

Hiperhomocisteinemia y mutaciones de la metilentetrahidrofolato reductasa 677C → T y 1298A → C en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal

C. Fernández-Miranda, M. Martínez Prieto, B. Casis Herce¹, F. Sánchez Gómez¹, P. Gómez González², J. Martínez López³, S. Sáenz-López Pérez¹ y A. Gómez de la Cámara⁴

Servicios de Medicina Interna (Unidad de Lípidos y Aterosclerosis. ¹Aparato Digestivo, ³Bioquímica y ³Hematología (Laboratorio de Genética Molecular). ⁴Unidad de Epidemiología. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid.

RESUMEN

Fundamento: recientemente se ha descrito la existencia de hiperhomocisteinemia en la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que podría estar relacionada con el mayor riesgo de trombosis en esta enfermedad. El objetivo del estudio ha sido evaluar la hiperhomocisteinemia en los pacientes con EII y su relación con las concentraciones de vitamina B₁₂ y folato séricos y con las mutaciones de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR 677C→T y 1298A→C).

Pacientes y métodos: se estudiaron consecutivamente 52 pacientes con EII (29 mujeres y 23 varones; edad: media [desviación estándar] 41,7 [11,9] años) y 186 controles con edad y sexo similares. Se consideró hiperhomocisteinemia cuando los valores de homocisteína eran superiores a la media más dos desviaciones estándar del grupo control (≥ 13 $\mu\text{mol/l}$).

Resultados: los pacientes presentaban una mayor prevalencia de hiperhomocisteinemia (17,3 frente a 3,7%; $p = 0,002$) y unos valores más bajos de folato (7,6 [4,1] frente a 8,9 [3,7] ng/ml; $p = 0,01$) y de vitamina B₁₂ (499 [287] frente a 603 [231] pg/ml; $p = 0,003$). En 6 pacientes (11,5%) que habían padecido episodios tromboembólicos la homocisteinemia era más elevada (14,3 [5,8] frente a 9,1 [3,9] $\mu\text{mol/l}$; $p = 0,006$). La frecuencia de las mutaciones MTHFR 677C→T (13,5% frente a 11,3%; $p = 0,66$) y de la 1298A→C (7,8 frente a 7,0%; $p = 0,76$) no fue mayor en los pacientes. La *odds ratio* (OR) de EII en los pacientes hiperhomocisteinémicos fue 5,51, intervalo de confianza [IC] del 95%: 1,81-16,76; ($p = 0,002$). La hiperhomocisteinemia se asoció negativamente con el sexo femenino (OR 0,08, IC del 95%, 0,01-

0,49; $p = 0,006$) y con los valores de folato (OR 0,04, IC del 95%: 0,007-0,20; $p < 0,001$).

Conclusiones: la hiperhomocisteinemia se asocia a la EII y a las concentraciones bajas de folato, y puede estar implicada en el desarrollo de tromboembolia. Las mutaciones MTHFR 677C→T y 1298A→C no se relacionan con la enfermedad.

Palabras clave: Enfermedad inflamatoria intestinal. Homocisteína. Hiperhomocisteinemia. Tromboembolia. Folato. Vitamina B₁₂. Metilentetrahidrofolato reductasa.

INTRODUCCIÓN

Los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) tienen una mayor incidencia de episodios trombo-embólicos que parecen relacionados con un estado de hipercoagulabilidad. Estos episodios se suelen presentar en las fases de actividad de la enfermedad (1,2), aunque en ocasiones ocurren estando inactiva (3,4). La tromboembolia venosa y/o arterial se ha descrito entre el 1,2 y 7,1% de los pacientes con EII (5,6), alcanzando hasta el 39% en los estudios de autopsias (7).

La elevación moderada de las concentraciones de homocisteína plasmática constituye un factor de riesgo de aterotrombosis (8,9). En los últimos años se ha descrito la presencia de hiperhomocisteinemia en pacientes con EII, sugiriéndose su relación con el mayor riesgo de tromboembolia que presentan estos pacientes (10-14). El aumento de la homocisteinemia en la EII se ha atribuido a la existencia de valores bajos de folato y de vitamina B₁₂ que podrían ser debidos a una menor inges-

tión y absorción de estas vitaminas, además del efecto antifolato de algunos fármacos empleados en el tratamiento de la EII (15-17).

La mutación en homocigosis del gen de la enzima relacionada con la remetilación de la homocisteína, la metil-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en su variante C677T consiste en la sustitución de una citosina por una timina en el nucleótido 677 dando lugar a un cambio de alanina por valina. Esta mutación (677C→T) produce una disminución de la actividad de la enzima, y cuando existe un déficit de folato se asocia a un aumento de los valores de homocisteína y a una mayor incidencia de episodios trombóticos (8,18). Recientemente se ha descrito una segunda mutación de la MTHFR, la 1298A→C, que consiste en la sustitución de adenosina por citosina en el nucleótido 1298, que cambia un glutamato en un residuo de alanina. Esta mutación se asocia a una menor actividad enzimática, aunque menos acusada que en presencia de la MTHFR 677C→T (19,20). En la EII se ha evaluado la prevalencia de la mutación 677C→T y su relación con la hiperhomocisteinemia en dos estudios cuyos resultados no han sido concordantes (14,21). Hasta la actualidad no se ha estudiado en esta enfermedad la mutación 1298A→C.

Los objetivos del presente estudio de pacientes con EII han sido: a) determinar si la enfermedad se asocia con la hiperhomocisteinemia y con las mutaciones de la MTHFR 677C→T y 1298A→C; y b) conocer si existe relación entre la hiperhomocisteinemia y las concentraciones de folato y de vitamina B₁₂.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se incluyeron en el estudio 52 pacientes diagnosticados de EII por criterios clínicos, radiográficos, colonoscópicos e histológicos, que acudieron de forma consecutiva a la Consulta de Aparato Digestivo entre enero del 2002 y febrero del 2003. Se excluyeron los pacientes con actividad de la EII, con enfermedad maligna o en tratamiento con vitaminas del grupo B. Se consideró que la EII no tenía actividad cuando no existían síntomas gastrointestinales. El grupo control estaba constituido por 186 sujetos sanos trabajadores del hospital o allegados de los mismos que accedieron voluntariamente a participar en el estudio, sin que ninguno de ellos estuviera emparentado y cuya edad y sexo eran similares a los pacientes.

Los valores de homocisteína plasmática se determinaron por inmunoensayo de fluorescencia polarizada mediante un analizador Imx (Abbott Laboratories. IL. EE.UU.). La sangre recogida en EDTA se colocó inmediatamente en hielo y se centrifugó dentro de la hora posterior a la extracción. Una vez separado el plasma, se congeló a -20 °C hasta su análisis. Se consideró hiperhomocisteinemia cuando las concentraciones de homocisteína eran superiores a la media más dos desviaciones estándar de la de los controles, ya que su distribución era normal ($\geq 13 \mu\text{mol/l}$). La vitamina B₁₂ y el ácido fólico se

determinaron por radioinmunoensayo (*SimulTRAC-SNB*; ICN Pharmaceuticals, Diagnostics Division, Orangeburg, Nueva York) y la creatinina por el método Jaffé (Boehringer Mannheim, Alemania). La hemoglobina y los leucocitos se determinaron mediante autoanalizador Advia 120 (Bayer, In, EE.UU.) y la proteína C reactiva (PCR) por inmunonefelometría (Image, Beckman, Fullerton, EE.UU.) Los polimorfismos de las variantes C677T y A1298C de la MTHFR se investigaron mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, usando sondas de hibridación en el sistema *Light Cycler* (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania).

El estudio fue aprobado por el comité ético del hospital y los pacientes dieron su consentimiento para participar en el estudio.

Análisis estadístico

Las diferencias entre variables cuantitativas se determinaron mediante la t de Student y entre las cualitativas mediante la prueba de la χ^2 o el test exacto de Fisher. Las diferencias se consideraron significativas para $p < 0,05$. Debido a que las concentraciones de vitamina B₁₂ y folato presentaban distribuciones muy alejadas de la normalidad se realizó una transformación logarítmica neperiana de sus valores antes del análisis estadístico.

En un primer análisis de regresión logística se determinó la asociación entre hiperhomocisteinemia y EII ajustando por edad y sexo, y en un segundo análisis la asociación entre hiperhomocisteinemia y las variables independientes: edad, sexo, valores séricos de vitamina B₁₂ y de folato. La magnitud de la asociación se expresa en forma de odds ratio (OR) con intervalos de confianza (IC) del 95%. Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el programa SAS, versión 12.1 CARY. NC. EE.UU.

RESULTADOS

Las características clínicas de los pacientes y controles se exponen en la tabla I.

Se comprobó hiperhomocisteinemia en 9 pacientes y en 7 controles (el 17,3 frente al 3,7 %; $p = 0,002$). Las concentraciones de homocisteína de los pacientes eran más elevadas en los varones que en las mujeres (media [desviación estándar] (11,1 [3,6] frente a 8,0 [3,6] $\mu\text{mol/l}$; $p = 0,003$). Los pacientes tenían concentraciones disminuidas de folato (7,6 [4,1] frente a 8,9 [3,7] ng/ml $p = 0,01$) y de vitamina B₁₂ (499 [287] frente a 603 [231] pg/ml ; $p = 0,003$) con respecto a los controles (Tabla II). La homocisteinemia era similar en la colitis ulcerosa y en la enfermedad de Crohn (9,5 [2,9] frente a 9,4 [4,4] $\mu\text{mol/l}$; $p = 0,95$).

Los pacientes que presentaban hiperhomocisteinemia tenían valores de folato más bajos (4,6 [2,5] frente a 8,2 [4,2] ng/ml), aunque no de vitamina B₁₂ (385 [126] frente

Tabla I. Características clínicas de los pacientes y controles

| Pacientes (n = 52) | |
|----------------------------------|------------------------|
| Edad (años) | 41,7 (11,9) |
| Varones/Mujeres (%) | 23 (44,2) / 29 (55,8) |
| Tabaquismo (%) | 18 (34,6) |
| Colitis ulcerosa (%) | 16 (30,8) |
| Enfermedad de Crohn (%) | 33 (63,5) |
| Colitis indeterminada (%) | 3 (5,7) |
| Duración de la enfermedad (años) | 8,0 (6,2) |
| Resección ileal (%) | 3 (5,7) |
| Corticoides (%) | 21 (40,4) |
| 5-ASA (%) | 38 (73,1) |
| Azatioprina (%) | 12 (23,1) |
| Antecedente de trombosis (%) | 8 (15,3) |
| Creatinina (mg/dl) | 0,7 (0,1) ^a |
| Hemoglobina (g/dl) | 13,8 (1,8) |
| Leucocitos (mm ³) | 7.840 (2.352) |
| Proteína C reactiva (mg/dl) | 0,65 (0,67) |
| Controles (n = 186) | |
| Edad (años) | 41,9 (10,1) |
| Varones/Mujeres (%) | 71 (38,2) / 115 (61,8) |
| Creatinina (mg/dl) | 0,8 (0,1) |

Los valores se expresan como medias (DE) o número de casos (%); ^a: p < 0,05 en relación con los controles.

Tabla II. Prevalencia de hiperhomocisteinemia y concentraciones de homocisteína, folato y vitamina B₁₂ en pacientes y controles

| | Pacientes (n = 52) | Controles (n = 186) |
|----------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Hiperhomocisteinemia (%) | | |
| Todos | 9 (17,3) ^a | 7 (3,7) |
| Varones | 7 de 23 (30,4) ^a | 9 de 71 (12,6) |
| Mujeres | 2 de 29 (6,8) ^a | 0 de 115 (0) |
| Homocisteína (µmol/l) | | |
| Todos | 9,7 (4,4) | 9,1 (1,9) |
| Varones | 11,1 (3,6) ^b | 10,2 (2,0) ^b |
| Mujeres | 8,0 (3,6) | 8,3 (1,6) |
| Vitamina B ₁₂ (pg/ml) | | |
| Todos | 499 (287) ^a | 603 (231) |
| Varones | 502 (284) | 544 (214) |
| Mujeres | 497 (294) ^a | 629 (231) |
| Folato (ng/ml) | | |
| Todos | 7,6 (4,1) ^a | 8,9 (3,7) |
| Varones | 7,0 (3,8) | 8,3 (3,4) |
| Mujeres | 8,2 (4,2) | 9,2 (4,1) |

Los valores se expresan como medias (DE) o número de casos (%); ^a: p < 0,05 en relación con los controles; ^b: p < 0,05 en relación con las mujeres del mismo grupo.

a 523 [306] pg/ml; p = 0,29). La hiperhomocisteinemia no se asoció con el tabaquismo, ni con el tiempo de evolución de la EII, ni con los valores de creatinina y de PCR, ni con el tratamiento con 5-ASA, corticoides y azatioprina.

Seis pacientes (11,5%) habían presentado episodios tromboembólicos (5 trombosis venosas de miembros inferiores y 1 trombosis venosa cerebral), que coincidieron en dos casos con el diagnóstico de EII y en los demás fueron posteriores al mismo en presencia de actividad de la enfermedad. En los 6 casos los valores de homocisteína eran más elevados (14,3 [5,8] frente a 9,1 [3,9] µmol/l; p = 0,006) y la hiperhomocisteinemia era más frecuente (el 50 frente al 6,5%; p = 0,02) que en los demás pacientes.

En 7 pacientes y en 21 controles existía la mutación MTHFR 677C→T (homocigotos TT) (el 13,5 frente al 11,3%; p = 0,66), siendo la concentración de homocisteína en todos los sujetos con esta mutación similar a la que presentaban los portadores de otros genotipos (CC/CT). La mutación MTHFR 1298A→C (homocigotos CC) existía en 4 pacientes y en 13 controles (el 7,8 frente a 7,0%; p = 0,76), y sus valores de homocisteína tampoco eran diferentes de los que tenían otros polimorfismos (AA/AC) (Tabla III). La doble heterocigosidad de los polimorfismos de MTHFR C677T y A1298C ni fue más prevalente en los pacientes (30,7 frente a 28,5%; p = 0,74), ni dio lugar en ellos a valores más elevados de homocisteína (9,1 [1,8] frente a 9,8 [3,5] µmol/l); p = 0,41).

En el análisis de regresión logística se comprobó que la OR de EII en los pacientes con hiperhomocisteinemia, ajustando por edad y sexo, era de 5,51 con un IC del 95%: 1,81-16,76; p = 0,002. Además, la hiperhomocisteinemia se asoció negativamente con el sexo femenino (OR 0,08, IC del 95%, 0,01-0,49; p = 0,006) y con las concentraciones de folato (OR: 0,04, IC del 95%: 0,007-0,20; p < 0,001), sin que se comprobara asociación con las de vitamina B₁₂.

Tabla III. Polimorfismos de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) C677T y A1298C en pacientes y controles: prevalencia y concentraciones de homocisteína

| | Nº casos (%) | Homocisteína (µmol/l) |
|----------------------------|--------------|--------------------------|
| Pacientes (n = 52) | | |
| Polimorfismos MTHFR C677T | | |
| TT | 7 (13,5) | 10,4 (6,2) |
| CC/CT | 45 (86,5) | 9,2 (3,5) |
| Polimorfismos MTHFR A1298C | | |
| CC | 4 (7,8) | 11,3 (3,5) |
| AA/AC | 48 (92,3) | 9,6 (4,5) |
| Controles (n = 186) | | |
| Polimorfismos MTHFR C677T | | |
| TT | 21 (11,3) | 9,8 (2,5) |
| CC/CT | 165 (88,7) | 9,0 (1,8) |
| Polimorfismos MTHFR A1298C | | |
| CC | 13 (7,0) | 8,2 (2,2) |
| AA/AC | 173 (93) | 9,2 (1,9) |

DISCUSIÓN

En el presente estudio de pacientes con EII se observa una prevalencia de hiperhomocisteinemia del 17,3%, que es significativamente más elevada que la de los controles. En otros estudios esta prevalencia ha oscilado entre el 11 y el 26% (10,11,13,14), si bien la definición de hiperhomocisteinemia no fue la misma en todos ellos. Además, en nuestra serie se comprueba que la EII se asocia a la hiperhomocisteinemia. Dado que la diferencia de proporciones de hiperhomocisteinemia que se halló entre pacientes y controles era del 13,6%, se ofrece un poder estadístico del 87% que consideramos suficiente para demostrar la asociación con la EII.

Las pacientes mujeres del estudio tenían valores de homocisteína más bajos que los varones, como se ha referido en otros estudios similares (11,22). Los valores de creatinina, cuya elevación está implicada en la hiperhomocisteinemia, se encontraban en los límites de la normalidad tanto en pacientes como en controles. Se observó una relación negativa entre la hiperhomocisteinemia y las concentraciones de folato, como también se ha descrito en otros trabajos (10-12,14). Algunos fármacos utilizados en el tratamiento de la EII tienen un efecto antifolato, como son la sulfasalazina y el metotrexato (16,17), pero los pacientes de nuestro estudio no recibieron esta medicación, por lo que es probable que los valores bajos de folato se deban a una menor ingestión y/o menor absorción de la vitamina (15). Las concentraciones bajas de vitamina B₁₂ se han asociado con la hiperhomocisteinemia en algunos estudios de EII (11,22), aunque en otros no se ha comprobado esta asociación (12,21), como tampoco se comprueba en nuestra serie. La resección ileal en la enfermedad de Crohn es una de las causas del déficit de vitamina B₁₂ (22), pero en nuestro estudio sólo se había realizado en 3 casos.

En los 6 pacientes que habían presentado episodios tromboembólicos los valores de homocisteína eran más elevados y la hiperhomocisteinemia más frecuente, por lo que podría constituir otro factor trombogénico en la EII, además de los descritos previamente (2).

La mutación de la MTHFR 677TC→T no era más prevalente en los pacientes, como tampoco lo fue en un estudio similar realizado por Papa y cols. (14). Aunque otros autores comprobaron una mayor prevalencia de homocigotos TT entre los pacientes con EII, esta mutación no era la única causa de la hiperhomocisteinemia (21). En los homocigotos TT se han referido valores más elevados de homocisteína (23), resultado que no se comprobó en nuestra serie probablemente por el escaso número de pacientes que presentaban esta mutación.

Se ha descrito que la mutación MTHFR 1298A→C aumenta los valores de homocisteína, aunque en menor medida que la 677C→T (19), y que se asocia a un mayor riesgo de trombosis (24), si bien estos resultados no se han comprobado en otros estudios (19,25). La prevalencia de la mutación MTHFR 1298A→C, que no se había evaluado previamente en los pacientes con EII, no se comprueba aumentada en nuestro estudio, ni tampoco los valores de homocisteína en los que la tenían. Por otra parte, la doble heterocigosidad de los polimorfismos de la MTHFR C677T y de la A1298C se ha asociado en ocasiones a hiperhomocisteinemia (19) aunque no en otras (26,27). En nuestra serie la prevalencia de esta doble heterocigosidad no era mayor en los pacientes y la homocisteinemia no era superior en los que la presentaban.

La administración de vitamina B₁₂ y de ácido fólico en los pacientes con EII ha demostrado un descenso significativo de los valores de homocisteína (10,21). Dado que la EII es relativamente frecuente en nuestro país (28,29), y que sus complicaciones tromboembólicas están infraestimadas, convendrá considerar los factores que pueden favorecerlas, como es la hiperhomocisteinemia asociada a valores bajos de folato, según se comprueba en este estudio.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a David Lora su colaboración en el análisis estadístico y a Blanca Navalón y a Manuela Gómez su colaboración técnica.