

Diagnóstico diferencial de la hiperhomocisteinemia en pediatría*

M^aA. Vilaseca Buscà^{1,2}, R. Artuch Iriberrí^{1,2}, F. Ramon Bauzá², M. Pineda Marfà^{1,3}, À. García Cazorla^{1,3}, J. Campistol Plana^{1,3}.

Resumen

Objetivos: Realizar un algoritmo para el diagnóstico diferencial de la hiperhomocisteinemia y aplicación del mismo al diagnóstico de 27 pacientes pediátricos.

Métodos: Homocisteína total: HPLC con detección de fluorescencia de los derivados de SBDF. Aminoácidos: cromatografía de intercambio iónico. Ácidos orgánicos: cromatografía de gases-espectrometría de masas. Folato y vitamina B12: Quimioinmunoluminiscencia.

Resultados: El algoritmo de diagnóstico diferencial se basa en las concentraciones plasmáticas de metionina, cisteína, metilmalonato, folato, vitamina B12 y macrocitosis. De los 27 pacientes con hiperhomocisteinemia (> 30 µmol/L) 13 mostraron una homocistinuria aislada y 14 combinada con aciduria metilmalónica. De los 13 primeros, 9 tenían además una elevación de metionina y deficiencia de cistina (deficiencia de cistationina beta-sintasa). En 4 la metionina era normal/baja: 1 paciente tenía una deficiencia de metionina sintasa reductasa (variante CblE) y 3 tenían un defecto parcial de metilentetrahidrofolato reductasa causado por la mutación 677C>T con el folato sérico disminuido. Entre los 14 pacientes con homocistinuria combinada con aciduria metilmalónica: 7 mostraron la vitamina B12 y folato séricos normales (variante CblC de defecto intracelular del metabolismo de la cobalamina) y 7 mostraron un defecto de vitamina B12: 3 pacientes con un síndrome de Imerslund-Gräsbeck, y 4 de origen nutricional [lactancia materna exclusiva con dieta vegetariana de la madre (1 caso) y defecto de factor intrínseco materno (3 casos)].

Conclusiones: El algoritmo propuesto ha resultado útil para el diagnóstico de estos pacientes que permite la aplicación precoz del tratamiento específico, así como el consejo genético y el diagnóstico prenatal si se requiere.

Palabras clave: Homocistinuria. Hiperhomocisteinemia. Ácido metilmalónico. Vitamina B12. Ácido fólico.

Summary. Differential diagnosis of hyperhomocysteinemia in pediatrics

Objectives: To design an algorithm for the differential diagnosis of hyperhomocysteinemia and to apply it to the diagnosis of 27 pediatric patients.

Methods: Total homocysteine: HPLC with fluorescence detection of the SBDF derivatives. Amino acids: ion-exchange chromatography. Organic acids: gas chromatography – mass spectrometry. Folate and vitamin B12: Chemoimmunoluminescence.

Results: The algorithm for differential diagnosis is based on plasma concentrations of methionine, cysteine, methylmalonate, folate, vitamin B12 and macrocytosis. Of the 27 patients with hyperhomocysteinemia (> 30 µmol/L), 13 showed isolated homocystinuria and 14 combined with methylmalonic aciduria. Among the first ones, 9 showed increased methionine and decreased cystine concentrations (cystathionine beta-synthase deficiency). In four patients methionine was low/normal: 1 patient had methionine synthase reductase deficiency (CblE variant) and 3 had a partial deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase caused by the 677C>T mutation with low serum folate. Among the 14 patients with homocystinuria combined with methylmalonic aciduria: 7 showed normal serum vitamin B12 (CblC variant of intracellular defect of cobalamin metabolism) and 7 revealed a serum vitamin B12 defect: 3 patients with an Imerslund-Gräsbeck syndrome and 4 with a nutritional defect [maternal breast-feeding from a vegetarian mother (1 case) and a maternal intrinsic factor defect (3 cases)]. **Conclusions:** The proposed algorithm is useful for the diagnosis of these patients, which allows the early introduction of specific treatment, as well as genetic counselling and prenatal diagnosis if required.

Keywords: Homocystinuria. Hyperhomocysteinemia. Methylmalonic acid. Vitamin B 12. Folic acid.

* Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el XXV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrado en Bilbao el 9, 10 y 11 de octubre de 2006.

¹Unidad de Errores Congénitos del Metabolismo

²Servicios de Bioquímica

³Neuropediatría

Hospital Universitario Sant Joan de Déu, Barcelona.

INTRODUCCIÓN

La hiperhomocisteinemia es una elevación de la concentración plasmática de homocisteína superior al $P_{97.5}$ de los valores de referencia para una población determinada. Existen diversas causas de hiperhomocisteinemia que pueden agruparse por su origen en fisiológicas (edad, sexo, etnia, función renal y hormonal), genéticas (deficiencias enzimáticas implicadas en el metabolismo de la homocisteína y cobalamina) y adquiridas (nutrición, estilo de vida, entidades clínicas y fármacos) (1). En pediatría, las causas genéticas y nutricionales son las más comunes.

Entre los factores genéticos podemos señalar en primer lugar los causantes de hiperhomocisteinemia grave ($tHcy > 100 \mu\text{mol/L}$) u homocistinuria, originados por mutaciones en los genes que codifican a las principales enzimas implicadas en el metabolismo de la homocisteína. Entre ellas se encuentran la cistationina β -sintasa (CBS; EC 4.2.1.22) cuya deficiencia causa la homocistinuria clásica, la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR; EC 1.5.20) y el sistema metionina sintetasa (MS; EC 2.1.1.13) -metionina sintetasa reductasa (MSR; EC 2.1.1.135) (2) (figura 1). Todos ellos causan importantes acumulaciones de homocisteína en tejidos y líquidos biológicos, que pueden ir acompañadas de aciduria metilmalónica en algunos defectos de absorción (deficiencias genéticas de factor intrínseco y síndrome de Imerslund-Gräsbeck) y del metabolismo intracelular de la cobalamina (variantes CblC, D, F) (figura 2) (3). También causan hiperhomocisteinemia algunos polimorfismos muy comunes en algunas áreas geográficas, especialmente el 677 C>T de MTHFR (4), que origina la sustitución de una alanina por una valina en la posición 225 de la proteína enzimática. Este polimorfismo aumenta la termolabilidad de la enzima y reduce su actividad catalítica en un 50%. Como consecuencia de ello se interfiere la síntesis de 5-metiltetrahidrofolato, la forma mayoritaria de folato circulante que proporciona el grupo metilo indispensable para la remetilación de la homocisteína, lo que explica que esta variante enzimática predisponga a la hiperhomocisteinemia moderada (5), especialmente cuando la concentración de folato es deficiente (6).

Aun cuando existe algún tipo de algoritmo de diagnóstico diferencial de hiperhomocisteinemia, los que hemos hallado en la

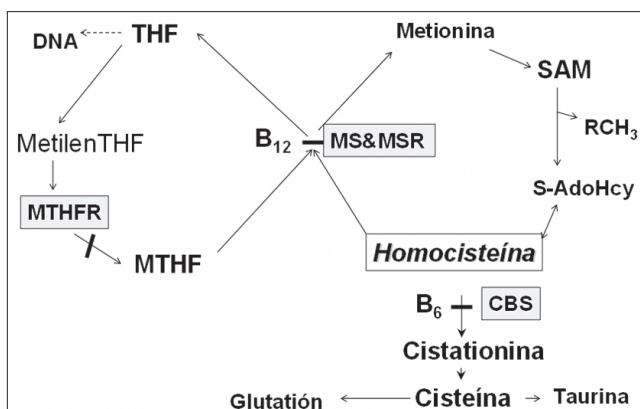


Figura 1. Metabolismo de la homocisteína, vías de la transulfuración y de la remetilación. THF: tetrahidrofolato; MTHFR: metilentetrahidrofolato reductasa; MTHF: metiltetrahidrofolato; MS&MSR: metionina sintetasa & metionina sintetasa reductasa; SAM: S-adenosilmetionina; RCH₃: radical metilo; S-AdoHcy: S-adenosilhomocisteína; CBS: cistationina beta-sintasa.

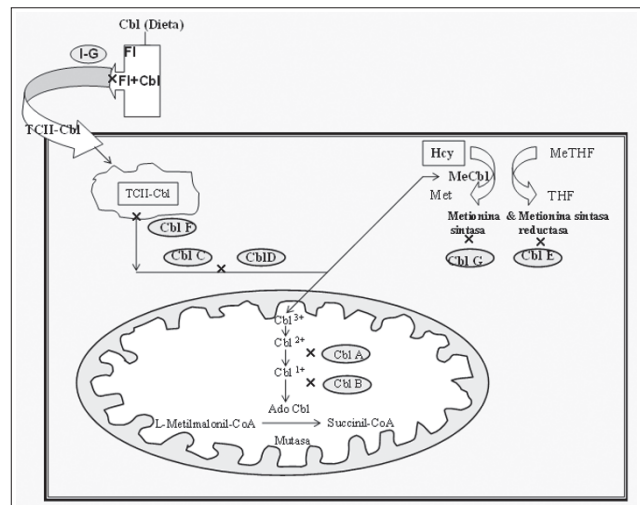


Figura 2. Defectos del metabolismo de la cobalamina (Cbl) que cursan con homocistinuria aislada o combinada con aciduria metilmalónica: FI: Factor intrínseco; SI-G: Síndrome de Imerslund-Gräsbeck; TII: transcobalamina II; CblF: defecto del transportador de Cbl en la membrana lisosomal; CblC, CblD: defecto de síntesis de adenosil cobalamina (AdoCbl) y metilcobalamina (MeCbl); CblG: defecto de metionina sintetasa; CblE: defecto de metionina sintetasa reductasa.

literatura no incluyen todas las formas genéticas (7). Por ello nuestro objetivo ha sido realizar un algoritmo útil para el diagnóstico diferencial de la hiperhomocisteinemia, así como la aplicación del mismo al diagnóstico retrospectivo de pacientes pediátricos con hiperhomocisteinemia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se han incluido en el estudio retrospectivo 27 pacientes pediátricos con hiperhomocisteinemia de diferente origen. La edad de los mismos oscila entre 14 días y 18 años. Todos ellos han sido diagnosticados y/o controlados en la Unidad de Errores Congénitos del Metabolismo del Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona.

Métodos

Homocisteína total (tHcy): suma de todas las formas que generan este aminoácido por reducción: Se ha determinado en plasma y orina por HPLC (Perkin Elmer Series 200) con detección de fluorescencia (Perkin Elmer LC 240) de los derivados de 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate (SBDF) por un procedimiento previamente descrito (8). Los valores de referencia para población pediátrica han sido establecidos en nuestro laboratorio utilizando el mismo procedimiento (8).

Aminoácidos: Se han determinado por cromatografía de intercambio iónico de los derivados de ninhidrina (Biochrom 30, Biochrom Ltd) (9).

Ácidos orgánicos: Se han analizado por cromatografía de gases-espectrometría de masas de los trimetilsilil derivados (Hewlett Packard, 5890A) (colaboración con la Dra. A. Ribes, Instituto de Bioquímica Clínica, Barcelona).

Folato y vitamina B₁₂: Se han determinado por quimioinmuno-luminiscencia (Centauro, Bayer).

Estudios enzimáticos y genéticos: El diagnóstico de estos pacientes se ha confirmado por estudios enzimáticos y/o

genéticos realizados en otros centros (ver tabla I y Agradecimientos).

Tabla I. Datos analíticos y genéticos de los pacientes con hiperhomocisteinemia.

Caso	Edad al diagnóstico	Hemo-grama	Ac.Org (mmol/mol cr)	AA-P (µmol/L)			AA-Or (µmol/g cr)		Vitaminas B (nmol/L; pmol/L)		Defecto enzimático
				tHcy	Cys	Met	tHcy	Cyst	Folato	V B12	
1	1a	normal	normal	181	trazas	80	nd	nd	nd	nd	↓ CBS (T191M/R125W)
2	1a	normal	normal	250	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↓ CBS (T191M/R125W)
3	10a	normal	normal	283	7	67	2063	39	8	145	↓ CBS (R366H/R366H)
4	15a	normal	normal	176	8	561	nd	nd	nd	nd	↓ CBS (S349N/IVS1+1G>A)
5	1a	normal	normal	250	6	192	1379	trazas	nd	nd	↓ CBS (R379Q/1566delG)
6	11a	normal	normal	112	5	489	375	5	nd	nd	↓ CBS (R366C/1566delG)
7	3a	normal	normal	180	9	84	4487	6	2.1	normal	↓ CBS (T191M/T191M)
8	6m	normal	normal	214	10	171	5616	181	nd	nd	↓ CBS (curso)
9	12a	normal	normal	180	9	116	527	7	10	147	↓ CBS (I278T/R121C)
10	9a	131	normal	91	28	11	75,2	11	54	268	CblE (S454L/S454L)
11	18a	102	normal	66,5	34	20	37,5	2	4.8	234	MTHFR (A222V/A222V)
12	17a	normal	normal	30,8	21	30	26,1	trazas	3,6	159	MTHFR (A222V/A222V)
13	15a	normal	normal	43	27	20	nd	12	5	497	MTHFR (A222V/A222V)
14	1m	AHC	1375	209	19	10	6958		36	707	CblC (curso)
15	2m	AHC	1190	108	19	9	1878	403	nd	nd	CblC (curso)
16	40d	normal	1925	225	13	trazas	882	1295	nd	nd	CblC (curso)
17	2m	no consta	1375	32	25	6	2223	513	nd	nd	CblC (curso)
18	1.5m	no consta	9829	226	22	5	1545	567	nd	nd	CblC (curso)
19	16d	102	889	110	4	trazas	253	570	nd	nd	CblC (curso)
20	10d	103	649	244	17	7	6245	1503	25,6	691	CblC (curso)
21	16m	113	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<100	S. I-G (curso)
22	5a	AN + TM	1041	72	19	6	490	480	32.7	<74	S. I-G (curso)
23	8m	94	1762	86	7	2	574	670	nd	32	S. I-G (curso)
24	1a	108	272	30	22	11	100	583	33	180	Madre vegetariana
25	6m	98	1610	159	13	10	1637	190	54	125	Madre ↓ FI
26	6m	99	204	91.3	18	trazas	1890	318	34,7	94	Madre ↓ FI
27	9m	102	120	119	20	6	211,3	138	38,1	88	Madre ↓ FI
VR		variables	<20	<12	20-45	13-33	<20		13-33	>120	

Casos previamente publicados: 1-7, 9 (22), caso 8 (23), caso 10 (24), caso 14 (25), casos 24-26 (19).

VR: valores de referencia, Nd: no determinado; AHC: anemia hipocrómica; AN+TM: anemia normoblástica + Talasemia *minor*

RESULTADOS

El algoritmo de diagnóstico diferencial de hiperhomocisteinemia se basa en valorar los ácidos orgánicos en orina (evaluando la concentración de metilmalonato), aminoácidos en plasma y orina (evaluando las concentraciones de metionina, cisteína, cistationina), vitaminas (folato, vitamina B₁₂) y las posibles alteraciones hematológicas, especialmente anemia macrocítica (figura 3).

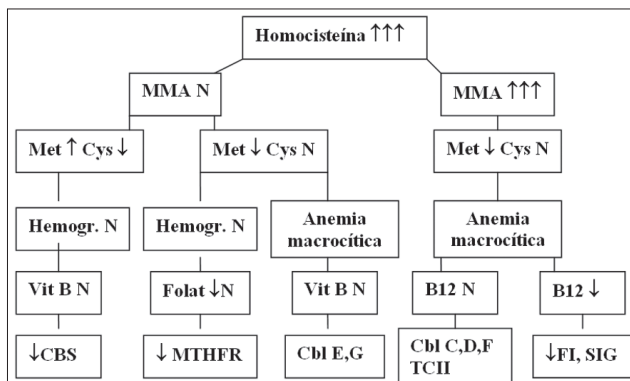


Figura 3. Algoritmo de diagnóstico diferencial de la hiperhomocisteinemia. MMA: metilmalonato; N: normal; Met: metionina; Cys: cistina; Vit B: folato y B₁₂; ↓CBS: deficiencia de cistationina b-sintasa; ↓MTHFR: deficiencia de metilentetrahydrofolato reductasa; ↓FI: deficiencia del factor intrínseco; ↓T-II: deficiencia de transcobalamina-II; SI-G: síndrome de Imerslund-Gräsbeck.

De 27 pacientes con hiperhomocisteinemia (> 30 μmol/L; valores de referencia pediátricos < 12 μmol/L) 13 mostraron una homocistinuria aislada y 14 una homocistinuria combinada con aciduria metilmalónica (tabla I). De los 13 primeros, 9 mostraban además una elevación de las concentraciones de metionina y deficiencia de cistina (homocistinuria clásica por deficiencia de cistationina beta-sintasa). En 4 pacientes los valores de metionina eran fisiológicos/bajos: un paciente tenía una variante Cbl E (deficiencia de metionina sintasa reductasa) y 3 tenían un defecto parcial de metilentetrahydrofolato reductasa (MTHFR) causado por la mutación C677T (con el folato sérico disminuido).

Entre los 14 pacientes con homocistinuria combinada con aciduria metilmalónica y macrocitosis, 7 mostraron valores de vitamina B₁₂ y folato séricos fisiológicos (variante CblC de defecto intracelular del metabolismo de la cobalamina) y 7 mostraron un defecto de vitamina B₁₂: 3 pacientes con un síndrome de Imerslund-Gräsbeck (defecto de absorción de B₁₂ causada por deficiencia del receptor de la pared intestinal cubilina) y 4 de origen nutricional por lactancia materna exclusiva, con dieta vegetariana de la madre (1 caso) y defecto de factor intrínseco materno (3 casos). El estudio de la madre en estos casos condujo al diagnóstico definitivo. Algunos de estos pacientes han estado publicados individualmente o en grupo (tabla I).

DISCUSIÓN

Aún cuando la presentación clínica de las diferentes causas genéticas o nutricionales de hiperhomocisteinemia puede orientar al diagnóstico diferencial de la misma (2,10), durante los primeros años de la vida resulta difícil el diagnóstico clínico de esta entidad. Esto es debido a que muchas veces las manifestaciones clínicas se reducen a un retraso psicomotor o a un deterioro neurológico inespecífico, que sólo condu-

cen a una sospecha clínica de error congénito del metabolismo (11,12). El hallazgo de una hiperhomocisteinemia moderada o grave determinará el análisis inmediato de las magnitudes incluidas en el algoritmo y la evaluación de los resultados permitirá el tratamiento específico que puede salvar la vida del paciente o evitar un deterioro neurológico irreversible.

El algoritmo de hiperhomocisteinemia podía haberse basado en un orden más lógico, desde el punto de vista clínico que considerara en primer lugar las anomalías hematológicas, las deficiencias vitamínicas, y finalmente las alteraciones en el perfil de aminoácidos y ácidos orgánicos (10), magnitudes propias de la bioquímica especial para el estudio de enfermedades metabólicas. No obstante, la aplicación de este algoritmo inicial a nuestros pacientes nos mostró que tanto las anomalías hematológicas como la deficiencia de vitamina B₁₂ pueden no ser tan informativas en algunos casos. La corta edad de diagnóstico de los pacientes con la variante CblC del metabolismo de la cobalamina (15 días-2 meses) determinó que no se hubiera manifestado aún la anemia macrocítica característica de los defectos de remetilación de la homocisteína a metionina (tabla I). Dicha reacción implica al metabolismo de la cobalamina y al del folato y, cuando está interferida por defecto nutricional o genético de cobalamina, se produce un atrapamiento de folato en forma de 5-metiltetrahydrofolato, sustrato de la reacción que no se puede transformar en tetrahydrofolato, disminuyendo la disponibilidad del mismo para la síntesis de ADN (3,12) (figura 1). Por otra parte, las deficiencias vitamínicas pueden no ser tan marcadas en algunos lactantes con defecto nutricional de vitamina B₁₂ por lactancia materna exclusiva de madres vegetarianas o con defecto de factor intrínseco (tabla I) (13). Además, la elevada prevalencia de talasemia en nuestra área geográfica puede enmascarar la existencia de una anemia macrocítica (tabla I, caso 22). Por estas razones hemos considerado más útil como base del diagnóstico diferencial la elevación de la excreción de metilmalonato que, tal como se observa en la tabla I, se muestra claramente alterado antes de que se evidencien las alteraciones hematológicas y bioquímicas (14).

El diagnóstico diferencial de hiperhomocisteinemia en pediatría es especialmente importante debido a que de él depende la aplicación del tratamiento específico, que es diferente dependiendo del origen de la alteración bioquímica (2,7,10). Por otra parte, el tratamiento vitamínico específico puede también aportar datos de especial interés en el diagnóstico diferencial de la hiperhomocisteinemia. Así, ante una homocistinuria moderada con concentraciones fisiológicas de metionina y concentración de folato baja, la administración de esta vitamina normalizará totalmente la homocisteína en el caso del polimorfismo 677C>T de MTHFR (6), mientras que no lo hará si la causa es una mutación grave en esta enzima. Esta normalización tras el tratamiento con folato tuvo lugar en los tres casos 11-13 de la tabla I. Estos casos mostraron una clínica neurológica que hacía sospechar una mutación más grave de dicha enzima, que fue descartada por tratamiento con folato y por estudio enzimático y genético. De hecho, este polimorfismo es muy común en nuestra área geográfica y en nuestra experiencia afecta a un 14,5% de la población general, tanto en adultos (15) como en pediatría (16-18). Por el contrario, las mutaciones graves de dicha enzima son mucho menos frecuentes y no hemos tenido ocasión de tratar ningún caso en nuestro hospital.

Por otra parte, ante una homocistinuria combinada con aciduria metilmalónica, que puede estar causada por defecto genético o nutricional de vitamina B₁₂, la administración inmediata de dicha vitamina en forma de hidroxicobalamina normalizará totalmente

ambas anomalías en un defecto nutricional. En los defectos genéticos sólo se observa una reducción de las concentraciones de homocisteína y metilmalonato que no llegan a normalizarse. Si un lactante muestra una deficiencia sérica de vitamina B₁₂ que se pone de manifiesto a lo largo del primer año de la vida, debemos considerar inmediatamente si la lactancia es materna exclusivamente o artificial. En el primer caso, es indispensable considerar un posible defecto de vitamina B₁₂ de su madre, sea de absorción o nutricional (dieta vegetariana) (19). En el segundo, debemos considerar un defecto de absorción del paciente, de difícil diagnóstico diferencial desde el punto de vista bioquímico y que requerirá el estudio genético de los tres genes implicados en la absorción de la vitamina B₁₂, que codifican al factor intrínseco (*GIF*) y a las proteínas de transporte a través de la pared intestinal (genes *CUBN* y *AMN*) (20,21).

En resumen, ante la multiplicidad de defectos genéticos o adquiridos que pueden dar lugar a hiperhomocisteinemia en pediatría es indispensable la aplicación de un algoritmo de diagnóstico diferencial que permita orientar el origen de la alteración. El algoritmo propuesto se basa en la determinación del metilmalonato, la metionina y la cisteína, las posibles alteraciones hematológicas y las concentraciones séricas de vitaminas B₁₂ y folato. La excreción de metilmalonato en orina resulta mucho más sensible que la anemia macrocítica y la deficiencia sérica de vitamina B₁₂ en pacientes pediátricos. El diagnóstico definitivo de estos pacientes permite la aplicación precoz del tratamiento específico, así como el consejo genético y el diagnóstico prenatal si se requiere.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Estella su colaboración en el estudio hematológico de los pacientes con alteraciones hematológicas, a la Dra. Antonia Ribes (IBC, Barcelona) la cuantificación del metilmalonato en orina, a la Dra. Paz Briones los estudios de incorporación de sustratos marcados en los pacientes CblC. A la Dra. Loreto Martorell los estudios de la mutación 677C>T de MTHFR. A los Drs. Susana Balcells y Daniel Grinberg los estudios genéticos de los pacientes con deficiencia de CBS. A los Drs. Brian Fowler, Víctor Kozick y Petra Zavadakova los estudios en la paciente con la variante CblE. Al Dr. Stephan Tanner los estudios genéticos en curso de los pacientes con Síndrome de Imerslund-Gräsbeck. A Juan Moreno, Rosa Puig, José M^o Martín y Montserrat Quintana por su inestimable ayuda técnica.

BIBLIOGRAFIA

- Schneede J, Refsum H, Ueland PM. Biological and environmental determinants of plasma homocysteine. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26:263-79.
- Mudd SH, Levy HL, Kraus J. Disorders of transsulfuration. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly L, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B editors. *The metabolic basis of inherited disease*. 8th edition. Mc Graw Hill, New York, 2001; pp: 2007-56
- Rosenblatt DS, Fenton WA (2001) Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th edn. New York: McGraw-Hill, 3897-933.
- 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.
- Engbersen AM, Franken DG, Boers GH, Stevens EM, Trijbels FJ, Blom HJ. Thermolabile 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 142-50.
- Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 94: 2322-3
- Skovby F. Disorders of sulfur amino acids. En: *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*. Edited by N. Blau, M. Duran and M. Blaskovics. Chapman & Hall Medical. London. 2^a ed 2002.
- Vilaseca MA, Moyano D, Ferrer I, Artuch R. Total homocysteine in pediatric patients. *Clin Chem* 1997; 43: 690-2.
- Moyano D, Vilaseca MA, Artuch R, Lambruschini N. Plasma amino acids in anorexia nervosa. *Eur J Clin Nutr* 1998; 52:684-9.
- Couce ML, Balcells S, Dalmau J, Grinberg D, Rodés M, Vilaseca MA. Pauta de diagnóstico y seguimiento de la homocistinuria. *An Pediatr* 2004;60 (Suppl 6): 58-64.
- Vilaseca MA, Moyano D, Artuch R, Ferrer I, Pineda M, Cardo E, et al. Selective screening for hyperhomocysteinemia in pediatric patients. *Clin Chem* 1998;44:662-4.
- Blanco F, Deulofeu R, Vilaseca MA, Chacón P, Dulín E. Determinación de homocisteína en plasma: metodología, interpretación de resultados y papel en la evaluación del riesgo vascular. *Quim Clin* 2002;21,243-50.
- Vilaseca MA, Vilarinho L, Zavadakova P, Vela E, Cleto E, Pineda M, et al. CblE type of homocystinuria: mild clinical phenotype in two patients homozygous for a novel mutation in the MTRR gene. *J Inher Metab Dis* 2003;26:361-9.
- Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004;50:3-32.
- Pintó X, Vilaseca MA, García-Giralt N, Ferrer I, Palá M, Meco JF, et al. Homocysteine and MTHFR 677C>T allele in Spanish patients with premature coronary artery disease. Case control and family studies. *Eur J Clin Invest*. 2001;31:24-30.
- Cardo E, Monrós E, Colomé C, Artuch R, Campistol J, Pineda M, et al. Children with stroke: polymorphism of the MTHFR gene, mild hyperhomocysteinemia, and vitamin status. *J Child Neurol* 2000;15:295-8.
- Vilaseca MA, Monrós E, Artuch R, Colomé C, Farré C, Valls C, et al. Antiepileptic Drug Treatment In Children: Hyperhomocysteinemia, B-Vitamins And The 677C>T Mutation Of The Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene. *Eur J Ped Neurol* 2000;4:269-77.
- Mainou C, García N, Vilaseca MA, Ferrer I, Meco JF, Palá M et al. Hiperhomocisteinemia y polimorfismo 677C -> T de la metil-tetrahidrofolato reductasa como factor de riesgo cardiovascular en la infancia. *An Esp Pediatr* 2002; 56: 402-8.
- Gutiérrez-Aguilar G, Abenia-Usón P, García-Cazorla A, Vilaseca MA, Campistol J. Encefalopatía con aciduria metilmalónica y homocistinuria secundaria a un aporte exógeno deficiente en vitamina B₁₂. *Rev Neurol* 2005;40:605-8.
- Grasbeck R. Imerslund-Grasbeck syndrome (selective vitamin B12 malabsorption with proteinuria). *Orphanet J Rare Dis* 2006; 1:1-6.
- Tanner SM, Li Z, Perko JD, Oner C, Cetin M, Altay C, et al. Hereditary juvenile cobalamin deficiency caused by mutations in the intrinsic factor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:4130-3.
- Urreiziti R, Balcells S, Rodés M, Vilarinho L, Baldellou A, Couce ML, et al. Spectrum of CBS Mutations in 16 Homocystinuric Patients from the Iberian Peninsula: High Prevalence of T191M and Absence of I278T or G307S. *Human Mutation, Mutation in Brief #624(2003)* on line
- Cardo E, Campistol J, Caritg J, Ruiz S, Vilaseca MA, Kirkham F et al. Fatal haemorrhagic infarct in a infant with homocystinuria. *Dev Med Child Neurol* 1999; 41:132-5.
- Vilaseca MA, Vilarinho L, Zavadakova P, Vela E, Cleto E, Pineda M, et al. CblE type of homocystinuria: mild clinical phenotype in two patients homozygous for a novel mutation in the MTRR gene. *J Inher Metab Dis* 2003;26:361-9.
- Ribes A, Briones P, Vilaseca MA, Lluch M, Rodés M, Maya A et al. Methylmalonic aciduria with homocystinuria, biochemical studies, treatment, and clinical course of a CblC patient. *Eur J Pediatr* 1990; 149, 412-5.

Correspondencia

M^o Antonia Vilaseca Buscá
Laboratorio de Bioquímica.
Hospital Sant Joan de Déu
Passeig Sant Joan de Déu 2
09850-Esplugues (Barcelona)
vilaseca@hsjdbcn.org