan respectivamente las enzimas metionina sintasa y la betaína:homocisteína metiltransferasa. La primera de estas enzimas se encuentra en la mayoría de estirpes celulares y requiere de 5-metiltetrahidrofolato como fuente de grupos metilo y de metilcobalamina como cofactor. La segunda se encuentra en el hígado y, en menor proporción, en riñones y glándulas suprarrenales; emplea betaína como fuente de grupos metilo (22). La acción de ambas reacciones permite conservar la metionina y mantener ciertos niveles de SAM. En humanos, aproximadamente el 50% de la Hcy es convertida en metionina mediante remetilación (23, 24).

El ácido tetrahidrofólico desmetilado por la enzima metionina sintasa ingresa al depósito intracelular de folatos reducidos. Si esta reacción se encuentra enlentecida, probablemente secuestre el folato en forma de 5-metiltetrahidrofolato, lo que disminuiría la disponibilidad de tetrahidrofolato para la síntesis de ADN y la proliferación celular. Esta perturbación en la homeostasis del folato se observa en la deficiencia de cobalamina y se suele conocer como la trampa del folato (25, 26).

La concentración plasmática de metionina determina la ruta de transulfuración o transmetilación que debe seguir la

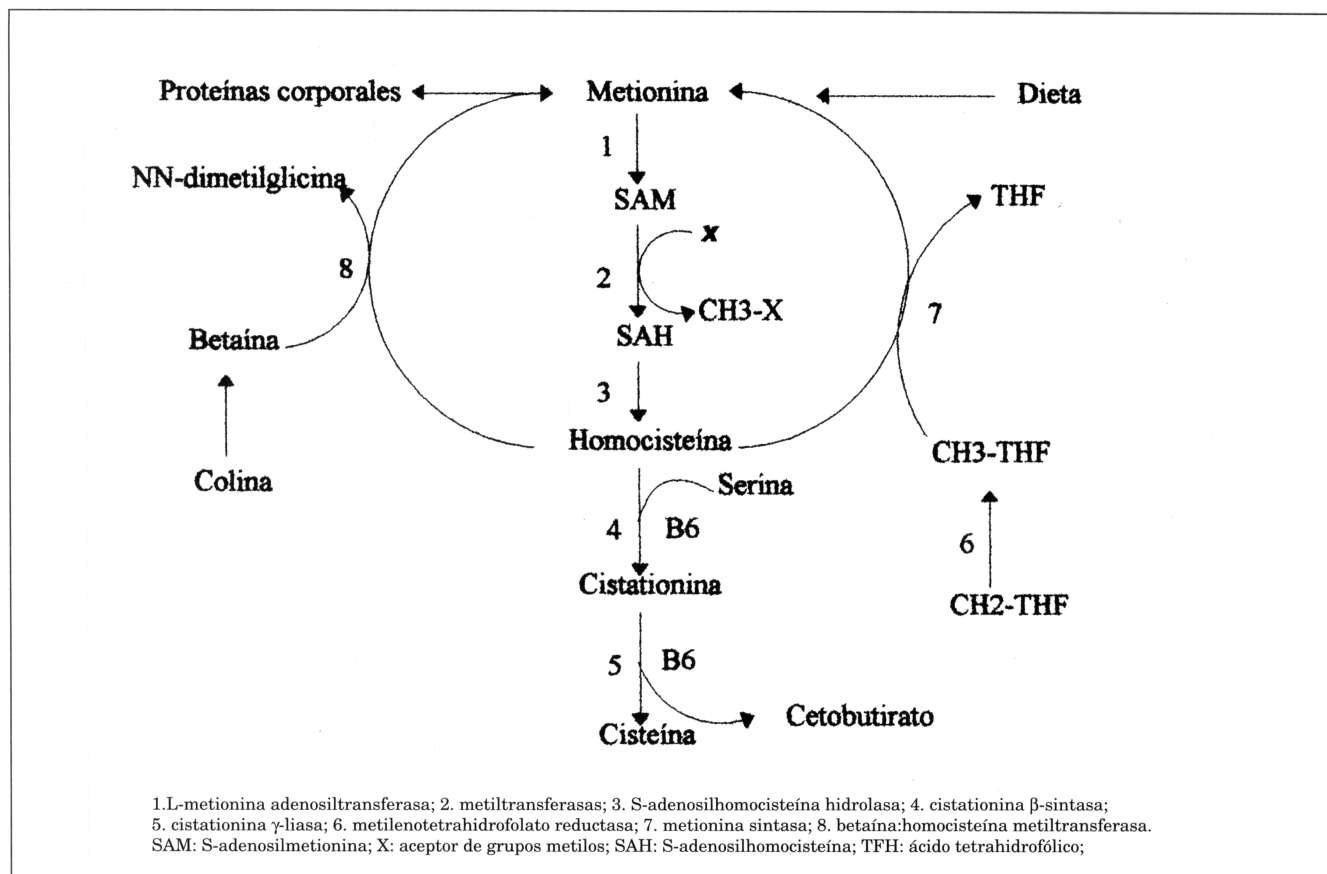


Figura 1. Metabolismo de la homocisteína.

Hcy. Cuando la metionina se encuentra aumentada se estimula la transulfuración y se inhibe la remetilación. Este mecanismo es regulado por el aumento del SAM (22, 27, 28). Cuando disminuye la concentración de metionina en la sangre, la concentración de los metabolitos y la actividad de las enzimas cambia en dirección opuesta. Este mecanismo de regulación asegura una conservación eficiente de metionina y de SAM a través de la remetilación durante el ayuno (29). Estos mecanismos permiten mantener las concentraciones de Hcy en un intervalo no tóxico. La concentración intracelular de Hcy es, en condiciones fisiológicas, muy reducida (1-5 nmol/g) (30). Cuando se aumenta la síntesis de Hcy (31, 32) o se inhibe su catabolismo (33, 34), aumenta la exportación hacia el espacio extracelular. La cantidad que se exporta refleja el balance entre la síntesis y la utilización. Por esta razón, la concentración extracelular de Hcy, y en particular la del plasma, es un indicador de la actividad de las enzimas y de la disponibilidad de cofactores y sustratos que participan en su metabolismo (35).

Enzimas involucradas directamente en el metabolismo de la homocisteína

CbS (L-serina hidro-liasa) (EC 4.2.1.22). El gen que codifica esta enzima se localiza en la región subtelomérica del cromosoma 21, 21q22.3 y está constituido por 2554

nucleótidos. Codifica para un monómero de 75 kDa formado por 551 residuos de aminoácidos (36). La forma enzimática que predomina es la de un tetrámero al que se une estrechamente el fosfato de piridoxal, la forma activa de la vitamina B₆, dos sustratos, Hcy y serina y tres ligandos adicionales: fosfato de piridoxal, SAM y un grupo hemo b. El grupo hemo se incorpora a la enzima durante el plegamiento del polipéptido para formar una hemoproteína, y es necesario para la unión del fosfato de piridoxal a la enzima. Un defecto que altere la unión del grupo hemo afectaría la unión del fosfato de piridoxal a la enzima (37).

Metionina sintasa. Es una enzima citoplasmática que cataliza la transferencia del grupo metilo desde el metiltetrahydrofolato (38) o el SAM (39, 40) a la Hcy para formar metionina. Esta reacción regenera el ácido tetrahidrofólico para el transporte de nuevas unidades de formilo, metileno y metilo para la síntesis de purinas y pirimidinas (22). El gen que codifica para esta enzima se localiza en el cromosoma y región 1q42.3-43 (41). Esta región codifica para una proteína de 1265 aminoácidos con un peso molecular de 140,3 kDa. En humanos adultos se encuentra en mayor proporción en corazón, páncreas, músculo esquelético y placenta, y en menor proporción en hígado, pulmón, cerebro y riñón, y en el feto, principalmente en el riñón (41).

Durante esta reacción el grupo metilo del metiltetrahidrofolato es transferido a la cob(I)alamina, que se encuentra fuertemente ligada a la enzima, para formar la metilcobalamina que finalmente es transferido a la Hcy (42, 43). La cob(I)alamina después de participar un cierto número de veces en esta reacción se oxida a cob(II)alamina o a cob(III)alamina. Su regeneración a cob(I)alamina requiere de un sistema reductor y de SAM (44, 45). También se oxida en presencia de óxido nítrico a cob(II)alamina, con formación de nitrógeno y de un radical hidroxilo o su equivalente capaz de modificar sitios de proteína próximos a la cobalamina (43, 46). Este último inhibe irreversiblemente a la enzima metionina sintasa e induce la pérdida de este grupo prostético (cobalamina I) (46).

Las alteraciones nutricionales y/o genéticas que comprometen la formación de la metilcobalamina (19) o del ácido metiltetrahidrofolato (20) inducen deficiencia funcional de la metionina sintasa y causan HH intermedia.

Betaína:homocisteína metiltransferasa (BHMT). Esta enzima cataliza la metilación de la Hcy para originar metionina. En esta reacción, la betaína (N,N,N-trimetilglicina) aporta el grupo metilo (47). La BHMT es inhibida reversiblemente por los productos de la reacción, metionina y N,N-dimetilglicina y por la SAM (48). Esta enzima se encuentra en el citosol de hígado y riñón de humanos y de cerdos (49) y en el hígado de ratas (49,50). La forma nativa de esta enzima, tanto en humanos como en ratas, es una proteína de 270 kDa, constituida por seis subunidades idénticas de 406 aminoácidos (51, 52).

La actividad de la BHMT depende de factores nutricionales (28, 53) y de la edad (54, 55). Es entre cinco y 10 veces más activa que la metionina sintasa y presenta dos veces mayor afinidad por la Hcy que la CbS (54). Es una enzima inducible por la colina o la betaína de la dieta (56) o por los cambios en la concentración de metionina en la sangre (7, 53). Esta enzima permite mantener las concentraciones de metionina en sangre cuando la ingesta de este aminoácido es limitada y eliminar la Hcy, cuando la ingesta de metionina es excesiva (53).

El suplemento con betaína ha demostrado ser efectivo en el tratamiento de los pacientes con homocistinuria clásica (57, 58) en la deficiencia de la MTHFR (59, 60) y en los defectos de cobalamina C para eliminar el exceso de Hcy y normalizar la concentración de metionina (57, 58).

MTHFR. Es una flavoproteína citoplasmática, con un peso molecular de 150 kDa, y probablemente sea un homodímero de 75 kDa (61) cada uno. Requiere de NADPH como dador de electrones (62). La MTHFR cataliza la reducción del 5,10-metilenotetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato. Esta reacción es irreversible y está regulada por la concentración de SAM. La acción combinada de esta enzima y la metionina sintasa aporta unidades de carbono para las reacciones de metilación en la cual el SAM es el dador final de estas unidades. La deficiencia de esta enzima es una de las causas de

homocistinuria, en general menos severa que la observada en la deficiencia de la CbS (63, 64).

Formas moleculares de la homocisteína en plasma

Entre el 70 y el 80% de la Hcy en sangre se encuentra ligada a las proteínas, principalmente a la albúmina, mediante puentes de sulfuro (65, 66). A esta fracción se le conoce como Hcy ligada a proteínas. Entre el 20 y el 30% del restante se conoce como Hcy libre (67) y está constituida por el heterodímero de Hcy-cisteína, el homodímero Hcy-Hcy (homocistina) y en una mínima proporción por el monómero de Hcy. La homocistina sólo se detecta en pacientes con homocistinuria o después de una sobrecarga de metionina (68). La suma de todas las especies plasmáticas de Hcy se denomina Hcy total, y su determinación es la que resulta de interés diagnóstico y/o fisiopatológico, ya que se ha demostrado que la concentración de Hcy libre es muy variable.

La experiencia acumulada en las dos últimas décadas tanto en pacientes con enfermedad cardiovascular como en la población general recomienda determinar la Hcy en estado de ayuno (basal) y tras sobrecarga de metionina (69). La alteración de una de estas dos determinaciones es suficiente para establecer el diagnóstico de HH.

Determinación de la concentración de homocisteína y su utilidad diagnóstica

Métodos utilizados en la determinación de homocisteína. La cuantificación de Hcy en plasma o suero requiere de equipos muy sofisticados como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (70), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección de fluorescencia (71, 72) o electroquímica (73), no siempre disponible en la mayoría de los laboratorios clínicos. De ahí, el interés que despierta la aparición de nuevos métodos (inmunoensayos, análisis enzimático-colorimétricos) que hagan accesible la determinación de Hcy a un mayor número de laboratorios (74, 75). La aparición de estas técnicas facilitará además, la posibilidad de automatización y el establecimiento de este procedimiento en la batería de análisis que de rutina se realizan para investigar la etiología de la enfermedad cardiovascular (76).

Para proceder a la determinación de la concentración plasmática de Hcy es aconsejable colocar en hielo el espécimen de sangre inmediatamente después de su extracción, y proceder a la separación del plasma antes de que pasen 30 minutos después de la extracción. El plasma podrá ser analizado en forma inmediata o ser congelado. La concentración de Hcy total en plasma almacenado a -20°C no varía en por lo menos un año. Sin embargo, tras la separación y congelación del plasma, aumenta la Hcy ligada a proteínas y disminuye la libre (16). Por ello, la determinación de la Hcy libre pierde validez en especímenes de plasma que hayan sido congelados. Por el contrario, se recomienda la determinación de la Hcy total por su estabilidad y poca variabilidad.

Intervalo de referencia de la concentración de homocisteína. Las concentraciones de Hcy en plasma en ayuno que se consideran "normales" en términos estadísticos varían entre diferentes países y laboratorios, por factores tales como las diferencias en los métodos analíticos y las características de los controles seleccionados. Las variaciones interindividuales están influidas por el tipo de dieta, la edad, el sexo, la ingesta de medicamentos, así como también por el folato sérico y tisular, y por las vitaminas B₆ y B₁₂. El criterio seguido por la mayoría de las investigaciones para considerar a un individuo hiperhomocisteinémico es cuando las concentraciones plasmáticas de Hcy son superiores a la media más dos desviaciones estándar de lo observado en los controles. La Tabla 1 resume las concentraciones normales de Hcy total en plasma en ayunas publicadas por diferentes autores. Estas concentraciones oscilan entre 5,0 y 16,0 mmol/L. En un grupo control seleccionado de la población de la ciudad de Barcelona, España, con una edad de 50±9,8 años sin signos ni síntomas de enfermedad vascular, las concentraciones de Hcy basal encontradas por nosotros fueron de 7,1±2,3 mmol/L (77).

Factores que regulan la concentración de homocisteína basal. La Hcy en ayuno está regulada por factores genéticos (4, 19, 20) y microambientales tales como las concentraciones de vitamina B₁₂(19), ácido fólico (20), factores hormonales (85, 86) y por ciertas patologías (87, 88) o tratamientos con algunos fármacos (89, 90). La deficiencia enzimática parcial observada en los individuos con la variante termolábil de la MTHFR (91-94) causa una elevación moderada de las concentraciones de Hcy en ayuno. Esta variante se presenta en la población general hasta en un 14% (91-94), ello sugiere que esta condición por sí sola no explica el elevado porcentaje de individuos con HHM en ayuno.

Importancia de la realización de la determinación de homocisteína basal. La determinación en ayuno de la Hcy es fundamental para identificar las alteraciones en la remetilación. Dichas concentraciones de Hcy en ayuno son muy sensibles a la deficiencia subclínica o moderada de ácido fólico (95, 98) o de vitamina B₁₂(15, 96). La severidad de esta HH está muy relacionada con el grado de la deficiencia vitamínica (19, 20). Por tal razón, un número importante de investigaciones encuentran una relación inversa entre las concentraciones de Hcy en ayuno y las de ácido fólico o de vitamina B₁₂ (16-21). Actualmente, se recomienda determinar además de la Hcy en ayuno la postsobrecarga oral de metionina, las concentraciones de ácido fólico y de vitamina B₁₂ para precisar el origen de la HHM y lo que es más importante desde el punto de vista clínico, la estrategia terapéutica por seguir.

Determinación de homocisteína tras una sobrecarga oral de metionina. *Cómo se realiza la prueba de sobrecarga de metionina.* Una vez extraída la muestra de sangre después de un ayuno de al menos 12 horas, se suministra a

Tabla 1. Niveles de homocisteína total en plasma de individuos en ayuno.

Número (n)	Sexo	Edad [†]	Homocisteína*	Referencia
46	HM	45-63	11,0±3,4	9
50	HM	47±11	7,1±2,3	77
45	HM	62±10	7,3±2,9	78
255	H	49±6	10,9±4,9	79
103	HM	48	10,1±2,1	80
98	HM	45-69	13,8±3,2	81
51	HM	23-45	7,9±2,1	82
85	H	50±6,7	11,3±2,9	83

*mmoles/L. [†]años. H: Hombres. M: Mujeres.

los individuos una dosis oral de 100 mg de metionina/kg de peso (17, 97) o 3,8 g/m² de superficie corporal (9, 98, 99), las cuales son dosis equivalentes (9). Se realiza una segunda extracción de sangre a las cuatro (9) o a las seis horas después de la ingesta de la metionina (97), o en varias muestras después de diferentes periodos de tiempo tras la sobrecarga oral de metionina (por ejemplo, tras cuatro, seis y ocho horas) (13, 17, 99). Actualmente, no hay un consenso en relación a después de cuántas horas debe realizarse la extracción, sin embargo, algunos la realizan cuatro horas después en tanto que otros seis horas después de la sobrecarga oral de metionina.

Intervalo de referencia de la concentración de homocisteína después de una sobrecarga de metionina. Cuando el aumento de la concentración de Hcy plasmática después de la sobrecarga de metionina es superior al promedio más dos desviaciones estándar de la concentración de los controles (9, 10, 99) se considera una respuesta anormal. Teniendo en cuenta este criterio la concentración de Hcy total en el plasma tras seis horas de la sobrecarga oral de metionina según distintos estudios está entre 15,1 y 50,1 mmol/L (100-102). En nuestra experiencia en la muestra de población analizada en la ciudad de Barcelona en el Servicio de Bioquímica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, el incremento máximo de Hcy total fue de 31,7 mmol/L (77).

Importancia de la realización de la prueba de sobrecarga de metionina. El interés de la realización de esta prueba consiste en que suele detectar heterocigotos para la deficiencia de la CbS, que en cambio presentan concentraciones de Hcy basal indistinguibles de las de los controles (9, 10, 65). Ello es debido a que los heterocigotos para la deficiencia de la CbS cuando se someten a un estrés de esta naturaleza metabolizan la metionina con una eficiencia entre el 30 y el 50% de la observada en un individuo normal. Diversos estudios han concluido que de no realizarse la sobrecarga oral de metionina (por tanto, sólo con el resultado de la determinación basal de Hcy), se dejarían de diagnosticar hasta un 60% de casos de HHM (100).

En humanos y en ratas las concentraciones plasmáticas de vitamina B₁₂ y folato no afectan el metabolismo de la Hcy después de una sobrecarga oral de metionina (9, 103). Por el

contrario, la deficiencia de vitamina B₆, aunque no afecta las concentraciones de Hcy en ayuno (104), sí causa un mayor incremento de Hcy después de una sobrecarga oral de metionina (103,105). Lo anterior confirma el papel que realiza esta vitamina en la transformación de Hcy en cisteína.

El incremento de las concentraciones de Hcy más que la concentración absoluta después de la sobrecarga oral de metionina, se considera un mejor indicador de la actividad de la CbS (10). Cuando se tiene en cuenta la concentración absoluta, la información sobre la vía metabólica afectada sería menos clara ya que una concentración de Hcy alta en ayunas podría ser una de las causas de hiperhomocisteinemia postsobrecarga.

La determinación de la actividad de la enzima CbS permite identificar una buena parte de los heterocigotos para una mutación en esta enzima (99). Sin embargo, tanto en la prueba de sobrecarga oral de metionina (9, 17, 99, 102) como en la determinación de la actividad enzimática, existe una superposición de los resultados entre los heterocigotos y los controles. La combinación de ambos procedimientos aumenta la sensibilidad y especificidad en la identificación de portadores de un defecto hereditario del gen que codifica la CbS (99). Por lo tanto, la HHM en ayuno y la postsobrecarga oral de metionina indican defectos diferentes aunque relacionados. La omisión de una u otra determinación reduce de manera apreciable la probabilidad de detectar los individuos con HHM.

Causas de hiperhomocisteinemia

La HH por sí sola no revela el origen último del defecto metabólico. En efecto, existen diversos factores hereditarios, patológicos, nutricionales y tratamientos farmacológicos capaces de inducir HH, que a continuación se detallan.

Hereditarias. *Deficiencia de la enzima CbS.* Es la causa hereditaria más frecuente de homocistinuria y se suele denominar homocistinuria clásica. Se hereda en forma autosómica recesiva (1,4). Se presenta en aproximadamente 1 de cada 334.000 nacimientos en todo el mundo. En algunas regiones y países esta incidencia es considerablemente mayor. Por ejemplo, es de uno en cada 60.000 en Nueva Gales del Sur y de uno en cada 10.000 en Irlanda (4, 17). En nuestra experiencia hemos diagnosticado 10 casos de homocistinuria en la ciudad de Medellín y es probable que existan 12 casos nuevos en la ciudad de Manizales (comunicación personal de la Dra. Ana Lorenza Valencia).

La característica bioquímica más sobresaliente en esta enfermedad es la HH severa (la elevación de la concentración plasmática de Hcy entre 50 y 100 veces la concentración de los controles) (65, 106) y la marcada excreción urinaria de homocistina (el aumento de la excreción de homocistina entre 20 y 100 veces respecto de los controles) (106). Este es un hecho además clínicamente relevante, puesto que la severidad de la enfermedad está en relación directa con la concentración de Hcy en sangre (107).

El tratamiento inicial de esta enfermedad consiste en suministrar vitamina B₆ (250-1200 mg/día) y luego monitorizar la respuesta a este tratamiento. Si no hay una respuesta positiva se añade ácido fólico (5-15 mg/día). En caso de una respuesta negativa se aconseja la ingestión de betaína (seis gramos diarios distribuidos en tres dosis de dos gramos) y si hace falta se recomienda una dieta de bajo contenido en metionina enriquecida con cisteína para evitar la síntesis defectuosa de proteínas. En el 50 % de los casos la concentración de Hcy disminuye notablemente tras el tratamiento con vitamina B₆(4); la respuesta al tratamiento con vitamina B₆ se correlaciona con la actividad residual de la enzima medida (108).

La Tabla 2 resume las mutaciones identificadas del gen que codifica esta enzima, el exón involucrado, la frecuencia de éstas en las diferentes etnias o países, y la respuesta al tratamiento con vitamina B₆ según el tipo de mutación. Como puede verse en dicha tabla, la mayor parte de estas mutaciones se localizan entre los exones 2 y 12, afectando en forma principal al 3 y al 8.

Las mutaciones de transición T833C y G919A son las más prevalentes en los pacientes con homocistinuria (102, 110, 114, 115). Los hallazgos clínicos en los pacientes homocigotos para la mutación T833C demuestran una respuesta positiva al tratamiento con vitamina B₆ y un cuadro clínico de evolución intermedia (115). Probablemente esta mutación afecta la conformación de la enzima o la interacción de las cuatro subunidades que conforman esta enzima, originando un tetrámero inestable (109). La mutación G919A es la más prevalente en los pacientes que no responden al tratamiento con vitamina B₆ y la más frecuente en el norte de Europa, Irlanda (71%) (117), Estados Unidos y en Australia (110).

Alteraciones de la remetilación o de la síntesis de metionina. Las alteraciones en la remetilación originan otras formas de homocistinuria. En estas variantes hay un suministro inadecuado del ácido 5-metiltetrahidrofólico, la principal forma de folato en la sangre y tejidos, o de metilcobalamina, debido a un defecto en una de las enzimas involucradas en el proceso de activación de estas coenzimas.

- Alteraciones en el metabolismo del ácido fólico. De las alteraciones en el metabolismo del ácido fólico, la deficiencia severa de la enzima MTHFR (20) y la homocigosidad para la variante termolábil, son las causas más comunes. Este último defecto cursa con una HH moderada respecto a la deficiencia severa de esta enzima.

La HH en la deficiencia de la MTHFR suele ser menos severa que en la homocistinuria clásica (deficiencia de la enzima CbS (63,64). Sin embargo, las alteraciones neurológicas incluyendo las convulsiones, neuropatía periférica, alteraciones psiquiátricas y retardo mental, son de más rápida evolución que en la deficiencia de la CbS. Se calcula que la homocigosidad para este defecto en la población general es la décima parte de la estimada para la deficiencia de la enzima CbS (91).

Tabla 2. Algunos defectos genéticos que afectan en el gen de la enzima cistationina β -sintasa

Investigador	Exon	Alelo 1	Alelo 2	Respuesta a la vitamina B ₆	Origen étnico o nacionalidad	Referencia
Kosich 1992	8/12	Thr→Ile T833C [†]	Sitio splice A1224-2C	+	[†] Franceses, Alemanes, Noruegos, Ingleses, Italianos, Polacos Portugueses	109
Hu 1993	8	Gly→Ser G919A	GlyÆ Ser G919A	-	Irlandeses, Franceses, Escoceses, Ingleses, Alemanes, Portugueses	110
Kozich 1993	3	Ala→Val C341T	ProÆLeu C434T	+	Irlandeses, Alemanes	111
De Franchis 1994	2/3	Arg→Pro C233G	LysÆGlu G715A	+	Irlandeses	112
	2/3	AsnÆLys G306C	LysÆGlu G715A	+	Irlandeses	
Marble [‡] 1994	3	GluÆAsp G393C	GluÆAsp G393C	-	Norteamericano de origen Irlandés	113
	3	ArgÆGlu G374A	ArgÆGlu G374A	-	Norteamericano de origen Irlandés	
	3	ArgÆGln G453A	ArgÆGln G453A	-	Norteamericano de origen Irlandés	
Sebastio 1995	3	ArgÆGlu G374A	ArgÆGlu G374A	±	Italianos, Portugueses, Irlandeses	114
	7	ThrÆMet C770T	ThrÆMet C770T	-	Italianos	
	8	Stop 8 44 ins 68	ThrÆIle T833C	+	Italianos, Norteamericanos	
	2	ProÆ Ser C262T	?	+	Italianos	
Shih 1995	3/8	GlyÆArg G415A	ThrÆIle T833C	+	Italianos, Norteamericanos	115
	3/8	GluÆLys G430A	ThrÆIle T833C	+	Ingleses, Norteamericanos	
	8	ThrÆIle T833C	ThrÆ Ile T833C	+	Norteamericanos.	
Kluitmans 1995		ValÆMet G1111A	ThrÆIle T833C	+	Holandeses	116
		CysÆTyr G494A	ThrÆIle T833C	+	Holandeses	

[†] homocigoto para tres mutaciones diferentes en posición cis en el mismo alelo.
[±] = respuesta parcial al tratamiento con vitamina B₆.

En el examen postmortem de los afectados se observa trombosis e infarto de las arterias cerebrales, coronarias o renales (118, 119) y otros cambios semejantes a los observados en los sujetos con deficiencia de CbS. La severidad de las manifestaciones clínicas es paralela al grado de deficiencia enzimática (63, 64). Entre los hallazgos bioquímicos en estos pacientes se destaca el aumento de Hcy en sangre y en orina (130 mmol/L en 24 horas), así como la disminución de la concentración de metionina en sangre (0 - 18 mmol/L vs 23-35 mmol/L en los controles) y del folato sérico y eritrocitario (60). Las concentraciones de metionina y de algunos neurotransmisores también se encuentran disminuidas en el sistema nervioso central (20). El hallazgo clínico más importante que permite el diagnóstico diferencial entre la deficiencia de la enzima MTHFR y los defectos metabólicos de la cobalamina, es la ausencia de anemia

megaloblástica y aciduria metilmalónica en la deficiencia de la MTHFR.

La deficiencia severa de la MTHFR se transmite en forma autosómica recesiva, y el gen que codifica para esta enzima se localiza en el cromosoma 1 p36.3 (120). Recientemente se han descrito catorce mutaciones que afectan la expresión de este gen (120, 121).

Debido a que los pacientes con deficiencia de la MTHFR son resistentes al tratamiento (60) se recomienda emplear dos o más de las siguientes estrategias terapéuticas: 1) ácido fólico o folínico para maximizar la actividad residual de esta enzima; 2) 5-metiltetrahidrofolato para sustituir el producto deficitario; 3) suplemento de metionina para corregir su deficiencia; 4) vitamina B₆ para disminuir la concentración de Hcy a través de la activación de la CbS; 5) cobalamina por su papel como cofactor de la metionina

sintasa; 6) carnitina como un requerimiento de la SAM y 7) betaína que es el sustrato de la betaína-homocisteína metiltransferasa (60), para activar la remetilación de la Hcy, aumentar la concentración de metionina y disminuir la de Hcy. El tratamiento con betaína parece ser el que produce mejores resultados (59).

Los estudios *in vitro* de estabilidad térmica demuestran que la enzima MTHFR presenta una variante con una sensibilidad térmica (46-C) que la diferencia claramente de la enzima presente en la mayoría de la población (14, 92) y de la enzima de pacientes con deficiencia severa (122). A esta variante se le suele denominar variante termolábil.

El hecho de que la HH no es un hallazgo consistente en los homocigotos para la variante termolábil sugiere que otros factores adicionales y diferentes a los genéticos (ej: folato sérico disminuido) son necesarios para que las concentraciones de Hcy en sangre se incrementen (14). En efecto, la actividad enzimática disminuida de esta variante incrementa la susceptibilidad por desarrollar HH, especialmente en los individuos con una concentración baja de ácido fólico (deficiencia subclínica) (4). La actividad específica medida en extracto de linfocitos de los homocigotos para esta variante es el 50% de la actividad de los controles y es similar a la expresada por los heterocigotos para la deficiencia severa de la MTHFR (14, 19).

En nuestra experiencia los controles y pacientes con esta variante presentaron una actividad después de calentar a 46°C significativamente disminuida (<30%) respecto a los controles y pacientes negativos para esta variante (50-90%), mientras que los heterocigotos presentaron una actividad intermedia entre éstos. Debido a la elevada frecuencia de homocigosidad para esta variante en la población general (14, 77, 92, 120) y en pacientes con enfermedad arteriocoronaria (tres veces más que en la población general) su detección es considerada por algunos estudios como un factor de riesgo para enfermedad vascular precoz (91-93).

En esta variante se produce una sustitución de una citosina por una timina en el nucleótido 677 de dicho gen, lo que origina un cambio de alanina por valina. La frecuencia de los genotipos homocigotos para la variante termolábil (+/+), heterocigotos (+/-) y negativos para esta variante (-/-) en la población control de la ciudad de Barcelona, España fue del 14%, 46% y 40% respectivamente (77). La HH en los homocigotos para la variante termolábil se corrige con suplemento de ácido fólico vía oral (94).

• **Déficit de vitamina B₁₂.** El metabolismo de la vitamina B₁₂ o cobalamina afecta de manera sustancial el funcionamiento de las enzimas metionina sintasa y/o de la metilmalonilCoA mutasa. Cuando el defecto compromete a la metionina sintasa se aumenta la Hcy en plasma y orina (homocistinuria). Cuando afecta la metilmalonilCoA mutasa, se aumenta el ácido metilmalónico en sangre y orina. En ocasiones, el defecto afecta ambas enzimas y los pacientes tienen aumentada la concentración de Hcy y ácido metilmalónico tanto en sangre como en la orina. En

la actualidad se han descrito diez defectos genéticos que afectan el metabolismo de la cobalamina, tres de ellos afectan la absorción y el transporte y los otros siete la utilización celular y la formación de las coenzimas metilcobalamina o adenosilcobalamina (19).

Adquiridas. Este tipo de HH es inducido por la deficiencia nutricional de ácido fólico y de las vitaminas B₁₂ y B₆, por medicamentos o por fallo renal.

Nutricionales. • **Deficiencia de folato.** La deficiencia de folato además de anemia megaloblástica induce HH en el 94,8% de los casos (16). Este porcentaje es del 84% de los casos cuando la concentración de folato está sólo ligeramente disminuida (deficiencia subclínica) (8).

• **Deficiencia de vitamina B₁₂.** En la deficiencia subclínica de vitamina B₁₂, la concentración de Hcy en sangre es dos veces superior a la de los controles. La administración de 1 mg de hidroxycobalamina por vía parenteral durante dos semanas normaliza la Hcy (15). En los pacientes con evidencia clínica de deficiencia de vitamina B₁₂, la concentración basal de Hcy en el 98,7% de los casos está significativamente aumentada con respecto a los controles (16).

Debido a que el metabolismo de la Hcy en el interior de la célula es muy sensible a la disminución de vitamina B₁₂, la medición de Hcy en plasma es un buen indicador del estatus intracelular de esta vitamina, aun en casos en los que las concentraciones séricas de B₁₂ están en el intervalo de la normalidad (123).

• **Deficiencia de vitamina B₆.** La deficiencia de B₆ afecta significativamente la velocidad de las reacciones que transforman la Hcy en cisteína al disminuir la actividad de las enzimas CbS y cistationasa γ -liasa. En estos individuos induce un aumento de las concentraciones de Hcy en sangre tras una sobrecarga de metionina (105). Esta alteración se corrige con la inclusión de B₆ en la dieta (124). La deficiencia de vitamina B₆ se considera un factor de riesgo para la enfermedad arteriosclerótica. Se ha encontrado que los pacientes con compromiso en las arterias aorta, iliaca, carótida y cerebral presentan concentraciones reducidas de 5-fosfato de piridoxal (9).

Alteración renal. En los pacientes con insuficiencia renal crónica (125) o recién trasplantados (126) aumenta la Hcy en sangre, probablemente por una disminución en el catabolismo de la Hcy. Existe una correlación negativa significativa entre el aclaramiento de creatinina y las concentraciones de Hcy en plasma ($p < 0,01$) (127). La HH está presente en estos pacientes desde períodos muy tempranos de la alteración renal y está más aumentada en aquellos pacientes con enfermedad arterial oclusiva (28,9 \pm 13,3 vs 17,8 \pm 8,9 mmol/L, $p < 0,01$). Dicha HH probablemente desempeñe un papel importante en la marcada susceptibilidad de estos pacientes a desarrollar enfermedad vascular prematura (125, 127).

Tratamiento farmacológico. • **Antifolatos.** Medicamentos como el metotrexate (empleado en el tratamiento de leucemia aguda; tumores sólidos, psoriasis, artritis

reumatoidea) y sus derivados hepáticos, inhiben la enzima dihidrofolato reductasa (89, 90). Este efecto interfiere con la transformación de Hcy en metionina. Las fenotiazinas, los antidepresivos tricíclicos, los contraceptivos orales, los tuberculostáticos y el trimetoprim actúan por mecanismos similares. Los anticonvulsivantes (fenitoína, fenobarbital, primidona, carbamazepina y ácido valproico) alteran el metabolismo del ácido fólico, disminuyen su absorción intestinal e inducen deficiencia de folato e HH (128).

- Antivitamina B₁₂. El óxido nitroso empleado como anestésico oxida el cobalto de la cobalamina (cob(I)alamina a cob(II)alamina), bloquea el transporte de grupos metilos por la cobalamina, inactiva irreversiblemente la enzima metionina sintasa e induce HH (43, 46).

- Antagonistas de la vitamina B₆. El azaribine (triacetato-6-azaurine) empleado en el tratamiento de la psoriasis refractaria es un antagonista de la vitamina B₆, por lo tanto, inhibe la CbS e induce aumento de la concentración de Hcy en la sangre. La isoniazida, la cicloserina, la hidralazina, la carbamacepina (129) y la teofilina (105) también interfieren con la función de la vitamina B₆. De igual manera, el uso de hipolipemiantes como el ácido nicotínico, disminuye significativamente la concentración de vitamina B₆ y de cisteína e incrementa la de Hey.

Influencia de la edad y sexo en la concentración de homocisteína. La concentración de Hcy basal en plasma es mayor en hombres que en mujeres (8, 71). También algunos estudios sugieren un mayor aumento de Hcy postsobrecarga oral de metionina en los hombres (85) Después de la menopausia, en las mujeres, la concentración de Hcy se incrementa hasta alcanzar la concentración de los hombres (71, 85, 86). La concentración de Hcy disminuye durante el embarazo y durante la terapia sustitutiva con estrógenos o con un agonista parcial de los estrógenos, el tamoxifen (130).

Estas diferencias en las concentraciones de Hcy en relación con el sexo pueden reflejar el efecto de las hormonas sexuales sobre el metabolismo de la Hcy (85, 86) y el efecto de una mayor masa muscular en los hombres respecto a las mujeres, ya que alrededor del 75% de la Hcy se forma conjuntamente con la creatinina (8, 23). Ello explicaría, en parte, por qué las concentraciones de estos metabolitos en sangre son mayores en los hombres que en las mujeres y por qué éstas tienen mayor protección contra la enfermedad vascular, especialmente durante su vida reproductiva (85).

Las concentraciones de Hcy aumentan progresivamente con la edad en ambos sexos (8). El incremento de la Hcy con la edad estaría relacionado con una disminución de las concentraciones de las vitaminas B₆ y B₁₂ y de ácido fólico (8).

Conclusiones

Los anteriores hallazgos permiten concluir que el aumento de la concentración de Hcy está determinado por múltiples factores, algunos de carácter genéticos y otros de

carácter ambiental. Tan sólo es necesaria la participación de uno de ellos para que la HH se manifieste (deficiencias enzimáticas o déficit vitamínico), en tanto que existen otros factores genéticos, que por sí solos no causan aumento de la concentración de Hcy pero predisponen a los individuos a tal alteración cuando coexiste con un factor ambiental. Por ejemplo, los individuos con la variante termolábil de la enzima MTHFR son muy susceptibles a presentar HH con pequeños descensos en la concentración sérica de ácido fólico. Este hecho es muy relevante ya que evidencia la importancia de la interacción de un factor genético con otro factor ambiental como posibles causas del aumento de la Hcy. El rápido crecimiento del conocimiento de la Hcy y su metabolismo en las últimas dos décadas, ha sido una pieza clave en la identificación de las causas que originan el aumento de la Hcy y de la estrategia terapéutica por seguir según el tipo de HH encontrado. A pesar de ello, todavía quedan por descifrar otras interacciones genéticas con otros factores ambientales que contribuirían a explicar otras causas involucradas en dicha alteración. Como por ejemplo, no se conoce la existencia de posibles variantes de las enzimas metionina sintasa o betaína homocisteína metiltransferasa y cómo estas variantes podrían afectar la concentración de Hcy, ni tampoco se conoce la influencia de las posibles interacciones de estas variantes con la deficiencia subclínica de la vitamina B₁₂. Por ello, en el futuro deben realizarse investigaciones encaminadas a dilucidar éstos y otros mecanismos que permitan un mayor entendimiento y control de este factor de riesgo de enfermedad cardiovascular.

Summary

Objective: To review the most relevant investigations on the molecular and environmental causes of hyperhomocysteinemia.

Sources: Medline-search of articles published between 1962 and 1998. Papers regarding the molecular origins of hyperhomocysteinemia, in both animal and human models were included.

Research selection: three-hundred and eighty articles were retrieved. From these 130 were selected as they analyzed the origins of hyperhomocysteinemia.

Data was obtained from those articles in which their research objectives and strategies allowed the identification of some of the causes of hyperhomocysteinemia both during fasting as well as after an oral methionine overload.

Conclusions: these investigations have allowed us to increase our knowledge about homocysteine metabolism and to clarify some of the responsible causes and mechanisms for blood homocysteine increase. These causes include genetic factors which affect the cystathionine β-synthase enzyme activity, the methylentetrahydrofolate reductase activity, the methionine synthase activity or decrease activity in any of the enzymes involved in the formation of one the active forms of vitamin B12 (methylcobalamine coenzyme), or to environmental factors

which cause a reduction of folic acid concentration in the blood as well as a reduction of either vitamin B6 or vitamin B12.

In all cases, the homocysteine increase is proportional either to the degree of decrease in enzymatic activity or to vitamin deficit. Hyperhomocysteinemia could be detected after an analysis, either with the patient in state of fasting or after a methionine overload. These determinations give information about the affected metabolic pathway and allow us to select the therapeutic strategy to follow.

Key words: homocysteine, hyperhomocysteinemia, cistathionine β -synthase, methylentetrahydrofolate reductase, betaine-homocysteine methyltransferase.

Referencias

- Finkelstein JD, Mudd HS, Laster FIK. Homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency: the mode of inheritance. *Science* 1964; **146**: 785-787.
- Gerritsen T, Vaughn JG, Weisman HA. The identification of homocysteine in the urine. *Biochem Biophys Res Commun* 1962; **9**: 493-496.
- Carson NAJ, Neill DW. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child* 1962; **37**: 505-513.
- Mudd SH, Levy HL, Skovy F. Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic Molecular Bases of Inherited Diseases*. New York, NY: McGraw-Hill Inc, 1995: 1279-1327.
- McKusick VA. Homocystinuria. In *Heritable disorders of connective tissue*, 4th ed. St. Louis: CV Mosby, 1972: 224-281.
- McCully KS. Homocysteine theory of arteriosclerosis. Development and current status. In: Gotto, Jr A.M. Paoletti R. (eds), *Atherosclerosis reviews*, New York; Raven press, 1983: 157-246.
- McCully KS, Wilson RB. Homocystinuria theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis* 1975; **22**: 215-227.
- Córdoba Porras A, Blanco Vaca F, González Sastre F. Hiperhomocisteinemia, un nuevo marcador de riesgo vascular: territorios vasculares afectados, papel en la patogénesis de la arteriosclerosis y la trombosis y tratamiento. *Medicina Clínica (Barc)* 1997; **109**: 715-725.
- González Y, Souto JC, Matheo J, Córdoba PA, Blanco-Vaca F, Fontcuberta J. Moderate hyperhomocysteinemia is a high prevalent defect in Spanish patients with venous thromboembolic disease. *Haematologica* 1998; **83**: 1126-1127.
- Córoba Porras A. Hiperhomocisteinemia en pacientes con accidente vascular cerebral: prevalencia, determinantes y asociaciones de interés clínico-biológico, papel del polimorfismo de la enzima metilenotetrahidrofolato reductasa y tratamiento. Tesis. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España, julio 1998.
- Boushey CJ, Beresford SAA, 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.
- Malinow MR, Kang SS, Taylor LM, et al. Prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1989; **79**: 1180-1188.
- Wilcken DEL, Reddy SG, Gupta VJ. Homocysteinemia, ischemic heart disease, and the carrier state for homocystinuria. *Metabolism* 1983; **32**: 363-370.
- Kang SS, Zhou J, Wong PWK, Kowalyszyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylentetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988; **43**: 414-421.
- Brattstrom L, Israelsson B, Lindgarde F, Hultberg B. Higher total plasma homocysteine in vitamin B-12 deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionine B-synthase deficiency. *Metabolism* 1988; **37**: 175-178.
- Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Invest* 1988; **81**: 466-474.
- Brattstrom LE, Israelsson B, Jeppsson JO, Hultberg B. Folic acid - an innocuous means to reduce plasma homocysteine. *Scand J Clin Lab Invest* 1988; **48**: 215-221.
- Ubbink JB, Vermaak WJH, Van der Merwe A, Becker PJ, Delport R, Potgieter HC. Vitamin requirements for the treatment of hyperhomocysteinemia in humans. *J Nutr* 1994; **124**: 1927-1933.
- Fenton AW, Rosenberg LE. Inherited disorders of cobalamin transport and metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, NY: McGraw-Hill Inc; 1995: 3129-3149.
- Rosenblatt DS. Inherited disorders of folate transport and metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, NY: McGraw-Hill Inc; 1995: 3111-3128.
- Stegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Trijbels FJM, et al. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects? *Metabolism* 1994; **43**: 1475-1480.
- Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990; **1**: 228-237.
- Mudd SH, Poole JR. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism* 1975; **24**: 721-735.
- Mudd SH, Ebert MH, Schriver CR. Labile methyl group balances in the human the role of sarcosine. *Metabolism* 1980; **29**: 707-720.
- Herbert V, Zalusky R. Interrelations of vitamin B12 and folic acid metabolism: folic acid clearance studies. *J Clin Invest* 1962; **41**: 1263-1276.
- Chanarin I, Deacon R, Lumb M, Perry J. Cobalamin-folate interaction. *Blood Rev* 1990; **3**: 211-215.
- Finkelstein JD, Kyle WE, Martin JJ, Pick AM. Activation of cystathionine synthase by adenosylmethionine and adenosylselenionine. *Biochim Biophys Res Commun* 1975; **66**: 81-87.
- Koracevic D, Djordjevic V. Effect of trypsin, s-adenosylmethionine and ethionine on L-serine Sulphydrase activity. *Experientia* 1977; **33**: 1010-1011.
- Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Adaptation to methionine excess. *J Biol Chem* 1986; **261**: 1582-1587.
- Ueland PM, Heiland S, Broch OJ, Schanche JS. Homocysteine in tissues of the mouse and rat. *J Biol Chem* 1984; **259**: 2360-2364.
- Svardal A, Refsum H, Ueland PM. Determination of in vivo protein binding of homocysteine and its relation to free homocysteine in the liver and other tissues of the rat. *J Bio Chem* 1986; **261**: 3156-3163.
- Christensen B, Refsum H, Vintermyr O, Ueland PM. Homocysteine export from cells cultured in the presence of physiological or superfluous levels of methionine: methionine loading of non-transformed, transformed, proliferating and quiescent cells in culture. *J Cell Physiol* 1990; **146**: 52-62.
- Ueland PM, Refsum H, Male R, Lillehaug JR. Disposition of endogenous homocysteine by mouse fibroblast C3H/10T1/2 Cl 8 and the chemically transformed C3H/10T1/2MCA Cl 6 cells following methotrexate exposure. *JNCI* 1986; **77**: 283-289.
- Refsum H, Christensen B, Djurhuus R, Ueland PM. The interaction between methotrexate rescue agents and cell proliferation as modulators homocysteine export from cells in culture. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; **258**: 559-666.
- Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med* 1989; **114**: 473-501.
- Kraus JP, Le K, Swaroop M, Ohura T, Tahara T, Rosenberg LE, et al. Human cystathionine -synthase cDNA: sequence, alternative splicing and expression in cultured cells. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 1633-1638.
- Kery V, Bukovska G, Kraus JP. Transsulfuration depends on heme in addition to pyridoxal 5'-phosphate. Cystathionine beta-synthase is a heme protein. *J Biol Chem* 1994; **269**: 25283-25288.
- Weissbach H, Taylor R. Role of vitamin B₁₂ in methionine of biosynthesis. *Fed Proc* 1966; **25**: 1649-1656.
- Taylor RT: B₁₂-dependent methionine biosynthesis, in Dolphin D (ed): "B₁₂" New York, Jhon Wiley & Sons, Inc., 1982: 307-355.
- Matthews RG. Methionine biosynthesis. In Blakley RL, Bencovic SJ (eds), *Folates and pterins Volumen 1*. New York: Jhon Wiley & Sons, Inc., 1986: 497-553.
- Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J, Shane B. Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression. *J Biological Chemistry* 1997; **272**: 3628-3634.
- Taylor RT, Weissbach H. Escherichia coli B N⁵methylterahydrofolate-homocysteine vitamina B₁₂ transmetilase: formation and photolability of a methylcobalamin enzyme. *Arch Biochem Biophys* 1968; **123**: 109-126.
- Drummond JT, Matthews RG. Nitrous oxide degradation by cobalamin-dependent methionine synthase: characterization of the reactants and products in the inactivation reaction. *Biochemistry* 1994; **33**: 3732-3741.
- Matthews RG, Jencks DA, Frasca V, Matthews KD. Methionine biosynthesis, In cooper BA, Whitehead VM (eds): *Chemistry and Biology of pteridines. Pteridines and Folic Acid Derivatives*. New York, de Gruyter, 198: 698-725.

45. **Mathews RG.** Methionine biosynthesis, in Blakley RL, Benkovic SJ (eds): Folate and Pterins. New York: John Wiley; 1984: 497-515.
46. **Drummond JT, Matthews RG.** Nitrous oxide inactivation of cobalamin-dependent methionine synthase from *Escherichia coli*: Characterization of the damage to the enzyme and prosthetic group. *Biochemistry* 1994; **33**: 3742-3750.
47. **Ericson LE.** Betaine-homocysteine methyltransferases. I. Distribution in nature. *Acta Chem Scand* 1960; **14**: 2102-2112.
48. **Finkelstein JD, Harris BJ, Kyle WE.** Methionine metabolism in mammals: kinetic study of betaine-homocysteine methyltransferase. *Arch Biochem Biophys* 1972; **53**: 320-324.
49. **McKeever MP, Weir DG, Molloy A, Scott JM.** Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat. *Clin Sci* 1991; **81**: 551-556.
50. **Finkelstein JD, Kyle WE, Harry BJ.** Methionine metabolism in mammals: regulation of homocysteine methyltransferase in rat tissue. *Arch Biochem Biophys* 1971; **146**: 84-92.
51. **Lee KH, Cava M, Amiri P, Ottoboni T, Lindquist RN.** Betaine: homocysteine methyltransferase form de rat liver: purification and inhibition by a boronic acid substrate analog. *Arch Biochem Biophys* 1992; **292**: 77-86.
52. **Skiba WE, Taylor MP, Wells MS, Mangum JH, Awad WN Jr.** Human hepatic methionine biosynthesis. Purification and characterization of betaine:homocysteine S-methyltransferase. *J Biol Chem* 1982; **257**: 14944-14948.
53. **Finkelstein JD, Harris BJ, Martin JJ, Hyle WE.** Regulation of hepatic betaine-homocysteine methyltransferase by dietary methionine. *Biochem and Biophys Res Communications* 1982; **108**: 344-348.
54. **Filkelstein JD.** Trasmethylación (Usdin, E., Borchardt, R.T. and Creveling, C.F. eds.) Elsevier/North Holland, New York. 1978: 49-58.
55. **Grzelakowska-Sztabert M, Manteuffel-Cymborowska M, Chmurzunska W, Sikora E.** Age- and tumor-related changes in methionine biosynthesis in mice. *Cancer Lett* 1986; **32**: 207-217.
56. **Finkelstein JD, Martin JJ, Harris BJ, Kyle WE.** Regulation of hepatic betaine homocysteine methyltransferase by dietary betaine. *J Nutr* 1983; **113**: 519-521.
57. **Wilcken DEL, Wilcken B, Dudman NPB, Tyrrell PA.** Homocystinuria-The effects of betaine in the treatment of patients not responsive to pyridoxine. *N Engl J Med* 1983; **309**: 448-453.
58. **Wilcken DEL, Dudman NPB, Tyrrell PA.** Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency- effects of betaine treatment in pyridoxine-responsive patients. *Metabolism* 1985; **34**: 1115-1121.
59. **Holme E, Kjellman B, Ronge E.** Betaine for treatment of homocystinuria caused by methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Arch Dis Child* 1989; **64**: 1061-1064.
60. **Erbe RW.** Inborn Errors of Folate Metabolism. In: Blakely RL, Whitehead VM (ed.): Folate and pterins. New York: John Wiley & Sons 1986; **3**: 413-435.
61. **Zhou J, Kang SS, Wong PWK, Fournier B, Rozen R.** Purification and characterization of methylenetetrahydrofolate reductase from human cadaver liver. *Biochem Med Metab Biol* 1990; **43**: 234-242.
62. **Mathews RW.** Are the redox properties of tetrahydrofolate cofactors utilized in folate-dependent reactions? *Fed Proc* 1982; **41**: 2600-2604.
63. **Erbe RW.** Genetic aspects of folate metabolism. In: Harris H, Hirschhorn K (eds): Advances in human genetics. New York: Plenum; 1979: 293-354.
64. **Rowe PB.** Inherited disorders of folate metabolism. In: Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS. eds., The metabolic Basis of inherited Disease. New York: McGraw-Hill; 1983: 498-521.
65. **Wiley VC, Dudman NPB, Wilcken DEL.** Interrelations between plasma free and protein-bound homocysteine and cysteine in homocystinuria. *Metabolism* 1988; **37**: 191-195.
66. **Smolin LA, Benevenga NJ.** Factors affecting the accumulation of homocysteine in rats deficient in vitamin B6. *J Nutr* 1984; **114**: 103-111.
67. **Refsum H, Heiland S, Ueland PM.** Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin Chem* 1985; **31**: 624-628.
68. **Andersson A, Isaksson A, Brattstrom L, Israelsson B, Hultberg B.** Influence of hydrolysis on plasma homocysteine determination in healthy subjects and patients with myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1991; **88**: 143-151.
69. **Daly L, Meleady R, Graham I.** Fasting or post-methionine load homocysteine: Which should be measured in relation to vascular risk?. International Conference on Homocysteine Metabolism: from basic Science to clinical Medicine. *Irish Journal of Medical Science* 1995; **164**(supl 4) (abstr).
70. **Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH.** Quantitation of total homocysteine, total cysteine, and methionine in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1987; **162**: 185-196.
71. **Araki A, Sako Y.** Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatography* 1987; **422**: 43-52.
72. **Hyland K, Bottiglieri T.** Measurement of total plasma and cerebrospinal fluid homocysteine by fluorescence following high-performance liquid chromatography and precolumn derivatization with ortho-phthalaldehyde. *J Chromatogr* 1992; **579**: 55-62.
73. **Genest JJ, McNamara DN, Salem JR, Wilson PWF, Scafer EJ, Malinow MR.** Plasma homocysteine levels in men with premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1990; **16**: 1114-1119.
74. **Frantzen F, Sundrehagen E.** Rapid nonchromatographic assays for homocysteine. International Conference on Homocysteine Metabolism: from basic Science to clinical Medicine. *Irish Journal of Medical Science*. 1995; **164** (supl 4) (abstr).
75. **Fischer G, Behnred C, Bartholmes P.** Plasma homocysteine: A simple enzymatic assay for routine use. International Conference on Homocysteine Metabolism: from basic Science to clinical Medicine. *Irish Journal of Medical Science*. 1995; **164** (supl 4) (abstr).
76. **Shipchandler MT, Moore EG.** Rapid fully automated measurement of plasma homocysteine with the Abbott IMx Analyzer. *Clin Chem* 1995; **41**: 991-994.
77. **Córdoba PA, Cirera S, Carrascosa C, Arcelus R, Castelli A, Rodes M, et al.** Thermolabile genotype of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and hyperhomocysteinemia in patients with nonhemorrhagic cerebro-vascular disease. The Society for Inborn Errors of metabolism (SSIEM). Cardiff 34th Annual Symposium. 10th-13th September 1996. *J Inherited Metabolic Disease* 1996; **19**(supl 1): 23.
78. **Araki A, Sako Y, Fukushima Y, Matsumoto M, Asada T, Kita T.** Plasma sulphydryl-containing amino acids in patients with cerebral infarction and in hypertensive subjects. *Atherosclerosis* 1989; **79**: 139-146.
79. **Genest JJ, McNamara DN, Salem JR, Wilson PWF, Scafer EJ, Malinow MR.** Plasma homocysteine levels in men with premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1990; **16**: 1114-1119.
80. **Taylor LM, Defrang RD, Harris EJ, Porter JM.** The association of elevated plasma homocyst(e)ine with progression of symptomatic peripheral arterial disease. *J Vas Surg* 1991; **13**: 128-136.
81. **Molgaard J, Malinow MR, Lassvik C, Holm A-C, Upson B, Olsson AG.** Hyperhomocyst(e)inemia. *J Intern Med* 1992; **231**: 273-279.
82. **Bienvenu T, Ankri A, Chadeaux B, Montalescot G, Kamoun P.** Elevated total plasma homocysteine, a risk factor for thrombosis. Relation to coagulation and fibrinolytic parameters. *Thrombosis Research* 1993; **70**: 123-129.
83. **Falcon CR, Cattaneo M, Panzeri D, Martinelli I, Mannucci PM.** High prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with juvenile venous thrombosis. *Arterioscler-Thrombosis* 1994; **14**: 1080-1083.
84. **Hopkins PN, Wu LL, Wu J, Hunt SC, James BC, Vicent GM, et al.** Higher plasma homocyst(e)ine and increased susceptibility to adverse effects of low folate in early familial coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 1995; **15**: 1314-1320.
85. **Boers GHJ, Smals AG, Trijbels JMF, Leermarkers AI, Kloppenborg PW.** Unique efficiency of methionine metabolism in premenopausal women may protect against vascular disease in the reproductive years. *J Clin Invest* 1983; **72**: 1971-1976.
86. **Brattstrom LE, Hultberg BL, Hardebo JE.** Folic acid responsive postmenopausal women homocysteinemia. *Metabolism* 1985; **34**: 1073- 1077.
87. **Hultberg B, Agardh E, Anderson A, Brattstrom L, Isaksson A, Israelson B.** Increased levels of plasma homocysteine are associated with nephropathy, but not with severe retinopathy in type 1 diabetes mellitus. *Scan J Clin Lab Invest* 1991; **51**: 277-282.
88. **Horowitz JH, Rypins EB, Henderson JM, Heymsfield SB, Moffitt SD, Bain RP.** Evidence for impairment of transulfuration pathway in cirrhosis. *Gastroenterology* 1981; **81**: 668-675.
89. **Jukes TH.** Searchin for magic bullets: early approaches to chemotherapy-antifolates, methotrexate-The Bruce F. Cain memorial award lecture. *Cancer Res* 1987; **47**: 5528-5536.
90. **Matherly LH, Seither RL, Goldman ID.** Metabolism of diaminoantifolates: Biosynthesis and pharmacology of the 7-hydroxyl and polyglutamyl metabolites of methotrexate and related antifolates. *Pharmac Ther* 1987; **5**: 27-56.
91. **Kang SS, Wong PWK, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N.** Thermolabile methylene tetrahydrofolate reductase: An inherited risk factor coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991; **48**: 536-545.
92. **Kang SS, Wong PWK, Zhou J, Sora J, Lessick M, Ruggie N, et al.** Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in patients with coronary artery disease. *Metabolism* 1988; **37**: 611-613.
93. **Gallagher PM, Meleady R, Shields DC, et al.** Homocysteine and risk of

- premature coronary heart disease. Evidence for a common gene mutation. *Circulation* 1996; **94**: 2154-2158.
94. **Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al.** A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* 1995; **10**: 111-113.
 95. **Lewis CA, Pancharuniti N, Säuberlich HE.** Plasma folate adequacy as determined by homocysteine level. *Ann N Y Acad Sci* 1992; **669**: 360-362.
 96. **Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J.** Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Clin. Invest* 1988; **81**: 466-474.
 97. **Murphy-Chutorian DR, Wexman MP, Grieco AJ.** Methionine intolerance: a possible risk factor for coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1985; **6**: 725-730.
 98. **Andersson A, Brattstrom L, Israelsson A, Hultberg B.** The effect of excess daily methionine intake on plasma homocysteine after a methionine loading test in humans. *Clin Chim Acta* 1990; **192**: 69-76.
 99. **Boers GHJ, Fowler B, Smals AGH, et al.** Improved identification of heterozygotes for homocystinuria due to cystathionine-synthase deficiency by the combination of methionine loading and enzyme determination in cultures fibroblasts. *Hum Genet* 1985; **69**: 164-169.
 100. **Bostom AG, Jacques PF, Nadeau MR, Willians RR, Ellison RC, Selhub J.** Post-methionine load hyperhomocysteinemia in persons with normal fasting total plasma homocysteine: initial results from the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis* 1995; **116**: 147-151.
 101. **Franken DG, Boers GHJ, Bloom HJ, Cruysberg JRM, Trijbels MJM, Hamel BCJ.** Prevalence of familial mild hyperhomocysteinemia. *Atherosclerosis* 1995; **125**: 71-80.
 102. **Tsai MY, Garg U, Key NS, Hanson NQ, Suh A, Schwichtenberg K.** Molecular and biochemical approaches in the identification of heterozygotes for homocystinuria. *Atherosclerosis* 1996; **122**: 69-77.
 103. **Miller JW, Nadeau MR, Smith D, Selhub J.** Vitamin B6 deficiency vs folate deficiency: comparison of responses to methionine load in rats. *Am J Clin Nutr* 1994; **59**: 1033-1039.
 104. **Miller JW, Ribaya-Mercado JD, Russell RM, et al.** Effect of vitamin B-6 deficiency on fasting plasma homocysteine concentrations. *Am J Clin Nutr* 1992; **55**: 1154-1160.
 105. **Ubbink JB, van der Merwe A, Delport R, Allen RH, Stabler SP, Riezler R, Vermaak WJH.** The effect of a subnormal vitamin B-6 status on homocysteine metabolism. *J Clin Invest* 1996; **98**: 177-184.
 106. **Brenton DP, Cusworth DC, Dent CE, Jones EE.** Homocystinuria: clinical and dietary studies. *QJ Med* 1966; **35**: 325-346.
 107. **Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, et al.** The natural history of homocystinuria due to cystathionine B-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; **37**: 1-31.
 108. **Lipson MH, Kraus J, Rosenberg LE.** Affinity of cystathionine B-synthase for pyridoxal 5'-phosphate in cultured cells. A mechanism for pyridoxine-responsive homocystinuria. *J Clin Invest* 1980; **66**: 188-193.
 109. **Kozich V, Kraus JP.** Screening for mutations by expressing patient cDNA segments in *E. coli*: homocystinuria due to cystathionine -synthase deficiency. *Hum Mutat* 1992; **1**: 113-123.
 110. **Hu FL, Gu Z, Kozich V, Kraus JP, Ramesh V, Shih VE.** Molecular basis of cystathionine -synthase deficiency in pyridoxine responsive and nonresponsive homocystinuria. *Human Molecular Genetics* 1993; **2**: 1857-1860.
 111. **Kozich V, de Franchis R, Kraus JP.** Molecular defect in a patient with pyridoxine-responsive homocystinuria. *Human Molecular Genetics* 1993; **2**: 815-816.
 112. **De Franchis R, Kozich V, McInnes RR, Kraus JP.** Identical genotypes in sibs with different homocystinuric phenotypes: identification of three mutations in cystathionine -synthase using an improved bacterial expression system. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 1103-1108.
 113. **Marbe M, Geraghty MT, de Franchis R, Kraus JP, Valle D.** Characterization of a cystathionine -synthase allele with three mutations in cis in a patient with B₆ nonresponsive homocystinuria. *Human Molecular Genetics* 1994; **3**: 1883-1886.
 114. **Sebastio G, Sperandeo MP, Pánico M, de Franchis R, Kraus JP, Andria G.** The Molecular Basis of Homocystinuria due to cystathionine -synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations. *Am J Hum Genet* 1995; **56**: 1324-1333.
 115. **Shih VE, Fringer JM, Mandell R, Kraus JP, Berry GT, Heidenreich RA, et al.** A missense mutation (I278T) in cystathionine -synthase gene prevalent in pyridoxine-responsive homocystinuria and associated with mild clinical phenotype. *Am J Hum Genet* 1995; **57**: 34-39.
 116. **Kluitmans LA, Blom HJ, Boers GHJ, Van Oost BA, Trijbels FJ, Van den Heuvel LP.** Two novel missense mutations in the cystathionine beta-synthase gene in homocystinuric patients. *Hum Genet* 1995; **96**: 249-250.
 117. **Gallagher PM, Ward P, Tan Soon Naughten E, et al.** High frequency (71%) of cystathionine -synthase mutation G307S in Irish homocystinuria patients. *Human Mutation* 1995; **6**: 177-180.
 118. **Kanwar YS, Manaligod JR, Wong PWK.** Morphologic studies in a patients with homocystinuria due to 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Pediatr Res* 1976; **10**: 598-603.
 119. **Baumgartner R, Wick H, Ohnacker H, Probst A, Mauer R.** Vascular lesions in two patients with congenital homocystinuria due to different defects of remethylations. *J Inherited Metab Dis* 1980; **3**: 101-103.
 120. **Goyete P, Sumner JS, Milos R, et al.** Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genetics* 1995; **7**: 195-200.
 121. **Goyette P, Frosst P, Rosenblatt DS, Rozen R.** Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet* 1995; **56**: 1052-1059.
 122. **Rosenblatt DS, Erbe RW.** Methylenetetrahydrofolate reductase in cultured human cells. I. Growth and metabolic studies. *Pediatr Res* 1977; **11**: 1137-1141.
 123. **Linderbaum J, Savage, DG, Stabler SP, Allen, RH.** Diagnosis of cobalamin deficiency: II. Relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol* 1990; **34**: 99-107.
 124. **Smolin LA, Benevenga NJ.** Accumulation of homocysteine in vitamin B-6 deficiency: A model for study of cystathionine B-synthase deficiency. *J Nutr* 1982; **112**: 1264-1272.
 125. **Wicklen, DEL, Gupta VJ.** Sulphur containing amino acids in chronic renal failure with particular reference to homocysteine and cysteine-homocysteine mixed disulphide. *Eur J Clin Invest* 1979; **9**: 301-307.
 126. **Wilcken DEL, Gupta VJ, Betts AK.** Homocysteine in the plasma of renal transplant recipients: Effects of cofactors for methionine metabolism. *Clin Sci* 1981; **61**: 743-749.
 127. **Chauveau P, Chadefaux B, Coude M.** Increased plasma homocysteine concentration in patients with chronic renal failure. *Miner Electrolyte Metab* 1992; **18**: 196-198.
 128. **Lambie DG, Johnson RH.** Drugs and folate metabolism. *Drugs* 1985; **30**: 145-55.
 129. **Drell W, Welch AD.** Azaribine-homocysteinemia-thrombosis in historical perspectives. *Pharmacol Ther* 1989; **41**: 195-206.
 130. **Kang S, Wong PWK, Zhou J, Cook HY.** Preliminary report: total homocyst(e)ine in plasma and amniotic fluid of pregnant women. *Metabolism* 1986; **35**: 889-91.