POLIMORFISMO DE LOS GENES C677T DE LA ENZIMA METIL-N-TETRAHIDROFOLATO REDUCTASA, A2756G DE LA ENZIMA METIONINA SINTASA Y A66G DE LA ENZIMA METIONINA SINTASA REDUCTASA Y SU RELACIÓN CON LA HOMOCISTEÍNA EN PACIENTES CON ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Mª Fátima Garcés[1], Hilda Stekman[1], Gustavo Martínez[1], Leonela Dokmaji[1], Adriana Rivas[2], Noel Silva[1], Mercedes Cerviño[3], Celsy Hernández[1], Francisco Hernández[1]

[1]Facultad de Medicina. Escuela de Bioanálisis, Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas, Universidad Central de Venezuela, Caracas. [2]Licenciado en Bioanálisis. Clínica Santiago de León, Caracas. [3]Facultad de Medicina. Escuela de Enfermeria. Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas, Universidad Central de Venezuela, Caracas.

Recibido para publicación junio 2012. Aprobado para publicación septiembre 2012.

RESUMEN:

La Hiperhomociteinemia (HHcy) se considera como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de aterosclerosis y de enfermedad arterial coronaria (EAC). Los polimorfismos en las enzimas involucradas en la regulación del metabolismo de la Hcy como la metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR), metionina sintasa (MTR), y la metionina sintasa reductasa (MTRR) pueden contribuir a la variación de los niveles de homocisteína en plasma (Hcy). Objetivo: En este estudio investigamos la asociación de los polimorfismos genéticos de las enzimas involucradas en la remetilación de la homocisteína: metionina sintasa (MTR), metil N-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y metionina sintasa reductasa (MTRR), con los niveles de Hcy en pacientes con EAC y sujetos sanos. Población: 136 individuos de los cuales 90 presentaron diagnóstico de enfermedad cardiovascular (IAM y ACV) y 46 eran aparentemente sanos (controles). Resultados: La concentración de Hcy fue significativamente más alta en pacientes con ECV que en los sujetos control (P<0,001). HHcy (>15 µmol/L) confirió un RR de IAM de 2.52 (95% IC: 1.4-4.4, P<0,001) y de ACV de 1.88 (95% IC: 1.0-3.5, P<0,05). Los niveles de vitamina B12 y folato se encontraba en el rango de los valores de referencia en el 86% de los individuos. La frecuencia del alelo T para C677T de MTHFR, del alelo G para A66G de MTRR y del alelo G para A2756G de MTR fueron 0.31, 0.30, 0.22 respectivamente para los sujetos casos. Los polimorfismos C677T, A66G y A2756G de los genes MTHFR, MTRR y MTR no tuvieron diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de casos con respecto al grupo control. Los polimorfismos estudiados no se relacionaron estadísticamente con la HHcy en los individuos en estudio. Conclusión: Sugerimos que HHcy confiere riesgo para ECV. En nuestro estudio encontramos evidencias de que la regulación de Hcy es poligénica.

Palabras claves: Hcy, polimorfismos, ECV, HHcy

C677T GENE POLYMORPHISM OF THE ENZYME N-METHYL-TETRAHYDROFOLATE REDUCTASE, A2756G GENE POLYMORPHISM OF THE ENZYME METHIONINE SYNTHASE AND A66G GENE POLYMORPHISM OF METHIONINE SYNTHASE REDUCTASE AND ITS RELATIONSHIP WITH HOMOCYSTEINE IN PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR DISEASE

SUMMARY

The Hiperhomocysteinemia (HHcy) is considered an independent risk factor for developing atherosclerosis and cardiovascular arterial disease (CAD). The polymorphisms of the enzymes involved in the regulation of homocysteine (Hcy) metabolism as the methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase (MTR) and methionine synthase reductase (MTRR) may contribute to the elevation of Hcy in plasma. Aim: The main aim of this study was to investigate the association of genetic polymorphisms of the enzymes involved in remethylation of homocysteine: methionine synthase (MTR), N-methyl tetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR), with levels of Hcy in patients with CHF and healthy subjects. Population: 136 subjects of whom 90 had a diagnosis of cardiovascular disease (heart failure and stroke) and 46 were apparently healthy (controls). Results: The concentration of Hcy was significantly higher in patients with cardiovascular disease than compare with the control group (P <0.001). HHcy (> 15 mmol / L) conferred a relative risk (RR) of heart failure of 2.52 (95% CI: 1.4-4.4, P <0.001) and stroke, RR of 1.88 (95% CI: 1.0-3.5, P <0.05). The levels of vitamin B12 and folate was in the range of reference values in 86% of subjects. The frequency of the T allele of MTHFR C677T was 0,31, for the G allele of MTRR A66G was 0,30 and for the G allele for MTR A2756G was 0.22 for the subjects with heart failure and stroke referred as cases. C677T polymorphism, A66G and A2756G of the genes MTHFR, MTRR and MTR had no statistically significant difference between the case group compared to control group. The polymorphisms studied were not associated statistically with HHcy in the subjects of the study. Conclusion: We suggest that HHcy confers risk for CVD. In our study we found evidence that the regulation of Hcy is polygenic

Key words: Hcy, polymorphism, cardiovascular disease, HHcy.

Solicitar copia a: Dra. María Fatima Garcés Da Silva (mariafatimagarces@hotmail.com)

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), son un asesino silencioso que está aumentando específicamente en la población urbana debido a los enormes cambios en sus hábitos y en la forma de vida. Así, cualquier intervención que pueda reducir los riesgos de las ECV podrían tener un enorme impacto en salud pública. Se han identificado varios factores de riesgo que se asocian con las ECV que, comúnmente cuando se combinan, interactúan creando un ambiente proaterogénico. Estos factores de riesgo son: edad avanzada, sexo masculino, fumar, hipertensión, antecedentes familiares positivos, hiperlipidemia, diabetes, y resistencia de insulina. A pesar de los continuos avances científicos, los factores de riesgo establecidos no explican completamente la ocurrencia de eventos cardiovasculares: cerca del 30% de las ECV no se pueden explicar por factores de riesgo convencionales.

La homocisteína (Hcy) se ha identificado como un factor de riesgo para la ECV. Varios estudios caso-control han demostrado que los pacientes con ECV tienen concentraciones de homocisteína 30% más elevadas que los sujetos controles (1)(2). En estudios con un diseño anticipado, la asociación de hiperhomocsteinemia (HHcy) con enfermedad vascular es más débil; sin embargo, es estadístico significativa en la mayoría de los casos. Sin embargo, actualmente, no se sabe si la homocisteína es una causa primaria de la aterosclerósis (3,4) o si es solamente un marcador secundario de la enfermedad vascular (5).

Los niveles de homocisteinemia están determinados por factores genéticos y/o adquiridos. El efecto directo de uno o varios de estos determinantes o la interacción entre los mismos puede provocar HHcy. Entre las causas genéticas que elevan los niveles plasmáticos de Hcy se han descrito algunas alteraciones moleculares en las enzimas involucradas en el metabolismo del aminoácido, fundamentalmente en el gen de la cistationina β-sintetasa (CBS), de la metionina sintasa reductasa (MTRR), de la metil-N tetrahidrofolato reductasa (MTHFR), y de la Metionina Sintasa (MTR) (6). Los principales factores adquiridos que regulan la homocisteinemia son el nivel vitamínico (ácido fólico, vitamina B12, B6 y B2), la presencia de algunas patologías (falla renal, enfermedades gastrointestinales, neoplasias, psoriasis, etc), uso de ciertas drogas (metotrexato, fenitoína, teofilina) y hábitos de vida tales como el consumo de cigarrillos, alcohol, café, etc. (7). Clásicamente el rango de referencia para la concentración plasmática de Hcy oscila entre 5 y 15 μmol/L (8,9).

La Metil N- tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es una enzima reguladora del metabolismo de la Hcy, la cual es necesaria tanto para el metabolismo del tetrahidrofolato como en la síntesis de las purinas, ADN y ARN. Esta enzima cataliza la reducción del 5,10- Metil-N-tetrahidrofolato a 5- Metil tetrahidrofolato, esta última es la forma predominante en circulación del folato y además participa como donador de carbonos para la remetilación de homocisteína a metionina (10).

La Metionina sintasa reductasa (MTRR) es una enzima que mantiene los niveles adecuados de cobalamina activada, coenzima de la metionina sintasa (MTR), la cual actúa como intermediario de grupos metilo entre el metiltetrahidrofolato y la Hcy durante la remetilación catabolizada por la MTR de homocisteína a metionina. La MTRR cataliza la metilación reductiva de la cobalamina II a metil-cobalamina III, usando S-adenosilmetionina como donador de grupos metilo.

Una variante común de la MTRR, A66G, fue recientemente identificado por Gaughan y col en el 2001, en pacientes homocisteinúricos con deficiencia de esta enzima (11).

La Metionina sintasa (MTR), una enzima dependiente de vitamina B12, participa también en la vía metabólica de la homocisteína, catalizando la remetilación de homocisteína a metionina usando un grupo metil donado por 5-metiltetrahidrofolato.

Actualmente se sabe que existen polimorfismos genéticos asociados con este gen, el cual produce deficiencias moderadas de la actividad de la enzima MTR y que en conjunto con otros polimorfismos, como el C677T de la enzima MTHFR, con los niveles de folato y vitamina B12, influyen en los aumentos de la concentración de homocisteína y la relación con enfermedades cardiovasculares (12,13).

En esta investigación, medimos los niveles del Hcy y determinamos tres polimorfismos comunes: el polimorfismo C677T del gen de MTHFR, el polimorfismo A2756G del gen de MTR, y el polimorfismo de A66G del gen de MTRR con el objetivo de evaluar la posible relación entre los niveles de Hcy y la ECV para así determinar la importancia de la influencia genética de los niveles de Hcy y la ECV.

Materiales y Métodos

Población de Estudio.

La población estudiada estuvo conformada por 136 sujetos con edades comprendidas entre 18 y 80 años de edad, de ambos sexo, de estos, 46 fueron controles (asistieron al laboratorio de Ciencias Básicas y Aplicadas de la Escuela de Bioanálisis en la UCV) y 90 casos de los cuales 35 fueron diagnosticados de IAM y 55 con ACV en la Unidad de Cuidados Coronarios del Hospital Dr. Domingo Luciani y del Servicio de Neurología del Hospital Universitario Clínico en Caracas, Venezuela y conto con la previa aprobación del Comité de Ética

de dichos centros y el consentimiento informado de los participantes. Además, fueron recolectados datos personales, antecedentes familiares, hábitos y antecedentes personales e información terapéutica de cada sujeto.

Obtención de la muestra.

A cada individuo, después de 12 horas de ayuno, se le extrajo una muestra de sangre venosa, recolectada en un tubo sin anticoagulante y un tubo con anticoagulante (EDTA), con el fin de realizar determinaciones bioquímicas y estudios moleculares. Las muestras de sangre sin anticoagulante fueron centrifugadas a 3.000 rpm durante 15 min a 20ºC para obtención de suero. Los sueros fueron almacenados a -70ºC hasta su procesamiento.

Determinación de Homocisteína, Folato y Vitamina B12 en el suero.

La medición de la concentración de homocisteína se realizó por un kit de inmunoensayo ligado a enzima (Axys), las determinaciones de folato se realizaron por electroquimioluminiscencia (Modular Systems, Roche) y la vitamina B12 por quimioluminiscencia mediante una reacción de unión competitiva al factor intrínseco biotinilado (VITROS, Johnson & Johnson).

Análisis Genético.

Para el estudio genético realizado, se obtuvo ADN genómico utilizando el método de Bunce modificado, que utiliza lavados y centrifugaciones subsecuentes, además de precipitación con cloroformo y deshidrataciones con etanol, para luego resuspender el ADN en búfer TE. Posteriormente se cuantificó y se verificó la pureza del ADN extraído en un biofotómetro de eppendorf y se procedió a la amplificación de un fragmento de 198 pb del gen de MTHFR (Primer Forward: 5´-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3´ y Primer Reverse: 5´-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3´. (Frosst y col) (16), uno de 118 pb de gen de MTRR (Primer Forward: 5´-GCAAAGGCATCGCAGAAGACAT-3´ y Primer Reverse: 5´-AAACGGTAAAATCCACTGTAACGGC-3´) (Leclerd y col)(21) y otro de 265 pb del gen de MTR (Primer Forward:

5´- GGTGTGTTCCCAGCTGTTAGATG–3´ y Primer Reverse:

5´- GACACTGAAGACCTCTGATTTGAAC–3´) (Wilson y col) (20) mediante reacción de cadena polimerasa (PCR) empleando el Termociclador modelo Lab Cycler de Senso Quest. El producto amplificado se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% el cual se tiñó con bromuro de etidio. Los fragmento de ADN una vez amplificados fueron sometidos a una reacción de digestión enzimática, empleando las enzimas Hinf I, Nsp I y Hae III (Promega) para los polimorfismo C677T de la enzima MTHFR, A66G de la enzima MTRR y A2756G de la enzima MTR respectivamente. La caracterización de los productos digeridos se llevó a cabo realizando una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% y posterior tinción con nitrato de plata.

Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como media ± una desviación estándar (X ± DS), se empleó el programa Excel 5.0 (Copyright MicrosoftOffice, Washington, USA) para estadística descriptiva. Las comparaciones entre variables se hicieron empleando la prueba "ANOVA", se consideró estadísticamente significativo valores de $p<0,05$.

Se usaron tablas de contingencia simple, evaluando la asociación entre las variables en estudio y los alelos de MTHFR, MTRR y MTR por Chi2 y odds ratio. Se emplearon pruebas de ANOVA para determinar las relaciones entre alelos de los tres genes estudiados y la enfermedad. Significancia estadística fue aceptada al tener una $p < 0.05$. Los resultados son presentados en tablas con la distribución por genotipos de MTHFR, MTRR y MTR en los grupos estudiados.

Resultados

La tabla 1 muestra los niveles de homocisteína total, folato y vitamina B12. Un hallazgo importante es que la media de los valores de vitamina B12 y folato fue mayor en los individuos denominados casos que los controles.). Los valores homocisteína de los individuos casos IAM y ACV fueron significativamente mayores que en los individuos controles ($p < 0,001$); al igual que los niveles de folato también fueron significativamente mayores en casos IAM y ACV ($p < 0,001$ y $p < 0,01$ respectivamente). Sin embargo los niveles de vitamina B12 fueron muy similares en los tres grupos.

Por otra parte, con respecto a los niveles de homocisteína, se obtuvo un Riesgo Relativo (RR) para los sujetos de los grupo casos IAM y ACV de 2,52 y 1,88 respectivamente en relación a los individuos controles demostrándose que la homocisteína es un factor de riesgo cardiovascular independiente para padecer EAC (Tabla 2).

Se realizó la genotificación de los distintos polimorfismos en los individuos en estudio, obteniéndose que los genotipos que presentaron susceptibilidad a producir EAC fueron TT y CT del gen de MTHFR, AA y AG del gen de MTRR y AA y AG del gen de MTR, aunque estos resultados no tienen significancia clínica (Tabla 3). Se observo

Tabla 1. Valores Bioquímicos de los individuos estudiados

	Casos IAM (n=35)	Casos ACV (n=55)	Controles (n=46)	Valor de Referencia
Homocisteína (µmol/L)	14,32 ± 8,66***	14,69 ± 9,17***	11,03 ± 3.56	0 – 15
Vitamina B12 (pg/mL)	461 ± 300	478 ± 294	446 ± 209	239 – 931
Folato (ng/mL)	5,83 ± 6,21***	5,45 ± 5,95**	4,08 ± 2,30	3,1 – 20,0

Tabla 2. Riesgo relativo (RR) de los sujetos Casos IAM y ACV en relación a los controles.

Grupo	HHcy	Normal Hcy	RR	Chi2	p
Casos IAM	23	12	2,52 (1,42 – 4,44)	12,720	<0,001
Casos ACV	27	28	1,88 (1,05-3,54)	5,592	0,018
Controles	12	34	0,46 (0,28 – 0,76)		<0,001

Tabla 3. Comparación de Genotipos de MTHFR C677T, MTRR A66G, MTR A2756G entre casos y controles.

GEN		Casos	Controles	OR (IC 95%)	Chi2	p
MTHFR	Genotipo TT	8	3	1,56 (0,33 – 8,30)	0,383	0,536
	Genotipo CT	38	16	1,39 (0,60 – 3,23)	0,703	0,402
	Genotipo CC	41	24	0,64 (0,12 – 3,05)		0,536
MTRR	Genotipo AA	39	14	2,32 (0,51 – 10,61)	1,582	0,208
	Genotipo AG	40	17	1,96 (0,44 – 8,70)	1,029	0,310
	Genotipo GG	6	5	0,431 (0,09 – 1,97)		
MTR	Genotipo AA	41	20	1,36 (0,14 – 11,32)	0,108	0,742
	Genotipo AG	24	14	1,14 (0,11 – 10,10)	0,019	0,891
	Genotipo GG	3	2	0,73 (0,09 – 6,90)		

Tabla 4. Comparación de valores de Homocisteína entre grupos casos vs controles según el genotipo de los genes de MTHFR, MTRR y MTR.

Genotipos		Valores de Hcy (X ± DS) µmol/L Casos	Controles
MTHFR	CC	14,55 ± 9,15**	10,41 ± 3,31
	CT	14,46 ± 9,01*	10,96 ± 3,57
	TT	14,43 ± 9,12	10,26 ± 3,41
MTRR	GG	14,52 ± 9,37	10,58 ± 3,28
	AG	14,61 ± 9,12***	10,77 ± 3,59
	AA	14,34 ± 9,04	10,67 ± 3,47
MTR	GG	13,95 ± 8,35	10,31 ± 2,08
	AG	14,35 ± 8,78*	10,66 ± 3,44
	AA	14,32 ± 8,55*	10,57 ± 3,38

Las variables son presentadas como la media ± DS; * $p < 0,05$ comparado con el grupo control; ** $p < 0,01$ comparado con el grupo control; *** $p < 0,001$ comparado con el grupo control.

que los valores de homocisteína de los casos para cada genotipo de los polimorfismos estudiados en los individuos casos fue mayor en comparación con los individuos controles. Siendo significativos los valores de los genotipos CC y CT de la enzima MTHFR, AG de la enzima MTRR y AG y AA de la enzima MTR (Tabla 4). Las frecuencias alelicas que se obtuvieron en nuestro estudio fueron reportados en la Tabla 5.

Discusion

La homocisteína es un factor de riesgo cardiovascular con evidencias sustanciales provenientes de investigaciones remontadas desde hace ya varios años, donde se demuestra que es una variable de tipo independiente en relación a los otros factores de riesgo comunes, es decir, que el aumento de su concentración en suero es aceptado como una causa quizás no del total de los casos, pero

Tabla Nº5. Frecuencia alélicas de los polimorfismos C677T, A66G y A2756G de los genes MTHFR, MTRR y MTR respectivamente en Casos y Controles.

Alelos	Casos (n=87)	Controles (n=43)
MTHFR C677T		
Alelo C	0,689	0,774
Alelo T	0,311	0,226
MTRR A66G	(n=85)	(n=36)
Alelo A	0,694	0,625
Alelo G	0,306	0,375
MTR A2756G	(n=68)	(n=36)
Alelo A	0,779	0,750
Alelo G	0,221	0,250

si en parte del desarrollo de algunos de ellos como en casos de enfermedad cardiovascular en pacientes donde existan dislipidemias, hipertensión u otros factores de riesgo comunes conocidos (10). Las variaciones en los niveles de dicho aminoácido están influenciadas por los niveles de fotalo, vitamina B2, B6 y B12 del individuo y/o por las mutaciones genéticas de las enzimas de la vía metabólica de la metionina como la MTHFR, MTRR y MTR. Además los factores dietéticos ya que son de gran importancia, debido a que la homocisteína proviene del metabolismo hepático de la metionina, y la principal fuente de metionina es la ingesta de proteínas de origen animal (14).

El polimorfismo C677T de la enzima MTHFR se ha descrito como un factor determinante en la concentración de homocisteína en sangre, por lo que también es influyente en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, siendo el alelo T el que se asocia con niveles elevados de homocisteína. En nuestro estudio se evidenció que el alelo T (representado por los genotipos TT y CT) se halló en mayor frecuencia en los sujetos casos en comparación con los sujetos controles lo cual indica que existe cierta susceptibilidad para el padecimiento de las EAC por la presencia de los genotipos nombrados anteriormente, aunque estos resultados no tuvieron significancia [OR = 1,6 (CI 95%: 0,3 – 8,3 (p>0,05)]. Resultados mucho más elevados han sido reportados para la mutación homocigota de la enzima MTHFR (Genotipo TT) en pacientes con enfermedad cardiovascular prematura, pero con una significancia clínica [OR = 3,1(CI 95% 1,0 – 9,2)] (15).

También se encontró una susceptibilidad clínica del alelo T a la hiperhomocisteinemia, debido a que este alelo tuvo una mayor frecuencia de individuos con HHcy en comparación con los portadores del alelo C, [OR= 2,3 CI 95%: 0,3 – 19,2 (TT vs CC) p >0,05]. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en otra investigación en la que demostraron que los individuos en el genotipo TT presentaron el doble de las concentraciones de homocisteína en comparación a individuos sanos (16).

En cuanto al polimorfismo A66G de la enzima MTRR, los genotipos AA y AG representan cierto grado de relación con el padecimiento de las enfermedades cardiovasculares estudiadas (ACV e IAM) ya que se obtuvo un OR de 2,3 (CI 95%: 0,5 – 10,6) y 1,96 (CI 95%: 0,4 – 8,7) en los individuos casos con el genotipo AA y AG respectivamente. Sin embargo estos valores no son estadísticamente significativos (p>0,05). Resultados similares fueron observados en otro estudio, en donde obtuvieron un OR de 1,92 (CI 95%: 1,3 – 2,9) en relación con padecer EAC (17).

En nuestro estudio, el polimorfismo A2756G de la enzima MTR la presencia del alelo G, pero únicamente en su forma homocigota (GG), se relaciono con niveles de homocisteína en la sangre elevados [OR=2,3 (CI 95%: 0,2 – 64,0)], aunque este valor no tuvo significación estadística. Estudios similares a nuestra investigación reportan al alelo G como causante de hiperhomocisteinemia (p= 0.008) (18,19).

La frecuencia en el polimorfismo C677T del gen de MTHFR para el alelo C y para el alelo T en la población sana (controles) fue de 0,774 y 0,226 respectivamente, comparable con la frecuencia alelica obtenida en otras investigaciones en sujetos de los países bajos (0,756 para el alelo C y 0,243 para el alelo T) (15). En cuanto al polimorfismo A66G de la enzima MTRR, los sujetos controles presentaron la siguiente frecuencia alelica: 0,625 para el alelo A y 0,375 del alelo G. En otras investigaciones se halló que la frecuencia del alelo G fue de 0,443 en población masculina de Irlanda del Norte (11). Los controles de nuestro estudio presentaron una frecuencia alelica de 0,750 para el alelo A del polimorfismo A2756G de la enzima MTR que al compararlo con otro estudios, fue menor, ya que ellos reportan una frecuencia del alelo A de 0,890 en población koreana sana y una frecuencia de 0,810 en la población americana (12).

Agradecimientos

El proyecto fue financiado por la Coordinación de Investigación, Medicina, UCV. Agradecemos al Laboratorio de Producción y Control de Calidad, Corpodiagnostica C.A., a Grupo Evo-Lab C.A. a Laboratorio Inmunofuturo XXI C.A., al Hospital Universitario de Caracas y al Hospital Domingo Luciani.

Referencias Bibliográficas.

1. Boushey C.J., Beresford S.A., Omenn G.S.,

Motulsky A.G. 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.

2. Eikelboom J.W., Lonn E., Genest J., Hankey G., Yusuf S. Homocysteine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence Ann Intern Med 1999;131:363-375.
3. Ford E.S., Smith S.J., Stroup D.F., Steinberg K.K., Mueller P.W., Thacker S.B. Homocysteine and cardiovascular disease: a systematic review of the evidence with special emphasis on case-control studies and nested case-control studies Int J Epidemiol 2002;31:59-70.
4. Finkelstein JD. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. Semin Thromb Hemost 2000;26(3):219-25.
5. Ueland P.M., Refsum H., Beresford S.A., Vollset S.E. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk Am J Clin Nutr 2000;72:324-332.
6. Rozen R. Genetic modulation of homocysteinemia. Semin Thromb Hemost 2000;26 (3):255-261.
7. Schneede J, Refsum H, Ueland PM. Biological and environmental determinants of plasma homocysteine. Semin Thromb Hemost 2000;26(23):263-279.
8. Ueland PM, Refsum H, Stabler S, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: Methods and clinical applications. Clin Chem 1993;39: 1764-1779.
9. Undas A, Brozek J, Szczeklik A. Homocysteine and thrombosis: from basic science to clinical evidence. Thromb Hemost 2005;94:907-915.
10. Bennouar N, Allami A, Azeddoug H, Bendris A, Laraqui A, El Jaffali A y col. Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism and Homocysteine Are Risk Factos for Coronary Artery Disease in Moroccan Population. J of Biomed and Biotech 2007;2007(1);80687-806896.
11. Gaughan D, Kluijtmans L, Barbaux S, McMaster D, Young I, Yarnell J, Evans A, Whitehead A. The methionine synthase reductasa (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. Atherosclerosis 2001;157: 451-456.
12. Kim O, Hong S, Ahn J. Influence of Combined Methionine Synthase (MTR 2756A>G) and Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR 677C>T) Polymorphisms to Plasma Homocysteine Levels in Korean Patients with Ischemic Stroke. Yonsei Medical Journal. 2007;48(2):201-209.
13. Jemaa R, Achouri A, Kallel A. Association between the 2756A>G variant in the gene encoding methionine synthase and myocardial infarction in Tunisian patients. Clin Chim Lab Med 2008;46(10):1364-1368.
14. Suárez I, Gómez J, Ríos J, Barbado F, Vázquez J. La homocisteína. ¿El factor de riesgo cardiovascular del próximo milenio? An Med Interna 2001;18:211-217.
15. Frosst P, Blom H.J, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Pub Group 1995;10:111-113.
16. Kluijtsman L., Van den Heuvel L., Boers G., et al. Molecular Genetic Analysis in Mild Hyperhomocysteinemia: A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. Genet 1996;58:35-41.
17. Lakshmi SV, Naushad SM, Rupasree Y, Seshagiri Rao D, Kutala VK. Interactions of 5'-UTR thymidylate synthase polymorphism with 677C → T methylene tetrahydrofolate reductase and 66A → G methyltetrahydrofolate homocysteine methyl-transferase reductase polymorphisms determine susceptibility to coronary artery disease. J Atheroscler Thromb 2011;18(1):56-64
18. Laraqui A, Allami A, Carrié A, Coiffard AS, Benkouka F, Benjouad A, Bendriss A, Kadiri N, Bennouar N, Benomar A, Guedira A,Raisonnier A, Fellati S, Srairi JE, Benomar M. Influence of methionine synthase (A2756G) and methionine synthase reductase (A66G) polymorphisms on plasma homocysteine levels and relation to risk of coronary artery disease. Acta Cardiol 2006;61(1):51-61.
19. Laraqui A, Allami A, Carrié A. Relation between plasma homocysteine, gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes, and angiographically proven coronary artery disease. Eur J Intern Med 2007;18(6):474-483
20. Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, Gravel RA. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increase risk for spina bifida. Mol genet Metab 1999;67(4):317-332
21. Leclerc D., Campeau E., Adjalla C. E., Christensen B., Ross M., Eydoux P., Rosenblatt D.S., Rozen R., and Gravel R.A., Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cbIG complementation group of folate/cobalamin disorders. Human Molecular genetics 1997;5(12):1867-1874.