

Niveles séricos de homocisteína en enfermedad de Parkinson

Martínez Laura E,¹ Martínez HR,²
Del Roble Velasco M,¹ Sampallo E,¹ Aguirre Rodríguez A,¹
González HC,² Cantú LA,² Garza NL,² Rivas MA.²

RESUMEN

Introducción: El manejo de la enfermedad de Parkinson incluye levodopa y agonistas de la dopamina. La hiperhomocisteinemia se asocia a complicaciones vasculares y aumenta la morbimortalidad en enfermedades neurodegenerativas. Además se ha relacionado con el uso de fármacos incluyendo levodopa, deficiencias vitamínicas y mutaciones enzimáticas. El polimorfismo genético que produce hiperhomocisteinemia incluye la mutación C677T del gen 5,10 metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Además, los folatos participan en la expresión fenotípica de esta mutación. **Objetivo:** Definir si la enfermedad de Parkinson aumenta los niveles de homocisteína o si el incremento de homocisteína se asocia al uso de levodopa, agonista de la dopamina (L01628) con factores genéticos (polimorfismo MTHFR) o nutricionales (folatos). **Material y métodos:** Se incluyeron pacientes con el diagnóstico de enfermedad de Parkinson evaluados con neuroimagen y la escala UPDRS. Se incluyó grupo control apareado a edad y sexo. A todos se les determinó biometría hemática, química sanguínea, colesterol, homocisteína, vitamina B12 y ácido fólico en sangre, ácido fólico en plasma y eritrocitos y polimorfismo de MTHFR. Para el análisis se dividieron en grupos: 1) enfermos tratados con levodopa, 2) enfermos tratados con agonista de dopamina, 3) enfermos vírgenes al tratamiento con levodopa, y 4) Grupo control. **Resultados:** En el grupo control (N:19; X 62.3 años) la media de homocisteína resultó en 11.06 $\mu\text{mol/L}$ (σ 10.4; σ 11.9). En pacientes vírgenes (N: 18; X 65 años) la media de homocisteína fue de 12.73 $\mu\text{mol/L}$ (σ 12.54; σ 12.92). En el grupo tratado con levodopa (N: 28, X 62.25 años) la media de homocisteína resultó en 12.34 $\mu\text{mol/L}$ (σ 10.06, σ 13.26) En el grupo de agonista de la dopamina (N: 9; X 70.3 años) la media de homocisteína 14.24 (σ 12.82; σ 16.03). El polimorfismo MTHFR (T/T) se encontró en 14 de 47 pacientes con enfermedad de Parkinson (30%) y en sólo uno de 19 controles (5%). No se encontraron anomalías en el resto de los exámenes incluyendo estudios de neuroimagen. **Conclusiones:** Enfermos con Parkinson tienen hiperhomocisteinemia en comparación con el grupo control. En varones tratados con levodopa la homocisteína permanece elevada a diferencia de las mujeres. En ambos sexos el agonista de la dopamina (L01628) aumenta la homocisteína, primordialmente en hombres. En casos con enfermedad de Parkinson detectamos mayor incidencia de polimorfismo MTHFR (T/T) comparado con los controles. No detectamos deficiencias de ácido fólico o vitamina B12 que expliquen la elevación de la homocisteína. Nuestros hallazgos sugieren que la homocisteína es importante en la fisiopatología y morbimortalidad de los enfermos con Parkinson. Lo anterior sugiere la posibilidad de incluir al ácido fólico como parte del tratamiento.

Palabras clave: homocisteína, enfermedad de Parkinson, levodopa, ácido fólico, MTHFR.

Rev Mex Neuroci 2003; 4(6): 413-418

Serum levels of homocysteine in Parkinson's disease

ABSTRACT

Introduction: Management of Parkinson's disease includes levodopa and dopamine agonists. Hyperhomocysteinemia is associated with vascular complications and increases morbimortality in neurodegenerative diseases. Moreover, it has been related with use of drugs including levodopa, vitamin deficiencies and enzymatic mutations. Genetic polymorphism that produces hyperhomocysteinemia includes C677T mutation of gene 5,10 methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR). Furthermore, folates participate in phenotypic expression of this mutation. **Objective:** to determine if Parkinson's disease increases homocysteine levels or if this homocysteine increase is associated to levodopa, dopamine agonist (L01628), genetic factors (MTHFR polymorphism) or nutritional factors (folates). **Material and methods:** Patients with diagnosis of Parkinson's disease evaluated with neuroimage studies and UPDRS scale were included. A control group matched by age and sex was included. Blood count, blood chemistry, cholesterol, blood homocysteine, vitamin B12, blood folic acid, folic acid in plasma and red blood cells, as well as MTHFR polymorphism were carried out to all subjects. For the analysis, patients were divided in the follow groups: group1, patients treated with levodopa; group 2, patients treated with dopamine agonists; group 3, naive patients to levodopa; and group 4, control group. **Results:** In control group (N: 19; X 62.3 years) homocysteine media was 11.06 $\mu\text{mol/L}$ (σ 10.4; σ 11.9). In naive patients (N: 18; X 65 years) homocysteine media was 12.73 $\mu\text{mol/L}$ (σ 12.54; σ 12.92). In levodopa treated group (N: 28, X 62.25 years) homocysteine media was 12.34 $\mu\text{mol/L}$ (σ 10.06, σ 13.26). In group of dopamine agonists (N: 9; X 70.3 years) homocysteine media was 14.24 (σ 12.82; σ 16.03). MTHFR polymorphism (T/T) was found in 14 of 47 patients with Parkinson's disease (30%) and only in one of 19 control subjects (5%). No other abnormalities in the rest of studies including neuroimage ones were observed. **Conclusions:** Patients with Parkinson's disease present hyperhomocysteinemia in comparison with control group. In male patients treated with levodopa, homocysteine remains in high levels unlike female patients. In both sexes, dopamine agonists (L01628) augment homocysteine levels, especially in male subjects. In Parkinson's disease cases we detected more incidence of MTHFR polymorphism (T/T) compared with control subjects. No folic acid or vitamin B12 deficiencies were detected which explain the homocysteine levels increment. Our findings suggest that homocysteine is important in physiopathology and morbimortality of patients with Parkinson's disease. The above-mentioned result suggests a possibility to include folic acid as part of Parkinson's disease treatment.

Key words: homocysteine, Parkinson's disease, levodopa, folic acid, MTHFR.

Rev Mex Neuroci 2003; 4(6): 413-418

1. Unidad de Defectos Congénitos. Facultad de Medicina UANL
2. Servicio de Neurología, Hospital Universitario, UANL.

Correspondencia: Dr. Héctor R. Martínez. Servicio de Neurología.

Hospital Universitario UANL. Av. Madero y Gonzalitos S/N. Col. Mitras Centro. CP 64460. Monterrey, N.L. México. Tel: (01-81) 8348-9266.

E-mail: hospitaluni@infosel.net.mx

La enfermedad de Parkinson es una entidad de causa desconocida que afecta a más de un millón de personas en Norteamérica. A la fecha, el único factor de riesgo consistente para desarrollar la enfermedad de Parkinson es la edad. Se estima que en los próximos años la frecuencia aumentará debido al incremento en la esperanza de vida de la población. Los pacientes con esta entidad clínica presentan una mortalidad de dos a cinco veces mayor que los controles de la misma edad.¹

La enfermedad de Parkinson es tratada con diferentes fármacos tales como: levodopa, agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, ropinirole, pramipexole, etc.), anticolinérgicos, amantadina, inhibidores de la monoamino oxidasa B (selegilina) e inhibidores de la catecol-O-metil transferasa (COMT) (entacapone y tolcapone). En la actualidad la levodopa es aún considerada de importancia primordial en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, sin embargo, su uso crónico se asocia a efectos adversos que incluyen: dicinesias, el fenómeno de encendido-apagado, el de desgaste, las distonías, el congelamiento y las alucinaciones, entre otros.²

La homocisteína, aminoácido no esencial derivado de la metionina, es metabolizado por dos vías: metilación y transulfuración (Figura 1). En la metilación, la homocisteína se forma a partir de la metionina, la cual activa su grupo metilo al convertirse en S-adenosylmetionina (SAM). Ésta es la principal donadora de grupos metilos en el organismo y el único en el SNC. La S-adenosil homocisteína (SAH) es un producto de la metilación y al ser hidrolizada se convierte en homocisteína en una reacción reversible. Deficiencias en SAM tienen impacto en el desarrollo, diferenciación y función celular. En el cerebro envejecido, al igual que en trastornos psiquiátricos y neurológicos, existe disminución de los procesos de metilación, en estas circunstancias, deficiencias en SAM producen una situación crítica. En la mayoría de los tejidos la homocisteína puede ser remetilada a metionina por la enzima metionin sintetasa (MS) dependiente de la vitamina B12.³

La vía de transulfuración es favorecida cuando la concentración de SAM se encuentra elevada, ocasionando que la homocisteína se asocie irreversiblemente a la serina para formar cistationina. Esta reacción es catalizada por la cistationina β sintetasa (CBS) favorecida por presencia de vitamina B6. De la cistationina se forma cisteína también favorecida por la vitamina B6. La cisteína es precursora del glutatión (buffer celular redox más importante del organismo), sustancia que previene el daño oxidativo y por consecuencia tiene efecto vascular protector. Las neuronas carecen de esta vía protectora y dependen de la cisteína glial para la generación de glutatión. La conversión de homocisteína

en metionina y SAM es bloqueada por defectos genéticos en la MS o metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR). El trahidrofolato reductasa (THR) es el paso importante en la generación de metionina a partir de homocisteína. La MTHFR tiene una influencia indirecta en la remetilación de la homocisteína.³

La hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo de enfermedad vascular. Se ha relacionado con microangiopatía cerebral, disfunción endotelial, actividad anormal del óxido nítrico y aumento del estrés oxidativo, todos estos factores relacionados con envejecimiento cerebral y daño neuronal. El aumento sostenido de la homocisteína se asocia a enfermedad aterosclerótica, muerte por enfermedad coronaria, aterosclerosis carotídea e infarto cerebral. Se ha demostrado que el aumento de homocisteína es factor de riesgo independiente para desarrollar demencia tipo Alzheimer.⁴

Estudios recientes sugieren que en la enfermedad de Parkinson los niveles de homocisteína están elevados. El tratamiento con levodopa puede ser promotor de la hiperhomocisteinemia y contribuir al daño vascular.⁵ Una de las principales vías metabólicas de la levodopa es mediada por la COMT que la transforma en 3-o-metildopa (3-OMD) para integrarse en la vía de la metilación de SAM.^{6,7} Además la hiperhomocisteinemia se ha asociado al uso de fármacos, deficiencia de folatos y al polimorfismo de la MTHFR C677T.⁸ El objetivo del presente reporte es definir si la enfermedad de Parkinson se asocia con hiperhomocisteinemia o si el incremento de homocisteína es secundario al uso de levodopa, agonista de la dopamina, factores genéticos (polimorfismo MTHFR) o nutricionales.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se incluyeron pacientes con el diagnóstico de enfermedad de Parkinson establecido por neurólogos del Servicio de Consulta Externa de Neurología del Hospital Universitario UANL en Monterrey, N.L. Los pacientes se dividieron en tres grupos. El Grupo I incluyó pacientes con enfermedad de Parkinson tratados con levodopa (n = 28); el Grupo II pacientes tratados con agonista dopaminérgico (L01628) (n = 9); y el Grupo III incluyó pacientes con diagnóstico de enfermedad de Parkinson reciente y aún sin recibir levodopa (vírgenes al tratamiento) (n = 18). Se incluyó además el Grupo IV (control) que incluyó controles pareados a la edad del resto de los grupos (n = 19).

Se obtuvo consentimiento firmado por parte del paciente o su familiar directo a cargo del enfermo participante en el estudio y de los controles. A todos los pacientes se les realizó el UPDRS (Unified Parkinson Disease Rating Scale) y el examen mínimo del estado mental (Mini Mental State Examina-

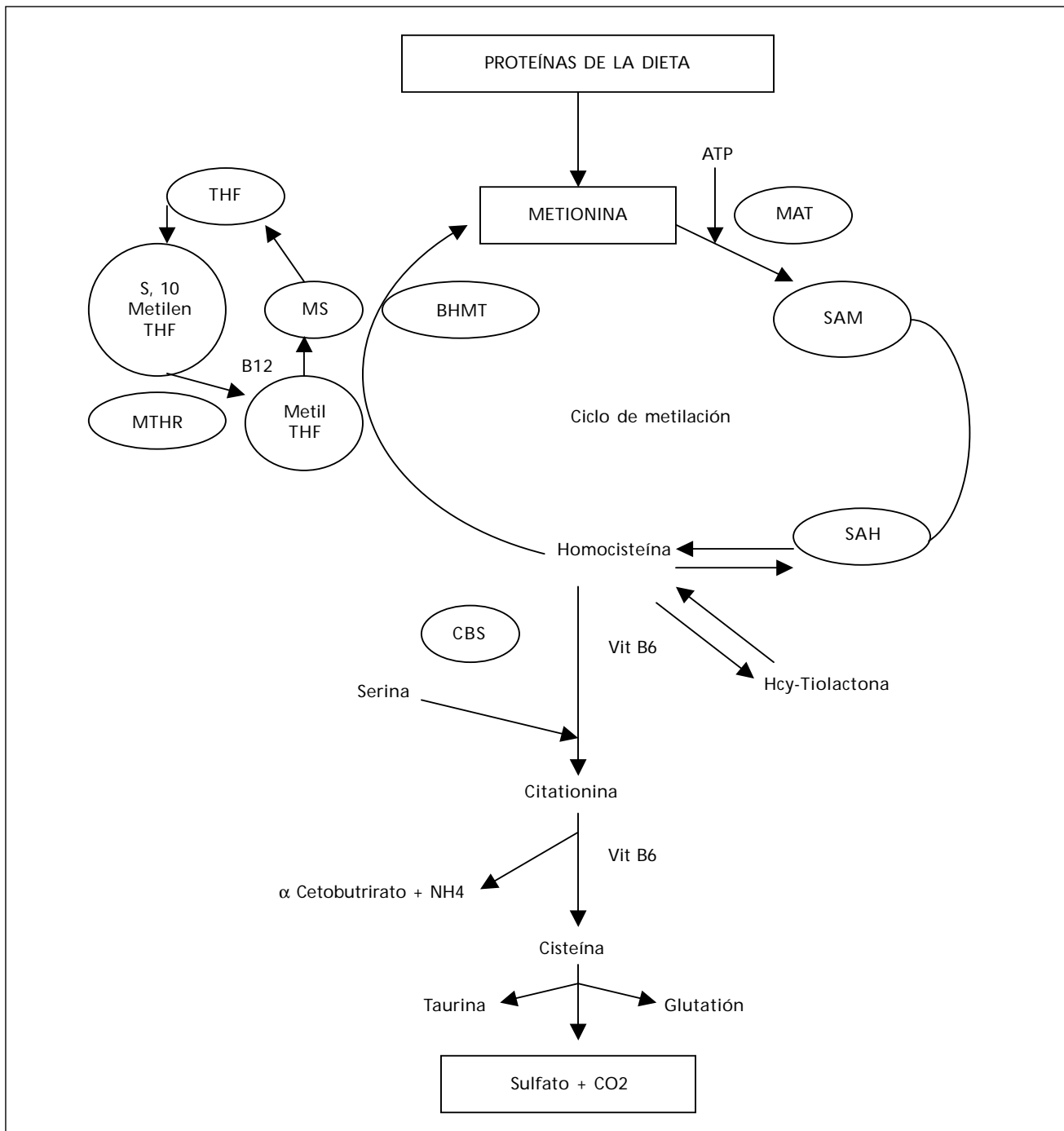


Figura 1.

tion). A todos los pacientes y controles se les realizó biometría hemática, perfil bioquímico, colesterol sérico, determinación de homocisteína en suero, ácido fólico (en sangre completa, en plasma y ácido fólico intraeritrocitario), vitamina B12 y el polimorfismo MTHFR.

Posterior a la evaluación clínica inicial por Neurólogo, realización de UPDRS, Minimental, además de aceptación y firma del consentimiento informado para participar en el estudio, el paciente fue so-

metido a la extracción de 10 mL de sangre periférica. La muestra obtenida por vacutainer en tubos con EDTA, se dividió en tres tubos: 4 mL para determinar ácido fólico, 4 mL para homocisteína y 2 a 3 mL para determinación del polimorfismo de la enzima MTHFR.

Determinación de folatos

De 4 mL de sangre se tomó alícuota de 0.1 mL y se diluyó en 2 mL de ácido ascórbico a 1% pre-

parado antes de la dilución, para hemolizar las células sanguíneas y cuantificar el ácido fólico intracelular; durante todo el proceso las muestras, dilución y solución se mantuvieron protegidos de la luz. La sangre restante (3.9 mL) se centrifugó a 1,500 rpm por 10 minutos con el fin de obtener plasma y determinar ácido fólico plasmático y vitamina B12. Las muestras se colocaron en tubos de plástico y posteriormente se metieron al congelador a -30 °C. Las determinaciones se efectuaron por radioinmunoensayo utilizando un estuche de fase sólida obtenido de Diagnostic Product Corporation (DPC), (Los Ángeles, California, USA). Se utilizaron controles CON6 (DPC) de niveles bajo, medio y alto para ambas vitaminas. Los valores de ácido fólico plasmático y vitamina B12 fueron tomados directamente de la curva estándar. Los resultados de ácido fólico intraeritrocitario se obtuvieron multiplicando por el factor de dilución (con la que se hizo el hemolizado) por el valor de la curva estándar, este valor se multiplicó por 100 y se dividió entre el hematócrito de cada muestra. Los valores normales de ácido fólico plasmáticos son 3.5-17 ng/mL, y de ácido fólico intraeritrocitario de 160-700 ng/mL y de vitamina B12 de 200-950 pg/mL.

Determinación de homocisteína

Los 4 mL de muestra se centrifugaron a 4,300 rpm durante 10 minutos a -4 °C; se separó el plasma y se colocó en un tubo de plástico; se guardó en el congelador a -20 °C hasta su procesamiento. Durante el procesamiento de la muestra se utilizaron 200 µL de plasma y se determinó utilizando kit de reactivo de homocisteína, y de controles (alto, medio y bajo) mediante inmunoensayo de polarización de la fluorescencia (FPIA) (Axsym SysTem, ABBOT). Esta tecnología se basa en que la homocisteína (oxidada) se reduce a homocisteína libre en presencia de ditioneitol (DTT) y S-adenosil-homocisteína y ésta se convierte enzimáticamente en S-adenosil L-homocisteína (SAH). La SAH se mezcla con un trazador marcado con fluorescencia y ambos compiten por los sitios de unión de los anticuerpos monoclonales. El intervalo de valores normales para mujeres y hombres adultos es de 5-15 µmol/L. Los valores aumentan con la edad y en las personas con más de 60 años alcanzan valores esperados de referencia entre 5 y 20 µmol/L.

Determinación del polimorfismo MTHFR C677T

Extracción de ADN. Se realizó mediante la técnica TSNT (10 mM Tris-HCL con un pH de 8.0, 1% SDS, 100 mM EDTA).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

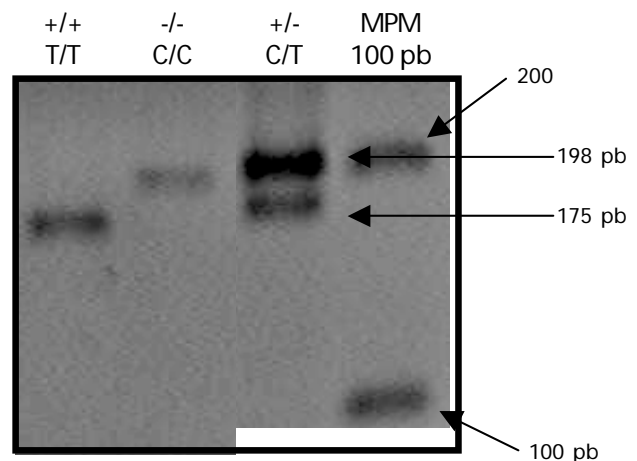
Se utilizaron los iniciadores MTHFR-1 (5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG Ga-3') y MTHFR-2 (5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'). La amplificación por PCR utilizando estos iniciadores genera un fragmento de 198 pb, verificando la presencia del producto en un gel de agarosa al 2%.

Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP's). Se digirieron los productos amplificados con la enzima Hinf I, a 37 °C durante 12 horas. El producto de la digestión se analizó en gel de agarosa al 2.5%. La sustitución de alanina por valina en la forma mutante crea un sitio de restricción para la enzima Hinf I, por lo que el producto amplificado de 198 pb se divide en un fragmento de 175 pb y otro de 23 pb. Este último fragmento dado su tamaño tan reducido se pierde al correr el gel (Figura 2).

RESULTADOS

En el presente estudio se incluyeron 55 pacientes con el diagnóstico clínico de enfermedad de Parkinson y 19 controles apareados a la edad del grupo de enfermos. En todos los pacientes se efectuaron estudios de neuroimagen sin detectarse lesión estructural, sólo en cuatro de ellos se observó la presencia de depósitos de hierro en ganglios basales. No se detectó la presencia de demencia en el grupo de enfermos y el promedio del examen del estado mental fue de 27 puntos en el grupo total de enfermos con Parkinson. En la presente serie el UPDRS reveló un promedio de 36 puntos.

El grupo I incluyó 28 pacientes con enfermedad de Parkinson tratados con levodopa con promedio de edad de 62.25 años. La media de homocisteína en este grupo resultó en 12.34 µmol/L (♀10.06, ♂13.26). El grupo IV constituido por 19 controles tuvo un promedio de 62.3 años de edad. La media de homo-



Patrones de bandas esperadas

Figura 2. MTHFR. Polimorfismo 677.

cisteína en el grupo control resultó en 11.06 $\mu\text{mol/L}$ (♀10.4; ♂11.9). En el grupo II se incluyeron nueve pacientes tratados con agonista de la dopamina con un promedio de 70.3 años, los cuales mostraron la media de homocisteína en 14.24 $\mu\text{mol/L}$ (♀12.82; ♂16.03). El grupo III correspondió a 18 pacientes con enfermedad de Parkinson y al momento del estudio vírgenes a tratamiento con levodopa (promedio de edad 65 años) en estos enfermos la media de homocisteína fue de 12.73 $\mu\text{mol/L}$ (♀12.54; ♂12.92).

El polimorfismo MTHFR (T/T) se encontró en 14 de 47 pacientes con enfermedad de Parkinson (30%) que corresponden a los homocigotos para la mutación de esta enzima. Este polimorfismo T/T solamente se encontró en uno de los 19 controles representando 5% del total de la muestra de este grupo. El polimorfismo C/T que corresponde a heterocigotos se detectó en 17 pacientes con enfermedad de Parkinson (36%). La determinación de folatos en plasma e intraeritrocitario (175 a 700 ng/mL) al igual que la determinación de vitamina B12 (200 a 950 pg/mL) se encontró dentro de los rangos descritos en todos los pacientes de los grupos I, II y III al igual que en el grupo IV compuesto por controles apareados a la edad.

DISCUSIÓN

El aumento de la homocisteína se ha asociado con enfermedades neurodegenerativas incluyendo la enfermedad de Parkinson. Se ha descrito que la presencia de esta anomalía favorece el desarrollo de complicaciones vasculares que influyen en el deterioro clínico de estos enfermos. Además, el aumento de la homocisteína en sangre predispone al SNC a mayor susceptibilidad para estrés oxidativo en comparación con otros tejidos del cuerpo humano.

En el presente reporte encontramos que los pacientes con enfermedad de Parkinson (Grupos I, II y III) muestran niveles mayores de homocisteína en suero que los controles (Grupo IV) (promedio 11.06 $\mu\text{mol/L}$) (Tabla 1). El incremento de la homocisteína es mayor en hombres que han estado bajo tratamiento con levodopa; en mujeres no se observó incremento. Los enfermos tratados con el agonista

dopaminérgico (L 01628) presentaron el mayor incremento en la homocisteína sérica (14.25 $\mu\text{mol/L}$) mayor en hombres que en mujeres, representando un aumento estadísticamente significativo ($p > 0.05$) (Tabla 1).

Se observó en el grupo total de pacientes un incremento significativo de la homocisteína. Este aumento fue mayor en hombres que en mujeres y controles. Lo anterior sugiere que los pacientes con enfermedad de Parkinson tienen incremento en la homocisteína, la cual podría condicionar el deterioro clínico progresivo de los pacientes. La homocisteína se mantuvo igual en las mujeres controles que las tratadas con levodopa. Se observó un moderado incremento en la homocisteína en las mujeres tratadas con agonista de la dopamina (L01628). El pequeño número de pacientes incluidos en el grupo II (tratados con agonista de la dopamina) impide efectuar análisis estadístico para permitirnos presentar alguna explicación a este hallazgo.

De acuerdo con nuestros resultados los pacientes con enfermedad de Parkinson sometidos a tratamiento con levodopa o a tratamiento con agonista dopaminérgico (L01628), muestran un incremento adicional de la homocisteína sérica. Consideramos que el aumento de homocisteína asociado a levodopa o agonistas indica que estos tipos de tratamiento podrían acelerar el deterioro neurológico. Es altamente frecuente observar deterioro clínico o eventos adversos a 3-4 años de uso de levodopa. La homocisteína podría estar participando en el deterioro y en la presencia de los efectos adversos. Deficiencias en SAM producen aumento de la homocisteína con gran impacto en la función celular. El cerebro envejecido o con trastornos neurológicos tiene disminución de SAM y por consecuencia disminución de los procesos de metilación. Los pacientes con enfermedad de Parkinson pueden no solo tener un cerebro con fenómenos de envejecimiento sino también deficiencias en SAM que lo predisponen a deterioro severo y progresivo que con frecuencia observamos en estos enfermos.

En pacientes con enfermedad de Parkinson detectamos mayor incidencia de polimorfismo MTHFR

Tabla 1
Niveles de homocisteína en suero

Grupo	Mujeres $\mu\text{mol/L}$	Hombres $\mu\text{mol/L}$	Total $\mu\text{mol/L}$
1. Levodopa	10.06	13.26	12.34
2. Agonista de dopamina	12.82	16.03	14.24
3. Vírgenes a levodopa	12.54	12.92	12.73
4. Controles	10.40	11.90	11.06

tanto del tipo homocigoto (T/T) que del heterocigoto (C/T) comparado con los controles (un caso de T/T entre 19 controles). El polimorfismo T/T (homocigotos) se detectó en 30% de los pacientes con enfermedad de Parkinson y el polimorfismo C/T (heterocigotos) en 36% de los pacientes con esta entidad clínica. La presencia de estos polimorfismos sugiere que los pacientes con enfermedad de Parkinson tienen anormalidades para el metabolismo de la homocisteína condicionados por polimorfismos genéticos. No detectamos deficiencias de ácido fólico o vitamina B12 que expliquen la elevación de la homocisteína. Nuestros hallazgos sugieren que la homocisteína es importante en la fisiopatología y morbimortalidad de los enfermos con Parkinson. Por lo anterior y debido a la participación del ácido fólico en el metabolismo de la homocisteína, sugerimos su utilización como parte del tratamiento en la enfermedad de Parkinson.

REFERENCIAS

1. Lang A, Lozano A. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 1998; 339: 1044-53.
2. Lang A, Lozano A. Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med* 1998; 339: 1130-43.
3. Bolander C, Bottiglieri T. Homocysteine related vitamins and neuropsychiatric disorders. Springer-Verlag France. France; 2003.
4. Sehsadri S, et al. Plasma homocysteine as a risk factor of dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 476-82.
5. Muller T, et al. Nigral endothelial dysfunction, homocysteine, and Parkinson's disease. *Lancet* 1999; 354: 126.
6. Muller T. Homocysteine plasma levels correlate with 3-OMD in PD patients. *J Neural Transm* 2002; 109: 175-9.
7. Zhao W, et al. L-Dopa upregulates the expression and activities of methionine adenosyl transferase and catechol-o-methyltransferase 2001; 171: 127-38.
8. Plasma homocysteine and MTHFR C677T genotype in levodopa treated patients with PD. *Neurology* 2000; 55: 3.

