

Estudio del polimorfismo C677T del gen MTHFR y las concentraciones plasmáticas de homocisteína*

B. González Martín-Moro, B. Pérez², C. Santiuste Puente, LR. Desviat², M. Ugarte², ML. Pérez, A. Pardo Vigo¹, M. Maties Prats

Resumen

Objetivo: Analizar la relación entre la concentración plasmática de la homocisteína (hcy) y los diferentes genotipos de la Metil-tetrahidrofolato reductasa MTHFR (CC, CT, TT) en los pacientes con enfermedad vascular.

Métodos: El estudio incluyó a 46 pacientes de edad media 52 años (intervalo=21-81). Se dividieron en 4 grupos: genotipo TT o «no TT» (CC o CT), y las concentraciones de homocisteína altas o fisiológicas (valor discriminante=12 $\mu\text{mol/L}$). Las concentraciones de homocisteína plasmática fueron analizadas por inmunoanálisis de fluorescencia polarizada FPIA (IMX®) y los genotipos de la MTHFR por PCR a tiempo real.

Resultados: De entre los 25 pacientes con las concentraciones de homocisteína plasmática elevadas, el 40% (10 pacientes) presentaron el genotipo TT, mientras que el resto presentaron el genotipo «no TT». Por otro lado, 6 pacientes de entre los 21 con las concentraciones fisiológicas de homocisteína plasmática (29%) fueron homocigotos para el alelo T, mientras que los restantes 15 fueron CC o CT. No se encontraron unas diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (prueba de Chi-cuadrado: $P=0,418$).

Discusión y conclusiones: En este estudio no hubo una correlación significativa entre el genotipo TT y las concentraciones elevadas de la homocisteína plasmática, lo que puede ser debido al pequeño tamaño muestral.

Palabras clave: Homocisteína, metil-tetrahidrofolato reductasa, enfermedades vasculares.

Summary. Study of the C677T polymorphism and plasma homocysteine levels

Objective: To analyze the relationship between plasma homocysteine (Hcys) levels and the different MTHFR genotypes (TT, CT, CC) in patients with vascular disease.

Methods: The study included 46 patients, average age=52 yrs (range=21-81). We divided them into 4 groups: TT or «non TT» (CC or CT) genotype, and high or normal hcy levels (cut-off=12 $\mu\text{mol/L}$). Plasma hcy levels were analysed by FPIA (IMX®) and MTHFR genotypes by real-time PCR.

Results: Among the 25 patients with high plasma Hcys levels, 40% (10 patients) had TT genotype, while 15 patients (60%) had «non TT» genotype (CC, CT). On the other hand, 6 patients out of the 21 with normal plasma hcy levels (29%) were homozygous for the T allele, while the other 15 (71%) were CC or CT. No significant statistical differences between these two groups of patients were found with the Chi-square test ($P=0.418$; $\alpha=0.05$). Cut-off= 12 $\mu\text{mol/L}$.

Discussion and conclusions: In this preliminary study we have not found a correlation between the TT genotype and high plasma Hcy levels, probably due to the small sample size.

Key words: homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase, vascular diseases.

INTRODUCCIÓN

La homocistinuria fue descubierta en 1962 por Carson y Neill al estudiar las alteraciones bioquímicas que causaban un daño cerebral en un grupo de pacientes pediátricos con retraso mental. Describieron dos casos que presentaban hallazgos similares y muy característicos entre los que se encontraban retraso mental severo, crisis epilépticas, subluxación del cristalino y pelo quebradizo de crecimiento anormalmente lento. Los estudios bioquímicos permitieron descubrir que el ami-

noácido implicado, en este error congénito del metabolismo, era la homocisteína (1) (hcy). El seguimiento posterior de este tipo de pacientes mostró la aparición de oclusiones vasculares graves, conduciendo a la muerte a un 50% de ellos antes de los 30 años, y que la base bioquímica de la forma más frecuente de la enfermedad es el déficit de cistationina β -sintetasa (2) (CBS).

La observación inicial que relacionó la concentración plasmática de homocisteína y la enfermedad vascular, fue realizada en 1969 por McCully. En el estudio post-mortem de un paciente diagnosticado de homocistinuria, por un defecto enzimático del metabolismo de la cobalamina, encontró una arteriosclerosis de severidad comparable a la de la homocistinuria clásica. La elevada concentración plasmática de homocisteína, común en ambas entidades, indujo a McCully a desarrollar una nueva teoría sobre el origen de la arteriosclerosis, en la que proponía como inductor principal de la misma a la homocisteína o a alguno de sus derivados (2).

Departamentos de Bioquímica Clínica y ¹Hematología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

²Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares. Madrid.

* Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el 15th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine y el XXII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrados en Barcelona del 1 al 5 de junio de 2003.

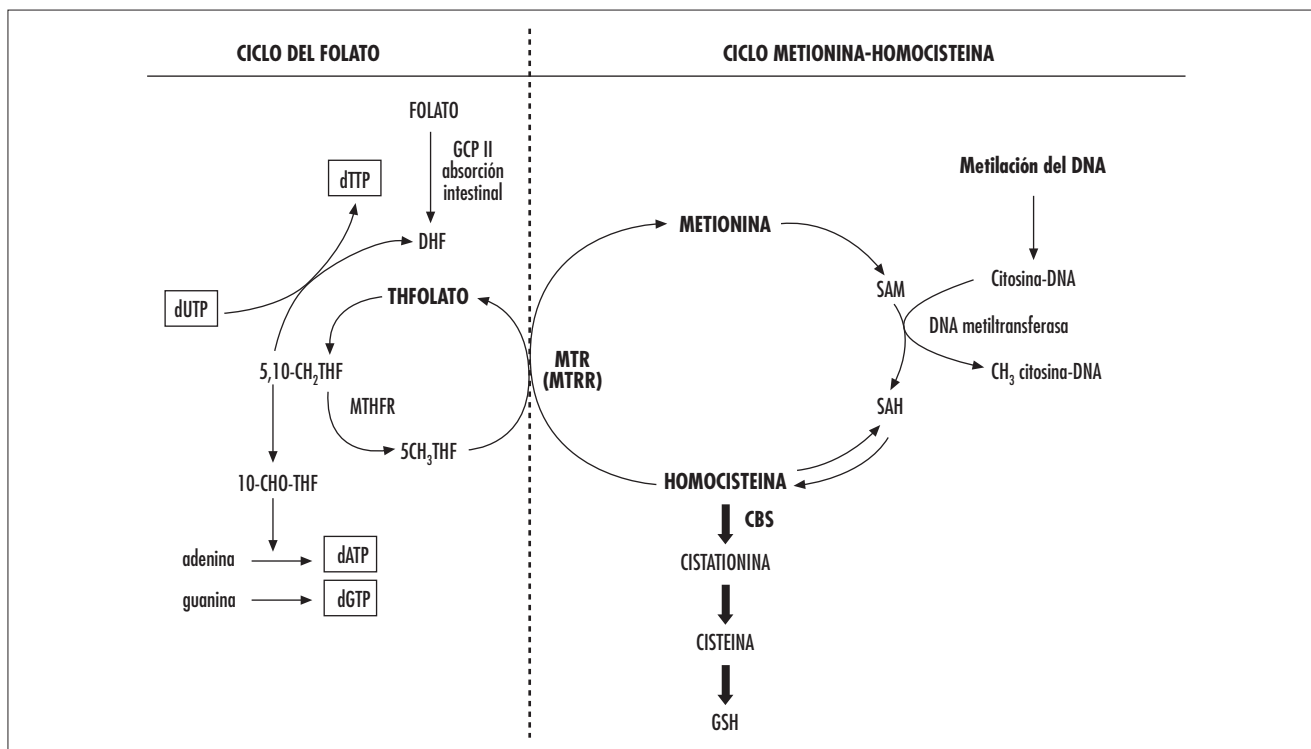


Figura 1 Ciclo metabólico de la homocisteína
 GPC II = Glutamato-carboxipeptidasa II
 MTHFR = Metilentetrahidrofolato reductasa
 MTRR = 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína-S-metiltransferasa
 SAM = S-adenosil-L-metionina
 SAH = S-adenosil-L-homocisteína
 CBS = Cistationina B sintetasa
 GSH = Glutatión reducido

La homocisteína es un aminoácido, no esencial, que se caracteriza por la presencia de un grupo sulfhidrilo (-SH) que le confiere una elevada reactividad. Proviene de la degradación de la metionina, y su catabolismo puede tener lugar por dos vías: la transulfuración y la remetilación. En la vía de la transulfuración la homocisteína es transformada en cistationina por la acción de la enzima cistationina B sintetasa (CBS), dependiente de vitamina B6. En la vía de la remetilación, la homocisteína se recicla a metionina por acción de la 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína-S-metiltransferasa (MTRR). Es la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (5,10-MTHFR) la encargada de mantener unas concentraciones adecuadas de 5-metiltetrahidrofolato, co-sustrato de la MTRR, para que pueda tener lugar la reacción (figura 1).

Actualmente sabemos que las concentraciones de homocisteína en sangre están condicionadas por diversos factores entre los que destacan los factores genéticos y los dietéticos, el estilo de vida y determinados fármacos.

Dentro de los factores genéticos están cobrando mucha importancia algunas de las variantes polimórficas de tipo puntual (SNP, *single nucleotide polymorphism*) que existen en los genes que codifican algunas de las enzimas implicadas, directa o indirectamente, en el ciclo metabólico de la homocisteína. Entre los más relevantes encontramos: MTHFR (Metilentetrahidrofolato reductasa) 677 C>T, MTHFR 1298 A>C, MTRR (metionina sintasa) 66 A>G y la GPCII (gen de la glutamato-carboxipeptidasa II) 1560 C>T.

Centrándonos en la MTHFR 677C>T, que ha sido el polimorfismo que hemos estudiado, cabe destacar que es una

variante termolábil de la enzima, que fue descubierta por Kang en 1988 y que se distingue por su baja actividad específica y por su sensibilidad al calor. Se sugirió que esta variante era heredada de forma autosómica recesiva y que estaba presente en el 5% de la población general y en el 17% de los pacientes con enfermedad coronaria (3). Fue Frosst, en 1995, el que identificó la sustitución de C por T en el nucleótido 677 como responsable de la MTHFR termolábil (4). Esta mutación da lugar al cambio de una citosina por una timina lo que conlleva la sustitución de una alanina por una valina en esta enzima. La mayoría de los estudios realizados hasta el momento asocian el genotipo TT con un aumento de las concentraciones de homocisteína en sangre en aquellos individuos con las concentraciones de folato bajas (3,5-7) aunque discrepan de si este aumento conlleva o no un incremento de riesgo cardiovascular (5,7). Existe un estudio contradictorio que afirma que es el genotipo homocigoto opuesto, CC, junto con las bajas concentraciones de folato el que se asocia con el riesgo de tromboembolismo y, afirma, que el genotipo MTHFR C677T modula el riesgo trombótico relacionado con el folato, independientemente de las concentraciones de homocisteína (8).

Otros factores que condicionan las concentraciones de homocisteína en la sangre son los factores dietéticos y el estilo de vida. Según el «Hordaland homocysteine study» la ingesta de folatos y el consumo de café y/o tabaco son los principales determinantes de las concentraciones de homocisteína en la población sana. (9) En cuanto a los fármacos, es conocido que algunos antiepilépticos como la fenitoína

(10) y/o algunos antifolínicos como el metotrexato (11) interfieren con las concentraciones de homocisteína, aumentándolas.

Actualmente, existe una gran controversia sobre el significado de la elevación de la homocisteína en plasma en relación con la aterosclerosis. No está claro si el aumento de homocisteína es por sí misma un factor de riesgo para la aterosclerosis, si potencia el riesgo asociado a otros factores como el tabaco, la hipertensión arterial, la hipercolesterolemia...o si es una consecuencia y no una causa de la misma (7). Los resultados de los estudios caso-control y los prospectivos han demostrado que un incremento de 5 $\mu\text{mol/L}$ en las concentraciones de la homocisteína están asociados a un incremento mayor del 50% en el riesgo de enfermedad vascular aterosclerótica (9). Por todo ello, es necesario llevar a cabo estudios poblacionales que nos permitan aclarar estas dudas y obtener datos concluyentes sobre la relación entre la homocisteína y los polimorfismos genéticos de las enzimas relacionadas con el ciclo metabólico de la misma.

El objetivo de este estudio ha sido determinar si existe una relación entre el polimorfismo MTHFR C677T con las concentraciones de homocisteína plasmática en los pacientes con una enfermedad vascular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio. El grupo estuvo compuesto por pacientes afectados de enfermedad vascular procedentes de los Servicios de oftalmología, neurología y hematología del hospital Ramón y Cajal. Los pacientes fueron seguidos en una única consulta centralizada en el último Servicio citado. De todos ellos se obtuvo el consentimiento informado.

El grupo de estudio estuvo compuesto por 46 pacientes con enfermedad cardiovascular (26 mujeres y 20 hombres) con una edad media de 52 años (intervalo= 21-81). Las diferentes patologías que presentaron fueron: 10 pacientes NOINA (neuropatía óptica isquémica no arterítica), 10 pacientes TVP (trombosis venosa profunda) y/o TEP (tromboembolismo pulmonar), 16 pacientes ACV (accidente cerebro-vascular), 1 paciente AIT (accidente isquémico transitorio), 1 paciente ACVA + NOINA.

En el momento de la extracción de la muestra y durante los 24 meses anteriores ningún paciente había estado en tratamiento con vitaminas y/o folatos. Así mismo, fueron excluidos del estudio todos aquellos que estaban en tratamiento con alguno de los fármacos que alteran las concentraciones de homocisteína: antiepilépticos (11), metotrexate, isoniazida (12) etc.

Especímenes de sangre. La extracción de sangre se realizó tras un mínimo de 10-12 horas de ayuno, por venopunción cubital y con aplicación de torniquete. Las muestras se recogieron en tubos de 5 mL con heparina de litio como anticoagulante (Vacutainer®). Después de la extracción se mantuvieron en el hielo hasta su centrifugación (Centrífuga: Kubota 5900®) siempre antes de 60 minutos, en frío, a 3.500 r.p.m durante 10 minutos y se separaron en dos alícuotas, una de plasma y otra de células que fueron congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente, hasta su posterior procesamiento. El plasma fue utilizado para la determinación de las concentraciones de la homocisteína total y las células para el polimorfismo de la MTHFR C677T.

Métodos de laboratorio. Las concentraciones de homocisteína fueron determinadas en plasma mediante inmunoanálisis de fluorescencia polarizada con anticuerpos monoclonales y un trazador específico (FPIA, IMx homocysteine Assay, Axis Biochemical ASA, Oslo, Norway) utilizando un analizador IMX® (Abbott Diagnostics, Abbot Park, IL). Se determina la homocisteína total ya que la homocisteína unida y el disulfuro de homocisteína son transformados a homocisteína libre que a su vez es convertida enzimáticamente a S-adenosil-L-homocisteína (SAH), que es el producto finalmente detectado por el sistema.

Este método ha sido comparado con cromatografía líquida de alta resolución con estándar interno y se ha obtenido una correlación excelente hasta 50 $\mu\text{mol/L}$ de t-homocisteína (12).

El valor discriminante establecido, para la homocisteína total en nuestro laboratorio, es de 12 $\mu\text{mol/L}$. Valor obtenido en un estudio realizado previamente en la población de Madrid. (datos no presentados).

Para la determinación del polimorfismo MTHFR C677T se optimizó una metodología, aplicable a otros SNPs, que nos ha permitido obtener los resultados de una forma más rápida y fiable. Se utilizó ADN genómico extraído de leucocitos de sangre periférica utilizando los métodos estándar. La técnica utilizada fue PCR a tiempo real y detección simultánea por discriminación alélica utilizando el análisis de las temperaturas de «melting» (desnaturalización del ADN) y la energía conocida como FRET (fluorescente resonante energy transfer donor). Esta técnica se realizó en un light-cycler®, Roche®. Los cebadores utilizados fueron: 5' CGA AGC AGG GAG CTT TGA GGC TG 3' y 5' AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG 3' y las sondas MTHFR F TGA CCT GAA GCA CTT GAA GGA GAA GGT GTC-FL y MTHFR-640 CGG GAG CCG ATT TCA TCA T-PH. Cuarenta y cinco ciclos (95 $^{\circ}\text{C}$ durante 10s, 55 $^{\circ}\text{C}$ durante 10s, 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 s) se utilizaron para amplificar el producto. La discriminación alélica se hizo gracias a las diferentes T_m (temperaturas de «melting») de ambos alelos. Como se observa en la gráfica, los individuos homocigotos aparecen como un solo pico a su T_m correspondiente, 54 $^{\circ}\text{C}$ los TT y 62 $^{\circ}\text{C}$ los CC. Los individuos heterocigotos aparecen como dos picos, a 54 $^{\circ}\text{C}$ y 62 $^{\circ}\text{C}$.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el objetivo de comparar la media de los valores de homocisteína entre el grupo con genotipo TT y el grupo con un genotipo «no TT» se aplicó la prueba de Levene para la igualdad de varianzas.

La relación entre el genotipo TT y «no TT» y tener la concentración de homocisteína por encima ó por debajo del valor discriminante se estudió mediante la prueba de la Chi-cuadrado de Pearson.

RESULTADOS

La distribución de los genotipos para la MTHFR C677T, en función del sexo, resultó ser aleatoria. De los 20 hombres siete de ellos resultaron homocigotos para el genotipo TT al igual que nueve de las 26 mujeres.

En la tabla I se reseñan los valores de homocisteína en plasma de acuerdo con el genotipo. Debido al bajo número de pacientes, para incrementar la solidez del estudio estadístico, agrupamos a los individuos con los genotipo TC y CC en un

Tabla I. Concentraciones de homocisteína en plasma en los pacientes trombosados en función del genotipo MTHFR 677 C>T.

	GENOTIPO	
	TT	NO TT
Media \pm DS ($\mu\text{mol/L}$)	13,89 \pm 5,2	13,32 \pm 7,98
Mediana ($\mu\text{mol/L}$)	14,27	11,97
Mínimo-máximo ($\mu\text{mol/L}$)	6,17-26,33	5,01-49,93
P10	8,26	7,8
P90	19,7	18,2

MTHFR= Metilentetrahidrofolato reductasa

mismo grupo (no TT). No teniendo en cuenta, por el mismo motivo, la diferencia por sexo. Podemos observar que la media de las concentraciones de homocisteína en ambos grupos, TT y no TT fue muy similar ($P=0,798$).

La distribución de los genotipos en función de las concentraciones de homocisteína, tomando como valor discriminante 12 $\mu\text{mol/L}$, se muestra en la tabla II. Podemos observar que la media de las concentraciones de la misma en el grupo de los 25 pacientes con concentraciones elevadas de homocisteína fue de 17,28 $\mu\text{mol/L}$ (intervalo= 12,07-49,93 $\mu\text{mol/L}$). En el grupo de pacientes con concentraciones fisiológicas de homocisteína la media fue de 9 $\mu\text{mol/L}$ (intervalo= 5,01-11,86 $\mu\text{mol/L}$). En cuanto al genotipo encontramos que 10 pacientes (40%) de los 25 con homocisteína elevada fueron homocigotos para el alelo T frente a los 6 pacientes (29%) de los individuos con unas concentraciones fisiológicas.

De los 16 pacientes con el genotipo TT el 62% presentaron concentraciones de homocisteína por encima del valor discriminante (12 $\mu\text{mol/L}$). Dentro del genotipo «no TT» la distribución en función de las concentraciones de homocisteína fue del 50%. Estos resultados no son estadísticamente significativos (prueba de Chi-square $P=0,418$). (Tabla III)

DISCUSIÓN

En este estudio preliminar no se pudo demostrar una asociación entre el genotipo TT y las concentraciones elevadas de homocisteína en plasma, lo que puede ser debido al pequeño tamaño muestral. Sin embargo, hemos observado un incremento en la frecuencia del genotipo TT (35%) en nuestros pacientes con enfermedad vascular comparado con el del estudio previo en la población española control (16%), lo que nos permite especular acerca de la existencia de alguna relación entre este polimorfismo y la patología cardiovascular (7).

Tabla II. Distribución de los genotipos en función de las concentraciones de la homocisteína tomando como valor discriminante 12 $\mu\text{mol/L}$

CONCENTRACIONES ($\mu\text{mol/L}$)	HOMOCISTEÍNA		GENOTIPO		n
	MEDIA ($\mu\text{mol/L}$)	INTERVALO ($\mu\text{mol/L}$)	TT	NO TT	
> 12,00	17,28	12,07-49,93	10 (40%)	15 (60%)	25
<12,00	9,00	5,01-11,86	6 (29%)	15 (71%)	21

n= número de pacientes

Tabla III. Distribución de las concentraciones de homocisteína en función de los genotipos.

CONCENTRACIONES DE HOMOCISTEÍNA	GENOTIPO	
	TT	NO TT
Elevadas	10 (62%)	15 (50%)
Fisiológicas	6 (38%)	15 (50%)
n	16	30

n= número de pacientes

Es posible que el análisis de un grupo mayor de pacientes y el estudio complementario de otros SNPs de genes relacionados con el metabolismo del folato, pudiera arrojar luz sobre la base genética de la elevación de la homocisteína y su posible asociación con la enfermedad cardiovascular en nuestra población. Actualmente se está estudiando otro polimorfismo en esta misma enzima, el A1298C. Los datos obtenidos hasta la fecha demuestran que este polimorfismo es altamente prevalente y similar, en su frecuencia, al C677T aunque parece ser que, de forma aislada, no afecta a las concentraciones de homocisteína (13,14). Algunos estudios afirman que los individuos dobles heterocigotos para esta enzima 677CT/1298AC, presentan concentraciones de homocisteína significativamente elevadas sin embargo, según otras investigaciones este polimorfismo no parece afectar al metabolismo de la misma (15). Por todo ello, es necesario llevar a cabo estudios en amplios grupos de población y teniendo en cuenta diferentes SNPs, que nos permitan aclarar la relación de la homocisteína con la aterosclerosis y los procesos trombóticos.

Además será necesario tener en cuenta las concentraciones de folatos y cobalamina que se encuentran íntimamente relacionadas con el ciclo metabólico de la homocisteína y que, probablemente, condicionan sus concentraciones plasmáticas. Algunos estudios demuestran que el genotipo TT de la MTHFR C677T está relacionado con elevadas concentraciones de homocisteína particularmente cuando los folatos son bajos (6) mientras que otros afirman que el déficit de cobalamina incrementa la susceptibilidad de un aumento de homocisteína en sangre en los portadores del polimorfismo (16).

BIBLIOGRAFÍA

1. Carson NAJ, and Neill DW. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. Arch Dis Child 1962; 37: 505-513.

2. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56, 111-128.
3. 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; 93: 7-9.
4. Lievers KJ, Kluijtmans LA, Blom HJ. Genetics of hyperhomocysteinemia in cardiovascular disease. *Ann Clin Biochem* 2003; 40: 46-59.
5. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sciences* 2001; 22 (4):195-201.
6. Quere I, Wutschert R, Zittoun J, Bellet H, Reber G, Gris JC et al. Association of red-blood methylfolate but not plasma folate with C677T MTHFR polymorphism in venous thromboembolic disease. *Thromb Haemost* 1998; 80 (4): 707-9.
7. Guillén M, Corella D, Portolés O, González JI, Mulet F, Sáiz C. Prevalence of the methylenetetrahydrofolate reductase 677 C>T mutation in the Mediterranean Spanish population. Association with cardiovascular risk factors. *Eur J Epidemiol* 2001; 17: 255-261.
8. Quere I, Perneger TV, Zittoun J, Bellet H, Gris JC, Daures JP et al. Red blood cell methylfolate and plasma homocysteine as risk factors for venous thromboembolism: a matched case-control study. *Lancet* 2002; 359: 747-52.
9. Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Major lifestyle determinants of plasma homocysteine distribution: the hordaland homocysteine study. *Am J Clin Nutr* 1998; 67 (2): 263-270.
10. James GK, Jones MW, Pudek MR. Homocysteine levels in patients on phenytoin therapy. *Clin Biochem* 1997; 30 (8): 647-649.
11. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993; 39 (9): 1769-1779.
12. Pfeiffer C, Twite D, Shih J, Holets-McCormack, Gunter E. Method Comparison for Total Plasma Homocysteine between the Abbott IMx Analyzer and an HPLC Assay with Internal Standardization. *Clin Chem* 1999; 45 (1):152-153.
13. Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y, Ben-Yehuda A, Selhub J, Babaey S et al. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. *J Nutr*. 1999; 129: 1656-1661.
14. Kolling K, Ndrepepa G, Koch W, Braun S, Mehilli J, Schomig A et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphism, plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 levels and the extent of coronary artery Disease. *Am J Cardiol*. 2004; 93(10):1201-6.
15. Botto N, Andreassi MG, Manfredi S, Masetti S, Cocci F, Colombo MG et al. Genetic polymorphism in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage. *Eur J Human Gen*, 2003; 11: 671-678.
16. Geisel J, Hubner U, Bodis M, Schorr H, Knapp JP, Obeid R, Herrmann W. The role of genetic factors in the development of hyperhomocysteinemia. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41 (11): 1427-1434.

Agradecimientos a los: Dres. Lousa y Gobernado, del Servicio de Neurología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, Dra. Rebolleda, del Servicio de Oftalmología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, F. Leal (técnico de laboratorio) y R. Navarrete (Lda. en farmacia) del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Universidad Autónoma de Madrid). Y a todos aquellos que, de forma directa o indirecta, han colaborado en la realización de este estudio.

Correspondencia:
 Beatriz González Martín-Moro
 Hospital Ramón Y Cajal
 Ctra de Colmenar Km 9,100
 Departamento de Bioquímica Clínica
 28034 Madrid
 e-mail: beagmoro@hotmail.com