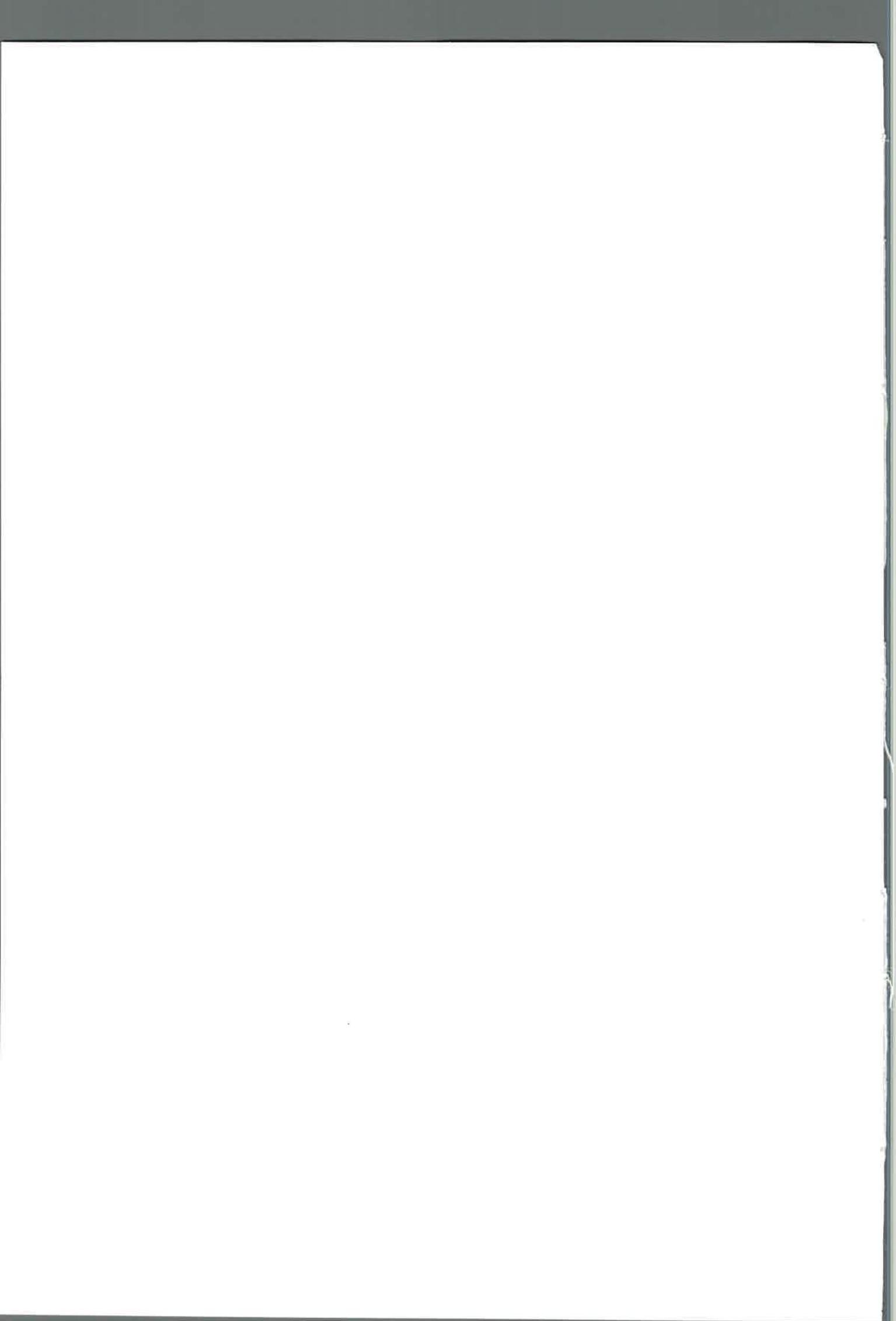


76152

SILVERA RUIZ, SILENE MAITE

Delictos sexuales en el ciberespacio - violencia de género

2017 **76152**





UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO- QUÍMICAS Y NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctor en
Ciencias Biológicas

DEFECTOS GENÉTICOS EN EL CICLO DE LA UREA
Variabilidad genotípica-fenotípica en pacientes argentinos

Lic. Silene Maité Silvera Ruiz

Director

Dra. Laura Elena Laróvere

Asesor de Tesis

Dra. Ana Niebilsky

Río Cuarto, Abril 2017

76152

REF
C -
T-1108

COMISIÓN ASESORA y JURADO

Dra. Carla Asteggiano Centro de Estudio de las Metabopatías Congénitas, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Facultad de Ciencias Médicas, UNC, UCC, Córdoba

Firma:  Aclaración:..... Carla G. Asteggiano

Dra. Cecilia Conde Laboratorio de Neurobiología, Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra, UNC, Córdoba

Firma:  Aclaración:..... Conde, Cecilia B.

Dra. Beatriz García Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, UNC, Córdoba

Firma:  Aclaración:..... GARCIA, BEATRIZ ALICIA

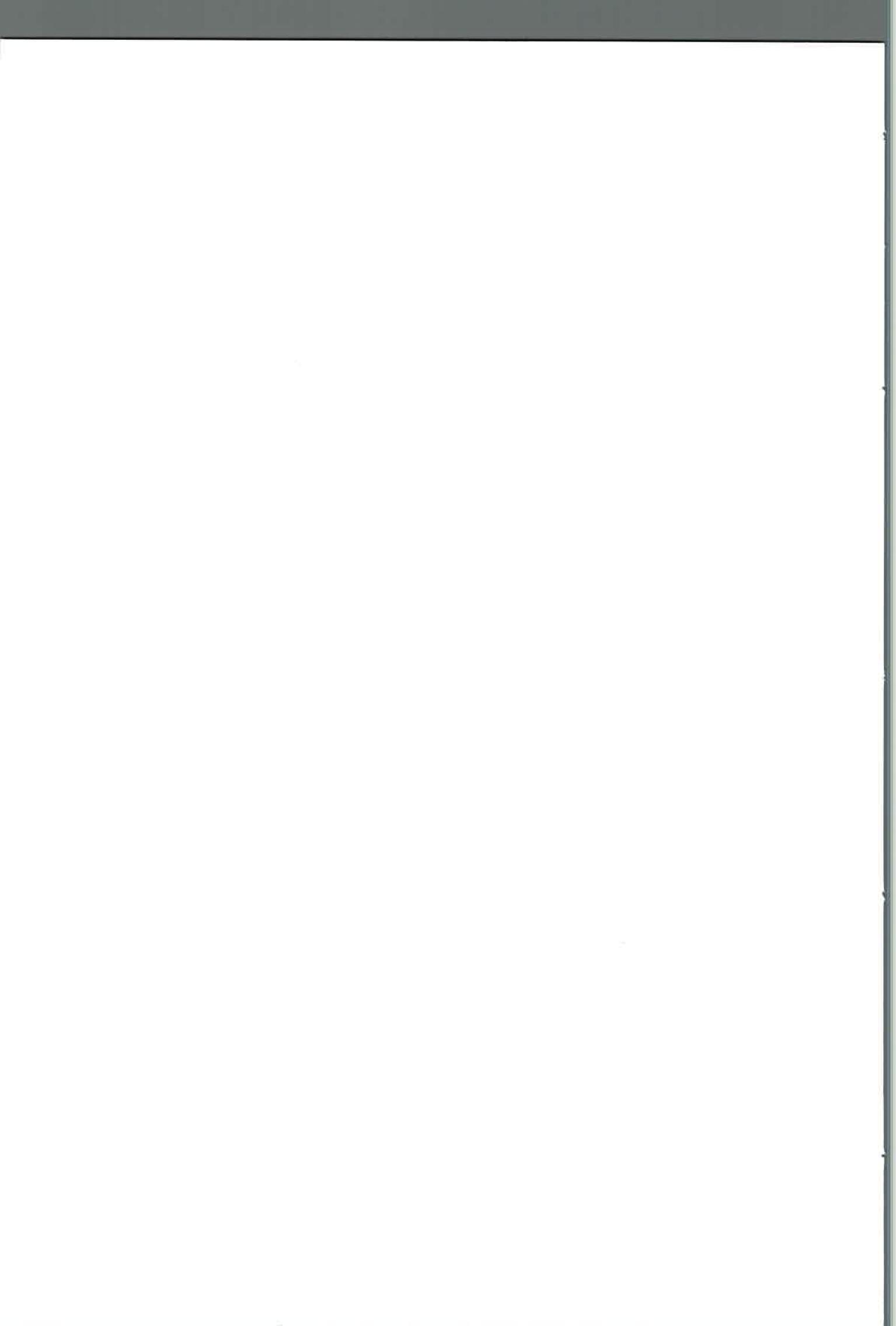
DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha:..... Río Cuarto, 10 de Abril de 2017

Calificación:..... SOBRESALIENTE (10 diez)

A Ramiro y mis hijos

A mis Padres



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo agradecer a la Dra. Raquel Dodelson de Kremer, no sólo por permitirme desarrollar mi trabajo doctoral en su centro de investigación sino también por sus correcciones y sugerencias, por sus enseñanzas y sabios consejos, por el ejemplo diario del trato con el paciente e inspirarme a seguir creciendo en esta profesión.

Es inmedible el aprecio que siento por mi directora, Laura. Quien siempre ha confiado en mis ideas y mi trabajo. Gracias por el ejemplo, la confianza y el apoyo que me ha brindado desde el primer día en que comenzamos a trabajar juntas.

A los integrantes de mi Comisión de Tesis, Dras. Carla Asteggiano, Cecilia Conde y Beatriz García, por las valiosas observaciones y sugerencias realizadas durante la realización de este trabajo.

Al Dr Ernesto Juaneda, Servicio de Cardiología, Hospital de Niños de Córdoba, por su confianza para emprender un proyecto en común. Este saludo es extensivo a los integrantes de su equipo y al Servicio de Cirugía Cardiovascular, por el compromiso y profesionalismo con el que se llevó a cabo el protocolo de Citrulina Oral.

Al Dr. Marshall Summar, Department of Genetics and Metabolism, Children´s National Medical Centre, por brindarme la posibilidad de aprender y trabajar en un laboratorio de referencia mundial en el campo de las Deficiencias en el Ciclo de la Urea. A Innovative Medicines por el apoyo brindado para la realización de la pasantía.

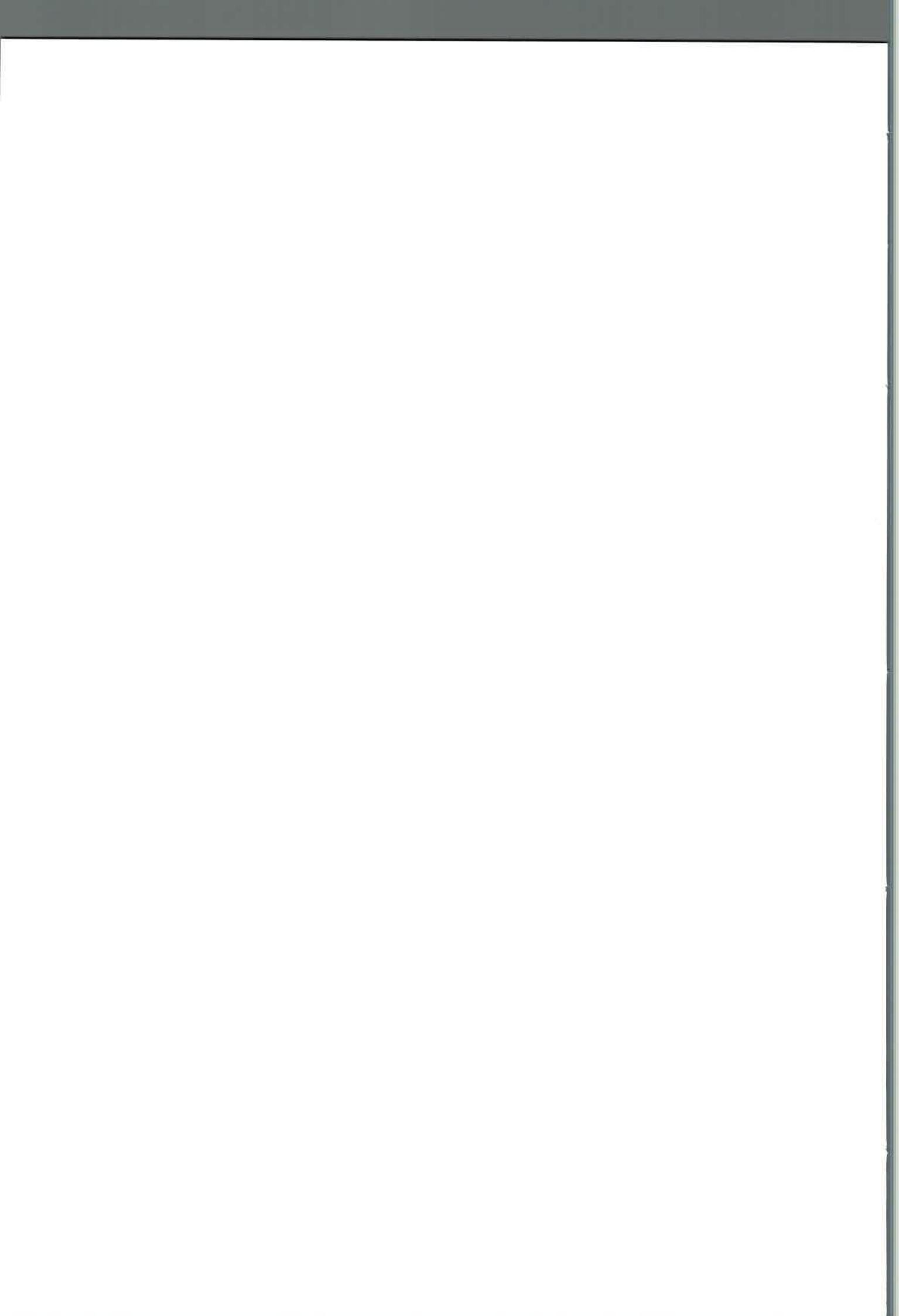
A todos mis compañeros de CEMECO, por la ayuda constante, por amenizar mis días de trabajo y compartir su sabiduría en todos los ámbitos, a Celia Angaroni, Sandra Antonozzi, Andrea Delgado, Miriam Bezar, Romina Cohan, Fernanda Santi, Ana Julia Badino, Lourdes Peralta, Adriana Becerra, Norberto Guelbert, Alicia Giner, Dora Martínez, Ricardo Noriega, Ana Oller, Inés Halac, Adriana Cismondi, Favio Pesaola, y Adriana Fochesato. Quiero agradecer especialmente a Carola Grosso por sus consejos tan certeros, por compartir su tiempo, paciencia, conocimientos y por su ejemplo diario.

A la Dra. Ana Niebylski, Departamento de Biología Molecular, FCEQyN, UNRC por su asesoramiento y seguimiento en la realización de este trabajo.

A las familias estudiadas que tan amablemente nos recibieron, brindaron información y participaron del proyecto. Gracias por confiar y brindarnos la oportunidad de guiarlos en este difícil camino.

A Ramiro, mi compañero incansable de este viaje eterno, gracias por tu apoyo y empuje en los momentos más difíciles, gracias por ser el soporte de esta hermosa familia y aguantar mis presentes ausencias, te amo.

A mis hijos, Feliciano y Martiniano, por enseñarme lo importante en esta vida y alborotar tan alegremente mis días. Son la mayor fortaleza para trabajar fuertemente y seguir con el objetivo de alcanzar mis metas. Ustedes son mi principal motivación.



A mis padres, Viviana y Nelson, por motivarme con constancia para alcanzar mis anhelos y no dejarme vencer por más difícil que parezca. Por su apoyo, por su incondicionalidad y principalmente por su amor que no espera nada a cambio,

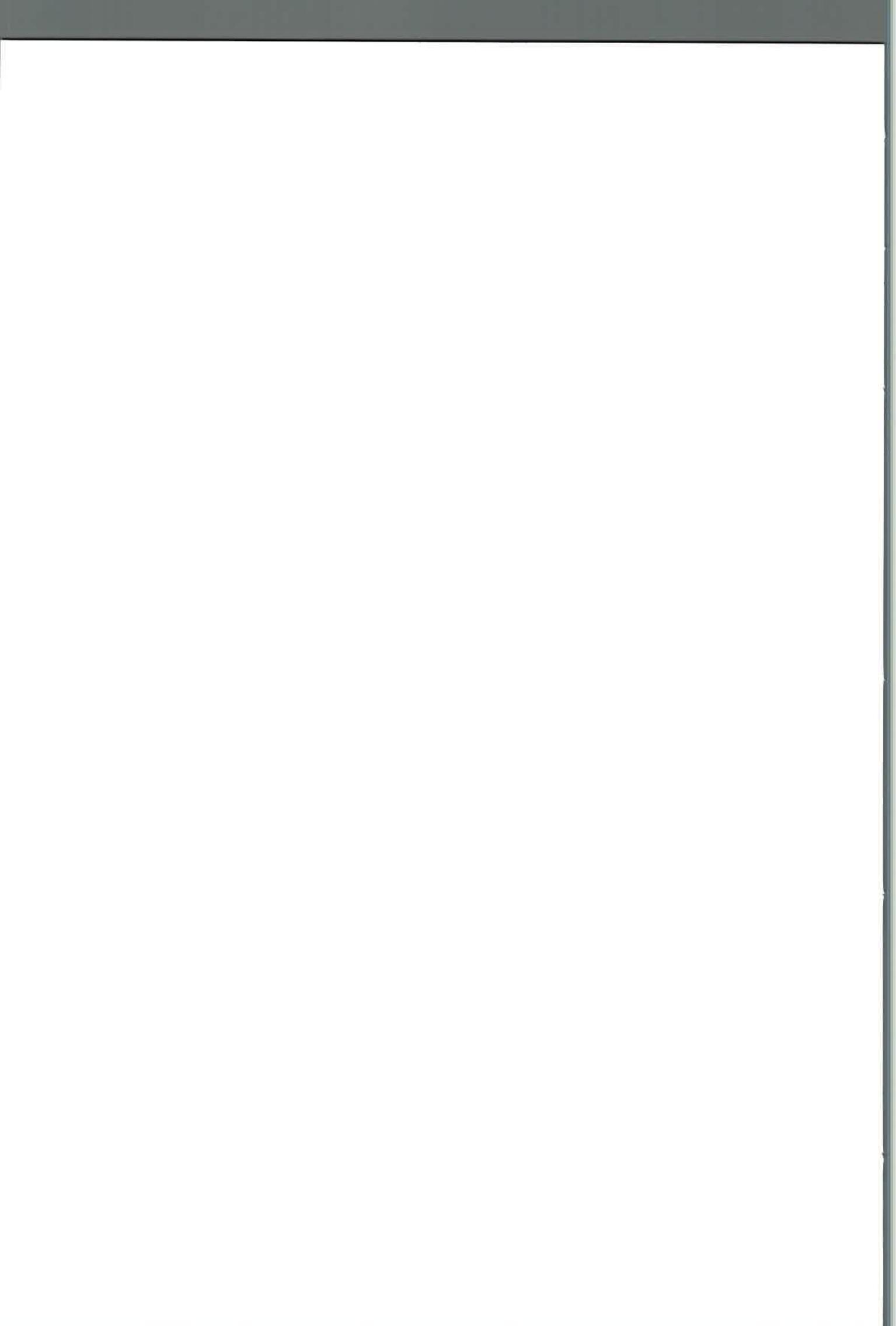
A mis hermanos Leda, Nelson y Yami; son mis gigantes y no puedo sino darles las gracias por el tiempo, por soportarme día a día y ayudarme a no bajar los brazos, pero sobre todo por el inmenso amor que siento de su parte.

A las maravillosas amigas que conocí en este camino, Julia, Cytia, Lorena, Magalí, Beatriz, Leila y Nydia con las cuales he compartido tantos momentos, y sé que sin su apoyo y compañía estos años no hubiesen sido lo mismo.

A Euge, Lily y Marta porque gracias a ellas sé lo que es la amistad verdadera, valor importante en mi vida, gracias por estar conmigo en todo este viaje, por aconsejarme, regañarme, compartir risas y llantos en todo este tiempo.

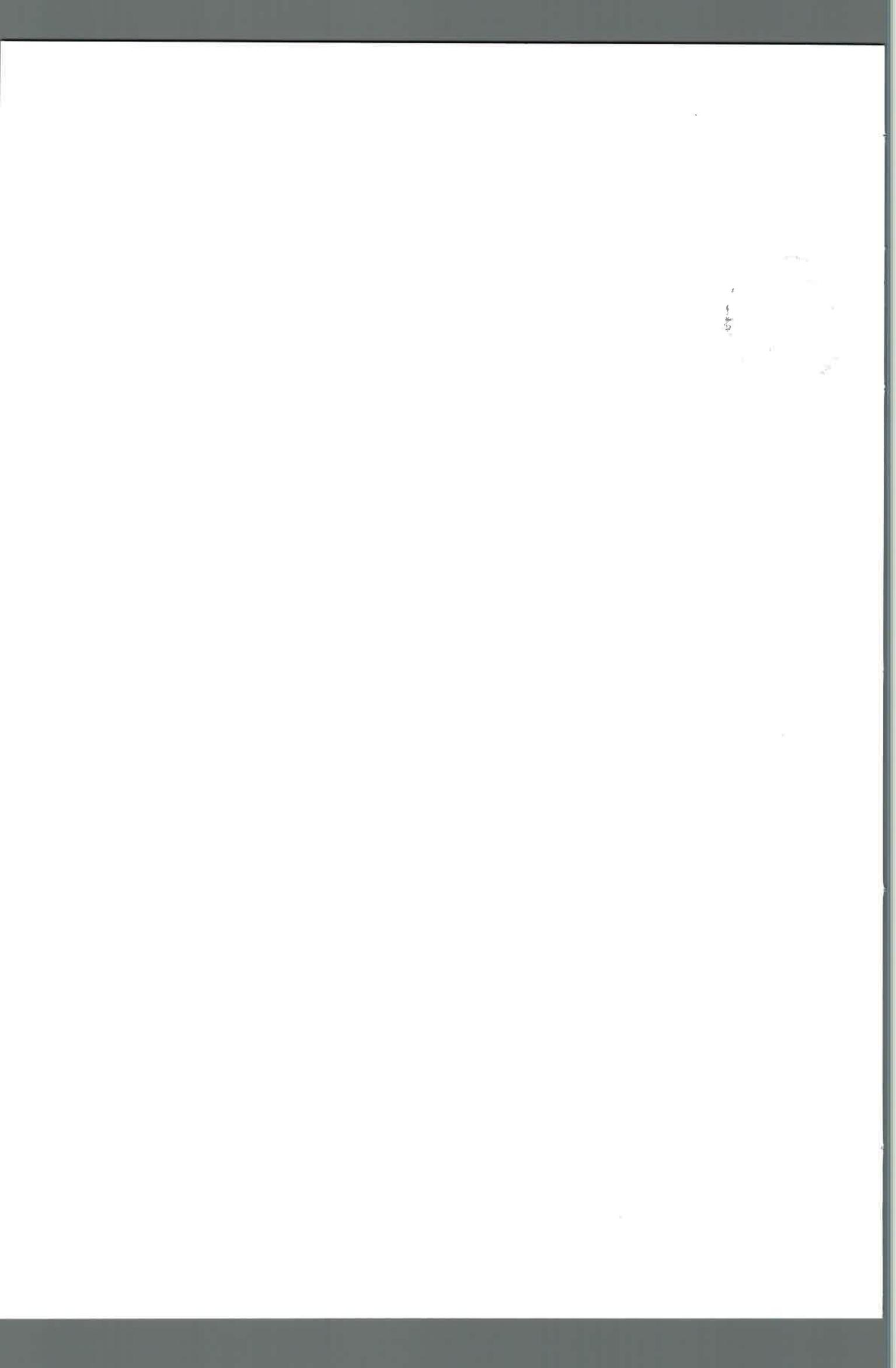
A mi gran familia López, política y de corazón, por estar siempre presentes, acompañarme y confiar en mí. Gracias por permitirme ser parte de ustedes.

Quiero extender este agradecimiento a todos los que, de alguna manera, me han apoyado y ayudado para que esta tesis sea una realidad.



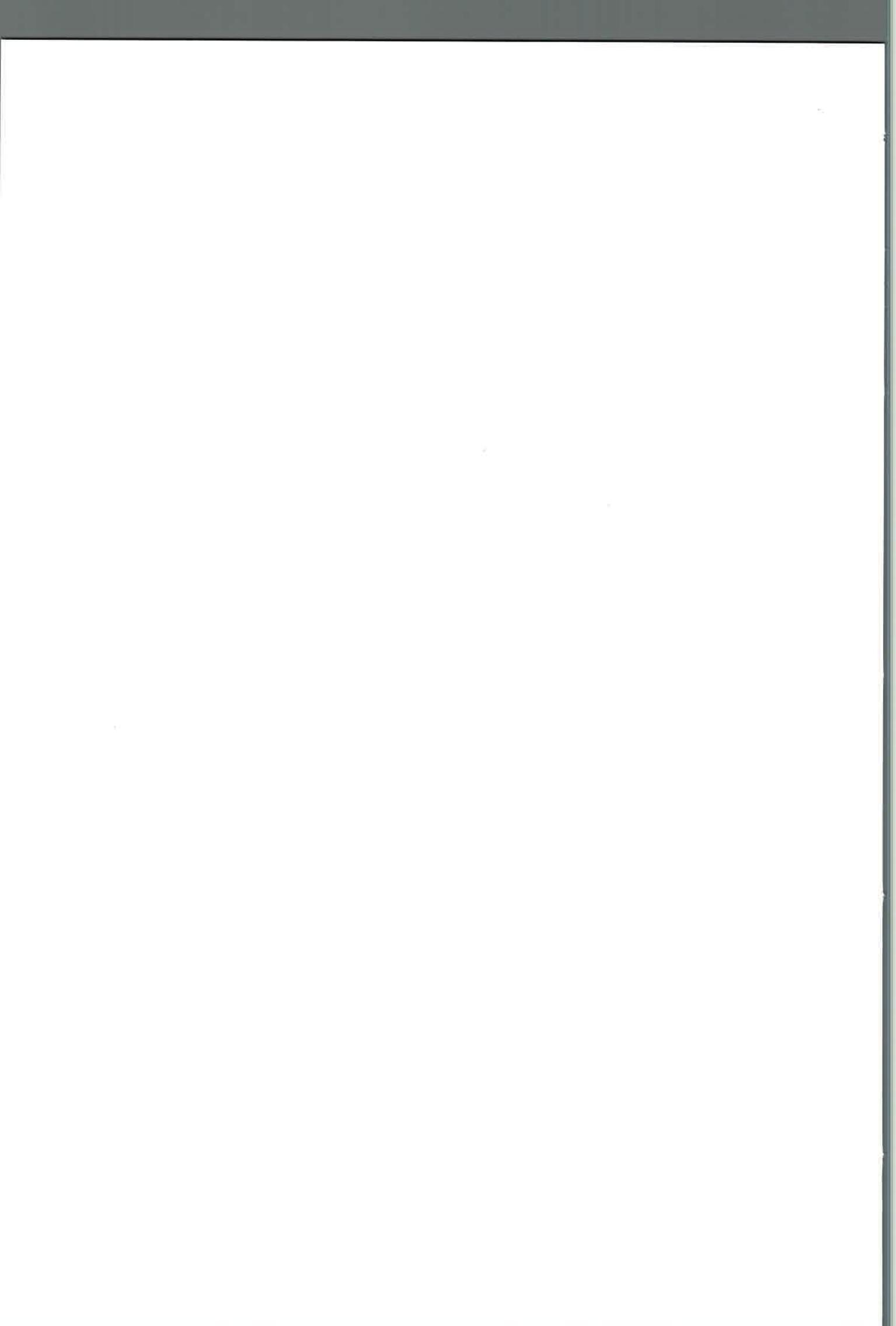
RESUMEN

Las últimas dos décadas han sido testigos de grandes avances en el diagnóstico, comprensión y tratamiento de enfermedades metabólicas hereditarias también denominadas enfermedades poco frecuentes. Entre las vías metabólicas principales del organismo se halla la del ciclo de la urea (CU), siendo la única vía capaz de la eliminación de exceso de nitrógeno derivado de la ingesta de proteínas de la dieta y de la degradación de proteínas endógenas. Esta vía consta de seis enzimas y dos transportadores transmembrana; las alteraciones en estructura/función de cualquiera de ellas, se denominan defectos del ciclo de la urea (DCU). Los genes que codifican para estas enzimas siguen un patrón de herencia autosómico recesivo, con excepción de la ornitina carbamiltransferasa, que sigue una herencia ligada al sexo. Los recién nacidos con DCU son asintomáticos en las primeras 24-48 hs después del nacimiento, los síntomas iniciales incluyen somnolencia y rechazo al alimento, y por lo general son seguidos por vómitos, letargo y coma. Las formas tardías se manifiestan con vómitos, elevación idiopática de las transaminasas, ataxia, trastornos de la conducta, rechazo al alimento, alucinaciones. Esta Tesis Doctoral, comprendió el abordaje de las alteraciones primarias y secundarias del CU en la población argentina mediante técnicas bioquímicas, de genética molecular y análisis *in silico*, aplicadas al diagnóstico, seguimiento, investigación conjuntamente con el desarrollo de un ensayo clínico aplicado. El abordaje de las *alteraciones primarias* comprendió el diagnóstico de: i) Deficiencia OTC: 11 familias, 14 pacientes; de los cuales 4 son hemocigotas con inicio neonatal (mutaciones OTC: delE2-10, c.533C>T, c.697delG), 4 varones con inicio tardío (c.216+1G>A, c.386G>A, c.622G>A, c.829C>T), 6 mujeres heterocigotas sintomáticas (delE2-10, c.533C>T, c.452T>G, c.540+1G>A, dupE1-9/delE10). ii) Deficiencia de argininosuccinato sintetasa (ASS), Citrullinemia tipo I (CTLN1), dos pacientes heterocigotos compuestos (mutaciones ASS1: c.79T>C/c.847G>A; c.79T>C/c.970G>A), y 16 pacientes (c.1168G>A/c.1168G>A) de 13 familias no relacionadas de la provincia de San Luis, fallecidos durante el período neonatal. La frecuencia de portadores de esta mutación en la población es del 4,1%, lo que sugiere una incidencia de CTLN1 de 1: 2427. Se abordó el estudio del grado de endogamia en la población mediante marcadores polimórficos y método isonímico indicando moderada endogamia y un alto grado de parentesco entre las parejas de riesgo. iii) Deficiencia de argininosuccinato liasa, 2 pacientes (mutaciones ASL: c.857A>G/c.857A>G; c.857A>G/C.436C>T), uno de ellos fallecido durante el período neonatal. En general, este estudio informa de 17 mutaciones, de las cuales 5 no se han informado previamente (Gen OTC: duPE1-9/delE10, delE2-10, c.540+1G, c.697delG; gen ASS1: c.79T>C). Las mutaciones fueron validadas con herramientas bioinformáticas que esclarecen la correlación de cada genotipo con la presentación clínica. Las *alteraciones secundarias* abarcan variantes funcionales del CU que son significativas, no sólo dentro del ciclo, sino por su capacidad de afectar otros sistemas fisiológicos. Se aborda el estudio del polimorfismo CPS1-T1405N, muy frecuente en nuestra población y que mediante la activación del CU aumenta la biodisponibilidad de arginina endógena, incrementando la capacidad del individuo para producir óxido nítrico, y con el consiguiente aumento de los niveles de homocisteína plasmática. Además, se llevó a cabo un ensayo clínico con el Servicio de Cardiología del Hospital de Niños, pudiendo validarse en nuestra población la eficacia de la administración de citrulina oral para prevenir la hipertensión pulmonar luego de la cirugía cardíaca congénita. Los resultados de esta tesis demuestran la existencia de las alteraciones del CU en nuestro medio y posibilitan su exacta definición nosológica, ampliando el espectro de enfermedades metabólicas hereditarias, junto al adecuado asesoramiento familiar. Como resultado, el número de pacientes argentinos que son diagnosticados tempranamente con un DCU va en aumento, al igual que su esperanza de vida.



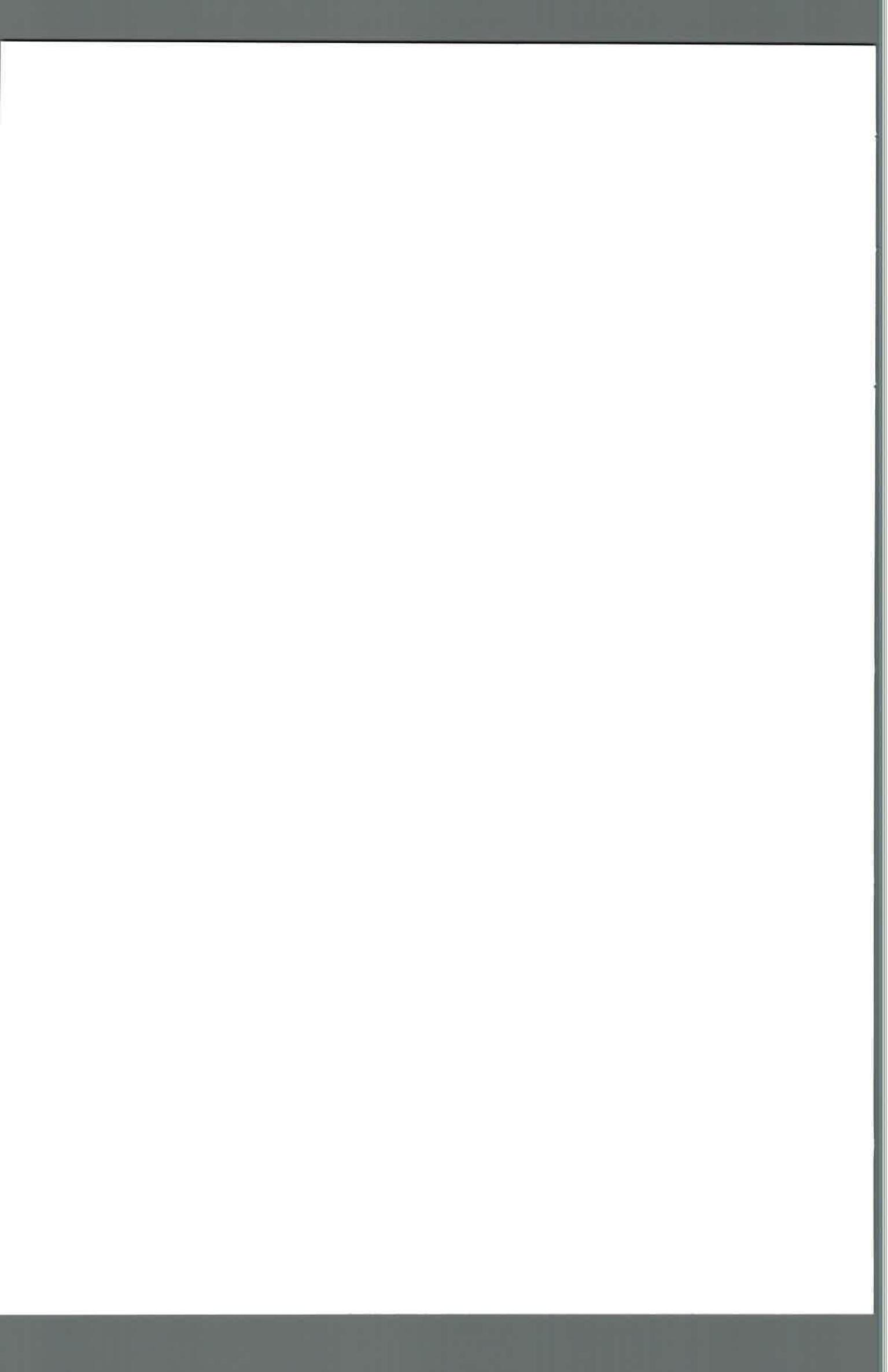
ABSTRACT

The last two decades have witnessed major advances in diagnosis, understanding and treatment of inherited metabolic diseases also called rare diseases. Among the main metabolic pathways of the body is the urea cycle (UC), the only pathway capable of removing excess nitrogen from the intake of dietary protein and degradation of endogenous proteins. This pathway consists of six enzymes and two transmembrane transporters, alterations in structure/function of any of them, are called cycle defects urea (UCD). The genes encoding for these enzymes follow an autosomal recessive inheritance pattern, except for the ornithine transcarbamylase, which follows a sex-linked inheritance. UCD newborns are asymptomatic in the first 24-48 hours after birth, the initial symptoms include somnolence and rejection of food, and usually are followed by vomiting, lethargy and coma. Late forms manifest with vomiting, idiopathic elevated transaminases, ataxia, behavioral disorders, rejection of food, hallucinations. This doctoral thesis comprise the approach of primary and secondary alterations in Argentinean UC population through biochemical techniques, molecular genetics and informatics applied to diagnosis, monitoring, research and applied clinical trial. The approach of the primary changes include: We diagnosed: i) OTC deficiency: 11 families, 14 patients; 4 hemizygous males with neonatal-onset (mutations OTC: delE2-10, c.533C> T, c.697delG), 4 boys with late-onset (c.216 + 1G> A, c.386G> A, c.622G> A, c.829C> T), 6 symptomatic heterozygous females (delE2-10, c.533C> T, c.452T> G, c.540 + 1G> A, dupE1-9 / delE10). ii) argininosuccinate synthetase deficiency (ASS), Citrullinemia type I (CTLN1), two patients compound heterozygous (mutations ASS1: c.79T> C / c.847G> A; c.79T> C / c.970G> A), and 16 patients (c.1168G> a / c.1168G> a) from 13 unrelated families from San Luis province, who died during the neonatal period. The carrier frequency of the mutation in the population is 4.1%, suggesting an incidence of CTLN1 of 1: 2427. Inbreeding in this population was approached through polymorphic markers and isonimic method indicating moderate endogamy and a high degree of kinship between the pairs of risk. iii) argininosuccinato lyase, 2 patients (mutations ASL: c.857A> G / c.857A> G; c.857A> G / c.436C> T) one of them died during the neonatal period. Overall, this study reports 17 mutations, of which 5 have not been previously reported (Gen OTC: dupE1-9 / delE10, delE2-10, c.540 + 1G c.697de3G and> A; Gen ASS1: c. 79T> C). Mutations were validated with bioinformatic tools that allowed elucidate the correlation of each genotype with clinical presentation. Secondary changes include functional variants of UC that are significant, not only within the cycle, but for its ability to affect other physiological systems. Thus, the study of polymorphism T1405N-CPS1, very common in our population and by activating the UC increases the bioavailability of endogenous arginine, increasing the individual's ability to produce nitric oxide. Thus, the presence of this polymorphism is involved in susceptibility/robustness in various pathological conditions associated with nitric oxide cycle. In addition, a clinical protocol was executed with the Department of Cardiology at Children's Hospital to validate in our population the efficacy of oral citrulline administration to prevent pulmonary hypertension after congenital heart surgery. These results demonstrate the existence of alterations in the UC in our population and enable its exact diagnosis, broadening the spectrum of inherited metabolic diseases, with the appropriate family assessing. As a result, the number of Argentine patients who are diagnosed early with an UCD is increasing as their life expectancy.



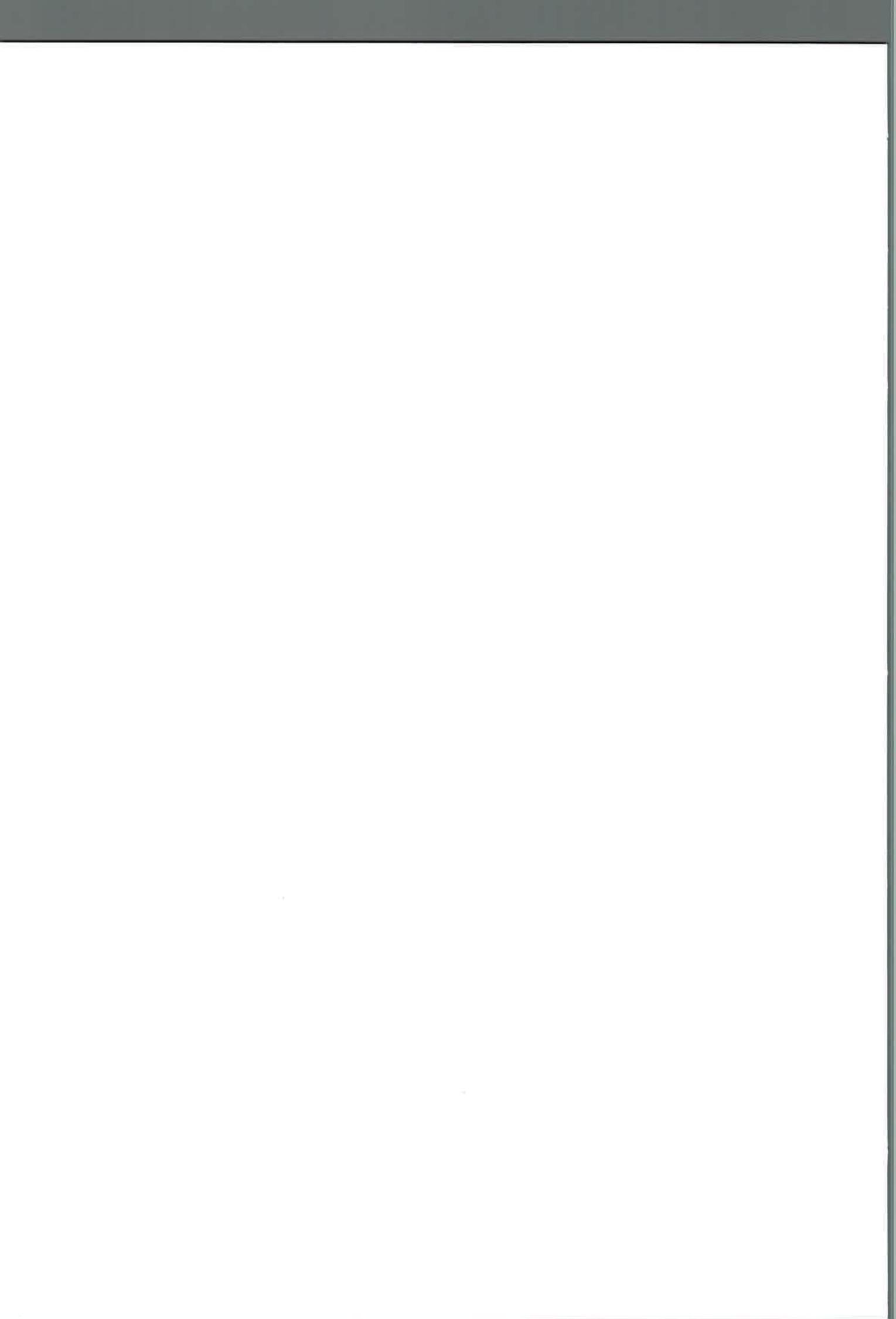
INDICE

	Página
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	ix
Abreviaturas	xi
Prólogo	xii
Objetivos	xv
Introducción	1
Parte I ALTERACIONES PRIMARIAS EN EL CICLO DE LA UREA	17
Capítulo 1. Deficiencia de Ornitina transcarbamilasa	18
Capítulo 2. Deficiencia de Argininosuccinato sintetasa o Citruinemia tipo I	33
Capítulo 3. Deficiencia de Argininosuccinato liasa	67
Consideraciones Finales Parte I	72
Parte II ALTERACIONES SECUNDARIAS EN EL CICLO DE LA UREA	77
Capítulo 4. Polimorfismos genéticos de Carbamilfosfato sintetasa	79
Capítulo 5. Protocolo de Citrulina oral	91
Referencias bibliográficas	117
Anexos	131



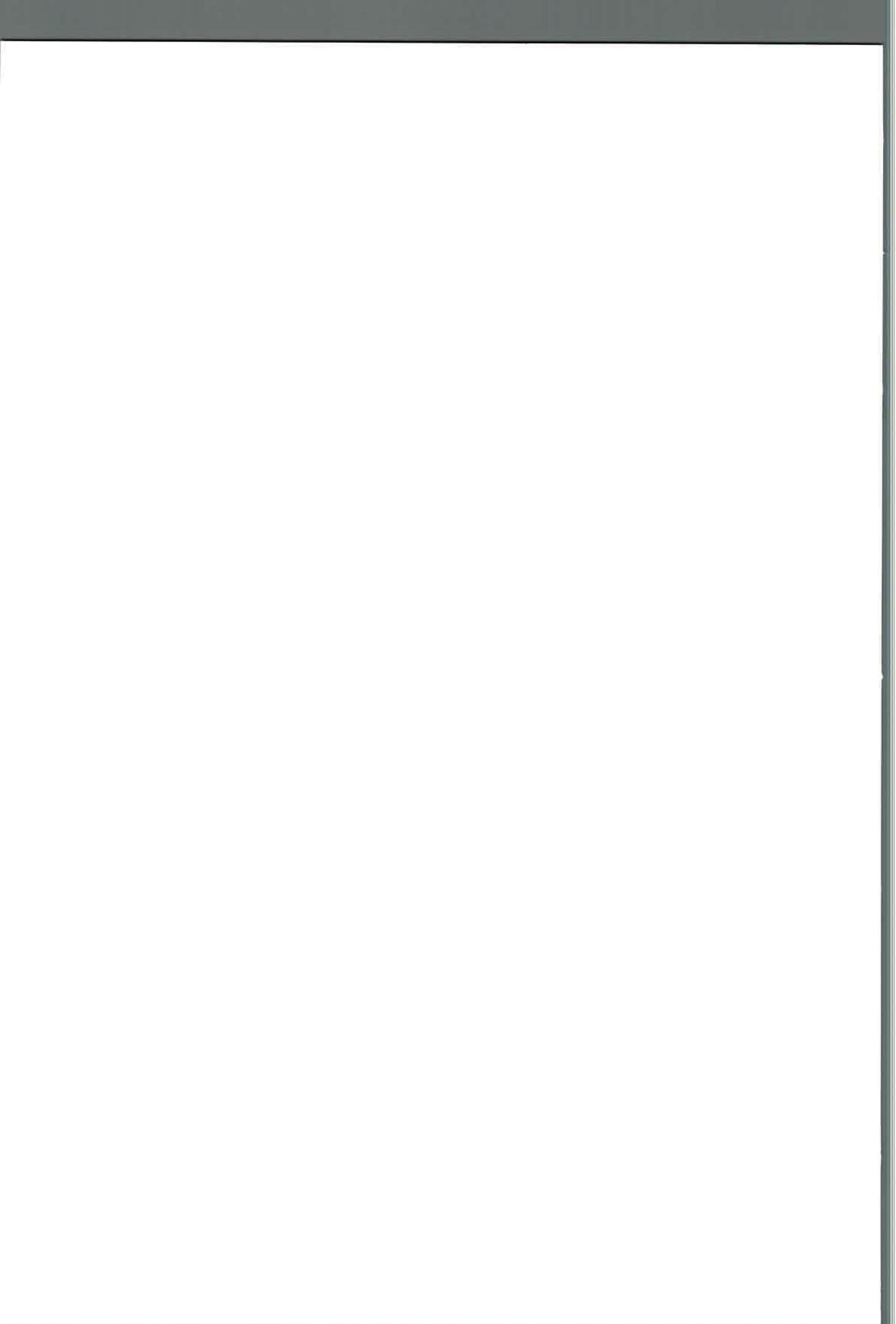
INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Algoritmo de hallazgos clínicos/bioquímicos en DCU	5
2	Amplificación de exones 7-8, gen OTC	24
3	Pacientes D-OTC diagnosticados en CEMECO	25
4	Valores medios ($\mu\text{mol/L}$) de metabolitos en pacientes D-OTC y valores de referencia	26
5	Análisis bioinformático de las mutaciones D-OTC	33
6	Amplificación del exón 15, gen ASS1	44
7	Amplificación del exón 3, gen ASS1	45
8	Pacientes CTLN1 diagnosticados en CEMECO	48
9	Valores promedio de metabolitos ($\mu\text{mol/L}$) en pacientes D-ASS y rango normal.	49
10	Test χ^2 de comparación de frecuencias T1405N- CPSI	53
11	Test χ^2 de comparación de frecuencias C677T-MTHFR	54
12	Test χ^2 de comparación de frecuencias 844ins68pb-CBS	54
13	Resultados de FSTAT y GenAIEx por locus y población	55
14	Test χ^2 de comparación de frecuencias T1405N- CPSI	56
15	Test χ^2 de comparación de frecuencias C677T-MTHFR.	56
16	Test χ^2 de comparación de frecuencias 844ins68pb-CBS	57
17	Índices calculados por departamento	59
18	Índices calculados por municipio dentro del departamento Gral. Pedernera	60
19	Resultados por circuitos electorales de la ciudad de Villa Mercedes	62
20	Distribución y frecuencias absolutas de los apellidos portadores	63
21	Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs7422339 obtenida de Hap map	81
22	Amplificación del exón 36, gen CPS1	84
23	Frecuencias alélicas y genotípicas de CPS1 T1405N en individuos HHci y N	86
24	Modelo dominante de herencia del polimorfismo T1405N en individuos HHci vs N	86
25	Influencia de CPS1 T1405N estratificado según el género en pacientes HHci	87
26	Frecuencias alélicas y genotípicas de T1405N- CPS1 en individuos DCUs y N	87
27	Coefficientes de correlación de los parámetros analizados	111

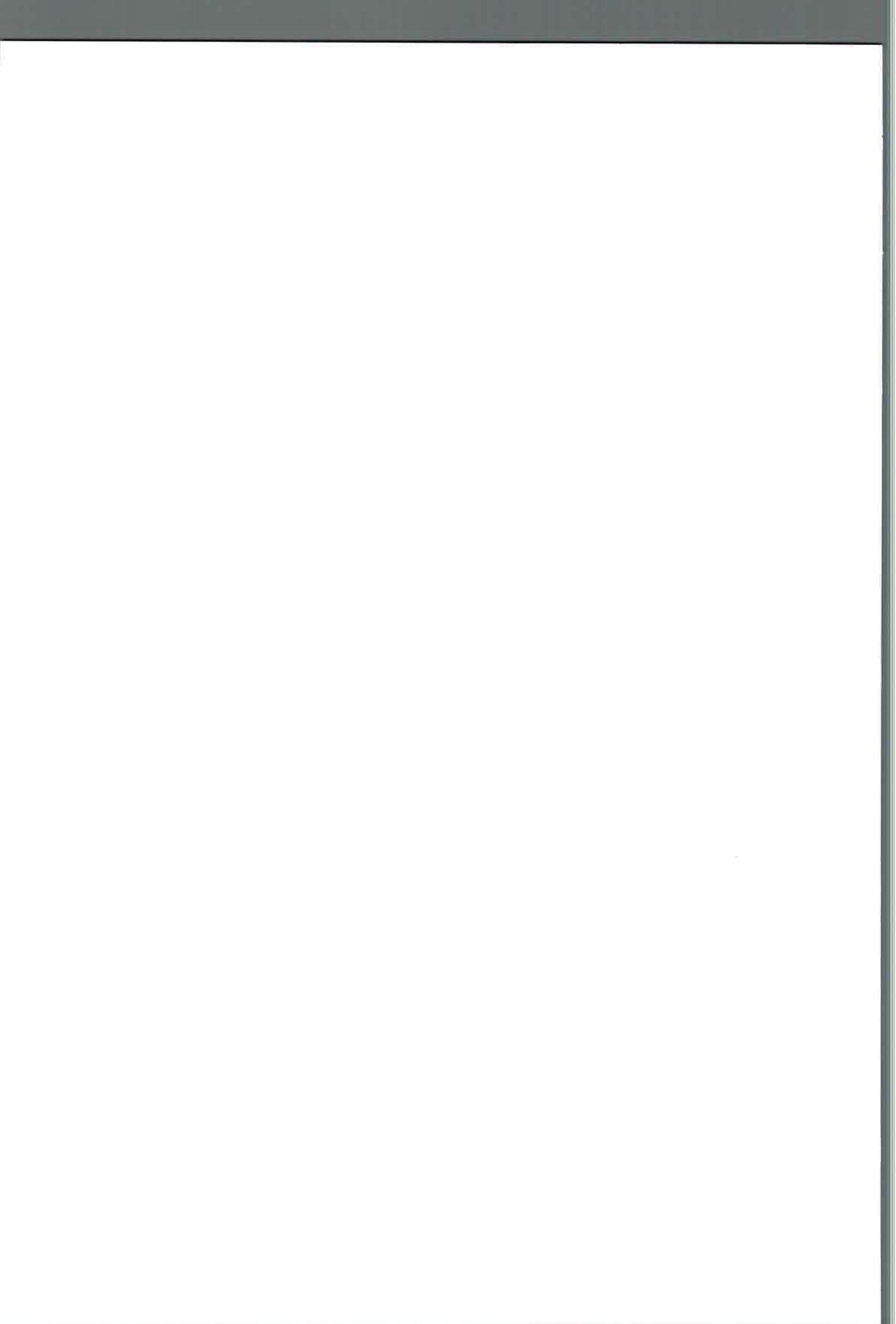


INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo de la Urea. Enzimas implicadas y vía de síntesis del óxido nítrico.	1
2	Secuencia de aminoácidos normal de la proteína OTC humana y mutaciones que provocan sustituciones aminoacídicas asociadas a deficiencia en OTC	20
3	Representación porcentual de manifestaciones clínicas de pacientes D-OTC	26
4	Secuencia aminoacídica normal OTC (arriba) y alterada por el cambio c.697delG (abajo)	28
5	Alineamiento múltiple realizado con CLUSTALW2	29
6	Interfase generada por el programa SIFT	30
7	Interfase de Polyphen para cada sustitución indicando la tolerancia de cada cambio en una posición específica	31
8	Salida del servidor web Popmusic-2.0, que corresponde a los residuos de la enzima OTC de <i>Homo sapiens</i>	32
9	Representación de mortalidad de pacientes D-OTC según forma de presentación y número de pacientes	34
10	Modelo ASS de <i>E.coli</i> con mutaciones halladas en <i>Homo sapiens</i>	35
11	Mapa linear del gen ASS con las mutaciones “missense” identificadas en sus respectivos exones	37
12	Actividad específica y desvío estándar del fenotipo wt y variantes de la ASS	38
13	Representación esquemática del cambio c.79T>C en la secuencia aminoacídica prevista	50
14	Secuencias obtenidas de un portador c.79T>C (p.Gln27*) y control normal	51
15	Árbol genealógico de las familias con la mutación p.G390R causal de CTLN1	52
16	Esquema de los valores medios Fst de los marcadores estudiados en parejas de la población de Villa Mercedes (Pop1) y la población control (Pop2)	55
17	Parentesco medio con intervalos de confianza del 95% calculado por “bootstrap” con GenAIEx	57
18	La provincia de San Luis en la geografía de Argentina	58
19	Circuitos electorales de la ciudad de Villa Mercedes	61
20	Interfase de resultados Polyphen prediciendo el daño de la mutación p.Arg146Trp-ASL	72
21	Base estructural de D-CPS1	80
22	Secuencias de ADN control	85
23	Mecanismo de acción del óxido nítrico en los cardiomiocitos	92
24	Concentraciones promedio de citrulina según tiempo de	99

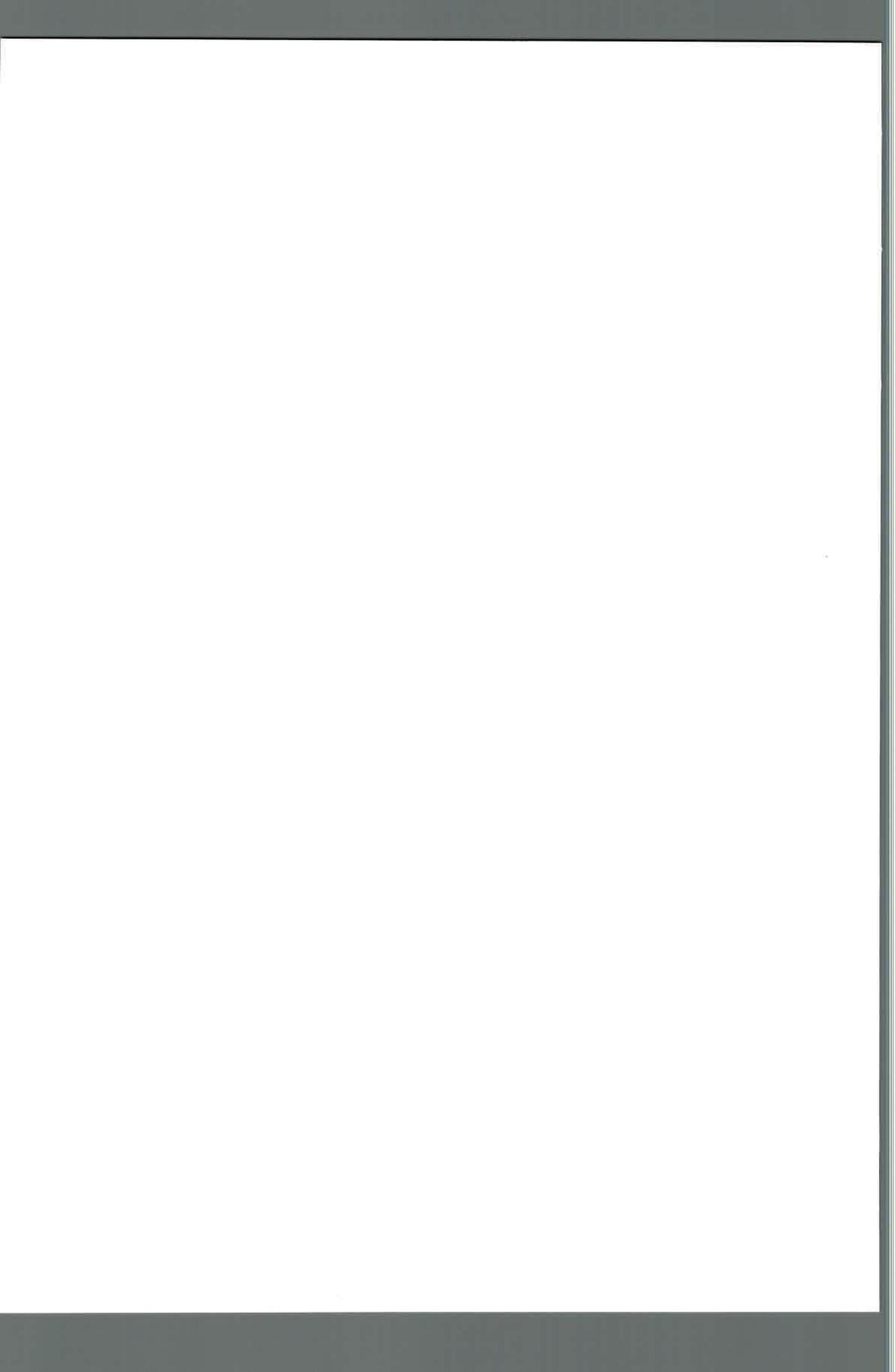


	determinación (0= preoperatorio, 1=postoperatorio, 2=12hs, 3=24hs) y tratamiento	
25	Concentraciones promedio de arginina según tiempo (0= preoperatorio, 1=postoperatorio, 2=12hs, 3=24hs) y tratamiento	101
26	Concentraciones promedio de arginina ajustadas por covariable arginina según tiempo postoperatorio y tratamiento	101
27	Concentraciones promedio de homocisteína según tiempo (0= preoperatorio, 1=postoperatorio, 2=12hs, 3=24hs) y tratamiento	102
28	Concentraciones promedio de homocisteína ajustadas por covariable homocisteína según tiempo postoperatorio y tratamiento	103
29	Concentraciones promedio de óxido nítrico ajustadas por covariable óxido nítrico según tiempo postoperatorio y tratamiento	104
30	Presión arterial pulmonar media según tiempo de determinación (0= preoperatorio, 1=postoperatorio, 2=12hs, 3=24hs) y tratamiento	105
31	Porcentaje de pacientes según pertenezcan a C1 o C2	106
32	Presión arterial sistémica media según tiempo (0= preoperatorio, 1=postoperatorio, 2=12hs, 3=24hs) y tratamiento	106
33	Porcentaje de pacientes según presenten o no del polimorfismo en cada grupo.	107
34	Presión arterial pulmonar media de cada genotipo según tiempo postoperatorio	108
35	Concentración media de citrulina de cada genotipo según tiempo postoperatorio	108
36	Concentración media de homocisteína de cada genotipo según tiempo postoperatorio.	109
37	Concentración media de óxido nítrico de cada genotipo según tiempo postoperatorio	109
38	Concentración media de arginina de cada genotipo según tiempo postoperatorio.	110
39	Concentraciones promedio de todos los metabolitos estudiados según tiempo (0= preoperatorio, 1=postoperatorio, 2=12hs, 3=24hs)	111
40	Concentración media de citrulina según tiempo del grupo tratado con citrulina oral de pacientes del presente protocolo, y pacientes del protocolo de Dr Smith (EEUU)	114
41	Presión arterial pulmonar media según tiempo del grupo tratado con citrulina oral de pacientes del presente protocolo, y pacientes del protocolo de Dr Smith (EEUU)	113



ABREVIATURAS

ADN: ácido deoxirribonucleico
ARG: arginasa
ARN: ácido ribonucleico
ASL: argininosuccinato liasa
ASS: argininosuccinato sintetasa
CAV: canal auriculoventricular
CBS: cistationina beta-sintasa
CE: células endoteliales
CIV: canal interventricular
CPS: carbamil fosfato sintetasa
CTLN1: citrulinemia tipo 1 o variante clásica
CU: ciclo de la urea
CUV: corazón univentricular
DCU: defectos del ciclo de la urea
EIM: error innato del metabolismo
HCl: homocisteína
HHci: hiperhomocisteinemia
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
INS: Isonimia al Azar no Sesgada
LCR: líquido cefalorraquídeo
MGM: medicina genética metabólica
MTHFR: metilentetrahidrofolato reductasa
NAGS: n-acetilglutamato sintasa
NOS: óxido nítrico sintasa
ON: óxido nítrico
OTC: ornitina transcarbamilasa
PCR: reacción en cadena de la ADN polimerasa
RMN: resonancia magnética nuclear
SNC: sistema nervioso central
SNP: polimorfismo de único nucleótido
SSCP: polimorfismo conformacional de cadena simple
VM: Villa Mercedes



RECURSOS FINANCIEROS PARA LA REALIZACIÓN DE LA TESIS

Beca Doctoral Cofinanciada Tipo I.

Ente Financiado: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Prov. de Córdoba (MINCYT) – 2011/2013.

Titular: Silvera Ruiz, Silene Maité.

Título: “Una investigación traslacional de los defectos genéticos en el ciclo de la urea en pacientes argentinos. Estudio de modelo paradigmático y variantes genéticas funcionales asociadas con una mayor susceptibilidad o la robustez frente a la enfermedad”.

Beca Doctoral Interna Tipo II.

Ente Financiado: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) – 2014/2016.

Titular: Silvera Ruiz, Silene Maité.

Título: “Una investigación traslacional de los defectos genéticos en el ciclo de la urea en pacientes argentinos. Estudio de modelo paradigmático y variantes genéticas funcionales asociadas con una mayor susceptibilidad o la robustez frente a la enfermedad”.

Subsidio PID año 2013 (n° 124/13)

Ente financiador: Secretaria de Ciencia y Tecnología, UNC.

Categoría: Proyecto categoría B - Investigación clínica

Director: Laura E Laróvere

Título: “Una investigación traslacional de defectos genéticos en el ciclo de la urea en pacientes argentinos. Modelo paradigmático del estudio de variantes genéticas y funcionales asociadas a mayor susceptibilidad o robustez frente a la enfermedad”.

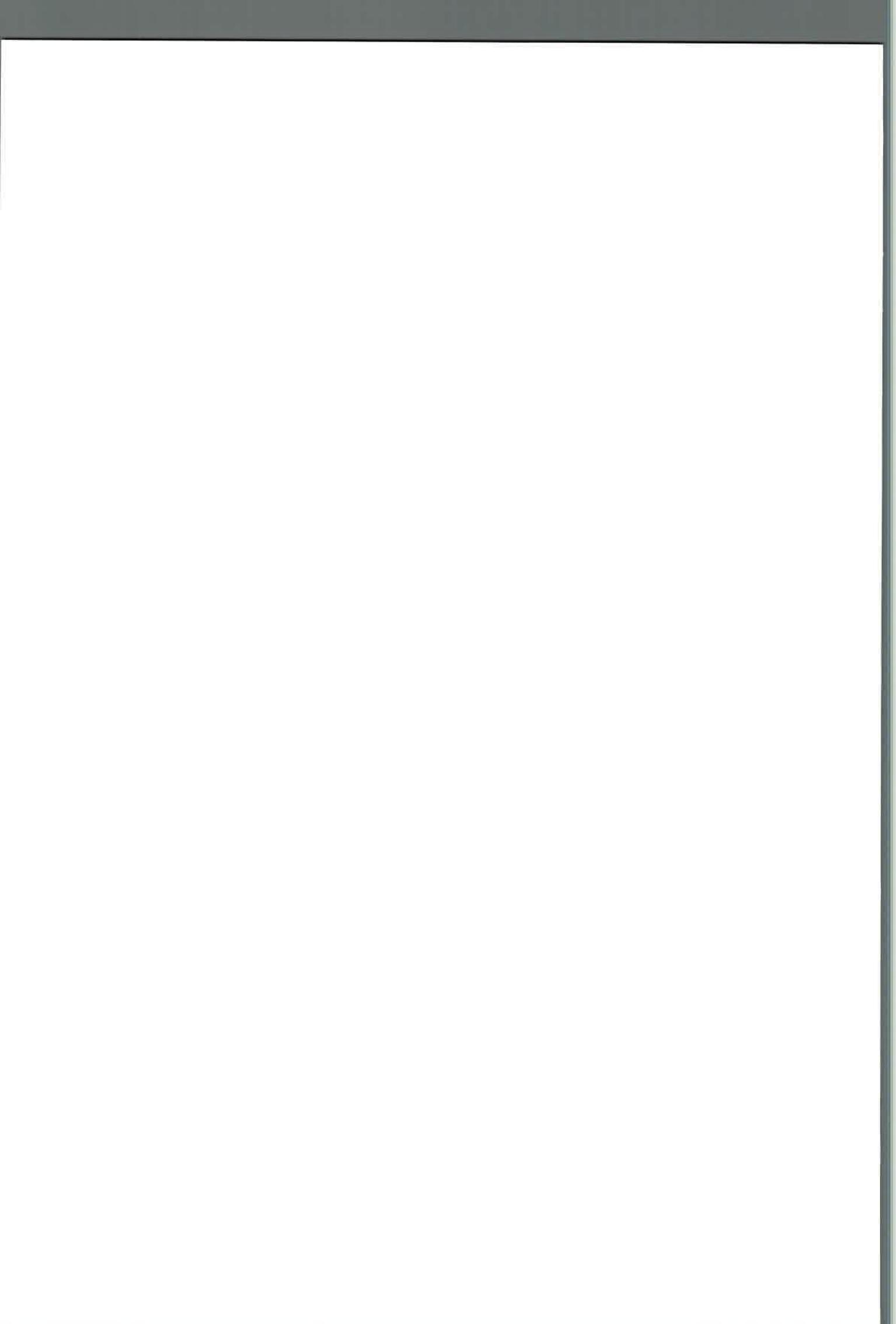
Subsidio PID año 2014 (n° 203/14)

Ente financiador: Secretaria de Ciencia y Tecnología, UNC.

Categoría: Proyecto categoría A - Investigación clínica

Director: Laura E Laróvere

Título: “DEFECTOS GENÉTICOS EN EL CICLO DE LA UREA EN PACIENTES ARGENTINOS. Correlación genotipo-fenotipo y asociación a otras variantes genéticas”.



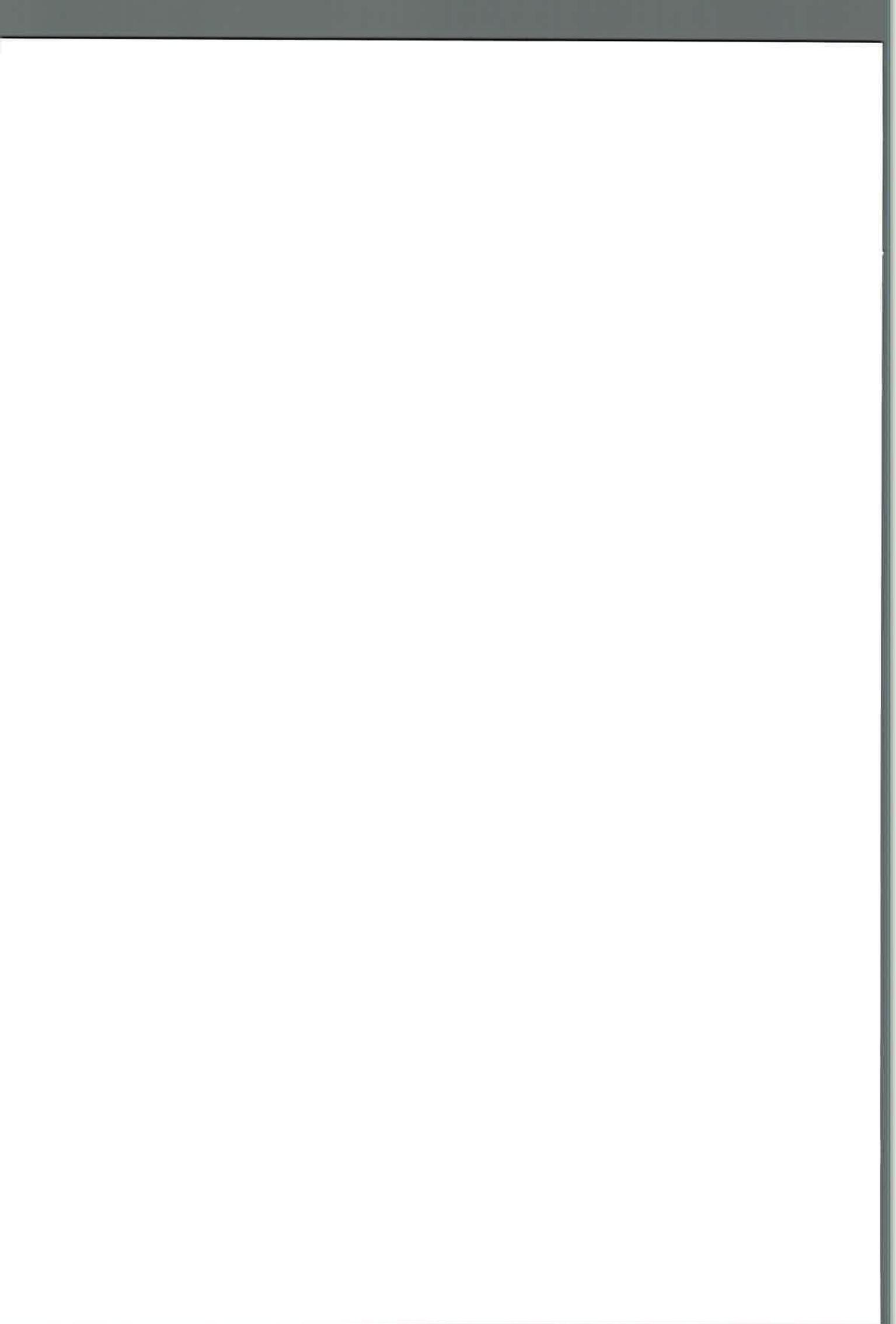
PRÓLOGO

La investigación clínica de las Enfermedades Metabólicas Hereditarias en nuestro medio tiene una larga experiencia, partiendo de lo inédito en nuestra comunidad y en el país, hasta llegar en la actualidad al reconocimiento y caracterización de decenas de estas patologías genéticas. Es decir, de “extraordinariamente raras” pasaron a una identificación exponencial que acredita el área como Medicina Genética Metabólica. En este contexto, uno de los capítulos que cobró relevancia por su prevalencia son los defectos genéticos del ciclo de la urea. Dos aspectos principales surgieron de nuestros trabajos previos: la seguridad en el diagnóstico, y por otra parte nuevos interrogantes e ideas provenientes de la casuística propia, ambos insertos en la proyección de la era post-genómica en la cual estamos inmersos en la actualidad.

Este momento ofrece la oportunidad de la investigación del “Fenoma”, considerado como la completa representación del fenotipo en los seres humanos. Ello requiere de un enorme y coordinado esfuerzo, local y foráneo, para la obtención de datos significativos y estandarizados (Cotton y cols., 2006). En consecuencia, se requiere la recolección de información del genotipo y fenotipo clínico y bioquímico de cada paciente para una mejor comprensión de su individualidad genética.

A partir de esta concepción, nuestro proyecto se ubica en lo que actualmente se denomina medicina traslacional (traduccional, traslativa), ella se refiere al vínculo que hay entre la investigación básica y el desarrollo tecnológico, y las aplicaciones clínicas. La hipótesis del trabajo aspira establecer un vínculo entre el laboratorio y el paciente. A partir de este concepto se aspira a que la medicina traslacional vincule las ciencias básicas con la disciplina clínica, aplicando en los pacientes los resultados de la ciencia, es decir, una investigación aplicada.

La incorporación de la tecnología adecuada, junto con el desarrollo de técnicas sensibles y específicas, significó la oportunidad de apertura del estudio en este campo de las Enfermedades Metabólicas. De esta forma, fue posible avanzar en el estudio de defectos primarios en el metabolismo del ciclo de la urea y ampliar la investigación hacia asociaciones a enfermedades de alta frecuencia, como el estudio de la hipertensión pulmonar. De allí se reconoce una aplicación traslacional inmediata preventiva a una población selectiva y numerosa como son los pacientes sometidos a cirugía cardíaca con riesgo de hipertensión pulmonar. Además se logró abordar la investigación de un polimorfismo en el metabolismo del ciclo de la urea, la identificación de factores genéticos asociados a la susceptibilidad a la enfermedad provee beneficios significativos



mediante la oportunidad de tratamiento y prevención del estado de enfermedad mediante la manipulación endógena y ambiental de un individuo genéticamente de riesgo.

Delineación de la Tesis

La presentación fue diseñada en cinco capítulos que se engloban en dos partes; defectos primarios y secundarios del Ciclo de la Urea.

Parte 1. Alteraciones primarias en el Ciclo de la Urea

Capítulo 1. Deficiencia de Ornitina transcarbamilasa

Capítulo 2. Deficiencia de Argininosuccinato sintetasa o citrulinemia tipo I

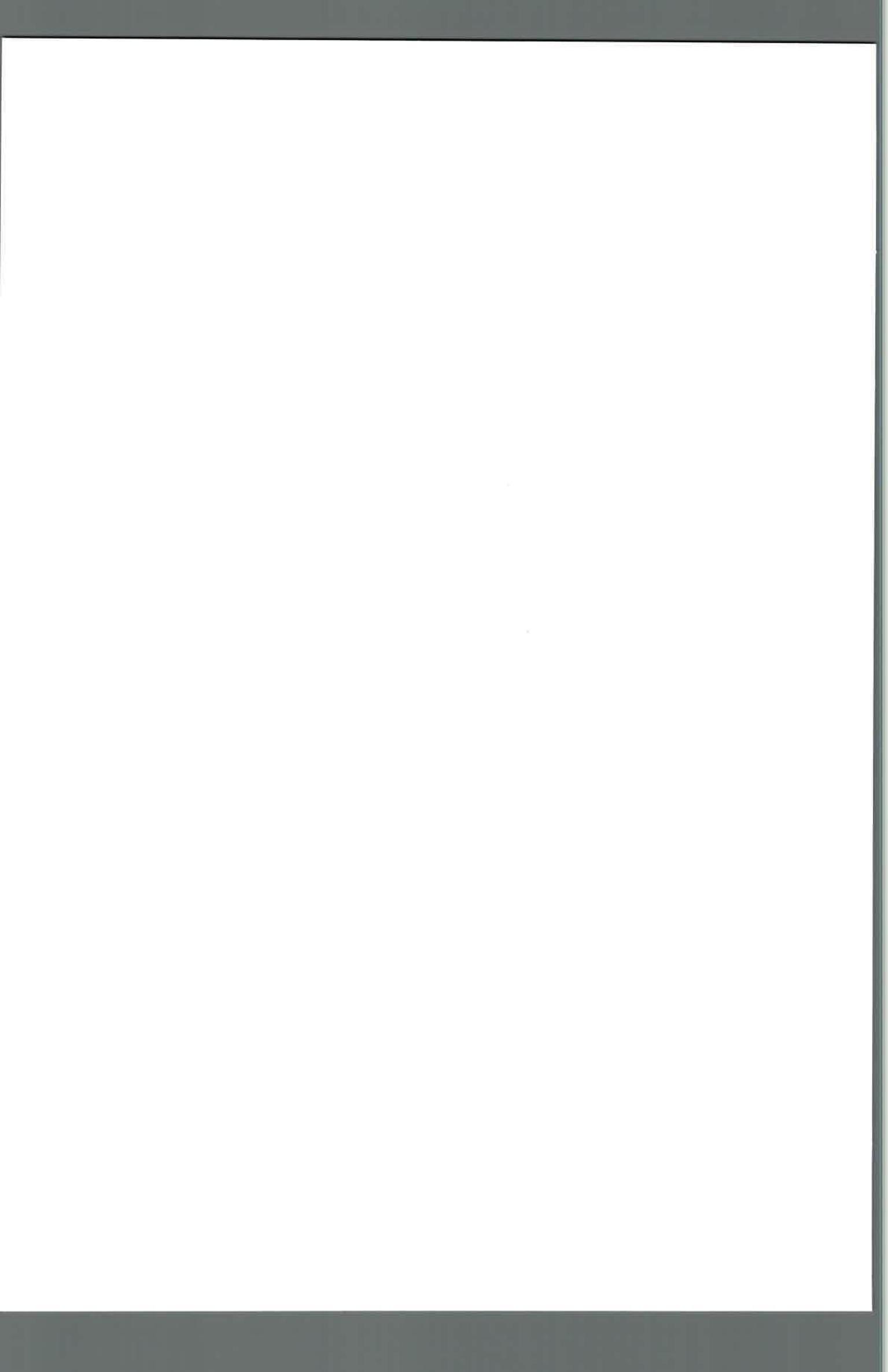
Capítulo 3. Deficiencia de Argininosuccinato liasa

Consideraciones Finales

Parte 2. Alteraciones secundarias en el Ciclo de la Urea

Capítulo 4. Polimorfismos genéticos de Carbamifosfato sintetasa

Capítulo 5. Protocolo de citrulina oral



OBJETIVOS

Generales

- Desarrollar un trabajo de investigación clínica-científica en el área de la Medicina Genética Metabólica, relacionado a los defectos genéticos en el ciclo de la urea.
- Aplicar un modelo de medicina traslacional como una interfase dinámica entre los conocimientos de investigación básica y la práctica clínica.

Específicos

- Ampliar y desarrollar nuevos tópicos en el protocolo de investigación en alteraciones primarias genéticas en el ciclo de la urea que permitan su exacta definición nosológica abarcando la caracterización fenotípica, bioquímica y molecular en pacientes argentinos.

Deficiencia de la Ornitina Transcarbamilasa (OTC). Herencia ligada al cromosoma X.

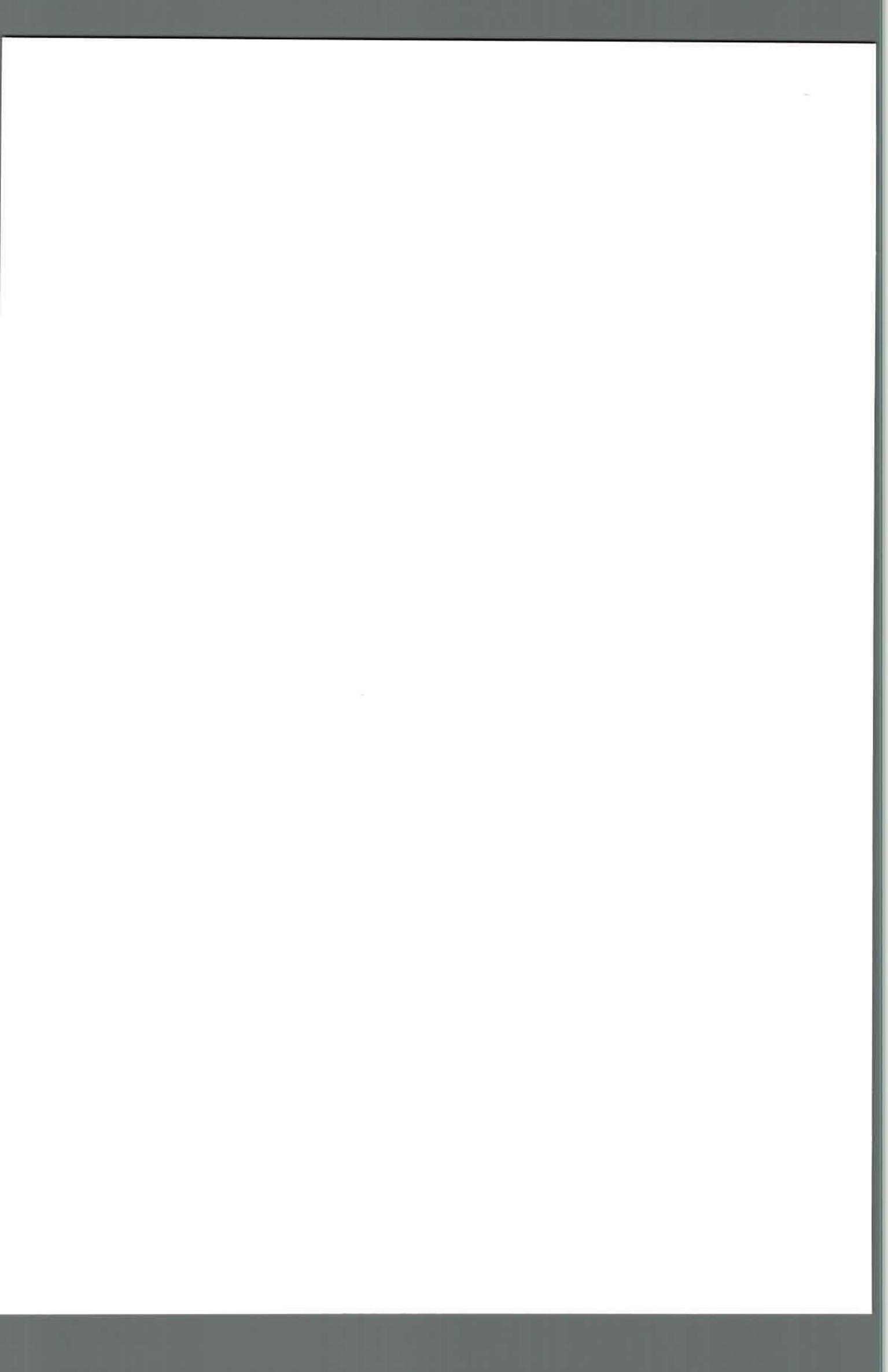
- Establecer la correlación entre el genotipo y fenotipo como edad de comienzo, compromiso del SNC, niveles de hiperamonemia y respuesta terapéutica, en pacientes argentinos tanto en los varones hemicigotos como en las mujeres portadoras (heterocigotas).

Citrulinemia Tipo I o Deficiencia de la Argininosuccinato sintetasa. Herencia autosómica recesiva.

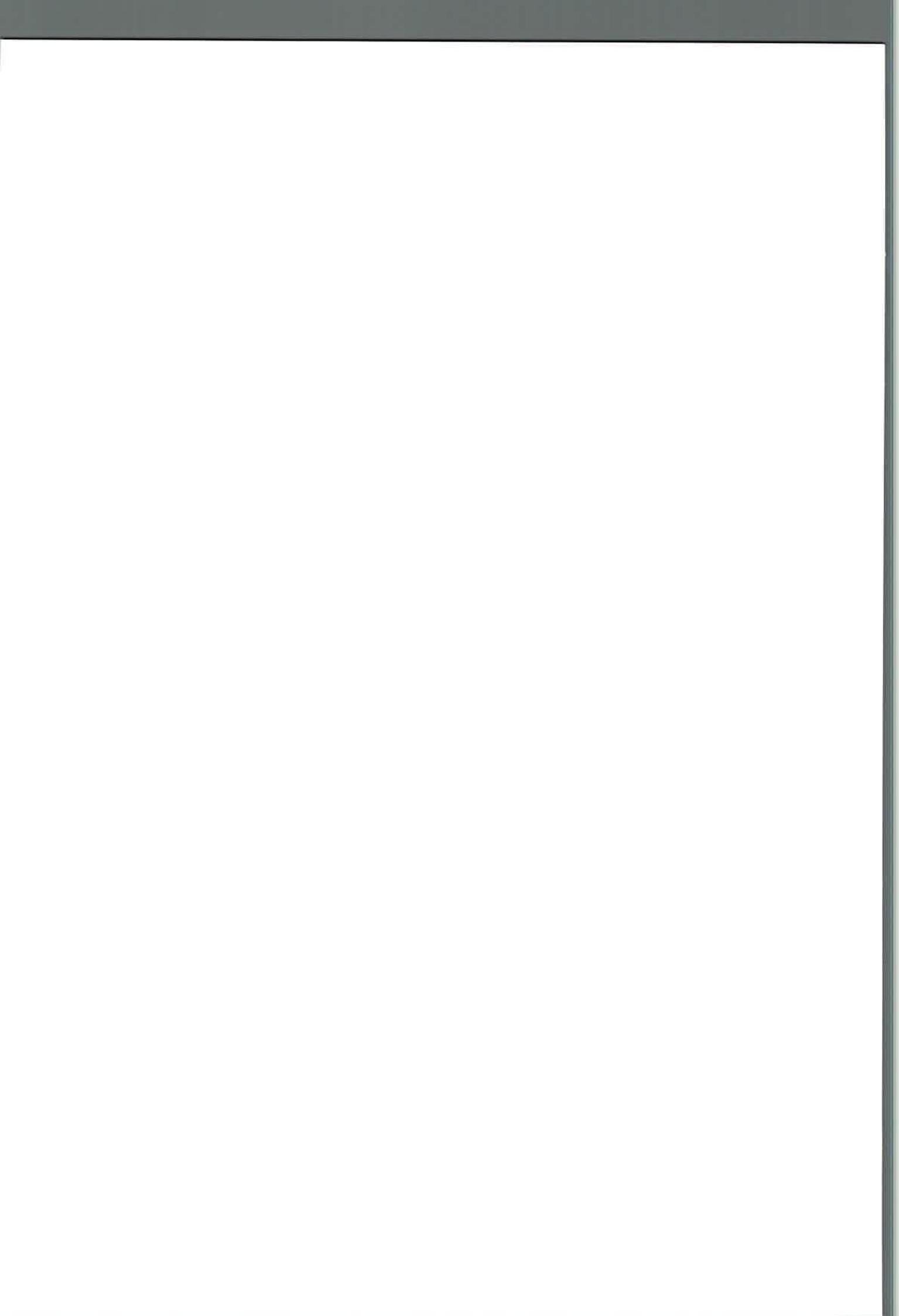
- Identificar, diagnosticar y caracterizar pacientes argentinos con Citrulinemia Tipo 1 y cumplimentar el análisis mutacional. Realizar la correlación genotípica con la forma de presentación observada en los pacientes.
- Investigar el grado de endogamia en la población de la Prov. de San Luis portadora de la mutación *ASS1*~p.G390R. Determinar la frecuencia de marcadores SNPs autosómicos a través de métodos moleculares y realizar el estudio de isonimia en la población de riesgo.

Deficiencia de la Argininosuccinato liasa (ASL). Herencia autosómica recesiva.

- Caracterizar pacientes argentinos con deficiencia en ASL y cumplimentar el análisis mutacional. Denotar aspectos diferenciables con descripciones foráneas.



- Estudiar la correlación entre el polimorfismo T1406N en el gen *CPS1* y la susceptibilidad/robustez frente a ciertas condiciones patológicas frecuentes en nuestra población, en defectos primarios y secundarios del ciclo de la urea.
- Realizar la primera validación argentina del uso terapéutico de la citrulina oral como herramienta segura y de bajo costo en la prevención de la hipertensión pulmonar en el post-operatorio de cirugías cardíacas congénitas.



INTRODUCCIÓN GENERAL

La Medicina Genética Metabólica (MGM) abarca un amplio grupo de patologías de base hereditaria, área de alto impacto no sólo por su incidencia relativamente elevada sino por el tipo de problemas que producen, caracterizándose la mayoría por comprometer la calidad de vida de los pacientes, debido a una grave discapacidad intelectual y física.

El presente proyecto pretende abordar nuevos aspectos de un capítulo de la MGM de alta prevalencia en nuestro medio: las alteraciones genéticas en el ciclo de la urea. Mediante este ciclo, se convierte el nitrógeno derivado de la ingesta de proteínas de la dieta y de la degradación de proteínas endógenas en urea, que es soluble en agua y fácilmente excretado del cuerpo a través de los riñones; siendo la única vía metabólica capaz de la eliminación de exceso de nitrógeno. Las enzimas involucradas en el ciclo son: carbamilfosfato sintetasa 1 (CPS1, OMIM 237300), ornitina transcarbamilasa (OTC, OMIM 311250), argininosuccinato sintetasa (ASS1, OMIM 215700), argininosuccinato liasa (ASL, OMIM 207900), y arginasa 1 (ARG1, OMIM 207800). Una enzima adicional, la N-acetilglutamato sintetasa (NAGS) provee el carbamilfosfato como cofactor esencial (Figura 1). El normal funcionamiento del ciclo de la urea también depende de dos transportadores, ornitina traslocasa y citrina, anomalías en estos pueden presentarse con hiperamonemia. Los genes que codifican para estas enzimas siguen un patrón de herencia autosómico recesivo, con excepción de la ornitina carbamiltransferasa, cuyo gen se ubica en el cromosoma X con un patrón de herencia ligada al sexo.

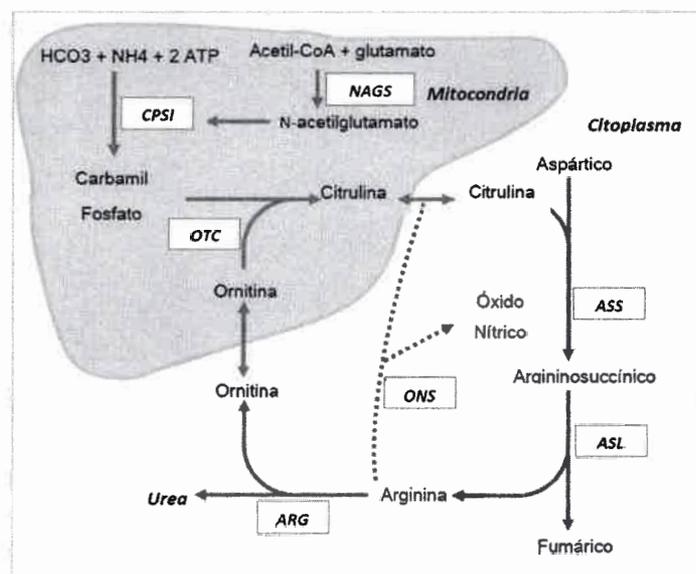


Figura 1. Ciclo de la Urea. Enzimas implicadas y vía de síntesis del óxido nítrico. NAGS: N-acetilglutamato sintetasa; CPS1: Carbamilfosfato sintetasa; OTC: Ornitina transcarbamilasa; ASL: argininosuccinato liasa; ARG: arginasa; ONS: óxido nítrico sintetasa.

ALTERACIONES PRIMARIAS

Las alteraciones en estructura/función de cualquiera de las enzimas tanto citoplasmáticas como mitocondriales en este metabolismo se denominan colectivamente como defectos del ciclo de la urea (DCU). Las deficiencias en los primeros cuatro pasos del ciclo se caracterizan por presentarse con crisis hiperamonémicas severas (Summar, 2005).

Los recién nacidos con DCU son asintomáticos en las primeras 24-48 hs, esto se debe a que en el útero la placenta compensa la deficiencia enzimática y permite el catabolismo de proteínas endógenas; al nacer, la ingesta de proteínas a través de la alimentación contribuye al inicio de las manifestaciones de la enfermedad. Los síntomas iniciales incluyen somnolencia y rechazo al alimento, y por lo general son seguidos por vómitos, letargo y coma. Las formas tardías se manifiestan con vómitos, elevación idiopática de las transaminasas, ataxia, trastornos de la conducta, rechazo al alimento, alucinaciones (Brusilow y col., 2001).

La gravedad del DCU está influenciada tanto la posición de la enzima defectuosa en el ciclo como por la gravedad del defecto enzimático; así es de esperar que las deficiencias en las enzimas finales del ciclo presenten manifestaciones más leves que las que inician el ciclo, y a su vez, mutaciones en los sitios claves para el funcionamiento proteico provoquen cuadros más graves en cualquiera de las enzimas del ciclo (Figura 1).

La **deficiencia enzimática grave** o la ausencia total de actividad de cualquiera de las primeras cuatro enzimas en la ruta (CPS1, OTC, ASS1, y ASL) o el cofactor (NAGS) resulta en la acumulación de amonio y otros metabolitos precursores durante los primeros días de vida.

Debido a que no existe un sistema secundario efectivo para la conversión de amonio, la interrupción completa de esta ruta resulta en una rápida acumulación de amonio y el desarrollo de los síntomas relacionados anteriormente mencionados. Los pacientes con defectos completos normalmente se manifiestan en el período neonatal, cuando la inmadurez del hígado acentúa los defectos en las enzimas del ciclo de la urea (Pearson y col., 2001; Summar y Tuchman, 2001). Los niños con defectos del ciclo parecen normales al nacer, pero desarrollan rápidamente letargo, anorexia, hiper o hipoventilación, hipotermia, convulsiones, posturas neurológicas, edema cerebral y coma.

La postura anormal y la encefalopatía están relacionadas con el grado de inflamación del sistema nervioso central y la presión sobre el tronco cerebral (Summar, 2001). Alrededor del 50% de los recién nacidos con hiperamonemia severa pueden tener convulsiones, algunos sin

manifestaciones clínicas previas evidentes. Los individuos con suturas craneales cerradas están en mayor riesgo de sufrir un rápido deterioro neurológico debido al edema cerebral que resulta de la elevación del amonio. La hiperventilación secundaria es un hallazgo inicial común en los ataques de hiperamonemia, resultando en alcalosis respiratoria. Esto se continúa con hipoventilación y paro respiratorio a medida que aumenta la presión en el tallo cerebral. La severidad de las secuelas neurológicas es variable y se correlaciona con la duración de la crisis hiperamonémica inicial.

Con la rápida identificación de los síntomas clínicos neonatales y las estrategias actuales de tratamiento, la supervivencia de los recién nacidos con hiperamonemia ha mejorado extraordinariamente en las últimas décadas (Summar, 2001; Summar y col., 2001; Enns y col., 2007; Summar y col., 2008; Tuchman y col., 2008; Krivitzy y col., 2009; Posset y col., 2016).

En **deficiencias enzimáticas más leves** (o parciales) del ciclo de urea, la acumulación de amonio puede ser provocada por enfermedad o estrés en casi cualquier momento de la vida, dando lugar a elevaciones leves de la concentración de amonio en plasma. La hiperamonemia es típicamente menos severa y los síntomas más sutiles que la presentación neonatal de DCU. En los individuos con deficiencia enzimática parcial, el primer episodio clínico reconocido se puede retrasar durante meses o años. Aunque las anormalidades clínicas varían dependiendo del trastorno específico del ciclo, en la mayor parte de los casos el episodio hiperamonémico se caracteriza por pérdida de apetito, vómitos, letargo, y anormalidades en la conducta. Pueden producirse trastornos del sueño, delirios, alucinaciones y psicosis. Un patrón de encefalopatía EEG se puede observar en la hiperamonemia y la atrofia cerebral específica puede verse posteriormente en la RMN.

Los defectos en la enzima final de la ruta (ARG) causa hiperargininemia, un trastorno más leve que implica síntomas neurológicos; sin embargo, se ha comunicado raramente hiperamonemia neonatal.

Aspectos neurológicos de DCU

La hiperamonemia provoca daños irreversibles en el desarrollo del sistema nervioso central: atrofia cortical, dilatación ventricular y desmielinización; conduciendo al deterioro cognitivo, convulsiones y parálisis cerebral. El cerebro es mucho más susceptible a los efectos nocivos del amonio en la infancia que en la edad adulta. Estudios recientes muestran que la exposición al amonio altera varias vías de aminoácidos y neurotransmisores, al metabolismo

energético cerebral, síntesis de óxido nítrico, estrés oxidativo y vías de transducción de señales (Natesan y col., 2016). A nivel celular, estos mecanismos están asociados con alteraciones en los patrones de diferenciación y muerte celular neuronal (Braissant y col., 2013). El amonio puede causar daño cerebral a través de una variedad de mecanismos propuestos, siendo el edema cerebral un componente importante. Las funciones específicas del amonio, glutamato y glutamina en el edema cerebral están todavía bajo investigación, pero se cree que afecta el sistema de acuaporinas, el agua y la homeostasis de potasio en el cerebro (Lichter-Konecki, 2008; Lichter y col., 2008; Albrecht y col., 2010).

Los daños ocasionados por hiperamonemia aguda en la infancia se asemejan a la observada en los eventos hipóxico-isquémica o ictus. Los infartos lacunares y la interrupción de materia blanca son hallazgos comunes. La hiperamonemia crónica puede interrumpir gradientes de iones y neurotransmisores, el transporte de metabolitos, la función mitocondrial, y la relación de afa-cetogluturato/glutamato/glutamina.

Las personas con deficiencia de OTC de inicio tardío, que tradicionalmente se han considerado intelectualmente normales, muestran a menudo alteraciones de los circuitos neuronales mediante RMN al realizar tareas que requieren trabajo de memoria y atención.

Alteraciones bioquímicas de los trastornos del ciclo de la urea. Diagnóstico diferencial.

Como se ha mencionado previamente, la consecuencia de un bloqueo o disfuncionalidad en el ciclo de la urea, como en cualquier otra vía metabólica, es una alteración de las concentraciones de compuestos intermediarios de la vía. La alteración de la ureagénesis, tanto por enzimopatías del ciclo de la urea como por otras causas secundarias que interfieren en este proceso, provoca una hiperamonemia. Es importante el *diagnóstico bioquímico diferencial* de las alteraciones causantes de hiperamonemia ya que éste no puede realizarse desde el punto de vista clínico por la gravedad de la hiperamonemia, sino únicamente en función de los metabolitos acumulados o excretados en fluidos biológicos antes del tratamiento, así como también en caso de ser factible el dosaje enzimático. El análisis de metabolitos se puede llevar a cabo rápidamente, evita la realización de biopsias hepáticas (necesarias para el dosaje enzimático en DCU), que pueden ser fatales en pacientes con hiperamonemias graves, y permite la instauración del tratamiento específico que dependerá del proceso desencadenante de la hiperamonemia (Campistol, 1997; Vilaseca, 1998).

Como primera instancia para reconocer un DCU con sospecha clínica se realiza una determinación de amonio, este metabolito es el principal desencadenante de las manifestaciones clínicas observadas. En una segunda instancia se emplea orina para la determinación de ácido orótico; la mayoría de los DCU se caracterizan por presentar, una importante excreción de ácido orótico en orina. Esta interrelación metabólica es consecuencia del acúmulo de carbamilfosfato intramitocondrial, que difunde al citosol e ingresa a la síntesis *de novo* de las pirimidinas, aumentando los niveles de ácido orótico urinario en cantidades comparables a las encontradas en la aciduria orótica hereditaria, aunque con fenotipos clínicos distinguibles. Mediante el estudio de las concentraciones plasmáticas de citrulina, arginina, argininosuccínico y glutamina es posible conocer en qué paso de la vía se encuentra la obstrucción o deficiencia enzimática por acumulación de estos compuestos intermedios, y finalmente se realiza la determinación de metabolitos del óxido nítrico (ON) con el objeto de inferir cómo se ve afectada la vía de generación de ON por alteraciones en el CU (Tabla 1).

Tabla 1. Algoritmo de hallazgos clínicos/bioquímicos en DCU.

Defecto enzimático	Presentación clínica		Metabolitos Característicos		Herencia
	Neonatal	Tardía	Sangre	Orina	
NAGS	-	+	↑NH ₃	-	AR?
CPS	+++	+	↑NH ₃ ,GLN,LYS ↓CTR,ARG,ORN	-	AR
OTC	+++	+++	↑NH ₃ ,GLN,LYS ↓CTR,ARG,ORN	↑Ororato	Ligada al X
ASS	++	+	↑NH ₃ ,GTR,GLN,LYS ↓ARG	↑CTR, ↑Ororato	AR
ASL	++	++	↑NH ₃ ,ASS,GLN,LYS ↓ARG	↑ASS, ↑Ororato?	AR
ARG	+	++	↑NH ₃ ,ARG	↑ARG, ↑Ororato?	AR

NAGS: N-acetilglutamato sintetasa; CPS: carbamilfosfato sintetasa; OTC: ornitina transcarbamilasa; ASS: argininosuccinato sintetasa; ASL: argininosuccinato liasa; ARG: arginasa.

Terapéutica de los defectos en el ciclo de la urea

Respecto a la terapia de los DCU, se ha demostrado en diversas situaciones un grado de eficiencia variable. La terapéutica se basa en la administración de arginina suplementaria y la utilización de quelantes del amonio como el benzoato de sodio, fenilbutirato o fenilacetato en las crisis hiperamonémicas de los pacientes afectados (Enns y col., 2007). Así mismo, en base a experiencias previas se recomienda la utilización de hemodiálisis o diálisis peritoneal cuando los valores de amonio superan los 350 $\mu\text{mol/l}$ o al observar un incremento mayor a 100 $\mu\text{mol/l}$ cada

2-3 horas (Mathias y col., 2001). El trasplante hepático en pacientes es de aplicación excepcional en formas neonatales con DCU. En los sobrevivientes o en variantes tardías se debe tomar además, el recaudo de un manejo dietético con limitación proteica y adecuado aporte calórico a modo de evitar el catabolismo endógeno debido a una dishomeostasis provocada por la disfunción de los compuestos tóxicos (Thoene, 2008).

Grupos poblacionales de riesgo

Desde la perspectiva de la Genética Médica, las cepas genéticas suelen ser pequeñas subpoblaciones que se originaron a partir de un pequeño número de individuos, con una larga historia de aislamiento cultural y geográfico, alto grado de endogamia, y donde se puede detectar una alta frecuencia de individuos afectados por enfermedades mendelianas raras recesivas y poco frecuentes (Boattini y col., 2011). Por esta razón, los aislamientos poblacionales se han utilizado ampliamente como una herramienta para el mapeo y clonación de genes de la enfermedad y para el estudio de la genética de rasgos complejos (Arcos Burgos y Muenke, 2002; Peltonen y col., 2000). Siguiendo la filosofía de la genética de la comunidad y de la salud pública, la identificación geográfica de la población aislada representa una prioridad (Bittles, 2001; Ten Kate y col., 2010).

En Argentina, se han identificado algunos aislados genéticos donde se han detectado diferentes enfermedades autosómicas recesivas (De la Fuente y col., 1993; Castilla y Sod, 1990; Castilla y Adams y col., 1990, Kremer y col., 1985). Muchos de ellos están situados en el norte del país, precisamente donde existen altos grados de endogamia. La localización geográfica de los aislamientos genéticos en la Argentina en los grupos con alta consanguinidad al azar pone de relieve la utilidad de este enfoque en la identificación de cepas con reducida heterogeneidad genética y reducción del tamaño efectivo de la población. Desde la aparición de las enfermedades raras es común su identificación en algunos aislados, así como la selección de poblaciones candidatas a ser estudiadas molecularmente (Leutenegger y col., 2011), destacando la gran relevancia de la atención sanitaria en estos lugares.

ALTERACIONES SECUNDARIAS

Además de la función clave del metabolismo del amonio, el ciclo de la urea es responsable de la síntesis *de novo* de la arginina, generada por la acción de la enzima ASL, la cual forma urea y ornitina. Sin embargo, existen otras vías que puede seguir este intermediario: producción de proteínas o precursor del ON, uniendo el ciclo de la urea, con la síntesis de ON (Figura 1). Variaciones en la disponibilidad de arginina debido a alteraciones en el ciclo de la urea afectan por ende la producción de ON.

El ciclo de la urea y del ON juegan un rol importante en la compleja red bioquímica y fisiológica de reacciones, con diversas funciones como son la eliminación de residuos de nitrógeno, generación de productos intermedios y de ON. A pesar de sus diferentes funciones, ambas vías comparten dos enzimas: ASS y ASL, y el transportador citrina. Estas enzimas tienen expresión génica diferencial en diferentes tejidos y, mediante la co-expresión de sus transcritos es que se cumple la función específica en el tejido que la expresa (Neill y col., 2009).

El abordaje de las alteraciones secundarias en el ciclo de la urea se encuentra inserto en lo que se denomina Proyecto Fenoma Humano. Con la finalización del proyecto genoma humano y la rápida acumulación de nueva información sobre las variaciones en el código genético (Scriver, 2004), se abordó la investigación de las interacciones entre diferencias genéticas y medio ambiente. Como objeto de estudio, ha sido desarrollado el concepto de expresión génica determinada ambientalmente (EDGE) para proporcionar un marco que considere ambos elementos, estadística y funcionalmente. EDGE se puede resumir en los siguientes enunciados: 1) las diferencias genéticamente codificadas en las proteínas expresadas reaccionan de manera diferente bajo condiciones ambientales extremas, 2) el fenotipo o patología resultante se determina a través de una combinación de la magnitud funcional del cambio genético y la severidad del estímulo ambiental, 3) los raros desórdenes genéticos representan un extremo, resultando en un fenotipo, mientras que las condiciones ambientales extremas representan el otro, y 4) la mayoría de las enfermedades se encuentran entre estos dos extremos (Summar y col., 2004).

Un excelente modelo para el aplicar este concepto son los polimorfismos y mutaciones en genes involucrados en el ciclo de la urea. El efecto de estos cambios en los intermediarios del ciclo y la formación de ON modifican un gran número de sistemas fisiológicos. Esta idea de interacción genético-ambiental no es nueva. Sin embargo, con el concepto EDGE podemos comenzar a definir modelos para los ejes de la ecuación. De esta manera se esperaría mejorar la

capacidad de predecir en qué momento un individuo cruzaría umbral del fenotipo. Cada eje desarrollará múltiples variables como las interacciones entre diferentes genes y riesgos ambientales. El desarrollo de este concepto permitirá identificar factores importantes en la clínica y permitirá la anticipación del tratamiento en individuos de alto riesgo.

Dentro del ciclo de la urea mutaciones en el gen que codifica la enzima que cataliza el paso limitante del metabolismo, CPSI, constituye un excelente ejemplo de este concepto. La deficiencia clásica de CPSI se expresa sin actividad enzimática, e invariablemente se presenta con una hiperamonemia en el período de neonatal, con poco efecto del medio ambiente. En cambio en la deficiencia parcial de la enzima pueden pasar décadas antes de que un paciente con actividad enzimática residual finalmente se enfrente a un estímulo ambiental que supere su capacidad marginal de generación de urea, resultando en un episodio hiperamonémico.

Los polimorfismos funcionales no pueden dar lugar a hiperamonemia, pero en su lugar afectan la producción de intermediarios metabólicos durante períodos clave de necesidad de los mismos. Bajo presión, la escasez de estas moléculas precursoras podría desacoplar la ONS de la generación de ON. Además de una escasez de ON, la enzima continuará consumiendo ATP y generará los radicales libres que resultan en un daño mayor. Como enzima limitante del ciclo de la urea, los cambios funcionales en CPSI tendrían el mayor impacto en la función del ciclo frente al estrés ambiental (Summar y col., 2004).

Existen variantes génicas (polimorfismos) en este ciclo asociadas a varias condiciones médicas relacionadas al metabolismo del ON. Un ejemplo de ello es la sustitución T1405N (rs7422339) del gen CPS1 que codifica el cambio de asparagina por treonina en la región crítica para la unión de N-acetil-glutamato resultando en un incremento del 20-30% en su actividad enzimática. Se ha demostrado que esta variación puede influir en las concentraciones de metabolitos de ON y la vasodilatación después de la estimulación agonista (Summar y col., 2004). Por otra parte, la misma variante se ha asociado con riesgo de hipertensión pulmonar en el recién nacido (Pearson y col., 2001), así como el riesgo de enfermedad veno-oclusiva después de trasplante de médula ósea (Summar y col., 1999). Curiosamente, el óxido nitroso inactiva irreversiblemente la enzima citosólica mediante la oxidación de la metionina sintetasa unido a la enzima vitamina B12 (Deacon y col., 1978). La metionina sintetasa es una enzima dependiente de la vitamina B12 que cataliza la síntesis de metionina y tetrahidrofolato a partir de homocisteína y metiltetrahidrofolato (MeTHF), esta vía es denominada de transmetilación. De

acuerdo con esta vía, los seres humanos y animales de laboratorio sometidos al óxido nítrico tienen niveles elevados de homocisteína plasmática (Waclawik y col., 2003).

Estos datos indican que las variantes funcionales del ciclo de la urea son significativas no sólo dentro del ciclo sino también por su capacidad de afectar otros sistemas fisiológicos (Mitchell y col., 2009). Así es que se ha demostrado que los precursores del ON endógeno, citrulina y L-arginina, disminuyen su concentración en el período postoperatorio del bypass cardiopulmonar por una disfunción endotelial pulmonar (Moncada y col., 1993; Pearson y col., 2001). El suplemento de citrulina oral en el período perioperatorio reduciría el riesgo de hipertensión pulmonar en esta cirugía (Barr y col., 2003; Schultze Neick y col., 1999).

METODOS

En esta sección se detallan las técnicas empleadas para el estudio de las alteraciones del ciclo de la urea y que permiten el diagnóstico bioquímico diferencial de cada entidad, la determinación del defecto molecular y pronosticar la evolución clínica del paciente; así como para estudiar la funcionalidad del ciclo en condiciones de estrés como sucede en las alteraciones secundarias del mismo.

Técnicas empleadas para el análisis bioquímico

A continuación se enumeran las cuatro técnicas empleadas para la determinación de metabolitos intermediarios mediante cromatografía líquida y espectrofotometría.

1. Determinación de aminoácidos (aa) plasmáticos y urinarios. Mediante Cromatografía líquida de alta performance (HPLC) según la técnica de Blau y col. (2008). Para este procedimiento se utilizan testigos comerciales de los metabolitos característicos del ciclo de la urea: arginina, citrulina y argininosuccínico. Los solventes utilizados para las corridas cromatográficas son grado HPLC.

Preparación de la muestra biológica: Se mezcla 50 µl de plasma con igual volumen de acetonitrilo para permitir su desproteinización. Se centrifuga a 13000 rpm durante 10 min. A 10 µl del sobrenadante se añaden 70 µl de buffer borato pH: 8,8, seguido de 20 µl del derivatizante AccQ taq (Waters) y se incuba por 10 min a 55°C en baño de arena. Una alícuota de 10 µl es utilizada para la inyección.

Condiciones cromatográficas: El análisis se realiza en un HPLC Hewlett Packard Serie 1100, con autoinyector y detector de fluorescencia Hewlett Packard modelo 1046A. Para la separación de los distintos aminoácidos se utiliza una columna de fase reversa analítica (Nova-Pak C18, 4 µm, 150 x 3,9 mm) termostaticada a 37°C. Las muestras se eluyen de la columna a flujo 1 ml/min utilizando las siguientes fases móviles: A: Buffer A Waters AccQ taq (Acetato de Sodio 0,2 mol/L, Trietilamina pH: 5,06); B: acetonitrilo grado HPLC y C: agua.

Las intensidades de fluorescencia se miden con una excitación de 250 nm y una emisión de 395 nm. Con estas condiciones cromatográficas se detectan los siguientes aminoácidos: Asp, Ser, Glu, Gly, His, Thr, Arg, Ala, Cit, Pro, Cys, Tyr, Val, Met, Lys, Ileu, Leu y Phe en 33 min, con un tiempo cromatográfico total de 53 min. La identificación de los compuestos se establece según los tiempos de retención en la columna de los testigos puros de cada metabolito.

Cuantificación: Para la calibración se realiza una curva de concentraciones de 100, 50, 25 y 10 $\mu\text{mol/L}$ de cada aa con excepción de la cistina de 50, 25, 12,5 y 6,25 $\mu\text{mol/L}$ seleccionada para cubrir el rango esperado en las muestras biológicas. El método de cuantificación utilizado es el de estándar externo y se realiza una regresión lineal con los cuatro puntos de la curva donde el eje de las “x” representa la concentración del aa y el eje de las “y” representa el área del aa.

Para la cuantificación de los distintos compuestos identificados en las corridas cromatográficas de controles y pacientes, se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de aa} = \frac{\text{área de aa} - \text{ordenada al origen}}{\text{pendiente de la curva de calibración}}$$

La concentración de cada aa en plasma se expresa en $\mu\text{mol/L}$.

2. Determinación de amonio plasmático por espectrofotometría (Kit de Amonio Randox, Randox Laboratories LTD, UK). El kit de Randox es un ensayo UV-enzimático para la determinación cuantitativa *in vitro* del amonio plasmático. Consta de dos etapas basadas en el siguiente principio:



El amonio se combina con α -oxoglutarato y NADH en presencia de glutamato dehidrogenasa (GLDH) para dar glutamato y NAD^+ . La correspondiente disminución en la absorbancia a 340 nm es proporcional a la concentración de amonio plasmático en la muestra. En cada ensayo se realiza un paso de corrección con el blanco de muestra.

Muestra: Se emplea plasma con heparina o EDTA. Se obtiene sangre venosa y se conserva en baño de hielo. El plasma debe ser separado dentro de los siguientes 30 min. El ensayo de amonio debe llevarse a cabo inmediatamente.

Reactivos: El kit provee NADH (0,16 mmol/l), α -oxoglutarato (2 mmol/l), una solución tampón de trietanolamina (0,15 mol/l, pH 8,6), GLDH, y un patrón (294 $\mu\text{mol/l}$).

Condiciones espectrofotométricas: El ensayo se realiza en microcubetas de 1 cm de espesor a una temperatura de entre 25 a 37°C, a una longitud de onda de 340 nm. El espectrofotómetro empleado fue Beckman DU640 (Beckman Instrumental Inc., Fullerton, CA, USA).

Cuantificación: se realiza empleando un factor en la siguiente ecuación:

$$A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}} \times 2596$$

Los valores normales de amonio en plasma (Mondzac y col., 1965) es de 10-47 $\mu\text{mol/l}$ en adultos y hasta 100 $\mu\text{mol/l}$ en niños menores de un (1) año de edad. El valor obtenido representa la concentración de amonio en la muestra en $\mu\text{mol/l}$.

3. *Determinación de ácido orótico en orina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) según la técnica de Simmonds y col. (1991).*

Para este procedimiento se utilizan testigos comerciales de los metabolitos característicos del metabolismo de las purinas y pirimidinas: ácido orótico, uracilo, pseudouridina, ácido úrico, hipoxantina, xantina, timina, uridina, 2,8-dihidroxiadenina, adenina, inosina, deoxi-inosina, guanosina, deoxi-guanosina (Sigma, St Louis, MA, USA). La estandarización de la técnica, espectros UV testigos y controles de la misma fue realizada previamente. Los solventes utilizados para las corridas cromatográficas son grado HPLC (Merck y Co. Inc, Whitehouse Station, NJ, USA).

Preparación de la muestra biológica: Se realiza una dilución 1:31 de 10 μl de orina de 24 hs en agua bidestilada; volumen de inyección en el HPLC 20 μl .

Condiciones cromatográficas: Se emplea un sistema de HPLC Hewlett Packard 1100, con autoinyector y detector UV. Para la separación de nucleósidos y bases se usa una columna Hypersil 5 μ C18 (ODS), 250 x 4,6 mm; las muestras se eluyen de la columna a flujo 1 ml/min utilizando el gradiente: 100% buffer A (acetato de amonio 40 mM ajustado a pH 5 con ácido acético glacial), 20% buffer B (70% metanol: 15% acetonitrilo: 15% tetrahidrofurano, v/v/v) durante 15 min. Las longitudes de onda utilizadas son de 254 nm y 280 nm. La identidad de los compuestos se establece según los tiempos de retención en la columna de los testigos puros y/o las reacciones de área de cada testigo a 280/254 nm.

Cuantificación: El método de cuantificación utilizado es el de estándar externo. El factor de respuesta para cada compuesto individual se determina dividiendo el área del pico cromatográfico por el volumen inyectado del estándar de concentración conocida. El resultado se expresa como pmol/unidad de área (1 μl del volumen de inyección). Para la cuantificación de los metabolitos identificados en las corridas cromatográficas correspondientes a los fluidos biológicos de pacientes se realiza el siguiente cálculo:

$$\frac{\text{área del compuesto} \times \text{dilución de la muestra} \times \text{factor de rta del estándar}}{\text{volumen } (\mu\text{l}) \text{ de la muestra inyectado}}$$

Los metabolitos en orina se expresan en $\mu\text{mol/mmol}$ de creatinina.

4. *Determinación de metabolitos de ON* mediante quimioluminiscencia con un analizador de óxido nítrico Sievers 280 (GE Analytical Instruments, Boulder, Colorado). Los experimentos se realizan a temperatura ambiente o a 37°C. Las muestras de plasma se mezclan en proporción 1: 2 muestra /etanol frío a 0°C durante 30 minutos. Luego se centrifugan a 14.000 rpm durante 5 minutos y se inyectan en el analizador. El medio de dilución se utiliza como blanco estándar.

Este método se basa en la reducción catalítica de metabolitos del ON por la exposición a clorhidrato de vanadio caliente en un recipiente de purga. El ON liberado es impulsado por gas nitrógeno en una cámara de ozono. La luz liberada por la interacción óxido nítrico-ozono, es capturada por un tubo fotomultiplicador y se retransmite a un programa de software analítico. Se utiliza una curva estándar con nitrito de sodio para determinar las concentraciones de la muestra. El software arroja los valores finales de las concentraciones de metabolitos del ON en la muestra, cada determinación se realiza por triplicado.

Técnicas empleadas para el estudio molecular

Un tercer nivel de investigación implica el estudio genético en el paciente y/o en la familia con diagnóstico clínico/bioquímico de una deficiencia del ciclo de la urea, con objeto de reconocer el defecto molecular involucrado en la alteración de la funcionalidad enzimática con el consiguiente diagnóstico definitivo y asesoramiento genético. En el momento de la toma de la muestra se solicita a los pacientes que firmen un consentimiento informado autorizando a realizar el estudio molecular y conservación del ADN para posterior análisis genético.

- **Extracción de ADN.** La extracción de ADN genómico a partir de sangre entera anticoagulada con EDTA 0,1M, se realiza utilizando el protocolo de purificación de Wizard Genomic DNA Promega Purification Kit (Promega, Madison, USA). Los ADN así obtenidos se chequean y cuantifican para posterior investigación de las mutaciones correspondientes; el material se almacena a -20 °C.

Análisis Genético. A modo general las técnicas utilizadas para el análisis genético consisten en la amplificación del gen/exón deseado a partir de ADN genómico con oligonucleótidos específicos mediante PCR (del inglés Polimerase Chain Reaction) y el examen de la secuencia deseada, ya sea mediante ensayos con enzimas de restricción que reconozcan el sitio alterado cuando la alteración buscada ya ha sido identificada, o mediante secuenciación

directa con método de Sanger, realizada en el Instituto de Biotecnología de INTA con el secuenciador automático de capilares modelo ABI 3130XL (Applied Biosystems).

En caso de ser necesario un análisis más extenso del gen para la búsqueda y localización precisa de la alteración se recurre, a través de un estudio colaborativo, a las técnicas SSCP (del inglés Single Strand Conformational Polymorphism), MLPA (del inglés Multiplex Ligation dependent Probe Amplification) para grandes deleciones/duplicaciones, y/o secuenciación completa de exones y regiones intrónicas. Las especificaciones respecto a las técnicas moleculares empleadas para el estudio de cada gen en particular, condiciones específicas y resultados obtenidos se detallan en el capítulo correspondiente a cada proteína.

Validación de mutaciones mediante estudios bioinformáticos

Con objeto de realizar una correlación genotipo/fenotipo de las alteraciones halladas en los pacientes con DCU las cuales no habían sido descritas previamente, se realiza el análisis bioinformático de mutaciones mediante estrategias *in silico*. Los métodos informáticos de evaluación se basan en la estructura y/o secuencia proteica para simular el efecto de la deficiencia.

Para comprender los mecanismos de las variaciones fenotípicas debido a variantes no sinónimas, es importante evaluar las consecuencias de la sustitución aminoacídica. Diversos estudios, mediante algoritmos computacionales (Xi y col., 2004), intentan determinar qué variantes se asocian a enfermedad o son neutrales, basados en información de secuencia y atributos estructurales (Richard y col., 2006). La estructura de una proteína puede cambiar de varias formas debido a diferencias bioquímicas de variantes aminoacídicas y por la localización de las variantes en la secuencia proteica que afecta la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria o el sitio activo donde se une el sustrato (Melisa y col., 2005).

Aunque los acercamientos basados en experimentación proveen la mayor evidencia del rol funcional de una variante genética, estos estudios son usualmente laboriosos y extensos. En contraste, algoritmos computacionales pueden ser empleados en una escala que es consistente con el gran número de variantes a ser identificadas. Las aplicaciones de estos algoritmos computacionales en estudios de asociación refuerzan en gran medida nuestro entendimiento de fenotipos humanos complejos. Todas estas técnicas ofrecen, en última instancia la posibilidad de comprender el comportamiento de los péptidos, proteínas y ácidos nucleicos, y el de sus

complejos entre sí o con moléculas orgánicas, en términos de fuerzas moleculares fundamentales.

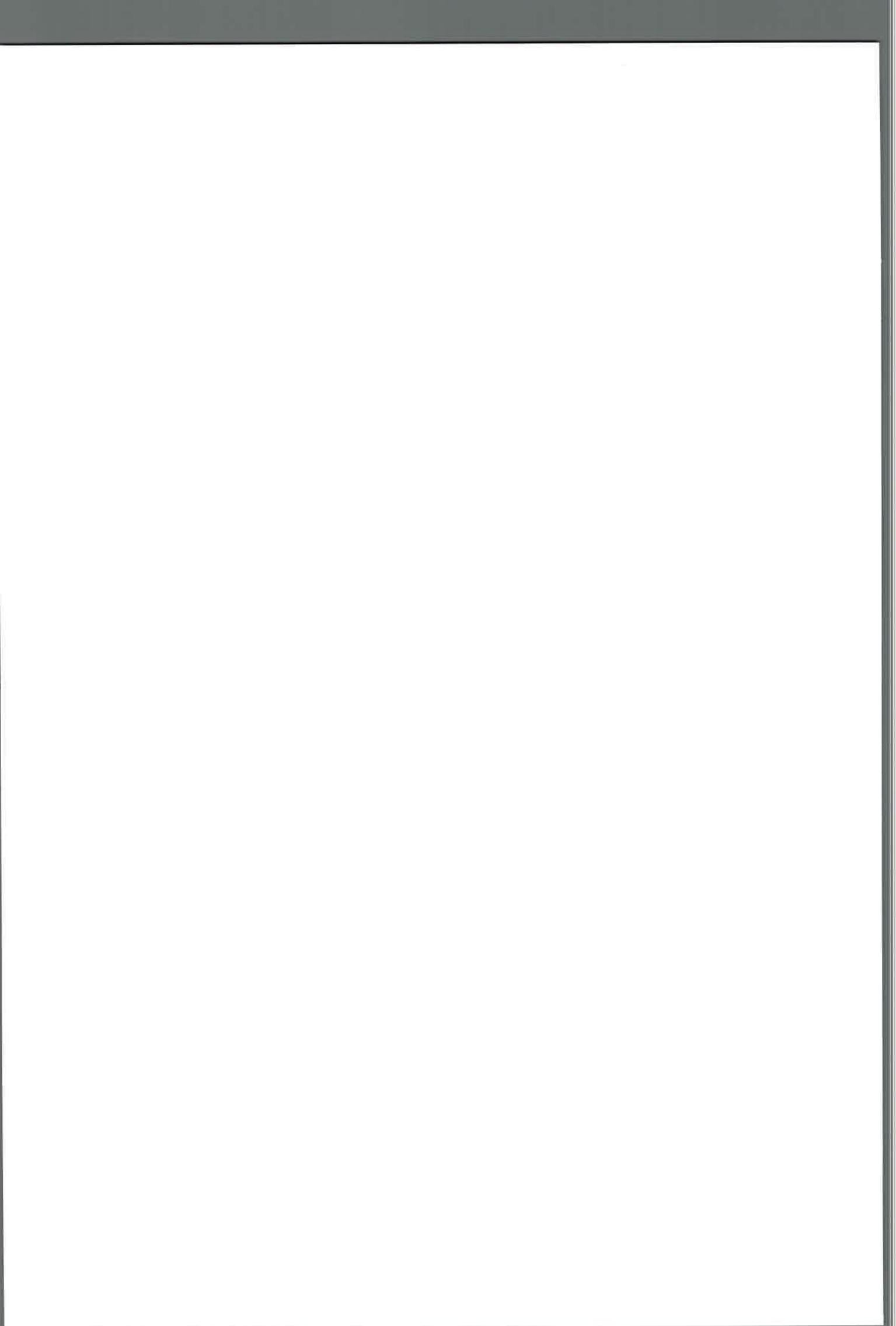
1. CLUSTALW2: Es una herramienta informática que permite efectuar múltiples alineamientos. El análisis comparativo de secuencias es una técnica poderosa que puede predecir si una sustitución no sinónima puede afectar a la función proteica. Estos métodos se basan en el hecho de que los residuos críticos para la función se conservan a través de diferentes genomas, invariablemente (Bao, 2005; Tavgigian y col., 2006). Dichos aminoácidos podrían estar participando directamente en la reacción enzimática o tener un papel importante en la estructura secundaria o terciaria. Del mismo modo, residuos que no son vitales estarían sujetos a un aumento de variación, sin afectar la función proteica.
2. SIFT: El programa Sort Intolerant From Tolerant (disponible en <http://sift.jcvi.org>) se basa en alineaciones de secuencias proteicas de múltiples especies y considera la conservación de los residuos afectados y el tipo de aminoácido sustituido para predecir si un cambio es inocuo o perjudicial (Ng y col., 2003; Kumar y col., 2009). Se ha pronosticado que la limitación de la alineación utilizada por el tamiz de análisis de determinados ortólogos puede dar falsos negativos, es así que emplear ciertos parálogos con diferente secuencia puede dar cuenta de diferencias funcionales sutiles (Chan y col., 2007). El resultado del análisis SIFT es una clasificación binaria de “Tolerado” o “No Tolerado”.
3. PolyPhen: El programa de fenotipificación de polimorfismo, (Polymorphism phenotyping, disponible en <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) se basa en un conjunto de reglas empíricas que combinan el análisis de un alineamiento múltiple de secuencias proteicas pre-establecido con un número de atributos proteicos estructurales y funcionales para estimar las consecuencias de la sustitución de un aminoácido caracterizándolos como benignos, posiblemente nocivos o perjudiciales (Ramensky y col., 2002). Se asignó una puntuación de 0 a variaciones benignas, una puntuación de 0,5 para las que se caracterizan como posiblemente perjudiciales, y una anotación de 1,0 para las perjudiciales.
4. PoPMuSiC: El programa Prediction of Protein Mutant Stability Changes (disponible en <http://babylone.ulb.ac.be/popmusic/>) es una herramienta eficiente para el diseño computacional de mutaciones puntuales en proteínas y péptidos. Tiene en cuenta dos parámetros, la estabilidad termodinámica, caracterizada por el plegamiento de la energía libre ΔG , y la solubilidad de las variantes. El programa trabaja introduciendo todas las mutaciones puntuales en la estructura proteica y prediciendo el plegamiento del cambio de energía libre resultante ($\Delta\Delta G_{\text{computed}} =$

$\Delta\Delta G_{\text{mutant}} - \Delta\Delta G_{\text{wild-type}}$) (Gilis y col., 2000; Kwasigroch y col., 2002). Como punto de partida, requiere la estructura proteica en formato PDB (Berman y col., 2000) y emplea una presentación estructural simplificada consistente en coordenadas cartesianas del esqueleto de átomos de C, N, Ca, y O. Los cambios predichos y los experimentales en el plegamiento de la energía libre se han demostrado correlacionarse muy bien para todas las mutaciones puntuales que no perturban demasiado la estructura. Las predicciones más precisas son obtenidas para los residuos de superficie.

5. SIFT Indel: El programa Sort Intolerant From Tolerant Indel (disponible en http://sift-dna.org/www/SIFT_indels2.html) es un método específico para predecir con un 84% de precisión las consecuencias de inserciones/deleciones que cambian el marco de lectura, “frameshift” (FS). *SIFT Indel* distingue entre dos conjuntos: (1) un conjunto de indeles FS que causan enfermedades; y (2) indeles funcionalmente neutros. Los indeles FS que causan enfermedades se toman de la base de datos Human Genome Mutation Database (HGMD) (Stenson y col., 2009). Los indeles neutros consisten en indeles codificantes con tamaños no divisibles por tres que derivan de alineamientos de a pares de humano con vaca, perro, caballo, chimpancé, macaco rhesus, y la rata (Fujita y col., 2011). Para cada indel, se describen 20 características y cómo influyen sobre el producto del gen. Entre ellas, las cuatro características seleccionadas en orden de importancia son: 1) la fracción de bases de ADN conservadas afectadas, 2) ubicación relativa en el transcritto, 3) fracción de aminoácidos conservados afectados, y 4) distancia mínima del indel al límite del exón del transcritto afectado (Hu y Ng, 2012).

Parte I

ALTERACIONES PRIMARIAS EN EL CICLO DE LA UREA



CAPÍTULO 1

DEFICIENCIA DE ORNITINA TRANSCARBAMILASA (D-OTC)

INTRODUCCIÓN

La ornitina transcarbamilasa (OTC; MIM#:311250; RefSeq: NM_000531.3) cataliza la formación de citrulina y fosfato inorgánico a partir de carbamil fosfato y ornitina en el ciclo de la urea. El gen *OTC* en humanos está localizado en el brazo corto del cromosoma X en la banda Xp21.1 (Lindgren y col., 1984). El gen tiene una longitud de 73kb con un marco de lectura abierto de 1.062 nucleótidos distribuída en diez exones y nueve intrones (Hata y col., 1988). La enzima OTC se expresa casi exclusivamente en el hígado y en la mucosa intestinal, pero la actividad completa del ciclo de la urea ocurre sólo en el hígado. El péptido maduro contiene 322 aminoácidos y un peso molecular de 36.1kD. La holoenzima funcional es un homotrímero con simetría triple y tres sitios activos, cada uno de los cuales se encuentra compartido entre dos polipéptidos adyacentes (Shi y col., 1998).

La deficiencia de OTC es el defecto hereditario más frecuente de la ureagénesis con una prevalencia estimada de 1:14000 (Dionisi-Vici y col., 2002). Varones hemocigotos con deficiencia completa de OTC se presentan con hiperamonemia aguda en la primer semana de vida, mientras que varones con deficiencia parcial tienen una presentación tardía, incluso en la adultez (Figura 2) (McCullough y col., 2000). Algunos individuos con mutaciones aparentemente deletéreas y deficiencia enzimática parcial no presentan síntomas. La gravedad de la presentación de síntomas de D-OTC en las mujeres depende principalmente del patrón de inactivación del X en el hígado, y va desde asintomática hasta casi tan grave como en los hombres afectados (Scaglia y col., 2002). Aproximadamente el 20% de mujeres heterocigotas manifiestan síntomas, mientras el 80% restante permanecen asintomáticas toda su vida (Hudak y col., 1985).

En general, los signos y síntomas clínicos son causados por los efectos tóxicos de la hiperamonemia en el cerebro, los que incluyen letargia, vómitos, anormalidades neurológicas y conductuales, y en los casos más severos, coma, edema cerebral y muerte. Las anormalidades bioquímicas además del amonio plasmático elevado incluyen elevada glutamina plasmática y citrulina disminuída o ausente. Los niveles elevados de ácido orótico urinario distingue la deficiencia de OTC de las deficiencias en las otras dos enzimas proximales a ella en el CU:

carbamilfosfato sintetasa I (CPSI) y N- acetilglutamato sintetasa (NAGS); en las deficiencias de CPSI o NAGS el ácido orótico urinario es normal o bajo.

La detección de portadoras es muy importante por el riesgo de crisis de hiperamonemia y asesoramiento genético. Como el amonio y la excreción de ácido orótico en condiciones basales pueden ser normales, en el pasado se recurría a la prueba de sobrecarga proteica para poner de manifiesto la alteración de ambos parámetros (Haan y col., 1982). Actualmente se utiliza la prueba de sobrecarga de alopurinol para elevar la excreción urinaria de ácido orótico inhibiendo su catabolismo, lo que evita el peligro de la hiperamonemia causada por la sobrecarga proteica en heterocigotos de esta deficiencia (Hauser, 1990).

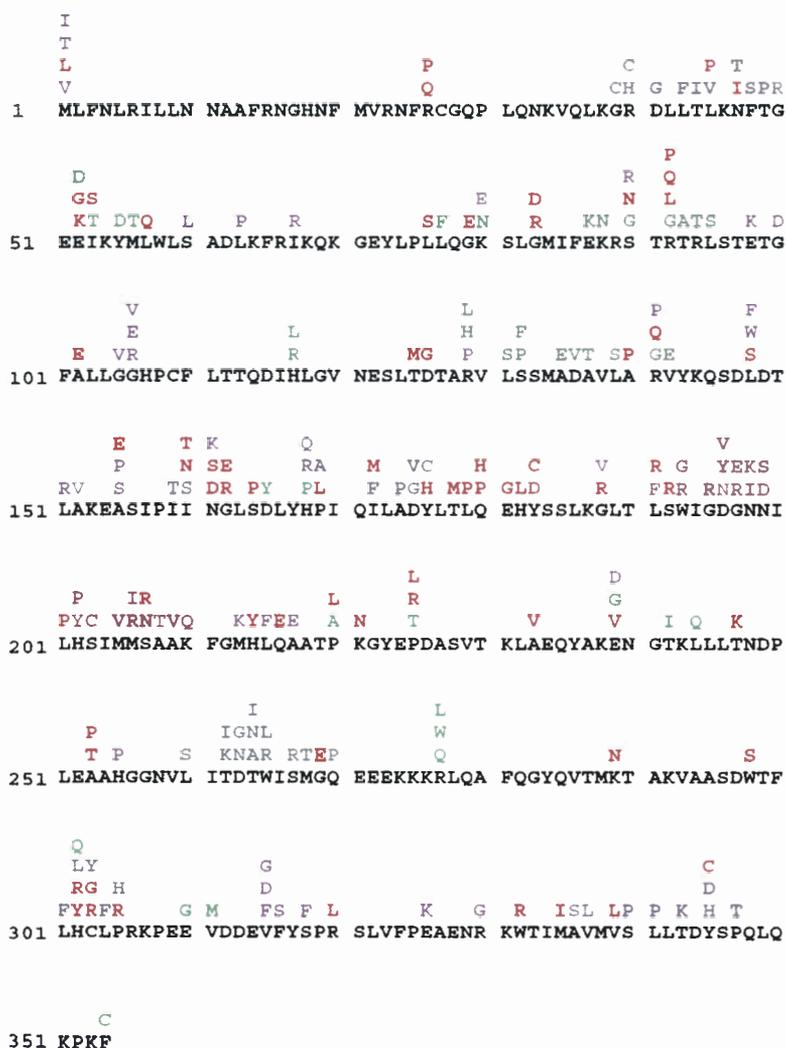


Figura 2. Secuencia de aminoácidos normal de la proteína OTC humana y mutaciones que provocan sustituciones aminoacídicas asociadas a deficiencia en OTC. Las mutaciones asociadas con una presentación neonatal se muestran en rojo, presentación de inicio tardío se muestran en verde, y aquellas que se presentan en mujeres se muestran en púrpura; una sólo mutación para la cual la edad de comienzo es desconocida se muestra en gris (Yamaguchi y col., 2006).

La mayoría de las mutaciones (aproximadamente el 84%) causantes de deficiencia de OTC consisten en sustituciones de una sola base, mientras que una pequeña proporción consiste de pequeñas deleciones o inserciones (12%) y grandes deleciones (4%). Las mutaciones son en gran parte “privadas” de cada familia, con mutaciones recurrentes principalmente en dinucleótidos CpG (Tuchman, 2002), los cuales son conocidos “hotspots” de mutación. El último reporte de mutaciones contiene un total de 417 mutaciones y 44 polimorfismos (Caldovic y col., 2015). Las mutaciones que bloquean la acción catalítica de la OTC están invariablemente asociadas a hiperamonemia aguda neonatal, mientras aquellas que permiten su actividad residual se presentan en un amplio rango de edades, desde el período neonatal a la adultez tardía, oraramente pueden no manifestarse clínicamente. La heterogeneidad fenotípica se observa incluso entre los miembros de una misma familia; la causa de ello aún no se comprende bien y parece deberse a una combinación de factores genéticos y variables ambientales como infecciones u otras causas de estrés catabólico. Constantemente se encuentran y reportan nuevas mutaciones con su correspondiente información clínica y bioquímica, aportando al mejor entendimiento de la correlación genotipo-fenotipo y dominios funcionales de la proteína OTC que son críticos para la actividad enzimática normal. La deficiencia en OTC se encuentra en equilibrio genético, en el cual las mutaciones perdidas por el éxito reproductivo reducido son reemplazadas por mutaciones que ocurren *de novo* en las líneas germinales masculinas y, mucho menos frecuente, en mujeres. Así, esta enfermedad genética no puede ser erradicada por prevención mediante asesoramiento genético o decisiones reproductivas. Siempre existirá la necesidad del diagnóstico genético, identificación de portadores y diagnóstico prenatal para deficiencia en OTC (Yamaguchi y col., 2006).

En este capítulo se detallan los pacientes diagnosticados en CEMECO con deficiencia en OTC. Además se realiza una correlación genotipo/fenotipo de las alteraciones halladas en los pacientes a través del análisis bioinformático de mutaciones en el gen OTC mediante estrategias *in silico*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población estudiada

En el laboratorio se procesaron muestras provenientes de sujetos con sospecha clínica de DCU. Los hallazgos clínicos de estos pacientes incluyen uno o varios síntomas previamente mencionados.

En individuos con D-OTC previamente diagnosticados en CEMECO presentando diversa sintomatología, se realizó un seguimiento con información de evolución y correlación genotipo/fenotipo.

Análisis bioquímico

- a. Determinación de aminoácidos plasmáticos y urinarios por HPLC como se ha descrito previamente (Blau y col., 2008).
- b. Determinación de amonio plasmático por espectrofotometría (Kit de Amonio RANDOX, Randox Laboratories LTD, UK).
- c. Determinación de ácido orótico en orina por HPLC (Simmonds y col., 1991).

Análisis molecular

a. Extracción de ADN.

La extracción de ADN genómico de leucocitos periféricos a partir de sangre entera se efectuó según la técnica previamente descrita. Los ADN así obtenidos fueron chequeados, cuantificados para la posterior investigación de la mutaciones en la secuencia codante del gen *OTC*; el material se almacenó para futuros estudios adicionales que pudieran surgir.

b. Análisis del gen *OTC*.

*Estudio del gen completo *OTC**

Los diez exones del gen *OTC* y las regiones que flanquean los límites exón-intrón se amplificaron por PCR (Pérez García y col., 1995) y se sometieron a SSCP en el sistema EF Genephor a 15°C con geles prefabricados GeneGel Clean 15/24 (ambas de Amersham Biosciences, Barcelona, España) siguiendo las instrucciones del fabricante; los fragmentos amplificados de ADN que producen SSCP anormales fueron secuenciados utilizando el secuenciador automatizado Prism 3100 ABI (de Applied Biosystems, Madrid, España).

Cuando no se encuentra SSCP anormal o cuando una mutación es nueva, los diez exones del gen *OTC* y regiones intrónicas flanqueantes se secuencian. Las mutaciones se identificaron por comparación con la secuencia de referencia GenBank para *OTC* humana (GenBank entradas: NP 000522 de la secuencia de aminoácidos; NM 000531 para la secuencia de ARNm; NC 000023 para los límites exón-intrón). La presencia de una mutación en un paciente se confirma por la repetición del análisis en el producto de una reacción de PCR independiente del ADN del paciente.

Multiplex Ligation-Dependent Probe Analysis (MLPA)

La técnica MLPA aplicada a este gen permite una rápida y precisa identificación de grandes duplicaciones, deleciones y reordenamientos complejos. La técnica de MLPA permite un análisis del número de copias de los 10 exones que componen el gen *OTC* en el ADN genómico de los pacientes. Se basa en las reacciones de hibridación, ligación y amplificación de sondas exón-específicas. El hecho de que el MLPA analice la totalidad de los exones permite identificar las deleciones que no se detectan con otras metodologías; duplicaciones, ya que no son detectables mediante PCR; y mutaciones nonsense (codon stop) situadas en el sitio de ligación.

Este apartado, así como el estudio completo del gen *OTC* y SSCP fueron realizados mediante un estudio colaborativo con el Prof. José Antonio Arranz Amo perteneciente a la Unidad de Metabolopatías del Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron, Barcelona, España.

Estudio mutación c.697delG

La amplificación fue realizada en un volumen total de 50 µl conteniendo 1x GoTaq Buffer, 0.5 µl de cada dNTP, 1 pmol de cada primer, 1U de GoTaq DNA Polymerase (Promega), y 20 ng de ADN genómico. Los ciclos de PCR involucran una desnaturalización inicial a 96°C por 5 min, 30 ciclos: desnaturalización 95°C 1 min, annealing 52°C 1 min, extensión 72°C 1 min, y una extensión final a 72°C por 7 min (Tabla 2). El producto de PCR resultante de 558pb fue secuenciado en el Instituto de Biotecnología de INTA.

Tabla 2. Amplificación de exones 7-8, gen OTC

Fragmento amplificado	Secuencia de oligonucleótidos	Producto de PCR	Temperatura de hibridación
Exones 7-8 y uniones exón-intrón	5' AGGGAAGGAGACGCGATATT 3' 5'TTCAAAGGACACAGCTAATCTT 3'	558 pb	52°C

c. Validación *In Silico*.

Los cambios missense hallados en los pacientes diagnosticados con D-OTC fueron analizados usando tres algoritmos computacionales distintos: CLUSTALW2, SIFT, Polyphen, PoPMuSiC y SIFT Indel. Los mismos han sido diseñados para predecir las variaciones deletéreas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total se han identificado 14 pacientes pertenecientes a 11 familias de diversas localidades. De los 14 casos con deficiencia de OTC, 42,8% (6) fueron mujeres y el 57,2% (8) varones. La edad media de inicio de síntomas fue de 29,9 meses (48 hs de vida a 10 años) (Tabla 3).

Tabla 3. Pacientes D-OTC diagnosticados en CEMECO.

FLIA	PAC	PRESENTACIÓN	DIAGNÓSTICO	ALTERACIÓN	AMINOÁCIDO	EDAD INICIO	OBSERVACIONES	PROCEDENCIA
I	1	Mujer portadora sintomática	Clínico / Bioquímico / Molecular	delExon 2-10	Intrónica	7m	Fallecido	Alta Gracia, Córdoba
	2	Mujer portadora sintomática	Clínico / Bioquímico/ Molecular	delExon 2-10	Intrónica		Diagn en período asintomático	Alta Gracia, Córdoba
	3	Hemicigoto pres. neonatal	Clínico / Bioquímico	delExon 2-10	Intrónica	5d	Fallecido	Alta Gracia, Córdoba
II	4	Hemicigoto pres. tardía	Clínico / Bioquímico/ Molecular	c.216+1G>A	Intrónica	2a		Córdoba Capital
III	5	Hemicigoto pres. tardía	Clínico / Bioquímico/ Molecular	c.386G>A	p.Arg129His	6m		Córdoba Capital
IV	6	Mujer portadora sintomática	Clínico / Bioquímico/ Molecular	c.452T>G	p.Leu151Arg	4a		Córdoba Capital
V	7	Mujer portadora sintomática	Clínico / Bioquímico/ Molecular	c.533C>T	p.Thr178Met	10m	Estado vegetativo	San Francisco, Córdoba
	8	Hemicigoto pres. neonatal	Clínico / Bioquímico/ Molecular en padres	c.533C>T	p.Thr178Met	48-72hs	Fallecido	San Francisco, Córdoba
VI	9	Mujer portadora sintomática	Clínico / Bioquímico/ Molecular	c.540+1G>A	Intrónica	9m		Almafuerte, Córdoba
VII	10	Hemicigoto pres. tardía	Clínico / Bioquímico/ Molecular	c.622G>A	p.Ala208Thr	8a		Prov Bs As
VIII	11	Hemicigoto pres. tardía	Clínico / Bioquímico/ Molecular	c.829C>T	p.Arg277Trp	10a	Fallecido	Marcos Juárez, Córdoba
IX	12	Hemicigoto pres. neonatal	Clínico / Bioquímico/				Fallecido	Córdoba Capital
X	13	Mujer portadora sintomática	Clínico/ Bioquímico/ Molecular	dupl-9/del10		9m	Fallecido	Villa Dolores, Córdoba
XI	14	Hemicigoto pres. neonatal	Clínico/ Bioquímico/ Molecular	c.697delG	p.Leu232Leufs*14		Fallecido	Neuquén

Las manifestaciones clínicas se presentaron variadas, desde varones fallecidos en el período neonatal y formas tardías, hasta mujeres gravemente afectadas. Los síntomas comenzaron en el período neonatal en el 50% de los casos en varones hemicigotos; no se observaron formas neonatales en las mujeres portadoras sintomáticas, sino formas tardías, representando el 43% de la casuística en nuestro estudio. El deterioro neurológico estuvo presente en la mayoría de los casos. Es así, que incluso dentro de la familia I presentando la misma mutación hallamos tanto varones y mujeres gravemente sintomáticos (pacientes 1 y 3) fallecidos en coma hiperamonémico como mujeres portadoras sintomáticas (paciente 2).



Figura 3. Representación porcentual de manifestaciones clínicas de pacientes D-OTC.

Con respecto a los metabolitos alterados en pacientes D-OTC, es de destacar un nivel de amonio promedio al comienzo de los síntomas de 547 $\mu\text{mol/L}$ (70-1500; VN: hasta 40 $\mu\text{mol/L}$) y un nivel medio de glutamina de 243 $\mu\text{mol/L}$ (24-502; VN: 32-140 $\mu\text{mol/L}$). Los valores de citrulina y arginina se conservaron dentro de los rangos normales (Tabla 4).

Tabla 4. Valores medios ($\mu\text{mol/L}$) de metabolitos en pacientes D-OTC y valores de referencia.

	Amonio	Glutamina	Citrulina	Arginina
Control	<100	32-140	16-32	44-120
Pacientes	547,03	243,6	18,4	62,7

El diagnóstico fue completado con el estudio molecular en 13 de los pacientes, el único individuo en el cual no se ha determinado la mutación fue un varón fallecido en el período neonatal y del cual no pudo obtenerse ADN. Sin embargo, el estudio en la madre no reveló alteraciones en el gen por lo que se ha sugerido un mutación *de novo*. El análisis genético ha permitido identificar alteraciones en el gen de la *OTC* en 10 familias afectadas con distinto defecto molecular y de los cuales cuatro no han sido previamente reportados: una es un rearrreglo cromosómico complejo (dup1-9/del10, *nueva*), una deleción grande y otra pequeña (del exon2-

10; c.697delG, *nuevas*), dos mutaciones intrónicas (c.216+1G>A; c.540+1G>A, *nueva*) y cinco cambios missense (c.386G>A; c.452T>G; c.533C>T; c.622G>A; c.829C>T).

El rearrreglo cromosómico **dup1-9/del10** fue hallado en la paciente 13 por MLPA y consta de una nueva alteración: duplicación en heterocigosis de la región comprendida entre los exones 1 y 9; a la vez que delección en heterocigosis, en el mismo alelo, de la región contigua que incluye desde el exón 10 hasta el final del gen y se continúa al gen adyacente TSPAN7, el cual se asocia a retraso mental ligado al cromosoma X. Esta alteración se ha producido *de novo* en la gametogénesis materna o paterna, pues igual estudio realizado en madre y abuela no evidencia el defecto antes enunciado, posiblemente resultado de alguna aberración en el sobrecruzamiento en la primera división meiótica por mecanismo no determinado. La sintomatología presentada por la paciente incluye un retraso madurativo no característico de los defectos clásicos en el ciclo de la urea, por lo que junto al grupo de estudio foráneo se intenta dilucidar qué influencia podría tener la delección del gen TSPAN7 contiguo en este caso. La paciente de dos años de vida se encontraba bajo seguimiento médico, con tratamiento farmacológico y dieta baja en proteínas; con frecuentes descompensaciones ante procesos infecciosos. Luego de una crisis sufre un edema cerebral no correlacionable con el valor de amonio, seguido de paro cardiorespiratorio y defunción.

Respecto a la pequeña delección **c.697delG** hallada en el individuo 14, se estandarizó la metodología para genotipificar la mutación c.697delG de la familia del paciente (hermanas), mediante amplificación por PCR de los exones 7 y 8 del gen *OTC* y secuencias intrónicas flanqueantes, y posterior secuenciación de la región amplificada. Las muestras de ADN de la madre (control positivo), dos hermanas y un control normal fueron genotipadas, comprobando la correcta amplificación del fragmento deseado y analizando el estado de portador de la mutación puntual de las mujeres estudiadas.

La mutación c.697delG hallada en la familia XI no ha sido descrita en la literatura previamente por lo que se propuso al *análisis bioinformático* mediante el programa SIFT Indel como la mejor forma de comprender el impacto de esta mutación en la función y estabilidad proteica. SIFT Indel fue empleado para predecir los efectos de la delección c.697delG, dicha mutación resulta en un cambio en el marco de lectura, produciendo un codón de stop en el aminoácido 14 siguiente al aminoácido modificado, truncando de esta forma la proteína en la posición 245 (Figura 4). Mediante esta información podemos proveer la correcta nomenclatura de la secuencia proteica resultante de la delección estudiada como p.Leu232Leufs*14.

>ENST00000039007; MISMATCH = 232-354 (SECUENCIA NORMAL)
 MLFNLRILLNNAAFRNGHNFVVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTKNFTGEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLP
 LLQGKSLGMIFEKRSTRRLSTETGFALLGGHPCFLTQDIHLGVNESLTDARVLSSMADAVLARVYKQSDLDLTA
 KEASIPHIINGLSDLYHPHPIQLADYLTQEHYSSLKGLTSLWIGDGNLHLSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVT
 Kl~~aeqyakengtklltndpleaahggvliitdtwismgqeeekkrqlqafqgyvmtktakvaasdwtflhclprkpeevddevfysprsl~~
 vfpeaenrkwtimavmvsilt dyspqkpkf

>ENST00000039007; MISMATCH = 232-245 (SECUENCIA MUTADA)
 MLFNLRILLNNAAFRNGHNFVVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTKNFTGEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLP
 LLQGKSLGMIFEKRSTRRLSTETGFALLGGHPCFLTQDIHLGVNESLTDARVLSSMADAVLARVYKQSDLDLTA
 KEASIPHIINGLSDLYHPHPIQLADYLTQEHYSSLKGLTSLWIGDGNLHLSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVT
 K~~Lqssmpkrmvpsc~~

Figura 4. Secuencia aminoacídica normal OTC (arriba) y alterada por el cambio c.697delG (abajo). Se indican: encima de cada secuencia el largo total del transcripto y en rojo los aminoácidos que difieren entre ellas.

Respecto a la localización de la delección, el programa estima se produce en la secuencia cuando el 65% ya ha sido transcrita, es decir que se encuentra en la segunda mitad de la proteína, cercano al extremo carboxilo terminal. Además, se prevé que el transcripto es expuesto al mecanismo celular de Nonsense mediated decay (NMD), por el cual se detectan las mutaciones nonsense y se previene la expresión de proteínas truncadas o erróneas. De esta forma, esta mutación es equivalente a la delección génica completa debido a que el ARNm nunca llega a ser traducido. El programa asigna por ende una clasificación de 12 a este cambio, siendo altamente dañino con una confianza en la predicción de 0,858.

Los cinco cambios missense hallados en los pacientes diagnosticados con deficiencia de OTC (c.386G>A; c.452T>G; c.533C>T; c.622G>A; c.829C>T) fueron analizados usando tres algoritmos computacionales previamente descriptos (SIFT, Polyphen y PoPMuSiC). Esto se debe a la imposibilidad de realizar el control de actividad enzimática en los pacientes, siendo los estudios *in silico* la manera más factible y confiable para analizar la severidad de las mutaciones halladas en estos casos.

Creación de múltiples alineamientos de secuencias

Se construyeron múltiples alineaciones de secuencias de aminoácidos utilizando *CLUSTALW2* (Greenblatt y col., 2003). Los homólogos de los genes de interés se recuperaron de GenBank tras las búsquedas BLAST utilizando de referencia la secuencia humana (Figura 5). El alineamiento para OTC fue de 11 secuencias ortólogas a saber: *Rattus norvegicus*, *Homo sapiens*, *Canis familiaris*, *Bos Taurus*, *Sus scrofa*, *Gallus gallus*, *Danio rerio*, *Branchiostoma floridae*, *Bacillus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*.

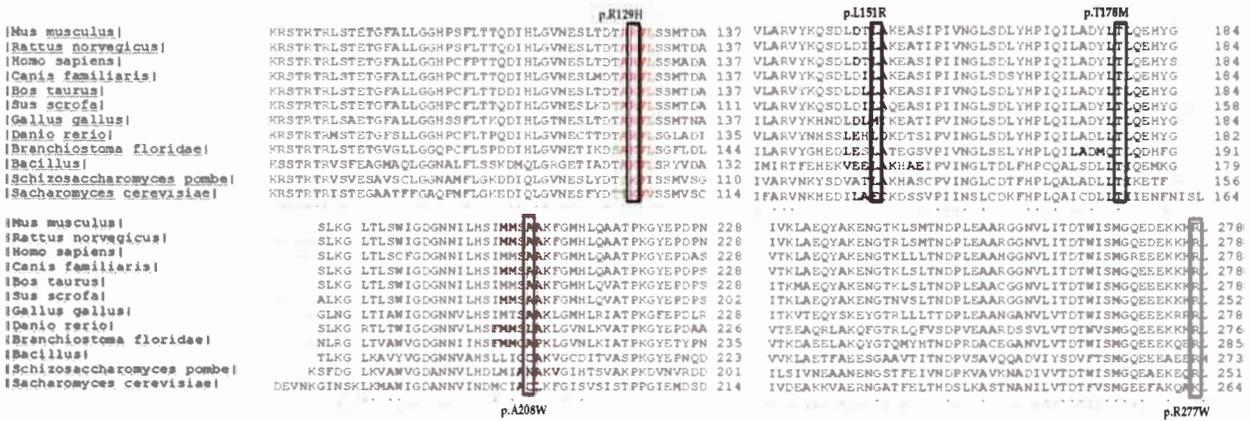


Figura 5. Alineamiento múltiple realizado con CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Los resultados del alineamiento para las distintas secuencias OTC se describen a continuación según el aminoácido alterado.

En la posición 129 (**c.386G>A**), la arginina no se conserva en los clados más alejados a *Homo sapiens*, en los cuales se presenta en esta posición una lisina. Tanto arginina como lisina son aminoácidos básicos, y al poseer ambos las mismas propiedades en su cadena lateral, la funcionalidad de la proteína se estaría conservando.

En la posición 151 (**c.452T>G**), el aminoácido leucina se encuentra relativamente conservado en todas la especies exceptuando *Gallus gallus* y *Saccharomyces* en los cuales se ha sustituido por metionina y fenilalanina respectivamente, lo que sugiere un origen independiente de estos últimos. Tanto leucina como metionina y fenilalanina son aminoácidos neutros no polares, conservando las propiedades en esta posición. La mutación de leucina por arginina se considera altamente perjudicial para la funcionalidad proteica ya que se sustituye un aminoácido neutro no polar por uno básico.

En la posición 178 (**c.533C>T**), el aminoácido treonina se halla altamente conservado en todos los ortólogos observándose aún en las especies más alejadas filogenéticamente. Probablemente indicando la importancia de este aminoácido para la funcionalidad proteica, y que cualquier cambio en esta posición puede resultar en pérdida de funcionalidad. La mutación que cambia treonina por metionina estaría modificando la estructura proteica al sustituir un aminoácido hidrófilo por uno hidrófobo.

En la posición 208 (**c.622G>A**), el aminoácido alanina se halla conservado en los clados más cercanos, pero no así en aquellos más alejados. El cambio de alanina por triptófano, ambos aminoácidos no polares, no alteraría la polaridad pero generaría un cambio estructural debido al tamaño de la cadena lateral del triptófano.

En la posición 277 (c.829C>T), la arginina se encuentra altamente conservada en todas las especies excepto en *Saccharomyces cerevisiae*, el clado más lejano filogenéticamente de *Homo sapiens*, el cual presenta en cambio una lisina. Tanto arginina como lisina son aminoácidos básicos. La sustitución de arginina por triptófano en esta posición generaría un cambio grande tanto en carga por pasar de poseer una carga positiva a una neutra no polar como así también estructural, al incorporar la cadena aromática del W.

Métodos basados en estructura/secuencia

Las mutaciones no sinónimas halladas en nuestros pacientes D-OTC fueron evaluadas por tres métodos descritos previamente y de libre acceso: 1) SIFT, 2) PolyPhen, 3) PoPMuSiC. Se creó una lista de ortólogos OTC a través del uso del buscador BLAST y búsqueda de ortólogos en la base de datos ENSEMBL y empleando CLUSTALW2 para crear un alineamiento de homología para OTC / ortólogos de humanos.

Mediante la herramienta SIFT se generaron múltiples alineamientos de secuencia de diferentes especies para observar las secuencias conservadas del gen, evaluar las posiciones aminoacídicas conservadas y analizar el efecto de cambios missense en la estructura proteica conservada en el curso de la evolución (Figura 6). La alineación de CLUSTAL fue empleada para el análisis SIFT de los cambios missense identificados en este estudio, siendo alcanzado el nivel recomendado de la diversidad, con una puntuación media de conservación ≤ 3 . SIFT asigna puntuación a las mutaciones, las puntuaciones menores a 0,05 son consideradas potencialmente dañinas.

La herramienta de análisis SIFT reveló para todas las sustituciones analizadas un score menor a 0,05, prediciendo que los aminoácidos reemplazados son potencialmente dañinos y no serán bien tolerados, afectando la función proteica.

Predict Not Tolerated	Position Seq Rep	Predict Tolerated
c w d f m i y v g p s h n a l t e	129R 1.00	Q K R
d g h n e c s k r w p y q t a v i	151L 1.00	F M L
y w v s r q p n m l k i h g f e d c a	178T 1.00	T
w h y f i m n q r d e k v t p	208A 1.00	L s C G A
m w c f i y v l h t p q a s e n g k D	277R 1.00	R

Figura 6. Interfase generada por el programa SIFT. Código de color: no polar, polar sin carga, básico, ácido. Letras mayúscula: aminoácidos del alineamiento; letras minúscula: predicciones; 'Seq Rep': fracción de secuencias que contienen uno de los aminoácidos básicos. Una baja fracción indica que la posición es o bien faltante o inalineable y se espera baja predicción en estas posiciones (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>).

El método Polyphen clasifica los cambios en un rango de entre 0 y 1, con un puntaje <0,5 para cambios benignos. Este análisis considera a la mutación **c.386G>A** como la menos dañina de la serie con un puntaje de 0,495, lo que la clasifica como posiblemente dañina. El resto de las mutaciones fueron clasificadas como probablemente dañinas con puntajes cercanos a 1 (Figura 7).

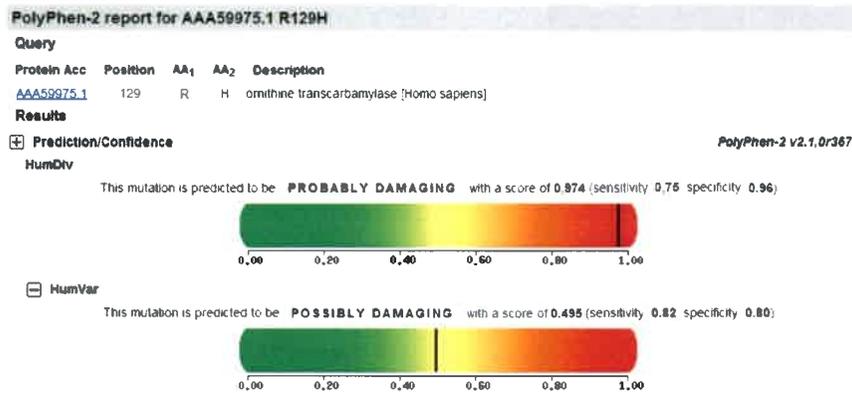


Figura 7. Interfase de Polyphen para cada sustitución indicando la tolerancia del cambio menos perjudicial de la serie, **c.386G>A** (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>).

Según los datos obtenidos mediante PoPMusic, todas las mutaciones produjeron una alteración de energía libre de plegamiento positivo por lo que se consideran desestabilizantes de la estructura proteica (Figura 8). En cuanto a la accesibilidad al solvente del residuo modificado, en p.R129H se observa la mayor conservación porcentual respecto al residuo normal que en el resto de las mutaciones, esto concordaría con los resultados de PolyPhen y podría deberse a la conservación de cargas, por mantenerse en el sitio un residuo aminoacídico básico (arginina por lisina); para el resto de las mutaciones la accesibilidad al solvente resulta mínima, posiblemente alterando en mayor medida la estructura proteica.

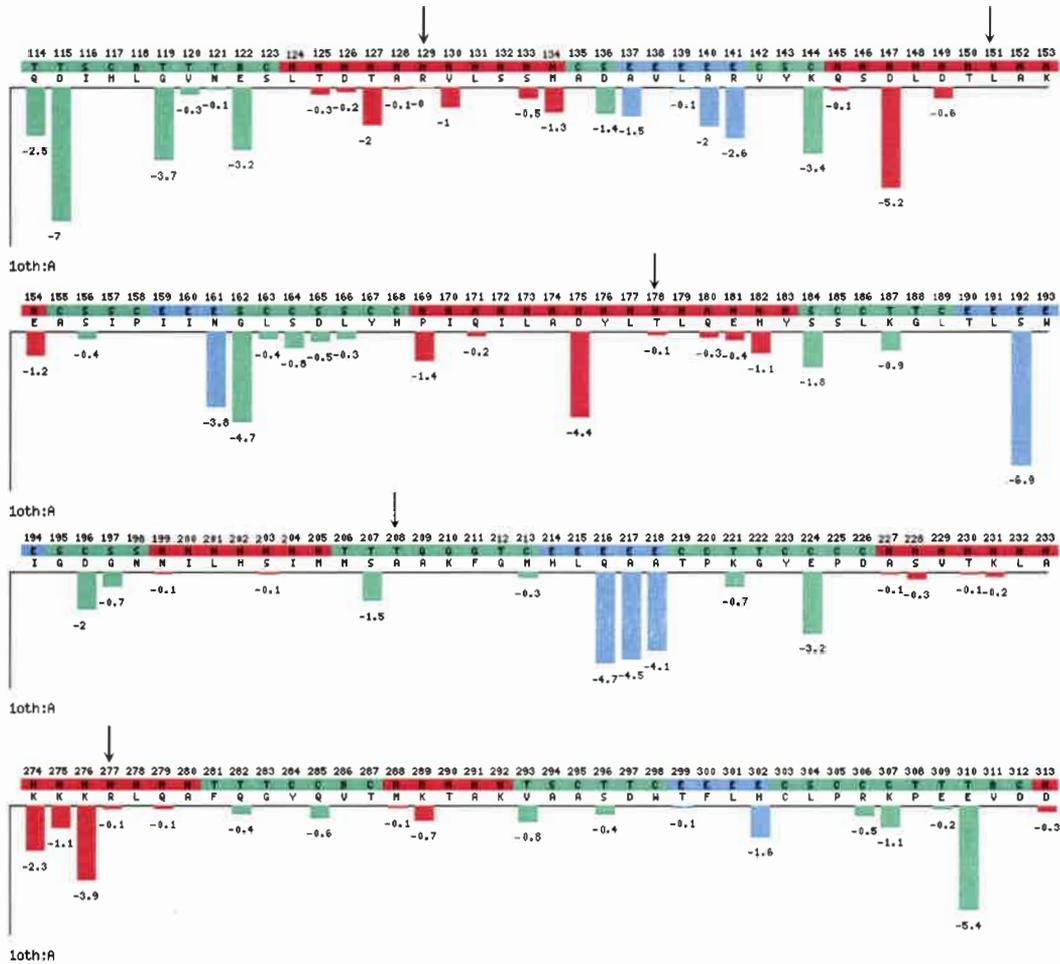


Figura 8. Salida del servidor web Popmusic-2.0, que corresponde a los residuos de la enzima OTC de *Homo sapiens*. La secuencia de puntuación óptima de Γ ($\Gamma_i = \sum_{j=1}^n \Delta \Delta G_{i,j} - H_i - \Delta \Delta G_{i,i}$) se representa gráficamente en función de la posición en la secuencia. Los elementos de la estructura secundaria proteica se distinguen por el color asociado: hélices en rojo, hebras en azul, y espirales en verde. Las flechas negras indican los aminoácidos afectados en los pacientes estudiados.

El análisis realizado en cada una de las mutaciones halladas en nuestros pacientes puso de manifiesto el impacto potencial de las sustituciones en la proteína, mostrando coherencia entre sí y su posible efecto patógeno. Además, estos resultados son consistentes con el fenotipo observado en los pacientes. Por lo tanto, el uso de programas de bioinformática para predecir el efecto patógeno probable de estas sustituciones nos permite un mejor enfoque o reafirmación del fenotipo clínico / bioquímico.

Analizando los resultados conjuntos de los datos obtenidos con los programas empleados es posible destacar que la mutación **c.386G>A** resulta ser la más tolerada a nivel proteico, conservando una relativamente alta accesibilidad al solvente (aprox 60%) respecto a la proteína normal, sumado al hecho de la naturaleza básica compartida por ambos aminoácidos, explicaría

la presentación tardía manifestada por el paciente y la ausencia de descripciones a nivel mundial de mujeres sintomáticas con esta alteración (Tabla 5). Por otra parte, la mutación **c.533C>T** sería considerada la más perjudicial de la serie por su estricta conservación en todas las especies analizadas y los puntajes obtenidos en todos los análisis computacionales, correlacionándose en forma precisa con la manifestación de nuestro paciente, hallada en una portadora sintomática gravemente afectada con un hermano fallecido en el período neonatal y habiéndose reportado previamente con una presentación neonatal severa.

Tabla 5. Análisis bioinformático de las mutaciones D-OTC

Pac	Cambio de nucleótido	Aminoácido	Observación	Polyphen		SIFT		PoPMuSiC		Presentación	Reporte previo	Conservación del Residuo afectado
				score	prediction	score	prediction	acc ste(%)	$\Delta\Delta G(\text{kcal/mol})$			
1	delExon 2-10									Mujer		
2	c.216+1G>A		error en sitio de splicing							Tardía	Tardía	
3	c.386G>A	p.Arg129His	CpG dinucleótido, error en sitio de	0.495	PROBABLEMENTE PERJUDICIAL	0.00	AFECTA FUNCIÓN PROTEICA	59.77	0.45	Tardía	Tardía	Conservado en 8 especies
4	c.452T>G	p.Leu151Arg		0.995	PROBABLEMENTE PERJUDICIAL	0.00	AFECTA FUNCIÓN PROTEICA	1.55	2.29	Mujer	Mujer	Conservado en 10 especies
5	c.533C>T	p.Thr178Met		0.999	PROBABLEMENTE PERJUDICIAL	0.00	AFECTA FUNCIÓN PROTEICA	1.97	0.14	Mujer	Neonatal	Conservado en 12 especies
6	c.540+1G>A		error en sitio de splicing							Mujer		
7	c.622G>A	p.Ala208Thr	CpG dinucleótido	0.996	PROBABLEMENTE PERJUDICIAL	0.00	AFECTA FUNCIÓN PROTEICA	1.69	0.24	Tardía	Tardía	Conservado en 7 especies
8	c.829C>T	p.Arg277Trp	CpG dinucleótido, aumento Km para ornitina	0.997	PROBABLEMENTE PERJUDICIAL	0.00	AFECTA FUNCIÓN PROTEICA	1.95	1.34	Tardía	Tardía	Conservado en 11 especies

La validación de las mutaciones missense e inserción/delección halladas muestra una fuerte correlación con el fenotipo clínico y bioquímico observado en los pacientes con D-OTC.

Respecto al tratamiento de estos pacientes es importante destacar que aquellos que sobrevivieron a las crisis hiperamonémicas se encuentran bajo dieta hipoproteica controlada, tratamiento con quelantes de amonio y suplementación de aminoácidos esenciales según las recomendaciones internacionales (Haerberle y col., 2012) e individualidad de cada paciente.

Los pacientes D-OTC diagnosticados son controlados rutinariamente por lo que fue posible hacer un seguimiento y analizar la evolución de los mismos tal como se grafica en la Figura 9.

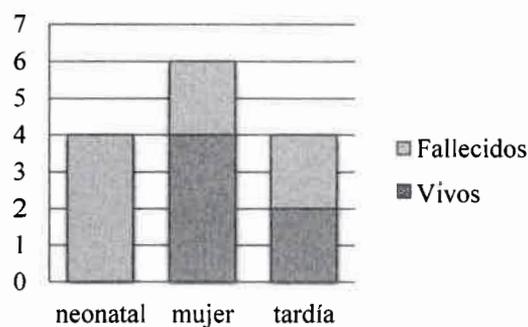


Figura 9. Representación de mortalidad de pacientes D-OTC según forma de presentación y n° de pacientes.

Como es posible observar en la Figura 9, aquellos individuos D-OTC que manifestaron la deficiencia en el período neonatal fallecieron sin poder revertir el cuadro, los varones que presentaron una forma tardía tuvieron una supervivencia del 50%, y por último, las mujeres sintomáticas presentaron un inicio tardío pero fatal en el 33% de los casos.

Así, se remarca la importancia del diagnóstico precoz, la instauración temprana del tratamiento y el adecuado control y seguimiento del paciente, con objeto de evitar las grandes crisis que provocan gran daño neurológico y muchas veces resultan irreversibles.

CAPÍTULO 2

DEFICIENCIA EN ARGININOSUCCINATO SINTETASA (D-ASS)

INTRODUCCIÓN

La Argininosuccinato sintetasa (ASS) es una enzima citosólica del ciclo de la urea, que se expresa en los hepatocitos peri-portales del hígado, como también en la mayoría de los tejidos corporales. La enzima está involucrada en la síntesis de arginina y cataliza la condensación de citrulina y aspartato a argininosuccinato con consumo de una molécula de ATP.

La ASS pertenece a la superfamilia alfa adenina nucleótido hidrolasas las cuales incluyen por ejemplo ATPasas de tipo N, proteínas de respuesta al estrés ATP sulfurilasas y la flavoproteína de transferencia de electrones. La enzima homotetramérica se compone de monómeros de 45kD cada uno y usualmente presenta tres dominios (Figura 10): dominio de unión a nucleótidos conteniendo una secuencia consenso “tipo N” ATP fosfatasa, el dominio con actividad sintetasa y el dominio de oligomerización c-terminal (Engel y col., 2009).

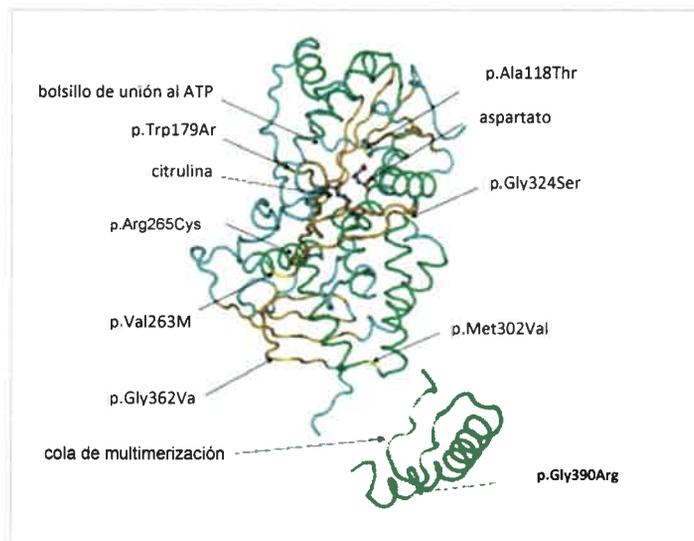


Figura 10. Modelo ASS de *E. coli* con mutaciones halladas en *Homo sapiens*. Las α -hélices en verde, cadenas β en marrón, y estructuras secundarias en turquesa. Los sustratos y motivos estructurales se hallan subrayados. El recuadro indica la mutación p.G390R. Modelo basado en la estructura de 1.6-Å de elevada resolución publicada por Lemke y Howell (2002), modificado. Alineamiento y modelación realizado con Cn3D (www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/CN3D/cn3d.shtml).

La deficiencia de ASS causa Citrulinemia tipo I (CTLN1), enfermedad metabólica genética con herencia autosómica recesiva que provoca una elevación extrema de la citrulina en plasma, con valores de 2000 hasta 5000 mmol/L (normal <40). Además, induce la acumulación

de glutamina y amonio, disminución de arginina, y aumento de la excreción de ácido orótico en orina (Haeberle y col., 2003).

La CTLN1 debe diferenciarse de la tipo II, en la cual la alteración molecular se presenta en el gen SLC25A13 que codifica para citrina, un transportador glutamato-aspartato localizado en la membrana mitocondrial; este defecto provoca una falla en el transporte desde y hacia la mitocondria, dando una hiperamonemia moderada y citrulinemia (Kobayashi y col., 1999).

La mayoría de los pacientes CTLN1 presentan sintomatología en el período neonatal con hiperamonemia aguda y sin un diagnóstico precoz puede conducir a encefalopatía, coma y muerte. El tratamiento permite apaciguar la crisis hiperamonémica, sin embargo luego de estos episodios los pacientes presentan secuelas con diversos grados de retraso en el desarrollo (Sander y col., 2003; Haeberle y col., 2002). También se han descrito formas leves o asintomáticas de la enfermedad en las cuales se observa citrulina sérica elevada pero no hiperamonemia (Dimmock y col., 2008), presentando metabolitos alterados pero no un fenotipo clínico, aunque se encuentran en riesgo de descompensación metabólica. Esta descompensación puede ser provocada por el aumento del estrés catabólico durante la enfermedad, lesión o en el período post-parto (Berning y col., 2008). El tratamiento, cuando se requiere, consiste en la restricción de proteínas en la dieta, la suplementación de arginina y otros aminoácidos esenciales, y el uso de quelantes de nitrógeno para permitir la desintoxicación del excedente nitrógeno por vías alternativas (Engel y col., 2009).

La deficiencia de la enzima ASS es provocada por mutaciones en el gen *ASS* (GenBank No.AY034076), el cual se localiza en el brazo largo del cromosoma 9, entre las bandas 9q34.11-9q34.12. El gen se compone de 16 exones y tiene una longitud de 63kb con un marco de lectura abierto de 1.259pb.

En la actualidad, más de 90 mutaciones dispersas entre los exones 3 y 15 han sido descritas en el gen *ASS*, siendo más frecuentes en los exones 5,12,13 y 14; éstas incluyen alteraciones en el sitio de splicing, deleciones y mutaciones “nonsense” y “missense” (Haeberle y col., 2003; Lee y col., 2013). La expresión “*in vitro*” de las cepas de tipo salvaje y mutantes, así como el análisis computacional, revelaron la naturaleza deletérea de estas mutaciones. En general, el análisis funcional que investiga cómo las mutaciones afectan la función de la variante proteica es crítico no sólo para la comprensión de la patogénesis molecular, sino también para la interpretación de su importancia clínica y pronóstico del paciente.

El hallazgo de mutaciones deletéreas heredadas mediante las pruebas genéticas es fundamental para el diagnóstico, terapia, predicción del riesgo tanto de los pacientes como de su familia y el correcto asesoramiento genético.

Específicamente la sustitución en el codón 390 del exón 15 de GGC (gly) por AGG (arg) denominada p.G390R (c.1168G>A) (Figura 11) es la mutación más común descrita en casos de CTLN1 con fenotipo temprano/severo y en diferentes grupos étnicos (Engel y col., 2009; Lee y cols, 2013).

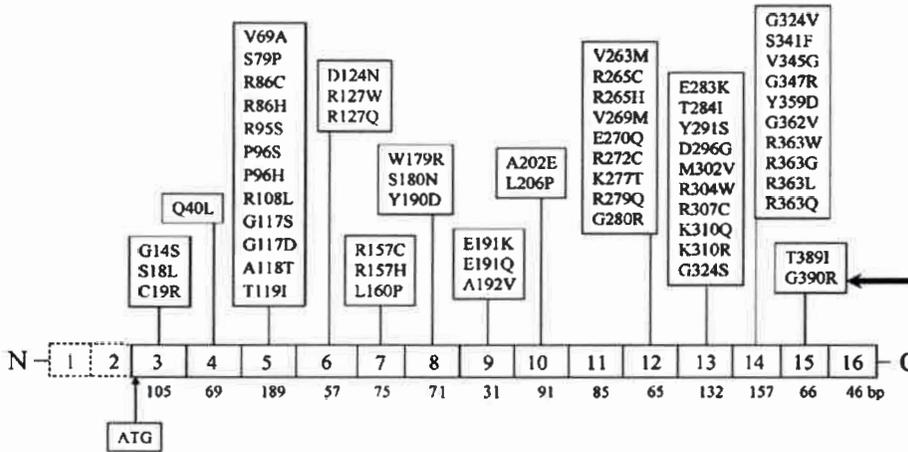


Figura 11. Mapa lineal del gen ASS con las mutaciones “missense” identificadas en sus respectivos exones. La mutación p.G390R se indica con una flecha negra. El tamaño de los exones se indica bajo cada cuadro (Engel y col., 2009).

El residuo G390 se halla estrictamente conservado en todas las secuencias génicas homólogas reportadas del gen ASS, se encuentra localizado en la α -hélice 12, afectando el comienzo de la hélice C terminal, importante para el contacto intermolecular de las colas de multimerización (Figura 10). Berning y col. (2008), realizaron estudios de expresión bacteriana “*in vitro*” de varias proteínas ASS mutantes demostrando que la variante p.G390R bloquea cualquier actividad enzimática de la ASS (Figura 12).

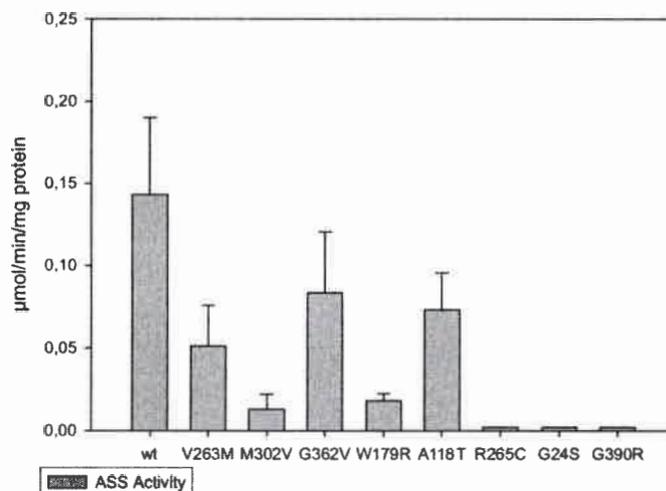


Figura 12. Actividad específica y desvío estándar del fenotipo wt y variantes de la ASS (Berning y col., 2008; modificado).

La experiencia de CEMECO en el reconocimiento de patologías en el ciclo de la urea, permitió realizar el diagnóstico clínico-bioquímico de pacientes afectados con CTLN1; con elevado número de casos pertenecientes a la misma área geográfica en la provincia de San Luis. El estudio molecular realizado en estas familias afectadas reveló igual mutación: p.G390R (c.1168G>A), sustitución descrita anteriormente de mayor prevalencia a nivel mundial (Engel y col., 2009).

A partir de estos datos y con objeto de conocer la incidencia de la mutación en la zona de riesgo, el análisis molecular se amplió a 26 familiares y 172 voluntarios sanos no emparentados de la ciudad de Villa Mercedes, Provincia de San Luis. La frecuencia de portadores se estimó de aproximadamente 1/25 habitantes, lo que sugiere una incidencia de CTLN1 de 1 persona afectada por cada 2.427 nacimientos (Laróvere y col., 2012), una cifra considerablemente mayor a estimaciones mundiales de 1:57.000 nacimientos (Brusilow y Horwich, 2001).

Estos resultados permitieron especular sobre la existencia de un “cluster” o grupo poblacional con una raíz ancestral genética común y causal de una frecuencia inusual observada en esa área geográfica delimitada (Laróvere y col., 2009), por lo que se ha considerado de relevancia estudiar familias afectadas e investigar respecto a la posible subestructuración poblacional/ grado de endogamia de la Prov. de San Luis portadora de la mutación p.G390R-ASS.

Subestructura Poblacional

De acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg, en una población infinitamente grande y bajo panmixia, los individuos se aparean al azar y no se hallan biológicamente relacionados: la población se dice que está en equilibrio. Sin embargo, por razones sociales y culturales entre otras, las poblaciones humanas tienden a escapar de las condiciones de equilibrio, de modo que en poblaciones finitas todos los individuos tienen un cierto grado de consanguinidad.

Los coeficientes de endogamia (F) y de apareamiento consanguíneo generalmente se infieren a partir de encuestas en la población (registro civil, pacientes hospitalizados, encuestas escolares, etc.) o estudios de pedigrí. La prevalencia global de endogamia se basa en la frecuencia de matrimonios entre parientes, por lo general hasta primos segundos (Bittles y Black, 2010) (Consanguinidad global sitio web: www.consang.net). Más recientemente se comenzó a estudiar el grado de consanguinidad mediante análisis de SNPs en todo el genoma, comprobando la existencia de una significativa homocigosis en el genoma, por encima de 4 o 5 MB en diferentes poblaciones y en sujetos sin antecedentes de consanguinidad en las últimas cinco a diez generaciones (Bittles, 2010; Mac Quillan y cols, 2008; Simon Sanchez y cols, 2007; Leuteneger y col., 2011) concluyeron que la determinación de F basada en genealogías y en datos genómicos son complementarios y su comparación a nivel local o regional puede proporcionar resultados diferentes.

Determinación de la frecuencia de marcadores SNPs autosómicos

El diseño del estudio caso-control con individuos no relacionados ha demostrado ser un enfoque válido para el estudio de estratificación poblacional, siempre que el locus marcador se encuentre disociado del locus candidato de ser susceptible a enfermedad. Cuando la subdivisión poblacional está presente es posible encontrar asociaciones estadísticas entre marcadores fenotípicos de una enfermedad y marcadores arbitrarios que no tienen vinculación física con el loci causativo (Ewens y Spielman, 1995). Tales asociaciones se producen porque la subdivisión de la población (o cualquier otra forma de apareamiento no aleatorio) permite que las frecuencias del alelo marcador varíen entre los segmentos de la población, como resultado de la deriva genética o efectos fundadores (Slatkin, 1991). Una enfermedad que es más prevalente en una subpoblación se asocia con cualquier alelo que está en alta frecuencia en esa subpoblación, sin relación del alelo con la enfermedad.

Es bien sabido que las frecuencias de los alelos de loci marcadores al azar pueden diferir entre los grupos étnicos (Cavalli-Sforza y col. 1994). Por esta razón, si los casos y controles en un estudio de mapeo de genes contienen diferentes mezclas de grupos étnicos, habrá que esperar a encontrar un patrón consistente de diferencias de frecuencia alélica entre los casos y controles, en muchos loci en todo el genoma. Por el contrario, si los casos y los controles pertenecen a un mismo grupo étnico, las diferencias de frecuencia alélica significativas deben estar ubicadas cerca del locus de susceptibilidad a enfermedad.

Si la estratificación está presente, los marcadores disociados deberían también mostrar asociaciones con el fenotipo. Esta idea forma la base de nuestra prueba para la estratificación. En este trabajo se describe la población como "estratificada" si las frecuencias de los marcadores bialélicos en casos y los controles no coinciden; es decir, contienen diferentes proporciones de cada grupo poblacional, o contienen diferentes fracciones de la ascendencia de cada subpoblación ancestral. Por el contrario, no consideraremos que la población se encuentra estratificada si las frecuencias de los marcadores en casos y controles son similares.

Mediante el estudio basado en análisis de patrones en las frecuencias de SNPs autosómicos, es posible detectar estructuración poblacional a diferentes escalas. Los SNPs autosómicos son SNPs bialélicos que muestran grandes diferencias en las frecuencias entre las diferentes poblaciones humanas, y por lo tanto tienen valores F_{st} muy altos (Mao y col., 2007) debido al aislamiento ocurrido por periodos de tiempo prolongados (Clark y col., 2003; Shriver y col., 2003). Es por ello que pueden ser empleados para estimar la ancestría biogeográfica al nivel de población, subgrupo (casos-control) e individual (Gayden y col., 2008) así como también detectar estructuración poblacional (Galanter y col., 2012).

En la actualidad las poblaciones de Latinoamérica no son homogéneas y por tanto existe una notable estructuración poblacional, con grupos en los que se puede rastrear la ancestría a diferentes poblaciones fuente, cada una con diferentes grados de desarrollo (Bryc y col., 2010; Wang y col., 2008). Es así que el estudio conjunto de tres polimorfismos conocidos de ser polimórficos en la población argentina nos puede dar un indicio del grado de aislamiento de la población de Villa Mercedes. Por otra parte, es posible analizar todos los marcadores empleando programas estadísticos para calcular el grado de endogamia y/o parentesco en las poblaciones estudiadas.

Estudio de isonimia como mejor aproximación al grado de endogamia.

Los apellidos, como los nombres, son rasgos culturales. En la mayoría de las sociedades, los apellidos se difunden patri y/o matrilinealmente a través de un mecanismo vertical comparable a la transmisión genética, en tanto los nombres lo hacen horizontalmente de un modo similar a la transmisión epidémica o endémica (Guglielmino y col., 1991). Debido a estas características, los apellidos se comportarían como marcadores genéticos, constituyendo una variable sociocultural universal, limítrofe entre la evolución biológica y cultural (Manrubia y Zanette, 2002).

Los apellidos pueden homologarse a un locus con múltiples alelos y su distribución en una población se ajustaría, en general, a la de los alelos selectivamente neutros. Están afectados los efectos de la migración y el flujo génico (Barrai y col., 1987), no confiriendo ventajas selectivas a quienes los portan (Zei y col., 1983).

La utilización de los apellidos como marcadores genéticos ofrece ventajas y desventajas. Entre las primeras se destacan su riqueza informativa, su obtención fácil, rápida y económica, tanto en poblaciones actuales como históricas y la posibilidad de disponer de muestras de gran tamaño, cubriendo vastos conjuntos poblacionales. Entre las desventajas se destaca el hecho de que debido a que los apellidos no constituyen una variable estrictamente biológica, pueden estar sometidos a influencias culturales que se manifiestan por el polifiletismo (no todas las personas que portan el mismo apellido desciende del mismo ancestro común). Además, al igual que los genes, los apellidos tienen la probabilidad de cambiar o mutar a lo largo del tiempo. Pueden darse variaciones en la grafía o pronunciación o quebrarse el vínculo entre el linaje biológico y el nombre de familia, generalmente por ilegitimidad o adopción.

No obstante las restricciones impuestas por estas desventajas y la imposibilidad de cumplir con los supuestos teóricos previamente enunciados, los apellidos constituyen un recurso metodológico esencial de la bioantropología y la genética de poblaciones humanas. Al disponer de los apellidos de toda la población, permiten una visión global del comportamiento genético y demográfico, que no siempre es posible lograr con otros métodos más costosos, lentos o difíciles a aplicar a un número significativo de individuos (Pinto Cisternas y Castro de Guerra, 1988).

La antroponimia representa una medida relativa y no absoluta de la afinidad biológica inter o intrapoblacional, constituyendo una excelente aproximación de la estructura genética subyacente. El coeficiente de consanguinidad (F) equivale a la probabilidad de que un individuo

reciba dos alelos idénticos por descendencia en un locus dado. En otras palabras, F representa la proporción de genes para el cual un sujeto es homocigoto. Habitualmente se consideran como consanguíneas las uniones entre personas relacionadas hasta el nivel de primos segundos ($F=0,0156$). Se elige este límite arbitrario porque la influencia genética en los matrimonios entre parejas con un grado menor de consanguinidad podría diferir muy poco de la observada en la población general o entre individuos no relacionados. Pese a que se proporciona una considerable atención al rol de los casamientos consanguíneos como factor causal de trastornos genéticos, la influencia potencial de la endogamia de las poblaciones sobre los niveles globales de homocigosidad permanecen subestimados (Bittles, 2005).

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes/población estudiada

- *Pacientes compatibles con D-ASS.* En el laboratorio se procesaron muestras provenientes de sujetos con sospecha clínica de DCU. Los síntomas clínicos de estos pacientes incluyen letargo, falta de apetito, vómitos persistentes, convulsiones intratables, alteraciones neurológicas inexplicables, retraso del desarrollo, coma, neurodegeneración, disfunción recurrente del hígado inexplicable o colestasis.
- *Miembros de familias afectadas.* Con el objeto de ampliar el análisis molecular-genealógico en las familias estudiadas y/o diagnosticadas con CTLN1 en CEMECO, varios parientes cercanos a las mismas accedieron a que se les realice el análisis genético. Al estar estos individuos directamente relacionados con personas afectadas, no se consideran parte del *muestreo poblacional* ya que no serían voluntarios aleatorios sino que pertenecen a un grupo específico. Así mismo, además de la toma de muestras, también se les realizó el cuestionario de información genealógica para obtener datos respecto a los sucesos de muertes de neonatos en la familia.
- *Muestreo poblacional.* El grupo de individuos estudiados de la población general comprendieron sujetos sanos, sin diagnóstico previo de CTLN1 en la familia, donantes voluntarios de sangre pertenecientes a la zona problema representada por habitantes de la ciudad de Villa Mercedes al este de la Prov. de San Luis. Los criterios de inclusión-exclusión se circunscribieron a hombres y mujeres (entre 20 a 50 años) que hayan contribuido o tengan posibilidad de contribuir al “pool génico” de la región en cuestión, con esto se evita la superposición generacional y delimita el grupo a personas que habiten en la localidad habiendo nacido allí y que al menos dos generaciones ancestrales pertenezcan a la misma. Para que la muestra poblacional pueda ser considerada independiente o cuasi aleatoria se excluyeron del estudio familiares directos de otros voluntarios para evitar sobre o sub-estimar la frecuencia de la mutación en la población, incluyéndose en el estudio el familiar de mayor edad.

Análisis bioquímico

- a. Determinación de aminoácidos plasmáticos y urinarios mediante HPLC como se ha descrito previamente.
- b. Determinación de amonio plasmático por espectrofotometría.

c. Determinación de ácido orótico en orina por HPLC.

Análisis molecular

a. **Extracción de ADN.** La extracción de ADN genómico se realizó a partir de sangre entera según la técnica previamente descrita.

b. **Análisis de la Mutación p.G390R por digestión con *MspI*.** El exón 15 y las correspondientes secuencias intrónicas flanqueantes del gen *ASS* se amplificó por PCR. En la tabla 6 se indican las características de la PCR. Las condiciones de ciclado fueron desnaturalización inicial de 1 min a 96°C, seguido de 1 min de templado a 56°C, y luego se permite la extensión por 1 min a 72°C, se repite el ciclo unas 30 veces hasta una extensión final de 7 min a 72°C.

Tabla 6. Amplificación del exón 15, gen *ASS1*.

Fragmento amplificado	Secuencia de oligonucleótidos	Producto de PCR	Temperatura de hibridación
Exón 15 y uniones exón-intrón	5' TGCTCTGGTTGGTGGAAAT 3' 5' AGATGGACAGGAAAGTGGG 3'	541 pb	56°C

La presencia de la sustitución G>A en el nucleótido 1168 del ADNc del gen de la argininosuccinato sintetasa (p.G390R) se determina mediante el corte con la enzima *MspI* o en su defecto con su esquizómero *HpaII*, ya que la mutación elimina el sitio de escisión correspondiente. El producto de digestión del fragmento de 541pb perteneciente al exón 15 y sus respectivas uniones a secuencias intrónicas flanqueantes se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%. El alelo normal presenta un sitio de corte, generando dos fragmentos (356 y 185pb), mientras que el alelo mutado pierde el sitio de reconocimiento de la enzima dando un solo fragmento de 541pb.

c. Investigación de la Mutación recurrente c.79T>C (p.Gln27*)

El exón 3 del gen *ASS* (110pb) y las correspondientes secuencias intrónicas flanqueantes se amplificaron por PCR. En la tabla 7 se indican las características de la PCR. Las condiciones de ciclado fueron: desnaturalización inicial 1 min a 96°C, 1 min de templado a 58°C, y extensión 1 min a 72°C, 30 ciclos y extensión final de 7 min a 72°C.

Tabla 7. Amplificación del exón 3, gen ASS1

Fragmento amplificado	Secuencia de Oligonucleótidos	Producto de PCR	Temperatura de Hibridación
Exón 3 y uniones exón-intrón	5' TCAGGTTGTTCCCTCGACTCC 3' 5' AAGTTCACCTTCTGTGCCCTCC 3'	405 pb	58°C

El fragmento obtenido por PCR es posteriormente purificado empleando el kit de purificación Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Amersham, UK) y secuenciado. El análisis de las secuencias fue realizado sobre el producto de PCR purificado empleando los oligonucleótidos sentido y antisentido, se incluyen controles positivo y negativo.

d. Determinación de la frecuencia de marcadores SNPs autosómicos

Con objeto de conocer el grado de endogamia y existencia de un alelo fundador en la población de riesgo de CTLN1, se realizó un análisis de polimorfismos autosómicos: Se analizaron 3 marcadores polimórficos a saber: T1405N del gen de la Carbamilfosfato sintetasa (*CPS1*), C677T del gen de la Metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*), y 844ins68pb en el gen de la Cistationina β sintetasa (*CBS*). Cada cambio se estudió en un total de 400 alelos, se estimó la frecuencia de los mismos en la población de estudio y se contrastó estadísticamente con la frecuencia obtenida en la población control para identificar la desviación de las frecuencias esperadas del equilibrio Hardy- Weinberg si existiese una supuesta sub-estructura poblacional.

- Estudio del polimorfismo T1405N- *CPS1* se realizó mediante amplificación por PCR del exón 36 y regiones colindantes del gen *CPS1* con una longitud de 571 pb y corte con la enzima *AciI* (New England Biolabs) que reconoce el sitio alterado por el polimorfismo dando dos fragmentos de 416pb y 155pb que se visualizaron luego de la corrida electroforética en gel de agarosa al 2% (Summar, 1998).

- Estudio del polimorfismo C677T-*MTHFR* (Frosst y col, 1995) se abordó mediante PCR y ensayo de restricción enzimática. La región amplificada fue de 198 pb y se sometió a posterior digestión con la enzima de restricción *HinfI* (New England Biolabs). El sitio de reconocimiento de *HinfI* se representa por la presencia del alelo T que produce dos fragmentos de 175 y 23 pb mientras que la presencia del alelo C está representada por el fragmento que permanece sin cortar de 198bp. Los fragmentos se separan por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6% y luego se visualizan bajo luz UV.

▪ Investigación de la inserción 844ins68pb en el gen de la Cistationina β sintetasa (*CBS*) (Urreizti y col, 2003) se llevó a cabo mediante amplificación por PCR del exón 8 del gen CBS con cebadores específicos que dan un producto de 254pb (ausencia de la inserción) y de 322pb (presencia del polimorfismo). El producto de PCR se separó por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6% y luego se visualizó bajo luz UV.

▪ El cálculo estadístico de las frecuencias alélicas, el test de equilibrio de HW, la estimación de las distancias genéticas poblacionales “pairwise” FST, y el análisis de varianza molecular (AMOVA) se efectuaron con dos softwares de libre acceso:

- ✓ Genetic Analysis in Excel, GenAlEx (<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>) paquete estadístico para realizar análisis genéticos complejos mediante la comúnmente usada interfase de Microsoft Excel. Este programa permite el cálculo de análisis tales como AMOVA, comparaciones con otros tipos de estadísticos relacionados como ser el valor F o índices de Shannon, entre otros (Peakall y Smouse, 2012).
- ✓ FSTAT (<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>) programa empleado para estudiar la diferenciación genética de las poblaciones empleando el índice de fijación de Wright Fst, en función del déficit de heterocigotas en la población de estudio (Goudet, 1995).

e. Cálculo y análisis espacial de la endogamia por isonimia al azar

En este tópico se analiza la distribución espacial de la endogamia y potencial aislamiento en San Luis mediante isonimia aleatoria (FST) para intentar explicar la alta frecuencia de portadores de la mutación en la zona de riesgo. Se realizó la comparación en la distribución de apellidos de las familias afectadas en el área de San Luis, en comparación a otras poblaciones. Este trabajo se realizó en forma colaborativa con la Dra. Virginia Ramallo, Doctora en Ciencias Naturales del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) CICPBA, CCT-CONICET, con vasta experiencia en el estudio en genética de poblaciones aisladas. Se adjunta el trabajo completo en el Anexo I para mayor información respecto a los fundamentos y metodología detallada empleada en este tópico.

Fuente de datos: La información concerniente a los apellidos provino del Padrón Electoral actualizado al año 2015, incluyendo a 334.603 votantes distribuidos en los 9 departamentos de la provincia de San Luis. Estas listas fueron proporcionadas por la Cámara Nacional Electoral.

La información demográfica proviene del Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010 - Censo del Bicentenario, desarrollado por la Dirección Provincial de Estadística y Censos de San Luis, conjuntamente con el INDEC (portal de acceso <http://www.estadistica.sanluis.gov.ar/>).

Agrupamiento y ordenamiento de los apellidos: Utilizando los programas Microsoft Excel y SPSS, los apellidos de varones y mujeres en conjunto se analizaron a tres niveles: por Departamento, por Municipio, y por Sección Electoral. Para Argentina se usó la base de datos del Padrón Electoral y a nivel mundial se utilizó la herramienta on-line <http://forebears.io/surnames>.

Análisis de la estructura genética de la población: En base a la distribución de los apellidos en cada departamento, municipio o sección, se determinó la Isonimia al Azar No Sesgada (INS), de acuerdo a Morton (1973)

$$INS = \sum k (n_{ik} / N_i)^2 - (1 / N_i)$$

n_{ik} = frecuencia absoluta del apellido k en la población i

N_i = número total de individuos de la misma población ($\sum n_{ik}$)

Cálculo de la abundancia de apellidos o indicador Alfa de Fisher (a): Este indicador mide el número efectivo de apellidos de una población. Se observan valores altos en poblaciones en expansión, donde hay un importante flujo de inmigrantes, mientras que valores bajos se dan en comunidades aisladas con alta deriva génica. En este trabajo se utilizó la fórmula de Barraí y col., (1992), donde:

$$a = 1 / INS$$

Cálculo de la consanguinidad de una población: El coeficiente de consanguinidad se calculó a partir de una derivación de la fórmula de Crow y Mange, que representa la consanguinidad como expresión de la isonimia de las uniones al azar o isonimia no sesgada.

$$F = INS / 4$$

Indicadores de aislamiento y sedentarismo: Siguiendo a Rodríguez-Larralde (1990), se calcularon los índices A y B. El primero representa el porcentaje de la población que es el único portador de su apellido y el segundo el porcentaje de la población que está incluido en los 7 apellidos más frecuentes.

Mapas y georreferenciamiento: Para la elaboración de los mapas se utilizó la herramienta on-line de Google y el programa Corel-DRAWX3R (Corel Corporation, Ottawa, Canada) para la creación y edición de todas las imágenes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A) Pacientes D-ASS

En el desarrollo de este trabajo, se han identificado 18 pacientes pertenecientes a 15 familias de diversas localidades (Tabla 8), observándose alta incidencia en familias de una determinada región. De los 17 casos con deficiencia de ASS, 58,8% (11) eran mujeres y el 41,2% (7) varones. La edad media de inicio de síntomas fue de 2 días en formas neonatales y de 30 días en las formas tardías (16d-45d).

Tabla 8. Pacientes CTLN1 diagnosticados en CEMECO

FLIA	PAC	PRESENTACIÓN	DIAGNÓSTICO	MUTACIÓN	AMINOÁCIDO	EDAD INICIO	OBS	PROCEDENCIA
I	1	Neonatal	Clínico / Bioquímico Molecular en padres	c.1168G>A	p.Gly390Arg	48-72hs	Fallecido	San Luis
	2	Neonatal	Clínico / Bioquímico Molecular	c.1168G>A	p.Gly390Arg	48-72hs	Fallecido	San Luis
II	3	Neonatal	Clínico / Bioquímico Molecular en padres	c.1168G>A	p.Gly390Arg	48-72hs	Fallecido	San Luis
III	4	Neonatal	Clínico / Bioquímico Molecular en padres	c.1168G>A	p.Gly390Arg	48-72hs	Fallecido	Villa Mercedes, San Luis
IV	5	Neonatal	Clínico / Bioquímico Molecular en padres	c.1168G>A	p.Gly390Arg	48-72hs	Fallecido	Sta Rosa de Conlara, San Luis
	6	Neonatal	Clínico / Bioquímico Molecular en padres	c.1168G>A	p.Gly390Arg	48-72hs	Fallecido	Sta Rosa de Conlara, San Luis
V	7	Neonatal	Clínico / Bioquímico Molecular en padres	c.1168G>A	p.Gly390Arg	48-72hs	Fallecido	San Luis
VI	8	Neonatal	Clínico / Bioquímico Molecular en padres	c.1168G>A	p.Gly390Arg	48-72hs	Fallecido	Villa Mercedes, San Luis
VII	9	Neonatal	Clínico / Bioquímico Molecular en padres	c.1168G>A	p.Gly390Arg	48-72hs	Fallecido	Mar del Plata
VIII	10	Neonatal	Clínico / Bioquímico Molecular	c.1168G>A	p.Gly390Arg	48-72hs	Fallecido	San Luis
	11	Neonatal	Clínico / Bioquímico Molecular	c.1168G>A	p.Gly390Arg	48-72hs	Fallecido	San Luis
IX	12	Neonatal	Clínico / Bioquímico Molecular	c.1168G>A	p.Gly390Arg	48-72hs	Fallecido	San Luis
X	13	Neonatal	Clínico / Bioquímico Molecular en padres	c.1168G>A	p.Gly390Arg	48-72hs	Fallecido	Mendoza
XI	14	Neonatal	Clínico / Bioquímico Molecular en padres	c.1168G>A	p.Gly390Arg	48-72hs	Fallecido	Villa Mercedes, San Luis
XII	15	Tardía	Clínico / Bioquímico Molecular	c.79T>C / c.847G>A	p.Gln27* / p.Glu283Lys	45d		Córdoba Capital
XIII	16	Tardía	Clínico/Bioquímico Molecular	c.79T>C / c.970G>A	p.Gln27* / p.Gly324Ser	16d	Fallecido	Capilla de los Remedios, Córdoba
XIV	17	Neonatal	Clínico/Bioquímico Molecular en Padres	c.1168G>A	p.Gly390Arg	48-72hs	Fallecido	Villa Huidobro, Córdoba
XV	18	Neonatal	Clínico/Bioquímico Molecular	c.1168G>A	p.Gly390Arg	48-72hs	Fallecido	San Luis

La forma principal de manifestación observada fue la severa, con sintomatología en las primeras horas de vida y muerte en el período neonatal, dos casos se presentaron de forma tardía al mes de vida con crisis hiperamonémicas severas y descompensación metabólica. El deterioro neurológico pudo constatarse en uno de los pacientes que presentó una forma de inicio tardío, con deterioro cognitivo y del desarrollo, falleciendo al año y medio de edad (paciente 16).

El nivel de amonio promedio al comienzo de los síntomas fue de 800 $\mu\text{mol/L}$ (399-1400; VN= hasta 100 $\mu\text{mol/L}$ para niños de hasta 1 año de edad) y un nivel medio de glutamina de 1290 $\mu\text{mol/L}$ (213-3077; VN= 32-140 $\mu\text{mol/L}$). El valor de citrulina aumentado, característico de esta enfermedad, presentó un valor promedio de 3700 $\mu\text{mol/L}$ (1130-8500; VN= 16-32 $\mu\text{mol/L}$), mientras los niveles de arginina se conservaron dentro de los rangos normales (Tabla 9).

Tabla 9. Valores promedio de metabolitos ($\mu\text{mol/L}$) en pacientes D-ASS y rango normal.

	Amonio	Glutamina	Citrulina	Arginina
Control	<100	32-140	16-32	44-120
Pacientes	799,28	1292,7	3692,87	60,7

La determinación exacta del genotipo del gen de la ASS pudo ser realizada en todos los pacientes, en muchos casos de forma deductiva a partir del ADN de los padres heterocigotas para tal defecto molecular. El estudio molecular en 15 familias afectadas ha permitido identificar las alteraciones descritas en la Tabla 8: 13 de ellas presentaron la misma mutación en homocigosis **c.1168G>A** (p.Gly390Arg) la cual ya ha sido descrita con la forma severa neonatal presentada por todos los pacientes de la serie; y otras dos familias siendo heterocigotas compuestas con una misma mutación recurrente en un alelo que no había sido previamente reportada **c.79T>C** (p.Gln27*) y que altera la actividad ASS; cabe destacar que no existe ningún parentesco entre los pacientes portadores de esta mutación, ni consanguinidad de los padres. Las otras dos mutaciones que presentaron los heterocigotas fueron dos cambios missense previamente reportados **c.847G>A** (p.Glu283Lys) y **c.970G>A** (p.Gly324Ser).

El paciente 15 es heterocigota compuesto para dos mutaciones puntuales: una no previamente descrita en el exon 3, **c.79T>C** (p.Gln27*), que causa un codón de “stop” en el comienzo de la proteína [CAA(Glutamina)>T(U)AA(Codón Stop)] (Figura 13); y un cambio “missense” en el exon 13, **c.847G>A** (p.Glu283Lys), el cual fue descrito con anterioridad (Gao y col., 2003). El residuo p.Glu283Lys se encuentra altamente conservado en todas las proteínas

ASS y su cambio estaría afectando la estructura terciaria y/o cuaternaria de la enzima, involucrando las interacciones intermoleculares para el correcto plegamiento del dominio sintetasa que interactúa con la citrulina y la región putativa de unión a ATP. El paciente homocigoto descrito por Gao y cols (2003) presentaba un fenotipo severo. El análisis genético realizado en los padres del paciente reveló el estado heterocigota de ambos para cada mutación. Se especula que la coexistencia de estos dos alelos mutados (heterocigota compuesto) genera un cambio estructural importante en la enzima, explicando la presentación clínica del paciente como la intolerancia alimenticia a proteínas y las frecuentes descompensaciones metabólicas que sufre el niño aún bajo tratamiento con elevadas dosis de fenilbutirato de sodio.

	<u>Ex 3</u>
NORMAL	<pre> MSSKGSVVLAYSGLDTSCILVWLKEQGYDVIAYLANIGQKEDFEARKKALKLGAKKVFIEDVSREFVEEFIWPAIQSSALYE DRYLLGTSLARPCARKQVEIAQREGAKYVSHGATGKGNQVRFELSCYSLAPQIKVIAPWRMPEFYNRFKGRNDLMEYAKQ HGIPVPTPKNPWMDENLMHISYEAGILENPKNQAPPGLYTKTQDPAKAPNTPDILEIEFKKGVPVKVTNVKDGTTHTQTSLELF MYLNEVAGKHGVRGRIDIVENRFIGMKSRGIYETPAGTILYHAHLDIEAFTMDREVRKIKQGLGLKFAELVYTFWFHSPCECFVR HCIAKSQERVEGKQVSVLKGQVYILGRESPLSLYNEELVSMNVQGDYEPTDATGFININSLRLKEYHRLQSKVTAK Ter </pre>
MUTANTE	<pre> MSSKGSVVLAYSGLDTSCILVWLKEQ Ter </pre>
	<u>Ex 3</u>

Figura 13. Representación esquemática del cambio c.79T>C en la secuencia aminoacídica prevista. La mutación provoca un codón de stop [CAA(Glutamina)> T(U)AA(Codón Stop)] lo que produce la terminación prematura (Ter) de la proteína en el codón 27 de la ASS, en vez de la terminación madura en el codón 413. Los colores negro y azul se alternan para distinguir los exones codificantes.

Por otra parte, el paciente 16 es heterocigota compuesto para dos mutaciones puntuales: c.79T>C (p.Gln27*) en el exón 3, no descrita previamente en la bibliografía, causal de un codón de “stop” en el comienzo de la proteína y hallada en otro de nuestros pacientes (Paciente 15); y un cambio missense en el exón 13, c.970G>A (p.Gly324Ser), el cual fue descrito con anterioridad (Kobayashi y col., 1990). El cambio p.Gly324Ser (sustitución de serina (AGT) por glicina (GGT)), ha sido identificado exclusivamente en pacientes con un fenotipo severo. El residuo G324 es estrictamente conservado en todas las secuencias homólogas reportadas de ASS. Esta sustitución rompe la estructura helical de la α -hélice 10, impidiendo la unión de citrulina y aspartato (Lemke y Howell, 2001). Los sistemas de expresión bacteriana in vitro empleados para validar esta mutación muestran una actividad ASS nula (Berning y col., 2008). Se especula que la coexistencia de estos dos alelos mutados (heterocigota compuesto) genera un cambio estructural importante en la enzima, esperando ser más grave de lo que manifestaba la evolución clínica del paciente, con intolerancia alimenticia a proteínas, poco frecuentes descompensaciones metabólicas bajo tratamiento con benzoato de sodio y un buen manejo de los niveles de amonio plasmático, aunque con un retraso psicomotor-cognitivo importante. El paciente ingresa a terapia al año y medio de vida por una crisis hiperamonémica con un valor de amonio máximo de 480

μmol/lt, presentando hipotonía, epilepsia, vómitos y dificultad respiratoria; fallece tras cinco días de internación.

Investigación de la mutación recurrente c.79T>C (p.Gln27)*

Al hallarse una misma mutación en los pacientes 15 y 16 mencionados previamente, sin presentar parentesco aparente entre los progenitores y siendo el primer reporte de la misma en pacientes CTLN1, se decidió estandarizar la técnica para determinar la presencia del cambio en familiares de los pacientes afectados, así como en posibles futuros casos autóctonos. Fue posible amplificar la secuencia e identificar el nucleótido afectado, confirmado el diagnóstico molecular en el padre del paciente (Figura 14).

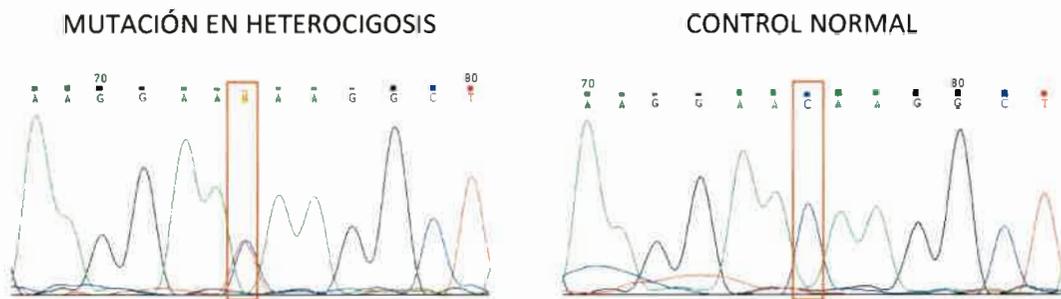


Figura 14. Secuencias obtenidas de un portador c.79T>C (p.Gln27*) y control normal.

El estudio molecular realizado en las familias afectadas con CTLN1 de un mismo área geográfica (Tabla 8) reveló igual mutación: p.G390R (c.1168G>A), sustitución descrita anteriormente de mayor prevalencia a nivel mundial (Engel y col., 2009). Analizando la genealogía de varias familias afectadas, tal como fue reportado por Laróvere y col. (2012), es posible señalar que hay una transmisión preferencial del alelo mutado frente al alelo normal (ver paper en Anexo II). La ocurrencia de la enfermedad en descendientes de parejas de riesgo es de 57,89%, frecuencia que duplica el porcentaje de embarazos esperados afectados según lo indicado en la primera ley de Mendel para una enfermedad autosómica recesiva. En relación a este hallazgo, Kleijer y col. (2006) demostraron una inesperada tasa de fetos afectados (39.5%) en embarazos con riesgo de Citrulinemia respecto al 25% esperado mediante segregación, lo que indica una transmisión diferencial el alelo mutado, con un radio distorsionado. Lewis y col. (1996) exponen que esta preferencia del alelo “citrulinémico” podría deberse a una selección positiva de la célula germinal masculina haploide que porta el gen ASS mutado. Los autores proponen que la causa de esto estaría relacionado a las concentraciones de óxido nítrico (ON) generado de forma endógena por el propio espermatozoide (la ASS es la enzima responsable de

la síntesis de ON), el cual a elevadas concentraciones afecta tanto la motilidad como la sobrevivencia de la célula germinal.

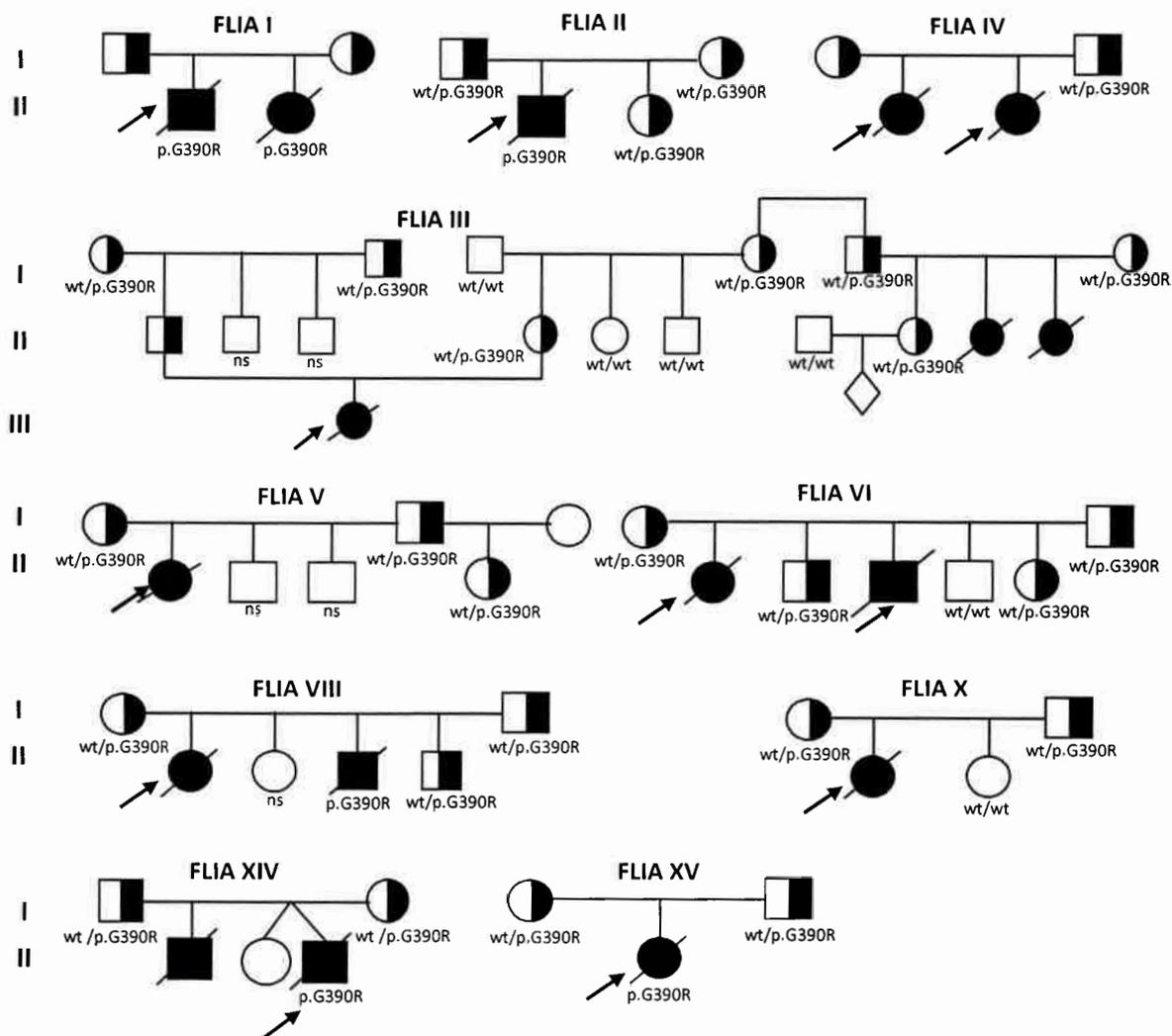


Figura 15. Árbol genealógico de las familias portadoras de la mutación p.G390R causal de CTLN1. Los probandos se indican con flecha. ns= no estudiado. Modificado de Laróvere y col. (2009).

Estos resultados permitieron especular sobre la existencia de un “cluster” o grupo poblacional con una raíz ancestral genética común y causal de una frecuencia inusual observada en ese área geográfica delimitada (Laróvere y col., 2012) (Figura 15), por lo que se ha considerado de relevancia estudiar familias afectadas. Además, la posible subestructura poblacional fue abordada mediante el estudio de marcadores bialélicos y análisis de isonimia en la población.

B) Investigación del grado de endogamia en la población de la Prov. de San Luis portadora de la mutación ASS1~p.G390R.

Este objetivo se ha cumplimentado mediante:

- I. Determinación de la frecuencia de marcadores SNPs autosómicos a través de métodos moleculares en:
 - a) Población de Villa Mercedes
 - b) Familias afectadas
- II. Estudio de isonimia como mejor aproximación al grado de endogamia.

I. a) Estudio de marcadores en la población de Villa Mercedes

El estudio comprende dos muestras de individuos al azar no relacionados: una muestra compuesta de 200 individuos de la población de riesgo de Villa Mercedes (VM) y una muestra compuesta de individuos no afectados de la población de Córdoba (N) (N=200).

Estudio del *polimorfismo T1405N-CPSI*. Tal como se observa en la tabla 10, no se halló desviación de las frecuencias entre ambas poblaciones con un valor de χ^2 muy pequeño (0,20) y la probabilidad mucho mayor a 0,05 considerada como punto de corte de significancia estadística.

Tabla 10. Test χ^2 de comparación de frecuencias T1405N- CPSI.

	VM	N	χ^2	Valor p
Frecuencia Genotípica				
AA	13	15	0,2	0,9062
AC	38	36		
CC	49	49		
Frecuencia Alélica				
A	64	66	0,05	0,83
C	136	134		

Estudio del *polimorfismo C677T-MTHFR*. Se tomó como frecuencias de control aquellas publicadas en bibliografía estimadas a partir de una población normal perteneciente a la Provincia de Córdoba (Grosso y col., 2010). No se observó desviación de las frecuencias entre ambas poblaciones (Tabla 11) con un valor de χ^2 de 1 y la probabilidad mucho mayor a 0,05 considerada como punto de corte de significancia estadística.

Tabla 11. Test χ^2 de comparación de frecuencias C677T-MTHFR.

	VM	N	χ^2	Valor p
Frecuencia Genotípica				
CC	11	15,2		
CT	41	42,4	1	0,6078
TT	48	42,4		
Frecuencia Alélica				
C	63	73		
T	137	127	1,11	0,29

Investigación de la inserción 844ins68pb en el gen de la Cistationina β sintetasa. Se tomó como frecuencias de control aquellas publicadas en bibliografía estimadas a partir de una población normal perteneciente a la Provincia de Córdoba (Grosso y col., 2010). No se observó desviación significativa de las frecuencias entre ambas poblaciones (Tabla 12) con un valor de χ^2 de 2,54 y la probabilidad mucho mayor a 0,05 considerada como punto de corte de significancia estadística.

Tabla 12. Test χ^2 de comparación de frecuencias 844ins68pb-CBS.

	VM	N	χ^2	Valor p
Frecuencia Genotípica				
insins	1	0		
inswt	5	10	2,54	0,2809
wtw	84	85		
Frecuencia Alélica				
ins	7	10		
wt	173	180	0,4	0,52

En el análisis conjunto de los tres marcadores bialélicos con FSTAT, es posible destacar que el locus *CPSI* tiene un valor alto de Fis (Rango [-1,1]; indicando exceso y deficiencia de heterocigotas, respectivamente) en las dos poblaciones (0,207 en Villa Mercedes y 0,116 en control), que si bien no son significativos ($p > 0,05$), estaría indicando que existe un exceso de homocigotas en ambas poblaciones (Tabla 13). Por otra parte también se denota que en la población de Villa Mercedes los valores Fis para *MTHFR* y *CBS* tienen valores negativos, mientras que en la población control esos mismos loci tienen valores positivos y el *ASS* es negativo, lo que indica un ligero exceso de heterocigotas respecto de HW. Esto es importante porque si bien el coeficiente de parentesco no difiere entre las dos poblaciones, podría indicar que en VM podría haber una tendencia a apareamientos no al azar, y se recomendaría seguir

estudiando esta población con marcadores microsatélites selectivamente neutros para intentar dilucidar esta tendencia.

Tabla 13. Resultados de FSTAT y GenAEx por locus y población

Marcador	CTRL	<i>Fis</i>		<i>Fst</i>	Valor p
		Valor p	VM		
<i>CPS1</i>	0,116	0,1	0,207	0	1
<i>MTHFR</i>	0,023	0,43	-0,009	0,003	0,258
<i>CBS</i>	0,262	0,11	-0,053	1	0,527
<i>ASS</i>	-0,034	1	NA	0,019	0,006

El software GenAEx permitió el cálculo del índice de fijación *Fst*, confirmando lo previamente evaluado con los test de X^2 ; el locus *ASS* presenta diferenciación genética significativa ($Fst=0,019$; $P=0,006$) mientras que en los otros 3 loci la diferenciación es mínima y no significativa (Fst *CPS1* 0; *MTHFR* 0,003; y *CBS* 0,001). Como es posible observar en la Figura 16, tanto la población de Villa Mercedes como la población control se encuentran en equilibrio, con valores del coeficiente de parentesco medios cercanos a cero lo que estaría indicando apareamientos al azar.

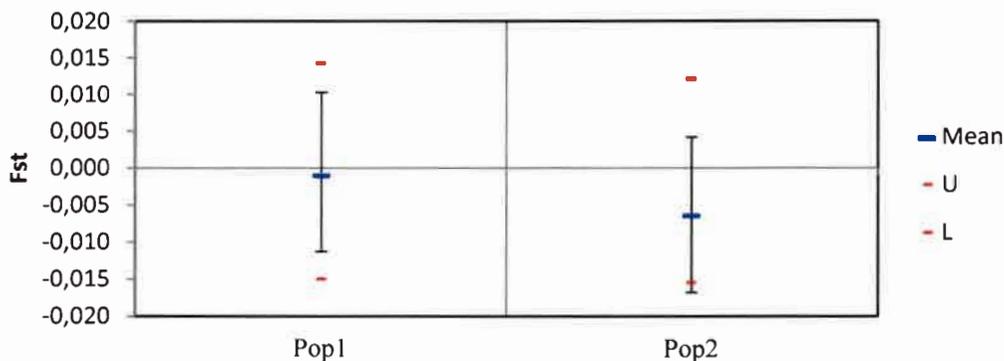


Figura 16. Esquema de los valores medios *Fst* de los marcadores estudiados en parejas de la población de Villa Mercedes (Pop1) y la población control (Pop2). Los guiones rojos indican los límites superior e inferior de endogamia promedio.

I. b) Estudio de marcadores en familias afectadas

El estudio comprende el análisis de marcadores polimórficos frecuentes en nuestra población en pacientes homocigotas para la mutación p.G390R-ASS y familiares de los mismos, y su comparación con una muestra control compuesta de individuos no afectados de la población de Córdoba. Para cada uno de los polimorfismos estudiados se realizó el análisis de 82 alelos

pertenecientes a las familias afectadas con CTLN1 y 200 alelos control de la población en general (N).

Estudio del *polimorfismo T1405N-CPSI*. Es posible observar una desviación de las frecuencias genotípicas entre ambas poblaciones (Tabla 14) con un valor de χ^2 muy significativo (20,6) y la probabilidad cercana a cero. Además también se encontró diferencias en las frecuencias alélicas ($p=6 \times 10^{-4}$).

Tabla 14. Test χ^2 de comparación de frecuencias T1405N- CPSI.

	CTLN1	N	χ^2	Valor p
Frecuencia Genotípica				
AA	19	15	20,6	<0,0001
AC	62	36		
CC	19	49		
Frecuencia Alélica				
A	100	66	11,9	0,0006
C	100	134		

Estudio del *polimorfismo C677T-MTHFR*. Existe una desviación de las frecuencias genotípicas entre ambas poblaciones (Tabla 15) con un valor de χ^2 de 6,3 y la probabilidad menor a 0,05 considerada como punto de corte de significancia estadística. Por el contrario, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre la población afectada y la control respecto a las frecuencias alélicas.

Tabla 15. Test χ^2 de comparación de frecuencias C677T-MTHFR.

	CTLN1	N	χ^2	Valor P
Frecuencia Genotípica				
CC	9	15,2	6,3	0,042
CT	60	42,4		
TT	31	42,4		
Frecuencia Alélica				
C	78	73	0,27	0,6
T	122	127		

Investigación de la inserción 844ins68pb en el gen de la Cistationina β sintetasa. No se observó desviación significativa de las frecuencias genotípicas ni alélicas entre ambas poblaciones ($p=0,16$) (Tabla 16).

Tabla 16. Test χ^2 de comparación de frecuencias *844ins68pb-CBS*.

	CTLN1	N	X ²	Valor p
Frecuencia Genotípica				
insins	0	0		
inswt	18	10	1,98	0,16
wtwt	82	85		
Frecuencia Alélica				
ins	18	10	2,04	0,15
wt	182	180		

El análisis conjunto de los marcadores en parejas de riesgo con GenAlEx permitió el cálculo del coeficiente de parentesco medio entre los padres de los niños afectados (0,25) y su comparación con la población control (0,006). Como es posible observar en la Figura 17, en la población control hallamos valores del coeficiente de parentesco medios cercanos a cero lo que estaría indicando apareamientos al azar, por el contrario, el promedio de parentesco entre progenitores de niños afectados con citrulinemia tipo I es de 0,25, valor muy alto considerando que el valor de parentesco entre padres a hijos o entre hermanos es de 0,5. Este resultado debe considerarse en el contexto de un mínimo número de marcadores empleado en sólo nueve familias, pero ya nos da un gran indicio de alto grado de consanguineidad en familias afectadas.

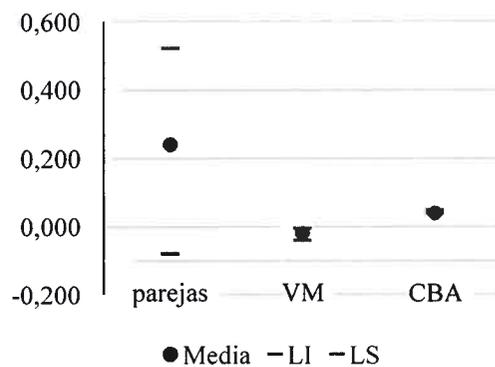


Figura 17. Parentesco medio con intervalos de confianza del 95% calculado por “bootstrap” con GenAlEx.

Analizando la información conjunta de los estudios realizados sobre estos marcadores polimórficos tanto en la población de riesgo de la ciudad de Villa Mercedes como en familias afectadas con CTLN1, es posible observar que:

1. No es posible definir a la población de la Ciudad de Villa Mercedes como endogámica;
2. Existe un alto grado de parentesco entre individuos pertenecientes a las familias afectadas.

Estos dos resultados podrían explicarse de ocurrir en simultáneo en la misma población por el hecho de que los progenitores de familias afectadas son procedentes de un "pool" génico ancestral común, a pesar de "no estar relacionados" en el sentido cultural. Adicionalmente, otro efecto que incrementaría la frecuencia de portadores en estas familias podría ser el modo de herencia del alelo mutado debido a la mencionada distorsión del radio de transmisión (Kleijer y col., 2006; Lewis y col., 1996) ya indicada de ocurrir en este grupo con incidencia de CTLN1 en descendientes de parejas de riesgo del 57,89%, con independencia del parentesco entre los padres (Laróvere y col., 2012).

I. Estudio de isonimia como mejor aproximación al grado de endogamia.

En este apartado se desarrolla de manera resumida los resultados obtenidos del estudio de isonimia para conocer el grado de endogamia, destacando las principales conclusiones, para acceder a resultados complementarios ver Anexo I.

Según la información demográfica, se incluyen en el estudio 334.603 votantes distribuidos en los 9 departamentos de la provincia de San Luis (Figura 18).

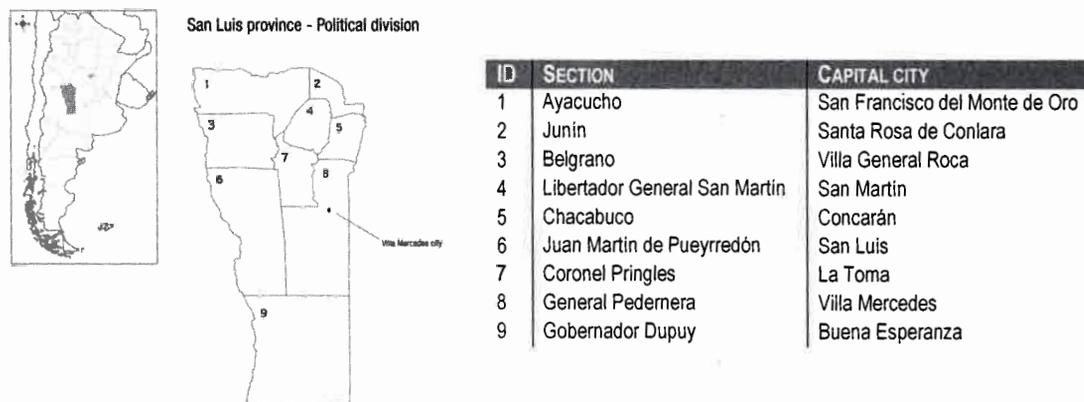


Figura 18. La provincia de San Luis en la geografía de Argentina. Los números de las secciones se corresponden con los datos de la Tabla de la derecha. Se destaca la ubicación de la ciudad de Villa Mercedes.

Según los datos la mayor concentración demográfica se da en los departamentos Juan Martín de Pueyrredón (204.019 habitantes) y Pedernera (125.899). El primero incluye la capital provincial, que es asiento de los poderes, de las funciones administrativas y un foco de atracción poblacional. A lo largo de la década analizada en el censo, Juan Martín de Pueyrredón tuvo una variación intercensal relativa del 20,9%, mientras que Pedernera fue del 13,6%. Este crecimiento se registró principalmente en la ciudad cabecera del departamento: Villa Mercedes.

Nivel departamental

La Tabla 17 presenta los resultados a nivel de departamento, incluyendo el número total de apellidos diferentes (S) y el de votantes (N). Este registro incluye a todos los habitantes mayores de 16 años con domicilio asentado en la provincia. Dependiendo de la conformación de la pirámide poblacional de cada departamento, el número final de votantes analizados se alejará en mayor o menor grado del número total de personas censadas.

Tabla 17. Índices calculados por departamento.

ID	INS	Alfa	F	A	B	N	S
1	0.0064	155	0.0016	6.22	13.64	15838	1786
2	0.0037	270	0.0009	14.13	9.99	23064	4961
3	0.0109	91	0.0027	10.44	20.46	3295	595
4	0.0120	83	0.0030	6.28	19.27	4157	439
5	0.0047	215	0.0012	7.97	10.36	16975	2246
6	0.0041	246	0.0010	7.16	10.94	155387	19447
7	0.0074	136	0.0018	9.92	16.34	10946	1736
8	0.0034	294	0.0008	6.25	9.79	95877	10759
9	0.0062	161	0.0016	8.00	14.67	9064	1325

INS (Isonimia no Sesgada), Alfa (Número Efectivo de Apellidos), F (Consanguinidad), A (Indicador de Sedentarismo), B (Indicador de Aislamiento), N (número total de votantes), S (cantidad de apellidos diferentes). ID se corresponden a la Figura 18.

Los valores calculados están en directa relación con el número de personas consideradas. Se espera que cuanto menor sea el N, menor será la diversidad de apellidos y los subsiguientes índices, pero veremos que esto no siempre se observa en San Luis. El valor de INS más alto fue de 0,0120, en el departamento de Libertador General San Martín (ID 4), lo que indica que en esta población la chance de recibir dos apellidos (o alelos) iguales de cada progenitor es alta. Aquí también se registra la consanguinidad más elevada (0,0030) y estos resultados se corresponden con la baja diversidad de apellidos (sólo 439 diferentes para todo el departamento) y el bajo valor de Alfa (83, el menor de toda la provincia). Sin embargo, el N considerado (4157 votantes) no es el más pequeño: el padrón electoral de Belgrano (ID 3) incluye solamente 3295 individuos.

Al analizar los valores más extremos de los índices A y B, observamos que no se registran en Libertador General San Martín. En el departamento de Junin (ID 2) se obtuvo un A de 14,13%. Recordemos que este porcentaje representa la cantidad de personas que son las únicas portadoras de un apellido y puede estar señalando tanto una expansión como un decrecimiento poblacional. Por otro lado, el valor más alto del índice B se registró en Belgrano (ID 3), con un porcentaje de 20,46% de los votantes incluidos en los 7 apellidos más frecuentes.

En este caso, dado el bajo número de N y la escasa variabilidad de apellidos, podemos considerar que nos encontramos ante una población sedentaria, donde unos pocos nombres de familia se han tornado muy frecuentes. Al no recibir inmigrantes, el valor de Alfa permanece bajo. Belgrano y Libertador General San Martín (ID 4) son los dos departamentos de San Luis que han experimentado un fuerte retroceso demográfico.

En este contexto, General Pedernera (ID 8), sección de la que Villa Mercedes es ciudad cabecera, destaca especialmente por su diversidad de apellidos (valor de Alfa más alto de toda la muestra), su baja consanguinidad y sus bajos índices de aislamiento y sedentarismo. Dado que el análisis desarrollado hasta ahora abarca el nivel de Departamento, esta amplitud podría estar enmascarando una sub-estructuración poblacional subyacente. Para explorar esta idea, se calcularon los mismos índices dentro de General Pedernera segmentando por municipios y finalmente dentro de la ciudad de Villa Mercedes, segmentando por circuito electoral.

Nivel municipal

El departamento General Pedernera comprende 2 municipios y 6 comisiones municipales, además de 4 parajes rurales (La Esquina, Las Isletas, La Angelina, Nueva Escocia). Si bien estos parajes Figuran en el padrón nacional como circuitos electorales, ninguno de ellos comprende un N mayor a 100 personas. Los índices calculados por el método isonímico son particularmente sensibles a distorsiones por bajo número y los valores obtenidos pueden no reflejar la verdadera dinámica poblacional, por lo que los parajes no se incluyen en el análisis final. Los resultados se muestran en Tabla 18.

Tabla 18. Índices calculados por municipio dentro del departamento Gral. Pedernera. Las abreviaturas se corresponden a la Tabla 17.

Sección	INS	Alfa	F	A	B	N	S
Villa Mercedes	0.0034	294	0.0008	5.75	9.60	85558	9933
Justo Darac	0.0045	222	0.0011	9.47	11.84	8204	1448
El Morro	0.0160	63	0.0040	29.57	28.26	230	107
Juan Jorba	0.0132	75	0.0033	26.75	22.93	314	139
Juan Llerena	0.0104	97	0.0026	23.26	20.67	387	158
Punilla	0.0171	59	0.0043	23.75	29.17	480	192
Lavaïsse	0.0164	61	0.0041	41.86	29.65	172	97
Villa Reynolds	0.0016	621	0.0004	62.38	7.62	420	326

Villa Mercedes presenta la mayor cantidad de votantes y de apellidos, pero ello no impacta en el valor de Alfa, que es superado en varios órdenes de magnitud por Villa Reynolds

(621, el mayor valor registrado hasta el momento). Esta sección es una comisión municipal con bajo número de electores en su padrón, pero una considerable cantidad de apellidos, lo que eleva el porcentaje del indicador A de sedentarismo: 62,38% son únicos representantes de su nombre de familia.

Al desglosar la población en una estructuración espacial más cercana a la realidad, se observa que el valor de consanguinidad $F = 0,0008$ que se obtuvo para el departamento de General Pedernera como un todo, presenta un notable espectro de variación considerándolo por municipio, desde el valor más bajo en Villa Mercedes hasta el más alto en Punilla (0,0043).

Nivel circuito electoral

Dado que el estudio poblacional fue realizado en la ciudad de Villa Mercedes, se consideró un último abordaje a nivel de circuito electoral. Estas divisiones menores varían en su área de influencia, incluyendo los votantes de una o más escuelas.

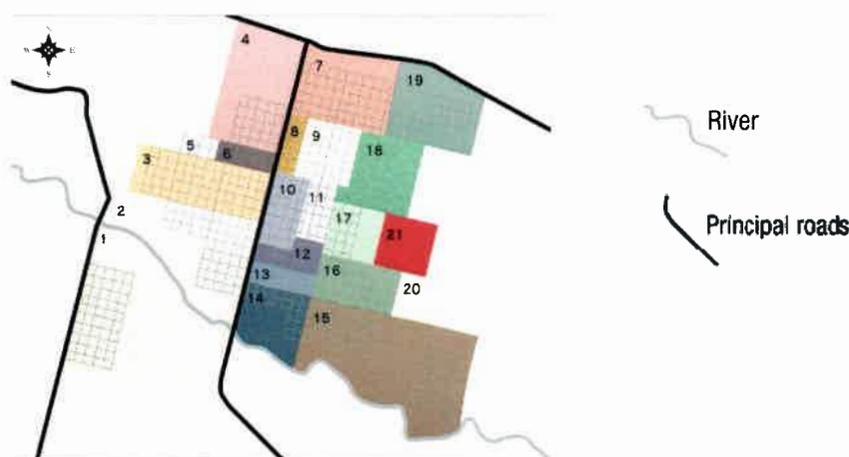


Figura 19. Circuitos electorales de la ciudad de Villa Mercedes.

Los índices calculados se resumen en la Tabla 19, correspondiendo nuevamente las siglas a: INS (Isonimia no Sugada), Alfa (Número Efectivo de Apellidos), F (Consanguinidad), A (Indicador de Sedentarismo), B (Indicador de Aislamiento), N (número total de votantes), S (cantidad de apellidos diferentes).

Tabla 19. Resultados por circuitos electorales de la ciudad de Villa Mercedes. Los ID se corresponden a la Figura 17.

ID	INS	Alfa	F	A	B	N	S
1	0.0038	266	0.0009	15.26	10.41	7976	2043
2	0.0039	257	0.0010	13.75	10.52	4639	1205
3	0.0036	275	0.0009	14.53	10.32	6553	1755
4	0.0030	331	0.0008	20.16	8.67	4118	1415
5	0.0077	131	0.0019	18.76	15.83	821	286
6	0.0044	226	0.0011	16.85	11.04	2772	834
7	0.0048	210	0.0012	10.54	10.86	5369	1120
8	0.0031	327	0.0008	24.73	9.20	2119	867
9	0.0029	344	0.0007	17.62	8.89	5960	1857
10	0.0023	440	0.0006	21.37	8.17	4862	1733
11	0.0025	393	0.0006	21.37	8.54	4146	1539
12	0.0018	543	0.0005	29.43	7.19	3034	1400
13	0.0027	364	0.0007	24.50	8.96	2722	1108
14	0.0043	231	0.0011	15.34	10.64	3514	975
15	0.0053	188	0.0013	10.14	11.59	3916	794
16	0.0045	222	0.0011	12.76	11.44	4694	1140
17	0.0045	221	0.0011	15.00	10.95	3306	887
18	0.0051	197	0.0013	11.21	11.85	5031	1099
19	0.0057	175	0.0014	11.63	12.79	2761	642
20	0.0049	203	0.0012	19.59	12.62	1307	482
21	0.0037	271	0.0009	16.05	9.82	5938	1636

En el conjunto de datos, se destacan en gris dos aglomerados con valores altos de isonimia y consanguinidad, lindantes en el terreno, uno en el centro de la ciudad, integrado por los circuitos 5 y 6 y otro en el este, integrado por los circuitos 7 y desde el 15 al 20 (ver Figura 19). Todos los componentes de estos aglomerados (con excepción del circuito 5) tienen un alto número de votantes (N). Sin embargo, también presentan los valores más altos del índice B, lo que estaría señalando una tendencia al aislamiento en esta porción de la población.

Distribución de los apellidos portadores

Se analizó la frecuencia y distribución en el territorio nacional de los 11 apellidos identificados en las familias de los afectados (Tabla 20).

Tabla 20. Distribución y frecuencias absolutas de los apellidos portadores.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
CABA	1687		662	654	723	2	230	223	3909	36879	307
Buenos Aires	12322	3	3991	6771	3057	9	1997	2102	28013	5531	32
Catamarca	2322		191	505	8		9	4	878	524	
Chaco	624		313	2525	66		90	464	2866	3429	
Chubut	595		181	113	253		50	12	689	1371	3
Córdoba	7780		3459	671	832		534	48	6536	5194	53
Corrientes	199		46	2724	111		70	160	3269	608	
Entre Ríos	136		60	337	49	17	122	87	2032	1810	
Formosa	976		74	466	205		5	724	2594	2173	
Jujuy	433		697	264	62		1	7	1282	2754	3
La Pampa	221		182	17	59		84	4	702	409	54
La Rioja	2527		1091	70	15		6	4	1391	675	3
Mendoza	5191		3004	400	744	2	778	6	5948	3091	281
Misiones	571		50	440	190	22	31	1023	2515	1101	
Neuquén	392		451	78	1297		59	17	1122	979	18
Río Negro	349		265	46	867		28	3	1195	1262	26
Salta	1373		1074	1413	267		41	16	2626	8037	
San Juan	2791		3460	67	309		27	1	2070	1427	101
San Luis	2005	2	342	107	113	27	619	8	2116	425	317
Santa Cruz	414		286	120	96		29	34	476	1005	2
Santa Fe	1601		829	1717	349		431	120	6593	6333	11
S. del Estero	1352		876	36	21		10	11	631	8186	1
T. del Fuego	143		61	57	45		41	46	330	349	4
Tucumán	3316		613	185	182		31	7	4140	9759	5

También se analizó la distribución a nivel mundial, los resultados se incluyen en el Anexo I. Si bien la mayoría de estos nombres de familia están representados a todo lo largo del territorio nacional, 3 de ellos (B, F y K) tienen una distribución bastante más restringida. El primero de estos apellidos es el menos frecuente, con sólo 5 votantes en el padrón electoral y es el que podría resultar determinante para identificar un aislado poblacional. De existir alguna variable biológica asociada a estos 11 marcadores socio-culturales, se espera observarla en los lugares donde los 11 aparecen juntos: las provincias de Buenos Aires y San Luis.

Para San Luis en particular se cuenta con el antecedente de los trabajos de Laróvere y col. (2009, 2012) en Villa Mercedes, ciudad en la que están registrados los dos votantes B: uno de ellos en el circuito 5 del aglomerado central y otro en el circuito 17 del aglomerado este.

CONCLUSIÓN

El estudio de alteraciones en la enzima argininosuccinato sintetasa abarcó desde el diagnóstico y seguimiento de una serie de pacientes con diversa sintomatología, hasta el abordaje de la posible causal de la alta incidencia de CTLN1 en nuestra región.

Fue posible realizar diagnóstico neonatal en embarazos de riesgo de CTLN1 con objeto de prever una terapéutica temprana, se realizó un diagnóstico retrospectivo en familias con antecedentes de recién nacidos fallecidos sin diagnóstico certero además del diagnóstico preconcepcional de portadores; de esta manera, se amplió el número de casos reconocidos de CTLN1 (Tabla 8, Figura 14).

Mediante un estudio poblacional realizado en la ciudad de Villa Mercedes, Provincia de San Luis, se calculó la frecuencia de portadores para la mutación p.G390R e incidencia de CTLN1 en la población. Los resultados publicados (Laróvere y col. 2012) indican una frecuencia de portadores de 4,1% o 1/25 habitantes y es posible estimar la incidencia de CTLN1 de 1 en 2.427 niños, aproximadamente veinte veces mayor que la incidencia descripta a nivel mundial de 1 en 57.000 (Brusilow y col., 2001).

La realización de este estudio genético-poblacional de portadores CTLN1 en la ciudad de Villa Mercedes aportó un panorama de la situación respecto a esta enfermedad metabólica en la zona, permitiendo avanzar respecto a la causa de la ocurrencia de alta frecuencia de una misma mutación en el grupo. La hipótesis de un posible cluster genético fue contemplada en el presente trabajo mediante distintos acercamientos:

El primer acercamiento a la estructura poblacional se realizó mediante el análisis de marcadores autosómicos (SNPs), conocidos de ser polimórficos y muy frecuentes en la población argentina. Estos resultados se contrastaron con las frecuencias controles esperadas y las diferencias observadas nos permiten inferir respecto a cualquier diferencia en la estructura poblacional de un grupo respecto a otro. Así, al no hallar diferencias estadísticamente significativas, fue posible concluir que no es posible definir a la población de la Ciudad de Villa Mercedes como endogámica. Por otro lado, contrastando las frecuencias halladas en familias afectadas CTLN1, se halló que existe un alto grado de parentesco entre individuos de las parejas de riesgo, aún cuando no se ha reportado en ninguna de ellas parentesco aparente.

El segundo acercamiento a la estructura poblacional se realizó considerando los apellidos como marcadores genéticos mediante el estudio de isonimia. Este método permitió estimar los

coeficientes de endogamia a distintos niveles, siendo posible destacar que en la Provincia de San Luis se hallan diferentes departamentos con altísima consanguinidad, no siendo uno de ellos el correspondiente a la ciudad de Villa Mercedes (dato que concuerda con el primer acercamiento), sin embargo, al analizar circuitos electorales dentro de la ciudad, se hallaron dos pequeños aislados que se corresponden justamente a los circuitos donde habitan las familias con antecedentes de CTLN1. Un estudio más amplio a nivel país y global demuestra que el área referencial de la Provincia de San Luis es la única en la que confluyen un grupo de 11 apellidos pertenecientes a familias afectadas y donde se esperaría una mayor incidencia de patologías asociadas a estos marcadores genéticos (apellidos), en este caso, Citrulinemia tipo 1.

Los resultados de estos dos acercamientos concuerdan entre sí y podrían explicarse de ocurrir en simultáneo en la misma población por el hecho de que los progenitores de familias afectadas son procedentes de un pool génico ancestral común, a pesar de "no estar relacionados" en el sentido cultural, motivo por el cual no se observaría actualmente endogamia en la población de riesgo. Adicionalmente, otro efecto que incrementaría la frecuencia de portadores en estas familias podría ser el modo de herencia del alelo mutado debido a la distorsión del radio de transmisión con incidencia de CTLN1 en descendientes de parejas de riesgo del 57,89%, con independencia del parentesco entre los padres (Laróvere y col., 2012).

Debido a la alta incidencia de CTLN1 en la población de riesgo, se propuso el *diagnóstico preconcepcional* de portadores como la medida preventiva más racional para manejo de CTLN1 sin tratamiento eficaz frente a la posibilidad de transmisión de carácter autosómico recesivo, permitiendo de esa manera las recomendaciones pertinentes al Ministerio de Salud de la Prov. de San Luis.

CAPÍTULO 3

DEFICIENCIA DE ARGININOSUCCINATO LIASA (D-ASL)

INTRODUCCIÓN

La escisión de argininosuccinato a fumarato y arginina es un paso esencial en el proceso de desintoxicación de amonio a través del ciclo de la urea. Esta reacción es catalizada por la enzima argininosuccinato liasa (ASL; MIM 608310), un homotetrámero citosólico que se expresa predominantemente en el hígado. En otros tejidos, ASL está implicada en la conversión de citrulina a arginina. El gen humano ASL ha sido localizado en el cromosoma 7cen → q11.2 (Todd y col., 1989) y está conformado por 16 exones (Abramson y col., 1991).

El gen *ASL* codifica una proteína de 464 aminoácidos con una masa molecular de 52 kD. La enzima activa es un homotetrámero de cuatro subunidades idénticas y una masa molecular de 208 kD, con cuatro sitios activos en cada tetrámero (Turner y col., 1997). Además de su papel en la generación de urea, ASL es la única enzima en el cuerpo que es capaz de generar arginina. La proteína se expresa predominantemente en el hígado, pero también se expresa en la mayoría de otros tejidos, como fibroblastos, riñón, corazón, cerebro, músculo, páncreas y glóbulos rojos. Su patrón de expresión en una amplia variedad de tejidos puede deberse a la necesidad de satisfacer la síntesis de arginina en estos tejidos.

La actividad enzimática de ASL requiere la unión de cuatro monómeros ASL para formar un homotetrámero. Por lo tanto, las consecuencias de una mutación específica dependen de la mutación en el otro alelo y su capacidad para complementarse el uno al otro.

La aciduria argininosuccínica es una alteración del ciclo de la urea causada por deficiencia de la argininosuccinato liasa (D-ASL). Esta deficiencia, registrada por primera vez a finales de 1950 (Allan y col., 1958.), es transmitida como un rasgo autosómico recesivo y se produce con una incidencia de aproximadamente 1:70.000 nacidos vivos (Levy y col., 1980). Produce cuadros de hiperamonemia, acumulación de ácido argininosuccínico en los fluidos corporales, y disminución de arginina.

Presentación clínica

La presentación clínica de D-ASL es de marcada heterogeneidad. Las dos formas más comunes son de inicio neonatal severo y de inicio tardío.

La presentación clínica de la forma de inicio neonatal severa es idéntica a la de otros DCUs y se caracteriza por hiperamonemia en los primeros días de vida. Los recién nacidos suelen parecer saludables las primeras 24 hs, pero a los pocos días desarrollan vómitos, letargo, hipotermia y rechazo proteico. La taquipnea y alcalosis respiratoria son los principales hallazgos que sugieren hiperamonemia. La falta de reconocimiento y la demora en tratar el defecto en ureagénesis conduce a letargo, convulsiones, coma y muerte. La hepatomegalia y tricoclasia (pelo grueso y friable) en esta primera etapa son los únicos hallazgos clínicos que pueden sugerir el diagnóstico de D-ASL (Brusilow y col., 2009).

Las manifestaciones de la forma de aparición tardía se dan con episodios de hiperamonemia (provocados por una infección aguda o estrés, y/o cambios en la dieta), o deterioro cognitivo, alteraciones del comportamiento y/o el aprendizaje en ausencia de episodios documentados de hiperamonemia (Brusilow y col., 2009).

Aunque manifestaciones secundarias a la hiperamonemia son comunes a todos los DCUs, muchos individuos con D-ASL presentan un fenotipo clínico más complejo y único. Entre ellos se observa: deficiencias neurocognitivas, enfermedad hepática, e hipertensión sistémica. Estas manifestaciones parecen no tener relación con la gravedad o duración de los episodios hiperamonémicos (Saudubray y col., 1999; Mori y col., 2002; Ficicioglu y col., 2009).

Alteraciones bioquímicas

El amonio elevado en plasma y la alcalosis respiratoria son hallazgos clásicos observados durante los períodos de descompensaciones metabólicas.

El análisis de aminoácidos plasmáticos normalmente revela elevados niveles de citrulina en un rango de 100-300 $\mu\text{mol/L}$ (Brusilow y col., 2009). La acumulación de ácido argininosuccinico, el sustrato previo al bloqueo metabólico es el sello bioquímico de D-ASL. Los niveles de creatinina típicos observados en pacientes D-ASL van entre 50 y 110 $\mu\text{mol/l}$ en plasma (VN=44- 106 $\mu\text{mol/l}$) y >10.000 $\mu\text{mol/g}$ en orina (VN=3710- 12000 $\mu\text{mol/l}$) (Ficicioglu y col., 2009). Elevaciones de alanina, glutamina, y glicina también se observan comúnmente en el perfil de aminoácidos plasmáticos. Aunque típicamente la excreción de ácido orótico se encuentra entre los rangos normales, se puede observar aciduria orótica en D-ASL (Brosnan y col., 2007; Gerrits y col., 1993).

Correlación genotipo-fenotipo

El número de mutaciones reportadas es de 134, bastante pequeño en comparación con otros DCU (Balmer y col., 2013). En general, hay una baja correlación entre la actividad enzimática residual y la severidad del fenotipo clínico. Según se observó con diversos métodos, la limitada correlación entre el fenotipo clínico de los pacientes y la actividad enzimática *in vitro* se deriva de una combinación entre la disminución de la sensibilidad de los ensayos enzimáticos y el hecho de que las diferentes mutaciones pueden permitir la complementación en el tetrámero. Los pacientes con formas tardías de D-ASL poseen significativa actividad residual o permiten la complementación intragénica. En estos pacientes se forma al menos un sitio activo en el tetrámero híbrido o bien las mutaciones se estabilizan parcialmente entre ellas permitiendo mayor funcionalidad de la esperada (Yu y col., 2000; Trevisson y col., 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Población estudiada

En el laboratorio se procesaron muestras provenientes de sujetos con sospecha clínica de DCU. Los hallazgos clínicos de estos pacientes incluyen letargo, falta de apetito, vómitos persistentes, convulsiones intratables, alteraciones neurológicas inexplicables, retraso del desarrollo, coma, neurodegeneración, disfunción recurrente del hígado inexplicable o colestasis.

En individuos con D-ASL previamente diagnosticados en CEMECO se realiza un seguimiento con información de evolución y correlación genotipo/fenotipo.

Paciente I. Paciente masculino nacido a término con Apgar 9/10, peso de 2950 gr, dado de alta a las 48 hs de vida. Ingres a la semana de vida deshidratado, se descompensa siendo rehidratado presentando síntomas de daño neurológico severo y entra en coma. Por RMN se observa un edema cerebral difuso. A los dos días se observa por ecografía cerebral un aumento del edema y se mide el amonio en plasma resultando en 1035 $\mu\text{mol/L}$ ($\text{VN} < 100 \mu\text{mol/L}$) por lo que se comienza la diálisis peritoneal. Fallece a los 14 días de vida.

Paciente II. El paciente ingresa a CEMECO a consulta derivada de Río Cuarto con un año y 11 meses de edad por presentar hipotonía, debilidad muscular persistente, leve retraso del crecimiento y el desarrollo, RMN normal. Fue de principal interés en el diagnóstico de este paciente las anomalías del cabello presentando períodos de calvicie seguido de cabello escaso, friable y quebradizo.

Análisis bioquímico

- a. Determinación de aminoácidos plasmáticos y urinarios por HPLC como se ha descrito previamente.
- b. Determinación de amonio plasmático por espectrofotometría.
- c. Determinación de ácido orótico en orina por HPLC.

Análisis molecular

- d. **Extracción de ADN:** La extracción de ADN genómico de leucocitos periféricos a partir de sangre entera se efectuó según la técnica previamente descrita.
- e. **Análisis del gen *ASL*.**

Los diecisiete exones del gen *ASL* (*ASL*; Chr. 7q21.3-q22.1) y las regiones que flanquean los límites exón-intrón se amplificaron por PCR y se secuenciaron. Las mutaciones se identificaron por comparación con la secuencia de referencia GenBank para *ASL* humana (GenBank entradas: NC_000007; Version NC_000007.13). La presencia de una mutación en un paciente se confirma por la repetición del análisis en el producto de PCR independiente del ADN del paciente.

Este apartado fue realizado mediante un estudio colaborativo con el Prof. Dr. Med. Johannes Häberle perteneciente a la División de Enfermedades Metabólicas del Hospital Universitario de Niños de Zurich, Suiza.

RESULTADOS

Paciente I

Hallazgos bioquímicos

En las muestras que fueron derivadas a CEMECO, las cuales habían sido recolectadas previo a una diálisis peritoneal indicada debido a un valor de amonio de de 1035 $\mu\text{mol/L}$, se observó un valor de aminoácidos en plasma con una elevada concentración de argininosuccinato (37 $\mu\text{mol/L}$; VN=0-0,7 $\mu\text{mol/L}$), valor indicativo de una D-ASL.

Estudio molecular

No se pudo recuperar la muestra de sangre del paciente y por ello se extrajo ADN de ambos padres para realizar el diagnóstico molecular. Fue posible identificar en ambos padres del mencionado paciente una mutación missense, c.857A>G (p.Gln286Arg) en el exón 11 del gen

El análisis bioinformático de esta alteración indica una estricta conservación del sitio en todos los clados analizados y un score de Polyphen igual a 1, señalando la alta patogenicidad esperada para esta sustitución como se muestra en la Figura 20.

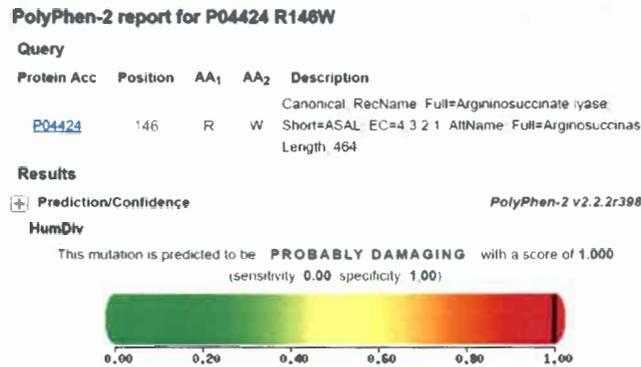


Figura 20. Interfase de resultados Polyphen prediciendo el daño de la mutación p.Arg146Trp-*ASL*.

Se construyeron múltiples alineamientos de secuencias de aminoácidos utilizando *CLUSTALW2* (Greenblatt y col., 2003). Los homólogos de los genes de interés se recuperaron de GenBank tras las búsquedas BLAST utilizando como consulta la secuencia humana para el gen *ASL*. Los resultados del alineamiento para las distintas secuencias de las *ASL* sugieren que en la posición 146 (c.436C>T), el aminoácido arginina se halla estrictamente conservado en todos los ortólogos observándose aún en las especies más alejadas filogenéticamente. Probablemente indicando la importancia de este aminoácido para la funcionalidad proteica, y que cualquier cambio en esta posición puede resultar en pérdida de funcionalidad. La mutación que cambia arginina por triptófano estaría modificando la estructura proteica, resultado consistente con la severidad indicada en Polyphen y ensayos de actividad enzimática.

Las dos mutaciones reveladas en el paciente II nunca antes se habían detectado juntas en un mismo paciente, ambas son severas y anularían la actividad de la *ASL*, esperándose un fenotipo severo neonatal como en el primer paciente. Sin embargo, debido al fenómeno de complementación existe un incremento en la actividad enzimática de la proteína afectada permitiendo un fenotipo tardío y no tan severo como sería de esperar si no se produjese la complementación.

La paciente se presenta estable sin descompensaciones hiperamoniémicas, siguiendo un tratamiento con benzoato de sodio, arginina y aminoácidos esenciales complementarios.

ASL. Esta mutación fue previamente descrita por Walker y col. (1989) en un paciente con la forma neonatal, hijo de padres consanguíneos; la transición resulta en la sustitución de glutamina por arginina en la posición 286, posición altamente conservada en el gen *ASL* desde levaduras a humanos y produciendo una enzima mutada que retiene menos del 3% de actividad residual *ASL*.

Esta grave alteración de la funcionalidad proteica se manifestó con la forma neonatal grave observada en el niño y causal de su fallecimiento. Se citó a la familia para realizar el respectivo asesoramiento genético.

Paciente II

Hallazgos bioquímicos

El estudio de aminoácidos en plasma reveló un incremento de los niveles de citrulina (218,2 $\mu\text{mol/L}$; VN=16-32 $\mu\text{mol/L}$) y una elevada concentración de argininosuccinato (49,3 $\mu\text{mol/L}$; VN=0-0,7 $\mu\text{mol/L}$), valor indicativo de una D-*ASL*.

Estudio molecular

Tanto las muestras de ADN del paciente como la de ambos padres fueron recolectadas para realizar el estudio molecular. Fue posible identificar dos mutaciones missense en el gen *ASL*, reportadas previamente en la bibliografía: c.857A>G (p.Gln286Arg) y c.436C>T (p.Arg146Trp).

La primera de ellas, c.857A>G (p.Gln286Arg) en el exón 11 del gen *ASL* (Walker y col., 1989) se halló también en el padre del paciente y ya ha sido descrita en nuestro centro en otra familia argentina; la misma es reconocida como una de las más frecuentes causales de deficiencia de D-*ASL*, permitiendo la complementación intragénica, fenómeno por el cual se forma una proteína multimérica a partir de subunidades producidas por dos alelos con distinta mutación en el mismo gen. En la complementación, se produce una parte funcional de la proteína híbrida a partir de dos tipos de subunidad mutada, ninguna de las cuales tienen individualmente una actividad enzimática apreciable (Yu y col., 2001).

La otra mutación, c.436C>T (p.Arg146Trp) no detectada previamente en Argentina, se detectó por primera vez en un paciente homocigoto para esta mutación de origen turco con una actividad enzimática no detectable (Balmer y col., 2013).

CONCLUSIÓN

El abordaje de las alteraciones en la enzima argininosuccinato liasa permitió realizar las primeras descripciones de pacientes D-ASL en Argentina.

Se ha podido confirmar el diagnóstico bioquímico en los dos casos estudiados mediante ensayos moleculares, pudiendo determinar las mutaciones específicas causales y efectuar un diagnóstico certero, con el consiguiente asesoramiento genético a las familias involucradas.

Las mutaciones halladas son dos y coinciden con otras previamente reportadas en la bibliografía, siendo de alta frecuencia a nivel global, una de ellas siendo objeto de muchos estudios por su capacidad de complementación intragénica. Ambas alteraciones son severas provocando la inactivación de la enzima ASL, pero debido al fenómeno de complementación, la paciente II heterocigota compuesta c.857A>G (p.Gln286Arg) y c.436C>T (p.Arg146Trp), presenta mínimas manifestaciones de la deficiencia.

La definición de estas patologías en las familias afectadas permitió en una de ellas un diagnóstico retrospectivo certero con asesoramiento a los padres respecto a futuros embarazos; en la segunda familia el diagnóstico significó un mejoramiento integral en la calidad de vida de la paciente, pudiendo implementar a tiempo el tratamiento y seguimiento.

ALTERACIONES PRIMARIAS EN EL CICLO DE LA UREA

Consideraciones Finales

El reconocimiento de DCUs en nuestro medio permitió la descripción de un gran número de familias afectadas con un desorden "poco frecuente" que afecta el metabolismo de la degradación de las proteínas, siendo el mayor grupo de pacientes descriptos de la Argentina. Esta descripción no solo involucra el diagnóstico del paciente sino un abordaje completo con el respectivo asesoramiento genético, control del tratamiento, evolución del paciente, correlación genotipo-fenotipo, entre otros, permitiendo acompañar al paciente y su familia en los cuidados de esta enfermedad crónica.

Analizando la sintomatología más manifiesta en este grupo de pacientes, tal como se ha descripto previamente, los niveles de amonio y glutamina al comienzo de la sintomatología están estrechamente relacionados con el daño neurológico; los pacientes sin secuelas neurológicas nunca superaron los valores de amonio de 200 $\mu\text{mol/L}$. Así, con objeto de mejorar el pronóstico neurológico es necesario detectar e instaurar un tratamiento temprano de la hiperamonemia combinando terapia farmacológica y control de la dieta. En nuestra serie, el 100% de los casos de pacientes sintomáticos estuvieron bajo dieta de restricción proteica, no así los casos asintomáticos. La importancia de una dieta baja en proteínas, ingesta calórica suficiente y suplementos de aminoácidos esenciales, minerales, vitaminas y ácidos grasos de cadena larga poli-insaturados para prevenir deficiencias, son remarcados en todas las guías. En el grupo de niños menores a un año, la ingesta proteica se mantuvo bajo el rango normal, pero se debe destacar que la mayoría de estos pacientes presentaban formas sintomáticas severas. Además se les suplementó la dieta con aminoácidos esenciales, consistiendo en el 20-30% del aporte proteico total. La ventaja de los aminoácidos esenciales es que disminuirían la carga de amonio en el CU ya que contienen menos nitrógeno que las proteínas naturales, con menor contenido de triptófano, tirosina y fenilalanina. La menor cantidad de triptófano afectaría el SNC en crisis hiperamonémicas, disminuyendo la producción de serotonina y el mayor aporte de aminoácidos ramificados contrarrestaría la deficiencia de estos aminoácidos observados en pacientes tratados.

Respecto al tratamiento y seguimiento de los pacientes DCU, la medicación empleada son drogas de conversión del nitrógeno, benzoato de sodio y fenilbutirato de sodio, que eliminan el amonio por rutas alternativas. En nuestra serie, el 100% de los pacientes sintomáticos recibe quelantes de amonio, principalmente benzoato de sodio debido a su disponibilidad y menor

costo. En esta cohorte de DCUs, hallamos diversos factores precipitantes de crisis hiperamoniémicas, entre ellos el abandono de la dieta y/o tratamiento farmacológico, y procesos infecciosos, incrementando los marcadores de morbilidad, tasas de hospitalización, tiempo de estadía en el hospital y un mayor uso de quelantes de amonio.

Es indispensable la creación de un registro de enfermedades raras, entre estas los DCUs, para conocer la incidencia de estas patologías y cómo la incorporación de nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas permitirá identificar nuevos casos y aumentar la supervivencia de los pacientes afectados.

Con objeto de mejorar el pronóstico de estos pacientes, sería de gran importancia poder ampliar el screening neonatal en el país para este tipo de enfermedades. Así también, es necesaria una mayor difusión de conocimientos respecto de estas enfermedades a pediatras, neurólogos y neonatólogos para así poder diagnosticar mayor cantidad de pacientes en estado presintomático o cuando el amonio aún se encuentra bajo el nivel umbral de provocar daños neurológicos irreversibles.

Parte II

ALTERACIONES SECUNDARIAS EN EL CICLO DE LA UREA

CAPÍTULO 4

POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA CARBAMILFOSFATO SINTETASA 1 (CPSI)

INTRODUCCIÓN

La carbamilfosfato sintetasa humana I (CPSI) (CE 6.3.4.16) es la enzima limitante de la velocidad que cataliza el primer paso de ciclo de la urea. CPSI es altamente específica de tejido, con su función y expresión limitada al hígado y en menor medida al intestino, es la proteína más abundante en mitocondrias hepáticas, representando el ~ 20% de las proteínas de la matriz (Jones, 1965; Metzenberg y col., 1958). La proenzima CPSI de 165 kDa se produce en el citoplasma y es transportada a la mitocondria donde se escinde en su forma madura de 160 kDa. La CPSI madura y su cofactor N-acetil glutamato (NAG) catalizan la conversión del amoníaco y bicarbonato a carbamilfosfato (CP) con el gasto de dos ATPs (Rubio y Grisolia, 1981; Rubio y col., 1981).

CPSI es un gen relativamente grande que abarca 122.497 bases, contiene 38 exones y 37 intrones, y se encuentra altamente conservado con representantes bien definidos en bacterias, Archaea y Eukarya (Schofield, 1993). Las enzimas CPSI en humanos y rata no son capaces de procesar glutamina porque carecen del residuo de cisteína que es esencial para la actividad aminotransferasa en la levadura y bacterias (Rubio, 1993), por lo que requieren para su función la unión a su cofactor NAGS. La unión de NAG a CPSI causa un cambio conformacional en la enzima que expone los dominios de unión a ATP (Figura 21) (Rubio, 1993).

La deficiencia en CPSI (D-CPSI) en los seres humanos (OMIM 237300) es un error congénito poco frecuente del ciclo de la urea con herencia autosómica recesiva que provoca hiperamonemia y puede ser primaria, causado por mutaciones en el gen *CPSI*, o secundaria, debido a la falta del activador esencial NAG (Brusilow y Horwich, 2001). Como el ciclo de la urea no se requiere en el útero, la edad de inicio de los síntomas clínicos varía desde un comienzo neonatal hasta episodios de hiperamonemia en adultos. La secuenciación del cDNA de *CPSI* humana (Haraguchi y col., 1991) ha facilitado la identificación de mutaciones en pacientes con D-CPSI. La incidencia exacta de D-CPSI es bastante incierta pero se ha estimado en algunas poblaciones: 1/62.000 en EE.UU. (Brusilow y col., 1996); 1/800000 en Japón (Nagata y col., 1991), y 1/539.000 en Finlandia (Keskinen y col., 2008). Así, luego de la deficiencia de OTC, DCPSI es el DCU más severo y puede causar una hiperamonemia letal. Últimamente, se han desarrollado y utilizado varios sistemas de expresión CPSI (Aeds y col., 2007; Pekkala y

col., 2009) para probar el carácter patogénico de mutaciones clínicas (Pekkala y col., 2010) y para la evaluación de polimorfismos (Ahuja y col., 2008).

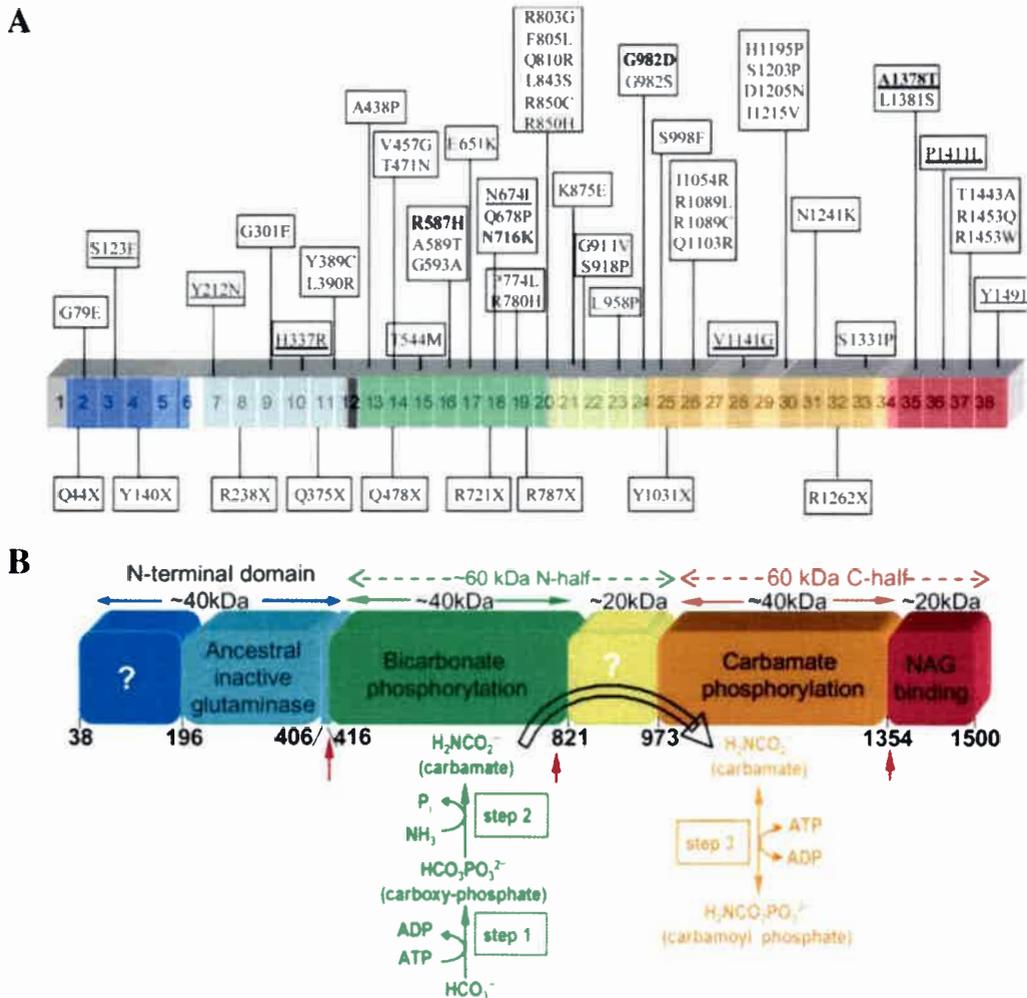


Figura 21. Base estructural de D-CPS1. A) Distribución exónica de mutaciones missense (parte superior) y nonsense (por debajo) en CPS1 humana. Las mutaciones en negrita se han encontrado en múltiples pacientes, mutaciones subrayadas son aparición tardía de la enfermedad. B) Esquema lineal de la organización multidominio CPS1 humana madura. Se indican las funciones específicas conocidas para cada dominio. Las flechas punteadas representan los dominios C-(verde) y N-terminal (rojo) del dominio sintetasa. Flechas verticales rojas apuntan a sitios de escisión proteolítica (Martínez y col, 2010).

Se han detectado catorce polimorfismos en el gen *CPS1*. El cambio polimórfico más interesante que se ha estudiado se ubica en el extremo 3' del ARNm CPS1, con 44% de heterocigosidad en la población control. El análisis de secuencia de este cambio revela una transversion C por A en la base de 4340, cambiando el codón de ACC a AAC. Este cambio provoca una sustitución de asparagina por treonina en el aminoácido 1405 (T1405N). La treonina 1405 se encuentra dentro del dominio alostérico importante para la unión de N-acetil

glutamato (NAG) (Shoaf y Jones, 1971; Jones, 1965). La sustitución de la cadena lateral de treonina por asparagina podría interrumpir la formación de enlaces de hidrógeno con NAG, sin embargo esto aún no ha sido demostrado. Los datos preliminares indican una diferencia de 30-40% en actividad enzimática para el polimorfismo T1405N, que afecta el dominio crítico de unión a NAGS (Summar y col., 2003). Pearson y col. (2001) han asociado al polimorfismo T1405N con el riesgo de hipertensión pulmonar persistente del recién nacido.

Por otro lado, se ha demostrado que el óxido nitroso inactiva irreversiblemente la enzima citosólica mediante la oxidación de la metionina sintetasa unido a la enzima vitamina B12 (Deacon y col., 1978). Estudios previos de GWAS (Genome Wide Association) en la población filipina demuestran que el polimorfismo más asociado a la elevación de niveles de homocisteína (Hci) plasmática (luego del C677T- MTHRF) es el T1405N- CPS1 (Lange y col., 2010).

El polimorfismo rs7422339 tiene elevada frecuencia a nivel mundial con independencia de la etnia (Tabla 21) y se demostró estar involucrado en varias patologías frecuentes en la población adulta, de allí la importancia de conocer su frecuencia en nuestra población, nunca antes descrita. Recientemente se conoció que la presencia del polimorfismo T1405N está significativamente asociado a un mayor riesgo de desarrollar hiperamonemias en pacientes que están medicados con ácido valproico ($p= 0.009$, odds ratio 5.4 con 95% intervalo de confianza de 1.58–18.43), por lo que la posibilidad de genotipificar a este tipo de pacientes permitiría prever posibles complicaciones con el uso del anticonvulsivante (Janiki y col., 2013). Otro estudio destaca la asociación del mismo polimorfismo con valores de fibrinógeno como indicativo de enfermedad vascular ($p=8.82 \times 10^{-09}$) y que podría ser resultado de su asociación a homocisteína (Danik y col., 2009).

Tabla 21. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs7422339 obtenida de Hap map.

Población	Frecuencias Genotípicas						Frecuencias alélicas			
	C/C	0.358	A/C	0.509	A/A	0.132	C	0.613	A	0.387
ASW (A)	C/C	0.482	A/C	0.446	A/A	0.071	C	0.705	A	0.295
CEU (C)	C/C	0.732	A/C	0.244	A/A	0.024	C	0.854	A	0.146
CHB (H)	C/C	0.798	A/C	0.190	A/A	0.012	C	0.893	A	0.107
CHD (D)	C/C	0.552	A/C	0.368	A/A	0.080	C	0.736	A	0.264
GIH (G)	C/C	0.694	A/C	0.306	A/A	0	C	0.847	A	0.153
JPT (J)	C/C	0.382	A/C	0.528	A/A	0.090	C	0.646	A	0.354
LWK (L)	C/C	0.417	A/C	0.479	A/A	0.104	C	0.656	A	0.344
MEX (M)	C/C	0.503	A/C	0.434	A/A	0.063	C	0.720	A	0.280
MKK (K)	C/C	0.455	A/C	0.443	A/A	0.102	C	0.676	A	0.324
TSI (T)	C/C	0.531	A/C	0.372	A/A	0.097	C	0.717	A	0.283
YRI (Y)	C/C		A/C		A/A		C		A	

Poblaciones: ASW(A): Ancestría africana del sudoeste de EEUU, CEU (C): Ancestría europea de la colección CEPH, CHB(H): Chinos Han de Beijing, China, CHD (D): descendientes chinos en Denver, Colorado, GIH (G): Indios Gujarati en Houston, Texas, JPT (J): Japoneses en Tokyo, Japón, LWK (L): Luhya en Webuye, Kenya, MEX (M): descendientes mexicanos en Los Angeles, California, MKK (K): Maasai en Kinyawa, Kenya, TSI (T): Toscanos en Italia, YRI (Y): Yoruban en Ibadan, Nigeria.

Correlación del polimorfismo T1405N con hiperhomocisteinemia

Como se mencionó, el polimorfismo más estudiado en la CPS1, T1405N se ha correlacionado a mejor respuesta frente a condiciones patológicas al influir en la generación de óxido nítrico. En una contracara de esta producción de óxido nítrico, diversos estudios han demostrado que el óxido nítrico inactiva irreversiblemente mediante oxidación la enzima citosólica metionina sintetasa unido a la enzima vitamina B12 (Deacon y col., 1978). La metionina sintetasa es una enzima dependiente de la vitamina B12 que cataliza la síntesis de metionina y tetrahidrofolato a partir de homocisteína y metiltetrahydrofolato (MeTHF), el punto de entrada de homocisteína en la vía de remetilación. De acuerdo con esta vía, los seres humanos y animales de laboratorio sometidos al óxido nítrico tienen niveles elevados de homocisteína plasmática (Waclawik y col., 2003).

Sumado a estos estudios, dos reportes recientes de asociaciones en todo el genoma (GWA) con los niveles de homocisteína en mujeres caucásicas (Paré y col., 2009) y asiáticas (Lange y col., 2010) hallaron evidencia significativa de una asociación entre los niveles de homocisteína y un nuevo loci, rs7422339, el cual codifica el cambio Thr1405Asn- CPS1 ($P=1.9 \times 10^{-11}$ y $P=4.7 \times 10^{-13}$, respectivamente). Debido a que la función vascular predice el riesgo de posteriores eventos cardiovasculares (Ezgu y col., 2005), ambos estudios remarcan la importancia de confirmar esta asociación en otras poblaciones y para determinar si el genotipo CPS1 predice la morbi-mortalidad cardiovascular.

Aunque la heredabilidad de hiperhomocistinemia se estima entre un 25% a 44% (Souto y col., 2005; Vermeulen y col., 2006), son poco conocidos los determinantes genéticos y cómo las mismas variantes influyen los niveles de homocisteína entre poblaciones. Defectos en homocigosis en los genes que codifican para las enzimas de metabolismo de la homocisteína (como ser CBS y MTHFR) conducen a un aumento de la concentración de homocisteína y enfermedad vascular oclusiva prematura (Selhub, 1999). Sin embargo, pocos polimorfismos comunes han sido asociados inequívocamente a la concentración de homocisteína. Entre estos, el más fuerte es la rs1801133 SNP *MTHFR* (C677T) correlacionado con la reducción de la actividad enzimática y elevados niveles de homocisteína (Frost y col., 1995).

Estudios previos en la población argentina respecto a polimorfismos comunes reconocidos a nivel mundial asociados a valores elevados de homocisteína plasmática, indican una baja frecuencia de estos otros marcadores en nuestra población (Dodelson de Kremer y Grosso, 2005), por lo que sólo pueden explicarse aquellos que presentan el C677T- *MTHFR*,

quedando un gran número de pacientes hiperhomocisteinémicos sin hallarse aún correlación genotípica alguna.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

a) *Controles*. Individuos normales dadores voluntarios de sangre de la población en general. Esta serie se constituyó de 100 individuos voluntarios sanos de edades de entre 0,5 y 72 años: 58 mujeres (edad promedio: $31,3 \pm 13,9$ años) y 42 varones (edad promedio: $22,2 \pm 15,3$ años). Los individuos adultos que participaron en este estudio fueron personal del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba. Las muestras correspondientes a niños procedieron del laboratorio general del Hospital de Niños por control antes de intervenciones de cirugía menor sin antecedentes patológicos significativos previos.

b) *Pacientes con diagnóstico de defectos enzimáticos en el ciclo de la urea*. Sujetos con diagnóstico bioquímico.

c) *Individuos hiperhomocisteinémicos*, con genotipo normal o heterocigota para el polimorfismo C677T del gen de la MTHFR. Constituido por 100 pacientes hiperhomocisteinémicos con definidas enfermedades vasculares cardíacas, cerebrales o periféricas (EV)*: 55 mujeres (edad promedio: $48,9 \pm 16,3$ años) y 45 varones (edad promedio: $52,9 \pm 16,1$ años). Los pacientes procedieron de Servicios de Cardiología, Angiología, Hematología y Neurología de instituciones de salud estatales y/o privados. La detección de la sustitución C677T del gen de la MTHFR se realizó en todos estos pacientes, resultando con genotipo normal para el polimorfismo descartando así un posible incremento de homocisteína debido a este SNP.

* Diagnósticos confirmados: *Enf. Oclusiva Arterial* ("stroke" o accidente cerebro vascular, oclusión arterial central de retina, infarto miocárdico), *Enf. Oclusiva Venosa* (embolismo pulmonar, trombosis venosa cerebral y de los senos encefálicos, de vena central de la retina y de venas superficiales).

d) *Niños (n=20-30) con indicación de cirugía cardíaca congénita* de by pass cardiopulmonar y con riesgo de hipertensión pulmonar.

Este trabajo estuvo sujeto a los Principios Bioéticos para la Investigación Biomédica No Terapéutica que involucra a los sujetos humanos según la declaración de Helsinki (Finlandia) de la Asociación Médica Mundial (1964), y posteriores modificaciones (Seoul, 2008). El proyecto

fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad; todos los individuos participantes o sus padres, en el caso de niños menores de edad, dieron el consentimiento para participar de este estudio.

Análisis molecular

a. Extracción de ADN.

b. Análisis del polimorfismo T1405N- *CPS1* por digestión con *Acil*. El exón 36 y las correspondientes secuencias intrónicas flanqueantes del gen *ASS* se amplificaron por medio de PCR (Tabla 22). Las condiciones de ciclado fueron una desnaturalización inicial de 1 min a 96°C, seguido de 1min de templado a 52°C, y luego se permite la extensión por 1 min a 72°C, se repite el ciclo unas 30 veces hasta una extensión final de 7 min a 72°C.

Tabla 22. Amplificación del exón 36, gen *CPS1*

Fragmento amplificado	Secuencia de Oligonucleótidos	Producto de PCR	Temperatura de Hibridación
Exón 36 y uniones exón-intrón	5' ATGGCACTATACTACTTCTC 3' 5' TAGCTGGTCATCTTATACTC 3'	571 pb	52°C

La presencia de la sustitución de la asparagina por treonina del codón 1405 del ADN del gen *CPS1* se determina mediante el corte con la enzima *Acil*, ya que el cambio genera un sitio de reconocimiento para esta enzima (C^VCGC). El producto de digestión del fragmento de 571pb perteneciente al exón 36 (113pb) y sus respectivas secuencias intrónicas flanqueantes se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%. El codón que codifica para treonina (ACC) presenta un sitio de corte, generando dos fragmentos (416 y 155pb), mientras que el ancestral que codifica para asparagina (AAC) no posee el sitio de reconocimiento de la enzima dando un solo fragmento de 571pb.

c. Análisis de la secuencia de ADN. El análisis de la secuencia se realizó en dos muestras con genotipos diferentes para confirmar la integridad del área adyacente al sitio de restricción. El análisis fue realizado sobre el producto de PCR amplificado empleando el primer sentido.

f. Análisis estadístico. El análisis estadístico mediante el software INFOSSTAT v2008. La comparación entre distribuciones de las variables categóricas fue realizado empleando el test de chi-cuadrado (χ^2). Además, las variables fueron descriptas como odds ratio (OR) con un Intervalo de Confianza del 95% (95% CI). La información se consideró estadísticamente significativa para valores de $p < 0,05$ y altamente significativa $p < 0,01$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de la secuencia de ADN para dos pacientes con distinto genotipo. La correcta amplificación del genotipo CC fue probada por la detección de un pico simple correspondiente al nucleótido C como se muestra en la Figura 22.a. Mientras la secuencia del genotipo AC fue confirmado por la presencia de dos picos superpuestos como es de esperarse (Figura 22.b).

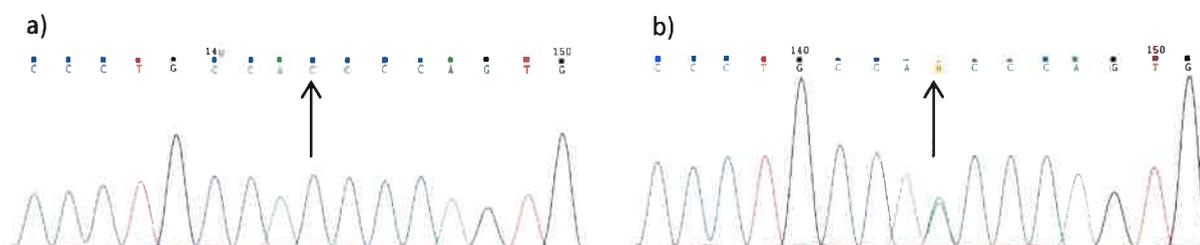


Figura 22. Secuencias de ADN de individuos con a) genotipos CC a la izquierda y b) genotipo AC a la derecha. La flecha negra indica la base alterada.

Frecuencias alélicas y genotípicas de CPS1 1405T/N SNP. Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de T1405N CPS1 tanto en la población control (N=200) como en los individuos que presentaron valores elevados de homocisteína como se muestra en la tabla 23.

Ha sido posible comparar la incidencia de estos genotipos con otras estimaciones de diversos grupos a nivel mundial, hallando una de las mayores proporciones de genotipos AA nunca antes observadas; así mismo también es posible destacar que la frecuencia del menor alelo (a) es una de las mayores observadas al comparar las frecuencias alélicas en otras poblaciones. Estos hallazgos acentúan la importancia de describir los efectos de este particular polimorfismo en nuestra población.

Comparando las frecuencias genotípicas de CPS1 rs7422339 entre los individuos control (N) e hiperhomocistinémicos (HHci), fue posible distinguir una distribución estadísticamente significativa como se muestra en la tabla 23. La distribución de individuos HHci y normal que portan el genotipo AA fue de 54,5% y 45,5%, del genotipo AC fue 60% y 40%, y del genotipo CC fue 36,4% y 63,6%, por lo que es posible observar que el ratio de individuos normal portando el genotipo CC es el doble de los HHci, reflejando un impacto de este genotipo en la función protectora ante la elevación de los niveles de homocisteína. Este efecto del genotipo CC solo se replica cuando el modelo dominante es aplicado, donde el 63,6% de los individuos con el genotipo CC fueron normales contra el 38,3% con genotipos AA+AC como puede observarse en la tabla 24.

Respecto a la frecuencia alélica, se observa una distribución diferencial del rs7422339 en individuos HHci versus normales. Notablemente, el porcentaje de pacientes HHci que portan el alelo A (45 de 78 = 57,7%) es mayor que aquellos que portan el alelo C (55 de 122= 45%).

Tabla 23. Frecuencias alélicas y genotípicas de *CPS1* T1405N en individuos HHci y N.

	HHci (N=100)	N (N=100)	X2	Valor p
Frecuencia Genotípica				
AA	18	15		
AC	54	36	9,6	0,008
CC	28	49		
Frecuencia Alélica				
A	0,45	0,33	3,03	0,0819
C	0,55	0,67		

Tabla 24. Modelo dominante de herencia del polimorfismo T1405N en individuos HHci vs N.

CPS1 1405T/N	HHci (N=100)	N (N=100)	Odds Ratio(OR)	95% Intervalo de Confianza		Valor p
				Inferior	Superior	
Modelo dominante						
CC	28	49	2,47	1,38	4,43	0,0023
AC + AA	82	51				

Influencia del SNP CPS1 1405 T/N estratificado de acuerdo al género. Los resultados del efecto de los genotipos CPS1 respecto al género se denotan en la tabla 25. Los resultados muestran que tanto en hombres como en mujeres, aquellos individuos con los genotipos AA y AC fueron más propensos a ser HHci que aquellos portando CC. Entre los varones CC, 28,9% (13 de 45) fueron HHci comparado al 71,1% (32 de 45) de los genotipos AA y AC. En mujeres, 27,3% (15 de 55) fueron HHci contra el 72,7% de mujeres AA y AC. Los resultados del estudio de cada genotipo por separado tampoco muestran una diferencia estadísticamente significativa entre las distribuciones de genotipos en hombres y mujeres. El análisis de la frecuencia alélica de CPS1 1405 T/N en hombres y mujeres arroja una diferencia no significativa. Con estos datos, es posible rechazar la hipótesis de la existencia de una diferencia en la distribución de genotipos dependiendo del género en nuestra población.

Tabla 25. Influencia de CPSI T1405N estratificado según el género en pacientes HHci.

Genotipo	Mujeres (N=55)	Hombres (N=45)	Valor p
AA	12	6	0,857
AC	28	26	
CC	15	13	
Alelo			
A	0,47	0,42	0,999
C	0,53	0,58	

Estudio del polimorfismo T1405N- CPSI en pacientes con diagnóstico de defectos enzimáticos en el ciclo de la urea.

Como ya se había comentado previamente, el polimorfismo T1405N-CPSI estaría influyendo en la capacidad del ciclo de la urea en la producción de ON y por ende en los procesos en los cuales el ON participa como sustrato o mediador. El estudio del mencionado cambio en pacientes con diagnóstico de deficiencias en el ciclo de la urea permitiría un nuevo acercamiento al estudio de variantes funcionales dentro del ciclo que puedan afectar la susceptibilidad en personas que ya poseen determinada deficiencia en el mismo. Pudiendo otorgar un mejor reconocimiento de la sintomatología presentada y de la evolución de la enfermedad en los pacientes estudiados.

Se realizó el estudio del polimorfismo T1405N- CPSI en portadores y pacientes homo/hemicigotas para diversos defectos del ciclo de la urea y se comparó con controles normales como se muestra en la tabla 26.

Tabla 26. Frecuencias alélicas y genotípicas de T1405N- CPSI en individuos DCUs y N.

	DCUs (N=42)	N (N=100)	x ²	Valor p
Frecuencia Genotípica				
AA	5	15	2,41	0,299
AC	21	36		
CC	16	49		
Frecuencia Alélica				
A	0,37	0,33	0,35	0,55
C	0,63	0,67		

Si se analiza el conjunto de la cohorte con DCU, no es posible observar diferencias estadísticamente significativas entre este grupo y el grupo control normal (Tabla 26). Analizando

caso por caso de paciente resulta difícil realizar una correlación directa, no es posible estudiar el efecto del polimorfismo en los casos severos neonatales de D-ASS ni D-OTC ya que la gravedad del defecto enzimático sobrepasa cualquier efecto que pueda tener el cambio en *CPS1* en el individuo; en portadoras D-OTC el fenotipo es determinado preferentemente por la inactivación diferencial del X, dando una gran variabilidad de presentaciones clínicas incluso con una misma mutación.

Los portadores D-ASS no presentan sintomatología clínica observable aún descrita, es por ello que analizando aminoácidos de portadores p.G390R-ASS fue de relevancia el incremento de los niveles plasmáticos de ácido glutámico ($232,34 \pm 73 \mu\text{mol/L}$; VN: 18-98 $\mu\text{mol/L}$), metabolito conocido por su efecto en la excitotoxicidad del sistema nervioso y que podría estar causando alguna neurodegeneración a largo plazo en estos individuos. La presencia del polimorfismo T1405N en heterocigosis u homocigosis podría estar activando el ciclo para depurar el exceso de ácido glutámico, favoreciendo a los individuos con un efecto neuroprotector. Es necesario realizar mayores investigaciones sobre este punto y ampliar el número de individuos portadores p.G390R, aminoácidos plasmáticos y posibles implicancias del incremento de glutamato, conjuntamente al efecto benéfico del polimorfismo de la *CPS1*.

Respecto a dos pacientes con D-ASS que no presentaron la forma severa neonatal observada en San Luis, resultan ser portadores del polimorfismo T1405N, lo que podría explicar en parte la evolución de ambos que, presentando mutaciones que afectan en gran medida la actividad ASS, han tenido una sobrevida considerable, no explicable por el genotipo ASS presentado.

Análisis del polimorfismo N1399T-CPS1

Otro de los polimorfismos estudiados es el N1399T- *CPS1* (Asn1399Thr, c.4214A>C, N1406T, rs121912594), ubicado a 21 nucleótidos o 7 aminoácidos del polimorfismo T1405N, también de supuesta alta frecuencia a nivel mundial y que podría influir en la conformación proteica de la *CPS1*.

Se amplificó y secuenció la región que contiene el cambio con la misma metodología empleada para T1405N. Se analizó la secuencia obtenida corroborando la posición del cambio y correcta amplificación. Se estudiaron 200 alelos del grupo control de la población general y 10 alelos de pacientes con deficiencias enzimáticas del ciclo de la urea, sin hallarse el polimorfismo

T1399N en ninguno de los grupos mencionados. Es así que todos los individuos son normales (AA) para este polimorfismo y se corrobora la ausencia del alelo C en nuestra población.

Existe gran confusión bibliográfica entre los polimorfismos T1405N y N1406T por el cambio de nucleótidos (C>A y A>C, respectivamente) y la pequeña distancia entre ellos, además de que la proteína tiene dos transcritos funcionales, de 1500 aa y 1506 aa, lo que modifica también la nomenclatura de los polimorfismos. Es así que en varios trabajos atribuyen los efectos o frecuencias poblacionales del primero sobre el segundo, causando mayor confusión al respecto. En nuestra población fue posible distinguir las frecuencias de cada uno y el efecto de T1405N sobre la susceptibilidad a hiperhomocisteinemia.

CONCLUSIÓN

Este estudio permitió identificar por primera vez la frecuencia del polimorfismo T1405N en una población latinoamericana. Nuestros hallazgos sugieren que al menos algunos de los factores genéticos principales que influyen en los valores plasmáticos de homocisteína son compartidos entre poblaciones asiáticas, europeas y sus descendientes, más allá de sus dietas particulares y del contexto genético. Además, al presentar la población argentina una de las mayores frecuencias a nivel mundial, se enfatiza la importancia de identificar los efectos del cambio sobre la susceptibilidad/robustez a la enfermedad. Es así que al analizar la relación del polimorfismo CPSI T1405N con la probabilidad de presentar hiperhomocisteinemia, fue posible dilucidar una asociación estadísticamente significativa. La causa de este efecto de un polimorfismo en una enzima del ciclo de la urea sobre los niveles de homocisteína plasmática motiva la realización de estudios futuros para comprender esta interrelación metabólica.

Estudios previos habían demostrado asociación del polimorfismo con los valores de homocisteína sólo en mujeres, sin embargo en nuestra población es posible observar mediante un análisis estratificado según el género, que la asociación está presente tanto en hombres como en mujeres, es decir, independiente del género.

Estos resultados se han publicado bajo la cita Silene M. Silvera-Ruiz, Carola L. Grosso, Raquel Dodelson De Kremer, Laura E. Laróvere. "Impact of CPSI gene rs7422339 polymorphism in Argentine patients with hyperhomocysteinemia". *Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening* (JIEMS) Vol. 3; 1-4. May 2015 DOI: 10.1177/2326409815586253. (Ver Anexo III)

CAPÍTULO 5

PRIMERA VALIDACIÓN ARGENTINA DE CITRULINA ORAL COMO INSTRUMENTO SEGURO/ DE BAJO COSTO PARA PREVENIR LA HIPERTENSIÓN PULMONAR EN EL POSTOPERATORIO DE CIRUGÍA CARDÍACA CONGÉNITA

INTRODUCCIÓN

Las variantes funcionales del CU son significativas no sólo dentro del ciclo sino también por su capacidad de afectar otros sistemas fisiológicos (Mitchell y col., 2009). Así es que se ha demostrado que los precursores del óxido nítrico (ON) endógeno, L-citrulina y L-arginina, aminoácidos generados por las enzimas del CU, disminuyen su concentración en el período postoperatorio del bypass cardiopulmonar por una disfunción endotelial pulmonar (Moncada y col., 1993; Pearson y col., 2001).

La L-citrulina es un aminoácido soluble en agua, incoloro y con un carbono asimétrico. Como otros α -aminoácidos, L-citrulina tiene la capacidad de formar enlaces peptídicos, pero no es utilizado en la síntesis de proteínas. L-citrulina era considerada principalmente como intermediario metabólico en el CU. Sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto que desempeña un importante papel en el metabolismo y la regulación de ON. La producción de ON por la ONS de células endoteliales vasculares (CE) es esencial para la regulación cardiovascular normal y depende de manera crítica de la disponibilidad del sustrato L-arginina. El ON es sintetizado por las células endoteliales mediante la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS). Esta enzima es estimulada por agonistas como la acetilcolina. El ON difunde hacia el músculo liso y estimula a la guanilato ciclasa. Un aumento de la concentración de monofosfatoguanosina cíclica (cGMP) estimula la liberación de proteínas kinasas. Esto hace abrir los canales de potasio y cerrar los del calcio, produciendo hiperpolarización y en última instancia la relajación del músculo liso (Figura 23). La extremadamente corta vida media de ON permite la precisa vasoregulación.

El rango normal de los niveles plasmáticos de L-arginina en los seres humanos es de 40 a 110 μM (Morris, 1992). Cuando el suministro de L-arginina no responde a las necesidades de la actividad de ONS, la formación de ON se reduce y se forma superóxido, un oxidante nocivo. Deficiencias en el suministro de L-arginina han sido fuertemente asociadas a enfermedades cardiovasculares, incluyendo hipertensión, aterosclerosis, enfermedad vascular diabética, hiperhomocisteinemia, insuficiencia cardíaca y lesión por isquemia-reperfusión (Chen y Sanders,

1991; Creager y col., 1990; Jin y col., 2001; Mayhan y col., 1997; Rector y col., 1996; Cooke y Weyrich, 1992).

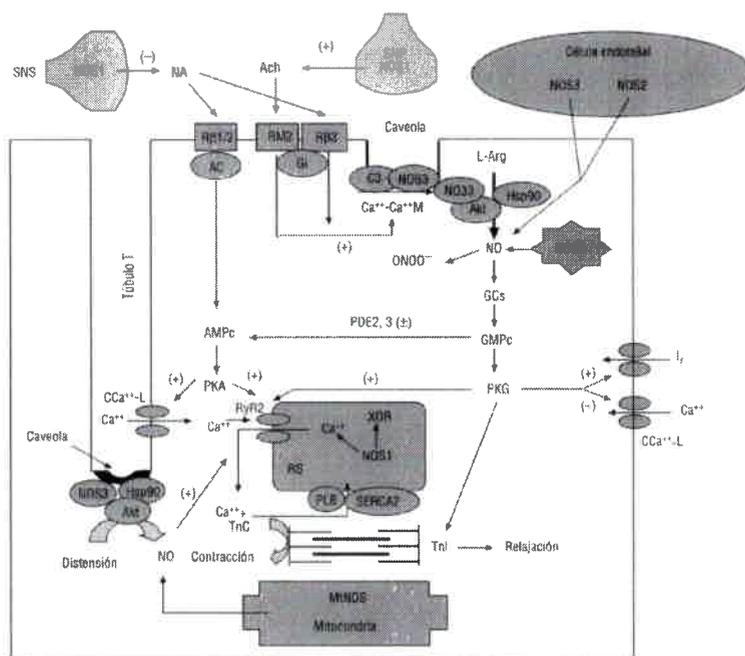


Figura 23. Mecanismo de acción del ON en los cardiomiocitos. AC: adenilciclase; Ach: acetilcolina; Akt: proteincinasaB; C3: caveolinas-3; Ca⁺⁺-Ca⁺⁺M: complejo Ca⁺⁺-calmodulina; GCS: guanilil ciclase soluble; Gi: proteína G inhibitoria; Hsp: proteínas del choque térmico; If: corriente marcapaso de la célula cardíaca; ONS3: óxido nítrico sintetasa; mtNOS: ONS mitocondrial; NA: noradrenalina; ONS1: ONS neuronal; ONS2: ONS inducible; ONOO: peroxinitrito; PDE: fosfodiesterasas; Rβ : receptores β-adrenérgicos; RM2: receptores muscarínicos-M2; RS: retículo sarcoplásmico; RyR2: receptores/canales de calcio del retículo sarcoplásmico; SERCA2a: ATP-asa calcio-dependiente del retículo sarcoplásmico; SNP/SNS: terminales nerviosos parasimpáticos y simpáticos; TnC/I: troponinas; XO: xantinoxidasa (Tamargo y col., 2006).

La administración de L-arginina ha sido reportada para prevenir la disfunción de CE o restaurar la vasodilatación endotelio en diversos estados de enfermedad cardiovascular. Sin embargo, diversos estudios sugieren que los beneficios de la terapia crónica con los suplementos de L-arginina no se mantienen o se pueden convertir a un resultado negativo (Jeremy y col., 1996; Schulman y col., 2006). El inconveniente de la administración de L-arginina por vía oral es que gran parte de la L-arginina en su paso a través del tracto gastrointestinal y del sistema portal en el hígado es catabolizada por la arginasa a ornitina y urea (Morris, 1992). Además, los niveles elevados de L-arginina en dieta o en circulación pueden aumentar la actividad de la arginasa en el hígado, riñón, vasculatura y probablemente otros tejidos, aumentando la tasa de catabolismo de L-arginina (Schulman y col., 2006; Jean y col., 2001; Socha y col., 2006).

Debido a que L-citrulina es el precursor natural de L-arginina, podría ser un importante sustituto de la misma en condiciones patológicas que limitan la disponibilidad de L-arginina. L-

citrulina se convierte en L-arginina en muchos tejidos, por lo que juega un papel importante en el suministro de L-arginina a ONS ya que evita el metabolismo en el hígado y que no es un sustrato inductor de la arginasa (Shearer, 1997). Además, no hay evidencia de la disfunción del transportador para L-citrulina en condiciones patológicas, tales como el estrés oxidativo, que puede ocurrir en el transporte de L-arginina (Romero y col., 2006). L-citrulina también se ha informado ser un inhibidor no competitivo de la arginasa (Greenberg, 1960; Shearer y col., 1997).

Por lo tanto, la administración sistémica de L-citrulina parece ser una manera más eficiente para elevar los niveles de L-arginina extracelular que la propia L-arginina. Varios estudios sugieren que la terapia complementaria a largo plazo para apoyar la función de ONS en las enfermedades cardiovasculares debe incluir la administración de L-citrulina (Spolarics y Bond, 1989), posiblemente en combinación con L-arginina en concentraciones y horarios que no incrementen la actividad arginasa vascular y ni hepática.

Las concentraciones de L-citrulina y L-arginina, disminuyen después de un bypass cardiopulmonar y mejoran con la suplementación oral de citrulina (Moncada y Higgs, 1984; Pearson y col., 2001; Barr y col., 2003). Se ha demostrado que los pacientes con concentraciones plasmáticas de citrulina $\geq 37\mu\text{mol/l}$ tienen menos riesgo de hipertensión pulmonar en el postoperatorio de cirugía cardíaca congénita cardiopulmonar (Schultze Neick y col., 1999). La citrulina es un aminoácido de bajo costo y no tóxico, con una indicación frecuente como terapia de reemplazo para los niños con defectos del ciclo de la urea. Además, es más eficaz en el mantenimiento de las concentraciones plasmáticas de L-arginina que la administración intravenosa (IV) de la L-arginina en voluntarios sanos sin modificación de la presión sistémica (Smith y col., 2006). El suplemento de L-citrulina oral en el período perioperatorio reduciría el riesgo de hipertensión pulmonar en esta cirugía (Barr y col., 2003; Schultze Neick y col., 1999).

Summar y col. (2004) demostraron que en adultos no hay efecto del genotipo CPS1 sobre las concentraciones plasmáticas de L-citrulina o L-arginina, sin embargo, existe un efecto significativo del genotipo sobre metabolitos del óxido nítrico y en la respuesta vasodilatadora. Debido a que la función vascular predice el riesgo de posteriores eventos cardiovasculares (Ezgu y col., 2005), se necesitan estudios para confirmar esta asociación en otras poblaciones y para determinar si el genotipo CPS1 predice la morbi-mortalidad cardiovascular y su posible influencia en el recuperatorio de la cirugía cardíaca congénita.

Citrulina oral en postoperatorio de cirugía cardíaca congénita

Los defectos congénitos cardíacos con cortocircuito de izquierda a derecha aumentan el flujo sanguíneo y presión pulmonar. La hipertensión pulmonar conduce a la enfermedad vascular pulmonar progresiva (Gale y col., 2004). La reparación mediante cirugía congénita cardíaca a la edad apropiada normaliza la presión arterial pulmonar (Haworth, 2002). En la fisiología univentricular, ya sea un Glenn o anastomosis modificada de Fontan-Kreutzer, es obligatoria la presión arterial pulmonar normal (Juaneda y col., 1993). La hipertensión pulmonar es una complicación potencial grave después de la cirugía cardíaca, siendo causada por factores etiológicos múltiples: ambientales, genéticos y nutricionales (Boneva y col., 2001). Las investigaciones respecto a los factores nutricionales se enfocan solamente en la relación entre vitaminas y defectos cardíacos congénitos, por lo que es de suma importancia elucidar el aporte de cada uno de estos tres componentes al desarrollo de esta complicación con objeto de minimizar los riesgos o al menos predecirlos con mayor claridad. Hasta el momento, las medidas de prevención recomendadas incluyen alcalosis inducida, sedación, parálisis y la administración de oxígeno. Además, las opciones de tratamiento con ionotrópicos y vasodilatadores parenterales o inhalación de óxido nítrico (ON) tienen un elevado costo (Gale y col., 2004; Haworth, 2002; Burrows y col., 1986).

Con el objeto de realizar la validación de uso de citrulina oral en postoperatorio de cirugía cardíaca congénita en nuestros pacientes, se ha puesto en marcha el proyecto multidisciplinario titulado “Primera validación argentina de citrulina oral como instrumento seguro y de bajo costo para prevenir la hipertensión pulmonar en el postoperatorio de cirugía cardíaca congénita”, realizado en conjunto con los servicios de Cardiología, Cirugía Cardiovascular, Terapia Intensiva Cardiovascular, y Centro de Estudio de las Metabopatías Congénitas (Cemeco), del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de la ciudad de Córdoba. Este proyecto es la primera investigación de estas características de la población argentina y se sumerge en la actualidad era post-genómica conceptual: el Proyecto Fenoma Humano (Nature Genetics, 2003; 34:15-21) y el Proyecto de Varioma Humano (Nature Genetics, 2007; 39:433-6). Por lo tanto, será una eventual inclusión de las variaciones genómicas y otros cambios no genómicos y epigenéticos tales como las características específicas de grupos (género, etnia, diagnóstico, etc.). Este proyecto ha sido evaluado y aprobado por el Comité de Ética de la Provincia de Córdoba.

Hipótesis

La experiencia argentina en la administración de citrulina oral aporta nuevos datos a la indicación de esta medida terapéutica como una herramienta efectiva para la prevención de la hipertensión pulmonar en postoperatorio de cirugía cardíaca congénita.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de Estudio

El estudio incluyó: 16 niños sometidos a cirugía de cardiopatía congénita y en riesgo de hipertensión pulmonar, que recibieron 5 dosis perioperatorias (3 g/m²/dosis) de citrulina oral o placebo.

Se reclutaron pacientes de menos de 6 años de edad consecutivos durante 2 años, considerando patología específica y edad apropiada, los cuales fueron sometidos a cirugía de bypass cardiopulmonar de dos grupos distintos:

- a) Reparación biventricular de defecto septal, comunicación interventricular, canal auriculoventricular, reparación de defecto septal atrioventricular;
- b) Comunicación univentricular con anastomosis bidireccional de Glenn y modificada de Fontan-Kreutzer.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: estrechamiento significativo de la arteria pulmonar, colocación previa del "stent" en arteria pulmonar anterior, angioplastia previa de arteria pulmonar anterior, insuficiencia de válvula aurículo ventricular agenésica (mitral), anomalías pulmonares como retorno venoso y estenosis de vena pulmonar. Se obtuvo el consentimiento informado de los padres para participar de este estudio en la evaluación preoperatoria.

Metodología

1. Cuantificación de citrulina, y L-arginina plasmáticas (evaluación del estado nutricional), mediante HPLC como se indicó previamente.
2. Cuantificación de homocisteína plasmática total por HPLC (Ubbinks y col., 1991; Dodelson y Grosso, 2005).

Los tioles existen en los sistemas biológicos de forma reducida y oxidada. Una fracción muy pequeña de Hci se encuentra en plasma en forma de sulfhidrilo libre y en su mayor parte como mezclas del disulfuro Hci-cisteína, unida a las proteínas del plasma o como su disulfuro homocisteína, este último sólo apareciendo cuando las concentraciones de Hci son elevadas. La Hcit representa todas estas formas en conjunto y se obtiene por reducción química de estos compuestos. El método consta de los siguientes pasos:

- Conversión de todos los disulfuros de Hci a Hci libre por reducción con tri-*n*-butilfosfina (TBP)
- Conjugación de la Hci con el reactivo específico de tioles fluorogénico, el 7-Fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonamida (SBD-F)
- Separación de los derivados Hci-SBD-F de los otros conjugados tioles-SBD-F por HPLC de fase reversa mediante elución isocrática
- Detección y cuantificación de la Hci-SBD-F por fluorometría

Los testigos comerciales de Hci, cisteína, cisteína-glicina, glutatión y cisteamina, y reactivos son de Sigma Aldrich. Los solventes grado HPLC utilizados para las corridas cromatográficas son Baker & Co. Inc (USA).

Preparación de la muestra y análisis. Se adiciona 240 μ l de plasma a 30 μ l de TBP al 15% v/v en dimetilformamida y 50 μ l de cisteamina 312,5 μ M, como patrón interno (PI); se incuba por 30 min a 4°C. Se precipitan las proteínas con 100 μ l de ácido tricloroacético (al 10% conteniendo 1 mmol/L de EDTA); se incuba a 4°C durante 10 min y se centrifuga a 13000 rpm por 10 min. Se toman 50 μ l del sobrenadante se le adicionan 50 μ l de una solución de SBD-F, 1 mg/ml en buffer borato 0,125 mol/L pH 9,5; 10 μ l de hidróxido de sodio (1,55 mol/L); 125 μ l de buffer borato 0,125 mol/L pH 9,5 conteniendo 4 mmol/L de EDTA. Se incuba la mezcla por 1 h a 60°C para la completa derivatización de Hci y otros tioles del plasma. Se enfrían las muestras por 10 min y se filtran con filtro de 0,20 μ m. Se inyecta una alícuota de 20 μ l por determinación.

Condiciones cromatográficas. Para el análisis se utilizó un HPLC Hewlett Packard Serie 1100, con autoinyector y detector de fluorescencia Hewlett Packard modelo 1046^a. La separación de los distintos metabolitos se efectuó en una columna de fase reversa analítica (ODS Hypersil C18, 5 μ m, 125 x 4 mm). Fase móvil en condición isocrática: Buffer acetato de sodio 0,2 mol/L, pH 4,0, con 2% de metanol a un flujo de 1ml/min durante 10 min. Las intensidades de fluorescencia se midieron con una excitación de 385 nm y una emisión de 515

nm. La identificación de los compuestos se estableció según los tiempos de retención en la columna de cada metabolito testigo.

Cuantificación. Para la calibración se realizó una curva de concentraciones de Hci seleccionada para cubrir el rango esperado en las muestras biológicas (5, 10, 15 y 30 $\mu\text{mol/L}$). El límite de detección fue de 0,5 $\mu\text{mol/L}$. El método de cuantificación utilizado fue el de estándar interno y se realizó una regresión lineal. La concentración de Hcit se expresa en $\mu\text{mol/L}$ y se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de Hcit} = \frac{(\text{área de Hci}/\text{área de PI} - \text{ordenada al origen}) \times 312,5}{\text{Pendiente de la curva de calibración}}$$

3. Cuantificación de metabolitos del óxido nítrico en plasma (Ver Materiales y Métodos, página 11).
4. Las mediciones de la presión arterial pulmonar y sistémica son tomadas por los médicos cirujanos mediante un catéter pulmonar colocado en sala de operaciones; en caso de obstrucción del catéter con una reparación biventricular se midió la presión no invasiva sistémica y pulmonar con ecocardiograma Doppler (presión sistólica pulmonar de acuerdo al gradiente de insuficiencia tricuspide + presión media de aurícula derecha y presión media pulmonar de acuerdo al gradiente insuficiencia pulmonar al final de diastólica + presión media de la aurícula derecha) (Borgesonn y col., 1996; Ommersen y col., 2000). La presión pulmonar y sistémica postoperatoria se registran a las 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 y 48 hs en la unidad de cuidados intensivos. La hipertensión pulmonar se define como la presión media > 25 mmHg o inferior o igual a 50% de la presión sistémica media. En la circulación biventricular se definió como presión pulmonar media normal hasta 20mmHg, dudosa o "borderline" cuando se encuentra una presión pulmonar media entre 21 y 25 mmHg (Hatano y col., 1975). En la circulación univentricular la hipertensión pulmonar se define como el gradiente de presión entre la arteria pulmonar y la aurícula izquierda mayor a 6mmHg (del Cerro y col., 2011).

Protocolo de estudio

Los pacientes se dividieron en:

- i) Grupo con administración de citrulina oral en cinco dosis de 3 g / m^2 y con una dosis total de 15 g / m^2 . La primera dosis se administró durante la inducción de la anestesia a través de una sonda nasogástrica, el segundo inmediatamente después de llegar a la unidad de cuidados intensivos, y luego cada 12 hs.

ii) Grupo de control con administración de placebo, sustancia inocua y sin actividad farmacológica ni efectos secundarios.

Toma de muestras: 3 ml de sangre obtenidos de cada paciente de este estudio a los 4 puntos de tiempo, inmediatamente antes de la incisión y a las 0, 24 y 48 hs después de la operación, en la unidad de cuidados intensivos.

Análisis estadístico. El cambio de las concentraciones plasmáticas de los metabolitos a lo largo del tiempo ha sido estudiado mediante el uso de INFOSTAT v2008 (Di Rienzo y col., 2008) empleando modelos lineales con efectos fijos para el tiempo y los tratamientos y efecto aleatorio para paciente. Ante la presencia de correlación entre las observaciones, se probaron diferentes posibles estructuras de correlación residual y también, en los casos necesarios, una función para modelar varianzas heterogéneas. Además, el nivel basal de cada metabolito fue considerado como una covariable, que podía afectar a la respuesta. Finalmente, bajo los criterios de Akaike (AIC) y Bayesiano (BIC), se seleccionó el modelo de mejor ajuste para cada respuesta. El nivel de significación se estableció en 0,05.

RESULTADOS

El objetivo de este estudio es validar en pacientes argentinos la administración segura y eficaz de citrulina, un precursor de la síntesis de óxido nítrico, en el aumento de las concentraciones plasmáticas de este aminoácido y la disminución del riesgo de hipertensión pulmonar postoperatoria.

El servicio de cardiología fue responsable de reclutar dieciséis (16) pacientes, con distribución homogénea de sexos (53% varones, 47% mujeres). La edad en promedio fue de 24,5 meses, en un rango de 3 meses a 4 años. El grupo estudiado presentó defectos cardíacos congénitos de canal aurículoventricular (CAV, 33%), comunicación interventricular (CIV, 40%), y corazón univentricular (CUV, 27%), sometidos a cirugía cardíaca congénita de reparación y se les asignó aleatoriamente el protocolo de dosificación de citrulina o placebo. Se registraron las presiones pulmonares, en los horarios preestablecidos, mediante catéter pulmonar y, en caso de no ser posible, con ecocardiograma Doppler. Se obtuvieron cuatro muestras de sangre de cada paciente a cuatro tiempos: preoperatorio (0), postoperatorio (1), 12 hs (2) y 24hs (3), las cuales se analizaron para la determinación de las concentraciones plasmáticas de citrulina, arginina, homocisteína y óxido nítrico.

Concentraciones plasmáticas de los metabolitos

Citrulina

Los resultados han sido esquematizados en la Figura 24, donde se muestran las variaciones de los niveles plasmáticos de citrulina en los distintos tiempos, comparando los grupos tratamiento y placebo; a partir de ello es posible destacar diversos aspectos que se enumeran a continuación.

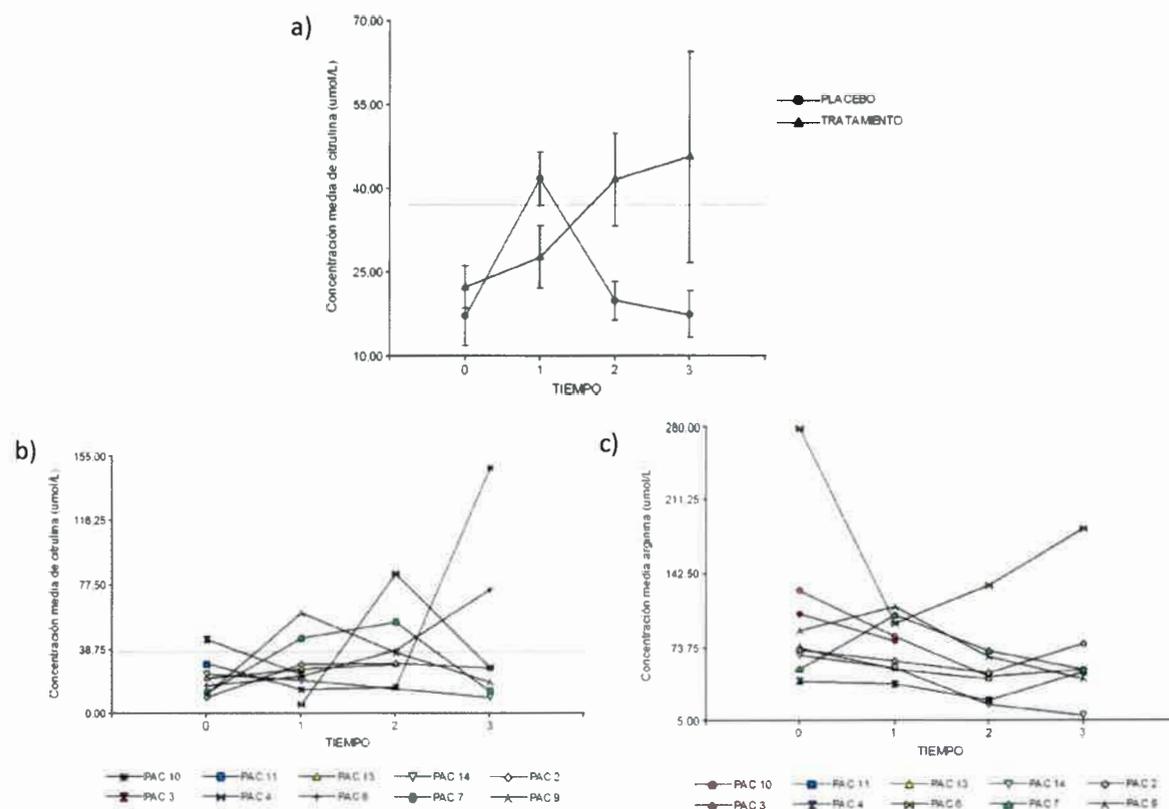


Figura 24. a) Concentraciones promedio de citrulina según tiempo de determinación (0= preoperatorio, 1=postoperatorio, 2=12hs, 3=24hs) y tratamiento. La línea demarca el nivel de 37µmol/L. Concentraciones de Citrulina según tiempo de determinación en cada paciente del grupo tratado con Citrulina oral (b) y del grupo placebo(c).

- Los niveles promedio de citrulina basal medidos en ambos grupos de niños (17,93 µmol/L IQR 10-27) no difirieron significativamente entre sí, encontrándose en el límite inferior de los valores normales de referencia para la edad (VN= 16-32 µmol/L) y, a su vez, muy alejados de los valores en descripciones previas de estudios foráneos (32 µmol/L IQR 25-44) (Smith y col., 2006). Es posible atribuir este valor al deficiente estado nutricional de nuestros pacientes al momento del ingreso.

- Analizando la tendencia de la concentración media de citrulina durante el transcurso del estudio (Fig. 24a), vemos que en el grupo placebo no se comporta, como en descripciones foráneas, con disminución abrupta inmediatamente en el postoperatorio sino que la caída de las concentraciones de este aminoácido se observa a las 12 horas del postoperatorio, punto crítico de rescate para prevenir la hipertensión pulmonar.

- La mayoría de los pacientes a los cuales se les administró citrulina oral (dosis: $3\text{g}/\text{m}^2/\text{dosis}$) superaron la concentración de $37\ \mu\text{mol}/\text{L}$ (Smith y col., 2006) recomendada para prevenir la hipertensión pulmonar, no siendo así con el grupo placebo en el cual los valores de citrulina cayeron bajo el límite recomendado a las 12 hs (Fig. 24b y 24c, respectivamente); se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre los valores medios de ambos grupos en este punto ($16\ \mu\text{mol}/\text{L}$ para placebo vs. $42\ \mu\text{mol}/\text{L}$ para tratado ; $p=0,039$).

- La concentración basal de citrulina no resultó significativa ($p=0,76$); la respuesta fue independiente del nivel inicial de citrulina. Por el contrario, sí se encontraron diferencias entre los grupos tratamiento y control ($p=0,04$), entre los distintos tiempos ($p=0,04$), como así también en la interacción del grupo a lo largo del tiempo ($p=0,02$). Esta interacción significativa indica que la respuesta al tratamiento depende del momento considerado. Como puede observarse en la Fig. 24a, mientras que en el grupo tratado las concentraciones medias de citrulina se incrementaron significativamente a lo largo del tiempo, al usar el placebo la concentración de citrulina a las 12 hs de la cirugía (Tiempo=2) fue significativamente menor que la determinada en el postoperatorio inmediato y muy por debajo de los valores recomendados.

Arginina

Los valores de arginina plasmática fueron graficados en la Figura 25, comparando los niveles medios entre ambos grupos a lo largo del tiempo. Los niveles basales de arginina plasmática (VN= $44\text{-}120\ \mu\text{mol}/\text{L}$) se mantuvieron constantes en el grupo placebo en el postoperatorio de cirugía cardíaca y cayeron abruptamente luego de 12 hs en ambos grupos. Este comportamiento difiere del observado por otros grupos de investigación que reportaron la caída abrupta de este aminoácido inmediatamente en el postoperatorio (Smith y col., 2006).

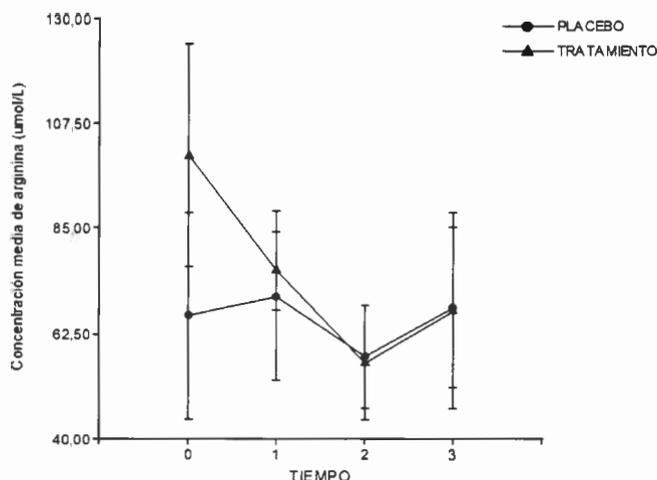


Figura 25. Concentraciones promedio de arginina según tiempo (0= preoperatorio, 1=postoperatorio, 2=12hs, 3=24hs) y tratamiento.

Al observar gran variabilidad inicial en las concentraciones de arginina, se emplearon modelos lineales con arginina como covariable para el estudio de este aminoácido. La concentración basal de arginina resultó significativa (0,0019), al igual que la interacción del grupo en el tiempo ($p=0,0015$). De acuerdo a estos resultados, las comparaciones se realizaron con las medias ajustadas por el efecto de la covariable como se grafica en la Figura 26.

Se observó una disminución en la concentración media de arginina a las 12 hs del postoperatorio inmediato, pero a las 24 hs del mismo, el promedio volvió al nivel de las 12 hs.

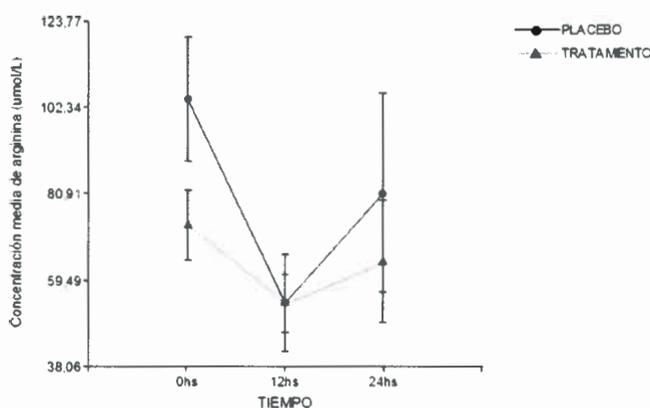


Figura 26. Concentraciones promedio de arginina ajustadas por covariable arginina según tiempo postoperatorio y tratamiento.

Si bien en cada tiempo de observación la concentración media resultó estadísticamente igual en ambos grupos, a lo largo del tiempo no se detectaron cambios estadísticamente importantes en el grupo tratado, pero sí al usar el placebo. En el grupo con placebo el promedio

de arginina a las 12 hs fue significativamente menor que a las 0 hs y a las 24 hs no presentó diferencias estadísticas respecto del nivel en postoperatorio (0 hs).

Se puede decir, entonces, que la concentración promedio de arginina post cirugía se mantuvo constante en el grupo tratado mientras que en el placebo disminuyó hacia las 12 hs y luego se restableció hacia los niveles del postoperatorio inmediato. Este comportamiento se atribuye a la alta demanda de arginina por parte del organismo a las 12 hs postoperatorio para la formación de ON, en el grupo tratamiento, la alta disponibilidad de citrulina permite la formación constante de arginina “amortiguando” la baja en su concentración; por el contrario, el grupo placebo no puede contrarrestar en tan poco tiempo la alta demanda de arginina y sufre un drástico descenso.

Homocisteína

En la Figura 27 se grafican los niveles medios de homocisteína a lo largo del tiempo en los grupos placebo y control. Aquí podemos observar que los niveles basales de homocisteína (VN= hasta $12\mu\text{mol/L}$) incrementaron inmediatamente en el post-operatorio seguidos de un marcado descenso a las 12 hs postcirugía.

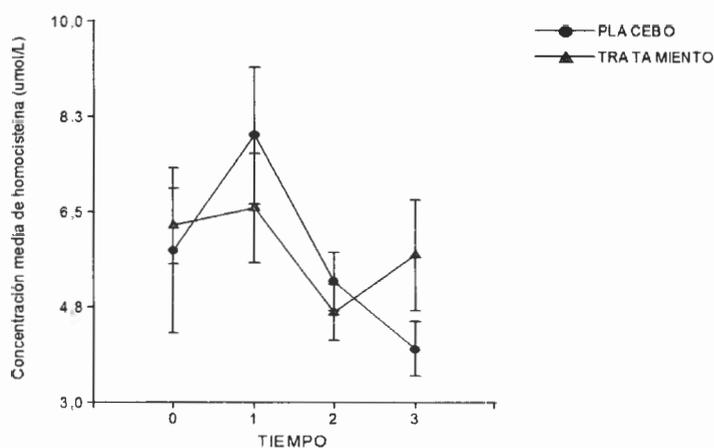


Figura 27. Concentraciones promedio de homocisteína según tiempo (0= preoperatorio, 1=postoperatorio, 2=12hs, 3=24hs) y tratamiento.

Debido a la alta variabilidad entre individuos de ambos grupos, se analizaron los datos mediante regresión. La concentración basal de homocisteína resultó significativa ($p < 0,0001$) al igual que el efecto del tiempo ($p = 0,009$) por lo que es posible decir que el comportamiento de este metabolito se ve influenciado por las concentraciones iniciales y por el tiempo transcurrido

desde la cirugía; no se detectó efecto de tratamiento ni de interacción ($p=0,7$ y $p=0,1436$, respectivamente).

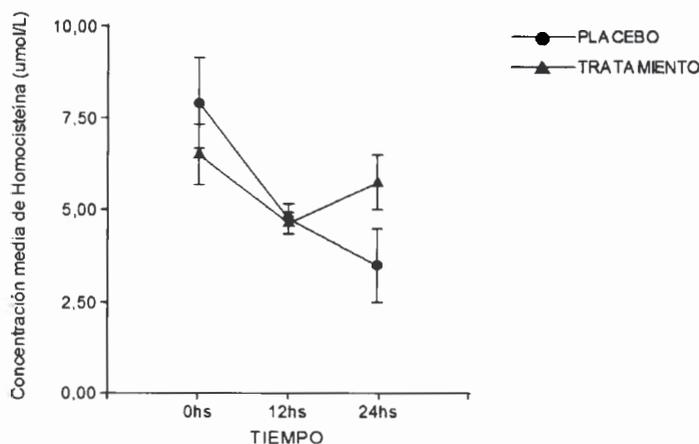


Figura 28. Concentraciones promedio de homocisteína ajustadas por covariable homocisteína según tiempo postoperatorio y tratamiento.

Como es posible observar en la Figura 28, a las 12 hs en ambos grupos se observó una disminución del nivel registrado en postcirugía pero a las 24 hs mientras que en el grupo tratado el promedio volvió al nivel basal, en el placebo siguió disminuyendo.

Por otro lado, aunque la interacción no resultó significativa luego de la cirugía, la homocisteína tuvo una tendencia al descenso muy marcado en el grupo placebo, mientras que en el grupo con aporte de citrulina oral conservó valores más homogéneos, restituyendo sus valores iniciales a las 24 hs. Este comportamiento diferencial de mayor estabilidad a lo largo del tiempo en el grupo tratamiento se repite para varios metabolitos e incluso en las presiones observadas y se especula estar relacionado a una menor tensión en el ciclo debido a mayor disponibilidad del metabolito primario, la citrulina, que permite biodisponibilidad para generar todos los metabolitos intermedios.

Óxido Nítrico

Los valores de ON se han graficado en la Figura 29. No existen datos bibliográficos previos respecto al comportamiento de este metabolito luego de la cirugía cardíaca congénita, por lo que no es posible comparar nuestros resultados. Las mediciones de ON muestran en ambos grupos una fuerte disminución a las 12 hs luego del postoperatorio (Fig. 29), cayendo muy por debajo del rango de valores normales recomendado para niños menores de 6 años ($47,2 \pm 11,2$ umol/L). Estos resultados demarcan el importante gasto o consumo de óxido nítrico en

esta etapa de la recuperación postcirugía y concuerdan con la hipótesis del punto crítico de control a las 12 hs luego del postoperatorio para prevenir la hipertensión pulmonar.

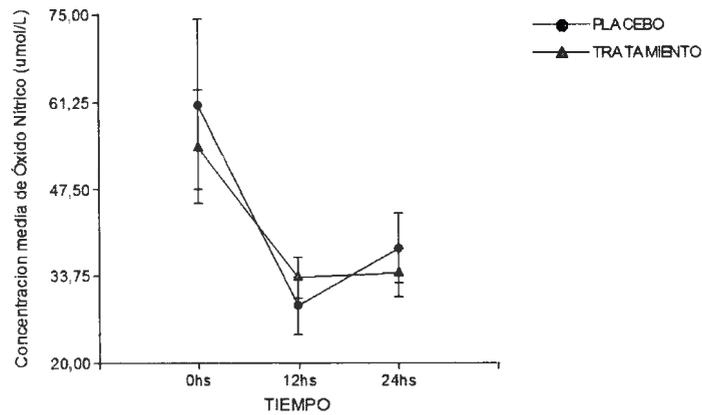


Figura 29. Concentraciones promedio de óxido nítrico ajustadas por covariable óxido nítrico según tiempo postoperatorio y tratamiento

La concentración basal de ON resultó significativa (0,0003) al igual que el efecto del tiempo ($p < 0,0084$), pero no se detectaron efectos de tratamientos ni interacción del grupo en el tiempo ($p = 0,19$). De acuerdo a estos resultados, las comparaciones se realizaron con las medias ajustadas por el efecto de la covariable.

La concentración media de ON en el postoperatorio inmediato resultó igual en ambos grupos; en el grupo tratado disminuyó la concentración inicial a las 12 hs y luego se mantuvo constante; en el grupo placebo la concentración de óxido nítrico a las 12 hs disminuye drásticamente con un pico de mínima de $29 \mu\text{mol/L}$ y el cual fue significativamente menor que en el postoperatorio inmediato y a las 24 hs, entre los que no hubo diferencias.

Se puede decir entonces, que la concentración promedio de óxido nítrico poscirugía se mantuvo más estable en el grupo tratado que en el placebo; con una drástica disminución en este último grupo a las 12hs, punto crítico en el riesgo de la hipertensión, respecto de los niveles basales.

Presión Arterial Pulmonar (PAP)

Respecto al seguimiento de la presión arterial pulmonar según se ha plasmado en la Figura 30, es posible observar en ambos grupos una curva con un pico máximo en el período postoperatorio alcanzando su mínimo a las 24 hs.

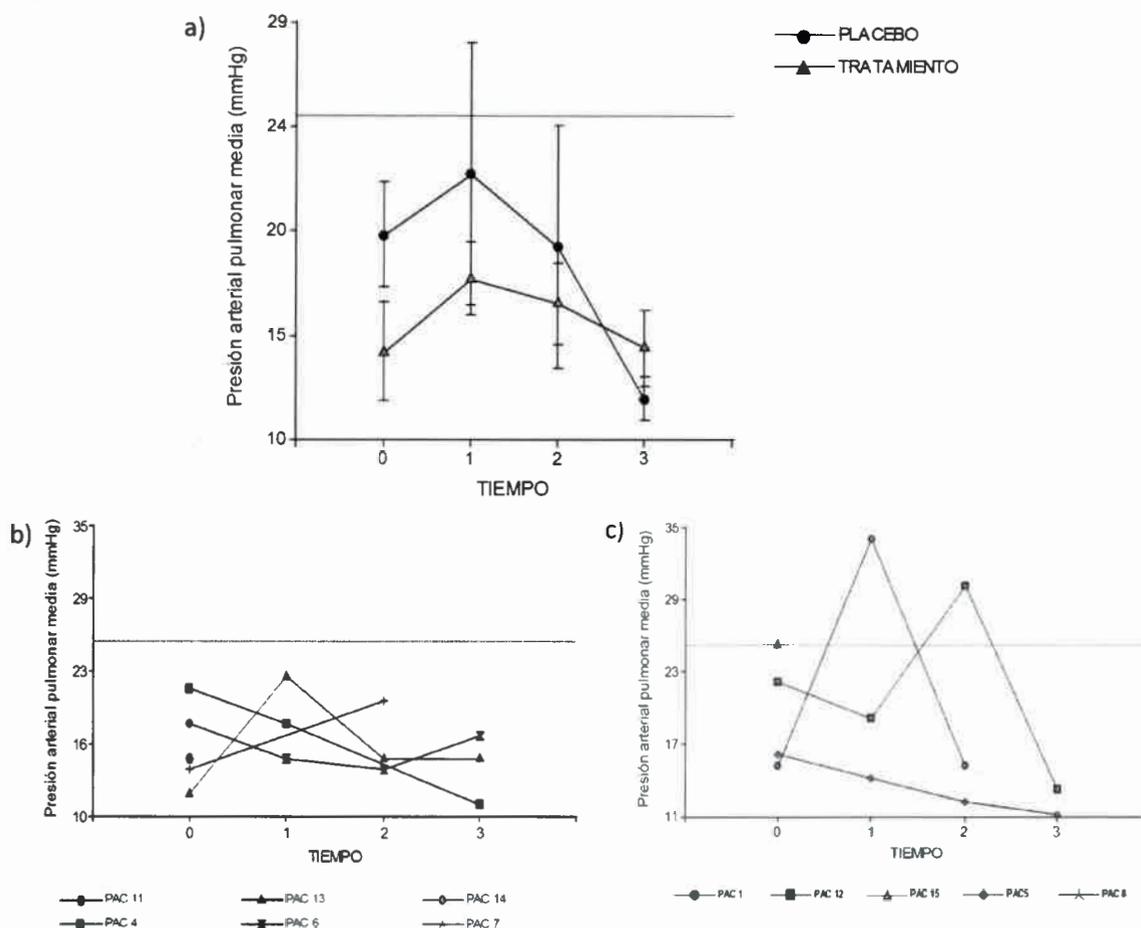


Figura 30. a) Presión arterial pulmonar media según tiempo de determinación (0= preoperatorio, 1=postoperatorio, 2=12hs, 3=24hs) y tratamiento. La línea demarca los 25mmHg de la HP. Presión arterial pulmonar media según tiempo de determinación en cada paciente del grupo tratado con Citrulina oral (b) y del grupo placebo(c).

Comparando ambos grupos, no es posible encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ellos en ningún momento; aun así es posible observar un comportamiento más estable y con valores más bajos en el grupo con tratamiento que en el placebo antes de la cirugía (19 mmHg vs 14 mmHg, $p=0,15$), inmediatamente en el postoperatorio (22 mmHg vs 17 mmHg, $p=0,41$) y a las 12 hs (19 mmHg vs 16 mmHg, $p=0,67$). Por otra parte, tomando como referencia el valor normal de presión arterial pulmonar hasta 20mmHg (Hatano y col., 1997), ninguno de los individuos del grupo tratamiento presentó presiones arteriales pulmonares elevadas, no así en el grupo placebo con el 67% de las mediciones igual o por sobre este nivel de presión pulmonar en el período postoperatorio. La Figura 31 muestra las proporciones de pacientes según la clasificación de la PAP: por debajo de 20 mmHg (C1) y sobre este límite (C2).

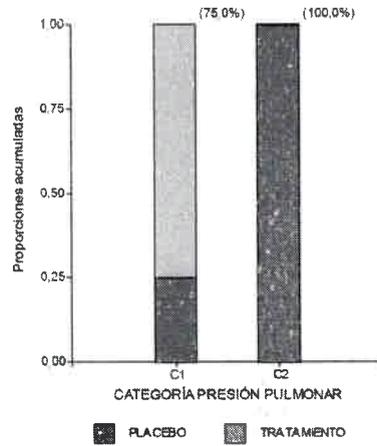


Figura 31. Porcentaje de pacientes según pertenezcan a C1 o C2

Dos de los pacientes con placebo superaron los 25 mmHg y al analizar sus concentraciones de citrulina plasmática a las 12 hs se observó que resultaron mucho más bajas al valor normal para niños menores de 6 años (10 y 26 $\mu\text{mol/L}$; VN=30 $\mu\text{mol/L}$ IQR 23-37) (Lepage y col., 1997).

Presión Arterial Sistémica (PAS)

La presión arterial sistémica media a lo largo del tiempo en pacientes del grupo control y placebo se grafican en la Figura 32.

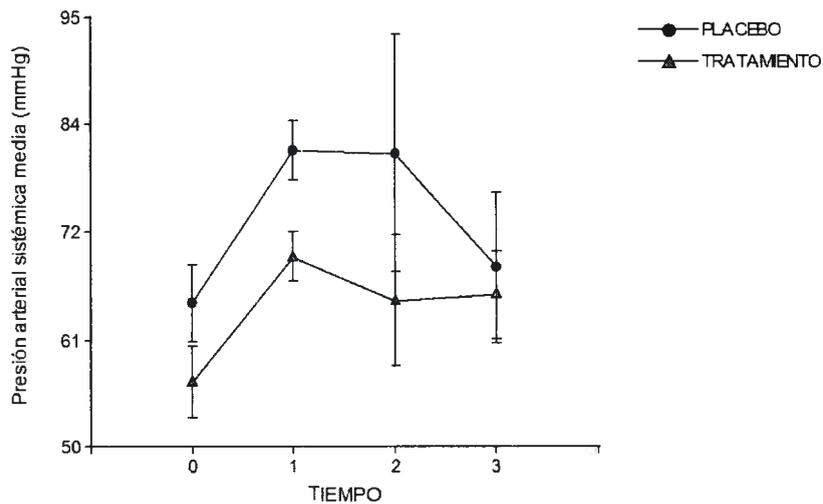


Figura 32. Presión arterial sistémica media según tiempo (0= preoperatorio, 1=postoperatorio, 2=12hs, 3=24hs) y tratamiento.

Los valores de las presiones arteriales sistémicas se incrementaron en el postoperatorio de la cirugía cardíaca en ambos grupos, existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ellos en este punto (67mmHg IQR 63-73 vs 81mmHg IQR 75-82, $p= 0,025$); luego de esto, en el grupo tratamiento la PAS se mantuvo relativamente constante y en el grupo placebo se observó una marcada disminución a las 24 hs. Si bien el grupo con citrulina oral mantuvo siempre presiones más bajas, esto no significa ningún riesgo para los individuos bajo tratamiento ya que conservan sus valores dentro del rango normal estipulado para la población infantil (91/63). Con esto es posible concluir que no se produce ninguna complicación respecto a la presión arterial sistémica luego de la administración de citrulina oral cuando se aumenta la dosis a $3g/m^2/dosis$, sino que, por el contrario, parece tener mayor estabilidad en el transcurso de la recuperación logrando con mayor rapidez volver a los valores basales.

Polimorfismo T1405N-CPS1

Para el estudio de la influencia del polimorfismo T1405N- CPS1 sobre las concentraciones de los distintos metabolitos/mediciones entre los grupos tratado y control se consideró una distribución equitativa entre los genotipos AA/CA- CC (Figura 33).

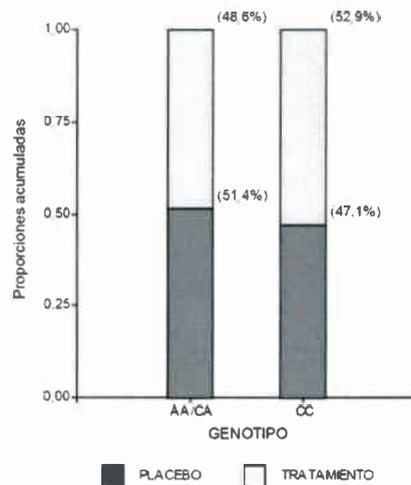


Figura 33. Porcentaje de pacientes según presenten o no del polimorfismo en cada grupo.

Los individuos CC presentan los valores de presión arterial pulmonar más bajas, aunque las diferencias con los otros genotipos no son significativas en ningún punto de tiempo (Figura 34). La presencia del polimorfismo tampoco altera la presión arterial sistémica.

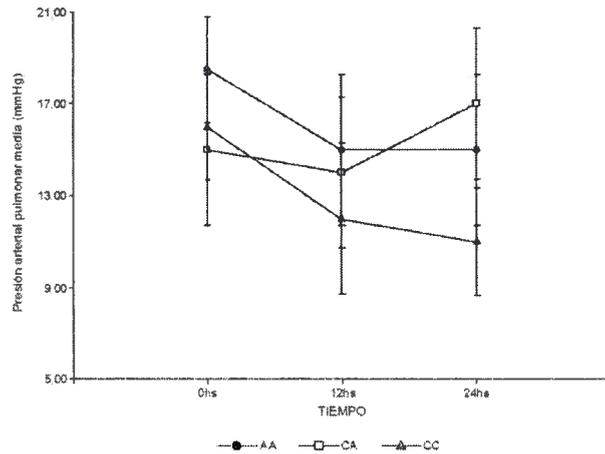


Figura 34. Presión arterial pulmonar media de cada genotipo según tiempo postoperatorio.

Los individuos CC presentan un aumento de los valores de citrulina hacia las 24hs, encontrándose asociados a la presión arterial pulmonar ($p=0,02$). Los pacientes CA/AA mantienen relativamente constantes los niveles de citrulina con independencia del tratamiento que reciban (Figura 35).

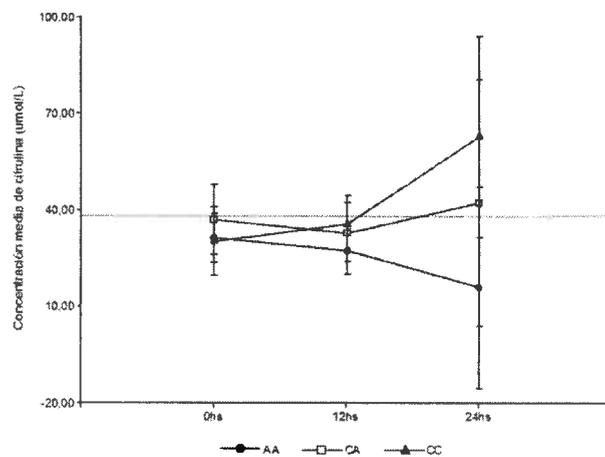


Figura 35. Concentración media de citrulina de cada genotipo según tiempo posoperatorio.

La presencia del polimorfismo T1405N-CPS1 en homocigosis se manifestó con un incremento en los valores de homocisteína plasmática ($p=0,03$). Este efecto no se produce en heterocigotas, los cuales no presentaron diferencias con el grupo normal como puede observarse en la Figura 36.

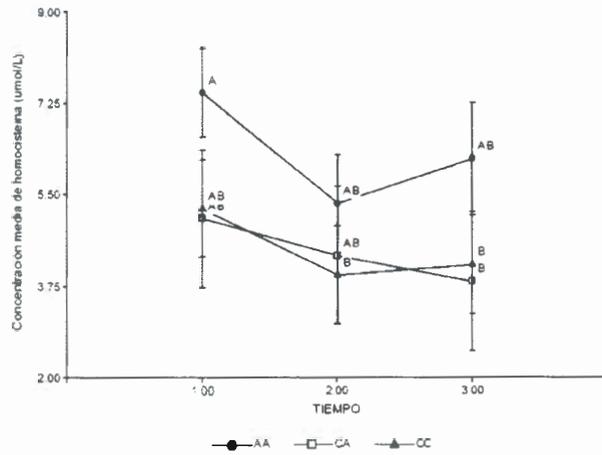


Figura 36. Concentración media de homocisteína de cada genotipo según tiempo postoperatorio.

La ausencia del polimorfismo se reflejó además en concentraciones más altas de ON para el genotipo CC tal como había sido demostrado por Summar y cols (2004), y las más bajas de cuando el polimorfismo está presente tal como se observa en la Figura 37.

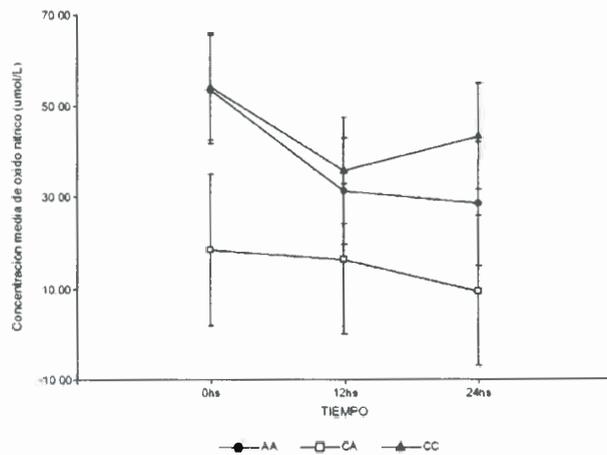


Figura 37. Concentración media de óxido nítrico de cada genotipo según tiempo postoperatorio.

Como es posible observar en la Figura 38, los tres genotipos se comportan similar respecto a las concentraciones medias de arginina con el paso del tiempo. Sin embargo, es posible hallar diferencias significativas entre ellos, destacándose los valores más altos para el genotipo CA, intermedio para CC y los más bajos para AA. En este aspecto es posible destacar que el genotipo CA presenta mayor concentración media de arginina en todos los tiempos del ensayo comparado con los genotipos AA/CC, pero por otra parte es el genotipo que presenta las concentraciones más bajas de óxido nítrico; junto con la observación de que las concentraciones de arginina en este genotipo no se correlaciona con los niveles medios de citrulina, es posible

especular que esta relación puede deberse a la capacidad reducida del genotipo de producir ON a partir de arginina, por limitar la actividad CPS1 en los primeros pasos del ciclo de la urea.

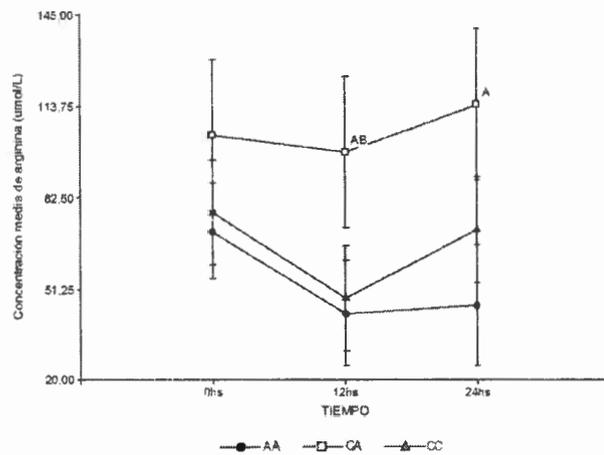


Figura 38. Concentración media de arginina de cada genotipo según tiempo postoperatorio.

Estudios previos realizados por Canter y col. (2008) demostraron que el genotipo CPSI T1405N (AC vs. AA: OR=4.08, $p=0.04$, CC vs. AA: OR=5.96, $p=0.01$) puede ser considerado como un predictor independiente del riesgo de hipertensión pulmonar persistente luego de la cirugía de problemas cardíacos congénitos. Esto es, el alelo A protege del riesgo, los individuos AA tendrían menor probabilidad de desarrollar hipertensión pulmonar luego de la cirugía. Sin embargo, este trabajo sólo considera presencia/ausencia de hipertensión pulmonar y sin distribución equitativa de genotipos.

Nuestro trabajo, por el contrario, señala los valores más bajos de presión arterial pulmonar para los genotipos CC, intermedios para CA y más altos para AA, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. A su vez los individuos homocigotas AA para el polimorfismo presentaron los valores más altos de homocisteína a todos los tiempos, efecto ya estudiado previamente (Silvera Ruiz y col., 2014), y al encontrarse dicho metabolito en directa relación con el nivel de presión arterial pulmonar, es posible especular el motivo por el cual el genotipo AA presenta mayor riesgo de sufrir hipertensión que AC/CC.

Correlación Metabolitos

Analizando la evolución de las concentraciones medias de metabolitos a lo largo del tiempo, es posible observar el comportamiento de cada variable (Figura 39), las correlaciones entre ellas (Tabla 27) y estudiar las mismas.

Tabla 27. Coeficientes de correlación de los parámetros analizados.

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	PAP	HOMOCISTEÍNA	ARGININA	PAS	ON	CITRULINA	PESO	EDAD
PAP	1,00	0,03	0,01	0,99	4,9E-03	0,94	0,20	0,18
HOMOCISTEÍNA	0,42	1,00	0,16	0,62	0,08	0,54	0,25	0,51
ARGININA	-0,51	-0,20	1,00	0,78	0,42	0,37	0,58	0,43
PAS	-2,5E-03	-0,08	0,05	1,00	0,10	0,74	0,27	0,33
ON	0,53	0,24	-0,12	-0,25	1,00	0,98	0,62	0,36
CITRULINA	0,02	-0,09	0,13	-0,05	-4,3E-03	1,00	0,99	0,95
PESO	-0,44	0,33	0,18	-0,32	-0,15	0,01	1,00	2,3E-06
EDAD	-0,49	0,19	0,25	-0,30	-0,27	0,02	0,92	1,00

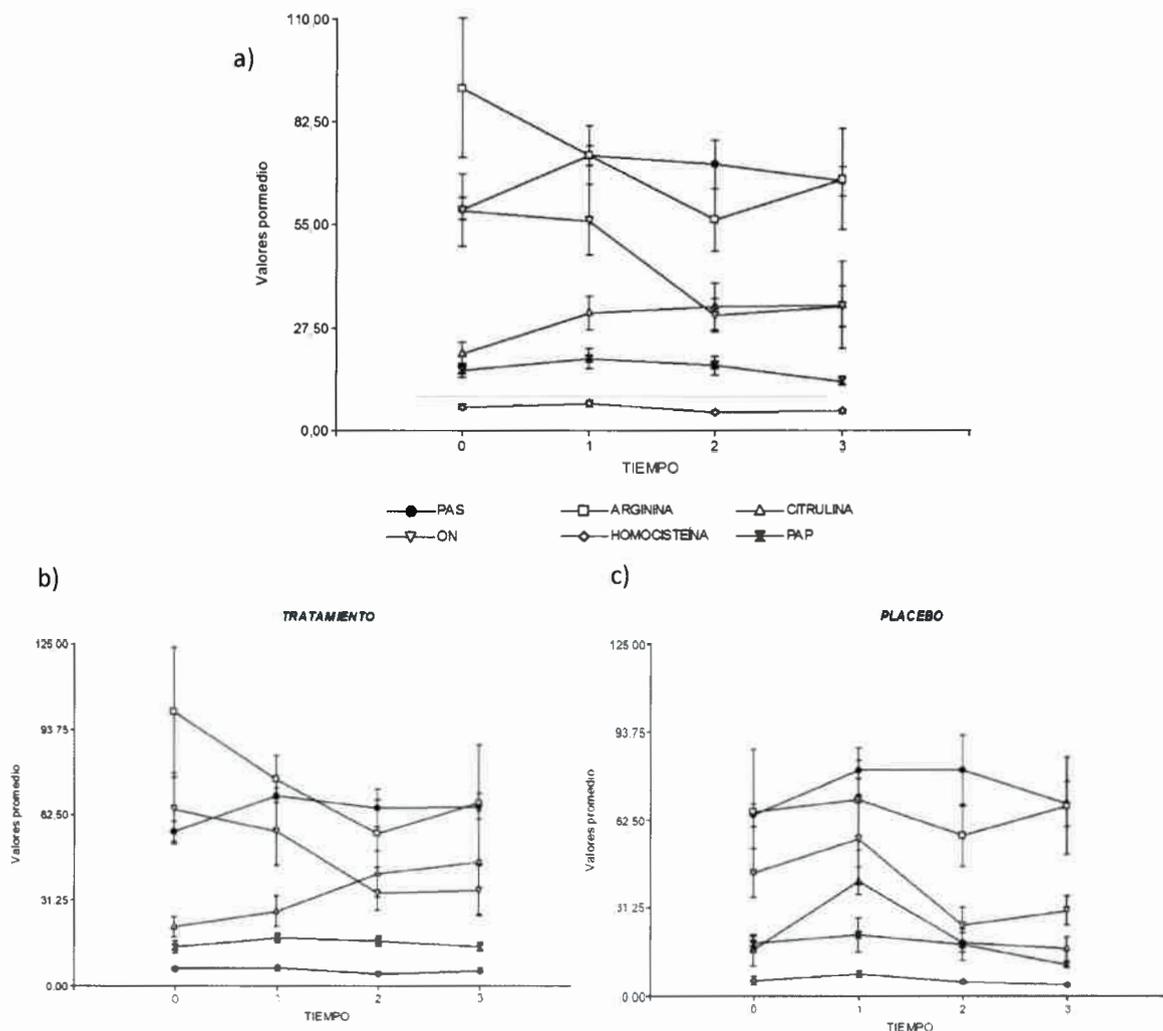


Figura 39. Concentraciones promedio de todos los metabolitos estudiados según tiempo (0= preoperatorio, 1=postoperatorio, 2=12hs, 3=24hs) de a) ambos grupos, b) grupo tratamiento, y c) grupo placebo.

Considerando el total de pacientes estudiados en su conjunto (N=16) es importante destacar que la presión arterial pulmonar no resultó correlacionada con la presión arterial sistémica ($p=0,99$), ni con las concentraciones plasmáticas de citrulina ($p=0,94$), como tampoco

tuvo influencia el peso o la edad del paciente; sino que la presión pulmonar se correlaciona con las concentraciones de homocisteína ($p=0,03$), de arginina ($p=0,01$) y de óxido nítrico ($p=0,0049$) (ver Figura 39 a).

Cuando se analizan los grupos por separado, en el grupo tratamiento se conserva sólo la correlación de la presión arterial pulmonar con la concentración de arginina ($p=0,02$), sin demostrarse el resto de las correlaciones (Figura 39 b). Por otra parte, puede observarse la evolución de todos los metabolitos a lo largo de la intervención/recuperación posquirúrgica sin intervención alguna de agregado de cirulina; aquí es posible observar que a lo largo del tiempo la presión arterial pulmonar, la sistémica y los niveles de homocisteína plasmática siguen el mismo comportamiento, como también lo sigue el grupo de citrulina/arginina/óxido nítrico (Figura 39 c). En este grupo placebo se encontró correlación estadística de la presión arterial pulmonar con los niveles de ON ($p=0,01$), y fue posible asociar las concentraciones de ON con los niveles plasmáticos de homocisteína ($p=0,02$).

Con esto es posible corroborar el postulado de Ling y col. (2014) que proponen a la homocisteína como un biomarcador de la presión arterial pulmonar, permitiendo brindar un mejor pronóstico y tratamiento en pacientes sometidos a cirugía cardiovascular. Además los valores de presión pulmonar se encontraron en directa asociación con los niveles de arginina y/u ON en todos los pacientes, con lo que se destaca la importancia de los metabolitos intermedios de este ciclo para determinar la homeostasis en la presión arterial pulmonar.

Comparación con estudios previos

Los resultados obtenidos en nuestra población de estudio demuestran la eficacia de la administración de citrulina oral para prevenir la hipertensión pulmonar. El incremento de la dosis del aminoácido citrulina en el protocolo permitió superar los valores recomendados a las 12hs postcirugía en nuestro grupo, que consideramos de mayor riesgo por los valores basales de citrulina plasmática observados previo a la intervención quirúrgica.

No se ha podido realizar la comparación estadística entre ambos trabajos por no disponer de los datos originales del estudio del Dr Smith del cual se obtendría el error estándar en cada tiempo, sin embargo, la comparación de medias permite elucidar los cambios en concentración de citrulina en cada tiempo (Figura 40).

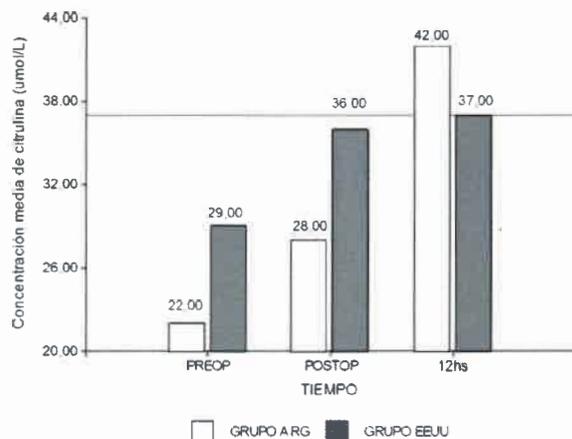


Figura 40. Concentración media de citrulina según tiempo del grupo tratado con citrulina oral de pacientes del presente protocolo (GRUPO ARG), y pacientes del protocolo de Dr Smith (GRUPO EEUU).

Por otra parte, comparando nuestros resultados con estudios previos (Smith y col., 2006) vemos que en el grupo tratado no hubo episodios de hipertensión pulmonar, siendo los valores promedio de presión arterial pulmonar mucho menores que los reportados en el protocolo anterior con dosis menores de citrulina oral (Figura 41) tanto en el postoperatorio inmediato como en el punto crítico a las 12hs.

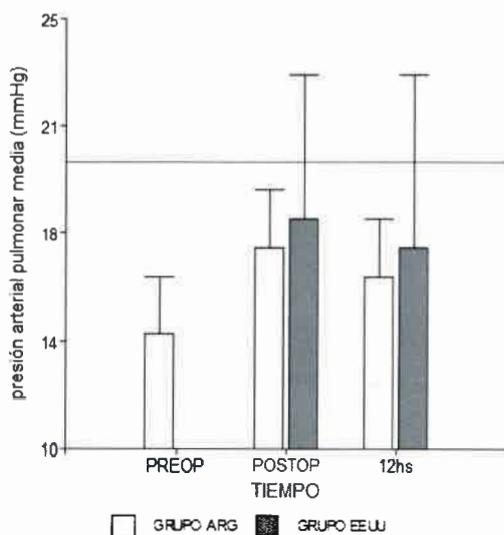


Figura 41. Presión arterial pulmonar media según tiempo del grupo tratado con citrulina oral de pacientes del presente protocolo (GRUPO ARG), y pacientes del protocolo de Dr Smith (GRUPO EEUU).

CONCLUSIONES

Con este trabajo se concluye que la suplementación oral de citrulina en dosis de 3mg/m²/dosis incrementa de forma segura las concentraciones de citrulina plasmática comparada con el grupo placebo en el postoperatorio de la cirugía cardíaca. La presión media sistémica no difiere entre los grupos de citrulina oral y placebo, independientemente de las diferencias en las concentraciones plasmáticas de citrulina entre los grupos.

Por otra parte, el aumento de las concentraciones de citrulina plasmática se asoció a una disminución del riesgo de hipertensión pulmonar postoperatoria. Este efecto puede ser secundario a la producción continua de L-arginina a partir de citrulina y la estimulación de la vía del NO en ambos tejidos hepáticos y pulmonares. La citrulina oral presenta una buena biodisponibilidad y facilidad de difusión a través de las membranas celulares. La parte citosólica del ciclo de la urea permite la producción intracelular localizada de L-arginina a partir de citrulina en el endotelio pulmonar. La producción local de ON se puede inferir de la asociación de las concentraciones plasmáticas de citrulina elevadas y la disminución en la incidencia de la hipertensión pulmonar sin que exista hipotensión sistémica según lo sugerido por Smith y col., 2006, explicando nuestros resultados, donde no se ven afectados los valores plasmáticos de ON.

Solo unos pocos pacientes que recibieron citrulina oral no demostraron un aumento significativo en la concentración de citrulina plasmática, y por lo tanto estuvieron en riesgo de hipertensión pulmonar postoperatoria.

Otra observación importante se halla en los niveles iniciales tanto de citrulina como de arginina de los pacientes que ingresan a cirugía, siendo éstos muy bajos e indicando un estado nutricional deficiente de los individuos. Esto los podría predisponer a mayores complicaciones si no se les administra citrulina durante el postoperatorio, siendo un componente agregado en nuestra población que destaca la importancia de la citrulina para el cuidado y mejora del paciente en la unidad de cuidados intensivos. En el mismo sentido, se observó en la muestra preoperatoria de dos de los pacientes que ingresaron al estudio, un marcado incremento de los niveles de glutatión, lo que se considera estar relacionado a la deficiencia de vitamina B6.

Es así que el empleo de dosis más altas de citrulina oral alcanzaron niveles promedio de citrulina plasmática de 42 $\mu\text{mol/L}$, excediendo fácilmente los 37 $\mu\text{mol/L}$ sugeridos en estudios previos para prevenir la hipertensión pulmonar. Con esto se demuestra la eficiencia de la

administración de citrulina vía oral en protocolos de rutina de reparación de defectos cardíacos congénitos para prevenir la hipertensión pulmonar de forma segura y con muy bajo coste.

BIBLIOGRAFÍA

Introducción

- Albrecht J, y cols. Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: A critical appraisal. *Biochem Pharmacol.* 2010;80:1303–8.
- Bao L, Cui Y. Prediction of the phenotypic effects of non-synonymous single nucleotide polymorphisms using structural and evolutionary information. *Bioinformatics*, 2005; 21(10):2185-2190.
- Barr FE, y cols. Effect of cardiopulmonary bypass on urea cycle intermediates and nitric oxid levels after congenital heart surgery. *J Pediatr* 2003; 142:26-40.
- Berman H, y cols. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, 235.
- Blau N, y cols. Amino acids. In *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics.* 2008; pp. 53-90.
- Braissant O, y cols. Ammonia toxicity to the brain. *J Inherit Metab Dis.* 2013; 36: 595-612.
- Brusilow SW, Horwich AL. Urea cycle enzymes. En: Scriver C, Beaudet A, Valle D, Sly W (eds). *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw Hill, New York 2001; pp 1909-63.
- Campistol J. Errores congénitos del metabolismo intermediario en la infancia. Formas de presentación y orientación diagnóstica. *Canarias Pediátrica* 1997; 7: 99-106.
- Chan PA, y cols. Interpreting missense variants: comparing computational methods in human disease genes CDKN2A, MLH1, MSH2, MECP2, and tyrosinase (TYR). *Hum Mutat.* 2007, 28:683–693.
- Cotton RGH, y cols. Human Variome Project meeting. Recommendations of the 2006 Human Variome Project meeting. *Nat Genet* 2007; 39,433 – 436.
- Deacon R, y cols. Selective inactivation of vitamin B12 in rats by nitrous oxide. *Lancet* 1978; 2:1023-1024.
- Enns GM, y cols. Survival after treatment with phenylacetate and benzoate for urea-cycle disorders. *N Engl J Med.* 2007;356:2282–92
- Fujita PA y cols. The UCSC Genome Browser database: update 2011. *Nucleic Acids Res* 2011, 39:D876-882.
- Gilis D, Rooman MJ. Popmusic, an algorithm for predicting protein mutant stability changes. Application to prion proteins. *Protein Eng.* 2000, 13, 849.
- Hu J, Ng PC. Predicting the effects of frameshifting indels. *Genome Biology* 2012,13:R9. (<http://genomebiology.com/2012/13/2/R9>).
- Krivitzky L, y cols. Intellectual, adaptive, and behavioral functioning in children with urea cycle disorders. *Pediatr Res.* 2009;66:96–101.
- Kumar P, y cols. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009, 4:1073–1081.
- Kwasigroch JM, y cols. PoPMuSiC, rationally designing point mutations in protein structures. *Bioinformatics* 200218: 1701–1702.
- Lichter-Konecki U, y cols. Gene expression profiling of astrocytes from hyperammonemic mice reveals altered pathways for water and potassium homeostasis in vivo. *Glia.* 2008; 56:365–77.

- Lichter-Konecki U. Profiling of astrocyte properties in the hyperammonemic brain: Shedding new light on the pathophysiology of the brain damage in hyperammonemia. *J Inherit Metab Dis*. 2008; 31:492–502.
- Mathias RS, y cols. Hyperammonemia in urea cycle disorders: role of the nephrologist. *Am J Kidney Dis*. 2001; 37(5):1069-80.
- Melissa M, y cols. Screening for deleterious nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms in genes involved in steroid hormone metabolism and response. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14, 1326–1329.
- Mitchell S, y cols. Genetic variation in the urea cycle: a model resource for investigating key candidate genes for common diseases. *Hum Mutat*. 2009; 30(1):56-60.
- Moncada S, Higgs A. Mechanism of disease. The L-arginine nitric oxid pathway. *N Engl J Med* 1993; 329:2002-12.
- Mondzac A, y cols. *J Lab Clin Med*. 1965; 66:526.
- Natesan V, Mani R, Arumugam R. Clinical aspects of urea cycle dysfunction and altered brain energy metabolism on modulation of glutamate receptors and transporters in acute and chronic hyperammonemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2016; 81:192–202.
- Neill MA, y cols. Quantitative RT-PCR Comparison of the Urea and Nitric Oxide Cycle Gene Transcripts in Adult Human Tissues. *Mol Genet Metab*. 2009 June; 97(2): 121–127.
- Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*. 2003, 31:3812–3814.
- Pearson DL, y cols. Neonatal pulmonary artery hypertension. Urea cycle intermediates, nitric oxid production, and carbamoyl-phosphate synthetase function. *New Engl J Med* 2001; 344:1832-38.
- Posset R., y cols. Age at disease onset and peak ammonium level rather than interventional variables predict the neurological outcome in urea cycle disorders. *J Inherit Metab Dis* 2016; 39(5):661-72.
- Ramensky V, y cols. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30:3894–3900.
- Richard JD, y cols. Predicting deleterious nsSNPs: an analysis of sequence and structural attributes. *BMC Bioinformatics* 2006; 7, 217.
- Schultze Neick I, y cols. L-arginine a substance preverse the pulmonary endothelial dysfunction caused by congenital heart surgery. *Circulation* 1999; 100:749-55.
- Scriver CR. After the genome -the phenome? *J Inher Metab Dis* 2004; 27(3): 305-17.
- Simmonds HA, y cols. Analysis of purines and pyrimidines in blood, urine, and other physiological fluids. In *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics. A Laboratory Manual*. Frits A Hommes (eds): Wiley-Liss; 1991, pp 397-424.
- Summar M, Tuchman M. Proceedings of a consensus conference for the management of patients with urea cycle disorders. *J Pediatr*. 2001 Jan; 138(1 Suppl):S6-10.
- Summar ML, y cols. Analysis of 200 patients undegoing bone marrow transplant shows allelic disequilibrium between drug related toxicity and a common exonic polymorphism in the CPS1 gene and correlates with disruption of urea cycle intermediates. *Am J Hum Genet* 1999; 65:A25.

- Summar ML, y cols. Diagnosis, symptoms, frequency and mortality of 260 patients with urea cycle disorders from a 21-year, multicentre study of acute hyperammonaemic episodes. *Acta Paediatr.* 2008;97:1420–5
- Summar ML, y cols. Environmentally determined genetic expression: clinical correlates with molecular variants of carbamyl phosphate synthetase I. *Mol Genet Metab* 2004; 81:S12–19.
- Summar ML, y cols. Relationship between carbamoyl-phosphate synthetase genotype and systemic vascular function. *Hypertension* 2004; 43:186–191.
- Summar MLS. Urea Cycle Disorders Overview. *Gene Rev* 2005.
- Tavtigian SV, y cols. Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *J Med Genet* 2006; 43(4):295-305.
- Thoene JS. Citrullinemia type I. *Gene Rev* 2008.
- Tuchman M, y cols. Urea Cycle Disorders Consortium of the Rare Diseases Clinical Research Network; Cross-sectional multicenter study of patients with urea cycle disorders in the United States. *Mol Genet Metab.*2008;94:397–402
- Vilaseca MA. Aminoácidos y derivados. In Fuentes Arderiu X, Castrineiros Lacambra MJ, Queraltó Compañó JM, eds. *Bioquímica clínica y patología molecular*. 2 ed. Barcelona: Reverté SA; 1998. p. 703-19.
- Waclawik AJ, y cols. Myeloneuropathy from nitrous oxide abuse: unusually high methylmalonic acid and homocysteine levels. *Wmj* 2003; 102:43–45.
- Xi T, y cols. Many amino acid substitution variants identified in DNA repair genes during human population screenings are predicted to impact protein function. *Genomics* 2004; 83, 970–979.

Parte 1. Alteraciones primarias en el Ciclo de la Urea

Capítulo 1. Deficiencia en Ornitina Carbamiltransferasa

- Blau N, y cols. Amino acids. In *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*. 2008; pp. 53-90.
- Caldovic L, y cols. Genotype-Phenotype Correlations in Ornithine Transcarbamylase Deficiency: A Mutation Update. *J Genet Genomics*. 2015; 42(5):181-94.
- Dionisi-Vici C, y cols. Inborn errors of metabolism in the Italian pediatric population: a national retrospective survey. *J Pediatr* 2002;140:321–327.
- Garcia-Perez MA, Sanjurjo P, RubioV. Demonstration of the spfash mutation in Spanish patients with ornithine transcarbamylase deficiency of moderate severity. *Hum Genet* 1995: 183–186.
- Greenblatt MS, y cols. Detailed computational study of p53 and p16: using evolutionary sequence analysis and disease-associated mutations to predict the functional consequences of allelic variants. *Oncogene* 2003; 22(8):1150-1163.
- Haan EA, y cols. Carrier detection in ornithine transcarbamylase deficiency. *J Inher Metab Dis* 1982; 5:37–40.

- Haeberle J, y cols. Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders. *Orphanet J Rare Dis* 2012; 7: 32.
- Hata A, y cols. Structure of the human ornithine transcarbamylase gene. *J Biochem* 1988;103:302–308.
- Hauser ER, y cols. Allopurinol-induced orotidinuria. A test for mutations at the ornithine carbamoyl- transferase locus in women. *N. Engl. J. Med.* 1990; 322:1641–1645.
- Hudak ML, y cols. Differentiation of transient hyperammonemia of the newborn and urea cycle enzyme defects by clinical presentation. *J Pediatr* 1985; 107:712–719.
- Lindgren V, y cols. Human ornithine transcarbamylase locus mapped to band Xp21.1 near the Duchenne muscular dystrophy locus. *Science* 1984; 226:698–700.
- McCullough BA, y cols. Genotype spectrum of ornithine transcarbamylase deficiency: correlation with the clinical and biochemical phenotype. *Am J Med Genet* 2000; 93:313–319.
- Scaglia F, y cols. An integrated approach to the diagnosis and prospective management of partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Pediatrics* 2002; 109, 150–152.
- Shi D, y cols. 1.85-Å resolution crystal structure of human ornithine transcarbamoylase complexed with N-phosphonacetyl-L-ornithine. Catalytic mechanism and correlation with inherited deficiency. *J Biol Chem* 1998; 273:34247–34254.
- Simmonds HA, y cols. Analysis of purines and pyrimidines in blood, urine, and other physiological fluids. *In Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics. A Laboratory Manual.* Frits A Hommes (eds): Wiley-Liss; 1991, pp 397-424.
- Tuchman M, Jaleel N, Morizono H, Sheehy L, Lynch MG. Mutations and polymorphisms in the human ornithine transcarbamylase gene. *Hum Mutat.* 2002 Feb;19(2):93-107.
- Yamaguchi S, y cols. Mutations and Polymorphisms in the Human Ornithine Transcarbamylase (OTC) Gene. *Hum Mutat* 2006; 27(7), 626:632.

Capítulo 2. Deficiencia en Argininosuccinato Sintetasa

- Arcos Burgos M, Muenke M. Genetics of population isolates. *Clin Genet* 2002; 61:233–247.
- Barraí I, Rodríguez-Larralde A, Mamolini E, Manni F and Scapoli C. Isonymy structure of the USA population. *Am J Phys Anthropol* 2001; 114:109-123.
- Berning C y cols. Investigation of Citrullinemia Type I Variants by In Vitro Expression Studies. *Human Mutation* 2008; 29:1222-1227.
- Berning C, y cols. Investigation of citrullinemia type I variants by in vitro expression studies. *Hum Mut* 2008; 29: 1222-7.

- Bittles AH, Black ML. Consanguinity, human evolution, and complex diseases. *PNAS* 2010; 107(1):1779–1786
- Bittles AH. Consanguinity and its relevance to clinical genetics. *Clin Genet* 2001; 60:89–98.
- Boattini A y cols. Are ethnic minorities synonymous for genetic isolates? Comparing Walser and Romance populations in the Upper Lys Valley (Western Alps). *J Anthropol Sci* 2011; 89:161–173.
- Brusilow SW, Horwich AL. Urea cycle enzymes. En: Scriver C, Beaudet A, Valle D, Sly W (eds). *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw Hill, New York 2001; pp 1909-63.
- Bryc K y cols. Genome-wide patterns of population structure and admixture among Hispanic/Latino populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(Supplement 2) 2010; 8954-8961. doi: 10.1073/pnas.0914618107
- Castilla E, Adams J. Genealogical information and the structure of rural Latin-American populations: reality and fantasy. *Hum Hered* 1996; 46(241):a 255.
- Castilla EE, Sod R. The surveillance of birth defects in South America: the search of geographic cluster: endemics. *Adv Mutagen Res* 1990; 2:211–230.
- Cavalli-Sforza LL y cols. *The history and geography of human genes*. Princeton University Press (1994), Princeton.
- Clark G y cols. Linkage Disequilibrium and Inference of Ancestral Recombination in 538 Single-Nucleotide Polymorphism Clusters across the Human Genome. *American Journal of Human Genetics* 2003; 73, 285-300.
- De La Fuente S y cols. Síndrome de Werner: estudios clínicos y genealógicos en varias familias emparentadas del Departamento de La Caldera (Salta). XXIV Congreso Argentino de Genética (1993), pag. 47.
- Dimmock DP, Trapane P, Feigenbaum A, y cols. The role of molecular testing and enzyme analysis in the management of hypomorphic citrullinemia. *Am J Med Genet A* 2008;146A:2885–90.
- Engel K, y cols. Mutations and Polimorphisms in the human argininosuccinate synthetase (ASS1) gene. *Hum Mut* 2009; 30(3): 300-7.
- Ewens WJ, Spielman RS. The transmission/disequilibrium test: history, subdivision, and admixture. *Am J Hum Genet* 1995; 57:455–464.
- Excoffier y cols. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*. 2007 Feb 23;1:47-50.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, y cols. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10:111-113
- Galanter JM y cols. Development of a Panel of Genome-Wide Ancestry Informative Markers to Study Admixture Throughout the Americas. *PLoS Genet* 2012; 8(3), e1002554. doi: 10.1371/journal.pgen.1002554.

- Gao HZ y cols. Identification of 16 novel mutations in the argininosuccinate synthetase gene and genotype-phenotype correlation in 38 classical citrullinemia patients. *Hum Mutat.* 2003 Jul; 22(1):24-34.
- Gayden T y cols. Human Y-chromosome haplotyping by allele-specific polymerase chain reaction. *Electrophoresis* 2008; 29, 2419-2423.
- Goudet J. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *J Hered* (1995) 86 (6): 485-486.
- Grosso C y cols. Maternal mutation 677C>T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with severe brain injury in offspring. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, 2010.
- Haberle J, Pauli S, Linnebank M, y cols. Structure of the human argininosuccinate synthetase gene and an improved system for molecular diagnostics in patients with classical and mild citrullinemia. *Hum Genet* 2002;110:327-33.
- Haberle J, Pauli S, Schmidt E, y cols. Mild citrullinemia in Caucasians is an allelic variant of argininosuccinate synthetase deficiency (citrullinemia type 1). *Mol Genet Metab* 2003;80:302-6.
- Haberle J, Pauli S, Schmidt E, Schulze-Eilfing B, Berning C, Koch HG. Mild citrullinemia in Caucasians is an allelic variant of argininosuccinate synthetase deficiency (citrullinemia type 1). *Mol Genet Metab* 2003;80:302-6.
- Kleijer WJ, y cols. Prenatal diagnosis of citrullinemia and argininosuccinic aciduria: evidence for a transmission ratio distortion in citrullinemia; *Prenat Diagn* 2006; 26(3): 242-7.
- Kobayashi K, y cols. The gene mutated in adult-onset type II citrullinemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nat Genet* 1999; 22: 159-163.
- Kobayashi K. Heterogeneity of Mutations in Argininosuccinate Synthetase Causing Human Citrullinemia. *J Biol Chem* 1990; 265, 11361.
- Kremer RD y cols. Sandhoff disease: 36 cases from Cordoba, Argentina. *J Inherit Metab Dis* 1985; 8(1):46.
- Laróvere LE, y cols. Citrullinemia Type I, Classical Variant. Identification of ASS-p.G390R (c.1168G>A) mutation in families of a limited geographic area of Argentina: a possible population cluster. *Clin Biochem* 2009; 42(10-11): 1166-8.
- Laróvere LE, y cols. Molecular Epidemiology of Citrullinemia Type I in a Risk Region of Argentina: A First Step to Preconception Heterozygote Detection. *JIMD reports* 2012; 6:27-9.
- Lee BH, Kim YM, Heo SH, y cols. High prevalence of neonatal presentation in Korean patients with citrullinemia type 1, and their shared mutations. *Mol Genet Metab* 2013;108:18-24.
- Lemke CT, Howell PL. The 1.6 Å crystal structure of E. coli argininosuccinate synthetase suggests a conformational change during catalysis. *Structure* 2001; 9:1153-1164.

- Lemke CT, Howell PL. The 1.6 Å crystal structure of *E. coli* argininosuccinate synthetase suggests a conformational change during catalysis. *Structure* 2001; 9:1153–1164.
- Leutenegger AL y cols. Consanguinity around the world: what do the genomic data of the HGDP-CEPH diversity panel tell us? *Eur J Hum Genet* 2011; 19:583–587
- Lewis SE, Donnelly ET, Sterling ESL, y cols. Nitric oxide synthase and nitric oxide production in human sperm: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. *Mol. Hum. Reprod.* 1996; 2:873–878.
- Manrubia SC, Zanette DH. At the boundary between biological and cultural evolution: the origin of surnames distributions. *J Theor Biol* 2002; 216(4):461-477.
- Mao X y cols. A Genome wide Admixture Mapping Panel for Hispanic/Latino Populations. *The American Journal of Human Genetics* 2007; 80, 1171–1178.
- McQuillan R y cols. Runs of homozygosity in European populations. *Am J Hum Genet* 2008; 83:359–372
- Morton E. Kinship bioassay. In: Morton NE (ed). *Genetics structure of populations*. University Press of Hawai (1973), pp:158-163.
- Peakall R and Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* (2012) 28 (19): 2537-2539.
- Peltonen L y cols. Use of population isolates for mapping complex traits. *Nat Rev Genet* 2000; 1(3):182–190.
- Rodríguez-Larralde A. Distribución de los apellidos y su uso en la estimación de aislamiento y sedentarismo en los municipios del Estado Lara, Venezuela. *Acta Cient Venez* 1990; 41: 163-170.
- Sander J, Janzen N, Sander S, y cols. 2003. Neonatal screening for citrullinaemia. *Eur J Pediatr* 162:417–420.
- Shriver M y cols. Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. *Human genetics* 2003; 112, 387–399.
- Simon-Sanchez J y cols. Genome-wide SNP assay reveals structural genomic variation, extended homozygosity and cell-line induced alterations in normal individuals. *Hum Mol Genet* 2007;16:1–14.
- Slatkin M. Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genet Res* 1991; 58:167–175.
- Summar ML. Molecular genetic research into carbamoyl-phosphate synthase I: Molecular defects and linkage markers. *J Inher Metab Dis* 1998; 21:30-39.
- Ten Kate LP y cols. Community genetics. Its definition 2010. *J Community Genet* 2010; 1:19–22.
- Urreizti y cols. Spectrum of CBS mutations in 16 homocystinuric patients from the Iberian Peninsula: high prevalence of T191M and absence of I278T or G307S. *Hum Mutat.* 2003 Jul;22(1):103.

- Wang S y cols. Geographic Patterns of Genome Admixture in Latin American Mestizos. *Plos Genetics* 2008; 4(3), 1-9.
- Wright S. Isolation by distance. *Genetics* 1943; 28:114-128.

Capítulo 3. Deficiencia en Argininosuccinato liasa

- Abramson RD, Barbosa P, Kalumuck K, O'Brien WE. Characterization of the human argininosuccinate lyase gene and analysis of exon skipping. *Genomics* 1991; 10:126-132.
- Allan JD, Cusworth DC, Dent CE, Wilson VK. A disease, probably hereditary characterised by severe mental deficiency and a constant gross abnormality of aminoacid metabolism. *Lancet* 1958; 1:182-187.
- Balmer C, Pandey AV, Rufenacht V, y cols. Mutations and Polymorphisms in the Human Argininosuccinate Lyase (ASL) Gene. *Hum Mut* 2014; Vol. 35, No. 1, 27-35.
- Brosnan ME, Edison EE, da Silva R, Brosnan JT. New insights into creatine function and synthesis. *Adv Enzym Regul* 2007; 47:252-260.
- Brusilow SW, Horwich AL. Online Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. 2009.
- Ficicioglu C, Mandell R, Shih VE. Argininosuccinate lyase deficiency: longterm outcome of 13 patients detected by newborn screening. *Mol Genet Metab* 2009; 98: 273-277.
- Gerrits GP, Gabreëls FJ, Monnens LA, y cols. Argininosuccinic aciduria: clinical and biochemical findings in three children with the late onset form, with special emphasis on cerebrospinal fluid findings of amino acids and pyrimidines. *Neuropediatrics* 1993;24:15-18.
- Levy HL, Coulombe JT, Shih VE. Newborn urine screen- ing. In: Bickel H, Guthrie R, Hammersen G (eds) Neonatal screening for inborn errors of metabolism. Springer, Berlin Heidelberg New York (1980), pp 89-103.
- Mori T, Nagai K, Mori M, y cols. Progressive liver fibrosis in late-onset argininosuccinate ly- ase deficiency. *Pediatr Dev Pathol* 2002; 5:597-601.
- Saudubray JM, Touati G, Delonlay P, y cols. Liver transplantation in urea cycle disorders. *Eur J Pediatr* 1999; 158(Supplement 2): S55-S59.
- Todd S, McGill JR, McCombs JL, y cols. cDNA sequence, interspecies comparison and gene mapping analysis of argininosuccinate lyase. *Genomics* 1989; 4:53- 59.
- Trevisson E, Burlina A, DoimoM, y cols. Functional complementation in yeast allows molecu- lar characterization of missense argininosuccinate lyase mutations. *J Biol Chem* 2009; 284:28926-28934.
- Turner MA, Simpson A, McInnes RR, Howell PL. Human argininosuccinate lyase: a structural basis for intragenic complementation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:9063-9068.
- Walker DC y cols. Identification of a mutation frequently involved in interallelic complementation at the human argininosuccinic acid lyase locus. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.* 47 (suppl.): A169 only, 1990.

- Yu B, Thompson GD, Yip P, Howell PL, Davidson AR. Mechanisms for intra-genic complementation at the human argininosuccinate lyase locus. *Biochemistry* 2001; 40:15581–15590.

Parte 2. Alteraciones Secundarias en el Ciclo de la Urea

Capítulo 4. Polimorfismos en el gen de la Carbamilfosfato sintetasa

- Aeds AM, y cols. Assessing the functional characteristics of synonymous and nonsynonymous mutation candidates by use of large DNA constructs, *Am. J. Hum. Genet.* 2007; 80:740–750.
- Ahuja V, Powers-Lee SG. Human carbamoyl-phosphate synthetase: insight into N-acetylglutamate interaction and the functional effects of a common single nucleotide polymorphism, *J. Inherit. Metab. Dis.* 2008; 31:481–491.
- Brusilow S, Horwich AL. Urea cycle enzymes, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 1909–1963.
- Brusilow SW, Maestri NE. Urea cycle disorders: diagnosis, pathophysiology, and therapy, *Adv. Pediatr.* 1996; 43:127–170.
- Danik JS, Pare G, Chasman DI, y cols. Multiple Novel Loci, Including Those Related to Crohn's Disease, Psoriasis and Inflammation, Identified in a Genome-Wide Association Study of Fibrinogen in 17,686 Women: the Women's Genome Health Study. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009; 2(2): 134–141.
- Deacon R, y cols. Selective inactivation of vitamin B12 in rats by nitrous oxide. *Lancet* 1978;2:1023-1024.
- Dodelson de Kremer R, Grosso C. Maternal mutation 677C>T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with severe brain injury in offspring. *Clin Genet* 2005; 67:69-80.
- Ezgü FS, y cols. Cirrhosis in an infant heterozygous for classical citrullinaemia. *Acta Paediatr* 2005, 94 (12):1849-51.
- Frosst P, y cols. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10:111-113.
- Haraguchi Y, y cols. Cloning and sequence of a cDNA encoding human carbamyl phosphate synthetase I: molecular analysis of hyperammonemia. *Gene* 1991; 107:335–340.
- Janicki D, Bezinover M, Postula RS, y cols. *ISRN Neurology* 2013; 4pages.
- Jones ME. Amino acid metabolism, *Annu. Rev. Biochem* 1965; 34:381–418
- Keskinen P, y cols. Hereditary urea cycle diseases in Finland, *Acta Paediatr.* 2008; 97:1412–1419.
- Lange LA, y cols. Genome-wide association study of homocysteine levels in Filipinos provides evidence for CPS1 in women and a stronger MTHFR effect in young adults. *Hum Mol Genet.* 2010 May 15;19(10):2050-8.

- Martínez AI, Pérez-Arellano I, Pekkala S, Barcelona B, Cervera J. Genetic, structural and biochemical basis of carbamoyl phosphate synthetase 1 deficiency. *Mol Genet and Metab* 2010; 101:311–323.
- Metzberg RL, y cols. Carbamyl phosphate synthetase: studies on the mechanism of action, *J. Biol. Chem.* 1958; 233:1560–1564.
- Nagata N, y cols. Estimated frequency of urea cycle enzymopathies in Japan, *Am. J. Med. Genet.* 1991; 39:228–229.
- Pare G, Chasman D, Parker A, y cols. Novel Associations of CPS1, MUT, NOX4 and DPEP1 with Plasma Homocysteine in a Healthy Population: A Genome Wide Evaluation of 13,974 Participants in the Women’s Genome Health Study. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009; 1; 2(2): 142–150.
- Pearson DL, y cols. Neonatal pulmonary hypertension–urea-cycle intermediates, nitric oxide production, and carbamoyl phosphate synthetase function. *NEngl. J. Med.* 2001; 344:1832–1838.
- Pekkala S, y cols. Structural insight on the control of urea synthesis: identification of the binding site for N-acetyl-L-glutamate, the essential allosteric activator of mitochondrial carbamoyl phosphate synthetase, *Biochem. J.* 2009; 424:211–220.
- Pekkala S, y cols. Understanding carbamoyl-phosphate synthetase I (CPS1) deficiency by using expression studies and structure-based analysis, *Hum. Mutat.* 2010; 31: 801–808.
- Rubio V, y cols. Carbamyl phosphate synthetase I of human liver. Purification, some properties and immunological cross-reactivity with the rat liver enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 1981; 659: 150–160.
- Rubio V, Grisolia S. Human carbamoylphosphate synthetase I. *Enzyme* 1981; 26: 233–239
- Rubio V. Structure–function studies in carbamoyl phosphate synthetases. *Biochem. Soc. Trans.* 1993; 21: 198–202
- Schofield JP. Molecular studies on an ancient gene encoding for carbomyl-phosphate synthetase. *Clin. Sci.* 1993; 84:119–128.
- Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999;19:217–246.
- Shoaf WT, Jones ME. Initial steps in pyrimidine synthesis in Ehrlich ascites carcinoma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1971; 45:796–802.
- Souto JC, Blanco-Vaca F, Soria JM, y cols. A genome wide exploration suggests a new candidate gene at chromosome 11q23 as the major determinant of plasma homocysteine levels: results from the GAIT project. *Am J Hum Genet* 2005; 76:925–933.
- Summar ML, y cols. Characterization of genomic structure and polymorphisms in the human carbamyl phosphate synthetase I gene. *Gene* 2003; 311:51–57.
- Vermeulen SH, van der Vleuten GM, de Graaf J, y cols. A genome-wide linkage scan for homocysteine levels suggests three regions of interest. *J Thromb Haemost* 2006; 4:1303–1307.
- Waclawik AJ, y cols. Myeloneuropathy from nitrous oxide abuse: unusually high methylmalonic acid and homocysteine levels. *Wmj* 2003; 102:43–45.

Capítulo 5. Protocolo de Citrulina Oral

- Barr FE, y cols. Effect of cardiopulmonary bypass on urea cycle intermediates and nitric oxid levels after congenital heart surgery. *J Pediatr* 2003;142:26-40.
- Blau N, y cols. Amino acids. In *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*. 2008; pp. 53-90.
- Boneva RS, Botto LD, Moore CA, Yang Q, Correa A, Erickson JD. Mortality associated with congenital heart defects in the United States: trends and racial disparities, 1979–1997. *Circulation* 2001; 103: 2376-2381.
- Borgesson SD, y cols. Frequency of Doppler measurable pulmonary artery pressure, *J Am Soc Echocardiogr* 1996;9:832-37.
- Burrows FA, y cols. Pulmonary hypertension in children perioperative management. *Can Anesth Soc J* 1986;33:606-26.
- Canter JA, y cols. Genetic variation in the mitochondrial enzyme carbamyl-phosphate synthetase I predisposes children to increased pulmonary artery pressure following surgical repair of congenital heart defects: a validated genetic association study. *Mitochondrion* 2007; 7,204-210.
- Chen PY, Sanders PW. L-arginine abrogates salt-sensitive hypertension in DahlGRapp rats. *J Clin Invest* 1991;88:1559–1567.
- Cooke JP, y cols. Arginine restores cholinergic relaxation of hyper-cholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Circulation* 1991;83:1057–1062.
- Creager MA, y cols. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1990; 86:228–234.
- Del Cerro, y cols. A consensus approach to the classification of pediatric pulmonary hypertensive vascular disease: Report from the PVRI Pediatric Taskforce, Panama 2011. *Pulmonary Circulation* 2011; vol 1, n°2.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dodelson de Kremer R, Grosso C. Maternal mutation 677C>T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene associated with severe brain injury in the offspring. *Clinical Genetics* 2005;67(1):69-80.
- Ezgü FS , y cols. Cirrhosis in an infant heterozygous for classical citrullinaemia. *Acta Paediatr* 2005, 94 (12):1849-51.
- Gale N, y cols. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2004;25:2243-78.
- Greenberg D. Arginase. In: *The Enzymes*. Boyer PD, Lardy H, Myrback K, Eds. New York: Academic Press 1960;4:257.
- Hatano S, y cols. Primary Pulmonary Hypertension. Report on a WHO Meeting Geneva: World Health Organization; 1975. P. 7-45.
- Haworth SG. Pulmonary hypertension in the young. *Heart* 2002;88:658-64.

- Jean C, y cols. Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats. *J Nutr* 2001;131:91–98.
- Jeremy RW, y cols. Effects of dietary L-arginine on atherosclerosis and endothelium-dependent vasodilatation in the hypercholesterolemic rabbit. Response according to treatment duration, anatomic site, and sex. *Circulation* 1996;94:498–506.
- Jin L, y cols. Endothelial cell dysfunction in a model of oxidative stress. *Med Sci Monit* 2001;7:585–591.
- Juaneda E, Haworth SG. Pulmonary vascular structure in patients dying after a Fontan procedure. The lung as a risk factor. *Br Heart J* 1984;52:575-80.
- Lepage N, McDonald N, Dallaire L, Lambert M. Age-specific distribution of plasma Amino acid concentrations in a healthy pediatric population. *Clin Chem.* 1997;43:2397-402.
- Ling S, Shuo S, Yufen L, y cols. Potential biomarkers predicting risk of pulmonary hypertension in congenital heart disease: the role of homocysteine and hydrogen sulfide. *Chinese Medical Journal* 2014;127 (5).
- Mayhan WG, y cols. Effect of L-arginine on reactivity of hamster cheek pouch arterioles during diabetes mellitus. *Int J Microcirc Clin Exp* 1997;17:107–112
- Mitchell S, y cols. Genetic variation in the urea cycle: a model resource for investigating key candidate genes for common diseases. *Hum Mutat.* 2009; 30(1):56-60
- Moncada S, Higgs A. Mechanism of disease. The L-arginine nitric oxid pathway. *N Engl J Med* 1993; 329:2002-12.
- Morris SM, Jr. Regulation of enzymes of urea and arginine synthesis. *Annu Rev Nutr* 1992;12:81–101.
- Ommersen SR, y cols. Assesment of right atrial pressure with 2-dimensional and Doppler echocardiography study. *Mayo Clin Proc* 2000;75:24-29.
- Pearson DL, y cols. Neonatal pulmonary artery hypertension. Urea cycle intermediates, nitric oxid production, and carbamoyl-phosphate synthetase function. *New Engl J Med* 2001; 344:1832-38.
- Rector TS, y cols. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of supplemental oral L-arginine in patients with heart failure. *Circulation* 1996;93:2135–2141.
- Romero MJ, y cols. Therapeutic Use of Citrulline in Cardiovascular Disease. *Cardiovascular Drug Reviews* 2006; Vol. 24, No. 3–4, pp. 275–290.
- Schulman SP, y cols. L-arginine therapy in acute myocardial infarction: The Vascular Interaction With Age in Myocardial Infarction (VINTAGE MI) randomized clinical trial. *JAMA* 2006;295:58–64.
- Schultze Neick I, y cols. L-arginine a substance preverse the pulmonary endothelial dysfunction caused by congenital heart surgery. *Circulation* 1999;100:749-55.
- Shearer JD, y cols. Differential regulation of macrophage arginine metabolism: A proposed role in wound healing. *Am J Physiol* 1997;272:E181–190.

- Silvera Ruiz SM, Grosso CL, Dodelson de Kremer R, Laróvere LE. Impact of CPS1 gene rs7422339 polymorphism in Argentine patients with hyperhomocysteinemia. *JIMD Reports* 2014.
- Smith HAB, y cols. Nitric oxide precursors and congenital heart surgery: a randomized controlled trial of oral citrulline. *J Thorac Cardiovasc Surgery* 2006;132:58-65.
- Socha HM, y cols. Oral citrulline administration enhances NO-dependent vasodilation. *FASEB Exp Biol* 2006;Abs 703.4.
- Spolarics Z, Bond JS. Comparison of biochemical properties of liver arginase from streptozocin-induced diabetic and control mice. *Arch Biochem Biophys* 1989;274:426–433.
- Stühlinger MC, y cols. Homocysteine impairs nitric oxid synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001;104:2569-75.
- Summar ML, y cols. Environmentally determined genetic expression: clinical correlates with molecular variants of carbamyl phosphate synthetase I. *Mol Genet Metab* 2004;S12–S19.
- Tamargo J, Caballero R, Gómez R. Efectos del óxido nítrico sobre la función cardíaca. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2006;6(A):3-20 - Vol. 6. DOI: 10.1157/13087917
- Ubbinks JB, y cols. Rapid high-performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum. *J Chromatog* 1991; 565: 441-6.
- Weyrich AS, y cols. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation* 1992;86:279–288

ANEXOS

ANEXO I

Genes y Apellidos: Estudio de un Aislado Poblacional de CTLN1 en Villa Mercedes (San Luis). *Actas de la XI Reunión de Antropología del Mercosur*. Diálogos, prácticas y visiones desde el Sur. 30 de noviembre-4 de diciembre 2015. Montevideo, Uruguay.

ISBN 978-9974- 0-1385- 8

INTRODUCCIÓN

6

Los apellidos como variables biológicas¹

Los apellidos, como los nombres, son rasgos culturales. En la mayoría de las sociedades, los apellidos se difunden patri y/o matrilinealmente a través de un mecanismo vertical comparable a la transmisión genética, en tanto los nombres lo hacen horizontalmente de un modo similar a la transmisión epidémica o endémica (Guglielmino et al., 1991). Debido a estas características, los apellidos se comportarían como marcadores genéticos, constituyendo una variable sociocultural universal, limítrofe entre la evolución biológica y cultural (Manrubia y Zanette, 2002).

La aplicación de los apellidos a estudios biológicos se fundamenta en varios supuestos teóricos que no siempre se cumplen en las poblaciones humanas (Crow, 1980; Rogers, 1991; Pinto Cisternas y Castro de Guerra, 1988).

- a) Origen monofilético. Supone que cada apellido ha sido introducido en la población por un único individuo, el ancestro de todas las copias contemporáneas de ese apellido en particular (Rogers, 1991).
- b) Transmisión progenitor-descendiente. Significa que los apellidos son transmitidos de padres a hijos, de generación en generación. En algunas culturas esta transmisión es preponderantemente patrilineal o matrilineal, mientras que otras se heredan ambos, como es el caso de los apellidos compuestos en algunos países latinoamericanos y en España. Esta suposición no contempla la adopción ni la ilegitimidad.
- c) Se reparten uniformemente en la descendencia. Ya sea transmitido por la madre o el padre y sin importar el sexo de

¹ Extracto de Dipierri (2011) "Consanguinidad por Isonimia y Factores Socioeconómicos en Argentina: Análisis Poblacional y Espacial", tesis doctoral

la prole, el apellido se distribuye uniformemente en toda la descendencia.

d) Constantes en el tiempo, no sufren cambios en la grafía ni en la pronunciación y se distribuyen proporcionalmente en ambos sexos.

e) Son selectivamente neutros, los apellidos no conceden ventajas o desventajas biológicas o adaptativas a quienes los portan. Sin embargo, se encuentran sometidos a presiones sociales y culturales que inciden sobre su neutralidad.

Independientemente de su transmisión por línea paterna o materna y de los supuestos teóricos enunciados antes, los apellidos pueden homologarse a un locus con múltiples alelos y su distribución en una población se ajustaría, en general, a la de los alelos selectivamente neutros. Están afectados los efectos de la migración y el flujo génico (Barrai et al., 1987), no confiriendo ventajas selectivas a quienes los portan (Zei et al., 1983).

Los apellidos como marcadores genéticos

La utilización de los apellidos como marcadores genéticos ofrece ventajas y desventajas. Entre las primeras se destacan su riqueza informativa, su obtención fácil, rápida y económica, tanto en poblaciones actuales como históricas y la posibilidad de disponer de muestras de gran tamaño, cubriendo vastos conjuntos poblacionales. De acuerdo a Castro de Guerra (1987), los listados de apellidos pueden provenir de distintas fuentes:

a) Registros civiles: listados electorales, actas de matrimonio, nacimientos y defunción, documentos de propiedad, lista de contribuyentes, etc.

b) Registros parroquiales: actas de matrimonio, nacimiento y defunción, dispensas matrimoniales

c) Otros: directorios telefónicos, padrones electorales, bancos de sangre, etc.

Entre las desventajas se destaca el hecho de que debido a que los apellidos no constituyen una variable estrictamente biológica, pueden estar sometidos a influencias culturales que se manifiestan por el polifiletismo (no todas las personas que portan el mismo apellido desciende del mismo ancestro común). Además, al igual que los genes, los apellidos tienen la probabilidad de cambiar o mutar a lo largo del tiempo. Pueden darse variaciones en la grafía o pronunciación o quebrarse el vínculo entre el linaje biológico y el nombre de familia, generalmente por ilegitimidad o adopción.

No obstante las restricciones impuestas por estas desventajas y la imposibilidad de cumplir con los supuestos teóricos previamente enunciados, los apellidos constituyen un recurso metodológico esencial de la bioantropología y la genética de poblaciones humanas. Al disponer de los apellidos de toda la población, permiten una visión global del comportamiento genético y demográfico, que no siempre es posible lograr con otros métodos más costosos, lentos o difíciles a aplicar a un número significativo de individuos (Pinto Cisternas y Castro de Guerra, 1988).

La antroponimia representa una medida relativa y no absoluta de la afinidad biológica inter o intrapoblacional, constituyendo un excelente proxy de la estructura genética subyacente.

Apellidos y estructura de población

Las desviaciones de las uniones al azar o panmixia (debidas al limitado número de ancestros, al sexo, a la preferencia o al rechazo por ciertos tipos de uniones consanguíneas y a una migración limitada en el espacio social o geográfico) determinan la estructura de una población (Barrai, 2002).

Las desviaciones de la panmixia pueden ser evaluadas a través del coeficiente de consanguinidad F (Wright, 1951). Una estimación cruda del F de una población es posible estudiando la distribución de los apellidos.

Darwin (1875) fue pionero en el estudio de apellidos para estimar las frecuencias de uniones entre primos sobre la base de la frecuencia de uniones isonímicas. Por *isonimia* se entiende la ocurrencia del mismo apellido en dos individuos. Posteriormente Crow y Mange (1965), empleando el mismo principio, desarrollaron el método isonímico para estudiar la consanguinidad, no sólo entre primos hermanos, sino de toda la población, asumiendo que todos los individuos con el mismo apellido lo han heredado de un ancestro común. Esto permite superar la imposibilidad del cálculo de la consanguinidad en poblaciones sobre las cuales no se dispone de información genealógica o la información genética no existe o está incompleta.

Crow y Mange (1965) advirtieron la relación constante, independientemente del grado de parentesco, entre la probabilidad de los parientes de tener el mismo apellido o *isonimia* (I) y el coeficiente de consanguinidad de su descendencia (F), tal que I/F es siempre igual a 4.

$$I/F = 4$$

El F estimado por isonimia está compuesto por: a) un componente al azar de las uniones (F_r) que se expresa como una función del número con determinado apellido, por sexo en la población; b) un componente no

azaroso (F_n) que resulta de la preferencia o rechazo intencional de ciertas uniones.

$$F_r = \sum p_i q_i / 4$$

donde p_i es la frecuencia del apellido i en los hombres y q_i es la frecuencia del mismo apellido en las mujeres. En el caso de las poblaciones donde no se dispone de listados matrimoniales

$$F_r = \sum_i p_i^2$$

El componente no azaroso F_n se estimaría de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$F_n = (I - \sum p_i q_i) / [4(1 - \sum p_i q_i)]$$

donde I es la frecuencia observada de uniones isonímicas en la población.

En el modelo jerárquico de consanguinidad (Wright, 1951), las poblaciones fundadoras y descendientes se relacionan entre ellas por un proceso de ramificación. El coeficiente de consanguinidad de la población total se define como F_{IT} ; la desviación de la panmixia dentro de la población descendiente se mide por F_{IS} ; la divergencia de la población descendiente de la fundadora se mide por F_{ST} . La relación que une estos componentes de la consanguinidad es la siguiente:

$$F_{IT} = F_{ST} + F_{IS} (1 - F_{ST})$$

donde F_{ST} es equivalente a F_n y F_{IS} es equivalente a F_r

Consanguinidad

De acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg, en una población infinitamente grande y bajo condiciones de panmixia los individuos que se cruzan no se encontrarían biológicamente relacionados. Sin embargo, las poblaciones humanas tienden a alejarse de las condiciones de equilibrio, de modo que todos los individuos presentan un cierto grado de parentesco o consanguinidad. Dos individuos son consanguíneos si tienen por lo menos un ancestro común. La consecuencia directa de la unión de individuos consanguíneos es el aumento de la homocigosis en la descendencia.

El grado de consanguinidad se mide por el coeficiente de consanguinidad (F) y equivale a la probabilidad de que un individuo reciba dos alelos idénticos por descendencia en un locus dado. En otras palabras, F representa la proporción de genes para el cual un sujeto es homocigoto. Habitualmente se consideran como consanguíneas las uniones entre personas relacionadas hasta el nivel de primos segundos ($F \geq 0,0156$). Se

elige este límite arbitrario porque la influencia genética en los matrimonios entre parejas con un grado menor de consanguinidad podría diferir muy poco de la observada en la población general o entre individuos no relacionados.

Pese a que se proporciona una considerable atención al rol de los casamientos consanguíneos como factor causal de trastornos genéticos, la influencia potencial de la endogamia de las poblaciones sobre los niveles globales de homocigosidad permanecen subestimados (Bittles, 2005).

OBJETIVO

5

El presente trabajo surge a partir de la investigación de Laróvere et al. (2009, 2012) sobre estudios familiares en la provincia de San Luis en individuos afectados de Citrulinemia tipo I (CTLN₁) y sus parientes. Esta enfermedad autosómica recesiva se caracteriza por un defecto en el ciclo de la urea, causada por mutaciones en el gen que codifica la enzima argininosuccinato sintetasa. Existe un amplio rango de manifestación de este defecto metabólico, desde una forma neonatal aguda (forma clásica), una intermedia de aparición tardía o una forma sin síntomas. Sin un diagnóstico y tratamiento temprano en su manifestación neonatal, puede resultar fatal. Mediante análisis moleculares, Laróvere et al. determinaron que todas las familias estudiadas eran portadoras de la mutación p.G390R, asociada a la manifestación temprana y más severa de la enfermedad. En el relevamiento genealógico, los individuos expresaron desconocer vinculaciones de parentesco entre las familias portadoras, pero compartían la misma procedencia geográfica: la ciudad de Villa Mercedes. A partir de estos datos, el análisis molecular se amplió a 26 parientes no afectados y a 172 voluntarios sanos no emparentados, para conocer la incidencia de la mutación. Resultaron heterocigotas 21 parientes y 7 voluntarios. Al momento del estudio, la población total de Villa Mercedes estaba estimada en 96.700 personas. La frecuencia de portadores sería aproximadamente 1/25 habitantes, lo que sugiere una incidencia de CTLN₁ de 1 persona afectada por cada 2.427 nacimientos, una cifra considerablemente mayor que los datos mundiales 1:57.000 nacimientos (Brusilow y Horwich, 2001).

En base a estos resultados, se sugiere la necesidad de un screening preconcepcional y se propone un posible aislado poblacional en la ciudad de Villa Mercedes. El objetivo de este trabajo es encontrar, mediante el método isonímico, datos que sustenten o rebatan este último postulado.

MATERIALES Y MÉTODOS

σ

Fuente de los datos

La información concerniente a los apellidos provino del Padrón Electoral actualizado al año 2015, incluyendo a 334.603 votantes distribuidos en los 9 departamentos de la provincia de San Luis (Ver Resultados - Figura 1). Estas listas fueron proporcionadas por la Cámara Nacional Electoral.

La información demográfica proviene del Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010 - Censo del Bicentenario, desarrollado por la Dirección Provincial de Estadística y Censos de San Luis, conjuntamente con el INDEC (portal de acceso <http://www.estadistica.sanluis.gov.ar/>).

Agrupamiento y ordenamiento de los apellidos

Utilizando los programas Microsoft Excel y SPSS, los apellidos de varones y mujeres en conjunto se analizaron a tres niveles:

- por Departamento
- por Municipio
- por Sección Electoral (ver Resultados - Figura 2).

En el Anexo N° 1 se presenta información demográfica (tamaño censal, densidad demográfica) y geográfica (longitud y latitud de la cabecera departamental) de los departamentos que integran la provincia.

En base a las genealogías ya relevadas, se identificaron 11 apellidos diferentes en las familias de los afectados y se analizaron sus frecuencias y distribución en el territorio nacional y en el mundo. Para Argentina se usó la base de datos del Padrón Electoral y a nivel mundial se utilizó la herramienta on-line <http://forebears.io/surnames>.

Análisis de la estructura genética de la población

De acuerdo a Relethford (1988) cuando todos los individuos dentro de una población tienen diferentes apellidos, la isonimia debería ser igual a 0. En base a la distribución de los apellidos en cada departamento, municipio o sección, se determinó la Isonimia al Azar No Sesgada (INS), de acuerdo a Morton (1973)

$$INS = \sum k (n_{ik} / N_i)^2 - (1 / N_i)$$

n_{ik} = frecuencia absoluta del apellido k en la población i

N_i = número total de individuos de la misma población ($\sum n_{ik}$)

Cálculo de la abundancia de apellidos o indicador Alfa de Fisher

Este indicador mide el número efectivo de apellidos de una población. Piazza et al. (1987) lo utilizaron por primera vez para analizar las tasas de migración a partir de la distribución de apellidos. Se observan valores altos en poblaciones en expansión, donde hay un importante flujo de inmigrantes, mientras que valores bajos se dan en comunidades aisladas con alta deriva génica. En este trabajo se utilizó la fórmula de Barrai et al., (1992), donde:

$$\alpha = 1 / INS$$

Cálculo de la consanguinidad de una población

El coeficiente de consanguinidad se calculó a partir de una derivación de la fórmula de Crow y Mange (ver Introducción), que representa la consanguinidad como expresión de la isonimia de las uniones al azar o isonimia no sesgada.

$$F = INS / 4$$

Indicadores de aislamiento y sedentarismo

Siguiendo a Rodríguez-Larralde (1990), se calcularon los índices A y B. El primero representa el porcentaje de la población que es el único portador de su apellido y el segundo el porcentaje de la población que está incluido en los 7 apellidos más frecuentes. Se han observado valores altos de B en poblaciones pequeñas o aisladas, en las cuales algunos pocos nombres de familia comprenden a la mayoría de los habitantes. Está influenciado en forma directa por las tasas de emigración.

El índice A necesita información demográfica de contexto para ser correctamente interpretado. En situaciones de expansión y rápido crecimiento poblacional (por efecto de atractivos económicos, como el desarrollo de industrias con gran demanda de mano de obra), puede registrarse una elevada frecuencia de apellidos con un único portador. Estos nuevos inmigrantes introducen variabilidad a la población pero en los primeros censos no se hará evidente porque aún no han tenido descendencia y son los únicos representantes de su apellido. En el otro extremo, el índice A también está asociado al sedentarismo. En comunidades pequeñas o de escaso atractivo económico, la población en edad productiva tiende a migrar hacia áreas urbanas. Los residentes que permanecen, por lo general, pertenecen a franjas etarias mayores que ya no vuelven a tener hijos y quedan como únicos representantes de un apellido.

Mapas y georreferenciamiento

Para la elaboración de los mapas se utilizó la herramienta on-line de Google y el programa Corel-DRAWX3R (Corel Corporation, Ottawa, Canada) para la creación y edición de todas las imágenes.

RESULTADOS

6

La provincia de San Luis cuenta con 9 departamentos y 9 ciudades cabecera, tal como se detalla en la Tabla 1 y se grafica en la Figura 1:

ID	SECTION	CAPITAL CITY
1	Ayacucho	San Francisco del Monte de Oro
2	Junín	Santa Rosa de Conlara
3	Belgrano	Villa General Roca
4	Libertador General San Martín	San Martín
5	Chacabuco	Concarán
6	Juan Martín de Pueyrredón	San Luis
7	Coronel Pringles	La Toma
8	General Pedernera	Villa Mercedes
9	Gobernador Dupuy	Buena Esperanza

Tabla 1: División administrativa de la provincia de San Luis.



Figura 1: La provincia de San Luis en la geografía de Argentina. Los números de las secciones se corresponden con los datos de la Tabla 1. Se destaca la ubicación de la ciudad de Villa Mercedes

Según los datos del Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas de los años 2001 y 2010, la mayor concentración demográfica se da en los departamentos Juan Martín de Pueyrredón (204.019 habitantes) y Pedernera (125.899). El primero incluye la capital provincial, que es asiento de los poderes, de las funciones administrativas y un foco de atracción poblacional. A lo largo de la década analizada en el censo, Juan Martín de Pueyrredón tuvo una variación intercensal relativa del 20,9%, mientras que Pedernera fue del 13,6%. Este crecimiento se registró principalmente en la ciudad cabecera del departamento: Villa Mercedes. Los valores totales se presentan en la Tabla 2.

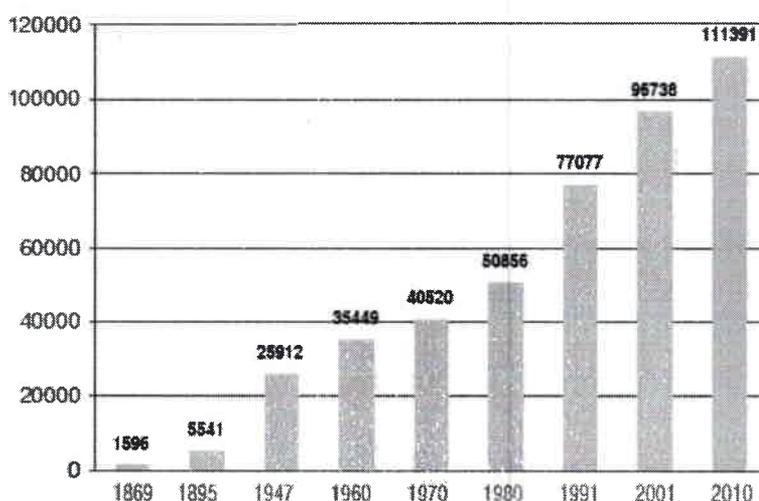


Tabla 2: Evolución demográfica de la ciudad de Villa Mercedes entre 1869 y 2010.

Nivel departamental

La Tabla 3 presenta los resultados a nivel de departamento, incluyendo el número total de apellidos diferentes (S) y el de votantes (N). Para las 9 secciones se calcularon además cinco índices: Isonimia no Ssegada (INS), Número Efectivo de Apellidos (Alfa), Consanguinidad (F) e Indicadores de Sedentarismo y Aislamiento (A y B, respectivamente) en base a la distribución y variabilidad de apellidos en el registro de electores. Este registro incluye a todos los habitantes mayores de 16 años con domicilio asentado en la provincia. Dependiendo de la conformación de la pirámide poblacional de cada departamento, el número final de votantes analizados se alejará en mayor o menor grado del número total de personas censadas. El porcentaje de población incluida en el presente análisis isonímico se resume en el Anexo 1.

ID	INS	Alfa	F	A	B	N	S
1	0.0064	155	0.0016	6.22	13.64	15838	1786
2	0.0037	270	0.0009	14.13	9.99	23064	4961
3	0.0109	91	0.0027	10.44	20.46	3295	595
4	0.0120	83	0.0030	6.28	19.27	4157	439
5	0.0047	215	0.0012	7.97	10.36	16975	2246
6	0.0041	246	0.0010	7.16	10.94	155387	19447
7	0.0074	136	0.0018	9.92	16.34	10946	1736
8	0.0034	294	0.0008	6.25	9.79	95877	10759
9	0.0062	161	0.0016	8.00	14.67	9064	1325

Tabla 3: Índices calculados por departamento. INS (Isonimia no Sesgada), Alfa (Número Efectivo de Apellidos), F (Consanguinidad), A (Indicador de Sedentarismo), B (Indicador de Aislamiento), N (número total de votantes), S (cantidad de apellidos diferentes). ID se corresponden a la Tabla 1.

Los valores calculados están en directa relación con el número de personas consideradas. Se espera que cuanto menor sea el N, menor será la diversidad de apellidos y los subsiguientes índices, pero veremos que esto no siempre se observa en San Luis. El valor de INS más alto fue de 0,0120, en el departamento de Libertador General San Martín (ID 4), lo que indica que en esta población la chance de recibir dos apellidos (o alelos) iguales de cada progenitor es alta. Aquí también se registra la consanguinidad más elevadas (0,0030) y estos resultados se corresponden con la baja diversidad de apellidos (sólo 439 diferentes para todo el departamento) y el bajo valor de Alfa (83, el menor de toda la provincia). Sin embargo, el N considerado (4157 votantes) no es el más pequeño: el padrón electoral de Belgrano (ID 3) incluye solamente 3295 individuos.

Al analizar los valores más extremos de los índices A y B, observamos que no se registran en Libertador General San Martín. En el departamento de Junin (ID 2) se obtuvo un A de 14,13%. Recordemos que este porcentaje representa la cantidad de personas que son las únicas portadoras de un apellido y puede estar señalando tanto una expansión como un decrecimiento poblacional. En el caso del padrón electoral de Junin, hay 23.064 personas y 4.961 apellidos diferentes, la isonimia y la consanguinidad tienen valores muy bajos. Según los datos del Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas, esta sección experimenta un crecimiento demográfico sostenido desde el año 1980, particularmente destacado en las últimas tres décadas (1991: 13.452 personas; 2001: 20.271 y 2010: 28.808). Se trata de una población receptora de migrantes, quienes aportan nuevos apellidos y mayor variabilidad pero en la que un porcentaje importante aún no ha tenido descendencia o si lo han hecho, no han alcanzado aún la edad legal de ser empadronados y por ello sus progenitores son los únicos portadores del nombre de familia.

Por otro lado, el valor más alto del índice B se registró en Belgrano (ID 3), con un porcentaje de 20,46% de los votantes incluidos en los 7 apellidos más frecuentes. En este caso, dado el bajo número de N y la escasa variabilidad de apellidos, podemos considerar que nos encontramos ante una población sedentaria, donde unos pocos nombres de familia se han tornado muy frecuentes. Al no recibir inmigrantes, el valor de Alfa permanece bajo. Esta información es corroborada por los datos censales, que señalan que comparando los resultados del año 2010 con los datos de 1980, hubo una variación negativa de -23%. Belgrano y Libertador General San Martín (ID 4) son los dos departamentos de San Luis que han experimentado un fuerte retroceso demográfico.

En este contexto, General Pedernera (ID 8), sección de la que Villa Mercedes es ciudad cabecera, destaca especialmente por su diversidad de apellidos (valor de Alfa más alto de toda la muestra), su baja consanguinidad y sus bajos índices de aislamiento y sedentarismo. Dado que el análisis desarrollado hasta ahora abarca el nivel de Departamento, esta amplitud podría estar enmascarando una sub-estructuración poblacional subyacente. Para explorar esta idea, se calcularon los mismos índices dentro de General Pedernera segmentando por municipios y finalmente dentro de la ciudad de Villa Mercedes, segmentando por circuito electoral.

Nivel municipal

El departamento General Pedernera comprende 2 municipios y 6 comisiones municipales, además de 4 parajes rurales (La Esquina, Las Isletas, La Angelina, Nueva Escocia). Si bien estos parajes figuran en el padrón nacional como circuitos electorales, ninguno de ellos comprende un N mayor a 100 personas. Los índices calculados por el método isonímico son particularmente sensibles a distorsiones por bajo número y los valores obtenidos pueden no reflejar la verdadera dinámica poblacional, por lo que los parajes no se incluyen en el análisis final. Los resultados se muestran en Tabla 4.

Sección	INS	Alfa	F	A	B	N	S
Villa Mercedes	0.0034	294	0.0008	5.75	9.60	85558	9933
Justo Darac	0.0045	222	0.0011	9.47	11.84	8204	1448
El Morro	0.0160	63	0.0040	29.57	28.26	230	107
Juan Jorba	0.0132	75	0.0033	26.75	22.93	314	139
Juan Llerena	0.0104	97	0.0026	23.26	20.67	387	158
Punilla	0.0171	59	0.0043	23.75	29.17	480	192
Lavaisse	0.0164	61	0.0041	41.86	29.65	172	97
Villa Reynolds	0.0016	621	0.0004	62.38	7.62	420	326

Tabla 4: Índices calculados por municipio dentro del departamento Gral. Pedernera. Las abreviaturas se corresponden a la Tabla 3.

Villa Mercedes presenta la mayor cantidad de votantes y de apellidos, pero ello no impacta en el valor de Alfa, que es superado en varios órdenes de magnitud por Villa Reynolds (621, el mayor valor registrado hasta el momento). Esta sección es una comisión municipal con bajo número de electores en su padrón, pero una considerable cantidad de apellidos, lo que eleva el porcentaje del indicador A de sedentarismo: 62,38% son únicos representantes de su nombre de familia.

Al desglosar la población en una estructuración espacial más cercana a la realidad, se observa que el valor de consanguinidad $F = 0,0008$ que se obtuvo para el departamento de General Pedernera como un todo, presenta un notable espectro de variación considerándolo por municipio, desde el valor más bajo en Villa Mercedes hasta el más alto en Punilla (0,0043).

Nivel circuito electoral

Dado que todos los casos afectados, familiares y voluntarios portadores se registraron como residentes de la ciudad de Villa Mercedes, se consideró un último abordaje a nivel de circuito electoral. Estas divisiones menores varían en su área de influencia, incluyendo los votantes de una o más escuelas (para mayores detalles, ver Anexo 1). En la Figura 2 se presentan en forma esquemática un plano de la ciudad y sus 21 circuitos.

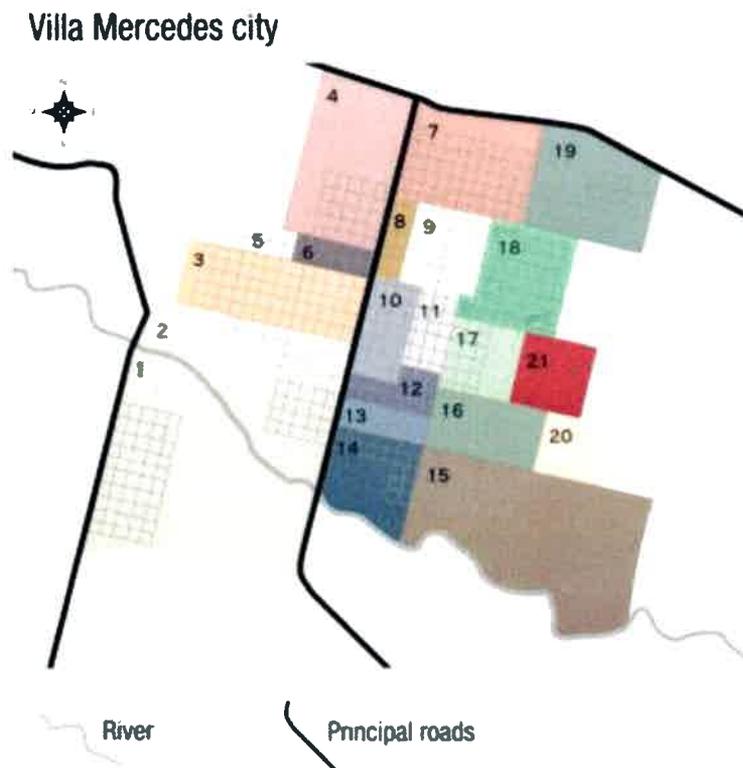


Figura 2: Circuitos electorales de la ciudad de Villa Mercedes.

Los índices calculados se resumen en la Tabla 5, correspondiendo nuevamente las siglas a: INS (Isonimia no Sesgada), Alfa (Número Efectivo de Apellidos), F (Consanguinidad), A (Indicador de Sedentarismo), B (Indicador de Aislamiento), N (número total de votantes), S (cantidad de apellidos diferentes).

ID	INS	Alfa	F	A	B	N	S
1	0.0038	266	0.0009	15.26	10.41	7976	2043
2	0.0039	257	0.0010	13.75	10.52	4639	1205
3	0.0036	275	0.0009	14.53	10.32	6553	1755
4	0.0030	331	0.0008	20.16	8.67	4118	1415
5	0.0077	131	0.0019	18.76	15.83	821	286
6	0.0044	226	0.0011	16.85	11.04	2772	834
7	0.0048	210	0.0012	10.54	10.86	5369	1120
8	0.0031	327	0.0008	24.73	9.20	2119	867
9	0.0029	344	0.0007	17.62	8.89	5960	1857
10	0.0023	440	0.0006	21.37	8.17	4862	1733
11	0.0025	393	0.0006	21.37	8.54	4146	1539
12	0.0018	543	0.0005	29.43	7.19	3034	1400
13	0.0027	364	0.0007	24.50	8.96	2722	1108
14	0.0043	231	0.0011	15.34	10.64	3514	975
15	0.0053	188	0.0013	10.14	11.59	3916	794
16	0.0045	222	0.0011	12.76	11.44	4694	1140
17	0.0045	221	0.0011	15.00	10.95	3306	887
18	0.0051	197	0.0013	11.21	11.85	5031	1099
19	0.0057	175	0.0014	11.63	12.79	2761	642
20	0.0049	203	0.0012	19.59	12.62	1307	482
21	0.0037	271	0.0009	16.05	9.82	5938	1636

Tabla 5: Resultados por circuitos electorales de la ciudad de Villa Mercedes. Los ID se corresponden a la Figura 2.

En el conjunto de datos, se destacan en gris dos aglomerados con valores altos de isonimia y consanguinidad, lindantes en el terreno, uno en el centro de la ciudad, integrado por los circuitos 5 y 6 y otro en el este, integrado por los circuitos 7 y desde el 15 al 20 (ver Figura 2). Todos los componentes de estos aglomerados (con excepción del circuito 5) tienen un alto número de votantes (N). Sin embargo, también presentan los valores más altos del índice B, lo que estaría señalando una tendencia al aislamiento en esta porción de la población.

Distribución de los apellidos portadores

Como se mencionara en “Materiales y Métodos”, se analizaron la frecuencia y distribución en el territorio nacional de los 11 apellidos identificados en las familias de los afectados. La Tabla 6 resume los resultados.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
CABA	1687		662	654	723	2	230	223	3909	36879	307
Buenos Aires	12322	3	3991	6771	3057	9	1997	2102	28013	5531	32
Catamarca	2322		191	505	8		9	4	878	524	
Chaco	624		313	2525	66		90	464	2866	3429	
Chubut	595		181	113	253		50	12	689	1371	3
Córdoba	7780		3459	671	832		534	48	6536	5194	53
Corrientes	199		46	2724	111		70	160	3269	608	
Entre Ríos	136		60	337	49	17	122	87	2032	1810	
Formosa	976		74	466	205		5	724	2594	2173	
Jujuy	433		697	264	62		1	7	1282	2754	3
La Pampa	221		182	17	59		84	4	702	409	54
La Rioja	2527		1091	70	15		6	4	1391	675	3
Mendoza	5191		3004	400	744	2	778	6	5948	3091	281
Misiones	571		50	440	190	22	31	1023	2515	1101	
Neuquén	392		451	78	1297		59	17	1122	979	18
Río Negro	349		265	46	867		28	3	1195	1262	26
Salta	1373		1074	1413	267		41	16	2626	8037	
San Juan	2791		3460	67	309		27	1	2070	1427	101
San Luis	2005	2	342	107	113	27	619	8	2116	425	317
Santa Cruz	414		286	120	96		29	34	476	1005	2
Santa Fe	1601		829	1717	349		431	120	6593	6333	11
S. del Estero	1352		876	36	21		10	11	631	8186	1
T. del Fuego	143		61	57	45		41	46	330	349	4
Tucumán	3316		613	185	182		31	7	4140	9759	5

Tabla 6: Distribución y frecuencias absolutas de los apellidos portadores.

También se analizó la distribución a nivel mundial, los resultados se incluyen en el Anexo 1. Si bien la mayoría de estos nombres de familia están representados a todo lo largo del territorio nacional, 3 de ellos (B, F, K) tienen una distribución bastante más restringida. El primero de estos apellidos es el menos frecuente, con solo 5 votantes en el padrón electoral y es el que podría resultar determinante para identificar un aislado poblacional. De existir alguna variable biológica asociada a estos 11 marcadores socio-culturales, se espera observarla en los lugares donde los 11 aparecen juntos: las provincias de Buenos Aires y San Luis.

Para San Luis en particular se cuenta con el antecedente de los trabajos de Laróvere et al. (2009, 2012) en Villa Mercedes, ciudad en la que están registrados los dos votantes B: uno de ellos en el circuito 5 del aglomerado central y otro en el circuito 17 del aglomerado este.

ANEXO II

Molecular Epidemiology of Citrullinemia Type I in a Risk Region of Argentina: A First Step to Preconception Heterozygote Detection. *Journal of Inherited Metabolic Disease* (JIMD reports) 2012

Molecular Epidemiology of Citrullinemia Type I in a Risk Region of Argentina: A First Step to Preconception Heterozygote Detection

Laura E. Laróvere · Silene M. Silvera Ruiz ·
Celia J. Angaroni · Raquel Dodelson de Kremer

Received: 10 November 2011 / Revised: 11 January 2012 / Accepted: 12 January 2012
© SSIEM and Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract Classical citrullinemia type I (CTLN1) is an autosomal recessive disorder encoded by the *ASS1* gene, which codes for argininosuccinate synthetase (ASS), the rate-limiting enzyme in the urea cycle. Previously, we identified the mutation p.G390R in patients with CTLN1 in the San Luis Province of Argentina. Here, we report the results of p.G390R analysis in a larger number of probands, relatives of involved families and additionally, a population study to identify carriers. Altogether, we analyzed 420 alleles, belonging to 12 probands, 26 relatives, and 172 healthy volunteers. All the probands were homozygous for the mutation, and 21 of 26 relatives were carriers. The occurrence of the disease in descendants of couples at risk was 57% showing a preferential transmission of the mutant allele compared to the normal allele. The carrier frequency in the general San Luis Province population was 4.1%, suggesting the incidence of CTLN1 to be 1:2,427, which is approximately 20 times higher than for the general population. This work suggests that there should be an increased awareness of preconceptional screening of CTLN1 among individuals/couples who are at risk in the San Luis Province in order to better inform them of their reproductive options.

Cascade/family and population molecular screening for carrier identification were performed in an Argentinean

province with high incidence of CTLN1, a first step to preconceptional screening.

Introduction

Citrullinemia type I (CTLN1, MIM# 215700), first described by McMurray et al. (1962), is a metabolic genetic disease with autosomal recessive inheritance. CTLN1 causes an accumulation of citrulline in the body fluids, due to a deficiency of argininosuccinate synthetase (ASS, EC 6.3.4.5), which is the third enzyme of the urea cycle and catalyzes the formation of argininosuccinate from citrulline and aspartate. The classical variant is associated with a neonatal/infantile onset and typically leads to hyperammonemia and early death if untreated (Brusilow and Horwich 2001).

The ASS enzyme is encoded by the *ASS1* gene (RefSeq accession number NM_000050.4), which is located in chromosome 9q34.1. At least 87 mutations have been described in this gene. Specifically, the substitution p.G390R (c.1168G>A) is one of the most common mutations described in cases of CTLN1 in different ethnic groups. This mutation has been exclusively associated, in homozygous condition, with an early/severe phenotype (Engel et al. 2009).

Previously, we reported the first identification of several patients affected by CTLN1 in a limited geographic area of Argentina (San Luis Province). The molecular *ASS1* gene analysis in probands and relatives of involved families (cascade screening) showed the same mutation: p.G390R (Laróvere et al. 2009). Here, we widen our previous study in relation to the number of probands and also describe results from cascade screening. In addition, we determined the prevalence of the p.G390R mutation testing carriers of

Communicated by: Verena Peters.

Competing interests: None declared.

L.E. Laróvere (✉) · S.M. Silvera Ruiz · C.J. Angaroni ·
R. Dodelson de Kremer
Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas (CEMECO),
Cátedra de Clínica Pediátrica, Facultad de Ciencias Médicas,
Universidad Nacional de Córdoba and Hospital de Niños de la
Santísima Trinidad, Ferrovianos 1250, 5014 Córdoba, Argentina
e-mail: lauralarovere@hotmail.com

CTLN1 in 172 unaffected individuals in San Luis Province. The aim of this work was to identify carriers in the risk area in order to inform individuals and couples at risk about their reproductive options; in addition, the data could be used to support improved surveillance and postnatal management.

Materials and Methods

Subjects

Patients

Twelve newborns (3 males, 9 females) of 7 apparently unrelated families, with the biochemical/molecular diagnosis of CTLN1, neonatal form. All the cases presented the severe phenotype including hyperammonemia, metabolic coma, and early death. The molecular analysis of 8 of them has been reported previously (Laróvere et al. 2009).

Cascade Screening

Twenty-six close, unaffected relatives of the seven families.

Population Study

One hundred and seventy-two unrelated healthy volunteer individuals of Villa Mercedes City (estimated population: 96,700 individuals), San Luis Province. The studied region was selected from the hometown of the most affected children.

Genetic analysis was performed after informed consent was obtained. This study was authorized by the Research Committee of Hospital de Niños de Córdoba.

DNA Diagnosis

The p.G390R mutation was investigated by PCR and restriction enzyme assay. Exon 15 of *ASS1* gene and the flanking intron-exon junction were amplified and digested with *MspI* according to the method described previously (Laróvere et al. 2009).

Results and Discussion

The analysis of the G390R mutation in the *ASS1* gene revealed that the probands ($n = 12$; alleles = 24) were homozygous for the mutation. Cascade/family testing showed that 21 of 26 individuals were carriers (Fig. 1). The nine couples where both parents were carriers had a total of 21 births, 12 of them homozygous for G390R

mutation, which leads to the occurrence of the disease in descendants to be 57%. This frequency doubles the percentage of expected affected pregnancies (25%) according to Mendel's first law for an autosomal recessive disease. These results suggest the occurrence of preferential transmission of the mutant allele compared to the normal allele. Kleijer et al. (2006) suggested that this phenomenon could be explained by a protective role of ASS deficiency in mutant sperm cells against the possible detrimental or apoptotic effect of nitric oxide produced normally from arginine by nitric oxide synthase.

The results of the population study indicate that of the 172 individuals from Villa Mercedes City, 7 were heterozygous for the p.G390R mutation. Thus, the carrier frequency is approximately 1/25 inhabitants of Villa Mercedes City, which suggests a population incidence of CTLN1 to be 1 affected individual per 2,427 births. This figure compares to the worldwide incidence of CTLN1 of 1 in 57,000 births (Brusilow and Horwich 2001), which is approximately 20 times lower.

The Basis for a Preconception Screening

The analyzed community of the Argentinean Province of San Luis appears to be an appropriate subject for a genetic study, because it had allegedly been an "isolated" population; although sociological and anthropological data to reinforce this assumption have not been carried out yet.

This high apparent carrier frequency in our study group suggests that preconception carrier screening could be used to inform parents of reproductive outcomes and to allow better postnatal management. In this context, the work of Kaback and O'Brien (1973) is instructive as they undertook the first voluntary community-based attempt at mass screening of an Ashkenazi Jewish population for Tay-Sachs disease. Three decades later, the incidence of this disease had been reduced by at least 90% (Kaback 2000).

In addition to the above success in reducing incidence by a screening program, one of the recommendations of the Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org>) encourages "...ethnicity and country specific mutation databases to deliver the most efficient health care" and so would improve geographic and ethnic-specific health care (Appelbe et al. 2007). Moreover, Godard et al. (2003) established that "carrier screening at antenatal clinics is easy to organize: the risk of being a carrier is of current interests and the partner already exists. . . . Of all the types of genetic screening, preconception carrier screening is the preferred way to go."

Due to the high carrier frequency of this mutation in this population, we recommend preconception carrier screening

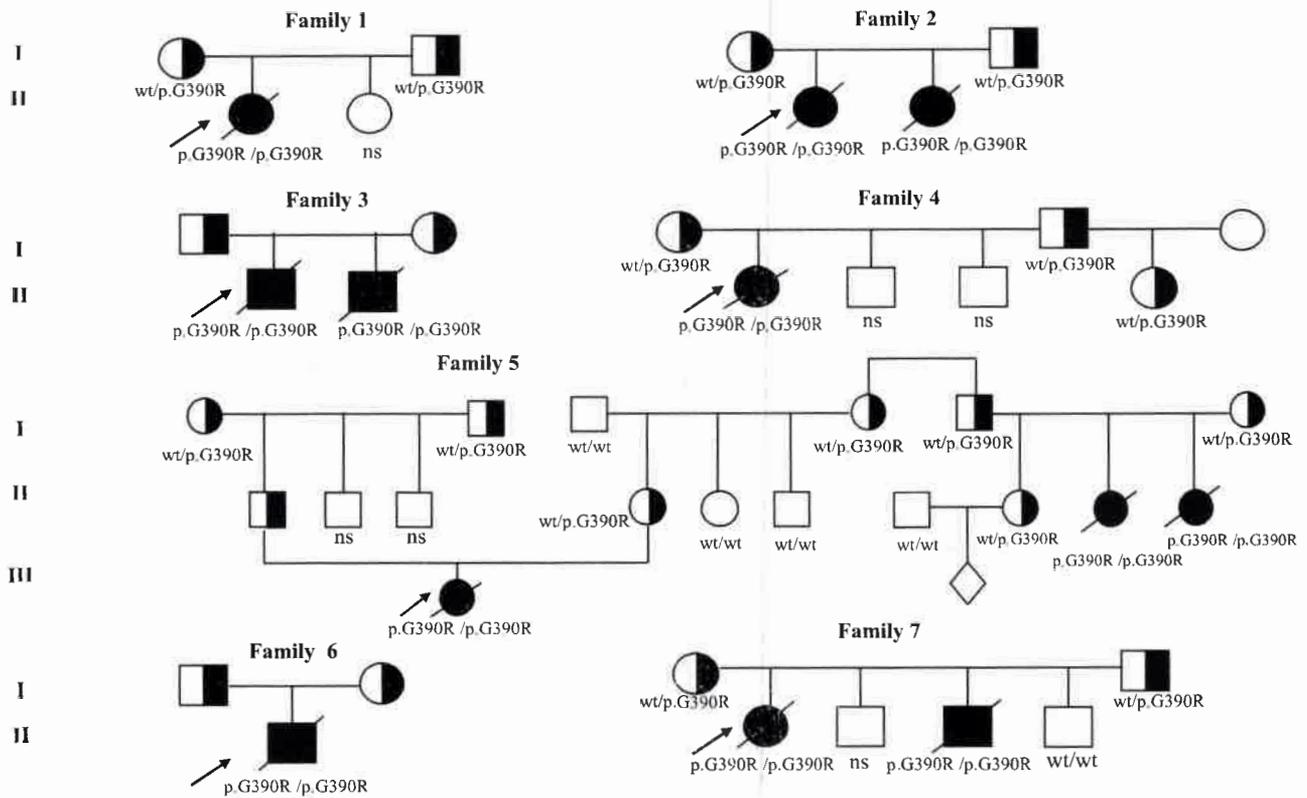


Fig. 1 Genetic pedigree of the studied families with CTLN1. Probands are indicated by arrows; ns not studied subject; modified from Laróvere et al. (2009)

for the common mutation G390R in *ASS1* at least in San Luis Province. Hopefully, this intervention will decrease the incidence of CTLN1 in this high-risk population, as preconception carrier detection has done in other risk populations (Kaback 2000; ACOG 2009).

Acknowledgements The authors gratefully acknowledge Prof. Dr. Antonio Blanco and Dr. Marshall Summar for the critical readings of the manuscript. We also thank the patients' families and the volunteers from Villa Mercedes for their cooperation and the technical assistance of María Fernanda Santi. This study was supported partially by grants from SECYT (No. 214/10) and FONCYT (PICT 05, No. 5-34226) and Innovative Medicines Company, Argentina.

References

ACOG Committee on Genetics (2009) ACOG Committee Opinion No. 442: preconception and prenatal carrier screening for genetic diseases in individuals of Eastern European Jewish descent. *Obstet Gynecol* 114:950–953

Appelbe W, Auerbach AD, Becker K et al (2007) Recommendations of the 2006 Human Variome Project meeting. *Nat Genet* 39(4): 433–436

Brusilow SW, Horwich AL (2001) Urea cycle enzymes. In: Scriver C, Beaudet A, Valle D, Sly W (eds) *Metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, pp 1909–1963

Engel K, Höhne W, Häberle J (2009) Mutations and polymorphisms in the human argininosuccinate synthetase (*ASS1*) gene. *Hum Mut* 30(3):300–307

Godard B, ten Kate L, Evers-Kiebooms G, Aymé S (2003) Population genetic screening programmes: principles, techniques, practices, and policies. *Eur J Hum Genet* 11:S49–S87

Kaback M, O'Brien J (1973) Tay–Sachs: prototype for prevention of genetic disease. In: McKusick V, Claiborne R (eds) *Medical genetics*. HP Publishing, New York, pp 253–262

Kaback MM (2000) Population-based genetics screening for reproductive counseling: the Tay–Sachs experience. *Eur J Pers* 159: S192–S195

Kleijer WJ, Garritsen VH, van der Sterre MLT, Berning C, Häberle J, Huijman JGM (2006) Prenatal diagnosis of citrullinemia and argininosuccinic aciduria: evidence for a transmission ratio distortion in citrullinemia. *Prenat Diagn* 26(3):242–247

Laróvere LE, Angaroni CJ, Antonozzi SL, Shimohama M, de Kremer RD (2009) Citrullinemia type I, classical variant. Identification of *ASS*-p.G390R (c.1168G>A) mutation in families of a limited geographic area of Argentina: a possible population cluster. *Clin Biochem* 42(10/11):1166–1168

McMurray WC, Mohyuddin F, Rossiter RJ et al (1962) Citrullinuria, a new aminoaciduria associated with mental retardation. *Lancet* 1:138

ANEXO III

“Impact of *CPS1* gene rs7422339 polymorphism in Argentine patients with hyperhomocysteinemia”. *Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening* (JIEMS) 2014

Impact of *CPS1* gene rs7422339 polymorphism in Argentine patients with hyperhomocysteinemia

Silene M. Silvera-Ruiz*, Carola L. Grosso, Raquel Dodelson De Kremer, Laura E. Laróvere.

Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas, CEMECO. Cátedra de Clínica Pediátrica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba and Hospital de Niños de la Santísima Trinidad.

*Corresponding Author. Address: Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas (CEMECO), Hospital de Niños de Córdoba, Ferroviarios 1250, Córdoba (5014), Argentina.

Telephone: + 54 351 4586473

e-mail: silenesilvera@outlook.com.ar

Word counts for the text: 1478

Word count for the abstract: 214

Number of tables: 2

SUMMARY

Carbamoyl phosphate synthetase I (CPSI) is a key gene in the first step of urea cycle and has been correlated with nitric oxide level and vascular smooth muscle activity. A functional single nucleotide polymorphism (C/A) at position 4217 in CPSI (NCBI SNP database no. rs7422339, T1405N) was reported to be associated with high homocysteine (Hcy) plasma values. High plasma Hcy level is related to cardiovascular disease and may play an etiologic role in vascular damage. While genetic variants of Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene are known to influence Hcy concentration, other genetic determinants of Hcy remain largely unknown. The association between the CPSI rs7422339 and the risk of hyperhomocysteinemia in Latin American populations is currently unknown. Here, we study the association between rs7422339 and hyperhomocysteinemic condition in Argentine patients. *Subjects.* 100 hyperhomocysteinemic (HHcy) patients without MTHFR C677T polymorphism and 100 control subjects. *Methods.* CPSI rs7422339 was studied using PCR and enzymatic restriction. Statistical analysis was made with INFOSAT. *Results.* Comparisons of the CPSI rs7422339 genotype distributions revealed a significant difference between groups ($P=2.3 \times 10^{-3}$), without gender specific differences ($P=0.857$). HHcy patients carrying polymorphic allele (A) showed almost three times higher risk ($OR=2.47$) of hyperhomocysteinemia than wild-type allele (C). *Conclusion.* Our data suggest that rs7422339 SNP should be associated with high Hcy levels in the Argentine population.

SYNOPSIS

We studied the association between rs7422339 (CPSI T1405N SNP) and hyperhomocysteinemic condition in Argentine patients. We identified for the first time T1405N SNP in a Latin American population, showing to be one of the highest frequencies described worldwide. We found strong association between T1405N SNP and hyperhomocysteinemia.

COMPLIANCE WITH ETHICS GUIDELINES

Conflict of Interest

Silene M. Silvera-Ruiz, Carola L. Grosso, Raquel Dodelson De Kremer and Laura E. Laróvere declare that they have no conflict of interest.

Informed Consent

All procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000(5). Informed consent was obtained from all patients for being included in the study.

Contributions of individual authors

Lic. Silene M. Silvera-Ruiz has contributed to the planning, execution, and reporting of the work; Dr. Carola L. Grosso has contributed to the planning and execution of the work; Dr. Raquel Dodelson De Kremer has contributed to the supervision of the work and Dr. Laura E. Laróvere contributed to the planning, reporting and supervision of the work described in the article.

INTRODUCTION

Homocysteine (Hcy) is a non-protein-forming sulfur amino acid produced during the catabolism of methionine. The small amount of Hcy found in plasma is the result of a cellular export mechanism that complements the remethylation and transsulfuration pathways in maintaining low intra-cellular concentration of this potentially cytotoxic and pro-oxidant amino acid (Selhub 1999; Upchurch et al 1997; Weiss et al 2001). Plasma Hcy levels are influenced by genetic as well as environmental factors, such as age, sex, smoking status, intake of folate and B vitamins. Hcy concentration has been epidemiologically correlated with the risk of cardiovascular diseases (Homocysteine Studies Collaboration 2002), neural tube defects (Mills et al 1995) and loss of cognitive functions (Clarke et al 1998).

Despite heritability estimates ranging from 25% to 44% (Souto et al 2005; Vermeulen et al 2006), relatively little is known of the genetic determinants or whether the same variants influence Hcy levels across populations. Rare homozygous defects in genes encoding for enzymes of Hcy metabolism, as Cystathionine β synthase (CBS) and Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), lead to dramatically increased Hcy concentration and premature occlusive vascular disease (Selhub 1999). However, few common polymorphisms have been unequivocally associated with Hcy concentration. Among these, the strongest is the MTHFR SNP rs1801133 (C677T) correlated with reduced enzymatic activity and higher Hcy levels (Frosst et al 1995). Previous genome-wide associations (GWA) reports for Hcy levels in Caucasian women (Paré et al 2009) and non-European women from the Philippines (Lange et al 2010), observed significant evidence for an association ($P=1.9 \times 10^{-11}$ and $P=4.7 \times 10^{-13}$, respectively) between Hcy levels and a novel loci, rs7422339 (c.4217C>A), which encodes Thr1405Asn in carbamoyl phosphate synthetase I (CPS1).

The protein encoded by CPS1 catalyzes the first committed step of the hepatic urea cycle (Summar et al 2007). CPS1 SNP rs7422339 was estimated to explain a greater proportion of the variability in log-Hcy levels in the Philippino mothers ($R^2=3.0\%$) than in the Caucasian group ($R^2=0.3\%$) despite a lower frequency (0.24 versus 0.31) of the minor allele in Philippino mothers.

Previously, we studied in Argentine population different polymorphisms commonly associated with hyperhomocysteinemia (HHcy) in MTHFR and CBS. The study of c.677C>T-MTHFR showed a high prevalence of this substitution in HHcy individuals. However, the c.1298A>C-MTHFR and c.844ins68-CBS did not correlate with high levels of Hcy, leaving a significant number of patients HHcy without known genetic determinant (Grosso 2010). Therefore, in order to find genetic determinants that could explain high plasma values of Hcy in our population we studied T1405N SNP.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

Pathological group. This group consists of 100 patients derived from state and/or private Services of Cardiology, Angiology, Neurology and Hematology, with defined cardiovascular, cerebral or peripheral disease. The patients were selected according to the following criteria: (i) over 18 years old, (ii) high levels of Hcy in plasma considering normal fasting values <15 $\mu\text{mol/l}$ and post methionine load test <30 $\mu\text{mol/L}$, (iii) normal genotype for C677T MTHFR polymorphism to discard a possible increase in Hcy because of this SNP [9].

Control group. The population sample taken as control consisted of 100 unrelated and healthy subjects, of which 58 were women and 42 were men (mean age: 33.8 ± 10.8 years, range 11-72).

This study was duly conducted in compliance with the Helsinki Declaration and the approval of the Institution Ethics Review Board (CIEIS) of Córdoba Government. Written consent of all participating individuals was obtained.

Blood samples and DNA isolation. A blood sample of 2ml was collected from each individual in sterile anticoagulant tubes. Genomic DNA was extracted using the protocol of Wizard Genomic's purification DNA Promega Purification Kit (Promega, Madison, USA).

Genotyping of CPSI T1405N rs7422339 polymorphism. DNA samples from patients and controls were genotyped for rs7422339 SNP using PCR and enzymatic restriction assay. Primer pair amplified the SNP region used for forward primer [5'- ATGGCACTATACTACTTCTC -3'] and for reverse [5'- TAGCTGGTCATCTTATACTC-3']. PCR amplification was carried out in a total volume of 50ul containing 1x GoTaq Buffer, 0.5ul each dNTP, 1pmol each primer, 1U GoTaq DNA Polymerase (Promega), and 20ng genomic DNA. PCR cycles involved initial denaturation at 96°C 5 min, 30 cycles with: denaturation 95°C 1 min, annealing 52°C 1 min, extension 72°C 1 min, and final extension at 72°C 7 min. PCR product [571 base pairs (bp)] were digested by 0.5ul (10U) of *AleI* restriction endonuclease (New England Biolabs) at 37°C overnight. *AleI* recognition site is represented by the presence of C allele which produces two fragments at 393 and 178bp while the presence of A allele is represented by the remain uncut fragment at 571bp. The fragments were separated by 2% agarose gel electrophoresis and then visualized under UV light.

DNA sequence analysis. DNA sequence analysis was performed in two different genotype samples to confirm the integrity of the area surrounding the restriction site. DNA sequence analysis was made to the PCR product using forward primer. The samples were analyzed at INTA Institute (B.A., Argentina) using ABI 3500xl automated DNA sequencer.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed with INFOSTAT software v2008 (Di Rienzo et al 2008). Comparison between distributions of categorical variables was performed using chi-square (X^2) test. In addition, variables were described as odds ratio (OR) with 95% confidence interval (95% CI) where appropriate. The data were considered significant if P values were <0.05 and highly significant if $P < 0.01$.

RESULTS AND DISCUSSION

DNA sequence analysis for two different genotype subjects. Successful sequencing of CC genotype was proved by detection of a single peak corresponding to C nucleotide; while AC genotype sequence was confirmed by the presence of two overlapping peaks as expected.

Genotype and allele frequencies of CPS1 T1405N SNP. Genotype frequencies of CPS1 rs7422339 showed a statistically significant differential distribution within HHcy patients and control individuals as shown in Table 1. The percentage of HHcy and control individuals carrying the AA genotype was 54.5% and 45.5%, respectively; whereas the AC genotype was 60% in the HHcy group and 40% in the control; and the CC genotype was 36.4% and 63.6%, respectively. Thus, it is to be noted that the ratio of CC carrying control individuals is about to be twice that for HHcy, reflecting an impact of this genotype on protecting function against elevation of homocysteine levels. This effect of CC genotype replicated only when the dominant model was applied, where 63.6% of patients with CC genotype were normal versus 38.3% normal individuals with AA+AC genotypes as shown in Table 2.

Regarding the allele frequency, a differential distribution was observed in CPS1 T1405N SNP in HHcy versus control. Notably, the percentage of patients harboring the A allele who had HHcy (45 out of 78: 57.7%) is higher than that of C allele carriers (55 out of 122: 45%).

Table 1: Genotype and allele frequency of CPS1 T1405N SNP in patients and normal subjects.

	HHcy (N=100)	Normal (N=100)	X^2	P value
Genotype Frequency				
AA	18	15	9.6	0.008
AC	54	36		
CC	28	49		
Allele Frequency				
A	0.45	0.33	3.03	0.0819
C	0.55	0.67		

Table 2: Dominant model of inheritance of CPS1 T1405N SNP in HHcy versus normals.

CPS1 T1405N	HHcy (N=100)	Normal (N=100)	Odds Ratio(OR)	95% Confidence Interval (95% CI)		P value
				Lower	Upper	
Dominant model						
CC	28	49	2.47	1.38	4.43	0.0023
AC + AA	82	51				

Influence of CPS1 T1405N SNP stratified according to gender parameter. The hyperhomocysteinemic study group was constituted by 55 females of which 12 were AA, 28 AC and 15 CC; and 45 males of which 6 were AA, 26 AC and 13 were CC. Analysis of the effect of CPS1 genotypes according to gender showed that in both males and females, those carrying the AA and AC genotype were more likely to have HHcy than those carrying CC; as for CC male carriers, 28.9% (13 out of 45) were HHcy compared to 71.1% (32 out of 45) of AA and AC male carriers. In females, 27.3% (15 out of 55) were HHcy versus 72.7% of AA and AC female carriers. Results of studying each genotype separately also showed no statistically significant difference between distribution of genotypes in males and females with a P value of 0.857. Also, allele frequency of CPS1 1405 T/N SNP in males (A: 0.42; C: 0.58) and females (A: 0.47; C: 0.53) in HHcy patients showed no significant difference, giving a P value of 0.999. So we could reject the hypothesis of some difference in genotype distributions between males and females.

CONCLUSION

This study identified for the first time CPS1 T1405N polymorphism in a Latin American population. Frequency calculation proved to be one of the highest described worldwide, emphasizing the importance of identifying the effects of this change on the susceptibility to hyperhomocysteinemic condition.

We demonstrated a significant statistical association between CPS1 T1405N polymorphism and hyperhomocysteinemic condition, regardless of gender, developmental status or another SNP interaction. These data reveal that functional variants within the urea cycle are significant not only within the pathway, but also in other physiologic systems. We hypothesize that this polymorphism affects the functional efficiency of CPS1 and thus the entire urea cycle and as such, the availability of the nitric oxide substrates, one of the regulators of one carbon metabolism.

Our findings suggest that at least one of the main genetic factors that are known to influence plasma homocysteine levels are shared between Asian and European populations and their descendants, regardless of their particular diet and genetic background.

This knowledge should allow better intervention strategies to either predict or modify the associated adverse outcomes.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from Secretaría de Ciencia y Técnica Universidad Nacional de Córdoba (no. 124/13; 203/14), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas and Secretaría de Ciencia y Tecnología, Gobierno de Córdoba, Argentina.

REFERENCES

- Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1998; 55:1449-55.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat (2008), FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10:111-113.
- Grosso C. Maternal mutation 677C>T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with severe brain injury in offspring. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, 2010.
- Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *Jama* 2002; 288:2015-2022.
- Lange LA, et al. Genome-wide association study of homocysteine levels in Filipinos provides evidence for CPS1 in women and a stronger MTHFR effect in young adults. *Hum Mol Genet* 2010; 15: 19(10):2050-8.
- Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, et al. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet* 1995; 345:149-151.
- Pare' G, Chasman DI, Parker AN, Robert RY, Zee RRY, Malarstig A, et al. Novel associations of CPS1, MUT, NOX4 and DPEP1 with plasma homocysteine in a healthy population: a genome-wide evaluation of 13,974 participants in the Women's Genome Health Study. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; 2:142- 150.
- Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999; 19:217-246.
- Souto JC, Blanco-Vaca F, Soria JM, Buil A, Almasy L, Ordonez-Llanos J, et al. A genome wide exploration suggests a new candidate gene at chromosome 11q23 as the major determinant of

plasma homocysteine levels: results from the GAIT project. *Am J-Hum Genet* 2005;76:925–933.

Summar ML, Hall L, Christman B, Barr F, Smith H, Kallianpur A, et al. Environmentally determined genetic expression: clinical correlates with molecular variants of carbamyl phosphate synthetase I. *Mol Genet Metab* 2004; 81 (Suppl. 1):S12-9.

Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keaney JF Jr, et al. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1997; 272:17012–17.

Vermeulen SH, van der Vleuten GM, de Graaf J, Hermus AR, Blom HJ, Stalenhoef AF, et al. A genome-wide linkage scan for homocysteine levels suggests three regions of interest. *J Thromb Haemost* 2006; 4:1303–1307.

Weiss N, Zhang YY, Heydrick S, Bierl C, Loscalzo J. Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocyst(e)ine-induced endothelial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12503–08.

76152

(54) 17