

## Diferencias en la expresión de PEX entre el centro y la periferia tumoral de los gliomas. Relación con el subtipo histológico y el grado tumoral

M. Brell<sup>1</sup>, J. Ibáñez<sup>1</sup>, A. Felpe<sup>2</sup>, B. Burguera<sup>2</sup>, M. Frontera<sup>2</sup>, M. E. Couce<sup>3</sup>

1- Servicio de Neurocirugía. Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca

2- Unidad de Investigación. Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca

3- Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca

### Resumen

Los gliomas de alto grado se caracterizan por su rápido crecimiento y su alta capacidad infiltrativa. En el proceso de invasión, las células neoplásicas interactúan con la matriz extracelular y con las células sanas del parénquima cerebral circundante. Las metaloproteinasas son endopeptidasas capaces de degradar la matriz extracelular favoreciendo la migración de las células tumorales. PEX, un fragmento derivado de la metaloproteinasas de matriz 2 (MMP-2), y expresado por numerosos tipos de tumores, se comporta como inhibidor de la proliferación y migración celular, así como de la angiogénesis tumoral. En el presente trabajo demostramos mediante el análisis topográfico de una serie de gliomas, que existen diferencias en la expresión de PEX entre áreas del centro y de la periferia tumoral a pesar de ser similares histológicamente. Ello supone una prueba más de la heterogeneidad de los gliomas, lo que debe tenerse en cuenta en el momento de planificar una biopsia diagnóstica o diseñar una estrategia terapéutica.

*Palabras clave:* Glioma, heterogeneidad, PEX, Metaloproteinasas, RT-PCR.

### Abstract

Gliomas, particularly those of high WHO grade, share basic features of fast tumor growth and diffuse infiltration of brain tissue. Invasion of glioma cells requires interaction with the extracellular matrix and surrounding cells of the healthy brain tissue. Metalloproteinases degrade extracellular matrix molecules and create a more permissive environment for cell migration. A fragment of MMP-2 called PEX is naturally expressed in various human tumors and has been shown to inhibit angiogenesis, cell proliferation, and migration. Our study, by means of a topographical dissection of large resections of gliomas, demonstrates similar histological findings in central and peripheral regions of these tumors, no clear differences in tumor cell proliferation, but significant differences with regard to PEX RNA expression, particularly in the high grade group of gliomas. These results reinforce the notion of molecular heterogeneity within the glioma mass, which could be of importance when planning different therapeutic strategies in the future. In addition, they suggest the need for maintaining orientation in the sampling of these resection specimens and for the planning of a biopsy surgical procedure.

*Keywords:* Glioma, heterogeneity, PEX, Metalloproteinase, RT-PCR.

### Introducción

Los gliomas son las neoplasias primarias más frecuentes del SNC. Una de sus principales características es su gran capacidad infiltrativa e invasiva del tejido cerebral en el que asientan. Es precisamente la invasión del parénquima cerebral por las células del glioma lo que determina en gran medida el comportamiento agresivo de estas neoplasias y es causa, en gran medida, del fracaso de la estrategia actual de tra-

tamiento (máxima resección segura seguida de radioterapia y quimioterapia)<sup>1</sup>. Las bases genéticas del comportamiento biológico de los gliomas no son del todo conocidas en la actualidad, de modo que algunos autores han sugerido que la capacidad de infiltración difusa que muestran estas células sea probablemente debida a la activación de determinados genes<sup>2</sup>. En ese sentido, en función de la expresión o no de un perfil genético específico de invasión, podrían distinguirse en el seno de un tumor dos

subpoblaciones celulares con comportamiento distinto: una población eminentemente proliferativa e inmóvil situada en el centro de la masa tumoral, y otra fundamentalmente invasiva, móvil y situada en la periferia del tumor<sup>3</sup>, donde tendrían lugar los fenómenos de angiogénesis, implicados e imprescindibles en los mecanismos de invasión tumoral<sup>4,5</sup>. Las características biológicas de estas dos subpoblaciones han sido y continúan siendo en nuestros días motivo de investigación, ya que, un mejor entendimiento de las bases moleculares de esta heterogeneidad regional redundará en un mayor conocimiento de la patogénesis de los gliomas y de posibles dianas terapéuticas<sup>6,7</sup>.

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son endopeptidasas fuertemente relacionadas con la invasión tumoral, ya que juegan un papel fundamental en la destrucción de la matriz extracelular y en la activación de numerosos factores de progresión<sup>8</sup>. La metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2) se ubica fundamentalmente en la superficie de los vasos sanguíneos y de las células tumorales, y es especialmente abundante en los gliomas de alto grado<sup>4,5,7</sup>. Un fragmento derivado por autocatálisis de la misma y denominado PEX (noncatalytic C-terminal hemopexin-like domain) actúa simultáneamente como inhibidor de la angiogénesis, proliferación y migración celular, regulando la interacción de MMP-2 con la integrina  $\alpha_3$ , paso fundamental en el proceso de invasión<sup>9-11</sup>. Estudios in vivo han demostrado la eficacia terapéutica de esta molécula en gliomas<sup>12</sup>.

La expresión de PEX se ha relacionado con el grado histológico y el subtipo de glioma, y paradójicamente, parece ser máxima en el GBM y mínima en el oligodendroglioma, caracterizado por presentar menos capacidad invasiva y proliferativa y menor vascularización<sup>4</sup>.

En un estudio previo<sup>13</sup>, pudimos demostrar en una serie de gliomas, la existencia de diferencias en el metabolismo energético entre regiones distintas del mismo tumor. Además, estas diferencias no seguían una distribución aleatoria, sino que seguían un patrón característico en áreas concéntricas: la mayor capacidad antioxidante se situaba en el centro tumoral mientras que la máxima funcionalidad mitocondrial se situaba en la periferia. Del mismo modo, la angiogénesis, la proliferación y la migración celular parecen seguir también un patrón de distribución concéntrico. Por ello, y dado que PEX se comporta como inhibidor de la angiogénesis, proliferación y migración celular, el objetivo del presente estudio fue eva-

luar la expresión de PEX en el centro y en la periferia tumoral de una serie de gliomas, para analizar la posible heterogeneidad intra o inter-tumoral en la expresión del mismo. Además se estudió el impacto pronóstico de la expresión de PEX.

## Material y Métodos

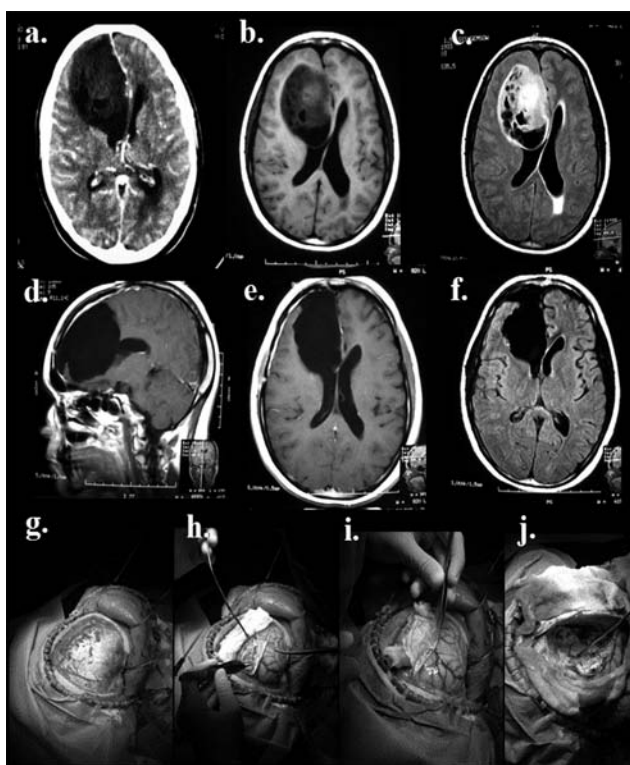
### *Selección de pacientes y muestras*

Se incluyeron 28 pacientes con diagnóstico de tumor cerebral, atendidos en el Servicio de Neurocirugía del Hospital Universitario Son Dureta, y tributarios de cirugía exéretica. Todos los pacientes fueron intervenidos mediante craneotomía y resección en bloque de la lesión que fue enviada al laboratorio desde el quirófano en un periodo máximo de 10 minutos. Tras la evaluación histológica intraoperatoria para diagnóstico, se procedió a la disección concéntrica de las muestras (Figura 1), obteniéndose secciones representativas del centro y de la periferia tumoral para análisis en fresco. Se estudiaron un total de 56 regiones tumorales. La clasificación histológica de las mismas se efectuó de acuerdo a los criterios de la OMS<sup>14</sup>. La expresión de PEX se evaluó mediante RT-PCR en tiempo real (real time RT-PCR) En todos los casos se tomaron muestras inmediatamente adyacentes a las seleccionadas para análisis de PEX del centro y de la periferia, para tinción con hematoxilina-eosina y análisis histológico, así como para el análisis inmunohistoquímico de Ki-67 y p53. Se recogió toda la información clínica y de seguimiento de todos los pacientes, que fueron tratados de acuerdo a un protocolo preestablecido común. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de las Islas Baleares y por la Comisión de Investigación del Hospital Universitario Son Dureta. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado de participación en el estudio.

### *Análisis histológico e inmunohistoquímico*

Se obtuvieron secciones de 5  $\mu$ m de los bloques de parafina del centro y la periferia tumoral para tinción con hematoxilina-eosina.

El análisis inmunohistoquímico se realizó con la ayuda del sistema automatizado Dual Link Envision+ detection de Dako con anticuerpos para la determinación de Ki-67 (Dako, clone MIB-1, dilución 1:800) y p53 (Dako, clone DO-7; dilución 1:200).



*Figura 1. a. Imagen preoperatoria TC con contraste. Se observa voluminosa lesión intraxial frontal derecha, con áreas quísticas en su interior y captación sutil de contraste, que produce efecto de masa sobre estructuras de línea media.*

*b. Imagen preoperatoria RM axial T1. Se observa que la lesión posee cierta heterogeneidad con áreas espontáneamente hiperintensas en su interior.*

*c. Imagen preoperatoria RM axial flair.*

*Radiológicamente, la lesión posee límites bien definidos respecto al parénquima cerebral circundante.*

*d. Imagen postoperatoria RM sagital T1 con gadolinio, donde no se observan restos tumorales.*

*e. Imagen postoperatoria RM axial T1 con gadolinio que demuestra la exéresis completa y la normalización de estructuras de la línea media.*

*f. Imagen postoperatoria RM axial flair que demuestra la exéresis completa y la normalización de estructuras de la línea media.*

*g. Secuencia de imágenes intraoperatorias de la lesión expuesta en las imágenes 3.a., 3.b., 3.c., 3.d., 3.e. y 3.f.: craneotomía frontal derecha con exposición de la línea media.*

*h. Secuencia de imágenes intraoperatoria de la lesión expuesta en las imágenes 3.a., 3.b., 3.c., 3.d., 3.e. y 3.f.: apertura de la duramadre con base al seno longitudinal superior respetando las venas puente.*

*i. Secuencia de imágenes intraoperatoria de la lesión expuesta en las imágenes 3.a., 3.b., 3.c., 3.d., 3.e. y 3.f.: tras la apertura dural queda expuesto el lóbulo frontal, observándose las circunvoluciones ensanchadas y*

*aplanadas como signos indirectos de la presencia de la lesión subyacente, pero sin apreciarse, a diferencia de lo que cabría esperar por la imagen preoperatoria, un tumor de límites claramente definidos.*

*j. Secuencia de imágenes intraoperatoria de la lesión expuesta en las imágenes 3.a., 3.b., 3.c., 3.d., 3.e. y 3.f.: lecho de resección quirúrgica tras la extirpación. La hoz cerebral y el ventrículo lateral resultaron límites anatómicos claramente identificables en el plano medial y en profundidad. En el plano lateral, la diferencia de consistencia y color guió la resección. Obsérvese en la imagen el ventrículo lateral abierto y la superficie endimaria y plexo coroide del mismo expuestos.*

El análisis inmunohistoquímico se realizó de manera semicuantitativa, determinándose un índice de proliferación Ki-67 para cada muestra, mientras que para p53 se consideró la inmunexpresión débil/focal (1+) cuando una minoría de las células mostraban expresión de la proteína siendo esta además débil o cuando sólo algunas células dispersas mostraban reactividad, moderada (2+) cuando menos del 50% de las células expresaban la proteína y fuerte/difusa (3+) cuando se observaban más del 50% de las células positivas.

### **RT PCR en tiempo real**

La extracción de ARN del tejido se efectuó con el kit comercial RNeasy Lipid tissue Mini kit (Qiagen), y con la ayuda de la estación de trabajo QiaCube (Qiagen), mientras que para la retrotranscripción se empleó el kit comercial Superscript III kit (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del fabricante. La PCR en tiempo real se realizó con el sistema 7500 ABI system (Applied Biosystems), de acuerdo a protocolos estándar y con reactivos SybrGreen (Applied Biosystems).

Las reacciones de PCR se efectuaron para un volumen total 12µl que contenía 2µl de ADNc a una dilución de 1:10. Todas las reacciones se realizaron por triplicado. Los niveles de expresión se calcularon por el método de la curva estándar<sup>15</sup>.

La normalización de la expresión génica en todas las muestras se efectuó con 3 genes control (house-keeping genes) (ABL1, TBP y HPRT1)<sup>16, 17</sup>. Las secuencias de los cebadores se detallan en la Tabla I.

Gen	Secuencias de los cebadores	Tamaño del producto de la PCR (bp)	T <sub>m</sub> (°C)
ABL	S 5'-CAACACTGCTTCTGATGGCAA-3'	92	57
	A 5'-CGGCCACCGTTGAATGAT-3'		
TBP	S 5'-GAGCTGTGATGTGAAGTTTCC-3'	117	57
	A 5'-TCTGGGTTTGATCATCTCTAG-3'		
HPRT1	S 5'-TGAGGATTGGAAAGGGTGT-3'	118	56
	A 5'-GAGCACACAGAGGGCTACAA-3'		
PEX	S 5'-TTGACGGTAAGGACGGACTC-3'	153	59
	A 5'-ACTTGCAGTACTCCCCATCG-3'		

Tabla 1.

### Análisis estadístico

Debido que la muestra no se ajusta a una distribución normal, se emplearon test estadísticos no paramétricos en el análisis. Las diferencias intratumorales en la expresión de PEX se analizaron mediante el test de Wilcoxon para datos apareados, mientras que las diferencias intertumoraes fueron evaluadas mediante el test de la U de Mann-Whitney. Sólo se consideró como significativo el nivel de significación  $P < 0.05$ .

La supervivencia global fue calculada desde el día del tratamiento quirúrgico hasta la fecha del éxitus o de la última visita y la supervivencia libre de progresión desde el día de la intervención hasta la fecha de recidiva o progresión tumoral. El análisis de supervivencia se efectuó mediante el cálculo de la curva de supervivencia de acuerdo con el método de Kaplan-Meier y la probabilidad de supervivencia entre subgrupos fue comparada mediante el test de log-rank. Todo el análisis estadístico se efectuó con el paquete estadístico SPSS 16.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL)

### Resultados

Las principales características clínicas y patológicas de la serie se muestran en la Tabla II. Se incluyeron un total de 28 pacientes, 24 con diagnóstico de glioma y 4 afectos de metástasis cerebrales. Diecisiete casos (68%) fueron gliomas de alto grado, 12 (43%) GBM y 7 (25%) gliomas anaplásicos, mientras que 4 tumores (14%) fueron gliomas de bajo grado. Siete gliomas presentaban componente oligodendroglioma (4 oligodendrogliomas de bajo grado y 3 oligodendrogliomas anaplásicos). Veinte pacientes (71.4%) fueron varones, y, la mediana de edad para

toda la serie fue de 53 años (rango, 14-81). Todos los pacientes fueron sometidos a cirugía exéretica lográndose una resección completa en 15 pacientes (53.5%) y una resección parcial en 13 casos (46.5%). Tras una mediana de seguimiento de 14 meses (rango, 1.1-29.1), 15 pacientes (53.5%) permanecían vivos, 10 pacientes (35.7%) habían fallecido y 3 casos se habían perdido de seguimiento. La mediana de supervivencia para los pacientes afectos de GBM fue de 8.8 meses (rango, 4.6-12.9), y para pacientes diagnosticados de metástasis de 4.4 meses (rango, 3.3-4.6), mientras que la supervivencia mediana para los pacientes con glioma anaplásico o glioma de bajo grado no se había alcanzado a fin de seguimiento.

### Análisis histológico e inmunohistoquímico

Se observó una alta densidad celular tanto en el centro como en la periferia de los tumores analizados. En la región central de 9 tumores se detectó necrosis con núcleos en empalizada, y en 6 de estos se observó la presencia de infarto y trombosis vascular. En 8 de estos tumores con necrosis central también se observó necrosis en la periferia, y en 3 de ellos áreas de infarto tumoral. Se identificó vascularización glomeruloide y/o proliferación endotelial en 13 regiones centrales y en 8 periféricas. No se observaron diferencias significativas en la densidad celular o en la presencia de necrosis entre el centro y la periferia de las lesiones. La proliferación vascular en forma de vascularización glomeruloide y/o proliferación endotelial se identificó con mayor frecuencia en las áreas centrales de los tumores que en las periféricas. El índice de proliferación celular Ki-67 fue similar en el centro y la periferia de las lesiones, oscilando entre el 5 y el 100%. Todos estos resultados se muestran en la Tabla III.

### RT-PCR en tiempo real.

Los resultados de la RT-PCR en tiempo real confirman la existencia de expresión de PEX en una serie de gliomas de diferente grado y subtipo histológico, así como en 4 metástasis cerebrales. Se hallaron diferencias en la expresión de PEX entre el centro y la periferia lesional en todos los casos, siendo mayor la expresión de PEX en el centro con respecto a la periferia en la mayoría de los tumores analizados (68%) (Tabla IV). Estas diferencias alcanzaron significación estadística en los gliomas ( $p=0.031$ ) y especialmente en los gliomas de alto grado ( $p=0.022$ ) (Figura 2)

Caso nº	Edad / Género	Histología	Tipo de cirugía	Radioterapia	Quimioterapia
1	60 / v	OA	RC	Si	Si
2	41 / v	GBG	RC	No	No
3	42 / v	AA	RP	Si	Si
4	47 / v	GBM	RP	Si	Si
5	65 / f	MET	RC	No	No
6	79 / f	GBM	PR	No	No
7	79 / v	MET	RC	Si	Si
8	20 / v	AA	RP	Si	Si
9	69 / v	GBM	RP	Si	Si
10	46 / v	GBG	RC	No	No
11	36 / v	GBG	RC	No	No
12	44 / v	GBM	RC	Si	Si
13	73 / v	GBM	RP	Si	No
14	24 / f	OA	RC	Si	Si
15	81 / v	GBM	RC	No	No
16	79 / f	GBM	RP	Si	No
17	60 / v	GBM	RP	Si	Si
18	41 / v	OA	RC	Si	Si
19	79 / f	GBM	RP	Si	Si
20	15 / v	AA	RC	Si	Si
21	45 / v	GBG	RP	No	No
22	53 / v	MET	RC	Si	No
23	14 / v	AA	RP	Si	Si
24	68 / f	GBM	RP	Si	Si
25	61 / v	MET	RC	Si	No
26	65 / f	GBM	RC	Si	Si
27	52 / f	GBM	RC	Si	Si
28	53 / v	GBG	RP	No	No

Tabla 2: Características clinicopatológicas

OA: Oligodendroglioma Anaplásico; GBG: Glioma de bajo grado; AA: Astrocitoma Anaplásico; Met: Metástasis;  
GBM: Glioblastoma; OA: Oligodendroglioma Anaplásico; RC: Resección completa; RP: Resección parcial

Casos	Densidad celular	Necrosis en empalizada	Necrosis de infarto	Proliferación vascular	P53	Ki-67 %
1 centro	Alta	Si	No	Si	++	60
1 perifería	Alta	Si	No	No	++	70
2 centro	Baja	No	No	No	++	<5
2 perifería	Media	No	No	No	++	<5
3 centro	Media	No	No	No	+++	8
3 perifería	Baja	No	No	No	+++	25
4 centro	Alta	Si	Si	No	++	<5
4 perifería	Alta	Si	Si	No	++	<5
5 centro	--	--	--	--	--	--
5 perifería	--	--	--	--	--	--
6 centro	Alta	No	Si	Si	++	80
6 perifería	Media	No	Si	Si	++	90
7 centro	--	--	--	--	--	--
7 perifería	--	--	--	--	--	--
8 centro	Baja	No	No	No	++	<5
8 perifería	Baja	No	No	No	++	<5
9 centro	Alta	Si	Si	Si	+	35
9 perifería	Media	No	No	Si	0	<5
10 centro	Media	No	No	No	+	10
10 perifería	Alta	No	No	No	+	20
11 centro	Media	No	No	No	0	10
11 perifería	Baja	No	No	No	+	<5
12 centro	Alta	No	No	Si	++	80
12 perifería	Media	No	No	No	++	30
13 centro	Alta	Si	Si	Si	0	70

Tabla 3: Datos histológicos e inmunohistoquímicos

Casos	Densidad celular	Necrosis en empalizada	Necrosis de infarto	Proliferación vascular	P53	Ki-67 %
13 perifería	Alta	Si	Si	Si	++	75
14 centro	Media	No	No	No	++	10
14 perifería	Baja	No	No	No	++	15
15 centro	Alta	Si	Si	Si	++	20
15 perifería	Alta	Si	Si	Si	++	20
16 centro	Alta	Si	No	Si	--	--
16 perifería	Alta	Si	No	Si	--	--
17 centro	Alta	No	Si	Si	++	50
17 perifería	Alta	No	Si	Si	++	45
18 centro	Media	No	No	No	++	15
18 perifería	Media	No	No	No	++	20
19 centro	Alta	Si	Si	Si	+	45
19 perifería	Alta	Si	No	Si	+	35
20 centro	Alta	No	No	No	+++	50
20 perifería	Alta	No	No	No	+++	25
21 centro	Baja	No	No	No	0	<5
21 perifería	Baja	No	No	No	0	<3
22 centro	--	--	--	--	--	--
22 perifería	--	--	--	--	--	--
23 centro	Alta	No	No	Si	0	>50
23 perifería	Baja	No	No	No	0	>50
24 centro	Media	Si	Si	Si	+	45
24 perifería	Media	Si	No	Si	++	40
25 centro	--	--	--	--	--	--
25 perifería	--	--	--	--	--	--

Tabla 3: Datos histológicos e inmunohistoquímicos

Casos	Densidad celular	Necrosis en empalizada	Necrosis de infarto	Proliferación vascular	P53	Ki-67 %
26 centro	Alta	No	Si	Si	+++	45
26 perifería	Media	No	Si	Si	++	>50
27 centro	Alta	Si	No	Si	++	50
27 perifería	Alta	Si	No	Si	+	30
28 centro	Baja	No	No	No	++	<3
28 perifería	Baja	No	No	No	+++	<3

-- = No aplicable;

Tabla 3: Datos histológicos e inmunohistoquímicos

En lo que respecta a la heterogeneidad inter-tumoral, la expresión de PEX fue significativamente mayor en el centro de los gliomas de alto grado que en el centro de las metástasis (p=0.039), mientras que sólo se observó una tendencia hacia la significación estadística al comparar la expresión de PEX en el centro de los gliomas de alto grado vs en los gliomas de bajo grado (p=0.06) (Figura 3). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó la expresión de PEX en la periferia de los distintos subtipos tumorales.

La expresión de PEX no mostró valor pronóstico de supervivencia global o supervivencia libre de progresión en los pacientes con GBM. Dicho de otro modo, no se halló una mayor expresión de PEX en el centro ni en la periferia de los tumores pertenecientes a pacientes con larga supervivencia.

### Discusión

El crecimiento de los gliomas depende del balance entre factores estimulantes e inhibidores de la angiogénesis, invasión y proliferación celular. Algunos de estos factores son producidos por el propio tumor [18]. PEX es una proteína de 210 aminoácidos derivada de la MMP-2 que ha demostrado en estudios in vitro capacidad para inhibir la proliferación de células endoteliales y neoplásicas de los gliomas, así como la migración celular<sup>4</sup>. El objetivo principal del presente estudio fue analizar las diferencias en la expresión de PEX entre las regiones centrales y periféricas de los tumores, así como profundizar en el conocimiento sobre la heterogeneidad de los gliomas.

Nuestros resultados demuestran que existe expresión de PEX los gliomas y en las metástasis cerebrales, y que ésta se relaciona con el grado histológico del glioma pero no con el subtipo celular. Se halló además mayor expresión de PEX en la región central respecto de la periférica en todos los gliomas, pero especialmente en los gliomas de alto grado. Estos resultados concuerdan con los previamente publicados por Bello et al.<sup>4</sup>, quienes demuestran la expresión de PEX incrementa con el grado tumoral en los gliomas.

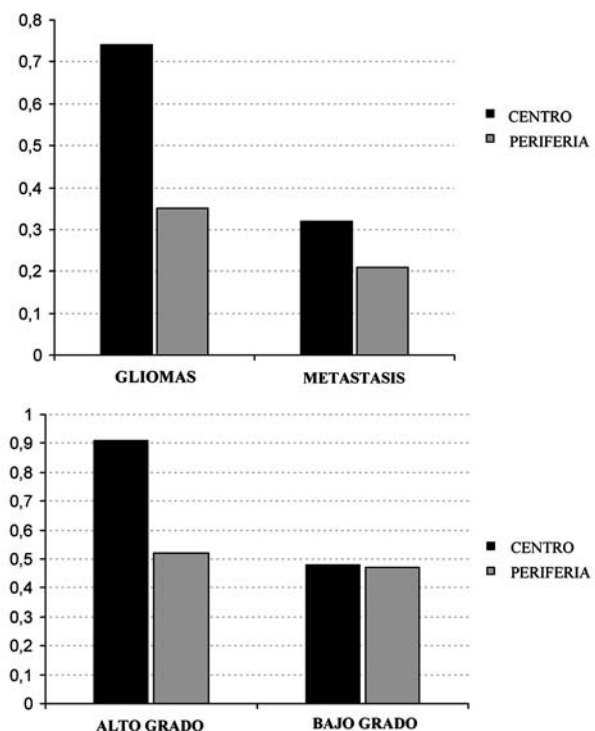


Figura 2: Diferencias intra-tumorales. Expresión de PEX en el centro vs la periferia en gliomas vs metástasis y en gliomas de alto grado vs de bajo grado



		Media	Mediana	Rango
Todos los casos	Centro	0.75	0.67	(0.12-2.39)
	Perifería	0.53	0.35	(0.03-2.17)
Gliomas	Centro	0.82	0.74	(0.12-2.39)
	Perifería	0.51	0.35	(0.06-2.10)
Metástasis	Centro	0.35	0.32	(0.15-0.64)
	Perifería	0.65	0.21	(0.03-2.17)
Tumores astrocitarios	Centro	0.88	0.76	(0.12-2.39)
	Perifería	0.59	0.38	(0.06-2.10)
Tumores oligodendrogiales	Centro	0.67	0.72	(0.13-1.38)
	Perifería	0.33	0.32	(0.08-0.76)
Alto grado	Centro	0.91	0.77	(0.12-2.39)
	Perifería	0.52	0.36	(0.06-2.10)
Bajo grado	Centro	0.48	0.41	(0.13-0.80)
	Perifería	0.47	0.21	(0.08-1.10)

Tabla 4: Expresión de PEX mediante RT-PCR en tiempo real

mas. Este hecho, que podría resultar paradójico, es justificado por los autores, quienes afirman que a pesar de mostrar una mayor expresión de PEX, los gliomas de alto grado son altamente invasivos y angiogénicos porque en ellos los factores inhibidores como PEX se ven superados por otras moléculas con efecto contrario<sup>19</sup>.

La existencia, en el seno de los gliomas, de heterogeneidad molecular entre áreas que muestran características histológicas distintas, es un hecho bien conocido y reportado en la literatura. Además, el hecho de que incluso áreas del mismo tumor con idéntica histología puedan presentar cierta heterogeneidad molecular, es un hecho también demostrado<sup>20</sup>. Así, algunos grupos de investigación han demostrado la existencia de heterogeneidad en el grado de metilación del promotor de MGMT entre distintas áreas del mismo glioma, incluso en ausencia de diferencias morfológicas obvias entre las mismas<sup>21-23</sup>. Mutaciones diferentes de p53 en distintas áreas de un mismo tumor han sido también descritas<sup>24</sup>. Del mismo modo, la expresión de VEGF, integrina  $\alpha_5$ , vitronectina y tensacina parecen incrementar desde la periferia hacia el centro tumoral<sup>5</sup>. Este es, hasta la fecha, el primer estudio que demuestra la existencia de heterogeneidad intra-tumoral en la expresión de PEX determinada mediante RT-PCR en tiempo real. Esta heterogeneidad no es atribuible a diferencias histológicas entre las distintas áreas del tumor analizadas ya que en todos los casos se realizó en examen

detallado del tejido descartándose diferencias significativas en lo concerniente a aspectos morfológicos, densidad celular, presencia de necrosis y extensión de la misma, proliferación vascular etc.

De entre los procesos biológicos que parecen estar incrementados en el centro de los GBM, van Meter et al.<sup>2</sup> describen aquellos relacionados con la agresividad tumoral como la sobreexpresión de metaloproteinasas. Al ser PEX un fragmento derivado de la autocatalisis de la MMP-2, la mayor expresión PEX en el centro de estos tumores podría ser en realidad secundaria a la de sobreexpresión MMP-2 en ellos.

La heterogeneidad intratumoral ha sido clasificada por algunos autores en heterogeneidad “región-independiente” (si está presente en todas las áreas del tumor) que aparece durante el desarrollo del tumor, y heterogeneidad “región-dependiente” (como la hallada en la expresión de PEX), que parece originarse como resultado de la progresión del tumor<sup>25</sup>. Así mismo, se ha señalado la importancia del microambiente tumoral en la expresión genética del mismo, y en los cambios que en ella puedan acontecer. En este sentido, mientras que las células tumorales situadas en el centro de la lesión se encuentran densamente hacinadas y por ser altamente proliferativas pueden experimentar una hipoxia considerable, las células de la periferia del tumor interactúan en mayor medida con la matriz extracelular y con otras células del parénquima cerebral circundante que invaden<sup>3</sup>.

Estas observaciones refuerzan la teoría de que en los gliomas áreas diferentes del tumor puedan desarrollarse de manera independiente, en contra del concepto clásicamente aceptado del origen monoclonal de estas neoplasias<sup>24</sup>. Es más, estas diferencias moleculares podrían explicar, al menos en parte, por qué no todas las células de un glioma respondan del mismo modo a la terapias convencionales. Un mejor conocimiento de la heterogeneidad tumoral facilitará el diseño de nuevas estrategias terapéuticas. Además, los resultados del presente trabajo, muestran la necesidad de una planificación cuidadosa y una selección adecuada de la diana quirúrgica en las biopsias tumorales, siendo en ocasiones necesario el análisis de más de una muestra proveniente de distintas áreas del tumor<sup>21</sup>. Son necesarios más estudios para clarificar el significado real de estos hallazgos y su posible relevancia en la práctica clínica diaria.

## Bibliografía

- 1 Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, Van Meir EG. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1046-69.
- 2 Van MT, Dumur C, Hafez N, Garrett C, Fillmore H, Broaddus WC. Microarray analysis of MRI-defined tissue samples in glioblastoma reveals differences in regional expression of therapeutic targets. *Diagn Mol Pathol* 2006;15:195-205.
- 3 Hoelzinger DB, Mariani L, Weis J, et al. Gene expression profile of glioblastoma multiforme invasive phenotype points to new therapeutic targets. *Neoplasia* 2005;7:7-16.
- 4 Bello L, Lucini V, Carrabba G, et al. Simultaneous inhibition of glioma angiogenesis, cell proliferation, and invasion by a naturally occurring fragment of human metalloproteinase-2. *Cancer Res* 2001;61:8730-6.
- 5 Bello L, Francolini M, Marthyn P, et al. Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in glioma periphery. *Neurosurgery* 2001;49:380-9.
- 6 Park CK, Jung JH, Park SH, Jung HW, Cho BK. Multifarious proteomic signatures and regional heterogeneity in glioblastomas. *J Neurooncol* 2009;94:31-9.
- 7 D'Abaco GM, Kaye AH. Integrins: molecular determinants of glioma invasion. *J Clin Neurosci* 2007;14:1041-8.
- 8 Deryugina EI, Bourdon MA, Luo GX, Reisfeld RA, Strongin A. Matrix metalloproteinase-2 activation modulates glioma cell migration. *J Cell Sci* 1997;110 ( Pt 19):2473-82.
- 9 Kim SK, Cargioli TG, Machluf M, et al. PEX-producing human neural stem cells inhibit tumor growth in a mouse glioma model. *Clin Cancer Res* 2005;11:5965-70.
- 10 Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL, Friedlander M, Cheresch DA. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* 1998;92:391-400.
- 11 Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, et al. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 1996;85:683-93.
- 12 Benny O, Duvshani-Eshet M, Cargioli T, et al. Continuous delivery of endogenous inhibitors from poly(lactic-co-glycolic acid) polymeric microspheres inhibits glioma tumor growth. *Clin Cancer Res* 2005;11:768-76.
- 13 Santandreu FM, Brell M, Gene AH, et al. Differences in mitochondrial function and antioxidant systems between regions of human glioma. *Cell Physiol Biochem* 2008;22:757-68.
- 14 The WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. 4th edn. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2007.
- 15 Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* 2005;21:62.
- 16 Tchirkov A, Rolhion C, Kemeny JL, et al. Clinical implications of quantitative real-time RT-PCR analysis of hTERT gene expression in human gliomas. *Br J Cancer* 2003;88:516-20.
- 17 Valente V, Teixeira SA, Neder L, et al. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Molecular Biology* 2009;10:17.
- 18 Pluderi M, Lucini V, Caronzolo D, et al. Long-term inhibition of glioma growth by systemic administration of human PEX. *J Neurosurg Sci* 2003;47:69-78.
- 19 Tate MC, Aghi MK. Biology of angiogenesis and invasion in glioma. *Neurotherapeutics* 2009;6:447-57.
- 20 Walker C, du Plessis DG, Joyce KA, et al. Phenotype versus genotype in gliomas displaying inter- or intratumoral histological heterogeneity. *Clin Cancer Res* 2003;9:4841-51.
- 21 Dunn J, Baborie A, Alam F, et al. Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *Br J Cancer* 2009;101:124-31.
- 22 Jullierat-Jeanerret L, Chapuis Bernasconi C, Bricod C, et al. Heterogeneity of human glioblastoma: glutathione-S-transferase and methylguanine-methyltransferase. *Cancer Invest* 2008;26:597-609.
- 23 Parkinson JF, Wheeler HR, Clarkson A, et al. Variation of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) promoter methylation in serial samples of glioblastoma. *J Neurooncol* 2008;87:71-8.
- 24 Ren ZP, Olofsson T, Qu M, et al. Molecular genetic analysis of p53 intratumoral heterogeneity in human astrocytic brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66:944-54.
- 25 Harada K, Nishizaki T, Ozaki S, Kubota H, Ito H, Sasaki K. Intratumoral cytogenetic heterogeneity detected by comparative genomic hybridization and laser scanning cytometry in human gliomas. *Cancer Res* 1998;58:4694-700.

## Homocistinuria y Acidemia Metilmalónica (CbIC) de evolución fatal en un recién nacido: a propósito de un caso

M<sup>o</sup> A. Ruiz<sup>1</sup>, S. Vetter<sup>1</sup>, J.C. de Carlos<sup>1</sup>, H. Corral<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> A. Torres<sup>1</sup>,

M<sup>o</sup> A. Vilaseca<sup>2</sup>, J. García<sup>3</sup>, A. Ribes<sup>3</sup>

1- Hospital Universitario Son Dureta. Palma de Mallorca

2- Hospital San Joan de Deu. Barcelona

3- IBC. Sección de Errores Congénitos del Metabolismo

Servicio de Bioquímica y Genética Molecular. Hospital Clínico. Barcelona

### Resumen

La forma CbIC de la Acidemia Metilmalónica (AMMC CbIC) es un error congénito del metabolismo intracelular de la cobalamina. Los síntomas clínicos consisten en descompensación neurológica y síntomas sistémicos. Describimos la evolución clínica y bioquímica en una paciente con inicio neonatal del defecto CbIC. Recién nacido a término, mujer, con peso al nacer de 2290 g. A los pocos días de vida presentó hipotonía, hipoactividad y succión dificultosa. A los 13 días de vida se ingresó en UCIN presentando letargia, hipotonía, hipotermia y signos de afectación neurológica de tronco encefálico, además hiperlactacidemia y alteraciones del recuento celular. La RNM junto con los síntomas clínicos nos surgieron una patología mitocondrial. Los ácidos orgánicos mostraron un importante aumento del ácido metilmalónico con homocistinemia y homocistinuria, sospechándose un defecto del metabolismo de la cobalamina que se comprobó *in vitro*.

En el estudio mutacional se confirmó el diagnóstico de AMM CbIC. A pesar de una buena respuesta bioquímica al tratamiento con cobalamina la paciente mantuvo un deterioro neurológico progresivo con éxitus a los 2 meses de vida.

Se concluye que la AMMC, variante CbIC, se puede presentar con retraso en el desarrollo, lactacidemia y alteración en los parámetros hematológicos. A pesar de la normalización de los parámetros bioquímicos presentó una progresión de la enfermedad que la condujo al éxitus. Se especula la posibilidad de que existan otros factores fisiopatológicos que influyen en una mala evolución.

*Palabras clave:* Aciduria metilmalónica, Homocistinuria, Metabolismo de la cobalamina, Hiperlactacidemia

### Abstract

The CbIC form of methylmalonic acidemia with homocistinuria (MMA CbIC) is a rare condition which results from impaired biosynthesis of methylcobalamin and adenosylcobalamin. The clinical phenotype implies neurological decompensation and systemic symptoms. We describe the clinical course and biochemical evolution of a girl with neonatal onset of the CbIC variant.

The female patient was delivered at term and weighed 2290 gr. The mother noticed hypotonia, hypoactivity and lack of sucking from very early on. At the 13 th day of life the patient was admitted to our hospital at the NICU. Lethargy, hypotonia, hypothermia, central ataxic breathing were the main symptoms. Initial blood profile pointed moderate hyperlactacidemia and alterations of blood cell count. RMN and the clinical profile suggested a mitochondrial disease. The metabolic profile, showed methylmalonic aciduria, with homocystinemia and homocystinuria suggesting a intracellular defect of cobalamin metabolism. The diagnosis of a MMA CbIC variant was confirmed by the propionate test *in vitro* and the genetic study. After treatment with cobalamin, levels of methylmalonic acid and homocysteine normalized, but the patient suffered progressive neurological deterioration with secondary multiorgan failure and death at two months of age.

We conclude that Methylmalonic Aciduria with combined homocystinuria, CbIC variant, may present with developmental delay, minor dysmorphology, moderate hyperlactacidemia and alteration of hematologic parameters. In spite of a normalization of biochemical parameters the disease led to a fatal outcome. We therefore think that in presence of a dysfunction of intracellular cobalamin, other physiological alterations leading to a fatal evolution might be possible.

*Keywords:* methylmalonic aciduria, homocystinuria, cobalamin metabolism, hyperlactacidemia

## Introducción

En términos generales las acidemias metilmalónicas (AMMs) son un grupo de enfermedades de herencia autosómica recesiva debidas a una disfunción de la actividad de la enzima de matriz mitocondrial Metilmalonil-CoA-Mutasa, que cataliza la isomerización de L-metilmalonil-CoA a Succinil-CoA en la degradación del propionato precisando como cofactor esencial la Adenosilcobalamina.

La acidemia metilmalónica puede ser debida a varias etiologías: deficiencia de la enzima Metilmalonil-CoA- Mutasa (mut), defectos en el metabolismo de la vitamina B12 o cobalamina (Cbl) (Fenotipo B12 sensible) CblA, CblB, CblC, CblD, CblF, deficiencia de Metilmalonil-CoA racemasa, deficiencia de transcobalamina II, enfermedad hereditaria del transporte de la cobalamina y deficiencia de succinil-CoA sintetasa asociada a depleción de DNA mitocondrial (SUCLA2 y SUCLAG1) 1-3.

La Acidemia Metilmalónica con Homocistinuria (AMMH) es una patología poco frecuente que resulta de un defecto intracelular del metabolismo de la Cbl, de herencia autosómica recesiva y con una incidencia que oscila entre 1/57 000 y 1/200 000 4,5. El defecto intracelular mencionado afecta la biosíntesis de metilcobalamina (MetCbl) y adenosilcobalamina (AdoCbl). La MeCbl es el cofactor requerido por la enzima mitocondrial Metilmalonil-CoA mutasa (Figura 1). La consecuencia de este defecto implica la deficiencia funcional de las enzimas metil-malonil-CoA mutasa y metionina sintetasa, produciéndose una aciduria metilmalónica con homocistinuria 3, 4, 6. La variante CblC (MIM 277400), junto con las variantes CblF y CblD son debidas a defectos primarios en el procesamiento de la Cbl intracelular y los tres pueden provocar una AMMH 2. Los trastornos de la Cbl pueden alterar además, la función mitocondrial 7-12.

Según Rosenblatt et al 6 los pacientes con la variante CblC están más severamente afectados que los pacientes con las variantes CblF y CblD. En la variante CblC se pueden distinguir dos formas clínicas según la edad de presentación de la enfermedad: a) Cuando los síntomas clínicos aparecen durante el primer año de vida, los pacientes presentan una enfermedad multisistémica con signos neurológicos severos, fallo de medro, retraso en el desarrollo y con manifestaciones hematológicas (macrocitosis y anemia megaloblástica), renales y gastrointestinales. B)

Cuando la presentación de los síntomas es más tardía los pacientes muestran un fenotipo más leve con regresión neurológica moderada y trastornos del comportamiento. El tratamiento requiere una combinación de las terapias para las deficiencias individuales de las coenzimas: dosis farmacológicas de hidroxicobalamina (1mg/día) posiblemente en combinación con antibióticos orales y suplementos de betaina, junto con una dieta hipoprotéica 13-14.

El diagnostico de estas entidades, se realiza mediante determinación de ácidos orgánicos en orina. Suelen estar presentes grandes cantidades de acido metilmalónico, junto con menores proporciones de los ácidos metilcitríco, 3-hidroxi-propiónico. En la determinación de aminoácidos en plasma suelen destacar niveles elevados de glicina y en las formas CblC, CblD y CblF se observa además una elevada concentración de homocisteína en plasma y orina e hipometioninemia.

Los niveles de cobalamina son normales y no se suele observar una anemia megaloblástica salvo en las formas CblC y CblD.

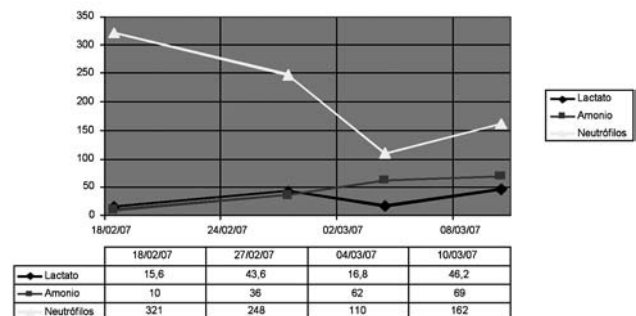


Tabla 1: Evolución de los valores de lactato (mg/dl) VN 5,7 -22 mg/dl, Amonio (mcg/dl), VN 15-45 mcg/dl y Neutrófilos (/ $\mu$ l), VN > 1500/  $\mu$ .

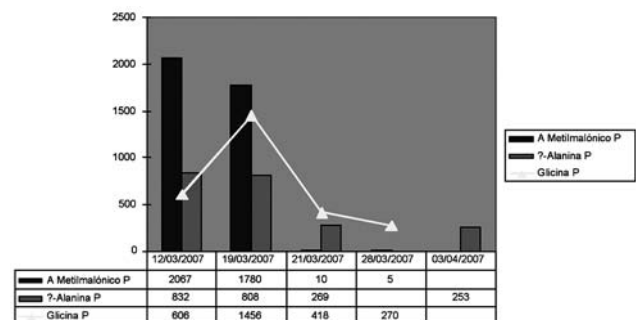


Tabla 2: Evolución de los valores de A. Metilmalónico, valores normales (VN): 0,08-0,56  $\mu$ mol/l, Alanina 240-400  $\mu$ mol/l y Glicina VN: 180-230  $\mu$ mol/l, en plasma

**Aspectos clínicos**

Neonato, primer hijo sano de padres no consanguíneos nacido en Mallorca. El parto fue eutócico a las 40 semanas de gestación: RN de peso bajo para la edad gestacional, CIR armónico (PRN 2290 g p < 10, talla 46.5 cm p < 10, PC 32 cm p < 10). Ingresó los primeros 4 días por rechazo de tomas y se alimentó por SNG. Desde entonces mal comedor, tomas de lactancia materna en biberón de 132 ml/kg/día.

A los 13 días de vida ingresó en la UCIN de nuestro centro con hipotermia (temperatura rectal de 33,5 °C), letargia con hipo-actividad progresiva importante, signos de afectación neurológica de tronco encefálico, episodios de apnea, ausencia de reflejos neonatales (succión, deglución), hipotonía axial y proximal y movimientos oculares y rechazo de tomas en las últimas 72 horas. El resto de la exploración clínica fue normal excepto hepatomegalia de 4 cm, homogénea. Presentó valores normales de hematíes 4,8/ µl, Hb 16,7 g/dl, Hto 47,9%, VCM 99, Plaquetopenia 58.13/µl, leucopenia 1.94 3/µl con neutropenia 5,7% (100), lactacidemia moderada de 47 mg/dl (tabla 1) con Amonio normal. PH venoso, glucemia, PCR, urea, creatinina, iones, bilirrubina normales. CPK 134 UI/L, GOT 22 U/L, cuerpos cetónicos en orina negativos. Lactato en LCR 24 mgr/dl (VN 10-22 mgr/dl).

Los estudios metabólicos en plasma mostraron disminución de metionina y aumento de homocisteína mientras que en orina se detectaron niveles muy elevados de ácido metilmalónico y homocisteína.

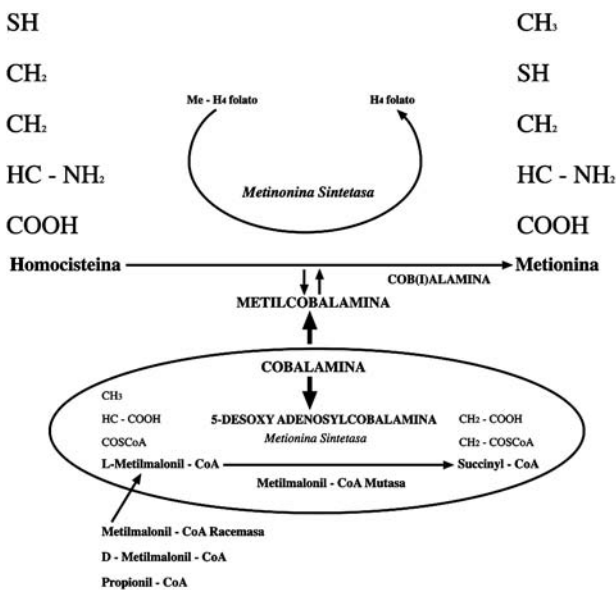


Figura 1: El metabolismo celular por el cual se transforma la vitamina B 12 en coenzima

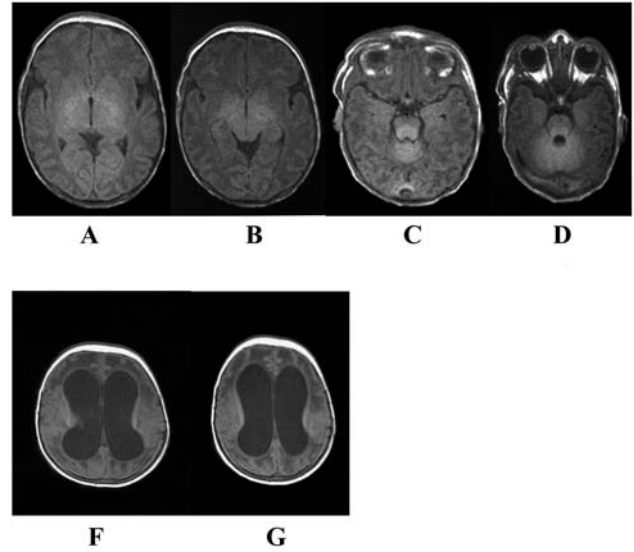


Figura 2: Imagenes de RNM a los 18 días de vida (A-D) y a los 53 días de vida (E-F)

Además se observó un aumento de propionilcarnitina con disminución de carnitina libre. En la RM craneal se observó una hiperintensidad en ganglios acueductales y basales. El estudio de incorporación de <sup>14</sup>C propionato en fibroblastos mostró una deficiente fijación de propionato a proteínas lo que indicó una interrupción de esta vía metabólica. Su posterior corrección con medio enriquecido con hidroxicobalamina demostró una buena respuesta *in vitro* a esta vitamina. El estudio molecular del gen MMACHC reveló la mutación c271dupA en homocigosis que es la mutación prevalente en la forma CbIC <sup>15</sup>.

A las 3 semanas de vida tras los resultados de las pruebas metabólicas se inició tratamiento con hidroxicobalamina (1 mgr/12 horas), además carnitina (100 mgr/Kg/día), betaína (3 gr/día) y dieta hipercalórica con restricción proteica, manteniendo aportes de valina 65 mgr/Kg, metionina 85 mgr/dl e isoleucina 70 mgr/kg y diuresis forzada con furosemda. El control de ácidos orgánicos a los cinco días mostró un importante descenso de la excreción de ácido metilmalónico hasta 10 mmol/mol de creatinina y normalización de los niveles de homocisteína (Tabla 2-3).

A pesar de la buena respuesta bioquímica al tratamiento la evolución clínica neurológica fue desfavorable con progresión a una importante encefalomalacia en la neuroimagen (Figura 2). Éxitus a los 2 meses por fallo multiorgánico.

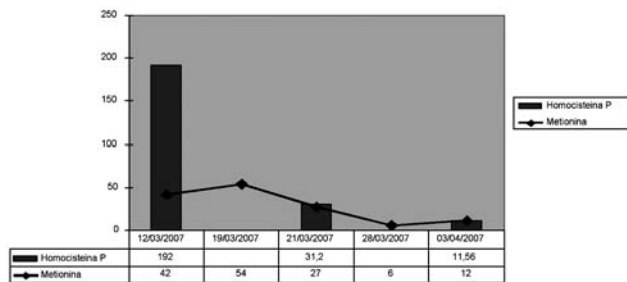


Tabla 3: Evolución de los valores de Homocisteína VN: 0-3,7  $\mu\text{mol/l}$ , y Metionina VN: 13,3- 26,8  $\mu\text{mol/l}$  en sangre. Se observa un marcado descenso después de haber iniciado el tratamiento con Cobalamina.

## Discusión

El diagnóstico precoz en la AMM-CbIC es difícil sin antecedentes familiares. La AMMH de presentación neonatal, a pesar de tener respuesta bioquímica positiva, puede presentar una evolución clínica desfavorable, como en nuestro caso <sup>6, 16, 17</sup>. En el paciente descrito destacó la marcada hipoactividad con hipotermia y las anormalidades hematológicas como leucopenia y trombopenia <sup>4</sup>. La clínica neurológica junto con los parámetros iniciales y la neuroimagen con afectación de los núcleos de la base, periacuaeductal y protuberancia, hicieron sospechar también un posible trastorno en el metabolismo energético mitocondrial. Los resultados bioquímicos, con aumento de homocisteína y ácido metilmalónico en orina dirigieron el diagnóstico hacia una AMM-CbIC, instaurándose tratamiento con hidroxocobalamina y restricción proteica. A pesar de obtener una respuesta bioquímica con descenso de la homocisteína y ácido metilmalónico a niveles no tóxicos, no hubo mejoría clínica, persistiendo un fallo multiorgánico y éxitus del paciente <sup>16, 18, 19, 20</sup>. Probablemente existen otros mecanismos patogénicos en esta enfermedad metabólica, aún desconocidos (actuación de la hidroxocobalamina como chaperona de la Metilmalonil-CoA mutasa) dependientes de la mutación específica, pudiendo estar relacionados además con defectos secundarios del metabolismo energético mitocondrial. Se ha descrito que hay un aumento de especies de oxígeno reactivas (reactive oxygen species=ROS) y apoptosis en los fibroblastos de pacientes con defecto de CbIC, lo que podría explicar la severa neuropatología de estos pacientes y quizás un tratamiento con antioxidantes podría ser importante en esta entidad <sup>15</sup>.

Concluyendo la AMMH-CbIC se puede presentar con clínica de afectación neurológica precoz, siendo los parámetros hematológicos y la hiperlactacidemia moderada únicos parámetros iniciales en el estudio metabólico. Nos preguntamos si el inicio precoz del tratamiento con el cofactor (hidroxocobalamina) podría haber evitado la progresión fisiopatológica o, por el contrario, existen otros mecanismos ya establecidos previamente (p.e. el defecto energético mitocondrial y/o otras alteraciones de remetilación en presencia de una disfunción de la reducción de la cobalamina citosólica) que impidieron una evolución clínica favorable.

## Bibliografía

1. Yano S, Li L, Le TP, Moseley K, Guadalia A, Lee J, Gonzalez I, Boles RG. Infantile mitochondrial DNA depletion syndrome associated with methylmalonic aciduria and 3-methylcrotonyl-CoA and propionyl-CoA carboxylase deficiencies in two unrelated patients: A new phenotype of mt DNA depletion syndrome. *J. Inherited Metab. Dis.* 2003; 26(5): 481-8.
2. Fowler B, Leonard JV, Baumgartner MR. Causes of and diagnostic approach to methylmalonic acidurias. *J Inherit Metab Dis* 2008; 31:350-360
3. Carrozo R, Dionisi-Vici, Steuerwald U, Luciola S, Federica Deodato, Di Giandomenico S, Bertini E, Franke B, Kluijtmans LAJ, Chiara Meschini MC, Rizzo C, Piemonte et al. SUCLA2 mutations are associated with methylmalonic aciduria, Leigh-like encephalomyopathy, dystonia and deafness. *Brain* 2007;130: 862-874.
4. Fenton, WA., Gravel, RA. And Rosenblatt, DS. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. En: Scriver CR, ed. *The Metabolic and molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 2001; 2165-2193.
5. Coulombe JT, Shih VE, Leyy HL. Massachusetts metabolic disorders screening program. II. Methylmalonic aciduria. *Pediatrics* 1981;67: 26.
6. Rosenblatt DS, Aspler AL, Shevell MI, Pletcher BA, Fenton WA, Seashore MR. Clinical heterogeneity and prognosis in combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (cbIC). *J Inherit Metab Dis* 1997; 20: 528-538.
7. Cantatore P, Petruzella V, Nicoletti C, Papadia F, Fracasso F, Rustin P, Gadaleta M.N. Alteration of mitochondrial DNA and RNA level in human fibroblasts with impaired vitamin B12 coenzyme synthesis. *FEBS Letters* 1998; 432: 173-178.

8. Okun J.G., Hörster F., Farkas L.M., Feyh P., Hinz A., Samuer S., Hoffmann G.F., Unsicker K., Mayatepek E., Kölker S. Neurodegeneration in methylmalonic Aciduria Involves Inhibition of Complex II and the tricarboxylic Acid Cycle, and Synergistically Acting Excitotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry* 2002 ; Vol. 277; No 17: 4674-14680.
9. Stumpf, D, McAfee JK, Parks JK, Eguren LA. Propionate inhibition of succinate:CoA ligase (GDP) and the citric acid cycle in mitochondria. *Pediatr. Res* 1980; 14: 1127-1131.
10. Nakai, A, Shigmimatsu Y, Saito M, Nikawa Y and Sudo M. Alteration of mitochondrial DNA and RNA level in human fibroblasts with impaired vitamin B12 coenzyme synthesis. *Pediatr. Res.* 1991; 30: 5–10.
11. Di Lisa, F Menabo R, Barbato R and Siliparndi N. Contrasting effects of propionate and propionyl-L-carnitine on energy-linked processes in ischemic hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1994; 267: H455-H46.
12. Toyhoshima S, Watanabe F, Saido I, Miyatake K, Nakano Y. Alteration of mitochondrial DNA and RNA level in human fibroblasts with impaired vitamin B12 coenzyme synthesis. *J. Nutr.* 1995; 125: 2846–2850.
13. Thompson GN, Chlamars RA, Walter JH, et al. The use of metronidazole in mamangemente of methylmalonic and propionic acidaemias. *Eur. J. Pediatr.* 1990; 149: 792.
14. Kolezko B, Bachmann C, Wender U. Antibiotic therapy for improvmene of metabolic control in methylmalonic aciduria. *J Pediatr* 1990; 117: 99
15. Richard E, Jorge-Finnegan A, Garcia Villoria J, Merinero B, Desviat LR, Gort L, Briones P, Leal F, Pérez-Cerdá C, Ribes A, Ugarte M, Pérez B: MMACHC Working Group. Genetic and cellular Studies of oxidative steress in methylmalonic aciduria (MMA) cobalamina deficiency type C (CbIC) with homocystinuria (MMACHC). *Hum Mutat* 2009 11: 1558-1566.
16. Nicolaides P, Leonard J, Surtees R. Neurological outcome of methylmalonic acidaemia. *Arch Dis Child* 1998; 78: 508-512.
17. Van der Meer SB, Poggi F, Spada M, Bonnefont JP, Ogier H, Hupert P et al. Clinical outcome of long-term management of patients with vitamin B12-unresponsive methylmalonic acidemia. *J Pediatr* 1994; 125: 903-908.
18. Ogier de Baulyn H, Gerard M, Saudubray JM, Zitton J. Remethylation defect: Guidelines for clinical diagnosis ant treatment. *Eur J Pediatr* 1998; 157 (Suppl 2): 77-83.
19. Montero Brens C, Dalmau Serra J, Cabello Tomas MI, Garcia Gómez AM, Rodes Monegal M, Vilaseca Busca A. Homocistinuria: eficacia del tratamiento con piridoxina, acido fólico y betaina. *An Esp Pediatr* 1993; 39: 37-41.
20. Urban Artero A, Aldana Gomez JA, Reig del Moral C, Nieto Conde C, Merinero Cortes B: aciduria metilmalónica con homocistinuria de inicio neonatal: mejoría bioquímica y clínica con betaina. *An Esp Pediatr* 2002; 56: 337-341.