

**ASOCIACIÓN ENTRE HOMOCISTEINA Y OTROS FACTORES DE
RIESGO CON LOS POLIMORFISMOS 699 C/T, 1080 C/T, 844 INSERCIÓN
DE 68pb DE LA CISTATIONINA β –SINTASA Y 677 C/T DE LA
METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA
EN PACIENTES CON TROMBOSIS VENOSA
PROFUNDA Y SUPERFICIAL**

CLAUDIA PATRICIA AYALA JIMÉNEZ

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTA, D.C
JULIO DE 2008**

**ASOCIACIÓN ENTRE HOMOCISTEINA Y OTROS FACTORES DE
RIESGO CON LOS POLIMORFISMOS 699 C/T, 1080 C/T, 844 INSERCIÓN
DE 68pb DE LA CISTATIONINA β –SINTASA Y 677 C/T DE LA
METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA
EN PACIENTES CON TROMBOSIS VENOSA
PROFUNDA Y SUPERFICIAL**

CLAUDIA PATRICIA AYALA JIMÉNEZ

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

Para optar al título de

BACTERIÓLOGA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BACTERIOLOGIA

BOGOTA D.C

JULIO DE 2008

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución. 13 de Julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

**ASOCIACIÓN ENTRE HOMOCISTEINA Y OTROS FACTORES DE
RIESGO CON LOS POLIMORFISMOS 699 C/T, 1080 C/T, 844 INSERCIÓN
DE 68pb DE LA CISTATIONINA β –SINTASA Y 677 C/T DE LA
METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA
EN PACIENTES CON TROMBOSIS VENOSA
PROFUNDA Y SUPERFICIAL**

CLAUDIA PATRICIA AYALA JIMÉNEZ

APROBADO

Dra. Marta Bermúdez, Biol. PhD
DIRECTORA

Dra. Victoria Villegas, Biol. Msc.
JURADO

Dra. Marleny Salazar, Biol.
JURADO

**ASOCIACIÓN ENTRE HOMOCISTEINA Y OTROS FACTORES DE
RIESGO CON LOS POLIMORFISMOS 699 C/T, 1080 C/T, 844 INSERCIÓN
DE 68pb DE LA CISTATIONINA β –SINTASA Y 677 C/T DE LA
METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA
EN PACIENTES CON TROMBOSIS VENOSA
PROFUNDA Y SUPERFICIAL**

CLAUDIA PATRICIA AYALA JIMÉNEZ

APROBADO

Dra. Ingrid Schuler, Biol. PhD
DECANA ACADEMICA

Dra. Luz Amparo Maldonado, Bact.
DIRECTORA DE CARRERA

Este trabajo lo dedico a mis papas y hermana quienes durante cinco largos años vivieron día a día y paso a paso todos aquellos esfuerzos, sacrificios, tristezas y alegrías que me fueron formando poco a poco como persona y como profesional. . . y después de tanto esfuerzo aquí está el fruto de todo ello, Gracias a ustedes por ser ese apoyo incondicional y esa mano amiga que nunca me dejó desfallecer.

Claudia Patricia Ayala Jiménez

Agradecimientos

A Dios por se esa luz que nunca me dejo desfallecer en los momentos mas duros de mi carrera.

A papá y mamá por darme la oportunidad de estudiar y formarme como una excelente profesional.

A la Pontificia Universidad Javeriana por permitirme hacer parte de ellos y formarme como una profesional javeriana.

A la los docentes de la carrera de bacteriología por brindar todas las herramientas necesarias para desempeñarnos como excelentes profesionales.

Al Instituto de Genética Humana, por abrir sus puertas a nosotros futuros investigadores y por haberme permitido realizar mi trabajo de grado en sus instalaciones.

A la Dra. Marta Bermúdez, por abrirme las puertas a un nuevo mundo, por sus enseñanzas y por haberme dado la oportunidad de hacer parte de su equipo de trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS

CONTENIDO	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	3
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 ANTECEDENTES DE LA TROMBOSIS	5
2.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA HEMOSTASIA	6
2.3 TROMBOSIS ARTERIAL Y VENOSA	16
2.4 FISIOPATOLOGÍA DE LA TROMBOSIS	19
2.5 TROMBOSIS VENOSA PROFUNDA Y SUPERFICIAL	24
2.6 SÍNTOMAS Y SIGNOS DE LA TROMBOSIS VENOSA PROFUNDA Y SUPERFICIAL	26
2.7 FACTORES DE RIESGO DE LA TROMBOSIS VENOSA PROFUNDA Y SUPERFICIAL	27
2.7.1 HOMOCISTEINA	29
2.7.1.2 METABOLISMO DE LA HOMOCISTEINA	31
2.7.1.3 HIPERHOMOCISTEINEMIA	33

2.7.1.4 GENÉTICA DE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA	35
2.7.1.5 GENETICA, HIPERHOMOCISTEINEMIA Y SU ASOCIACION CON ENFERMEDAD VASCULAR	37
2.7.1.6 MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA ACCION PERJUDICIAL DE LA HOMOCISTEINA	45
2.7.2 ENFERMEDAD VASCULAR, HOMOCISTEINA Y DIABETES	48
2.7.3 ENFERMEDAD VASCULAR, HOMOCISTEINA E HIPERLIPIDEMIAS	54
2.7.4 ENFERMEDAD VASCULAR, HOMOCISTEINA Y HORMONAS	56
3. FORMULACION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION	60
3.1 FORMULACION DEL PROBLEMA	60
3.3 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACION	61
4. OBJETIVOS	62
4.1 OBJETIVO GENERAL	62
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
5. MATERIALES Y MÉTODOS	64

5.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	64
5.1.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO	64
5.1.2 VARIABLES DEL ESTUDIO	65
5.2 MÉTODOS	67
5.2.1 Cuantificación de homocisteina Total plasmática	68
5.2.2 Determinación cuantitativa de colesterol total	69
5.2.3 Determinación cuantitativa de triglicéridos	69
5.2.4 Determinación cuantitativa de colesterol HDL	70
5.2.5 Determinación cuantitativa de glucosa	70
5.2.6 Extracción de DNA geonómico	71
5.2.7 Amplificación del DNA	71
5.2.8 Digestión enzimática de productos amplificados	72
5.3 RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN	73
5.4 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN	74
6. RESULTADOS	75
6.1 Descripción de resultados bioquímicos	75
6.2 Descripción de resultados moleculares	90
7. DISCUSION	101
8. CONCLUSIONES	104

9. RECOMENDACIONES	105
10. REFERENCIAS	106
11. ANEXOS	114
11.1 Extracción de DNA geonómico (Método de Probé)	114
11.2 Protocolo PCR (Exón 1) polimorfismo 677 C/T de la MTHFR	116
11.3 Protocolo PCR (Exón 6) polimorfismo 699 C/T de la CBS	117
11.4 Protocolo PCR (Exón 10) polimorfismo 1080 C/T de la CBS	118
11.5 Protocolo PCR (Exón 8) 844 Ins de 68 pb de la CBS	119
11.6 Protocolo Enzima de restricción <i>Taq I</i>	120
11.7 Protocolo Enzima de restricción <i>RsaI</i>	121
11.8 Protocolo Enzima de restricción <i>BstU I</i>	122
11.9 Protocolo preparación geles de poliacrilamida	123
11.10 Protocolo Coloración de plata	124
11.11 Consentimiento Informado	125
11.12 Encuesta	133

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Principales mecanismos de la hemostasia primaria.....	8
Figura 2. Generación de tromboxano A ₂ en las plaquetas y de prostaciclina (PGI ₂) en las células endoteliales.....	10
Figura 3. Principales reacciones de la coagulación.....	13
Figura 4. Representación esquemática de la vía fibrinolítica.....	14
Figura 5. Triada de virchow en la trombosis.....	22
Figura 6. Formula estructural de la homocisteina y homocistina.....	30
Figura 7. Formas de homcisteina en sangre.....	31
Figura 8. Metabolismo de la homocisteina.....	33
Figura 9. Metabolismo de la homocisteina y posibles mecanismos de la enfermedad aterotrombotica.....	47
Figura 10. Mecanismos patogénicos involucrados en la iniciación de la aterosclerosis.....	50
Figura11. Mecanismos de aterogenesis y trombotogenesis.....	51

Figura 12. Efectos vasculares de la homocisteína.....	53
Figura 13. Esquema de metodología.....	67
Figura 14. Población de estudio.....	75
Figura 15. Población casos y controles.....	76
Figura 16. Promedios perfil lipídico, glucosa y homocisteína grupo de casos y controles.....	78
Figura 17. Comparación del grado de variación entre el perfil lipídico, glucosa y homocisteína grupo de casos y controles.....	79
Figura 18. Trombosis venosa vs colesterol total y género.....	80
Figura 19. Trombosis venosa vs colesterol total y edad.....	80
Figura 20. Trombosis venosa vs triglicéridos y género.....	81
Figura 21. Trombosis venosa vs triglicéridos y edad.....	81
Figura 22. Trombosis venosa vs colesterol HDL y género.....	82
Figura 23. Trombosis venosa vs Colesterol HDL y edad.....	83
Figura 24. Trombosis venosa vs colesterol LDL y género.....	83

Figura 25. Trombosis venosa vs colesterol LDL y edad.....	84
Figura 26. Trombosis venosa vs glucosa y genero.....	85
Figura 27. Trombosis venosa vs glucosa y edad.....	85
Figura 28. Trombosis venosa vs sobrepeso y genero.....	86
Figura 29. Trombosis venosa vs sobrepeso y edad.....	87
Figura 30. Trombosis venosa vs tabaquismo y genero.....	87
Figura 31. Trombosis venosa vs tabaquismo y edad.....	88
Figura 32. Trombosis venosa vs uso de anticonceptivos.....	89
Figura 33. Amplificación y corte del segmento correspondiente al polimorfismo 677 C/T (Exón 4) de la MTHFR.....	90
Figura 34. Amplificación y corte del segmento correspondiente al polimorfismo 699 C/T (Exón 6) de la CBS.....	90
Figura 35. Amplificación y corte del segmento correspondiente al polimorfismo 1080 C/T (Exón 10) de la CBS.....	91
Figura 36. Amplificion correspondiente al polimorfismo 844 Ins 68 pb (Exón 8) de la CBS.....	91

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Mecanismos potenciales por los cuales se puede facilitar el desarrollo de trombosis venosa profunda.....	28
Tabla 2. Relación de las mutaciones de las enzimas que intervienen en el metabolismo de la homocisteina y el riesgo de enfermedad vascular.....	43
Tabla 3. Comparación entre el perfil lipídico, glucosa y homocisteina grupo de casos y controles	77
Tabla 4. Ilustración tabla de 2x2 para colesterol total.....	89
Tabla 5. Asociación entre el perfil lipídico y la glucosa, con la trombosis venosa.....	90
Tabla 6. Frecuencias genotípicas y alelicas observadas grupo de casos.....	94
Tabla 7. Frecuencias genotípicas y alelicas observadas grupo de controles.....	94
Tabla 8. Tabla ilustrativa de 2x2 para el polimorfismo 677 C/T de la MTHFR.....	95
Tabla 9. Asociación entre el polimorfismo 677 T/T de la MTHFR y 699 T/T de la CBS con la trombosis venosa.....	95

Tabla 10. Ilustración tabla de 2x2. Presencia o ausencia del polimorfismo TT de la MTHFR y niveles de colesterol total.....	96
Tabla 11. Asociación entre el polimorfismo 677 C/T de la MTHFR y los factores de riesgo de trombosis venosa	97
Tabla 12. Relación entre la ausencia o presencia del polimorfismo 677 T/T de la MTHFR y 699 T/T, 1080 T/T, 844 Ins 68 pb de la CBS y los niveles de homocisteína grupo de casos	98
Tabla 13. Relación entre la ausencia o presencia del polimorfismo 677 T/T de la MTHFR y 699 T/T, 1080 T/T, 844 Ins 68 pb de la CBS y los niveles de homocisteína grupo control	99
Tabla 14. Ilustración tabla de 2x2. Presencia y ausencia del polimorfismo 677 T/T y sobrepeso grupo de casos.....	100

RESUMEN

Se produce trombosis cuando el sistema hemostático se activa de manera inapropiada al grado de que los procesos anticoagulantes naturales se superan y se permite la formación de un coagulo dentro de un vaso sanguíneo. La trombosis puede ser profunda y superficial. Los factores de riesgo para el desarrollo de la trombosis venosa, pueden ser adquiridos (diabetes mellitus, hiperlipidemias, tabaquismo anticonceptivos, en menor proporción, inmovilización, cirugía, trauma y embarazo) o genéticos, (anormalidades en el sistema de la coagulación). Y en forma reciente la hiperhomocisteinemia, alteración metabólica caracterizada por la presencia de niveles elevados de homocisteína en sangre. Este trabajo analizó una población con diagnóstico clínico de trombosis, describió el perfil lipídico, los niveles de glucosa y homocisteína calculo las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos 699C/T, 1080C/T, 844 INSER 68 pb de la CBS y el 677C/T de la MTHFR. Las pruebas bioquímicas se realizaron por métodos colorimétricos y de inmunoensayo. Se utilizó la técnica de PCR para la amplificación de los exones 6,10 y 8 de la CBS y 4 de la MTHFR y mediante análisis de restricción se hallaron las frecuencias de los polimorfismos mencionados. El estudio de asociación se hizo mediante la prueba de χ^2 corregido por la prueba de Fischer. Los resultados mostraron asociación entre el nivel de triglicéridos, el colesterol total, cLDL y el riesgo de presentar trombosis. También estos resultados mostraron que individuos homocigotos TT del polimorfismo 677C/T y con niveles de colesterol alto tienen un factor de riesgo (OR) de 3.5 ($p= 0.14$) de desarrollar trombosis.

Palabras clave: Cistationina β - sintasa. Metilentetrahidrofolato reductasa. Hiperhomocisteinemia. Polimorfismos. Trombosis venosa profunda y superficial.

ABSTRACT

Thrombosis is produced when the hemostatic system is active in a wrong way, so the natural anticoagulants process have been surpassed and it permits the appearance of a clot inside of a blood vessel. The thrombosis can be deeper and superficial. The risk factors to the vessel thrombosis development, can be acquired (Diabetes Mellitus, hyperlipidemias, contraceptives, tobacco; in less proportion, immobilization, surgery, trauma and pregnancy) or genetic abnormalities in the system of the coagulation and in a recent way the hyperhomocysteinemia, metabolic alteration that presents high levels of homocysteine in the blood. This work analyzed a population with a clinical thrombosis diagnosis, as well as describe the lipidic profile, the glucose and homocysteine levels, also calculate the allelic and genotypic frequency of the – polymorphisms- 699C T, 1080 C T, 844 INSER 68 pb of the CBS and the 677 C T of the MTHFR. The biochemistry proof was done by –colorimetricos- methods and immunoassay. In the other hand in this work was used the PCR technique to the amplification of the 6, 10 and 8 exons of the CBS and 4 of the MTHFR and through an analysis of restriction we found the frequencies of the –polimorfismos- that were mentioned before. The analysis of association was done through the Chi2 proof, that was corrected by the Fisher proof. The results showed an association between the –triglyceridos- level, the total cholesterol, cLDL and the thrombosis risk. Besides these results showed that a homozygote TT person of the –polimorfismo- 677 C T and with high levels of cholesterol have a risk factor of (OR) of 3.5 ($p=0.14$) of development thrombosis.

Key Words: Cystathionine β - Synthase. Methyltetrahydrofolate Reductase. Hyperhomocysteinemia. Polymorphism. Deep Venous Thrombosis and Superficial.

1. INTRODUCCION

La presencia de un trombo (habitualmente compuesto por fibrina, plaquetas y hematíes) y la respuesta inflamatoria que le acompaña es lo que se conoce como Trombosis Venosa o Tromboflebitis. Las trombosis venosas que se producen en el Sistema Venoso Profundo (SVP) son más importantes que las del Sistema Venoso Superficial (SVS), debido a la gravedad de sus complicaciones potenciales (embolismo pulmonar, síndrome posttrombótico). Esta enfermedad se presenta con una incidencia anual de 1 a 3 por cada 1000 personas, afectado tanto a jóvenes como ancianos.

Los factores de riesgo para el desarrollo de la trombosis venosa, pueden ser adquiridos o genéticos. Dentro de los factores de riesgo adquiridos se encuentran; la diabetes mellitus, hiperlipidemias, tabaquismo y el uso de anticonceptivos, en menor proporción aparecen aquellos asociados con inmovilización, cirugía, trauma y embarazo. Dentro de los factores de riesgo genéticos están; anomalías en el sistema de la coagulación, así como el factor V de Leiden, deficiencia de antitrombina III, proteínas C y S y altos niveles de los factores procoagulantes (factor II, VIII, IX y XI). Recientemente se encontró otro factor de riesgo involucrado en el desarrollo de la trombosis conocido como hiperhomocisteinemia, alteración metabólica caracterizada por la presencia de niveles elevados de homocisteína en sangre. Para algunos autores este desorden metabólico ha sido relacionado con los polimorfismos en las enzimas que actúan en el metabolismo del aminoácido metionina: Metilentetraihidrofolato Reductasa (MTHFR) y Cistationina β - Sintasa (CBS) sin embargo otros autores niegan esta relación.

Este trabajo se propuso buscar la asociación entre factores de riesgo para el desarrollo de trombosis con el perfil lipídico y los niveles de glucosa como

también los valores elevados de homocisteína plasmática y los polimorfismos (699 C/T, 1080 C/T, 844 ins68pb de la CBS y 677 C/T de la MTHFR. Estos resultados permitirán identificar personas en riesgo de presentar trombosis y sugerir un tratamiento para prevenir el desarrollo de esta enfermedad.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES DE LA TROMBOSIS

Los casos de enfermedad aterotrombótica, arritmias cardíacas, infarto al miocardio y accidente cerebrovascular representan una cifra importante de muertes anualmente. La aterotrombosis es un proceso complejo que cursa de manera crónica y el cual inicia en las paredes internas de arterias o venas, en el sitio de la lesión endotelial, disminuyéndose por lo tanto la producción de colágeno necesaria para los tejidos, lo cual conlleva a la pérdida de la contractilidad de los vasos y contribuye a la formación del trombo. Actualmente se ha considerado que las enfermedades vasculares tienen un origen de múltiples causas resultantes de factores genéticos y/o adquiridos (Austin, 2004).

In vivo existe un balance entre la formación de fibrina y la fibrinólisis, por lo tanto, la reducción del flujo sanguíneo, los cambios en la pared de los vasos y cambios en la composición de la sangre (hipercoagulabilidad), pueden todos resultar en un desequilibrio, lo cual favorece a la formación de fibrina, sintomatología que cursa siempre de manera crónica por lo cual carece de diagnóstico durante un periodo considerable, conllevando a la formación del trombo oclusivo, el cual requiere el tratamiento correspondiente y además previene la aparición de una trombosis arterial oclusiva (Kamphuisen, 2001; Rosendaal, 2005).

Se han descrito varios factores predisponentes a episodios aterotrombóticos como los son: las dislipidemias, hipertensión, diabetes, tabaquismo, obesidad, estrés y alteraciones del sistema de la coagulación y fibrinolítico. Pero en los últimos años se ha postulado que la presencia de concentraciones elevadas de homocisteína en la circulación constituye un

factor de riesgo independiente para el desarrollo de enfermedad cardiovascular, cerebrovascular y del tromboembolismo venoso (Austin, 2004; Barkis, 2007).

Dentro de las complicaciones más severas de la trombosis se encuentran síndrome postflebítico o posttrombótico, hipertensión pulmonar tromboembólica crónica y embolismo pulmonar. La trombosis venosa profunda y el embolismo pulmonar son un evento grave y potencialmente mortal con una incidencia de 1 a 3 por cada 1000 personas, afectando a jóvenes y ancianos sin importar el género. Esta además se relaciona comúnmente con Infarto Agudo del Miocardio o Accidente Cerebro-Vascular isquémico (Doggen, 2004; Rosendaal, 2005).

2.2 FISIOPATOLOGIA DE LA HEMOSTASIA

El diagnóstico exacto y el tratamiento de los pacientes con trombosis requiere el conocimiento de la fisiopatología de la hemostasia. El sistema hemostático es enfrentado a una compleja tarea de mantener la sangre como un fluido, de tal forma que este pueda circular, mientras simultáneamente es capaz de convertir a la sangre en una especie de gel insoluble en los sitios donde se presenta daño vascular (López, 2004).

El proceso puede dividirse en componentes primarios y secundarios, y se inicia cuando diversos traumatismos, intervenciones quirúrgicas o procesos patológicos alteran el revestimiento endotelial vascular y la sangre queda expuesta al tejido conjuntivo subendotelial (McKenzie, 2000; Harrison, 2002).

La hemostasia primaria es el nombre que se da al proceso de formación del tampón plaquetario en las zonas de lesión. Aparece al cabo de unos segundos de producirse la lesión y tiene una importancia enorme para

detener la salida de sangre en los capilares, las arteriolas pequeñas y las vénulas. La hemostasia secundaria consiste en una serie de reacciones del sistema de coagulación plasmática que dan lugar a la formación de fibrina, proceso que tarda varios minutos en completarse. Siendo las bandas de fibrina que se producen quienes refuerzan el tapón hemostático primario. Esta reacción es especialmente importante en los vasos de mayor calibre, e impide la recidiva de la hemorragia al cabo de varias horas o días de producirse la lesión inicial (McKenzie, 2000; Harrison, 2002).

La hemostasia primaria eficaz requiere tres fenómenos cruciales: la adhesión plaquetaria, la liberación granular y la agregación plaquetaria. A los pocos segundos de producirse la lesión, las plaquetas se adhieren a las fibrillas de colágeno del subendotelio vascular a través de un receptor de colágeno específico para las plaquetas, la glucoproteína Ia/IIb, interacción que es estabilizada por el factor de von Willebrand, una glucoproteína adhesiva que hace que las plaquetas permanezcan adheridas a la pared del vaso a pesar de la fuerzas de desplazamiento que se generan en la luz vascular (McKenzie, 2000; Harrison, 2004; López, 2002).

El factor de von Willebrand lleva a cabo esta función mediante la formación de un enlace entre el receptor plaquetario de la glucoproteína Ib/IX y las fibrillas de colágeno subendotelial. Mas tarde, las plaquetas adherentes liberan constituyentes granulares preformados y generan mediadores *de novo*. Al igual que en otras células, la activación y la secreción plaquetaria están reguladas por las modificaciones de la concentración de nucleótidos cíclicos, la entrada de calcio al interior de la células, la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana y la fosforilación de proteínas intracelulares clave (McKenzie, 2000; Harrison, 2004; López 2002).

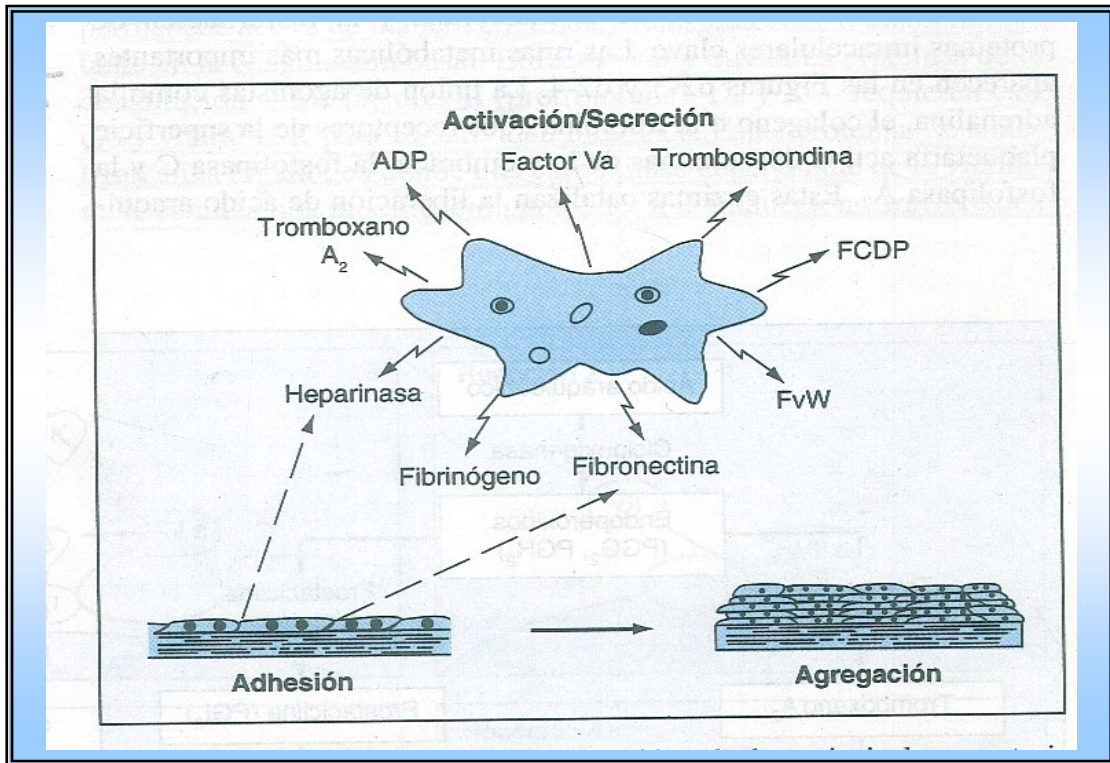


Figura 1. Principales mecanismos de la hemostasia primaria, tomado de Harrison, 2002.

La unión de agonistas como la adrenalina, el colágeno o la trombina a los receptores de la superficie plaquetaria activa dos enzimas de la membrana, la fosfolipasa C y la fosfolipasa A₂. Estas enzimas catalizan la liberación de ácido araquidónico a partir de dos de los principales fosfolípidos de membrana, el fosfatidilinositol y la fosfatidilcolina (Mckenzie, 2000; Harrison, 2002).

Inicialmente una pequeña cantidad del ácido araquidónico liberado se convierte en tromboxano A₂ (TXA₂) que, a su vez, puede activar la fosfolipasa C. La formación de TXA₂ a partir de ácido araquidónico esta mediada por la enzima ciclooxygenasa (Mckenzie, 2000; Harrison, 2002).

La hidrólisis del fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato produce diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃), que desempeña un papel crucial en el metabolismo plaquetario. El IP₃ actúa como mediador en el desplazamiento de calcio dentro del citosol plaquetario y estimula la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina (McKenzie, 2000; Harrison, 2002).

Por su parte, la miosina interactúa con la actina para facilitar el movimiento de los gránulos y el cambio de forma de las plaquetas. El DAG activa la proteína cinasa C que, a su vez, induce la fosforilación de varios sustratos, el cual regula la secreción de los gránulos de las plaquetas (McKenzie, 2000; Harrison, 2002).

Existe finalmente un mecanismo equilibrado que controla la velocidad e intensidad de la activación plaquetaria. El TXA₂, que es un producto plaquetario del ácido araquidónico, estimula la activación y la secreción de las plaquetas. Por el contrario la prostaciclina, que es un producto del metabolismo del ácido araquidónico en las células endoteliales, inhibe la activación plaquetaria al aumentar los niveles intraplaquetarios de adenosina monofosfato cíclico (McKenzie, 2000; Harrison, 2002).

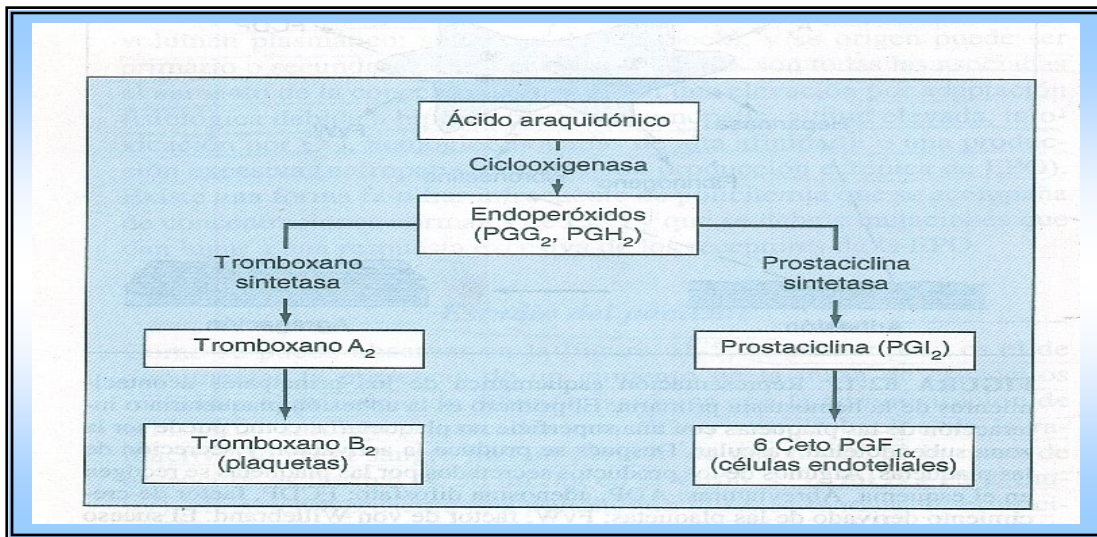


Figura 2. Generación de tromboxano A₂ en las plaquetas y de prostaciclina (PGI₂) en las células endoteliales, tomado de Harrison, 2002.

Tras su activación, las plaquetas secretan el contenido de sus gránulos hacia el plasma. De los lisosomas se liberan endoglucosidasas y una enzima que fragmenta la heparina; de los gránulos densos se liberan calcio, serotonina y adenosina difosfato (ADP); finalmente, de los gránulos α se liberan varias proteínas, entre ellas el factor de von Willebrand, la fibronectina, la trombospondina, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas y una proteína que neutraliza la heparina (factor plaquetario 4). El ADP liberado se une a un receptor, que cuando se activa, modifica la configuración del complejo glucoproteína IIb/IIIa de manera que se puede unir al fibrinógeno y une entre sí las plaquetas adyacentes formando un tapón hemostático (McKenzie, 2000; Harrison, 2002).

A medida que se forma el tapón hemostático primario, las proteínas plasmáticas de la coagulación se activan para iniciar la hemostasia secundaria. La vía metabólica de la coagulación se puede dividir en una serie de reacciones, que culminan con la producción de una cantidad

suficiente de trombina como para convertir una parte del fibrinógeno plasmático en fibrina. Cada una de las reacciones requiere la formación de un complejo de superficie y la conversión de proteínas precursoras inactivas en proteasas activas mediante proteólisis limitada, y cada una de ellas esta regulada por cofactores plasmáticos y celulares y por el calcio (McKenzie, 2000; Harrison, 2002).

En la *reacción 1* que corresponde a la fase intrínseca o de contacto de la coagulación, tres proteínas plasmáticas, el factor de Hageman (factor XII), el cininogeno de alto peso molecular (CAPM) y la precalicreína (PK), forman un complejo sobre el colágeno subendotelial vascular. Tras su unión al CAPM, el factor XII se convierte lentamente en una proteasa activa (XIIa) que mas adelante convierte la PK en calicreina y el factor XI en su forma activa (XIa). A su vez la calicreina acelera la conversión de XII a XIIa, mientras que el XIa participa en las reacciones posteriores de la coagulación (McKenzie, 2000; Harrison, 2002).

La *reacción 2*, proporciona una segunda vía para iniciar la coagulación mediante la conversión del factor VII en una proteasa activa. En esta vía extrínseca, o dependiente de un factor tisular, se forma un complejo entre el factor VII, el calcio y el factor tisular, una lipoproteína que existe en las membranas celulares y que queda expuesta tras la lesión celular. La vía factor tisular-factor VII permanece activa de manera continua y tiene una contribución importante en la coagulación basal. El factor VII y otras tres proteínas de la coagulación – los factores II (protrombina), IX y X – requieren calcio y vitamina K para su actividad biológica (McKenzie, 2000; Harrison, 2002).

En la *reacción 3*, el factor X se activa por las proteasas que se generan en las dos reacciones previas. En una de estas reacciones, se forma, entre los

factores VIII, IX y X, un complejo dependiente del calcio y de los lípidos. Dentro de este complejo, el factor IX se convierte inicialmente en IXa mediante el factor XIa que había sido generado a través de la vía intrínseca. Mas tarde, el factor X se activa por el factor XIa en conjunto con el factor VIII. Como alternativa, ambos factores IX y X se pueden activar de una manera más directa por el factor VIIa, que se ha generado a través de la vía extrínseca. La activación de los factores IX y X proporciona un enlace importante entre las vías intrínseca y extrínseca de la coagulación (McKenzie, 2000; Harrison, 2002).

En la *reacción 4*, que es el paso final, convierte la protrombina en trombina en presencia del factor V, calcio y fosfolípidos. Aunque la conversión de la protrombina puede tener lugar en diferentes superficies naturales y artificiales con abundantes fosfolípidos, es varios miles de veces más rápida cuando se realiza en la superficie de las plaquetas activadas o de las células endoteliales. La trombina tiene múltiples funciones en la hemostasia. Aunque su papel principal en la hemostasia es la conversión de fibrinogeno en fibrina, tan bien activa los factores V, VIII y XIII, y estimula la agregación y la secreción plaquetaria (Mckenzie, 2000; Harrison, 2002).

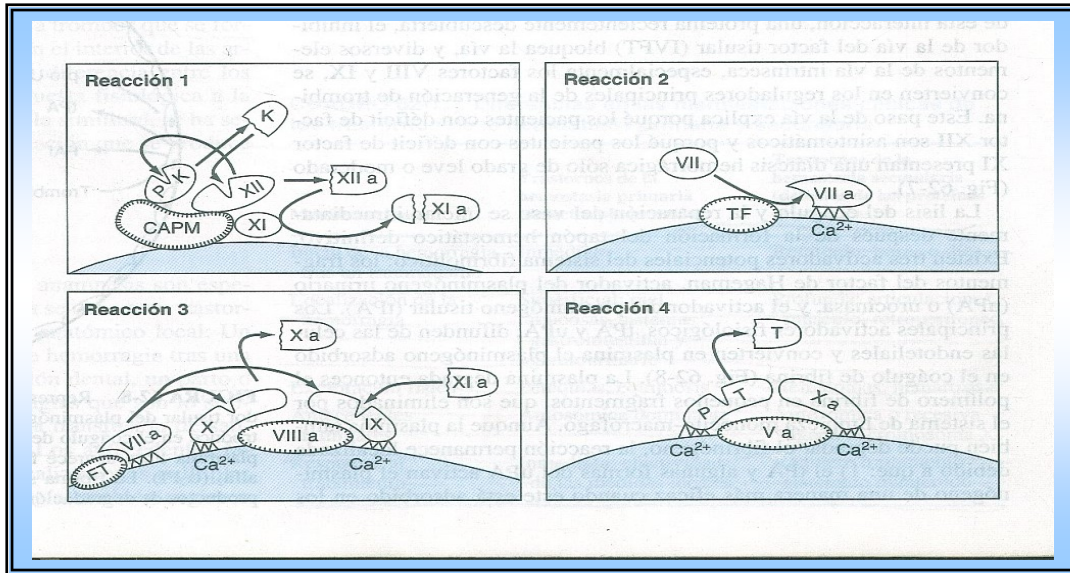


Figura 3. Principales reacciones de la coagulación, tomado de Harrison 2002.

Tras la liberación de los fibrinopéptidos A y B a partir de las cadenas α y β del fibrinógeno, la molécula modificada, que ahora se denomina monómero de fibrina, el cual polimeriza en un gel insoluble. Finalmente el polímero de fibrina se estabiliza mediante el establecimiento de enlaces cruzados de cadenas individuales, por el factor XIIIa, una transglutaminasa plasmática (Mckenzie, 2000; Harrison, 2002).

La lisis del coagulo y la reparación del vaso se inicia inmediatamente después de la formación del tapón hemostático definitivo. Existen tres activadores potenciales del sistema fibrinolítico: los fragmentos del factor de Hageman, activador del Plasminógeno urinario (uPA) o urocinasa, y el activador del Plasminógeno tisular (tPA). Los principales activadores fisiológicos, tPA y uPA, difunden de las células endoteliales y convierten en plasmina el plasminógeno adsorbido en el coagulo de fibrina (Mckenzie, 2000; Harrison, 2002).

La plasmina degrada entonces el polímero de fibrina en pequeños fragmentos, que son eliminados por el sistema de limpieza monocito – macrófago. Aunque la plasmina también puede degradar el fibrinogeno, la reacción permanece localizada debido a que: 1) el tPA y algunas formas de uPA activan el plasminógeno de una manera mas eficaz cuando este esta adsorbido en los coágulos de fibrina; 2) cualquier cantidad de plasmina que se introduce en la circulación se fija y neutraliza rápidamente por el inhibidor de la plasmina α_2 , y las células endoteliales liberan un inhibidor del activador del Plasminógeno (PAI-1) que bloquea directamente la acción del tPA (Mckenzie, 2000; Harrison, 2002).

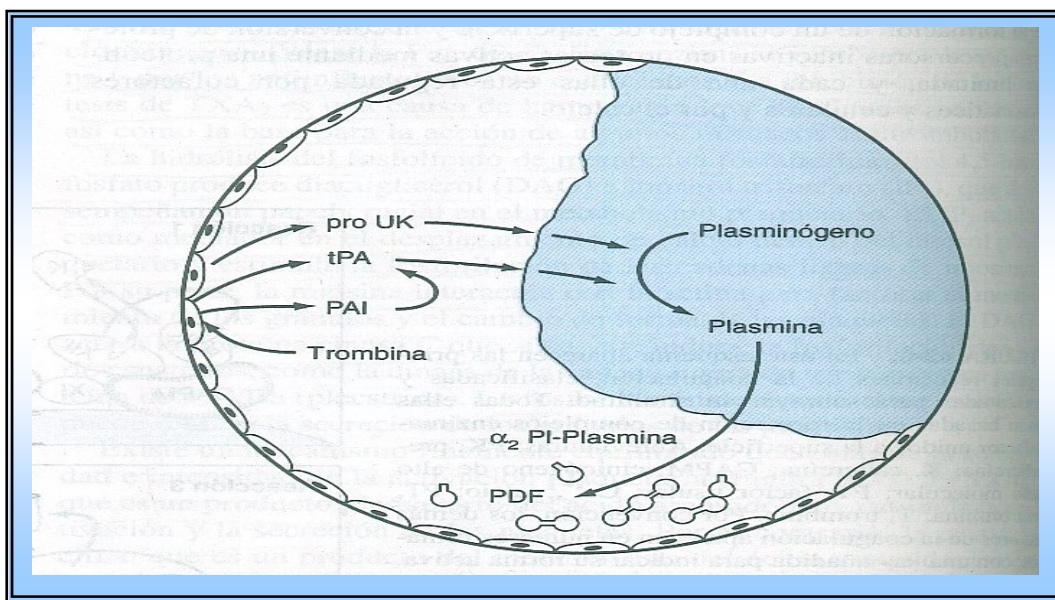


Figura 4. Representación esquemática de la vía fibrinolítica, tomado de Harrison 2002.

Solo se convierte en su forma activa una pequeña cantidad de cada enzima de la coagulación. En consecuencia, el tapón hemostático no se propaga más allá de la zona de lesión. Es importante una regulación muy precisa, debido a que en solo 1ml de sangre existe el potencial de coagulación suficiente para coagular todo el fibrinogeno del organismo en diez a quince

segundos. La fluidez se mantiene por el propio flujo sanguíneo, que reduce la concentración de reactantes, por la absorción de los factores de la coagulación a las superficies y por la presencia de múltiples inhibidores en el plasma. La antitrombina, las proteínas C y S, y el IVFT (Inhibidor de la Vía del Factor Tisular), son inhibidores importantes que mantienen la fluidez de la sangre (Mckenzie, 2000; Harrison, 2002).

Estos inhibidores presentan diferentes formas de acción. La antitrombina forma complejos con todos los factores de la coagulación proteasas serina, excepto con el factor VII. La velocidad de formación de complejos esta acelerada por la heparina y por las moléculas de tipo heparina en la superficie de las células endoteliales (Mckenzie, 2000; Harrison, 2002).

La proteína C se convierte en una proteasa activa por la trombina después de su unión a una proteína de la célula endotelial denominada trombomodulina. La proteína C activada, inactiva entonces los dos cofactores plasmáticos V y VII mediante proteólisis limitada, lo que disminuye la velocidad de dos reacciones de coagulación de carácter crítico. Esta proteína también puede estimular la liberación del tPA por las células endoteliales. La función inhibidora de la proteína C esta potenciada por la proteína S. Por lo tanto, la disminución de la concentración de antitrombina o de las proteínas C y S, así como la presencia de formas disfuncionales de estas moléculas, da lugar a un estado de hipercoagulabilidad o pretrombótico. Además un defecto hereditario asociado a un estado de hipercoagulabilidad es la presencia de una forma del factor V (factor V de Leiden) que es resistente a la inhibición inducida por la proteína C (Mckenzie, 2000; Harrison, 2002).

Por otro lado, se encuentra la homocisteina, la cual puede potenciar la actividad procoagulante en la cascada de la coagulación, en diversas formas.

Por un lado la proteína C activada es formada por la acción de la trombina en proteína C, en presencia de un cofactor unido a membrana, conocido como trombomodulina. Al encontrarse niveles elevados de homocisteína, esta inhibe la actividad de este cofactor, produciendo daño en la vía anticoagulante trombomodulina – proteína C activada. Al disminuirse la actividad de la trombomodulina, esto resulta en la disminución de la formación de la proteína C, presentándose inhibición del factor Va debido a la ausencia de esta proteína (Sharma, 2006).

2.3 TROMBOSIS ARTERIAL Y VENOSA

Una manifestación anormal de la hemostasia es la trombosis. Se produce trombosis cuando el sistema hemostático se activa de manera inapropiada al grado de que los procesos anticoagulantes naturales se superan y se permite la formación de un coagulo dentro de un vaso sanguíneo (Mckenzie, 2000; Blann 2006). Al crecer la masa o trombo, puede ocluir el vaso sanguíneo y producir entonces la muerte de los tejidos abastecidos normalmente por ese vaso. Además, puede romperse una porción de un trombo, llamada embolo y desplazarse a ramas vasculares mas pequeñas, y en ese sitio el embolo puede alojarse en un vaso menor a su tamaño, obstruir el flujo sanguíneo y causar subsecuente la destrucción del tejido (embolia o tromboembolia) (McKenzie, 2000).

La coagulación sanguínea no es un proceso uniforme en todo el organismo y, de hecho, la composición del coagulo sanguíneo varia según la zona de lesión. Los tapones hemostáticos o trombos que se forman en las venas en las que el flujo sanguíneo es lento tienen abundante fibrina y eritrocitos atrapados, y contienen una cantidad relativamente escasa de plaquetas. A menudo, se denominan trombos rojos. Los extremos friables de estos trombos rojos, que con frecuencia se forman en las venas de las piernas, se

pueden fragmentar y producir embolia en la circulación pulmonar (McKenzie, 2000; Harrison, 2002).

Por el contrario, los coágulos que se forman en las arterias en condiciones de flujo rápido están constituidos predominantemente por plaquetas y tienen poca fibrina. Estos trombos blancos se pueden desprender fácilmente de la pared arterial y producir embolia en zonas distantes, dando lugar a isquemia temporal o permanente (McKenzie, 2000; Harrison, 2002).

Los trombos arteriales se producen en vasos sanguíneos en los cuales el flujo sanguíneo es rápido. Como el nombre lo sugiere, se produce más frecuentemente en arterias. Estos trombos son de color blanco debido a su composición. Un trombo blanco se inicia por la interacción del endotelio lesionado y las plaquetas y está constituido principalmente por capas de plaquetas y fibrina, entre las cuales quedan atrapados unos cuantos leucocitos y eritrocitos (McKenzie, 2000).

La lesión del endotelio se vincula con la presencia en la capa íntima de los vasos sanguíneos de las placas constituidas por lípidos, tejido conjuntivo fibroso, macrófagos y exceso de células musculares lisas (ateroesclerosis). Cuando estas lesiones se presentan en la pared de un vaso se vuelve más gruesa a expensas de su luz que, entonces, se vuelve más estrecha. Aunque hasta el momento no se explican los mecanismos precisos, se piensa que las células endoteliales se lesionan y luego se separan de las áreas de las placas, lo que da lugar a la exposición de las plaquetas y del plasma a las estructuras subendoteliales (McKenzie, 2000).

A continuación se produce la activación de los elementos hemostáticos. Las plaquetas se adhieren al subendotelio, se agregan y liberan ADP y otros contenidos de sus gránulos, así como sintetizan tromboxano A_2 . El contacto

entre las proteínas de la coagulación y el subendotelio conduce a la formación de fibrina. Además, las propiedades anticoagulantes normales de las células endoteliales, están disminuidas. El trombo que es la masa de plaquetas y fibrina, crece hacia el interior de la luz del vaso (McKenzie, 2000).

Los factores que aumentan la probabilidad de trombosis arterial incluyen las dietas ricas en colesterol, el tabaquismo, el uso de anticonceptivos orales, la presencia de varias enfermedades entre las cuales se encuentran la aterosclerosis, la hipertensión, la diabetes y el síndrome nefrótico (McKenzie, 2000).

Los síntomas se desarrollan a través de varios mecanismos. Una arteria puede ocluirse por un trombo desarrollado localmente o, con mayor frecuencia, se afecta un vaso mas pequeño en el corazón, el encéfalo o las extremidades, cuando se aloja en el un embolo proveniente de un sitio lejano. Clínicamente el resultado de la oclusión de vasos por trombos y tromboémbolos es la disminución de la velocidad del flujo sanguíneo en un área particular (isquemia) y la muerte del tejido (necrosis), ataques cardiacos e infartos cerebrales (McKenzie, 2000).

Por otro lado, la trombosis venosa se produce en vasos sanguíneos en los cuales el flujo de sangre es lento. El flujo sanguíneo más lento y el estancamiento (estasis) se producen en todas las venas, particularmente en aquellas cercanas a la región de una válvula. La lesión al endotelio, notable en la trombosis arterial, no es tan evidente en la trombosis venosa, aunque es probable que debido al abastecimiento menor de oxígeno a la pared del propio vaso, la contracción de las células endoteliales produzca brechas entre ellas. Las plaquetas pueden llenar entonces los espacios para adherirse al subendotelio expuesto y activarse, y su activación puede llevar a

los pasos subsecuentes de agregación y formación de fibrina (McKenzie, 2000).

En su mayor parte los trombos se forman en las venas profundas de los músculos de las pantorrillas y se lisan por los procesos naturales sin causar síntomas. La trombosis venosa sintomática clínicamente significativa se denomina trombosis venosa profunda (TVP). La TVP puede formarse en las venas de las pantorrillas, pero generalmente se encuentra en las venas proximales de los miembros inferiores. La hinchazón y la distensión de las venas causadas por la oclusión de la luz puede acompañarse con inflamación que causa dolor, hipersensibilidad, enrojecimiento y calor local (tromboflebitis) (McKenzie, 2000).

Las embolias son las complicaciones principales de las trombosis venosas profundas. Los émbolos procedentes de las venas profundas en los miembros inferiores se desplazan a través de venas cada vez más grandes hasta el lado derecho del corazón y finalmente alcanzan la circulación pulmonar, ocluyendo los vasos en los pulmones (McKenzie, 2000).

2.4 FISIOPATOLOGIA DE LA TROMBOSIS

La trombosis, se caracteriza por la formación intravascular in vivo de una masa compuesta por varios elementos sanguíneos. La formación del trombo requiere de varias etapas: a) denudación de células endoteliales; adherencia de plaquetas al subendotelio debida a la liberación de fibrinógeno y ADP almacenado en los gránulos; b) la síntesis de tromboxano A₂ aumenta la agregación plaquetaria; se expone el factor plaquetario tres que posee receptores de los factores VIII y V de la coagulación; se desenmascaran los receptores IIB y IIIA de la fibrina, y c) la coagulación sanguínea, que genera trombina y estabiliza la masa plaquetaria formando una malla de fibrina. La

combinación de ADP, trombina y tromboxano A_2 estimula la actomiosina intraplaquetaria que se contrae, formando una masa de plaquetas, que es la iniciadora del proceso de trombosis (Pérez, 2007).

Los trombos pueden formarse de tres maneras: 1) por aglutinación, constituidos principalmente por plaquetas y fibrina, con relativamente pocos eritrocitos; se encuentran sobre todo en vasos sanguíneos pequeños; 2) por coagulación, que da origen a los trombos rojos, formados casi exclusivamente por eritrocitos envueltos en una malla de fibrina, con pocas plaquetas o leucocitos; se ven en las trombosis de las venas grandes y dan origen a embolias graves, y 3) mixtos, que se inician con aglutinación de las plaquetas y continúan con la coagulación de la sangre y participación equilibrada de eritrocitos, leucocitos y fibrina (Pérez, 2007).

Una vez formado el trombo, hay tres destinos posibles de este: a) lisis total o parcial; b) organización y recanalización, y c) desprendimiento y embolia. 1) la fibrina recién formada es muy susceptible a la lisis, por lo que la rápida retracción y desaparición de trombos, se debe casi por completo a la acción lítica de la plasmina. Sin embargo, una vez que la fibrina se ha polimerizado y estabilizado con uniones covalentes catalizadas por el factor XIII, se vuelve mucho más resistente a la lisis (Pérez, 2007).

2) La organización y recanalización de trombo se inicia a las 48 horas de su formación: la masa plaquetaria se vuelve más laxa, la fibrina se extiende a los espacios entre los restos de plaquetas y los leucocitos y los monocitos invaden el trombo y fagocitan a la fibrina y a los restos plaquetarios. Al mismo tiempo, desde el sitio de lesión penetran al trombo células musculares lisas, que tan bien recubren la superficie temporalmente; el endotelio adyacente prolifera y empieza a cubrir la masa. El estímulo para la

multiplicación de estos elementos proviene de la plaquetas y se conoce como PGF (factor de crecimiento plaquetario) (Pérez, 2007).

Mientras el trombo no está completamente cubierto por células endoteliales, puede seguir creciendo por oposición de nuevo material a la superficie no endotelizada, pero, al completarse la cobertura, el trombo se transforma poco a poco en una masa de colágeno y músculo liso (Pérez, 2007).

La velocidad del proceso es variable; los trombos que se forman en sitios de inflamación vascular, como arteritis o flebitis, tienden a organizarse y recanalizarse con mayor rapidez que los trombos de estasis o los émbolos que se alojan en vasos sanos; en cambio, cuando la pared del vaso está muy alterada, como en la pared de un aneurisma o en una placa ateromatosa ulcerada y calcificada, los trombos suprayacentes pueden tardar mucho tiempo en organizarse y poco a poco pierden todo el vestigio de restos celulares, permaneciendo *in situ* como masas de fibrina condensadas que a veces dan origen a émbolos (Pérez, 2007).

La embolia, es el transporte patológico por la circulación de material insoluble en la sangre hasta un sitio distante de su origen. El material transportado se llama embolo y puede ser de distintos materiales, como trombos, glóbulos de grasa, fragmentos de placas de ateroma ulceradas, etc. La consecuencia final de la embolia es la oclusión de vasos cuyo diámetro no permite el paso de material embolizado (Pérez, 2007).

Los trombos grandes y largos que se forman en las venas profundas de las extremidades inferiores pueden dar origen a émbolos que se enroscan y llenan las cavidades derechas del corazón, las ramas principales de la arteria pulmonar, o ambos sitios (Pérez, 2007).

En cambio, los émbolos diminutos, como las gotas de grasa que ingresan al torrente circulatorio, dan lugar comúnmente a obstrucción letal de los capilares pulmonares, o cuando son mas pequeñas, atraviesan los pulmones y llegan a ocluir los vasos finos del sistema nervioso central (Pérez, 2007).

Uno de los mas importantes avances en el entendimiento de la trombosis venosa, ocurrió en 1859, cuando *Rudolph Virchow* deduce las principales determinaciones patogénicas de la trombosis venosa profunda y el embolismo pulmonar, quien basado en diversas observaciones, concluye que; el estasis sanguíneo, los cambios en la pared de los vasos y la hipercoagulabilidad, son los principales factores responsables para el desarrollo de la TVP (triada de virchow) (Kahn, 1998; López, 2004).

Por lo tanto, tres influencias primarias predisponen a la formación del trombo, la denominada triada de virchow, caracterizada por lesión endotelial, estasis sanguíneo y la hipercoagulabilidad de la sangre (Robbins, 2005).

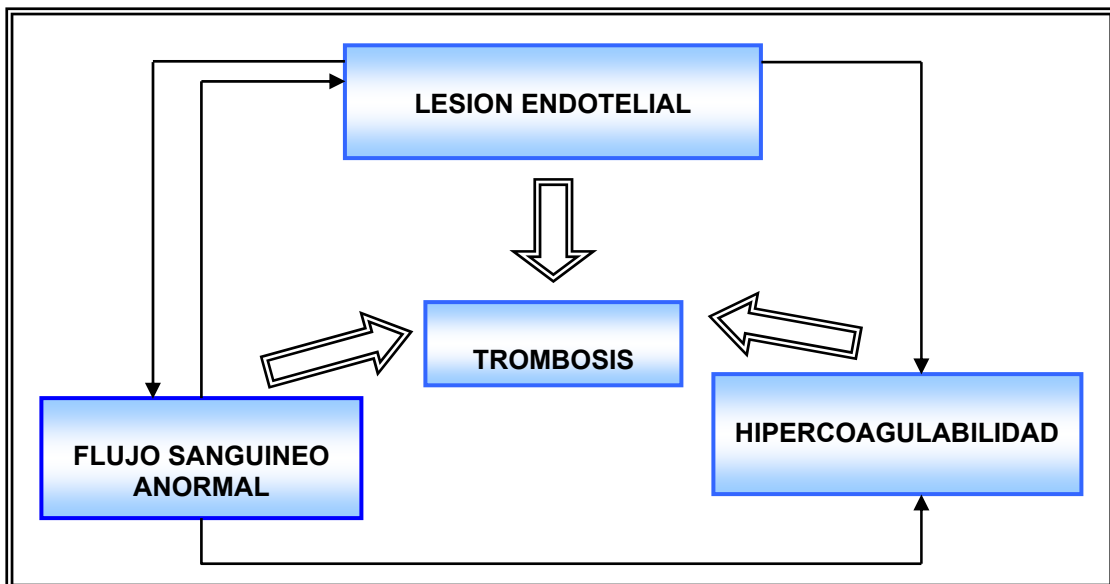


Figura 5: Triada de virchow en la trombosis, modificado de Robbins 2005.

La lesión endotelial es la influencia dominante, la cual puede producir trombosis. La formación del trombo es debida principalmente a la lesión endotelial, la cual puede ocurrir por la presencia de placas ulceradas en las arterias ateroscleróticas, o en lugares de lesión vascular traumática o inflamación. Claramente, la pérdida física del endotelio conducirá a la exposición de la matriz extracelular subendotelial, la adhesión de plaquetas y la liberación del factor tisular (Robbins, 2005).

Sin embargo, es importante resaltar que no es necesario que el endotelio quede desnudo o físicamente alterado para contribuir al desarrollo de la trombosis, por lo tanto cualquier perturbación en el equilibrio dinámico de los efectos pro y antitrombóticos del endotelio puede influir en los eventos locales de formación del coágulo (Robbins, 2005).

Por lo tanto, el endotelio disfuncional puede elaborar mayores cantidades de factores procoagulantes (p. ej., moléculas de adhesión plaquetaria, factor tisular) o puede sintetizar menos efectores anticoagulantes (p. ej., trombomodulina, PGI₂, t-PA). La disfunción endotelial significativa (en ausencia de pérdida celular endotelial) puede ocurrir debido a fuerzas hemodinámicas de hipertensión, flujo turbulento sobre válvulas fibrosas o endotoxinas bacterianas. Incluso influencias relativamente mínimas como la homocistinuria, hipercolesterolemia, radiación o productos absorbidos con el humo del tabaco pueden iniciar la lesión endotelial (Robbins, 2005).

Por otra parte, Las alteraciones en el flujo sanguíneo normal, entre ellas la turbulencia contribuyen a la trombosis arterial y cardiaca al causar lesión o disfunción endotelial así como al formar contracorrientes y bolsas locales de estasis, el cual es un factor principal en el desarrollo de los trombos venosos (Robbins, 2005).

El flujo sanguíneo normal es laminar, de tal forma que las plaquetas fluyen en el centro de la luz del vaso separadas del endotelio por una zona de plasma clara que se mueve más lentamente. Por lo tanto, el estasis y la turbulencia alteran el flujo laminar y acercan las plaquetas al contacto con el endotelio, evitan la dilución de los factores de coagulación activados por la sangre fresca circulante, retrasan el aflujo de inhibidores de factores de coagulación y permiten la formación del trombo y favorecen la activación celular endotelial, predisponiendo a la trombosis local, la adhesión leucocitaria y una variedad de efectos celulares endoteliales (Robbins, 2005).

Así mismo, la hipercoagulabilidad contribuye menos frecuentemente a los estados tromboticos pero, sin embargo, es un componente importante. Este estado se define como cualquier alteración de las vías de la coagulación que predispone a la trombosis. Las causas de hipercoagulabilidad pueden ser trastornos primarios (genéticos) y secundarios (adquiridos). De las causas elevadas de hipercoagulabilidad se encuentran; las mutaciones en el gen del factor V y en el gen de la protrombina, que son las más frecuentes. La mutación de este factor de la coagulación, es conocida como factor V de Leiden, convirtiendo la proteína resistente a la degradación por la proteína C. Tal resistencia del factor Va a la inactivación mediada por la proteína C favorece una coagulación incontrolada (Robbins, 2005).

2.5 TROMBOSIS VENOSA PROFUNDA Y SUPERFICIAL

La presencia de un trombo (habitualmente compuesto por fibrina, plaquetas y hematíes) y la respuesta inflamatoria que le acompaña es lo que se conoce como Trombosis Venosa o Tromboflebitis (Pendás, 2002).

Las trombosis venosas que se producen en el Sistema Venoso Profundo (SVP) son más importantes que los del Sistema Venoso Superficial (SVS), debido a la gravedad de sus complicaciones potenciales (embolismo

pulmonar, síndrome postrombótico). La mayoría de las trombosis venosas profundas se producen por debajo de la rodilla, habitualmente el trombo es lisado en otros menores que se disuelven espontáneamente en el torrente sanguíneo, produciéndose una recanalización y reendotelización de la vena, con el reestablecimiento del flujo en unos diez días (Pendás, 2002).

En el caso de los trombos de gran tamaño se produce una destrucción permanente de las válvulas venosas, con lo que aparecerá el Síndrome Postrombótico y la Insuficiencia Venosa Crónica (Pendás, 2002). La fisiopatología de la TVP se resume mediante la triada de Virchow, caracterizada por estasis sanguínea, daño endotelial e hipercoagulabilidad. Estas tres circunstancias aisladas o en asociación, intervienen en el desarrollo del trombo. Así mismo, la tromboflebitis superficial (TVS) se caracteriza por la presencia de trombos y la reacción inflamatoria que la acompaña en alguna de las venas que se localizan bajo la piel (Pendás, 2002).

La localización más frecuente es en miembros inferiores, asociada a las varices, aunque también puede localizarse en brazos, generalmente en relación con cateterización o punciones venosas repetidas. Es importante saber que este es un proceso benigno y autolimitado (Pendás, 2002).

Se puede clasificar en: tromboflebitis aséptica; suele asociarse a varices, traumatismos, es más frecuente en miembros inferiores, y no existe evidencia de infección. Habitualmente se resuelve en unos diez días. La tromboflebitis séptica o supurativa, se relaciona con canalizaciones venosas o heridas; es más frecuente en los brazos, y presentan un mal pronóstico si no se tratan (Pendás, 2002).

Entre los factores de riesgo de las TVS se encuentran: embarazo, anticonceptivos orales, neoplasias, trombofilias hereditarias, varices e inyección intravenosa de sustancias irritantes (fármacos, estupefacientes) (Pendás, 2002).

2.6 SINTOMAS Y SIGNOS DE LA TROMBOSIS VENOSA PROFUNDA Y SUPERFICIAL

En la tromboflebitis superficial (Trombosis Venosa Superficial), la presentación clínica se acompaña de edema, eritema y dolor a lo largo del trayecto venoso afectado, presentándose complicaciones entre las que se encuentran; la trombosis venosa profunda, el tromboembolismo, la hiperpigmentación cutánea y la persistencia de nódulo subcutáneo en el lugar de la trombosis (Pendás, 2002).

Los síntomas típicos de la trombosis venosa profunda son; el dolor, calor local, enrojecimiento e hinchazón de las extremidades inferiores. Estos síntomas pueden ocurrir en varias combinaciones y comúnmente su evolución se da en unos pocos días o hasta varias semanas, aunque también estos pueden ser ausentes, como se ha demostrado en estudios de autopsias y en pacientes quirúrgicos de alto riesgo (Kahn, 1998; Blann 2006).

Los signos de la trombosis venosa profunda en el examen físico, incluyen; dolor, eritema, cianosis, edema, dilatación de las venas superficiales, cordón venoso palpable y otros signos descritos como el signo de Homans, louvel y lowenberg (Kahn, 1998).

2.7 FACTORES DE RIESGO DE LA TROMBOSIS VENOSA PROFUNDA Y SUPERFICIAL

Como factor de riesgo se entienden aquellas situaciones que aumentan la probabilidad de desarrollar una enfermedad. Dentro de los factores de riesgo de padecer trombosis venosa se pueden encontrar aquellos de origen genético o adquirido bien sea conocidos o emergentes. Dentro de los factores de riesgo de origen genético encontramos; los polimorfismos en las enzimas que actúan en el metabolismo de la homocisteína: Metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR) y Cistationina β - Sintasa (CBS), y por consiguiente la hiperhomocisteinemia, anomalías en el sistema de la coagulación, así como el factor V de Leiden, deficiencia de antitrombina III, proteínas C y S y altos niveles de los factores procoagulantes (factor II, VIII, IX Y XI). Dentro de los factores de riesgo adquiridos encontramos: diabetes, hiperlipidemias, tabaquismo y consumo de anticonceptivos orales, en menor proporción aparecen aquellos asociados con inmovilización, cirugía, trauma y embarazo (Aznar, 2000; Kamphuisen, 2001; Doggen, 2004; Rosendaal, 2005; Eldibany, 2007).

Sin embargo, la relación entre la mutación 677 C/T y la trombosis no ha sido bien establecida. Además de estas mutaciones puntuales bien caracterizadas, los polimorfismos en los genes de los factores de coagulación también parecen impartir un mayor riesgo para la trombosis venosa. Otros estados primarios de hipercoagulabilidad, menos frecuentes, incluyen las deficiencias heredadas de anticoagulantes como la antitrombina III y la proteína C o S. Los individuos afectados presentan típicamente, trombosis venosa o tromboembolismo recurrente en la adolescencia o vida adulta temprana (Robbins, 2005).

Tabla 1. Mecanismos potenciales por los cuales se puede facilitar el desarrollo de trombosis venosa profunda, modificado de López, 2004.

<p style="text-align: center;">HIPERCOAGULABILIDAD</p>	<p><u>FACTORES GENETICOS</u> INCREMENTO DE FACTORES PROCOAGULANTES: Mutación en el gen que codifica para la protrombina (G20210A)</p> <p>DECREMENTO DE FACTORES ANTICOAGULANTES: Deficiencia de antitrombina Deficiencia de la proteína C Deficiencia de la proteína S Factor V de Leiden</p> <p><u>ADQUIRIDOS</u> Hiperhomocisteinemia Anticonceptivos orales Terapia de reemplazo hormonal Embarazo Síndrome nefrótico (perdida de antitrombina) Síndrome antifosfolípido</p>
<p style="text-align: center;">DAÑO CAUSADO DIRECTAMENTE EN LA PARED DEL VASO SANGUINEO</p>	<p>Daño endotelial secundario a quimioterapia Hiperhomocisteinemia Vasculitis Síndrome antifosfolípido</p>
<p style="text-align: center;">ESTASIS SANGUINEO</p>	<p>Edad Obesidad Embarazo Sedentarismo</p>

2.7.1 HOMOCISTEINA

El aminoácido sulfurado homocisteina fue descrito por primera vez por Butz y du Vigneaud en 1932. La homocisteina no es un constituyente de la dieta y este no es incorporado en las proteínas, pero es exclusivamente formado como un producto intermediario del metabolismo de la metionina (Nygard, 1999).

Las concentraciones de homocisteina en plasma o suero encontradas en población adulta de Colombia (Bermúdez, 2006) son hasta aproximadamente 17 μ mol/L. Aunque la homocisteina existe en varias formas solamente el 1% se encuentra en la forma reducida (sulfidrilos) y la otra parte es oxidada y existe como varios disulfuros (Nygard, 1999), aproximadamente el 70% es unido a la albúmina y el 30% restante existe como disulfuros libres, en su mayor parte mezcla de disulfuros de homocisteina-cisteina, siendo después distribuida en sangre, en su forma libre y la unida a proteínas (Nygard, 1999).

Un elevado nivel de homocisteina en plasma puede ocurrir como resultado de desordenes hereditarios, los cuales alteran la actividad de las enzimas en las vías de transulfuración y remetilación. Por otro lado se encuentran las deficiencias nutricionales de los cofactores esenciales o sustratos de las enzimas, incluyendo la cobalamina (vitamina B₁₂), folato o la piridoxina (vitamina B₆), los cuales pueden resultar en un bloqueo de las vías metabólicas (Fonseca, 1999).

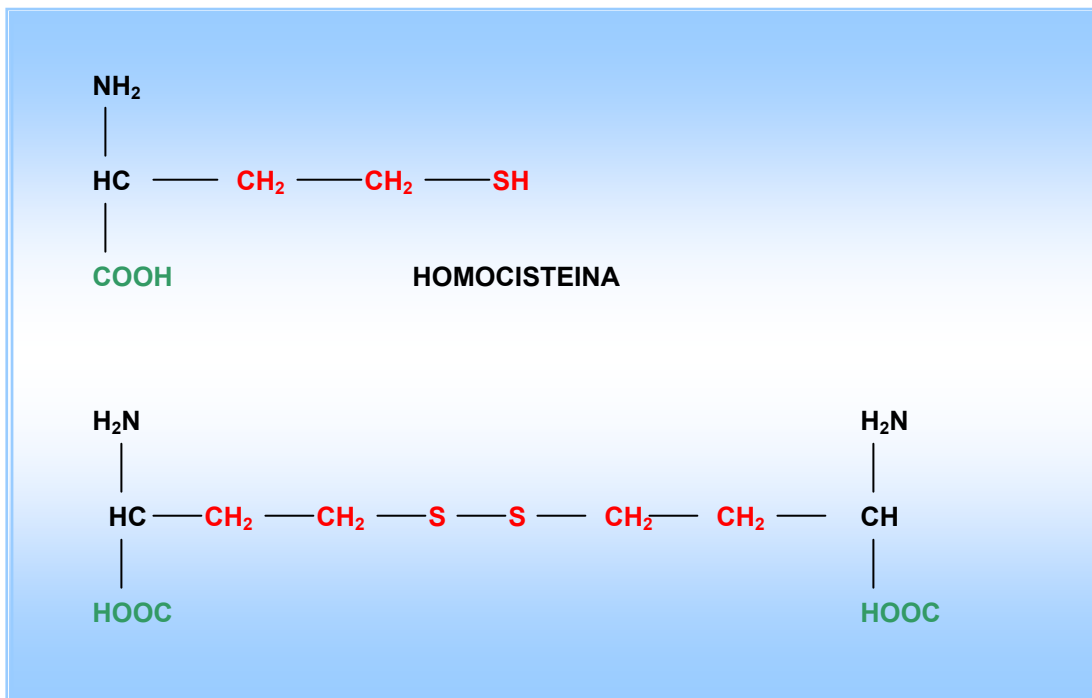


Figura 6: Formula estructural de la homocisteina y homocistina, modificado de Nygard 1999.

Aproximadamente el 70% es unido a la albúmina y el 30% restante existe como disulfuros libres, en su mayor parte mezcla de disulfuros de homocisteina-cisteina, siendo después distribuida en sangre, en su forma libre y la unida a proteínas (Nygard, 1999).

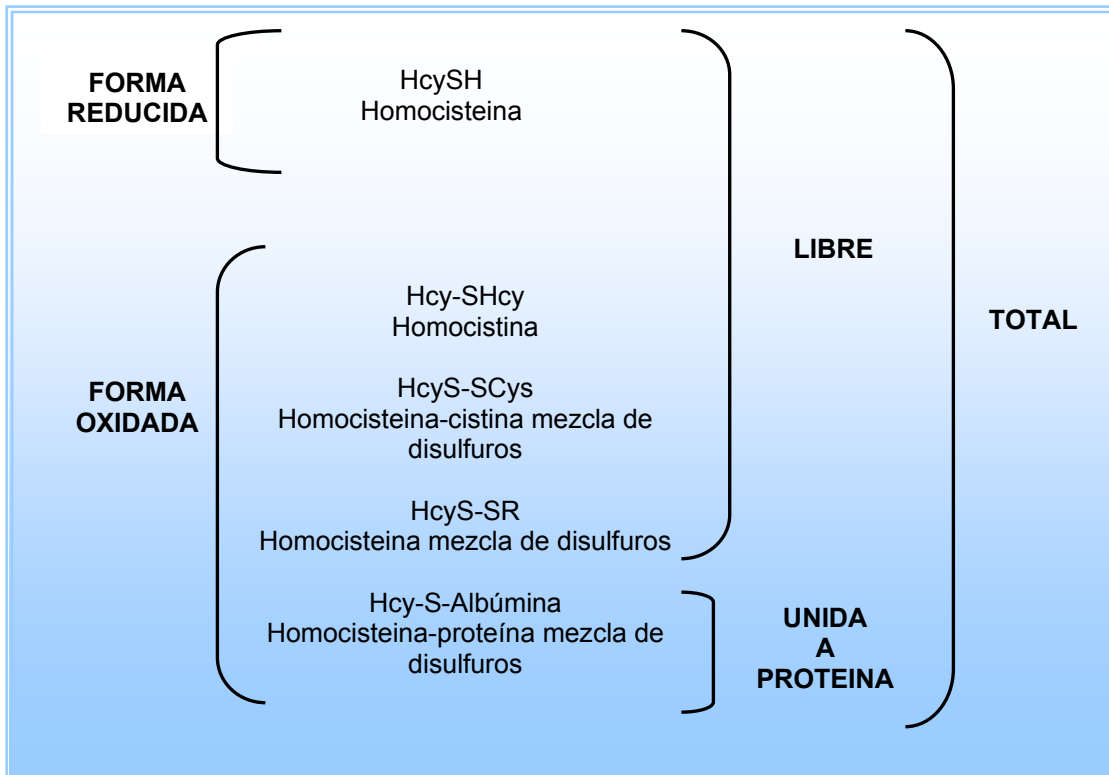


Figura 7. Formas de homocisteína en sangre, modificado de Nygard 1999.

Los niveles de homocisteína total en sangre, se presentan en mayor cantidad en hombres que en mujeres e incrementan con la edad. La diferencia entre los géneros, comienza aparentemente en la pubertad y se cree que es debido a factores hormonales, al estilo de vida, la dieta y el estado de las vitaminas (Nygard, 1999).

2.7.1.2 METABOLISMOS DE LA HOMOCISTEINA

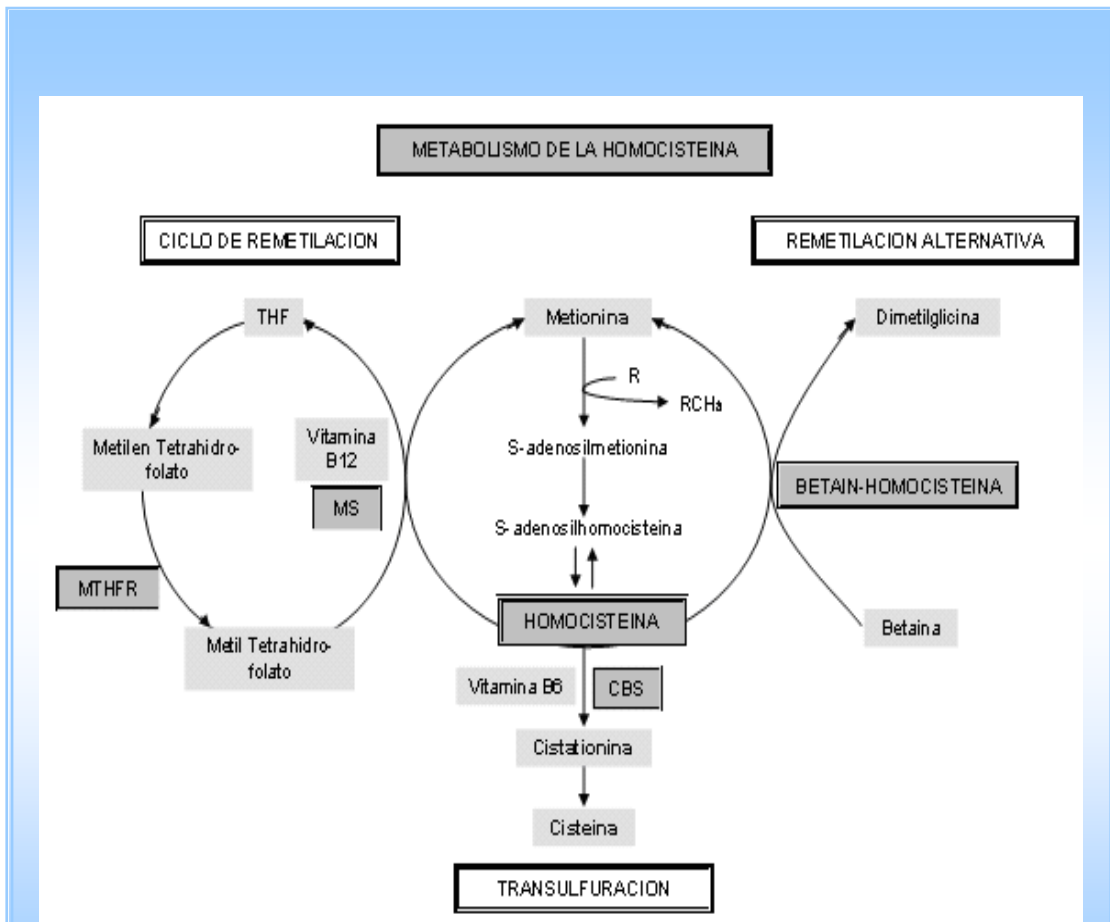
La homocisteína se obtiene como resultado del metabolismo del aminoácido metionina. En este proceso la homocisteína se condensa con la serina de forma irreversible para formar cistationina (reacción 1), esta reacción es catalizada por la CBS y es también dependiente del piridoxal -5'- fosfato (metabolito activo de la vitamina B₆) como un cofactor. La cistationina es

hidrolizada a cisteína por la enzima cistationasa (reacción 2) y es también una reacción dependiente de la vitamina B₆ (Fonseca, 1999; eldibany 2007).

Alternativamente la metionina puede ser reformada por la vía de remetilación cuando el grupo metilo es donado a la homocisteína. En esta vía el 5,10-metilen tetrahidrofolato es convertido a N-5-metil tetrahidrofolato (reacción 3a), en una reacción catalizada por la metilentetrahidrofolato – reductasa (MTHFR), con la riboflavina como un cofactor (Fonseca, 1999; eldibany 2007).

El N-5- metil tetrahidrofolato dona un grupo metilo a la homocisteína en una reacción catalizada por la 5-metilentetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasa (metionina sintasa) y su cosustrato la vitamina B₁₂ (reacción 3b) (Fonseca, 1999; eldibany 2007).

Por otro lado, el grupo metilo puede ser donado por la betaina (reacción 4) en una reacción catalizada por la betaina-homocisteína metiltransferasa, formando dimetilglicina y metionina. La reacción de la betaina-homocisteína no es dependiente ni de la vitamina B₁₂ ni del folato (Fonseca, 1999; eldibany 2007).



THF, Tetrahidrofolato; MTHFR, Metileno-tetrahidrofolato reductasa, MS, Metionina sintasa; CBS, Cistationina-β-sintasa.

Figura 8: Metabolismo de la homocisteína, modificado de Eldibany 2007.

2.7.1.3 HIPERHOMOCISTEINEMIA

La hiperhomocisteinemia es un desorden hereditario caracterizado por un aumento de los niveles de homocisteína en plasma, presentándose en diversas formas, (moderada: de 17 -100µmol/L y severa: > 100µmol/L). Una marcada y moderada elevación de las concentraciones de homocisteína en plasma son asociadas con incremento del riesgo de desarrollar enfermedad vascular oclusiva (D'Angelo, 1997).

La hiperhomocisteinemia es la consecuencia de un metabolismo desequilibrado de la metionina debido a factores genéticos como son las mutaciones en los genes que codifican para las enzimas involucradas en el metabolismo de la metionina (Cistationina Beta Sintasa y la Metilentetrahidrofolato Reductasa) o polimorfismos de estas enzimas o carencias de ácido fólico, vitamina B₁₂ o B₆, enfermedades renales y otras, y varios medicamentos. Este trastorno metabólico es implicado en la patogénesis de la enfermedad aterosclerótica vascular, aunque sea todavía incierto si esta asociación existe, hay también pruebas que muestran que los elevados niveles de homocisteína en plasma están asociados con la trombosis (D'Angelo, 1997). Los niveles elevados de homocisteína en disfunción renal puede ser debido a que los riñones son órganos de gran importancia en el metabolismo de la homocisteína y su disfunción conduce a una hiperhomocisteinemia, relacionándose de esta forma con la neuropatía diabética, una de las grandes complicaciones de esta enfermedad (Biondi-Zoccai, 2003).

Por otro lado las drogas y toxinas pueden producir hiperhomocisteinemia leve a moderada, debido a que interfieren con el metabolismo de las vitaminas. Entre estas encontramos, metotrexato y fenitoina, ambas intervienen en el metabolismo del folato, la teofilina puede interferir con el metabolismo de la vitamina B₆, ciclosporinas, antidiabéticos (metformina), drogas hipolipidémicas, terapia de reemplazo hormonal, anticonceptivos orales y finalmente se encuentra el humo del cigarrillo el cual interfiere en la síntesis del piridoxal fosfato reduciéndose sus concentraciones en suero (Alpert, 1999).

2.7.1.4 GENETICA DE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA

La hiperhomocisteinemia es producida por causas genéticas como son deficiencias en las enzimas que intervienen en el metabolismo del aminoácido metionina. La homocisteína es metabolizada por la vía de transulfuración con las enzimas Cistationina β sintasa (CBS), Cistationasa hasta sulfitos y sulfatos y por la vía de la remetilación con las enzimas Metiléntetrahidrofolato reductasa (MTHFR), Metionina sintasa y Betaína – homocisteína metiltransferasa (Skovby, 1996).

El gen de la enzima CBS tiene 28.046 pares de bases y 23 exones, el cual se encuentra localizado en la región subtelomérica de la banda 21q22. Con el ADN genómico aislado a partir de sangre periférica y usando primers apropiados se han identificado los diferentes polimorfismos genéticos asociados a enfermedad aterotrombótica. Entre estos, el 699 C/T, 1080 C/T y 844 Ins 68 pb, siendo la variante alélica del polimorfismo 699 C/T descrita en población caucásica normal, encontrándose en un estudio de población norteamericana con una prevalencia del 11%. Un análisis adicional encontró asociación significativa entre este polimorfismo y la enfermedad arterial oclusiva prematura (Tsai, 1996; Orendac, 1999).

Sebastio y colaboradores en 1995, describieron en pacientes con hiperhomocisteinemia severa, una mutación en el exón 8 de la CBS, 844 Ins 68pb, la cual consiste en una inserción de 68 pares de bases así: 53 pares de bases del intrón 7 y 15 pares de bases del exón 8, determinando que en estado heterocigoto este no representa un factor de riesgo severo para el desarrollo de enfermedad oclusiva, en contraste con la presencia de este polimorfismo en combinación con la MTHFR variable termolábil (Sebastio 1995; Fonseca 1999; Bermúdez 2006).

Esta inserción, en la cual se crea un splicing alternativo en el intron7-exon8, contiene un codón prematuro de parada (trunca el RNA), el cual no es detectado. Esta mutación ha sido reportada solamente en combinación con la mutación missense 833 T/C, la cual resulta en una mutación benigna debido a que es eliminada a través del splicing alternativo en el intron 7-exon 8 (Fonseca, 1999).

Otra de las enzimas involucradas en la hiperhomocisteinemia es la MTHFR enzima de 77 kDa, la cual es una flavoproteína, inhibida por SAM (Kutzbach, y Stokstad, 1971) y cataliza la conversión de 5,10 metiléntetrahidrofolato a 5 metiltetrahidrofolato. Este metabolito es la mayor forma de circulación del folato el cual en la forma 5 metil, participa en la síntesis de nucleótidos; en la síntesis de Adenosilmetionina, en la remetilación de homocisteína a metionina, metilación del ADN, proteínas de mielina y en la metilación de neurotransmisores (Rosenblatt, 2000).

Este gen esta localizado en el cromosoma 1p36.3 y el cDNA tiene 2.2 kb y 11 exones; entre los polimorfismos descritos está la transición 677 C/T, que resulta en una variante termolábil de la enzima, debido a que la enzima codificada por este alelo tiene una actividad reducida a 37° C. Esta mutación, crea un sitio de restricción y la sustitución de un residuo de alanina por valina en la proteína (Fonseca, 1999; Varga, 2005).

La frecuencia del alelo del polimorfismo 677 C/T, varia ligeramente con la población estudiada, pero aproximadamente el 8% de las poblaciones estudiadas son homocigotos para este polimorfismo. La termo labilidad del polimorfismo de la MTHFR en estados homocigotos es caracterizada por una actividad enzimática en un 30% de lo normal. La enzima es considerada termolábil cuando su actividad es menor al 20% (Fonseca, 1999).

2.7.1.5 GENÉTICA, HIPERHOMOCISTEINEMIA Y SU ASOCIACIÓN CON LA ENFERMEDAD VASCULAR

Las observaciones clínicas y patológicas en pacientes hiperhomocisteinemicos severos (homocistinuria) sugirieron el rol patogénico de la elevación de la homocisteína; debido a que estos pacientes muestran una alta probabilidad de desarrollar enfermedad cardiovascular prematura, en la adolescencia y en la infancia (Nygard, 1999).

Esta observación fue descrita por primera vez en 1969 cuando *McCully y colaboradores*, reportaron placas ateroscleróticas encontradas en la autopsia de dos niñas quienes presentaban elevados niveles de homocisteína en plasma y homocistinuria (Welch, 1998; Nygard 1999).

Posteriormente en 1976, el estudio clínico publicado por Wilchen y Wilchen reporta que los pacientes con enfermedad arterial coronaria presentan altos niveles de la mezcla de disulfuros de homocisteína-cisteína después de la carga de metionina en comparación con los controles (Nygard, 1999).

En 1994, se reporto una alta prevalencia de hiperhomocisteinemia en pacientes con trombosis juvenil, en dos estudios siguientes el valor elevado de homocisteína fue en un 95% de los casos un factor de riesgo para el desarrollo de Trombosis Venosa Profunda. Gracias a la información entregada por diferentes estudios, se ha logrado determinar que pacientes con valores superiores a los 13 μ M/L de homocisteína en plasma, corren el riesgo de desarrollar trombosis venosa o arterial, a pesar de no presentar ningún tipo de alteración en sus factores de coagulación. Por otro lado pacientes con leves aumentos en este valor pueden presentar enfermedad oclusiva venosa o arterial (Eldibany, 2007).

Desde entonces, aproximadamente 100 estudios clínicos y epidemiológicos sobre la relación que existe entre la homocisteína y la enfermedad oclusiva coronaria, cerebral y de las arterias y venas periféricas han sido publicados (Nygard, 1999).

Por otro lado, *Mandel y colaboradores* en 1996, sugirieron que existen otros factores que contribuyen al desarrollo de la trombosis, al observar que el tromboembolismo arterial y venoso ocurría en uno de tres pacientes homocigotos para la homocistinuria (Mandel, 1996). Entre estos factores se encuentra la mutación en el gen que codifica para el factor V (Factor V de Leiden), la cual es la causa más común de trombosis familiar y puede ser un factor potencial para el desarrollo de la enfermedad (Mandel, 1996).

Actualmente la resistencia hereditaria a la actividad de la proteína C es la causa mas frecuente de trombosis familiar. Muchos de los casos de resistencia a la actividad de la proteína C se deben a una mutación en el gen que codifica para el factor V conocida como factor V de Leiden, para lo cual el riesgo de trombosis se incrementa de 50 a 100 veces entre personas homocigotos para el factor V de Leiden y de 5 a 10 veces entre heterocigotos. Muchas de estas personas con la mutación pueden no presentar signos de trombosis a menos que tengan otros defectos genéticos, como lo son, deficiencia de la proteína C y S, o que estén expuestos a otros factores como lo son anticonceptivos orales, embarazo o cirugía (Mandel, 1996).

Por lo tanto encontraron en su estudio que la trombosis (venosa, arterial o ambas) ocurría en menos de la mitad de los pacientes con homocistinuria, los cuales presentaban la mutación del Factor V de Leiden, para lo cual concluyeron que los pacientes con homocistinuria con la presencia del factor

V de Leiden pueden presentar un riesgo incrementado de padecer trombosis (Mandel, 1996).

Sin embargo se contradice la hipótesis de Mandel en donde *Kluijtmans y colaboradores* en 1998, encuentran en su grupo de estudio que cinco de los seis pacientes con homocistinuria que encontraron, quienes presentaron uno o mas eventos tromboticos, no presentan la mutación en el gen que codifica para el factor V, para lo cual concluyen que el factor V de Leiden no es un requerimiento absoluto para el desarrollo de la trombosis (Kluijtmans, 1998).

Desde entonces, se ha considerado el interés en la homocisteina, como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad arterial coronaria, el infarto al miocardio y la enfermedad vascular periférica. Aunque el entendimiento de las diferentes etiologías de la hiperhomocisteinemia difieren debido a la habilidad para discriminar entre los tipos de mutaciones presentes en los desórdenes hereditarios, la habilidad para distinguir entre estados homocigotos y heterocigotos y el reconocimiento de los factores que modifican el metabolismo de la homocisteina (Fonseca, 1999).

Aún no existe consenso en la relación entre los polimorfismos y el desarrollo de la enfermedad vascular. Diferentes autores han relacionado las diferentes mutaciones en las enzimas involucradas en el metabolismo de la homocisteina, asociándolos con una actividad reducida de la CBS; quienes encontraron que los polimorfismos del gen de la CBS, 699 C/T en el exón 6 y 1080 C/T en el exón 10 muestran una asociación con concentraciones elevadas del aminoácido (Bermúdez, 2006).

Para algunos autores como *Gemmatti et al. 1999*, *Kluijtmans et al. 2001* y *Spiroski et al. 2008*, existe una posible asociación entre el polimorfismo 677 de la MTHFR y el hecho de presentar la trombosis venosa, mientras que

Besemer et al. 2007, reportan lo contrario. Así mismo *Franco et al.* 1998, no encuentra asociación alguna entre la trombosis venosa y la 844 Ins 68 pb.

Spiroski et al. en el presente año, en su estudio tomo 226 pacientes de diferentes áreas de la republica de Macedonia entre el año 2003 a 2004, los cuales fueron divididos en tres grupos; pacientes sanos, pacientes con enfermedad arterial oclusiva y pacientes con trombosis venosa profunda. En sus resultados encuentra que la frecuencia del alelo C para el polimorfismo 677 de la MTHFR varía entre 0.575 en los pacientes con trombosis venosa profunda, 0.612 en pacientes con enfermedad arterial oclusiva y 0.645 en pacientes sanos. Por otro lado, encuentra que la presencia del alelo T es baja en los pacientes sanos 0.355 comparado con los pacientes con enfermedad arterial oclusiva 0.388 y con trombosis venosa profunda de 0.425. Observándose una mayor frecuencia del genotipo CT de la MTHFR – 677 en pacientes sanos con una frecuencia del 44.6%, una baja frecuencia del genotipo CC (42.2%) y aun mas baja del genotipo TT (13.2%). En comparación con el grupo de pacientes con enfermedad arterial oclusiva y trombosis venosa profunda el genotipo CT y TT fue incrementado y el CC disminuyo notablemente, confirmando la presencia de los polimorfismos 677 de la MTHFR en la población Macedonia y su posible asociación con la enfermedad arterial oclusiva y la trombosis venosa profunda (Spiroski, 2008).

Kluijtmans et al. en el año 2001, incluyo en su estudio 1857 casos y 2942 controles, tomados en el año 1995 a 1998, con el fin de identificar si existía asociación entre el polimorfismo 677 C/T de la MTHFR y la enfermedad aterotrombotica. Kluijtmans y colaboradores reportan un significativo incremento en la frecuencia del genotipo 677 TT de la MTHFR en los pacientes con enfermedad aterotrombotica y el grupo control. Ellos compararon los genotipos en el grupo de 1857 casos (643: CC, 847: CT, 367: TT) y en los 2942 controles (1252: CC, 1364: CT, 326: TT). Así mismo

al calcular el OR obtuvieron un valor de 1.27. Lo cual fue suficiente para llegar a asociar el genotipo CC y CT con la enfermedad. Siendo el genotipo CC un factor de protección y el CT un factor que incrementa el desarrollo de la enfermedad aterotrombotica (Kluijtmans, 2001)

Gemmati et al. en el año 1999, demuestra la contribución del polimorfismo 677 C/T de la MTHFR, en la enfermedad arterial oclusiva y la trombosis venosa, en un estudio de caso-control incluyendo 160 casos con enfermedad arterial oclusiva y 180 casos con tromboembolismo venoso, y su respectivo grupo control constituido por 200 pacientes sanos. Los resultados mostraron en el grupo control una frecuencia del alelo (TT) en el gen de la MTHFR del 15%, los homocigotos para el alelo normal (CC) 34% y los heterocigotos (CT) fue del 51%. En el grupo de pacientes con trombosis venosa la prevalencia de homocigotos fue de 22.7% y un OR de 1.67, lo cual no difiere significativamente del grupo control. De este grupo se excluyeron 56 pacientes los cuales tenían defectos protromboticos, dando un OR: 2.14, siendo estadísticamente significativo e incrementándose el riesgo de presentar la trombosis venosa (Gemmati, 1999).

Franco et al en el año 1998, en su estudio tomo una población de 101 pacientes diagnosticados con trombosis venosa profunda y 101 pacientes sanos, los cuales fueron apareados por edad, sexo y grupo étnico, pertenecientes al estado de Sao Pablo, Brasil. En su estudio quiso ver la distribución de la 844 Ins 68pb del gen de la CBS, para lo cual encontró 20 heterocigotos (19.8%) y 1 homocigoto (1%) en el grupo de los 101 pacientes diagnosticados con trombosis venosa, siendo la frecuencia del alelo de 0.109. En el grupo control, encontró 17 heterocigotos (16.8%) y 3 homocigotos (3%), observándose una frecuencia del alelo de 0.114. Los datos estadísticos mostraron un OR de 1.0 siendo un factor de riesgo neutral. En el presente estudio se determino la prevalencia de la inserción de la CBS

en pacientes con trombosis venosa y el grupo control, seleccionando un población relativamente joven y quienes no presentaban ningún otro factor de riesgo para el desarrollo de la trombosis, para lo cual concluyen que la prevalencia de la inserción de la CBS es alta en la población brasilera. Aunque la prevalencia encontrada es estadísticamente idéntica en el grupo de casos y el grupo control (OR: 1.0) se considera un factor de riesgo neutral para el desarrollo de la trombosis venosa, por lo tanto este hallazgo disminuye la probabilidad de que la inserción de la CBS sea un factor de riesgo para el desarrollo de la trombosis venosa (Franco, 1998).

Tabla 2. Relación de las mutaciones de las enzimas que intervienen en el metabolismo de la homocisteína y el riesgo de enfermedad vascular, modificado de Fonseca, 1999.

MUTACION	ESTADO DE LA MUTACION	NIVEL DE HOMOCISTEINA	RIESGO DE ENFERMEDAD VASCULAR
CBS (homo)	Funcional	elevado	incrementado
CBS (Hetero)	funcional	normal o elevado	no incrementado
MTHFR (C ₆₇₇ T, homo)	funcional	normal	no incrementado
MTHFR (C ₆₇₇ T, hetero)	neutral	normal	no incrementado
Metionina sintasa (A ₂₇₅₆ G transición)	neutral	normal	no incrementado
Enzimas que interviene en la síntesis de las coenzimas de la cobalamina	funcional	elevado	incrementado

Aunque algunas de estas mutaciones directamente incrementan el riesgo de desarrollar enfermedad arterial o venosa oclusiva, es algo que aun sigue en debate. Muchos de los estudios reportados no evalúan el genotipo de los sujetos en estudio y solamente correlacionan la elevación de los niveles de homocisteína con el riesgo de desarrollar enfermedad vascular oclusiva (Fonseca, 1999).

Malinow y colaboradores en 1997, en su estudio reportaron que al utilizar suplementación con ácido fólico se reduce la homocisteína total en plasma en un 7% en homocigotos para el genotipo C/C y en un 13 o un 21% en sujetos con una o dos copias del alelo T₆₇₇. Por otro lado los homocigotos para el genotipo T/T presentan elevados niveles de homocisteína y bajos niveles de folato en plasma (Malinow, 1997; Brattström, 2000).

Hoy en día los homocigotos para la mutación 677 C/T en la Metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR), muestran concentraciones elevadas de homocisteína en plasma, lo cual ha sido investigado como un factor de riesgo para el desarrollo de la trombosis venosa profunda. Según el estudio de *Kluijtmans y colaboradores* en 1998, quienes estudiaron 24 pacientes con homocistinuria causada por la deficiencia de la CBS en estados homocigotos y lo relacionan con la presencia del Factor V de Leiden y la mutación 677 C/T de la Metilentetrahidrofolato Reductasa, encuentran una alta frecuencia del genotipo T/T de la MTHFR en seis pacientes con homocistinuria, los cuales sufrieron eventos tromboticos. En este grupo tres de los seis pacientes (50%) presentan el genotipo T/T para la MTHFR, lo cual sugiere que aunque el número de individuos sea pequeño la termo labilidad de la MTHFR es un factor importante en el desarrollo de trombosis (Kluijtmans, 1998).

En 1995 *Frosst y colaboradores* demostraron que en homocigotos con el polimorfismo 677 C/T de la MTHFR, se encontraba una asociación significativa con los niveles elevados de Homocisteína. Pero *Nadir y colaboradores*, en su estudio no encontraron una diferencia significativa entre los niveles de homocisteína y los genotipos de la MTHFR (C/C, C/T, T/T), para lo cual concluyen, que la asociación entre homocisteína, vitamina B₁₂, ácido fólico y el polimorfismo 677 C/T de la MTHFR es muy débil (Nadir, 2007).

2.7.1.6 MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA ACCION PERJUDICIAL DE LA HOMOCISTEINA

Los mecanismos involucrados en la acción perjudicial de la homocisteína aun no están completamente esclarecidos, se ha postulado que la homocisteína podría incrementar el estrés oxidativo, limitar la biodisponibilidad del óxido nítrico, estimular la proliferación de células del músculo liso y alterar las propiedades elásticas de la pared vascular (D'Angelo, 1997).

Estos hallazgos sugieren que los niveles de homocisteína elevados provocarían disfunción endotelial conllevando a la activación plaquetaria y del sistema de la coagulación, generando de esta forma un estado protrombótico (D'Angelo, 1997).

Según *Alpert y colaboradores*, La hiperhomocisteinemia produce daño a nivel de las células endoteliales, principalmente a través del mecanismo de oxidación. La oxidación de la homocisteína a homocistina, disulfuros y homocisteína tiolactona produce radicales superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno (Alpert, 1999).

El peróxido de hidrógeno en particular está implicado como una de las principales causas de daño a nivel endotelial, además la homocisteína, la oxalactona en combinación con las lipoproteínas de baja densidad (LDL), promueven en la superficie del endotelio especies reactivas del oxígeno (Alpert, 1999).

Estas especies reactivas del oxígeno contribuyen a la disfunción endotelial, proliferación de células del músculo liso, incremento en los oxicolesteroles aterogénicos, peroxidación de los lípidos y la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (Alpert, 1999).

Por otro lado, el efecto tóxico de las elevadas concentraciones de homocisteína en las células endoteliales, conlleva a un incremento de la adhesión plaquetaria debido al desbalance en el factor de relajación derivado del endotelio, la inducción del factor tisular, las especies reactivas del óxido nítrico, la supresión del heparán sulfato y la estimulación de la proliferación del músculo liso (D'Angelo, 1997).

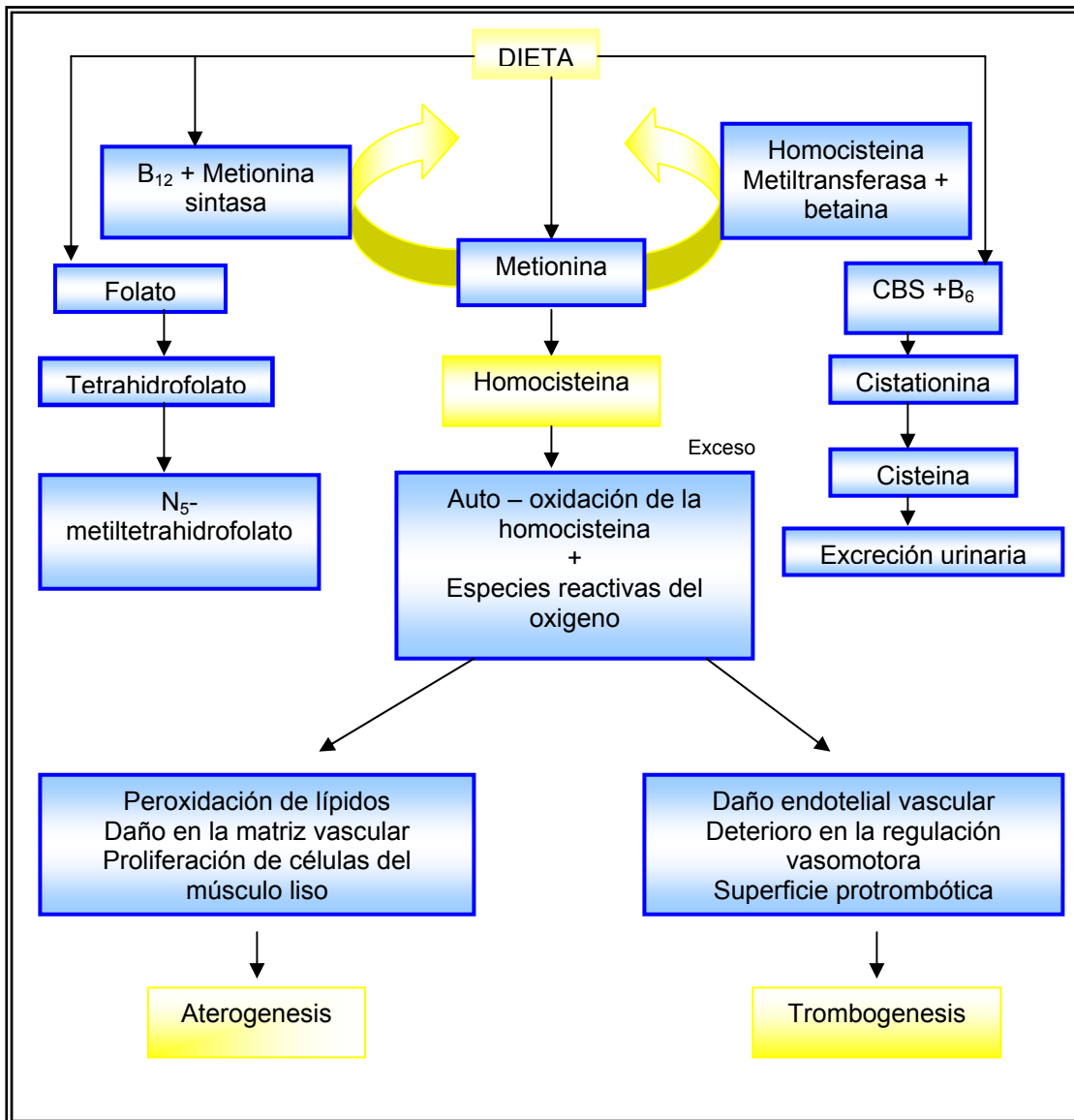


Figura 9. Metabolismo de la homocisteína y posibles mecanismos de la enfermedad aterosclerótica, modificado de Goldhaber 2002.

Recientemente se ha reportado que la homocisteína tiene la capacidad de inducir redes de fibrina más compactas y ramificadas asociadas a una fibrinólisis defectuosa. Esto se explica mediante las complejas vías de la coagulación sanguínea conduciendo en última instancia a la formación del coágulo de fibrina que es precedido por los mediadores de la trombina, en donde el fibrinógeno es convertido a fibrina y la fibrina a factor XIII

activado. Sin embargo la estructura y función del coágulo de fibrina puede variar por diversos factores genéticos y ambientales que regulan el sistema hemostático, su concentración en plasma y la función del fibrinogeno y la trombina (D'Angelo, 1997; Undas, 2006).

Así mismo la homocisteina en conjunto con los factores VII y V incrementa la síntesis del tromboxano B₂ y los niveles de tromboxano A₂ en las plaquetas, disminuyendo la actividad de la proteína C y bloqueando el activador tisular del Plasminógeno (t-PA). Por otro lado la homocisteina suprime la expresión de la trombomodulina, induciendo la expresión del factor tisular y disminuyendo la expresión del heparan sulfato por el endotelio, creando por lo tanto un ambiente protrombotico, promoviendo la formación de fibrina (Alpert, 1999).

Según estudios realizados los coágulos formados del plasma humano incubado in vitro con homocisteina presentan una estructura más compacta que aquellos formados en ausencia de homocisteina, para lo cual sugieren que los niveles de homocisteina en plasma afectan la estructura del coágulo de fibrina, siendo este sensible a la lisis, lo cual puede contribuir a crear un ambiente protrombotico (Undas, 2006).

2.7.2 ENFERMEDAD VASCULAR, HOMOCISTEINA Y DIABETES MELLITUS

La diabetes y las enfermedades metabólicas relacionadas, tales como hiperinsulinemia, resistencia a la insulina y la obesidad, son reconocidas como factores que contribuyen a la morbilidad y mortalidad por enfermedad cardiovascular. Recientemente se ha demostrado el papel significativo e independiente de la inflamación coronaria en la progresión hacia una aterotrombosis (Rudy, 2005).

La diabetes mellitus, ha sido una enfermedad reconocida durante muchos años, como una patología que conduce al desarrollo de varias complicaciones crónicas. Daños en la pared endotelial, hiperglicemia, estrés oxidativo, factores genéticos, desequilibrios en el metabolismo de los lípidos se encuentran en el grupo de las causas de padecer diabetes. Pero, recientes datos sugieren que la homocisteína puede ser un factor de riesgo adicional para desarrollar enfermedad cardiovascular en estos pacientes. (Fonseca, 1999; Rudy, 2005).

Estudios in vivo han demostrado que la diabetes favorece la acelerada progresión a la aterosclerosis, siendo las placas ateroscleróticas las complicaciones más comunes, las cuales representan un gran riesgo en subsecuentes complicaciones. Esto se evidencia en diabéticos quienes mueren repentinamente, los cuales muestran un aumento en la cantidad de placas ateroscleróticas en comparación con pacientes no diabéticos. De hecho otros estudios muestran que los pacientes diabéticos con angina inestable tienen una mayor predisposición a la formación de úlceras, placas ateroscleróticas y formación de trombos (Biondi-Zoccai, 2003).

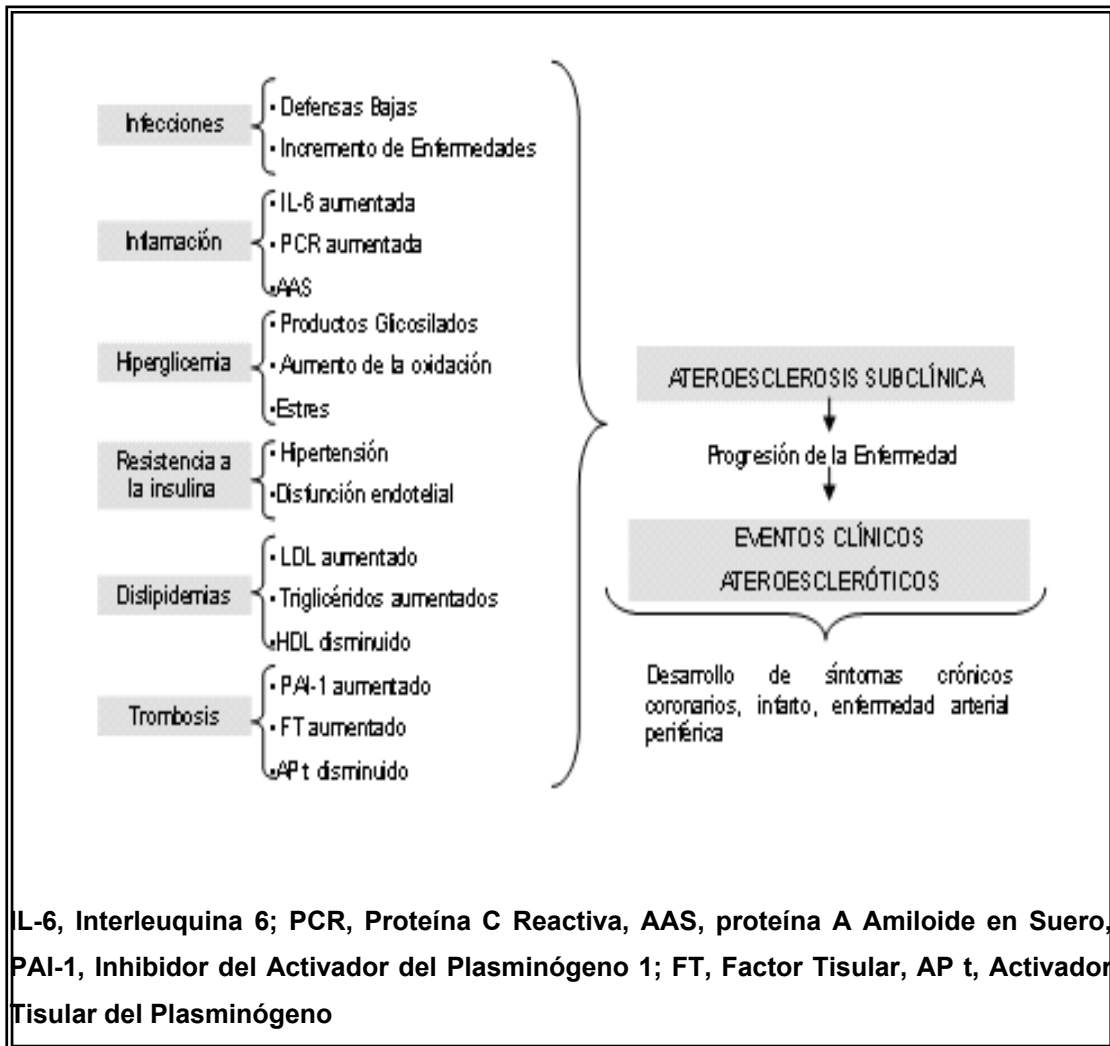


Figura 10. Mecanismos patogénicos involucrados en la iniciación de la aterosclerosis, modificado de Biondi-Zoccai 2003.

Esta aterosclerosis en conjunto con la hipertensión, son una importante causa de elevados niveles de homocisteína en plasma, lo cual conlleva a deterioro en la función renal en estos pacientes. La aterogenesis y la elevación de la presión sanguínea se desarrollan silenciosamente a lo largo de varios años antes de presentarse los eventos vasculares, los cuales conllevaran a un proceso conocido como nefroesclerosis, en el cual se deteriora totalmente la función renal, lo cual es de gran importancia, debido a

Un factor importante en pacientes diabéticos para el desarrollo de aterotrombosis son las anomalías dislipídicas, caracterizadas usualmente porque muestran una disminución de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) con un aumento de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), niveles de colesterol y triglicéridos. En pacientes diabéticos es muy común asociar estas LDL con susceptibilidad a la oxidación, creando un ambiente aterogénico (Biondi-Zoccai, 2003).

Por lo tanto en los diabéticos se presenta una disminución de la actividad antioxidante, un incremento en el estrés oxidativo y la hiperglicemia. Esto se explica mediante las vías de señalización del Oxido Nítrico (NO) y las reacciones de oxidación de los lípidos las cuales son de gran importancia en el mantenimiento de la homeostasia vascular y la progresión hacia la enfermedad vascular, debido a que estas vías envuelven especies de radicales libres (O'Donnell, 2001).

Estudios bioquímicos y de biología celular han definido las múltiples interacciones del Oxido Nítrico (NO) con la oxidación de los lípidos, los cuales pueden conferir protección a nivel vascular o potenciar la respuesta inflamatoria a nivel de la lesión vascular (O'Donnell, 2001).

Las especies de radicales libres del Oxido Nítrico (NO) son mediadoras generadas endógenamente de la relajación del músculo liso e inhibidores de la activación de las plaquetas y leucocitos los cuales son esenciales para el mantenimiento del tono vascular (O'Donnell, 2001).

En muchas patologías vasculares, se ven alteradas las tasas de generación del oxido nítrico, disminuyéndose la señalización de este y secundariamente generando especies tóxicas derivadas del Oxido Nítrico (NO) (O'Donnell, 2001).

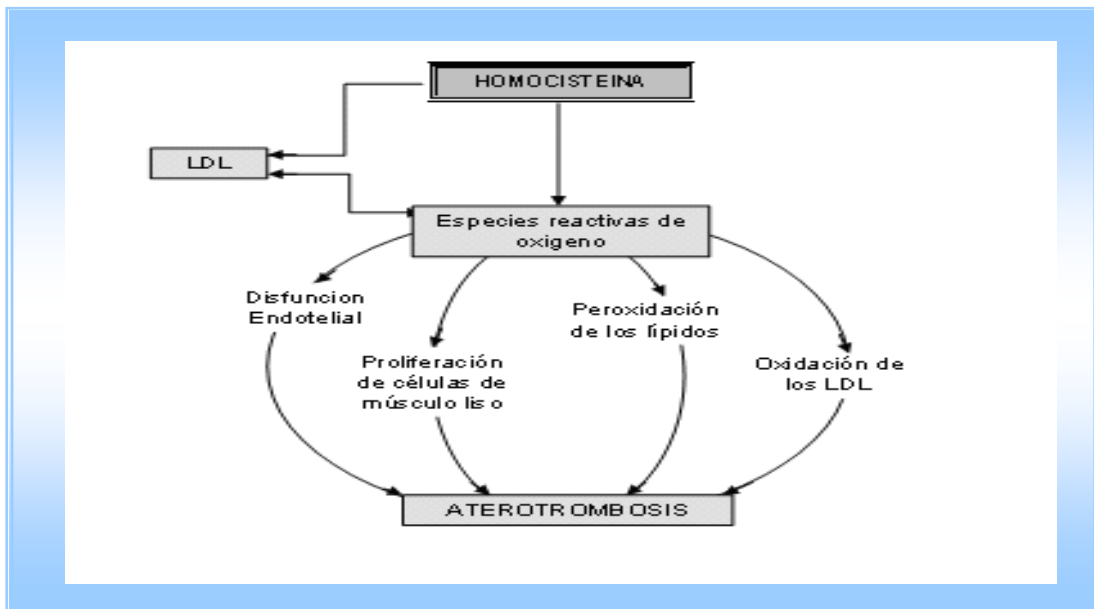


Figura 12. Efectos vasculares de la homocisteína, modificado de Welch 1998.

Por otro lado, característicamente la hiperglicemia en los diabéticos conduce a la glicosilación no enzimática de las macromoléculas comunes, como suele apreciarse a través de la Hemoglobina A1C, conduciendo a la producción de agregados conocidos como AGEp (productos finales de glicosilación avanzada), los cuales están implicados en la modificación de las LDL, su acumulación y la activación de procesos inflamatorios (Biondi-Zoccai, 2003).

De esta forma la oxidación de estos AGEp parece tener un papel importante en la oxidación de los lípidos contribuyendo al ambiente aterogénico en los pacientes diabéticos. La glicosilación de los complejos macromoleculares incrementa el crecimiento no celular de la íntima arterial envolviendo proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, la formación de estos complejos y la disminución en la degradación de los agregados macromoleculares y la discapacidad de las células que han perdido su función causan un

desbalance cuantitativo en los niveles de lípidos, promoviéndose así la formación del ateroma (Biondi-Zoccai, 2003).

Aparte de los factores mencionados anteriormente que están implicados en la aterosclerosis, la diabetes tiene varios efectos protromboticos posiblemente involucrados en la placa aterosclerótica, su progresión y complicación. Entre estos se encuentra la disfunción plaquetaria debido al aumento del catabolismo del ácido araquidónico y la producción creciente de tromboxanos. La diabetes también se asocia con el aumento de niveles de fibrinogeno, factor de Von Willebrand, factor VIII, factor 4 de la plaqueta y nivel de PAI – 1 (Biondi-Zoccai, 2003).

2.7.3 ENFERMEDAD VASCULAR, HOMOCISTEINA E HIPERLIPIDEMIAS

En las hiperlipidemias es característico encontrar, concentraciones de colesterol total en suero elevado, colesterol LDL elevado y bajas concentraciones de colesterol HDL los cuales son todos conocidos como factores de riesgo de padecer enfermedades aterotrombóticas (Doggen, 2004).

Dentro del rol que cumplen las concentraciones de lípidos elevadas en sangre parece ser que los triglicéridos incrementan los niveles del factor VII y del Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI – 1), dándole una consistencia viscosa a la sangre. Las LDL por su parte promueven la activación de las plaquetas y la expresión del factor tisular, así mismo las HDL tienen propiedades anti – aterotrombóticas que pueden resultar en la inhibición de la agregación plaquetaria, reducción de la viscosidad sanguínea, supresión de la actividad del factor tisular y los niveles del activador tisular del plasminógeno (PAI – 1) y aumentan la inactivación del

factor Va por la activación de la proteína C, propiedades que no se cumplen en pacientes predispuesto a sufrir enfermedades vasculares (Doggen, 2004).

Este aumento de los lípidos en sangre, conlleva a la aterosclerosis, enfermedad inflamatoria crónica de las arterias, en la cual los depósitos de sustancias grasas, el colesterol, los productos de desecho celular, y otras sustancias comienzan a formar la placa a nivel del endotelio arterial. Aparte de los convencionales factores de riesgo para el desarrollo de la aterosclerosis, los elevados niveles de homocisteína, son considerados hoy en día, como un factor independiente para el desarrollo de enfermedad cardiovascular (Sharma, 2006).

Diversos mecanismos han sido propuestos, de cómo la homocisteína induce enfermedad cardiovascular, incluyendo alteración en el metabolismo de los lípidos, regulación inadecuada del colesterol, modulación de la expresión de proteínas de la matriz extracelular, respuesta inflamatoria y estrés oxidativo (Sharma, 2006).

La homocisteína, juega un papel importante en la biosíntesis del colesterol, ya que induce la transcripción así como la traslación del 3-hidroxi-metilglutaril-CoA reductasa, enzima importante en la biosíntesis del colesterol, lo cual conlleva a un incremento en la síntesis de colesterol, conllevando a su acumulación en las células endoteliales. Para lo cual se dice, que los elevados niveles de homocisteína resultan en un desbalance en la biosíntesis del colesterol (Sharma, 2006).

Por otro lado, se ha encontrado que la homocisteína induce la expresión de la lipoproteína lipasa (LPL) de los macrófagos. Esta es la principal enzima lipolítica involucrada en la hidrólisis de los triglicéridos en lipoproteínas. Esta es secretada por los macrófagos cuando se producen lesiones

ateroecleroticas, produciéndose en la pared vascular como una proteína pro – aterogénica. Esta enzima media la respuesta de las lipoproteínas por los macrófagos, promoviendo la retención de lipoproteínas de la matriz extracelular, induciendo la expresión de citoquinas proaterogénicas, el incremento de la adhesión de los monocitos a las células endoteliales y la proliferación de células del músculo liso (Sharma, 2006).

2.7.4 ENFERMEDAD VASCULAR, HOMOCISTEINA Y HORMONAS

Uno de los factores de riesgo que ha tomado mayor fuerza con el transcurrir del tiempo especialmente en las mujeres es el consumo de las píldoras anticonceptivas, el cual se ha asociado considerablemente con el incremento de la aparición de los casos de TVP. A principios del año 1960, un poco después de la introducción de la píldora anticonceptiva, comenzaron a aparecer los primeros reportes de casos de trombosis y tromboembolismo pulmonar en mujeres quienes utilizaban la píldora como control de natalidad y subsecuentemente se encontró la asociación entre el infarto del miocardio y ataques al corazón con el consumo de las píldoras anticonceptivas (Martinelli, 1998; Vandenbroucke, 2001).

Fue así, como el uso de los anticonceptivos orales fue asociado por primera vez con la trombosis venosa profunda en el año de 1961 y en el año de 1963 se reporta el primer caso de infarto del miocardio por el uso de anticonceptivos orales. *Rosendaal y colaboradores* en el año 2002, reportaron el caso de embolismo pulmonar en una enfermera quien comenzó a tomar anticonceptivos orales los cuales contenían 100µg de mestranol un derivado del estrógeno, para el tratamiento de la endometriosis (Rosendaal, 2002).

El estrógeno, del cual esta compuesta la píldora, incrementa el riesgo de padecer trombosis venosa profunda cuando se usa como anticonceptivo oral o como terapia de reemplazo hormonal en la postmenopausia. Según estudios de los efectos de los anticonceptivos orales de segunda y tercera generación sobre los factores procoagulantes, anticoagulantes y las vías fibrinolíticas, indican que estos tienen efectos protromboticos. (Vandenbroucke, 2001; Rosendaal, 2002).

Dentro de los efectos protromboticos se incluyen: incremento en los niveles de los factores procoagulantes (VII, X, XI, XIII) y la reducción de los factores anticoagulantes (Proteína S y la antitrombina III) (Martinelli, 1998).

Los anticonceptivos orales tienen efectos en el sistema de la coagulación, dentro de los cuales encontramos la resistencia a la proteína C activada, como se presenta en pacientes con mutación del factor V de Leiden quienes tienen resistencia heredada a la actividad de la proteína C, lo cual indica que los anticonceptivos orales producen una mayor resistencia a la actividad de esta proteína, aunque las bases moleculares de la resistencia adquirida a la actividad de la proteína C no se conocen aun, se cree que los niveles disminuidos de proteína S (cofactor de la actividad de la proteína C) explica parcialmente la resistencia a la actividad de la proteína en personas que consumen anticonceptivos orales (Vandenbroucke, 2001).

Por otro lado, un mecanismo antifibrinolítico implica al inhibidor de la fibrinólisis de la trombina activada (TAIF), el cual cuando se activa inhibe la fibrinólisis retirando los residuos de lisis de la fibrina los cuales son esenciales para la activación del plasminógeno. Estos niveles elevados de TAIF son un factor de riesgo de padecer trombosis venosa (Vandenbroucke, 2001).

Sin embargo, hoy en día se han realizado numerosos estudios acerca del rol que cumplen los cambios hormonales en la regulación del metabolismo de la homocisteína y en causar la hiperhomocisteinemia, debido a que las anormalidades genéticas no explican totalmente el predominio de la hiperhomocisteinemia en pacientes con enfermedad vascular (Fonseca, 1999).

Dudman y colaboradores en el año 1996, sugirieron que la depresión en la actividad de la CBS en estos pacientes, estaba asociado a otras causas diferentes a anormalidades en la proteína. Una explicación alternativa para la depresión de la actividad de la CBS puede ser debida, a una baja regulación en su metabolismo, aunque esto puede ocurrir debido a los cambios hormonales (Fonseca, 1999).

Existen datos que sugieren que el estrógeno tiene un efecto sobre el metabolismo de la homocisteína, aunque el mecanismo no es muy claro, esto es evidente en mujeres embarazadas, en quienes la homocisteína en plasma se disminuye a la mitad comparada con mujeres no embarazadas, sugiriendo un posible efecto del estrógeno sobre este aminoácido (Fonseca, 1999).

Se cree que el estrógeno puede tener efecto sobre la actividad de algunas enzimas que intervienen en el metabolismo de la homocisteína, conllevando al aumento de las concentraciones de la homocisteína en sangre (hiperhomocisteinemia) y por tanto predisponer al desarrollo de la enfermedad vascular oclusiva (Fonseca, 1999).

A partir de esto, diversos investigadores han estudiado el efecto que tiene el estado pre y posmenopáusico con las concentraciones elevadas de homocisteína en plasma. *Wouters y colaboradores* en el año 1995, midieron

las concentraciones de homocisteína en plasma en estados de ayuno y poscarga de metionina en mujeres premenopáusicas y posmenopáusicas sanas sin historia de enfermedad vascular. Las concentraciones de homocisteína en plasma se mostraron elevadas en las mujeres posmenopáusicas en estado de ayuno y poscarga de metionina, para lo cual relacionaron las concentraciones elevadas del aminoácido con el estado hormonal (Fonseca, 1999).

Los niveles elevados de homocisteína después de la menopausia, en parte pueden explicarse por el riesgo elevado de padecer enfermedad cardiovascular que ocurre en esta edad y por el uso de terapia de reemplazo hormonal. Aunque muchos factores de riesgo cardiovascular mejoran con el uso de los estrógenos, se requiere investigaciones que determinen si la incidencia menor de enfermedad vascular en mujeres premenopáusicas se relaciona con la terapia de reemplazo hormonal en las mujeres posmenopáusicas (Fonseca, 1999).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

3.1 FORMULACION DEL PROBLEMA

Las patologías oclusivas vasculares, aterotrombosis, son una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en el mundo occidental y se manifiestan como enfermedad vascular coronaria, accidente cerebrovascular y trombosis venosa. La aterotrombosis es un proceso complejo que cursa de manera crónica y el cual se inicia en las paredes internas de arterias o venas, en el sitio de la lesión endotelial, disminuyéndose por lo tanto la producción de colágeno necesaria para los tejidos, perdiendo la contractilidad de los vasos y contribuyendo a la formación del trombo. En un evento trombotico, se presentan en forma aislada o en asociación factores de riesgo genético o adquirido. Entre estos, los más relevantes son, la diabetes, hiperlipidemias, también pacientes expuestos a diferentes situaciones, como sedentarismo, y la anticoncepción con píldoras y recientemente, otro factor de riesgo ha sido considerado, la hiperhomocisteinemia, alteración metabólica definida como el aumento del aminoácido homocisteína en plasma, condición relacionada con la deficiencia de vitamina B₁₂ y del ácido fólico y con causas genéticas como polimorfismos de genes reguladores del metabolismo del aminoácido metionina; entre estos polimorfismos están 699 C/T, 1080 C/T, 844 inserción 68 pb de la Cistationina β-Sintasa (CBS) y 677 C/T de la Metilentetrahidrofolato-reductasa (MTHFR). Algunos estudios como los de, D'Angelo A, 1997; Welch G, 1998; Varga E, 1995; Eldibany M, 2007, y entre otros, señalan positivamente la existencia de estos polimorfismos con la presentación de la patología, sin embargo otros estudios como los realizados por Franco R, 1998; Bezemer ID, 2007; Nadir Y, 2007; y colaboradores, han encontrado resultados contradictorios.

Por otra parte en Colombia aun no se ha determinado con exactitud como contribuyen los diferentes factores de riesgo en el desarrollo de la TVP, ni si existe relación entre la hiperhomocisteinemia, la trombosis y la presencia de los polimorfismos 699 C/T, 1080 C/T, 844 inserción 68 pb de la Cistationina β -Sintasa (CBS) y 677 C/T de la Metilentetrahidrofolato-reductasa (MTHFR) lo cual dificulta el diseño de estrategias terapéuticas y el control de esta patología.

3.2 JUSTIFICACION

La alta frecuencia de enfermedad vascular en nuestro medio, contribuye de una manera importante a la morbimortalidad constituyéndose en un problema de salud pública. Por esta razón es necesario categorizar los diferentes factores de riesgo que predisponen al desarrollo de la enfermedad vascular y determinar su relación con la presentación de ésta. Estudios epidemiológicos señalan a la hiperhomocisteinemia como factor de riesgo de esta patología, cumpliendo un papel importante en la enfermedad a través del favorecimiento de condiciones protrombóticas. Aunque el mecanismo exacto de la trombofilia producido por hiperhomocisteínemia no se conoce, existen indicios que apoyan la hipótesis de la "respuesta a la lesión endotelial". La hiperhomocisteína provocaría una disfunción endotelial que promueve el desarrollo de la hipercoagulabilidad; esta situación conduce a la necesidad de determinar, si existe relación entre la hiperhomocisteinemia con los polimorfismos 699 C/T, 1080 C/T, 844 inserción 68 pb de la Cistationina β -Sintasa (CBS) y 677 C/T de la Metilentetrahidrofolato-reductasa (MTHFR) en pacientes con antecedentes trombóticos, con y sin hiperhomocisteinemia, lo cual permitirá generar conocimientos sobre si estos polimorfismos son marcadores de susceptibilidad y establecer estrategias terapéuticas de prevención y de control.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la asociación entre homocisteína plasmática y los factores de riesgo de trombosis venosa con los polimorfismos 699C/T, 1080 C/T, 844 inserción 68 pb de la CBS y 677 C/T de la MTHFR en pacientes que han presentado esta patología.

4.2 Objetivos específicos

1. Describir los valores de colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL, colesterol LDL, glucosa y homocisteína basal en los pacientes objeto de estudio y del grupo control.
2. Determinar el grado de riesgo de presentar trombosis venosa a partir de los factores de género, edad, niveles de colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL, colesterol LDL y glucosa, sobre peso, tabaquismo y uso de anticonceptivos con respecto al tiempo de exposición en los pacientes objeto de estudio y grupo control.
3. Identificar y describir los polimorfismos 699 C/T, 1080 C/T, 844 inser 68 pb de la CBS y 677 C/T de la MTHFR en los pacientes objeto de estudio y en el grupo control.
4. Determinar la relación entre los valores séricos de colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL, colesterol LDL, glucosa y homocisteína con los polimorfismos mencionados en los pacientes objeto de estudio y grupo control.

5. Determinar la asociación entre los niveles de homocisteína con los polimorfismos 699 C/T, 1080 C/T, 844 inser 68 pb de la CBS y 677 C/T de la MTHFR en los pacientes objeto de estudio y en el grupo control.

6. Determinar la relación entre sobre peso, tabaquismo y uso de anticonceptivos con los polimorfismos 699 C/T, 1080 C/T, 844 inser 68 pb de la CBS y 677 C/T de la MTHFR en los pacientes objeto de estudio.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN: Se desarrollo una estudio analítico observacional, mediante un estudio de casos y controles, el cual se inicia con la presencia de Trombosis Venosa Profunda o Superficial, siendo este el evento de interés; buscando la asociación entre los factores de riesgo predisponentes a desarrollar la enfermedad (género, edad, hiperlipidemias, diabetes, uso de anticonceptivos e hiperhomocisteinemia), con los polimorfismos 677 C/T de la MTHFR, 699 C/T, 1080 C/T y 844 inser 68 pb de la CBS.

5.1.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTRA: La población universo correspondiente a este estudio, esta conformada por pacientes de la ciudad de Bogotá, diagnosticados con Trombosis Venosa Profunda y/o Superficial, en el Hospital Universitario San Ignacio en el periodo comprendido entre el año 2004 hasta el año 2007, de acuerdo a los criterios de inclusión para seleccionar el grupo de casos.

Fueron incluidos los pacientes que cumplían con los siguientes criterios: Diagnóstico a criterio clínico, con paraclínico positivo por eco-doppler duplex. Así mismo, se excluyeron quienes manifestaron su deseo de no participar en el estudio y pacientes con estados protromboticos (Síndrome Antifosfolipido, Lupus Eritematoso Sistémico, enfermedad hepática y cáncer). El grupo control fue integrado por personas sanas, de la misma edad, sexo y grupo étnico, los cuales han estado expuestos a los posibles factores de riesgo y quienes no han presentado la enfermedad.

El tamaño de la muestra fue obtenido mediante el programa EPIDAT Versión 3.1, con la herramienta tamaño de la muestra para estudios de casos y controles, utilizando la siguiente información:

Confiabilidad: 95 %

Error tipo II ($1 - \beta$): 80%

Proporción de controles expuestos: *27.45 (*Bermúdez et al, 2006*)

Proporción de casos expuestos: 62.99

OR: *4.5 (*Guo et al, 2002*)

Asociación de Casos y Controles: 1:1

Obteniéndose un $n = 33$ casos y 33 controles

***27.45**, dato obtenido del estudio de *Bermúdez et al, 2006*; en donde evaluaban 102 personas voluntarias sanas, de las cuales 28 eran homocigotos T/T para el polimorfismo 677 de la MTHFR, el cual se ha encontrado con mayor frecuencia asociado a las enfermedades atrotromboticas.

***4.5**, dato obtenido del estudio de *Guo et al, 2002*; en donde estudiaron la prevalencia del polimorfismo 677 C/T de la MTHFR y su asociación con la trombosis venosa profunda, en el cual encontraron una frecuencia del genotipo 677 T/T de la MTHFR de 52.38% en el grupo de casos y de 36.25% en el grupo control. La asociación entre la enfermedad y el polimorfismo fue estadísticamente significativa de acuerdo al OR (T/T) encontrado de 4.5 y un valor de $p = 0.01$.

5.1.2 VARIABLES DEL ESTUDIO

Las variables cualitativas que se evaluaron en el estudio corresponden a edad, genero, tabaquismo, sobrepeso y uso de anticonceptivos, los cuales

fueron analizados como variables numéricas discretas, determinando la frecuencia en la cual ocurre el evento, las variables numéricas continuas que se evaluaron corresponden a los datos obtenidos en la medición de homocisteína basal, perfil lipídico y glicemia.

5.2 METODOS

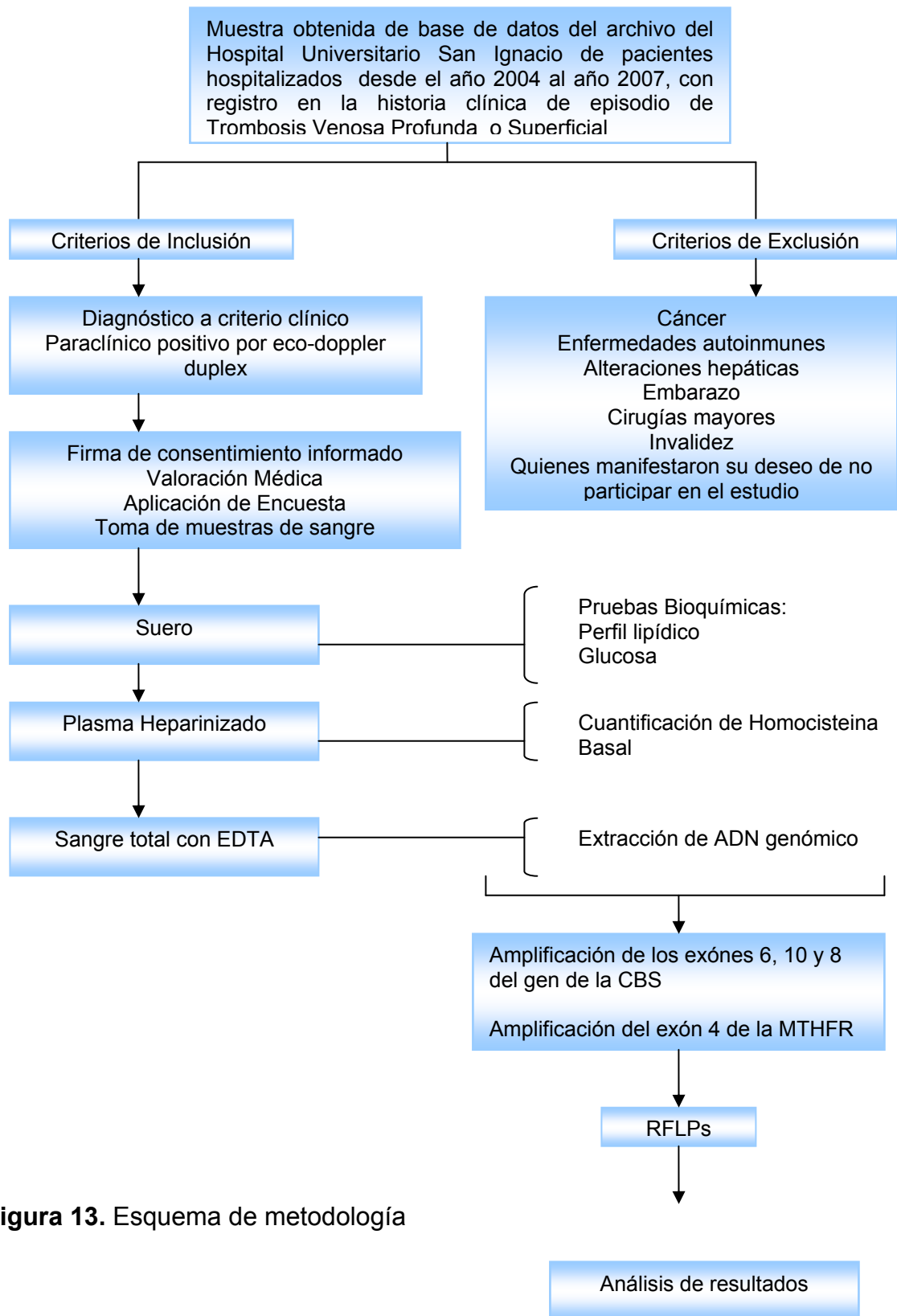


Figura 13. Esquema de metodología

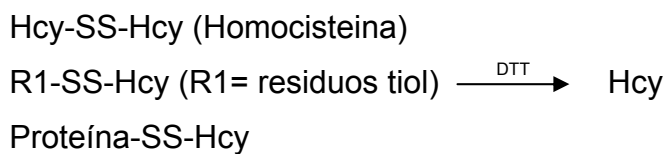
Estudio Bioquímico: Se tomo muestra de sangre para establecer los niveles de homocisteína, perfil lipídico y glucosa básicas. Estudio Molecular: se tomo muestra de sangre en estos pacientes, con el fin de identificar y describir las frecuencias de los polimorfismos 677C/T de la Metilendetrahidrofolato Reductasa (MTHFR) y los 699C/T, 1080C/T y 844Inser 68 de la enzima Cistationina β - Sintasa (CBS).

ESTUDIO BIOQUIMICO:

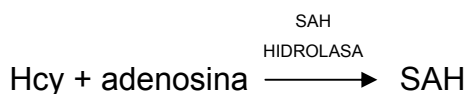
5.2.1 Cuantificación de homocisteína total plasmática

El ensayo de la homocisteina IMX es basado en el inmunoensayo de polarización fluorescente (FPIA). La homocisteina unida a proteínas (forma oxidada) es reducida a homocisteina libre y esta homocisteina libre es enzimáticamente convertida a S-adenosil-L-homocisteina (SAH) como se muestra en la siguiente reacción:

Reducción: la homocisteina y la mezcla de disulfuro y la forma unida a proteínas de la Homocisteina presente en la muestra son reducidas a la forma libre por el uso del ditioneitol (DTT).

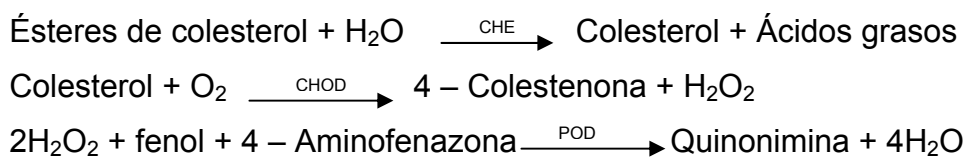


Conversión enzimática: la homocisteina total libre, es convertida a S-adenosil-L-homocisteina (SAH) por el uso de SAH hidrolasa y exceso de adenosina.



5.2.2 Determinación cuantitativa de colesterol (Colesterol oxidasa peroxidasa)

Este método parte de la hidrólisis inicial de los ésteres de colesterol, seguida de una conversión enzimática de colesterol libre resultante. El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:

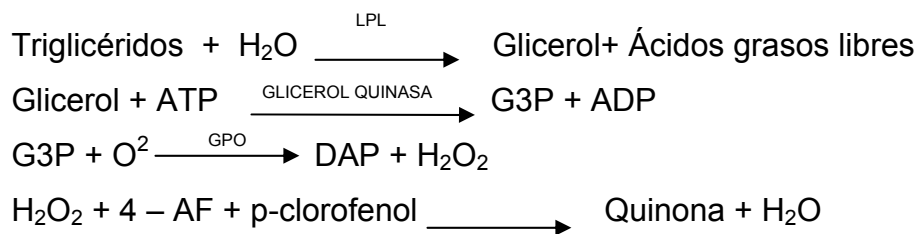


Si el indicador oxidado es coloreado, se mide mediante un espectrofotómetro. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada (Salve, 1997; Spinreact S.A, 2006).

5.2.3 Determinación cuantitativa de triglicéridos (Glicerol fosfato deshidrogenasa – peroxidasa)

Los triglicéridos incubados con lipoproteinlipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) por GPO.

Al final, el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra ensayada (Salve, 1997; Spinreact S.A. 2006).

5.2.4 Determinación cuantitativa de colesterol HDL (Fosfatidilcolina/Mg-colesterol oxidasa/peroxidasa)

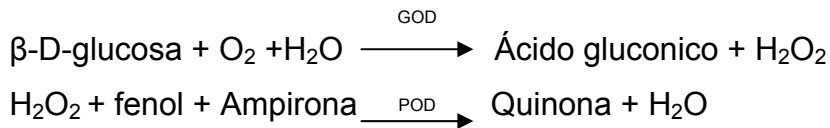
El método más extendido consiste en eliminar las lipoproteínas que contiene apo B (quilomicrones, VLDL, LDL y Lp(a)) mediante precipitación, y medir posteriormente el colesterol en el sobrenadante. El método se basa en las propiedades de un detergente que solubiliza solo la fracción HDL, de forma que el cHDL se libera reaccionando con la colesterol esterasa, la colesterol oxidasa y los cromógenos (salve, 1997).

Las lipoproteínas LDL, VLDL y quilomicrones son inhibidas debido a la adsorción del detergente en sus superficies haciéndolas resistentes a la enzima. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de la muestra (Salve, 1997, Spinreact S.A, 2006).

5.2.5 Determinación cuantitativa de glucosa (Glucosa oxidasa/peroxidasa)

Se basa en la oxidación de la glucosa por la enzima glucosa oxidasa, reacción en la que se consume oxígeno y se genera peróxido de hidrógeno. La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de la glucosa a ácido

glucónico. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD):



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada (Salve, 1997; Spinreact S.A, 2006).

ESTUDIO MOLECULAR:

5.2.6 Extracción de DNA genómico (Método de Probé)

Anexo 11. 1

5.2.7 Amplificación del DNA

Polimorfismo 677C/T del gen MTHFR: para el estudio del polimorfismo se amplificó el exón 1 y se utilizaron los primers: forward: 5' TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA3' y reverse: 5' AGGACGGTGCGGTGAGTG3' con las siguientes condiciones experimentales de PCR: un ciclo de 4 minutos a 95° C, 35 ciclos con las siguientes condiciones; 30 segundos a 95° C, 1 minuto a 62° C, 30 segundos a 72° C y un ciclo final de 4° C (Bermúdez, 2006). **Anexo 11. 2**

Polimorfismo 699C/T del gen de la CBS: para el estudio del polimorfismo se amplificó el exón 6 con los primers: forward 5' CAGCAACCCCCTGGCTCAGT3' y reverse 5' CAGCCATGCCCTGTGTTTGCTATT3' con las siguientes condiciones experimentales de PCR: un ciclo de 3 minutos a 95° C, 35 ciclos con las

siguientes condiciones; 1 minuto a 92° C y 1 minuto a 64° C, un ciclo de 30 segundos a 72° C, un ciclo de 7 minutos a 72° C y un ciclo de finalización a 4° C (Bermúdez, 2006). **Anexo 11.3**

Polimorfismo 1080C/T del gen de la CBS: para el estudio del polimorfismo se amplifica el exon 10 con los primers: forward 5' CAGTGCCACCCAGCTCATTA3' y reverse 5' GGCCTCCTCCCCTCCCAGTTCT3', con las siguientes condiciones experimentales de PCR: un ciclo de 20 segundos a 95° C, 35 ciclos con las siguientes condiciones; 5 segundos a 95° C, 30 segundos a 69° C y 40 segundos a 68° C, un ciclo de 10 minutos a 68° C y un ciclo de finalización a 4° C (Bermúdez, 2006). **Anexo 11.4**

844 Inserción 68 pb del gen de la CBS: para la amplificación del exon 8 se utilizaron los primers: forward 5' CCGCAGGGTGGTCTGTCTGGACTG3' y reverse: 5' AGCCCCACTCAGCATCCGTGTGAC3', con las siguientes condiciones de PCR: un ciclo de 2 minutos a 94° C, 35 ciclos con las siguientes condiciones; 10 segundos a 94° C, 25 segundos a 66° C, 30 segundos a 72° C, un ciclo de 5 minutos a 72° C y un ciclo final de 4° C (Bermúdez, 2006). **Anexo 11.5**

5.2.8 Digestión enzimática de productos amplificados

Polimorfismo 677 de la MTHFR: se obtuvo un producto de 198 pares de bases que no es cortado por la enzima de restricción *Taq I*. La presencia del polimorfismo crea sitio de restricción y se generaron los fragmentos 177 y 21 pares de bases que se separaron en gel de poliacrilamida (Bermúdez, 2006)

Anexo 11. 6

Polimorfismo 699 de la CBS: se obtuvo un fragmento de 289 pares de bases, al digerir con la enzima de restricción *RsaI* y separar los productos en gel de poliacrilamida se obtuvieron los fragmentos de 177,92 y 20 pares de bases cuando el genotipo es C/C y, 177 y 112 pares de bases cuando el genotipo es T/T (Bermúdez, 2006). **Anexo 11.7**

Polimorfismo 1080 de la CBS: se obtuvo un fragmento de 465 pares de bases, al digerir con la enzima de restricción *BstUI* y separar los productos en gel de poliacrilamida se observaron fragmentos de 219, 178, 69 y 20 pares de bases cuando el genotipo es C/C, el polimorfismo T, hace que se pierda un punto de corte con la enzima de restricción produciendo los fragmentos 246 y 219 (Bermúdez, 2006). **Anexo 11.8**

Polimorfismo 844 Ins 68 pb: se obtuvo un fragmento de 252 pares de bases al separar los productos en agarosa al 2%, cuando esta presente la inserción de 68 pares de bases y de 184 pares de bases en ausencia de esta (Bermúdez, 2006).

5.3 RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

La información, fue recolectada mediante formatos previamente estandarizados, verificados, para determinar la claridad en el planteamiento de las preguntas citadas, el orden de estas, el lenguaje utilizado, y la codificación de las alternativas de respuesta para las preguntas de tipo cerrado.

El cuestionario aplicado interrogó acerca de, datos clínicos como: presentar diabetes, manejar valores elevados en el perfil lipídico, tabaquismo, sobrepeso, uso de anticonceptivos y casos de trombosis venosa en familiares, manejando tipos de variables cualitativas y sus correspondientes códigos de respuesta.

5.4 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Los resultados fueron analizados por género y edad. Se realizó estadística descriptiva (promedios, desviaciones estándar, rangos e intervalos de confianza para las variables numéricas y porcentajes de evento para las variables categóricas). Así mismo, se realizó el análisis entre las categorías de riesgo y la presencia de los polimorfismos, mediante el cálculo del *odds ratio* (OR), prueba de χ^2 y el planteamiento de pruebas de hipótesis con el fin de determinar si existe o no asociación entre las variables y el presentar la enfermedad.

6. RESULTADOS

6.1 DESCRIPCION DE RESULTADOS BIOQUIMICOS

Se estudio una población de 33 individuos con trombosis venosa profunda y/o superficial, diagnosticados en el Hospital Universitario San Ignacio y 33 individuos sanos pertenecientes a la ciudad de Bogota, Colombia. Cada grupo conformado por 26 mujeres y 7 hombres apareados 1:1 por rangos de edad. Por medio de encuestas se obtuvo información sobre el habito de fumar, sobrepeso y uso de anticonceptivos, con previa firma del consentimiento informado.

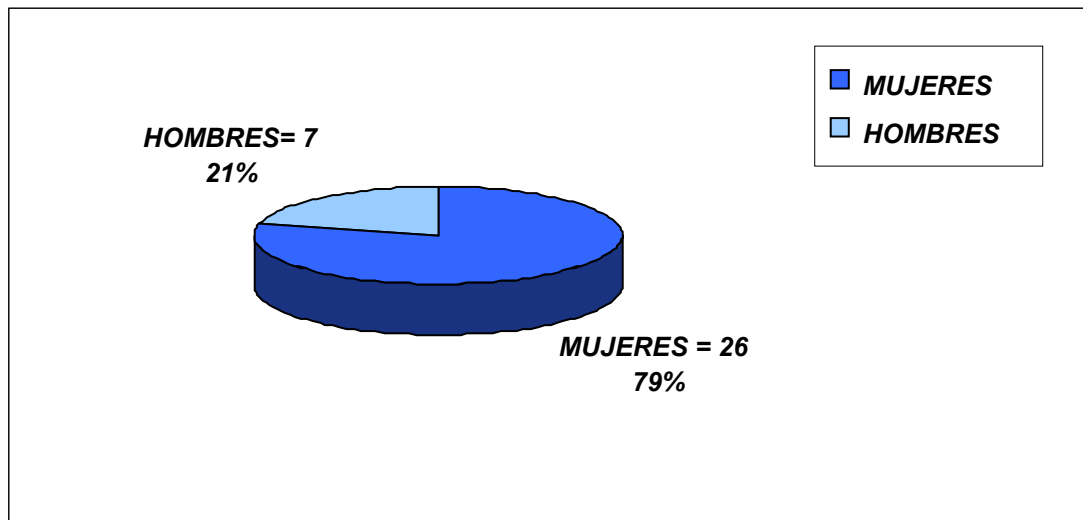


Figura 14. Población de estudio.

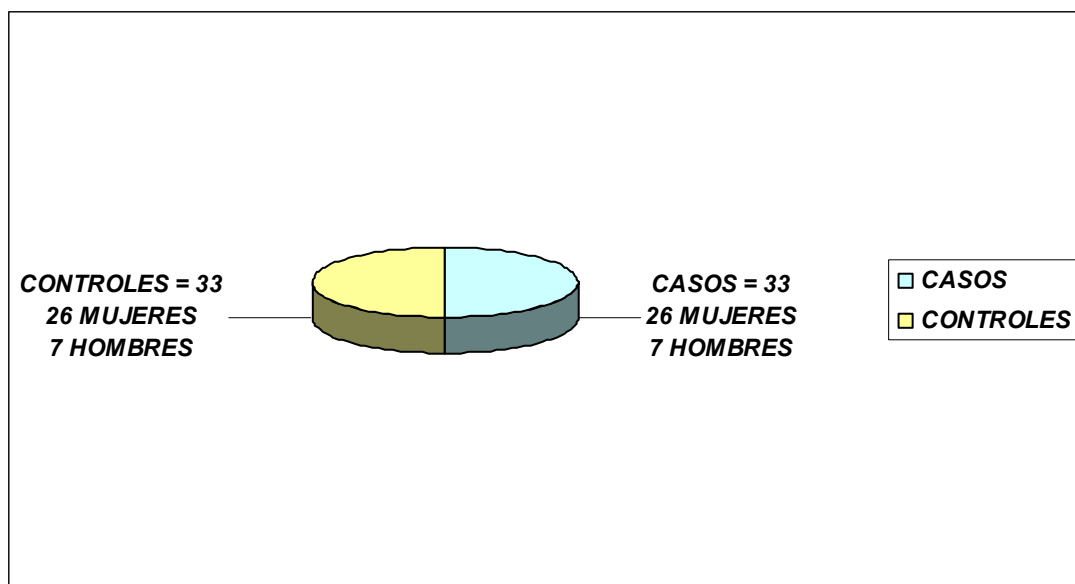


Figura 15. Población casos y controles.

Se cuantificaron los niveles de colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL, colesterol LDL, glucosa y homocisteína en los pacientes objeto de estudio y el grupo control.

En la **tabla 3** Se muestran los resultados de las variables en términos de la media, coeficiente de variación y desviación estándar. El nivel medio de colesterol total en el grupo de casos fue de 212.5 con un intervalo de confianza del 95% (188 – 237) y para el grupo control fue de 182,7 con un intervalo de confianza del 95% (170 – 196). El nivel medio de triglicéridos en el grupo de casos fue de 123.3, con un intervalo de confianza (99.4 – 147.2) y el del grupo control fue de 94.1 con un intervalo de confianza del 95% (81.1 – 107.1). El nivel medio de colesterol HDL en el grupo de casos fue de 45.7 con un intervalo de confianza del 95% (40.5 – 50.9) y el del grupo control fue de 47,9 con un intervalo de confianza del 95% (43.7 – 52). El nivel medio de colesterol LDL en el grupo de casos fue de 142.1 con un intervalo de confianza del 95% (116.7 – 167.5) y el del grupo control fue de 115.8 con un intervalo de confianza del 95% (103.9 – 127.7). El nivel medio de glucosa

en el grupo de casos fue de 95.9 con un intervalo de confianza del 95% (84.7 – 107.2) y el del grupo control fue de 90.6 con un intervalo de confianza del 95% (83.8 – 97.4). El nivel medio de homocisteína en el grupo de casos fue de 10 con un intervalo de confianza del 95% (8.1 – 11.9) y el del grupo control fue de 9.9 con un intervalo de confianza (8.7 – 11.1). Al comparar los valores de la media para colesterol total, triglicéridos, cLDL, en el grupo de casos y en el grupo control se observó una diferencia estadísticamente significativa, siendo los niveles mayores para el grupo de los casos.

Tabla 3. Comparación entre el perfil lipídico, glucosa y homocisteína grupo de casos y controles.

	COLESTEROL TOTAL mg/dl	TRIGLICERIDOS mg/dl	COLESTEROL HDL mg/dl	COLESTEROL LDL mg/dl	GLUCOSA mg/dl	HOMOCISTEINA μmol/l
MEDIA CASOS	212,5	123,3	45,7	142,1	95,9	10,0
MEDIA CONTROLES	182,7	94,1	47,9	115,8	90,6	9,9
DS CASOS	60,0	58,5	12,8	62,1	27,6	4,7
DS CONTROLES	31,8	36,5	10,2	29,2	16,6	3,0
CV CASOS	28,2	47,4	35,8	46,7	31,3	29,4
CV CONTROLES	17,4	39,1	21,2	25,2	18,3	29,9
IC CASOS	188 - 237	99.4 - 147.2	40.5 - 50.9	116.7 - 167.5	84.7 - 107.2	8.1 - 11.9
IC CONTROLES	170 - 196	81.1 - 107.1	43.7 - 52	103.9 - 127.7	83.8 - 97.4	8.7 - 11,1
Valor de P	0.0142	0.0183	0.43	0.031	0.34	0.94

Al comparar los dos grupos se encontró que en general el grupo de casos presenta un promedio superior para el colesterol total, triglicéridos, colesterol LDL y glucosa con excepción del colesterol HDL y la homocisteína como se muestra en la **figura16**.

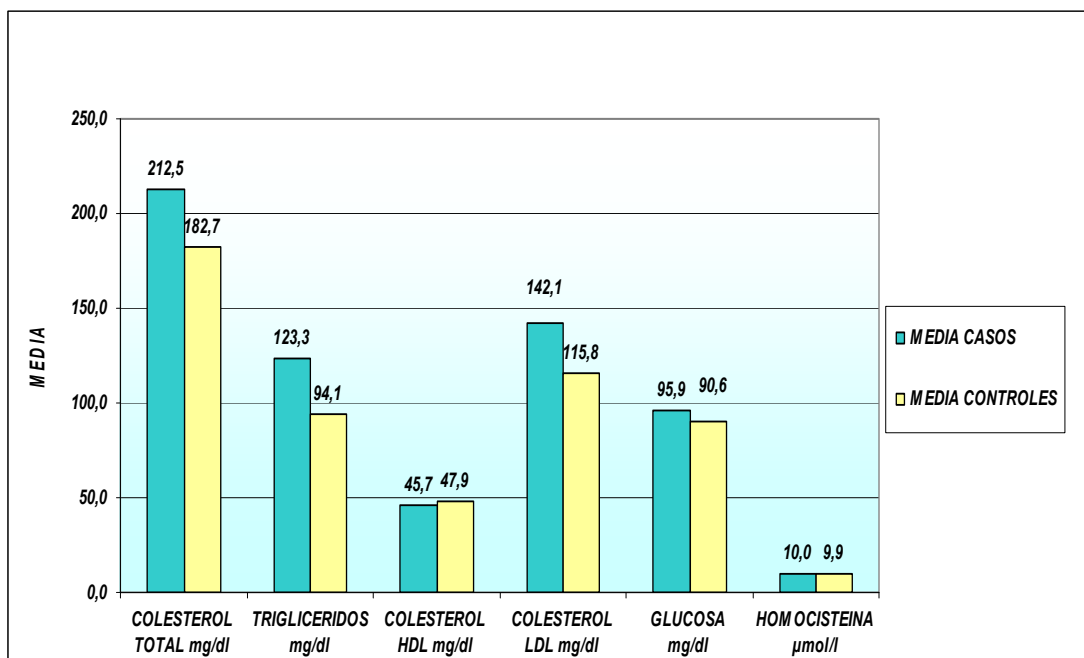


Figura 16. Promedios perfil lipídico, glucosa y homocisteina grupo de casos y controles.

Se encontró que el grupo de estudio es más variable (disperso), con relación a las variables de estudio con excepción de la homocisteina observándose un valor de 29,4 en el grupo de casos y 29,9 en el grupo control como se muestra en la **figura 17**.

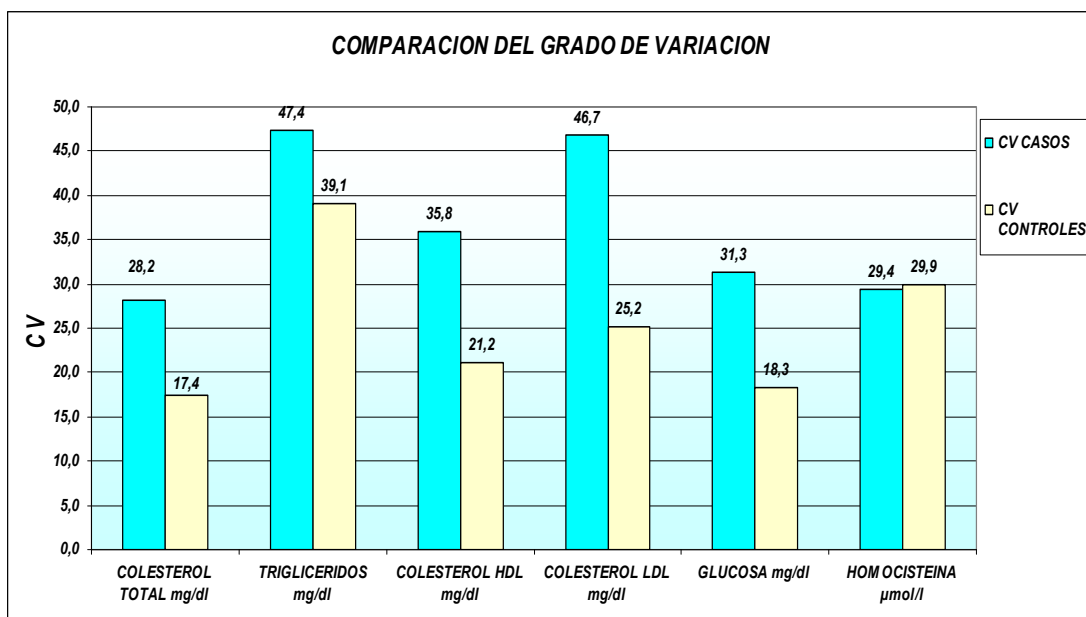


Figura 17. Comparación del grado de variación entre el perfil lipídico, glucosa y homocisteína grupo de casos y controles.

Al comparar los niveles de colesterol total en los individuos con trombosis venosa se encontró que el 12.1% de los hombres presentaron un nivel deseable mientras que el 9% presentaron un nivel alto como se muestra en la **figura 18**. El 45.4% de las mujeres presentaron un nivel deseable y el 33.3% ($p= 0.40$) presentaron un nivel alto como se muestra en la **figura 18**. En las mujeres con trombosis no hay diferencia significativa en las categorías de los niveles de colesterol total.

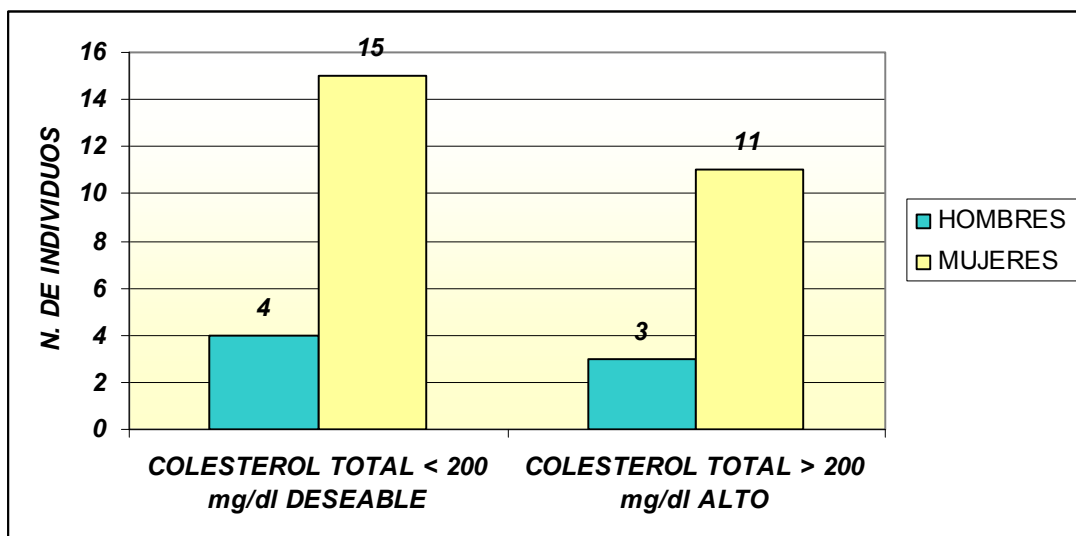


Figura 18. Trombosis venosa vs colesterol total y genero.

Con respecto a la edad, el 39.3% de los menores de 50 años presentaron un nivel de colesterol total deseable mientras que el 9% presentaron un nivel elevado ($p=0.001$). En los mayores de 50 años el 18.2% presentaron un nivel deseable y el 33.3% presentaron un nivel alto como se muestra en la **figura 19**. ($p= 0.17$) Es decir los niveles de colesterol que fueron observados en el grupo de casos tienden a aumentar con la edad.

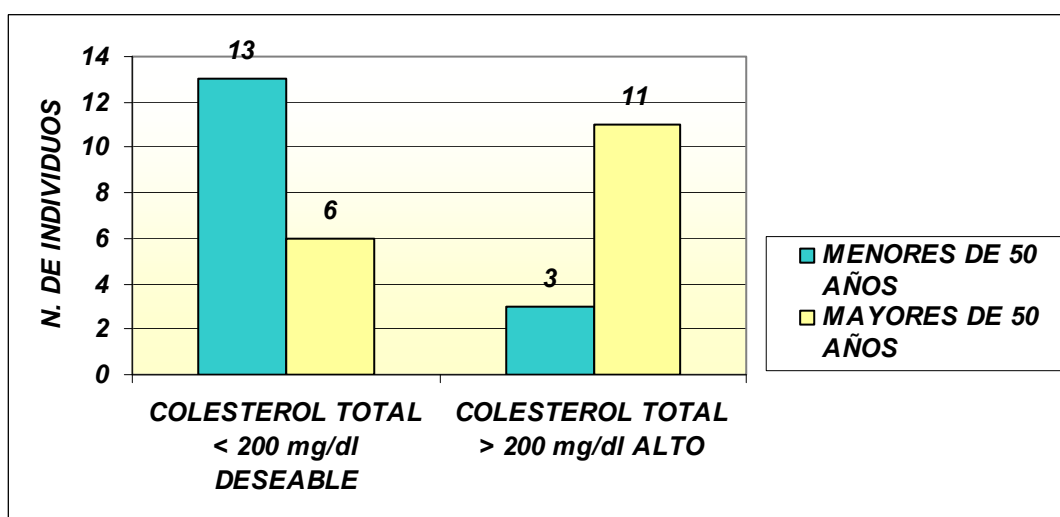


Figura 19. Trombosis venosa vs colesterol total y edad.

Al comparar los niveles de triglicéridos en los individuos con trombosis venosa se encontró que el 9% de los hombre presentaron un nivel deseable y el 12.1% presentaron un nivel de alto ($p=0.012$). El 69.7% de las mujeres presentaron un nivel deseable y el 9% un nivel alto como se muestra en la **figura 20**. ($p=0.0004$). En los menores y mayores de 50 años el nivel de triglicéridos está en el nivel deseable como se muestra en la **figura 21**. Es decir los triglicéridos no aumentan de forma significativa con la edad en el grupo de los casos.

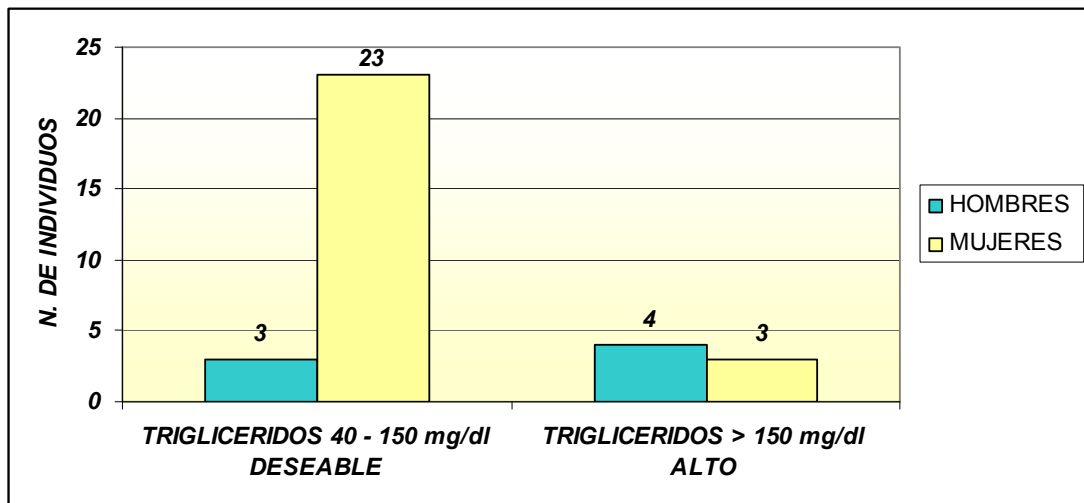


Figura 20. Trombosis venosa vs triglicéridos y genero.

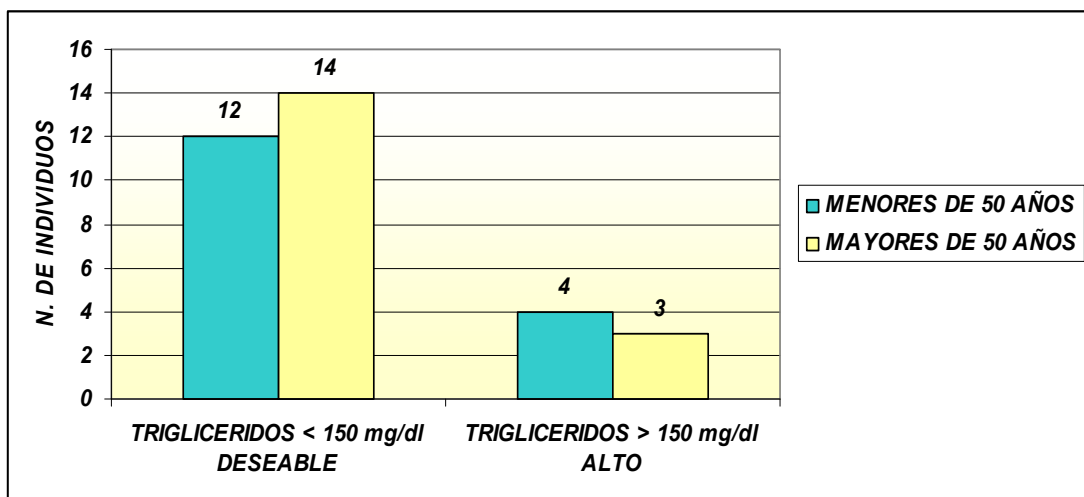


Figura 21. Trombosis venosa vs triglicéridos y edad.

Al comparar por edad, se encontró que el 36.3% de los menores de 50 años presentaron un nivel de triglicéridos deseable mientras que el 12.1% presentaron un nivel alto. En los mayores de 50 años el 42.4% presentaron un nivel deseable mientras que el 9% presentaron un nivel alto como se muestra en la **figura 21**.

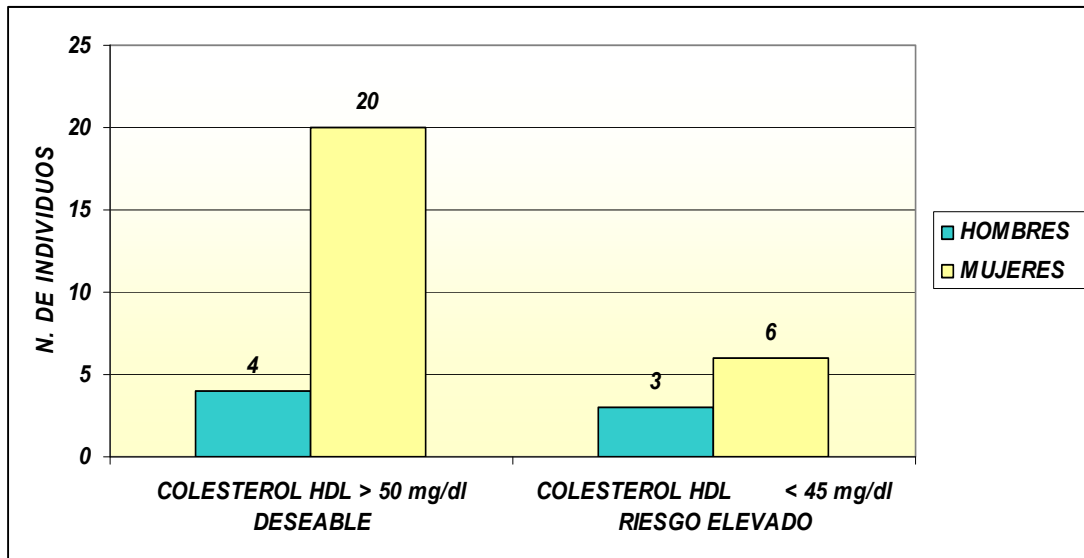


Figura 22. Trombosis venosa vs colesterol HDL y genero.

Al comparar los niveles de colesterol HDL en los individuos con trombosis venosa, se encontró que el 12.1% de los hombres presentaron un nivel deseable mientras que el 9% de los hombres presentaron un riesgo elevado. El 60.6% de las mujeres presentaron un nivel deseable mientras que el 18.1% de las mujeres presentaron un riesgo elevado como se muestra en la **figura 22**. Al comparar por edad el 42.4% de los menores de 50 años presentaron un nivel deseable mientras que el 6% presentaron un riesgo elevado ($p=0.001$). En los mayores de 50 años el 24.2% presentaron un nivel deseable mientras que el 27.2% ($p=0.9$) presentaron un riesgo elevado como se observa en la **figura 23**. Es decir la edad si influye en los niveles del cHDL en el grupo de los casos.

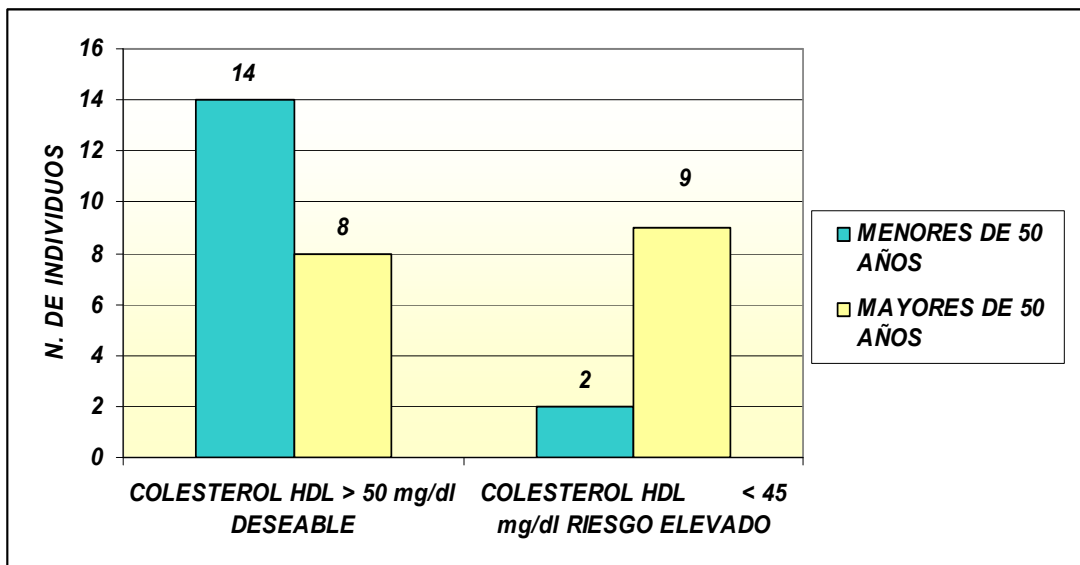


Figura 23. Trombosis venosa vs Colesterol HDL y edad.

Al comparar los niveles de colesterol LDL en los individuos con trombosis venosa se encontró que el 12.1% de los hombres presentaron un nivel deseable mientras que el 9% presentaron un nivel alto. El 60.6% de las mujeres presentaron un nivel deseable el 18.2% presentaron una ($p=0.001$) nivel alto como se muestra en la **figura 24**.

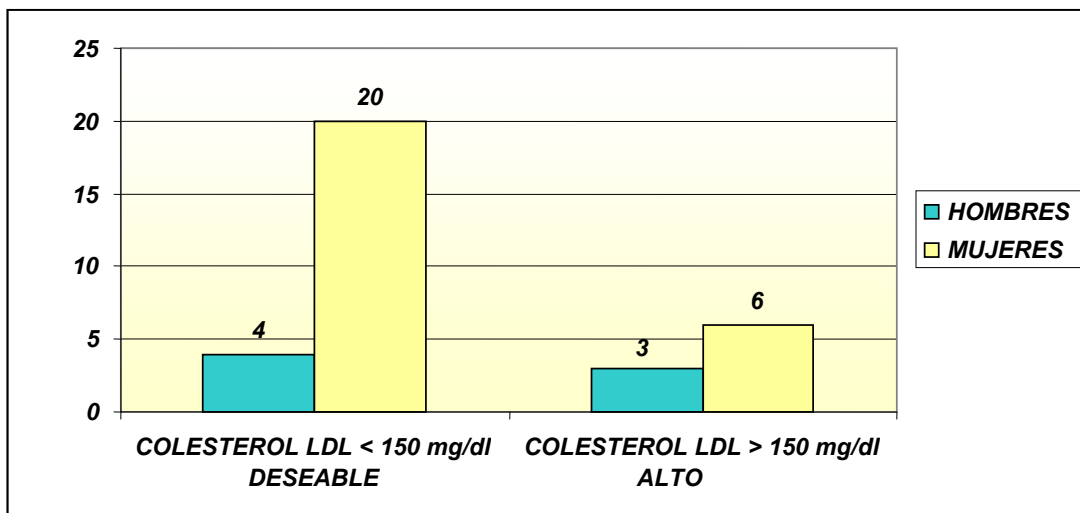


Figura 24. Trombosis venosa vs colesterol LDL y genero.

Al comparar los niveles de colesterol LDL con la edad, se encontró que el 42.2% de los menores de 50 años presentaron un colesterol LDL deseable y el 6% un nivel alto ($p=0.0001$). En los mayores de 50 años el 24.2% presentaron un nivel deseable mientras que el 27.2% presentaron un nivel alto como se muestra en la **figura 25**. ($p=0.9$).

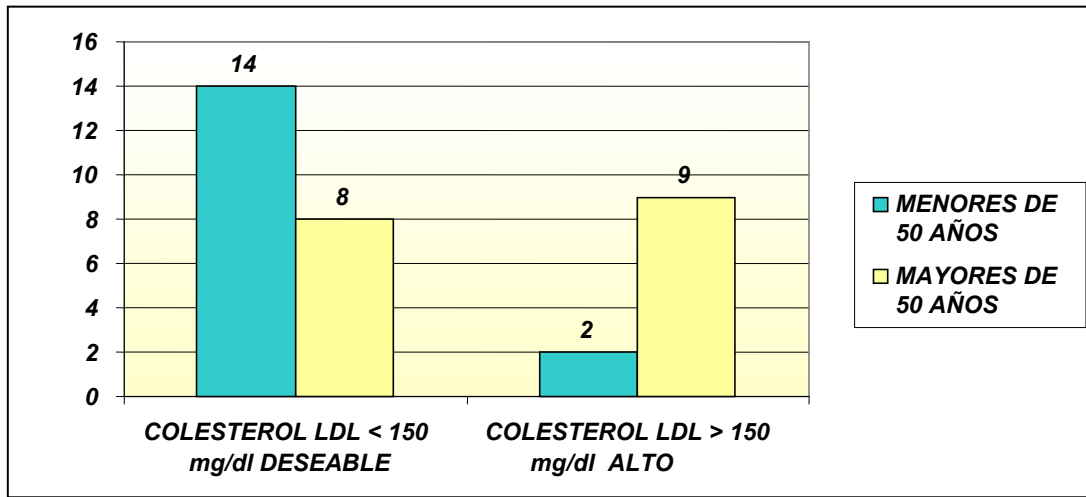


Figura 25. Trombosis venosa vs colesterol LDL y edad.

Al comparar los niveles de glucosa, en los individuos con trombosis venosa se encontró que el 18% de los hombres presentaron un nivel de glucosa deseable y el 3% un nivel alto. El 75.7% de la mujeres presentaron un nivel de glucosa deseable y el 3% presentaron un nivel alto como se muestra en la **figura 26**. ($p=0.0001$).

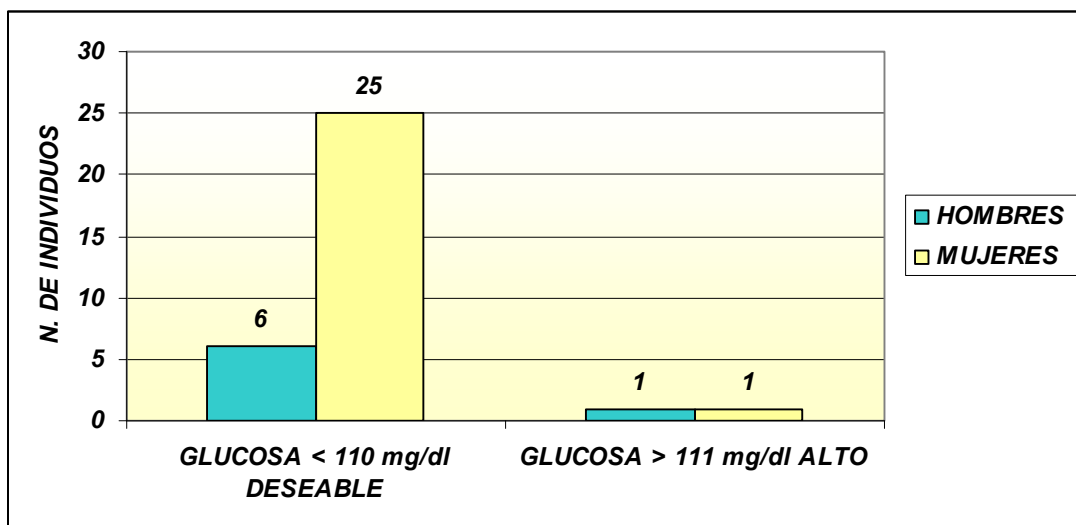


Figura 26. Trombosis venosa vs glucosa y genero.

Al comparar los niveles de glucosa con la edad, se encontró que el 42.4% de los menores de 50 años presentaron un nivel deseable y el 6% presentaron un nivel alto. En los mayores de 50 años el 45.4% presentaron un nivel deseable y el 6% un nivel alto como se muestra en la **figura 27**. Los niveles de glucosa en el grupo de los casos se encuentran en el nivel deseable. Es decir la glucosa no se encuentra como factor de riesgo en estos pacientes.

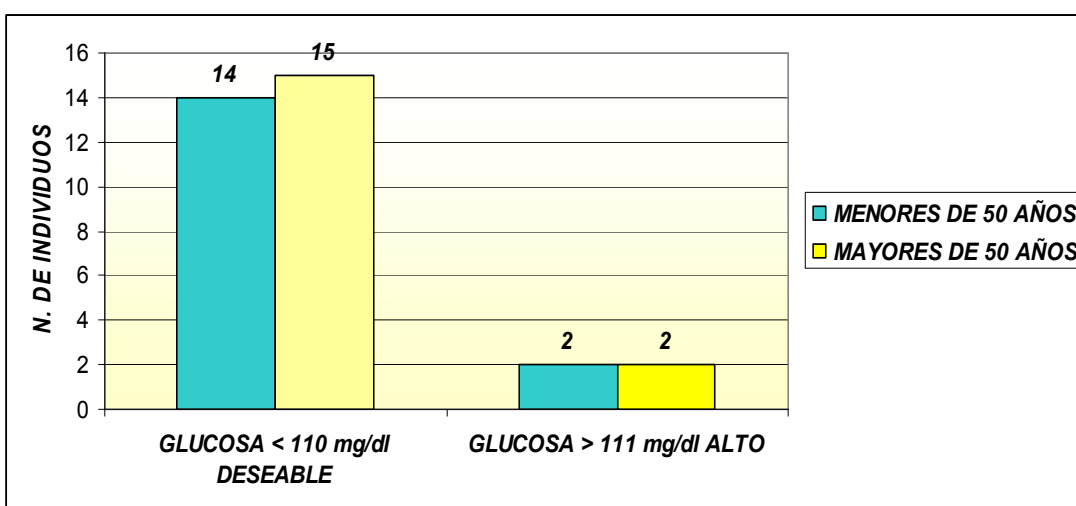


Figura 27. Trombosis venosa vs glucosa y edad.

Otra variable importante a evaluar fue el sobrepeso el cual se determino calculando el índice de masa corporal y siguiendo la clasificación establecida por la OMS en 1998.

Al comparar el sobrepeso en los individuos con trombosis venosa, se encontró que el no existe diferencia significativa ($p=0.169$) con respecto al genero, se encontró que el 18% de los hombres presentaron sobrepeso y el 3% no presentaban sobrepeso. En las mujeres el 33.3% presentaron sobrepeso y el 45.4% no presentaron sobrepeso como se muestra en la **figura 28**. Al comparar por edad, se encontró que el 18.2% de los mayores de 50 años presentaron sobrepeso y el 30% no presentaron sobrepeso. En los menores de 50 años el 33.3% presentaron sobrepeso y el 18.1% no presentaron sobrepeso como se muestra en la **figura 29**.

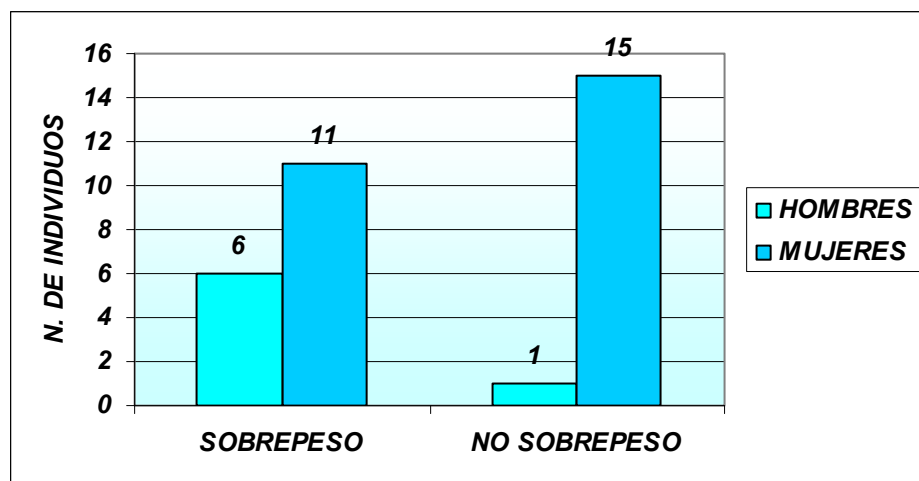


Figura 28. Trombosis venosa vs sobrepeso y genero.

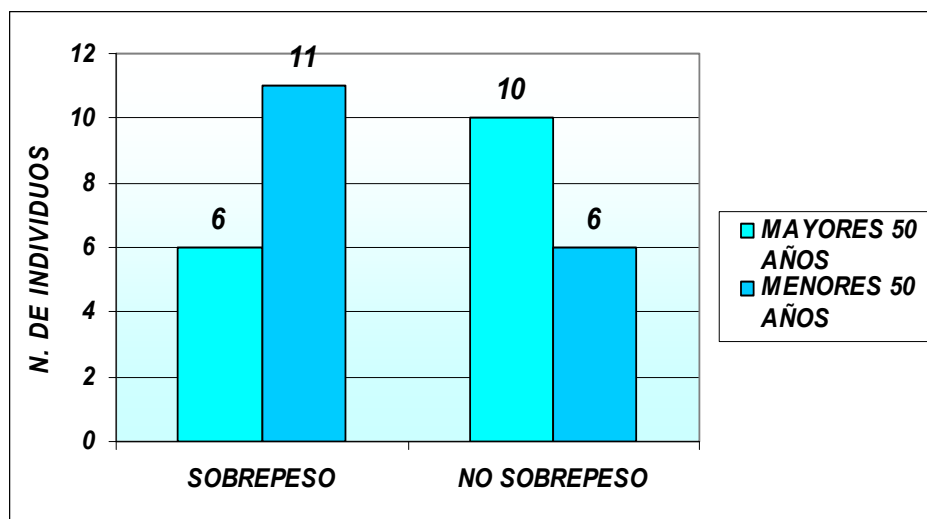


Figura 29. Trombosis venosa vs sobrepeso y edad.

Al comparar los fumadores con los no fumadores en los individuos con trombosis venosa, se encontró que el 9% de los hombres tiene el hábito de fumar y el 12.1% no tiene el hábito de fumar. En las mujeres el 21.2% tienen el hábito de fumar y el 57.6% no tienen el hábito de fumar como se muestra en la **figura 30**. Existe una diferencia significativa ($p=0.002$) entre el grupo de fumadores y no fumadores. Es decir en el grupo de casos la mayoría son no fumadores.

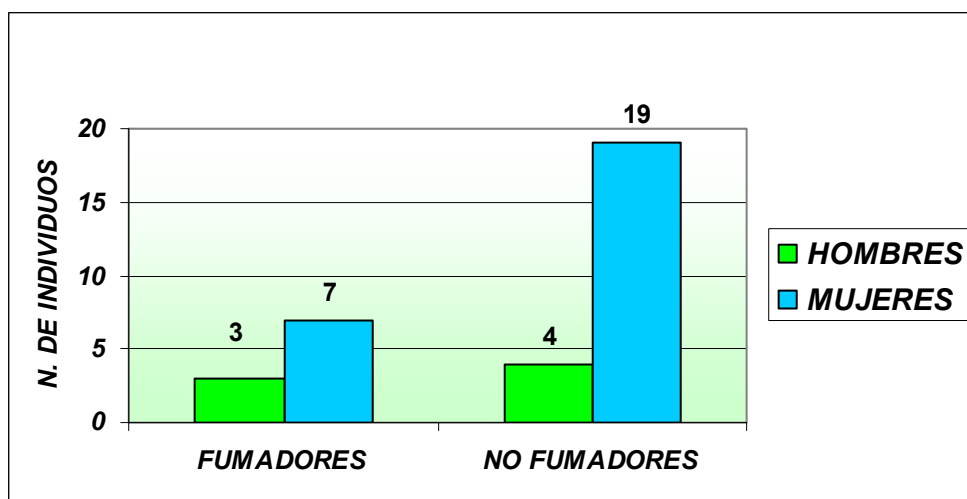


Figura 30. Trombosis venosa vs tabaquismo y género.

Al comparar por edad, se encontró que en los mayores de 50 años, el 18.2% tienen el hábito de fumar y el 30.3% no tienen el hábito de fumar. En los menores de 50 años 12% tiene el hábito de fumar y el 39.4% no tiene el hábito de fumar como se muestra en la **figura 31**.

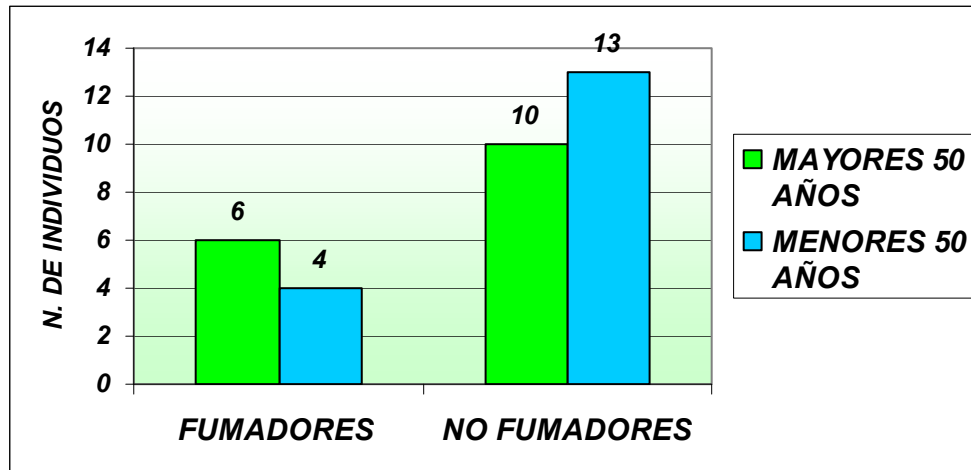


Figura 31. Trombosis venosa vs tabaquismo y edad.

Otra variable importante a evaluar fue el uso de anticonceptivos, observándose que el 24,2% de las mujeres mayores de 50 años utilizaron anticonceptivos y el 18.2% no utilizaron anticonceptivos. En las mujeres menores de 50 años el 15% utilizaron anticonceptivos y el 21.2% no utilizaron anticonceptivos como se muestra en la **figura 32**.

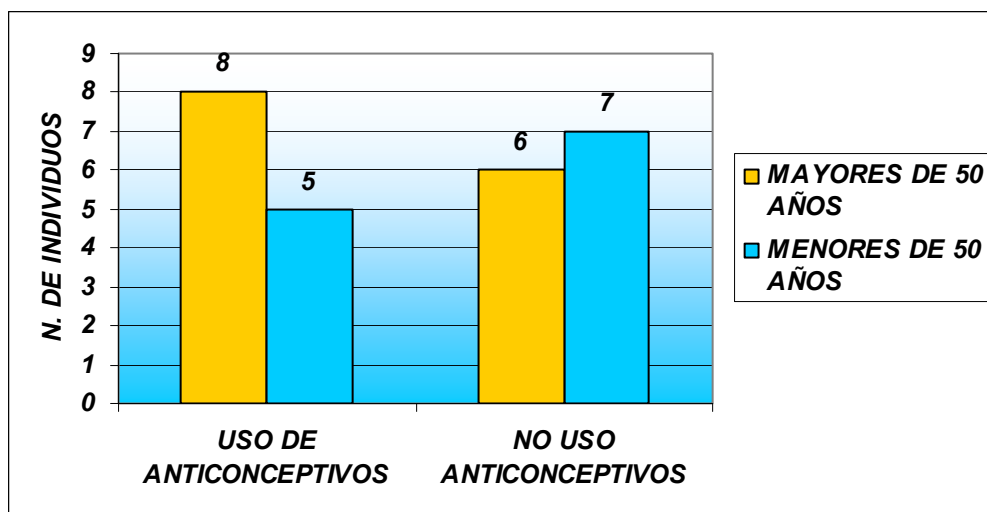


Figura 32. Trombosis venosa vs uso de anticonceptivos.

Se determinaron los *Odds Ratio* (OR) con respecto a cada uno de los factores de riesgo a evaluar por medio de las tablas de 2 x 2 como se muestra en la **tabla 4**.

Tabla 4. Ilustración tabla de 2x2 para colesterol total.

	COLESTEROL TOTAL > 200 mg/dl		TOTAL
	EXPUESTO	NO EXPUESTO	
CASOS	14	19	33
CONTROLES	7	26	33
TOTAL	21	45	66

Se analizó la relación entre la trombosis venosa y los niveles de colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL, colesterol LDL y glucosa con el fin de encontrar si la enfermedad se asocia o no con los factores de riesgo a evaluar y si es o no estadísticamente significativa mediante la prueba exacta de *Fisher*, como se muestra en la **tabla 5**.

Tabla 5. Asociación entre el perfil lipídico y la glucosa, con la trombosis venosa.

	OR*	IC 95%	Valor de <i>p</i>
COLESTEROL TOTAL mg/dl	2.7	0.92 – 8.08	0.0559
TRIGLICERIDOS mg/dl	8.6	0.99 - 74.5	0.0270
COLESTEROL HDL mg/dl	1.6	0.61 - 4.4	0.2277
COLESTEROL LDL mg/dl	2.8	0.84 - 9.2	0.0749
GLUCOSA mg/dl	1.0	0.22 - 4.3	0.6458

* OR = 1 No hay asociación entre la presencia del factor y el evento, OR > 1 Si la asociación es positiva, OR < 1 Si la asociación es negativa.

6.2 DESCRIPCION DE RESULTADOS MOLECULARES

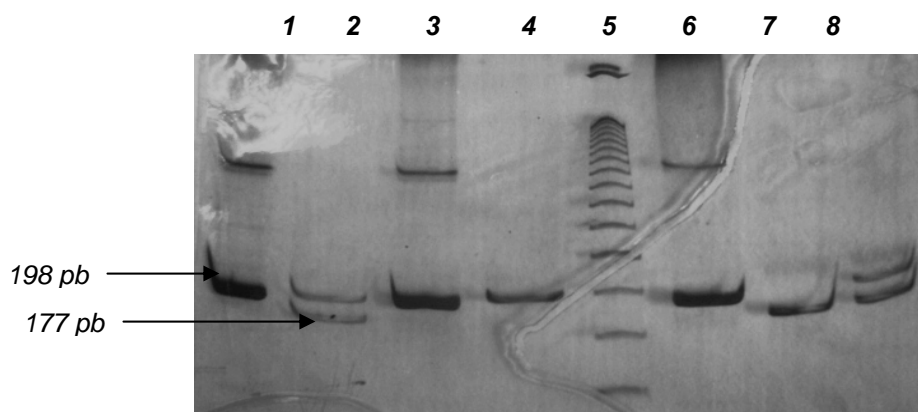


Figura 33. Amplificación y corte del segmento correspondiente al polimorfismo 677 C/T (Exón 4) de la MTHFR. (1) Fragmento sin digerir 198 pb. (2) Genotipo C/T. (3) Genotipo C/C (5) Marcador de peso molecular (7) Genotipo T/T.

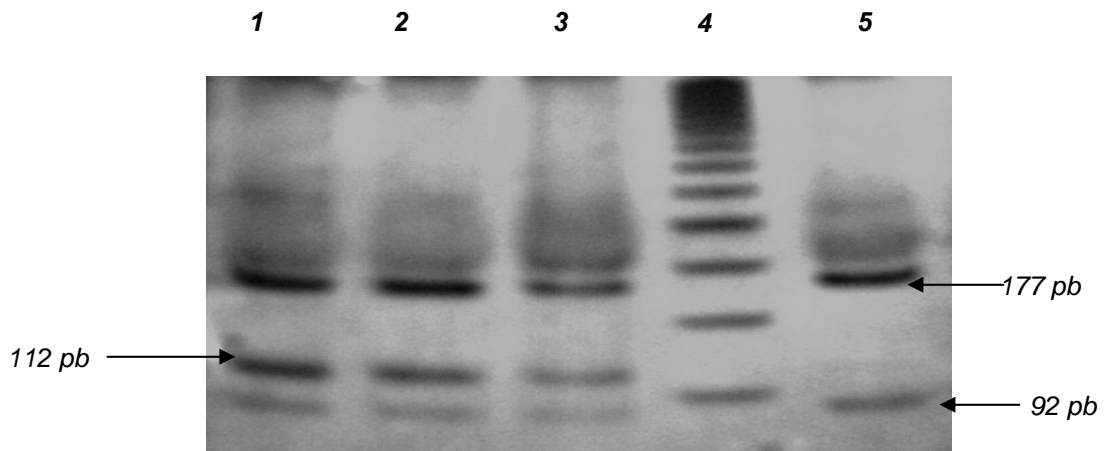


Figura 34. Amplificación y corte del segmento correspondiente al polimorfismo 699 C/T (Exón 6) de la CBS. Fragmento sin digerir 289 pb. (1) Genotipo C/T (4) Marcador de peso molecular (5) Genotipo C/C. Genotipo T/T: 177 y 112 pb.

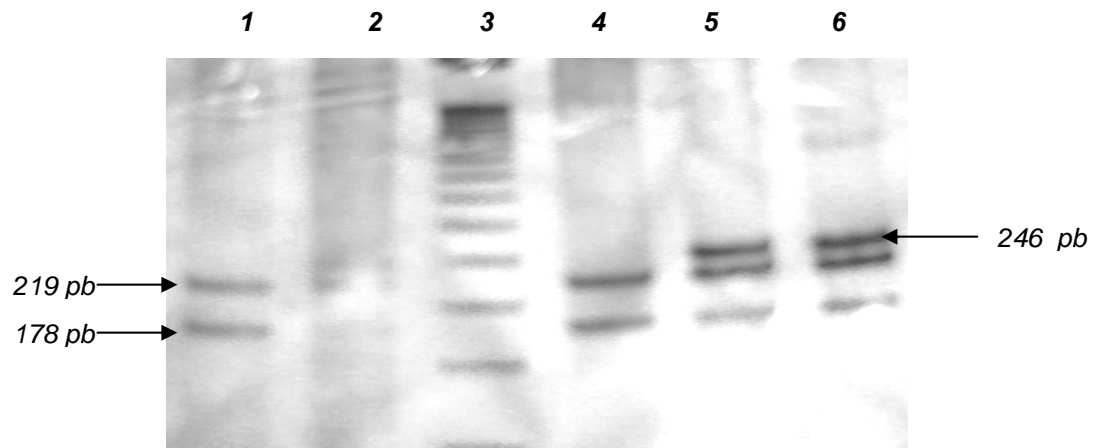


Figura 35. Amplificación y corte del segmento correspondiente al polimorfismo 1080 C/T (Exón 10) de la CBS. (1) Genotipo C/T (4) Marcador de peso molecular (5) Genotipo C/C.

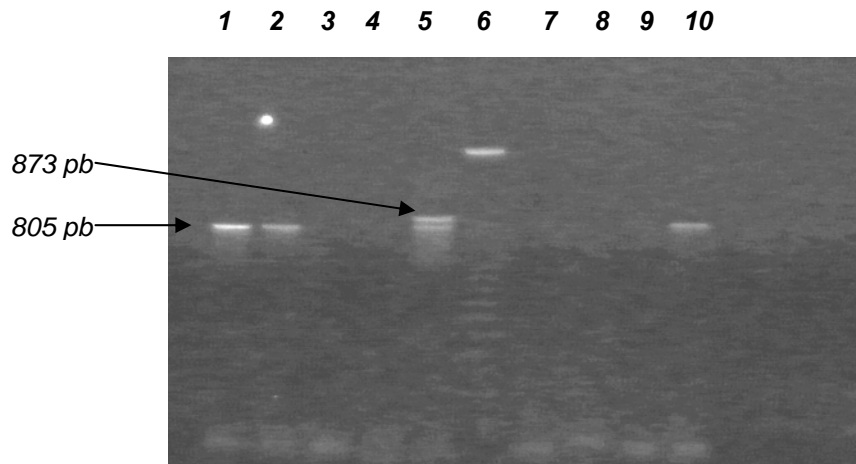


Figura 36. Amplificación correspondiente al polimorfismo 844 Ins 68 pb (Exón 8) de la CBS. (1) Fragmento sin la inserción 805 pb. (5) Fragmento con la inserción 873 pb (6) Marcador de peso molecular.

Se identificaron los polimorfismos 699 C/T, 1080 C/T, 844 Ins 68 pb de la CBS y 677 C/T de la MTHFR en los pacientes objeto de estudio y el grupo control, encontrándose para el polimorfismo 677 C/T de la MTHFR del grupo de casos 2 individuos para el genotipo CC, 22 para el genotipo CT y 9 para el genotipo TT. Las frecuencias genotípicas encontradas fueron 0.06 (6%) para el genotipo CC, 0.67 (67%) para el genotipo CT y 0.27 (27%) para el genotipo TT como se muestra en la **tabla 6**.

La frecuencia alelica encontrada para el alelo C fue 0.39 (39%) y para el alelo T 0.61 (61%) como se muestra en la **tabla 6**. En el grupo de controles se encontraron 5 individuos para el genotipo CC, 23 individuos para el genotipo CT y 5 para el genotipo TT. Las frecuencias genotípicas encontradas fueron 0.15 (15%) para el genotipo CC, 0.70 (70%) para el genotipo CT y 0.15 (15%) para el genotipo TT. La frecuencia alelica

encontrada para el alelo C fue de 0.50 (50%) y la del alelo T 0.50 (50%) como se observa en la **tabla 7**.

Para el polimorfismo 699 C/T de la CBS, en el grupo de casos se encontraron 19 individuos para el genotipo CC, 13 individuos para el genotipo CT y 1 individuo para el genotipo TT. Las frecuencias genotípicas encontradas fueron 0.58 (58%) para el genotipo CC, 0.39 (39%) para el genotipo CT y 0.03 (3%) para el genotipo TT. La frecuencia del alelo C fue de 0.77 (77%) y la del alelo T 0.23 (23%) como se muestra en la **tabla 6**. En el grupo control, se encontraron 19 individuos para el genotipo CC, 13 individuos para el genotipo CT y 1 individuo para el genotipo TT. Las frecuencias genotípicas encontradas fueron 0.58 (58%) para el genotipo CC, 0.39 (39%) para el genotipo CT y 0.03 (3%) para el genotipo TT. La frecuencia del alelo C fue de 0.77 (77%) y la del alelo T 0.23 (23%) como se muestra en la **tabla 7**.

Para el polimorfismo 1080 C/T de la CBS del grupo de casos, se encontraron 11 individuos para el genotipo CC, 22 individuos para el genotipo CT y ningún individuo para el genotipo TT. Las frecuencias genotípicas fueron 0.33 (33%) para el genotipo CC, y 0.67 (67%) para el genotipo CT. La frecuencia del alelo C fue de 0.67 (67%) y la del alelo T 0.33 (33%) como se muestra en la **tabla 6**. En el grupo control, se encontraron 18 individuos para el genotipo CC, 12 individuos para el genotipo CT y 3 individuos para el genotipo TT. Las frecuencias genotípicas encontradas fueron 0.55 (55%) para el genotipo CC, 0.36 (36%) para el genotipo CT y 0.09 (9%) para el genotipo TT. La frecuencia del alelo C fue de 0.73 (73%) y la del alelo T de 0.27 (27%) como se muestra en la **tabla 7**.

Para el polimorfismo 844 Ins de 68 pb de la CBS del grupo de casos, se encontraron 32 individuos sin la inserción (wt / wt) y 1 individuo con la

inserción (wt / Ins). Las frecuencias genotípicas encontradas fueron 0.97 (97%) para el genotipo wt / wt y 0.03 (3%) para el genotipo wt / Ins. La frecuencia del alelo normal fue de 0.98 (98%) y del alelo con la inserción fue de 0.03 (3%) como se muestra en la **tabla 6**. En el grupo de control, se encontraron 26 individuos para el genotipo wt / wt y 7 individuos para el genotipo wt / Ins. Las frecuencias genotípicas encontradas fueron 0.79 (79%) para el genotipo wt / wt y 0.21 (21%) para el genotipo wt / Ins. La frecuencia del alelo normal fue de 0.89 (89%) y la del alelo con la inserción fue de 0.11 (11%) como se muestra en la **tabla 7**.

Tabla 6. Frecuencias genotípicas y alelicas observadas grupo de casos.

	GENOTIPOS OBSERVADOS GRUPO DE CASOS n = 33						FRECUENCIA	FRECUENCIA	HW: P
	W/W ^a	%	W/M	%	M/M ^b	%	DEL ALELO w ^a	DEL ALELO M ^b	
677 C >T	2	6	22	67	9	27	0.39	0.61	0.0372
699 C >T	19	58	13	39	1	3	0.77	0.23	1
1080 C >T	11	33	22	67	0	0	0.67	0.33	0.0051
844 Ins 68 ^c	32	97	1	3	0	0	0.98	0.03	1

Tabla 7. Frecuencias genotípicas y alelicas observadas grupo de controles.

	GENOTIPOS OBSERVADOS GRUPO DE CONTROLES n = 33						FRECUENCIA	FRECUENCIA	HW: P
	W/W ^a	%	W/M	%	M/M ^b	%	DEL ALELO w ^a	DEL ALELO M ^b	
677 C >T	5	15	23	70	5	15	0.50	0.50	0.383
699 C >T	19	58	13	39	1	3	0.77	0.23	0.956
1080 C >T	18	55	12	36	3	9	0.73	0.27	0.973
844 Ins 68 ^c	26	79	7	21	0	0	0.89	0.11	1

***Convenciones tabla 6 y 7**

- a. Alelo normal
- b. Alelo mutado
- c. Polimorfismo 844 Ins 68

La estimación del valor de P , se realizó mediante el programa GENEPOP versión 4.0 por el método de cadenas de Markov, respectivamente para cada grupo de individuos y para cada polimorfismo, con el fin de determinar si la población estudiada se encuentra en equilibrio de Hardy – Weinberg.

Se calcularon los *Odds Ratio* para el polimorfismo 677 C/T de la MTHFR y 699 C/T de la CBS como se muestra en la tabla de 2 x 2 (**tabla 8**), realizándose de la misma forma con cada polimorfismo.

Tabla 8. Ilustración Tabla de 2x2 para el polimorfismo 677 C/T de la MTHFR.

	EXPUESTOS	NO EXPUESTOS	TOTAL
CASOS	9	24	33
CONTROLES	5	28	33
TOTAL	14	52	66

Tabla 9. Asociación entre el polimorfismo 677 T/T de la MTHFR y 699 T/T de la CBS con la trombosis venosa.

	OR	IC 95%	Valor de P
677 T/T	2.1	0.61 – 7.12	0.1835
699 T/T	1	0.05 – 16	0.7568

Se determinó la relación existente entre el colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL, colesterol LDL y glucosa con el polimorfismo 677 C/T a través del cálculo del *Odds Ratio* (OR), cruzado la presencia o ausencia del polimorfismo con cada una de las variables como se muestra en la **tabla 10**. Es de importancia resaltar que no se pudo observar la asociación entre el polimorfismo 699 C/T, 1080 C/T y 844 Ins 68 pb y las distintas variables, ya

que, el OR no pudo ser calculado debido a la ausencia o escasa presencia del genotipo TT en la población para estos polimorfismo, quedando varias variables sin cruzar. Así mismo para 677 C/T no se pudo observar la asociación entre el polimorfismo y los niveles de homocisteína debido a la escasa presencia del genotipo TT, y al cruzarlo encontrar un valor de cero.

Tabla 10. Ilustración tabla de 2x2. Presencia o ausencia del polimorfismo TT de la MTHFR y niveles de colesterol total.

CASOS	COLESTEROL TOTAL < 200 mg/dl	COLESTEROL TOTAL > 200mg/dl	TOTAL
TIENEN EL POLIMORFISMO TT DE LA MTHFR	7	2	9
NO TIENEN EL POLIMORFISMO TT DE LA MTHFR	12	12	24
TOTAL	19	14	33

De la misma manera se realizo para los demás factores de riesgo; triglicéridos, colesterol HDL, colesterol LDL y glucosa con la presencia o ausencia del polimorfismo TT.

Se analizo la relación entre el polimorfismo 677 C/T de la MTHFR y los niveles de colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL, colesterol LDL y glucosa con el fin de ver si el polimorfismo se asocia con el perfil lipídico y la glucosa y si es o no estadísticamente significativo mediante la prueba exacta de *Fisher*, como se muestra en la **tabla 11**.

Tabla 11. Asociación entre el polimorfismo 677 C/T de la MTHFR y los factores de riesgo de trombosis venosa.

	OR*	IC 95%	Valor de P
677 C/T y colesterol total	3.5	0.6 – 20.4	0.1487
677 C/T y triglicéridos	2.6	0.27 – 25.9	0.3646
677 C/T y colesterol HDL	0.42	0.08 – 2.9	0.2509
677 C/T y colesterol LDL	2.1	0.35 – 12.3	0.3473
677 C/T y glucosa	0.31	0.03 – 2.69	0.2952

* OR = 1 No hay asociación entre la presencia del factor y el evento, OR > 1 Si la asociación es positiva, OR < 1 Si la asociación es negativa.

Entre el polimorfismo 677 C/T de la MTHFR y la homocisteína no se pudo realizar una asociación ya que al hacer el cruce de las variables ningún individuo de la población presentaba el genotipo TT y al mismo tiempo un nivel de homocisteína elevado.

Al determinar la asociación entre los niveles de homocisteína con los polimorfismos 699 C/T, 1080 C/T, 844 Ins 68 pb de la CBS y 677 C/T de la MTHFR en los pacientes objeto de estudio y el grupo control no fue posible encontrarla, debido a que al cruzar la presencia o ausencia del polimorfismo con los niveles de homocisteína era representativo encontrar individuos TT, CC o CT con niveles de homocisteína normal, mientras que con niveles de homocisteína aumentados fueron muy pocos quienes los presentaron como se muestra en la **tabla 12 y tabla 13**.

Tabla 12. Relación entre la ausencia o presencia del polimorfismo 677 T/T de la MTHFR y 699 T/T, 1080 T/T, 844 Ins 68 pb de la CBS y los niveles de homocisteína grupo de casos.

CASOS	HOMOCISTEINA NORMAL < 17µmol/l	HOMOCISTEINA AUMENTADA 17 - 100 µmol/l
TIENEN EL POLIMORFISMO TT DE LA MTHFR	9	0
NO TIENEN EL POLIMORFISMO TT DE LA MTHFR	21	3
TIENEN EL POLIMORFISMO 699 TT DE LA CBS	1	0
NO TIENEN EL POLIMORFISMO 699 TT DE LA CBS	29	3
TIENEN EL POLIMORFISMO 1080 TT DE LA CBS	0	0
NO TIENEN EL POLIMORFISMO 1080 TT DE LA CBS	30	3
TIENEN EL POLIMORFISMO 844 Ins 68 pb DE LA CBS	0	0
NO TIENEN EL POLIMORFISMO 844 Ins 68 pb DE LA CBS	30	3

Tabla 13. Relación entre la ausencia o presencia del polimorfismo 677 T/T de la MTHFR y 699 T/T, 1080 T/T, 844 Ins 68 pb de la CBS y los niveles de homocisteína grupo control.

CONTROLES	HOMOCISTEINA NORMAL < 17µmol/l	HOMOCISTEINA AUMENTADA 17 - 100 µmol/l
TIENEN EL POLIMORFISMO TT DE LA MTHFR	5	0
NO TIENEN EL POLIMORFISMO TT DE LA MTHFR	28	0
TIENEN EL POLIMORFISMO 699 TT DE LA CBS	1	0
NO TIENEN EL POLIMORFISMO 699 TT DE LA CBS	32	0
TIENEN EL POLIMORFISMO 1080 TT DE LA CBS	3	0
NO TIENEN EL POLIMORFISMO 1080 TT DE LA CBS	30	0
TIENEN EL POLIMORFISMO 844 Ins 68 pb DE LA CBS	0	0
NO TIENEN EL POLIMORFISMO 844 Ins 68 pb DE LA CBS	30	3

Al analizar la relación existente entre el sobrepeso, tabaquismo y uso de anticonceptivos en el grupo de individuos con trombosis venosa, solamente se pudo determinar con el sobrepeso y el polimorfismo 677 TT, encontrándose un OR: 1.2, IC 95%: 0.26 – 5.82 y un valor de *P*: 0.5429 como se muestra en la **tabla 14**. Se observó que el sobrepeso con la presencia o ausencia del polimorfismo TT de la MTHFR, es un posible factor de riesgo para desarrollar la trombosis venosa como lo muestra el valor del OR, pero su asociación no es estadísticamente significativa.

Tabla 14. Ilustración tabla de 2x2. Presencia o ausencia del polimorfismo 677 T/T y sobrepeso grupo de casos.

	SOBREPESO	NO SOBREPESO	TOTAL
POLIMORFISMO 677 TT	5	4	9
AUSENCIA POLIMORFISMO 677 TT	12	12	24
TOTAL	17	16	33

OR: 1.2

IC: 0.26 - 5.82

P: 0.5429

7. DISCUSION

Los resultados encontrados en este estudio muestran los niveles de algunos de los factores de riesgo tradicionales conocidos y otro factor de riesgo emergente (hiperhomocisteinemia) para el desarrollo de la trombosis y contribuye con las frecuencias genotípicas y fenotípicas de algunos polimorfismos de genes candidatos en el desarrollo de esta enfermedad en una población colombiana. Este estudio encontró que los niveles de colesterol total son mayores en el grupo de los casos y tienden a aumentar con la edad al compararlos con los controles. Por otra parte se encontró que el colesterol total es un factor de riesgo significativo en el desarrollo de la trombosis como lo describe *Doggen y colaboradores* en el año 2004. El cLDL también aumenta con la edad y es un factor de riesgo no significativo para el desarrollo de la trombosis. Mientras que el cHDL disminuye con la edad, la diferencia al compáralos con los controles no es significativa y no obstante representar riesgo de trombosis este no es significativo. Resultados similares a los reportados por *AW. SD de Souza, NP SILVA y colaboradores*, es posible que este aumento de los lípidos en sangre, conlleve a la aterosclerosis y de esta forma esté contribuyendo a la trombosis observada en estos pacientes.

Los niveles de triglicéridos también son mayores en el grupo de los casos al compararlos con los controles, sin embargo no aumentan de forma significativa con la edad. En este estudio se encontró que los niveles de triglicéridos son el mayor factor de riesgo para el desarrollo de la trombosis, resultados similares a los encontrados por *W. Ageno y colaboradores*.

Al comparar la media en los dos grupos, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los niveles altos de colesterol total, triglicéridos y colesterol LDL y la trombosis venosa, mientras que la media

encontrada para el colesterol HDL, glucosa y homocisteína no son estadísticamente significativas, como lo muestra el valor de *P*.

Al analizar la relación entre la Trombosis Venosa y los niveles altos de colesterol de total, triglicéridos, colesterol HDL, colesterol LDL y glucosa, se encontró que dicha enfermedad se asocia con los triglicéridos altos como lo muestran los OR = 3.6 y la probabilidad de la prueba de *Fisher*, Lo cual implica que si hay asociación entre presentar niveles de triglicéridos altos y la enfermedad. Resultados similares a los encontrados por *Doggen et al*, en donde asocia el nivel alto de triglicéridos con el riesgo incrementado de presentar trombosis venosa encontrando un OR de 2.14.

Otro factor de riesgo asociado con la trombosis venosa, son los niveles altos de colesterol total, los cuales mostraron un OR de 2.7 siendo esta asociación estadísticamente significativa como lo muestra el valor de *P*. Con relación al colesterol HDL y colesterol LDL, se encontró que estos pueden ser factores de riesgo, pero su asociación no es estadísticamente significativa como lo muestra la probabilidad de la prueba de *Fisher*.

De los polimorfismos evaluados se encontró que el 677 C/T de la MTHFR, se relaciona con varios de los factores de riesgo para el desarrollo de la trombosis venosa, lo cual se observó al analizar la relación entre la presencia del polimorfismo y los niveles altos de colesterol total, triglicéridos y colesterol LDL, que todos pueden ser factores de riesgo para el desarrollo de la trombosis, aunque su asociación no es estadísticamente significativa como lo muestra la probabilidad de la prueba de *Fisher*. Mientras que la presencia del polimorfismo 677 de la MTHFR y los niveles de colesterol HDL y glucosa no representan un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad.

También se encontró que el sobrepeso y la presencia del polimorfismo 677 de la MTHFR, puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de la trombosis venosa, aunque su asociación no es estadísticamente significativa.

En nuestro grupo de casos se encontró un OR de 2.1 para el polimorfismo 677 de la MTHFR, encontrándose una posibles asociación entre el genotipo TT y el desarrollo de la trombosis venosa, aunque no es estadísticamente significativo, esto ha sido reportado por varios autores como *Gematti et al. 1999; Kluijtmans et al. 2001; Spiroski et a. 2008*, quienes encuentran una asociación estadísticamente significativa entre presentar el polimorfismo y ser este un factor de riesgo para la trombosis venosa.

En cuanto a los niveles de homocisteína, se esperaba encontrar niveles elevados en el grupo de casos, que tuvieran el genotipo TT en cualquiera de los polimorfismos, pero en nuestro grupo solo 3 individuos presentaron niveles de homocisteína elevados, quienes presentaron el genotipo CC y CT; los 30 restantes presentaron niveles de homocisteína normales siendo genotipo CC y CT, por lo tanto no se pudo hacer una asociación estadísticamente significativa entre la presentación del polimorfismo y tener niveles elevados de homocisteína.

8. CONCLUSIONES

Se realizó una descripción de los parámetros bioquímicos, colesterol total, cLDL, cHDL, triglicéridos, glucosa, en los pacientes que permitió determinar diferencias significativas al compáralas con el grupo control.

En estudio se encontró que el 79% de pacientes con trombosis correspondió al grupo de las mujeres.

El perfil lipídico muestra asociación con el desarrollo de la trombosis.

Se detectó hiperhomocisteinemia en el grupo de casos.

El polimorfismo 677 C/T de la MTHFR en el grupo de casos en conjunto con los niveles de colesterol total, triglicéridos y colesterol LDL, pueden ser factores de riesgo de presentar trombosis aunque su asociación no es estadísticamente significativa.

El sobrepeso puede ser un posible factor de riesgo de presentar trombosis venosa en presencia del polimorfismo 677 T/T de la MTHFR, aunque su asociación no es estadísticamente significativa.

Es importante resaltar que aunque no se pudo hacer asociación entre el polimorfismo 844 Ins 68 pb de la CBS, en nuestro grupo control se encontró presente la inserción en el 21.2% en comparación con el grupo de casos el cual se encontraba en el 3%, similar a lo reportado por *Franco et al* y *sebastio et al*.

8. RECOMENDACIONES

Realizar estos análisis con un mayor tamaño de muestra.

Incluir la evaluación de parámetros indicativos de trombosis.

9. REFERENCIAS

Alpert MA. 1999. Homocysteine, Atherosclerosis, and Thrombosis. *Southern Medical Journal*. 92: 858 – 864.

Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. 2004. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death and Differentiation*. 11: 56 – 64.

AW. SD de Souza NP SILVA y col. 2007. Impact, hypertension and hyperhomocysteinemia on arterial trombosis in primary antiphospholipid syndrome lupus. 16: 782.

Aznar J, Vaya A, Estellés A, Mira Y, Segui R, Villa P, Ferrando F, Falco C, Corella D, España F. 2000. Risk of venous trombosis in carriers of the prothrombin G20210A variant and factor V Leiden and their interaction with oral contraceptives. *Hematologia*. 85: 1271-1276.

Barkis GL. 2007. Current Perspectives on Hypertension and Metabolic Syndrome. *Journal of Managed care pharmacy*. 13: 3 – 5.

Bermúdez M, Briceño I, Gil F, Bernal J. 2006. Homocisteina y polimorfismos de la Cistationina - β - sintasa y Metilentetrahidrofolato-reductasa en población sana de Colombia. *Colomb Med*. 37: 46-52.

Bermúdez M, Frank N, Bernal J, Urreizti R, Briceño I, Merrier B, Pérez-Cerda C, Ugarte M, Grinberg D, Balcells S, Kraus JP. 2006. High prevalence of CBS p.T191M Mutation in Homocystinuric Patients from Colombia. *Human Mutation*. 887: 1-8.

Bezemer ID, Doggen KJM, Vos HL, Rosendaal FR. 2007. No Association Between the Common *MTHFR* 677C→T Polymorphism and Venous Thrombosis. *Arch Intern Med.* 167: 497 – 501.

Biondi – Zoccai GGL, Aabbate A, Liuzzo G, Biasucci LM. 2003. Atherothrombosis, Inflammation, and Diabetes. *Journal of the American College of Cardiology.* 41: 1071-1077.

Blann AD, Lip GYH. 2006. Venous thromboembolism. *British Medical Journal.* 332: 215 – 219.

Brattström L, Wilchen EL. 2000. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? *Am J Clin Nutr.* 72: 315 – 323.

D'Angelo A, Mazzola G, Crippa L, Fermo I, D'Angelo SV. 1997. Hyperhomocysteinemia and venous thromboembolic disease. *Hematologica.* 82: 211 – 219.

Doggen CJM, Smith NL, Lemaitre RN, Heckebert SR, Rosendaal FR, Psaty BM. 2004. Serum Lipid Levels and the Risk of Venous Trombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 1970 – 1975.

Dudman NP, Guo XW, Gordon RB, Dawson PA, Wilcken DE. 1996. Human homocysteine catabolism: three major pathways and their relevance to development of arterial occlusive disease. *J. Nutr.* 126: 1295-1300.

Eldibany MM, Caprini JA. 2007. Hyperhomocysteinemia and thrombosis. *Arch Pathol Lab Med.* 131: 872-837.

Fonseca V, Suba SC, Fink LM. 1999. Hyperhomocysteinemia and the endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis. *Endocrine reviews*. 20: 738 – 759.

Franco R, Maffei F, Lourenco D, Piccinato C, Morelli V, Thomazini I, Zago M. 1998. The frequency of 844ins68 mutation in the cystathionine b-synthase gene is not increased in patients with venous thrombosis. *Hematologica*. 83: 1006 – 1008.

Garcia-Róspide V, Lopes-Espada C, Fernández M. 2004. Estrategia diagnóstica ante la sospecha de trombosis venosa profunda. *Angiología*. 56: 253-258.

Gemmati D, Serino ML, Trivellato C, Fiorini S, Scapoli GL. 1999. C677T substitution in the methylenetetrahydrofolate reductase gene as a risk factor for venous thrombosis and arterial disease in selected patients. *Hematologica*. 84: 824 – 828.

Ginsburg D. 2005. Genetics Risk Factors for Arterial Thrombosis and Inflammation. *American Society of Hematology*. 1: 442-444.

Goldhaber SZ, Ridker PM. 2002. Thrombosis and Thromboembolism. 1ª edición. Marcel Dekker, Inc. New York.

Guo C, Guo Q, Gong Y, Chen B, Liu Q, Li J, Gao G, Zhou H. 2002. The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and its association with deep vein thrombophilia in Shandong Hans. 4: 295 – 297.

Harrison TR. 2002. Principios de medicina interna. 15ª edición. McGraw – Hill. Madrid, España. Cap. 62: 417-421. Homocysteine and cardiovascular disease. *J of Int Med*. 246: 425 – 454.

Jacques PF, Bostom AG, William RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R. 1996. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*. 93: 7 – 9.

Kahn SR. 1998. The clinical diagnosis of deep venous thrombosis. *Arch intern med*. 158: 2315 – 2323.

Kamphuisen PW, Eikenboom CCJ, Bertina RM. 2001. Elevated factor VIII levels and the risk of thrombosis. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol*. 21: 731 – 738.

Kluijtmans LAJ, Boers GHJ, Verbruggen B, Trijbels FJM, Novakova IRO, Blom HJ. 1998. Homozygous cystathionine β – synthase deficiency, combined with factor V Leiden of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductasa in the risk of venous thrombosis. *Blood*. 91: 2015 – 2018.

Kluijtmans LAJ, Whitehead AS. 2001. Methylenetetrahydrofolate reductase genotypes and predisposition to atherothrombotic disease. *Eur Heart J*. 22: 294 – 299.

López JA, Kearon C, Lee AYY. 2004. Deep Venous Thrombosis. *Hematology*. 9: 439 – 455.

Kluijtmans LAJ, Boers GHJ, Verbruggen B, Trijbels FJM, Novakova IRO, Blom HJ. 1998. Homozygous cystathionine β – synthase deficiency, combined with factor V Leiden of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductasa in the risk of venous thrombosis. *Blood*. 91: 2015 – 2018.

Mandel H, Brenner B, Berant M, Rosenberg N, Lanir N, Jakobs C, Fowler B, Seligsohn U. 1996. Coexistence of hereditary homocystinuria and factor V leiden_effect on thrombosis. *N Engl J Med.* 344: 763 – 768.

Martinelli I, Sacchi E, Landi G, Taioli E, Duca F, Manucci PM. 1998. High risk of Cerebral-Vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. *N Engl J Med.* 338: 1793 -1798.

McKenzie SB. 2000. Hematología clínica. 2ª edición. Manual moderno. México. Cap 23, 24 y 26: 573-594, 603-620 y 704-709.

Nadir Y, Hoffman R, Brenner B. 2007. Association of homocysteine, vitamin B12, folic acid, and MTHFR C677T in patients with a thrombotic event or recurrent fetal loss. *Ann Hematol.* 86: 35-40.

Nygard O, Vollest SO, Refsum H, Brattstrom L, Ueland PM. 1999. Total homocysteine and vascular disease. *J of Int Med.* 246: 425 – 454.

O'Donnell VB, Freeman BA. 2001. Interactions between Nitric Oxide and Lipid Oxidation Pathways Implications for vascular disease. *Circulation Research.* 19: 12-21.

Orendac M, Muskova B, Richrerova E, Zvarova J, Stefek M, Zaykova E, Graus JP, Stribny J, Hyanek J, Kozich V. 1999. In the common 844 ins 68 polymorphism in the cistationine β -synthase gene associated with atherosclerosis. *J. Inher. Metab. Dis.* 22: 674-675.

Pendás JAR, Estébanez RV. 2002. Trombosis Venosa. *Guías Clínicas.* 26:1-5.

Pérez TR. 2007. Principios de patología. 4ª edición. Editorial Médica Panamericana. México. Cap. 7: 126-129.

Robbins SL, Cotran R, Abbas AK, Kumar V. 2005. Patología estructural y funcional. Séptima edición. El sevier. Madrid, España. 126-134.

Rosenblatt, D. 2000. Inherited disorders of folate transport and metabolism. En Scriver, CR, Beaudet AL, Sly WS eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease .New York, NY:McGraw-Hill Book Company.

Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP. 2002. Female Hormones and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22: 201 – 210.

Rosendaal FR. 2005. Venous Thrombosis: The Role of Genes, Environment, and Behavior. *Hematology.* 1: 1-12.

Rudy A, Kowalska I, Straczkowski M, Kinalska I. 2005. Homocysteine concentrations and vascular complications in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 31: 112-117.

Salve ML. 1997. laboratorio de bioquímica. 1ª edición. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid, España. Cáp. 1: 41 y 61 – 64.

Sebastio G, Sperandeo M, Panico M, Francis R, Kraus J. 1995. The molecular Basis of Homocystinuria due to Cystationine b synthase deficiency in italian families, and report of four nobel mutations. *Am J Hum Genet.* ; 56: 1324-1333.

Sharma P, Senthilkumar RD, Brahmachari V, Sundaramoorthy E, Mahajan A, Sharma A, Sengupta S. 2006. Mining literature for a comprehensive

pathway analysis: A case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. *Lipid in health and disease*. 5: 1 – 19.

Skovby, F. 1996. Disorders of sulfur amino acids. In *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*. Edition, Chapman&Hall.189-200.

Spiroski I, Kedev S, Antov S, Arsov T, Krstevska M, Dzhekova-Stojkova S, Kostovska S, Trajkov D, Petlichkovski A, Strezova A, Efinska-Mladenovska O, Spiroski M. 2008. Association of Methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR-677* and *MTHFR-1298*) Genetic Polymorphisms with Occlusive Artery Disease and Deep Venous Thrombosis in Macedonians. *Croat Med J*. 49: 39 – 49.

Tsai M, Perella M, Yoshizumi M, Hsieh C, Haber E, Shlegal R, Lee M. 1994. Promotion of vascular smooth muscle growth by homocysteine: A link to atherosclerosis. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 6369 – 6373.

Undas A, Brozek J, Jankowski M, Siudak Z, Szczeklik A, Jakubowski H. 2006. Plasma Homocysteine Affects Fibrin Clot Permeability and Resistance to Lysis in Human Subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26: 1397 – 1404.

Vandenbroucke JP, Rosing J, Bloemenkamp KWM, Middeldorp S, Helmerhorst FM, Bouma BN, Rosendaal FR. 2001. Oral Contraceptives and the risk of venous thrombosis. *N Engl J Med*. 344: 1537 – 1535.

Varga EA, Sturm AC, Misita CP, Moll S. 2005. Homocysteine and MTHFR Mutations Relation to thrombosis and coronary Artery Disease. *Circulation*. 111: 289 -293.

Welch GN, Loscalzo J. 1998. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 338: 1042-1052.

W. Ageno y col. 2006 The metabolic syndrome and the risk of venous thrombosis: a case –control study .*Journal of thrombosis and Haemostasis* 4: 1914-1918

Wouters MG, Moorrees MT, van der Mooren MJ, Blom HJ, Boers GH, Schellekens LA, Thomas Cm Eskes TK. 1995. Plasma homocysteine and menopausal status. *Eur J Clin Invest.* 25:801–805.

ANEXO 11.1

TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE ADN (METODO DE PROBE)

1. En un tubo falcón de 15 ml, medir 2.0 ml de buffer de lisis de glóbulos rojos y sobre este adicionar con una pipeta pasteur 1 ml de sangre total. Mezclar muy bien preferiblemente con vortex.
2. Agitar fuertemente en una plataforma shaker durante 15 minutos a temperatura ambiente a 300 r.p.m.
3. Centrifugar a 3000 r.p.m durante 8 minutos sin freno, descartar el sobrenadante y conservar el pelet.
4. Adicionar 2.0 ml de buffer de lisis celular y mezclar por chupeteo varias veces (de 20 a 25 veces hasta la completa homogenización), dejar al menos 1 hora a temperatura ambiente. Realizar un vortex intermedio antes de terminar la hora. Se puede suspender el procedimiento hasta el día siguiente dejando los tubos a 4° C.
5. Adicionar 400 µl de solución precipitante de proteínas mezclar con vortex y centrifugar a 4000 r.p.m durante 20 minutos sin freno (repetir este paso si es necesario).
6. Adicionar 200 µl de solución precipitante de proteínas, mezclar con vortex y centrifugar a 4000 r.p.m durante 20 minutos sin freno.
7. Adicionar 100 µl de solución precipitante de proteínas mezclar con vortex y centrifugar a 4000 r.p.m durante 10 minutos sin freno.

8. Pasar el sobrenadante a otro tubo falcón de 15 ml adicionar 100 µl de solución precipitante de proteínas mezclar con vortex y centrifugar a 4000 r.p.m durante 10 minutos sin freno.

9. Verter todo este sobrenadante sobre un tubo falcon de 15 ml que contenga 6 veces el volumen de Isopropanol frío según el volumen del sobrenadante, dejar en reposo al menos 5 minutos

10. Mezclar cuidadosamente por inversión hasta precipitar el DNA (se debe observar la malla)

11. Envolver el DNA en una pipeta pasteur de vidrio y pasarlo rápidamente por etanol 70% frío, dejar secar a T° ambiente por unos segundos y resuspender finalmente de H₂O, dependiendo de la cantidad de DNA recuperado.

12. Resuspender en 150 µl de agua estéril

13. Colocar en la plataforma Shaker a velocidad lenta a una temperatura de 60° C durante 1 hora, para resuspender por completo el DNA.

14. chequear en agarosa y almacenarlo a -20° C.

ANEXO 11.2

PROTOCOLO EXON 1, 677 de la MTHFR

MIX 1	1X (μL)
BUFFER	20
DNTPs	20
H ₂ O	60
VOL. FINAL	100

MIX 2	1X(μL)
MIX 1	12.5
SENSE 677 A	0.5
ANTISENSE 677 B	0.5
MgCl ₂	2.5
H ₂ O	4.8
TAQ	0.2
ADN	4.0
VOL. FINAL	25

se utilizaron los primers: forward: 5' TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA3' y reverse: 5' AGGACGGTGCGGTGAGTG3' con las siguientes condiciones experimentales de PCR: un ciclo de 4 minutos a 95° C, 35 ciclos con las siguientes condiciones; 30 segundos a 95° C, 1 minuto a 62° C, 30 segundos a 72° C y un ciclo final de 4° C (Bermúdez, 2006).

ANEXO 11.3

PROTOCOLO EXON 6, 699 de la CBS

MIX 1	1X(μL)
BUFFER	5
DNTPs	5
H ₂ O	15
VOL. FINAL	25

MIX 2	1X(μL)
MIX 1	19
699 A	0.5
399	0.5
MgCl ₂	1.5
H ₂ O	1.3
TAQ	0.2
ADN	2
VOL. FINAL	25

Se utilizaron los primers: forward 5' CAGCAACCCCCTGGCTCAGT3' y reverse 5' CAGCCATGCCCTGTGTTTGCTATT3' con las siguientes condiciones experimentales de PCR: un ciclo de 3 minutos a 95° C, 35 ciclos con las siguientes condiciones; 1 minuto a 92° C y 1 minuto a 64° C, un ciclo de 30 segundos a 72° C, un ciclo de 7 minutos a 72° C y un ciclo de finalización a 4° C (Bermúdez, 2006).

ANEXO 11.4

PROTOCOLO EXON 10,1080 de la CBS

MIX 1	1X(μL)
BUFFER	3
DNTPs	3
H ₂ O	9
VOL. FINAL	15

MIX 2	1X(μL)
MIX 1	14
SENSE 10 A	0.5
ANTISENSE 10 B	0.5
DMSO	1.0
MgCl ₂	2.0
TAQ	0.2
ADN	2
H ₂ O	4.8
VOL. FINAL	25

Se utilizaron los primers: forward 5' CAGTGCCACCCCAGCTCATTA3' y reverse 5' GGCCTCCTCCCCTCCCAGTTCT3', con las siguientes condiciones experimentales de PCR: un ciclo de 20 segundos a 95° C, 35 ciclos con las siguientes condiciones; 5 segundos a 95° C, 30 segundos a 69° C y 40 segundos a 68° C, un ciclo de 10 minutos a 68° C y un ciclo de finalización a 4° C (Bermúdez, 2006).

ANEXO 11.5**PROTOCOLO EXON 8, 844 Ins 68 pb**

MIX 1	1X(μL)
BUFFER	10
DNTPs	10
H ₂ O	30
VOL. FINAL	50

MIX 2	1X(μL)
MIX 1	10
295	1
296	1
MgCl ₂	1.2
TAQ	0.2
ADN	4.6
H ₂ O	2
VOL. FINAL	20

Se utilizaron los primers: forward 5' CCGCAGGGTGGTCTGTCTGGACTG3' y reverse: 5' AGCCCCACTCAGCATCCGTGTGAC3', con las siguientes condiciones de PCR: un ciclo de 2 minutos a 94° C, 35 ciclos con las siguientes condiciones; 10 segundos a 94° C, 25 segundos a 66° C, 30 segundos a 72° C, un ciclo de 5 minutos a 72° C y un ciclo final de 4° C (Bermúdez, 2006).

ANEXO 11.6

PROTOCOLO DIGESTION ENZIMATICA EXON 1, 677 de la MTHFR

MIX	1X (μL)
H ₂ O	15.3
BUFFER RE 10X	2
BSA	0.2
DNA	2
ENZIMA	0.5
VOL. FINAL	20

Condiciones: Enzima: *Taq I*
T°: 65° C
Tiempo: 3 horas

ANEXO 11.7

PROTOCOLO DIGESTION ENZIMATICA EXON 6, 699 de la CBS

	1X (μ L)
H ₂ O	16.5
BUFFER	2
BSA	0.2
ENZIMA	0.3
DNA	1
VOL. FINAL	20

Condiciones: Enzima: *RSa I*
T°: 37° C
Tiempo: 4 horas

ANEXO 11.8

PROTOCOLO DIGESTION ENZIMATICA EXON 10, 1080 de la CBS

	1X (µL)
H₂O	15.7
BUFFER	2.0
ENZIMA	0.3
DNA	2.0
VOL. FINAL	20

Condiciones: Enzima: *BsTU I*
T°: 60° C
Tiempo: 1 hora y media

ANEXO 11.9

PREPARACION GELES DE POLIACRILAMIDA

SOLUCION DE STOCK (30:1)

Solución acrilamida (30:1).....	2.8
TBE 10X	0.7 ml
Agua destilada.....	3.5 ml
APS.....	47 ul
Temed.....	4.7ul

ACRILAMIDA proporción 30:1 es 30g de acrilamida + 1g de bis – acrilamida, llevarla a 100 ml con agua estéril.

ANEXO 11.10

PROTOCOLO COLORACION DE PLATA

En el agitador:

Colocar 5' - 10' en Etanol al 10%

Colocar 3' en HNO_3 , lavar 2 veces con agua destilada

Colocar 20' con AgNO_3 mínimo 20 minutos pero puede ser mas

Lavar 2 veces con agua destilada

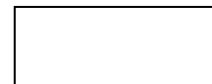
Revelado:

Colocar NaCO_3 y esperar unos segundos hasta que oscurezca el gel, retirar la solución de carbonato y agregar de la misma solución una cantidad equivalente hasta observar la aparición de las bandas.

Adicionar acido acético al 10% durante 5' - 10' para detener la reacción y colocar los geles en agua y glicerol y envolver en papel de celofán frío y dejar secar de un día para otro.



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA**



Estudio: ASOCIACIÓN ENTRE HOMOCISTEINA Y OTROS FACTORES DE RIESGO CON LOS POLIMORFISMOS 699C/T, 1080C/T, 844 INSERCIÓN 68pb DE LA CISTATIONINA β -SINTASA Y 677C/T DE LA METILENTETRAHIDRO FOLATO REDUCTASA EN PACIENTES CON TROMBOSIS VENOSA PROFUNDA Y SUPERFICIAL

Usted (o su pariente) está invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por el Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana. Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio: (a) Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. (b) El participar en este estudio puede no beneficiarlo a usted directamente, pero esta investigación nos permite clarificar muchos conceptos sobre la enfermedad y su mecanismo de herencia, de manera que los beneficios posteriores sean para usted, su familia u otros individuos afectados. (c) Usted puede retirarse del estudio cuando lo desee. La revocación de este consentimiento no tendrá perjuicio alguno sobre la relación médico - paciente. (d) Ninguna persona involucrada en este estudio recibirá beneficios económicos como pago por su participación. (e) Este estudio no tiene ningún interés económico por parte nuestra o de las instituciones colaboradoras. (f) CONFIDENCIALIDAD: Los registros con la información de cada individuo permanecerán archivados en el Instituto de Genética Humana. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de investigación tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento. Cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos. (g) La naturaleza de este estudio, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información importante está resumida a continuación y será explicada por el grupo investigador. (h) Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas.

Cualquier información adicional usted puede obtenerla de los investigadores, o directamente con:

**Jaime Bernal
Marta Bermúdez
Instituto de Genética Humana
Tel: (91)3208320 (Ext. 2791, 2796, 2798)**



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA**



EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL INDIVIDUO

OBJETIVO:

Determinar la asociación de homocisteína plasmática y los factores de riesgo, en pacientes con trombosis venosa, pertenecientes a un estudio de cohorte de una población de colombianos, con los polimorfismos 699C/T, 1080 C/T, 844 inserción 68 pb de la CBS y 677 C/T de la MTHFR.

PROCEDIMIENTO:

Se hará registro de datos sobre, edad, sexo, sobrepeso, hipertensión y consumo de anticonceptivos orales, de forma adicional se tomará una muestra de aproximadamente 14 ml de sangre de la vena, a la cual se le cuantificará los niveles colesterol total, colesterol LDL y colesterol HDL, triglicéridos, glucosa y homocisteína, se identificarán los polimorfismos 699C/T, 1080 C/T, 844 inserción 68 pb de la CBS y 677 C/T de la MTHFR. Si fuera necesario repetir los exámenes, usted sería notificado para tomar las muestras nuevamente. Estas muestras serán manejadas únicamente por las personas involucradas directamente en este proyecto, además serán almacenadas y procesadas en el Instituto de Genética Humana. Si usted decide retirarse del estudio, sus muestras dejarán de ser utilizadas de inmediato y serán devueltas si así lo desean.

RIESGOS E INCOMODIDADES:

La participación en este estudio representa riesgo mínimo para su salud e integridad y las molestias y efectos adversos estarán representados exclusivamente por la toma de muestra referida en el procedimiento.

BENEFICIOS ADICIONALES:

Este estudio nos ayudará a entender las causas de las enfermedades genéticas. Se puede dar el caso donde usted y su familia no se beneficien directamente, pero tanto su familia como otros individuos afectados si pueden beneficiarse. En el caso donde se logre conocer la alteración genética, se le informará inmediatamente. Es importante aclarar que este estudio no tiene ningún interés económico por parte de nuestra o de las instituciones colaboradoras.

RESPONSABILIDAD DEL PACIENTE Y PRECAUCIONES:

Al tomar parte de este estudio es importante que usted contemple las siguientes responsabilidades y precauciones:

MANEJO DE RESULTADOS:

Los resultados de los estudios genéticos solo le serán revelados cuando representen una ayuda diagnóstica para la entidad objeto de este estudio, estos resultados le serán entregados durante consulta clínica en presencia de un MEDICO GENETISTA. Los resultados de pruebas diagnósticas no genéticas empleadas en el estudio serán remitidos en sobre cerrado directamente al médico tratante que lo remitió.



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA**



OTRA INFORMACIÓN PERTINENTE:

Confidencialidad: cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos. Los registros médicos de cada individuo permanecerán archivados en el Instituto de Genética Humana. Las historias médicas, resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son absolutamente confidenciales, de manera que solamente usted y el investigador tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento.



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA**



AUTORIZACION:

La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la(s) entidad(es) anteriormente mencionada(s). Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

- Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio de investigación.**
- Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla en las situaciones señaladas a continuación:**
 - En estudios complementarios de diagnóstico para mí o algún miembro de mi familia: Si No
 - En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación Si No
 - En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación Si No
 - En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato mis datos de identificación Si No



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA**



**AUTORIZACIÓN PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSIÓN
VOLUNTARIA
EN EL ESTUDIO:**

Yo _____ identificado con documento de
identificación No. _____ de _____ acepto
voluntariamente que se me tome una muestra de _____, con el
fin de realizar análisis de _____.

Así mismo, declaró que se me ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se le
dará al material de muestra.

Fecha: _____

Paciente, Acudiente, Representante legal

Testigo

Investigador



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA**



**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRAS
BIOLÓGICAS CON EL OBJETO DE REALIZAR DIAGNOSTICO MOLECULAR**

Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio genético de diagnóstico molecular: (a) La realización de este estudio es totalmente voluntaria. (b) La naturaleza de este estudio, su propósito, sus limitaciones, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información pertinente al resultado de este, le será explicada por el equipo de atención clínica (c) Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas. (d) ENTREGA DE RESULTADOS: Los resultados del estudio le serán entregados (sin costo adicional) durante consulta clínica en presencia de un MEDICO GENETISTA. En caso que usted no acepte esta condición, el resultado será remitido en sobre cerrado directamente al médico tratante que lo remitió. (e) CONFIDENCIALIDAD: Los registros médicos de cada individuo permanecerán archivados en el Instituto de Genética Humana. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de atención clínica tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento. Cualquier información adicional usted puede obtenerla de los investigadores, o directamente con:

**Jaime Bernal
Marta Bermúdez
Instituto de Genética Humana
Tel: (91)3208320 (Ext. 2791, 2796, 2798)**



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA**



PROCEDIMIENTO:

Se realizará una entrevista clínica inicial y se procederá a tomar una muestra de aproximadamente _____ de _____ mediante _____

_ En caso de que sea necesario repetir los exámenes, usted será notificado para tomar las muestras nuevamente. Estas muestras serán manejadas únicamente por personas involucradas en el equipo de atención clínica.

BENEFICIOS ADICIONALES:

La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la(s) entidad(es) anteriormente mencionada(s). Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

- Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio de investigación.**
- Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla en las situaciones señaladas a continuación:**

-En estudios complementarios de diagnóstico para mí o algún miembro de mi familia: Si No

-En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación Si No

-En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación Si No

-En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato mis datos de identificación Si No



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA**



**AUTORIZACIÓN PARA LA TOMA DE MUESTRAS Y REALIZACIÓN
VOLUNTARIA DEL ESTUDIO DE DIAGNOSTICO MOLECULAR DE:**

Yo, _____ identificado con documento de
identificación: No. _____ de _____, acepto
voluntariamente que se me tome una muestra de _____ con el fin
de realizar análisis de _____. Así
mismo, declaró que se me ha explicado la no presencia de riesgos mayores y el manejo que
se le dará al material de muestra.

Firma _____
cc.

Acudiente: _____

(Testigo)
cc

ANEXO 11.12



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE GENETICA HUMANA

ASOCIACIÓN ENTRE HOMOCISTEINA Y OTROS FACTORES DE RIESGO CON LOS
POLIMORFISMOS 699 C/T, 1080 C/T, 844 INSERCIÓN 68pb DE LA CISTATIONINA β –
SINTASA Y 677 C/T DE LA METILENTETRAHIDRO FOLATO REDUCTASA EN
PACIENTES CON TROMBOSIS VENOSA

Encuesta No. _____

Nombre _____

Fecha _____

La información solicitada en este formato tiene un carácter estrictamente confidencial y solo será usada con fines académicos. Por favor, lea cuidadosamente cada pregunta y señale con una X la respuesta que corresponda. Le agradecemos la participación y la sinceridad prestada al realizar la encuesta.

Natural de _____

Procedente de _____

1. GENERO Femenino Masculino
2. EDAD Años cumplidos
3. FECHA DE NACIMIENTO DD/MM/AA
4. ESCOLARIDAD:
- | | | | | | |
|---------------|--------------------------|----------|--------------------------|------------|--------------------------|
| Ninguna | <input type="checkbox"/> | Primaria | <input type="checkbox"/> | Secundaria | <input type="checkbox"/> |
| Universitario | <input type="checkbox"/> | Técnico | <input type="checkbox"/> | Postgrado | <input type="checkbox"/> |
5. REGIMEN DE SEGURIDAD SOCIAL: SI NO
- | | | | | | |
|------------|--------------------------|-----------|--------------------------|--------------|--------------------------|
| Subsidiado | <input type="checkbox"/> | Vinculado | <input type="checkbox"/> | Contributivo | <input type="checkbox"/> |
|------------|--------------------------|-----------|--------------------------|--------------|--------------------------|

Nombre de la entidad _____

6. OCUPACION
- | | | |
|---|-------------------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> Ama de Casa | <input type="checkbox"/> Estudiante | <input type="checkbox"/> Trabajador independiente |
| <input type="checkbox"/> Laboralmente vinculado | | <input type="checkbox"/> Pensionado |

7. ETNIA: Blanca Mestiza
 Afrodescendiente Indígena

8. ESTATURA . en metros.

9. PESO en Kilogramos

IMC _____ Perímetro Abdominal _____

10. ¿Usted fuma o fumo en algún momento se su vida?

SI NO

Si su respuesta es si, por favor pase a la pregunta 11 de lo contrario pase a la N. 13

11. ¿Por cuánto tiempo? MESES _____ AÑOS _____

12. ¿Cuántos fumaba? _____

13. ¿Usted utiliza o utilizo anticonceptivos en algún momento se su vida?

SI NO

Si su respuesta es no, por favor pase a la pregunta N. 17.

14. ¿De que clase?

ORALES INYECTABLES

15. ¿Por cuánto tiempo? MESES _____ AÑOS _____

16. ¿En la actualidad hace uso de ellos? SI NO

17. ¿El diagnostico dado por su medico fue?

Trombosis venosa profunda

Tromboflebitis

Embolismo pulmonar

18. ¿Cuántas veces estuvo hospitalizado por problemas de trombosis?

1 vez 2 veces más de 2 veces

19. ¿Cuándo ocurrió esto?

20. ¿Cuál era su tensión arterial cuando estuvo hospitalizado? _____

21. Sabe si su tensión arterial actualmente es: Alta
 Normal
 Baja
 No sabe

Si respondió NO SABE en esta pregunta, por favor pase a la pregunta 23.

22. Toma algún medicamento para controlar su tensión arterial. SI NO

23. ¿Cuál es el medicamento? _____

Nombre genérico

24. Tensión arterial antes de la toma de muestra DIASTOLICA _____ SISTOLICA _____

- | | | | |
|---|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| 25. ¿Tiene el colesterol aumentado? | SI <input type="checkbox"/> | NO <input type="checkbox"/> | NO SABE <input type="checkbox"/> |
| 26. ¿Tiene el triglicéridos aumentados? | SI <input type="checkbox"/> | NO <input type="checkbox"/> | NO SABE <input type="checkbox"/> |
| 27. ¿Tiene glucosa aumentada? | SI <input type="checkbox"/> | NO <input type="checkbox"/> | NO SABE <input type="checkbox"/> |
| 28. ¿Alguno de sus familiares ha tenido problemas de trombosis? | SI <input type="checkbox"/> | NO <input type="checkbox"/> | NO SABE <input type="checkbox"/> |
| 29. ¿Usted sufre de diabetes? | SI <input type="checkbox"/> | NO <input type="checkbox"/> | NO SABE <input type="checkbox"/> |
| 30. ¿Alguien en su familia sufre de diabetes? | SI <input type="checkbox"/> | NO <input type="checkbox"/> | NO SABE <input type="checkbox"/> |
| 31. ¿Ud. sufre de alguna otra enfermedad? | SI <input type="checkbox"/> | NO <input type="checkbox"/> | NO SABE <input type="checkbox"/> |

32. ¿Cuáles? _____

33. ¿Toma algún medicamento relacionado con su problema de trombosis?

SI NO

¿Cuáles? _____

34. ¿Qué otros medicamentos esta tomando?

35. ¿Con que regularidad usted hace ejercicio?

- Diariamente Una vez por semana 2 o 3 veces por semana
 Más de 3 veces por semana Nunca

36. ¿Ha seguido alguna dieta alimenticia en el último año?

- SI NO

37. En esta dieta se evita el consumo de (marque con una X todas las casillas necesarias)

- Frutas Vegetales Carnes
 Todos los anteriores Otro ¿Cuál? _____

38. ¿Con que frecuencia consume frutas y verduras?

- Siempre Casi siempre Casi nunca Nunca

39. ¿Toma suplementos vitamínicos actualmente?

- SI NO NO SABE