Asociación de variantes funcionales en genes del metabolismo de la homocisteína con riesgo de trombosis venosa profunda e hiperhomocisteinemia en individuos del Sur de Chile

Neftalí Guzmán^{1,2,3} y Luis A. Salazar^{1,2}

¹Laboratorio de Biología Molecular y Farmacogenética, Depto. de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

(BIOREN), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Recibido el 28 de diciembre 2009 / Aceptado 7 de julio 2010

Rev Chil Cardiol 2011; 30: 28 - 32

Resumen:

Introducción: La Trombosis Venosa Profunda (TVP) es un importante problema de salud en la sociedad moderna. Evidencia reciente sugiere una asociación entre variantes funcionales en genes del metabolismo de la homocisteína con TVP. Sin embargo, los resultados entre poblaciones son contradictorios. En este trabajo, evaluamos la potencial asociación entre la presencia de polimorfismos en genes del metabolismo de la homocisteína y susceptibilidad a TVP e hiperhomocisteinemia en sujetos chilenos.

Métodos: Un total de 231 individuos, 77 pacientes con diagnóstico de TVP y 154 controles fueron incluidos en el estudio. Polimorfismos en los genes Metileno-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y Cistationina β -sintetasa fueron genotipificados por PCR-RFLP. Las concentraciones de homocisteína basal fueron cuantificadas mediante

Inmunoensayo de Fluorescencia Polarizada.

Resultados: La distribución genotípica y frecuencias alélicas del polimorfismo MTHFR C677T fue significativamente diferente entre pacientes y controles ($p < 0.01$). Odds Ratio para TVP asociada al genotipo homocigoto fue 3.68 (I.C. 95%: 1.628–8.337, $p < 0.01$). Por el contrario, la distribución genotípica de la variante CBS 844ins68 fue similar en ambos grupos (OR=1.82, I.C. 95%: 0.636–5.234, $p = 0.257$). Además, los portadores del genotipo homocigoto MTHFR 677TT presentaron niveles más elevados de homocisteína plasmática.

Conclusiones: El polimorfismo MTHFR C677T constituye un biomarcador de riesgo de TVP en población chilena, y se relaciona a mayores niveles de homocisteína en sujetos homocigotos. Los resultados sugieren que la detección molecular de esta variante debería ser incluida en el estudio básico de Trombofilia en nuestra población.

Correspondencia:

Dr. Luis Antonio Salazar
Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina,
Universidad de La Frontera.
Av. Francisco Salazar 01145, Casilla 54-D, Temuco
Fono: (45) 592 895 - Fax: (45) 592 832.
Correo Electrónico: lsalazar@ufro.cl

Association of functional variants in homocysteine metabolism genes, deep venous thrombosis risk and hyperhomocysteinemia in Southern Chilean subjects

Background: Deep Venous Thrombosis (DVT) is an important health problem in modern society. Recent evidence suggests an association between functional variants in homocysteine metabolism genes and DVT. However, findings in different populations have been contradictory. In this work, we evaluated the potential association between the presence of polymorphisms in homocysteine metabolism genes, DVT susceptibility and hyperhomocysteinemia in Chilean subjects.

Methods: A total of 231 individuals, 77 patients with diagnosis of DVT and 154 controls were included in this study. Common variants in Methylene-tetrahydrofolate reductase (MTHFR) and Cystathionine β -synthetase (CBS) genes were genotyped by PCR-RFLP. Basal homocysteine was quantified by Fluorescence Polarization Immunoassay.

Results: Genotype distribution and allelic frequencies

of MTHFR C677T polymorphism were significantly different between patients and controls. Odds Ratio for DVT associated to homozygous status was 3.68 (95% C.I., 1.628–8.337, $p < 0.01$). On the other hand, the genotype distribution of the CBS 844ins68 variant was similar in both groups (OR 1.82, 95% C.I.: 0.636–5.234, $p = 0.257$). In addition, the individuals carrying the MTHFR 677TT homozygous genotype exhibited higher levels of homocysteine.

Conclusion: The MTHFR C677T polymorphism constituted a molecular biomarker of DVT in Chilean population, and related to higher levels of homocysteine in homozygote subjects. The results suggest that the molecular detection of this polymorphism should be included in the basic screening for thrombophilia in our population.

Key words: Deep venous thrombosis, Risk factors, Molecular biomarkers

Introducción

La enfermedad tromboembólica constituye una importante causa de morbilidad en países occidentales, siendo considerada una enfermedad multifactorial cuya predisposición se encuentra asociada a la presencia de factores genéticos y ambientales¹.

La hiperhomocisteinemia constituye una de las alteraciones más frecuentes descritas en pacientes con trombosis, siendo consecuencia de defectos genéticos o adquiridos². Evidencia reciente sugiere que los niveles elevados de homocisteína jugarían un rol central en la tendencia a la hipercoagulabilidad y constituiría un factor de riesgo de trombosis venosa³⁻⁵. Diversos estudios han descrito variantes funcionales en genes codificantes para enzimas del metabolismo de la homocisteína que se encontrarían asociadas a enfermedad vascular^{6,7}. Sin embargo, los resultados en diversas poblaciones en el mundo son contradictorios^{8,9}.

En Chile, sólo un estudio previo ha evaluado el impacto del polimorfismo MTHFR C677T en pacientes con trombosis venosa profunda, demostrando que esta variante contribuiría al desarrollo de TVP en población chilena (OR = 2.0, I.C. 95% 1.06 – 3.79, $p < 0.05$)¹⁰. Sin embargo, en este estudio no fueron cuantificados los niveles plasmáticos de homocisteína en los pacientes analizados, no siendo posible correlacionar la presencia del genotipo mutado con el

fenotipo de hiperhomocisteinemia.

Ante la escasa evidencia disponible sobre las bases moleculares de la enfermedad tromboembólica venosa, el objetivo del presente estudio fue evaluar la potencial asociación entre la presencia de variantes funcionales en los genes MTHFR y CBS y susceptibilidad a trombosis venosa profunda e hiperhomocisteinemia en población chilena.

Métodos

Población en estudio

Un total de 231 individuos, 77 pacientes no relacionados con Trombosis Venosa Profunda (TVP) diagnosticada por ultrasonografía Doppler y 154 controles fueron incluidos en el estudio. Ninguno de los sujetos presentaba enfermedad hepática crónica o trombosis secundaria a enfermedad maligna. Datos antropométricos, demográficos e historia de hipertensión, diabetes mellitus, dislipidemia e historia familiar de trombosis fueron evaluados para cada individuo.

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética Científica del Servicio de Salud Araucanía Sur y todos los sujetos firmaron un documento de consentimiento informado de acuerdo a los principios básicos para investigación médica enumerados en la Declaración de Helsinki.

Cuantificación de homocisteína plasmática

La cuantificación de homocisteína total plasmática se realizó a partir de sangre total recolectada después de un ayuno de 12 horas, de acuerdo a criterios descritos previamente¹¹. Los niveles plasmáticos de homocisteína basal fueron cuantificados mediante un Inmunoensayo de Fluorescencia Polarizada (Abbott Laboratories)¹².

Genotipificación molecular

Se evaluaron las variantes 844ins68 del gen Cistationina β -sintetasa (CBS) y C677T del gen Metilenotetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Para los análisis moleculares, el DNA genómico fue extraído de sangre periférica mediante la metodología previamente descrita¹³. La detección molecular de la variante CBS 844ins68 fue realizada por ampliación directa por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de la región que contiene la mutación y su visualización por medio de electroforesis en gel de agarosa al 3%, de acuerdo al protocolo descrito por Ramsbottom et al.¹⁴.

Por su parte, la genotipificación del polimorfismo MTHFR C677T se realizó utilizando los partidores forward 5'-CC-GAAGCAGGGAGCTTTGAG-3' y reverse 5'-AGGACGGTGC GG TGAGAGTG-3'. Las reacciones de ampliación fueron realizadas en un volumen final de 25 μ l conteniendo 50 ng de DNA genómico, 100 nM de cada partidor, 200 mM de cada dNTP, 1 unidad de *Taq* DNA polimerasa and buffer de PCR (KCl 50 mM, 2 mM MgCl₂, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 75 mM Tris-HCl, pH 9.0).

Los productos de PCR fueron sometidos a restricción enzimática a 37°C por 12 horas con la endonucleasa *Hinf*I (Fermentas, Lituania). Los fragmentos de restricción fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio y visualizados en transiluminador UV. Todos los geles fueron leídos por dos personas en forma independiente y el 20% de los análisis fue repetido aleatoriamente.

Análisis estadístico

La distribución genotípica y la frecuencia relativa de alelos fueron calculadas por conteo de genes. Diferencias fueron evaluadas por test de χ^2 cuadrado. La Odds Ratio (OR) para TVP asociada a la presencia de las variantes analizadas fue calculada con un I.C. de 95%. Las variaciones en las concentraciones de homocisteína de acuerdo, al genotipo se evaluaron mediante test de ANOVA, asumiendo una significancia estadística de $p < 0.05$.

Resultados

Las características clínicas y demográficas de pacientes con TVP se presentan en la tabla 1. La distribución genotípica y frecuencia relativa de alelos de las variantes analizadas se presentan en la tabla 2. Las frecuencias genotípicas para los polimorfismos analizados se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Las frecuencias del polimorfismo MTHFR C677T fueron significativamente diferentes entre pacientes y controles ($p < 0.01$). El genotipo homocigoto para la variante analizada en el gen MTHFR mostró asociación significativa con TVP (OR=3.68, 95%I.C.: 1.628–8.337, $p < 0.01$). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en las frecuencias encontradas para la variante 844ins68 del gen de la enzima CBS en casos y controles (OR=1.82, 95%I.C.: 0.636–5.234, $p = 0.257$).

Las concentraciones plasmáticas de homocisteína basal, de acuerdo al genotipo de los polimorfismos investigados se muestran en la figura 1. Interesantemente, nuestros resultados muestran que los niveles plasmáticos de homocisteína basal fueron significativamente mayores en los individuos portadores de la variante MTHFR C677T al estado homocigoto (CC= 8.1 ± 2.4 μ mol/L; CT= 8.6 ± 3.1 μ mol/L v/s TT= 14 ± 6.1 μ mol/L, $p < 0.001$). Por otro lado, no se encontró asociación significativa entre la presencia de la variante CBS 844ins68 y concentraciones elevadas de homocisteína basal (Figura 1B).

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de pacientes con Trombosis Venosa Profunda del Sur de Chile

	Hombres (n=35)	Mujeres (n=42)
Edad, años	18 - 70	18-65
Media $\pm$ DS	44.8 $\pm$ 12.3	44.6 $\pm$ 12.1
Diabetes mellitus	4 (11.4%)	5 (11.9%)
Dislipidemia	1 (2.8%)	3 (8.6%)
Hipertensión	6 (17.1%)	6 (14.3%)
IMC, kg/m ²		
< 25	9 (25.7%)	19 (45.2%)
25- 30	18 (51.4%)	17 (40.5%)
> 30	8 (22.9%)	6 (14.3%)
Historia Familiar	9 (25.7%)	16 (38.1%)
Trombosis Previa	11 (31.4%)	13 (37.1%)

DS, Desviación Standard; IMC, Índice de Masa Corporal; Historia familiar, definida como la presencia de un evento trombótico en familiar de primer grado < 50 años; Trombosis Previa, definida como la presencia de un evento trombótico venoso anterior a los 50 años.

Tabla 2. Distribución de genotipos y frecuencia relativa de alelos para los polimorfismos MTHFR C677T y CBS 844ins68 en individuos chilenos con trombosis venosa profunda (TVP) y controles

Polimorfismo	Genotipo	TVP (n=77)	Controles (n=154)	P*
MTHFR C677T (rs1801133)	CC	35.1%	46.1%	< 0.01
	CT	42.8%	46.8%	
	TT	22.1%	7.1%	
	Alelos			
	C	0.56	0.70	
	T	0.44	0.30	
CBS 844ins68 ^a	WW	90.9%	94.8%	0.258
	WI	9.1%	5.2%	
	II	0%	0%	
	Alelos			
	W	0.955	0.97	
	I	0.045	0.03	

* OR=3.68 (95% IC= 1.628-8.337, $p<0.01$); W=Wild type; I=Inserción ^a 844ins68 corresponde a una inserción de 68 pb en el exón 8 del gen CBS.

Discusión

La trombosis venosa es una importante causa de morbilidad y mortalidad en países occidentales, encontrándose asociada a factores genéticos y ambientales. Evidencia epidemiológica sugiere que la hiperhomocisteinemia constituye un importante factor de riesgo de trombosis venosa⁵.

En el presente estudio, evaluamos la potencial asociación entre variantes funcionales en genes del metabolismo de la homocisteína (MTHFR y CBS) y susceptibilidad a trombosis venosa profunda e hiperhomocisteinemia en población del sur de Chile. El análisis de las características clínicas de los pacientes con TVP, muestra la presencia de diversos factores de riesgo, incluyendo obesidad, diabetes, hipertensión e historia familiar de trombosis, lo que se correlaciona con diversos estudios realizados en el mundo^{15, 16}. Sin embargo, otros estudios muestran resultados contradictorios¹⁷. En este sentido, un reciente meta-análisis demuestra una asociación significativa entre trombosis venosa y obesidad, diabetes mellitus, hipertensión e hipertrigliceridemia, lo que permite sugerir que factores de riesgo de enfermedad aterotrombótica también estarían asociados a trombosis venosa¹⁸.

Nuestros resultados muestran que la frecuencia de la variante MTHFR C677T es significativamente mayor en pacientes con trombosis comparada con controles, observándose que los portadores del polimorfismo al estado homocigoto presentan un elevado riesgo de TVP. Este hallazgo aporta evidencia sobre la importancia de esta

Figura 1. Niveles plasmáticos de homocisteína basal de acuerdo a los diferentes genotipos para los polimorfismos MTHFR C677T (A) y CBS 844ins68 (B) en pacientes con Trombosis Venosa Profunda. W=Wild type; I=Inserción. *P<0.05

variante como un biomarcador molecular de susceptibilidad a trombosis venosa en población chilena. Un reciente meta-análisis (8364 casos y 12468 controles) muestra que en poblaciones asiáticas y latinoamericanas, individuos con genotipo homocigoto presentan un mayor riesgo de trombosis comparados con individuos de genotipo normal (OR 1.60, 95% CI: 1.27 - 1.02)¹⁹, lo que se correlaciona con los resultados obtenidos en este estudio. En cuanto a la frecuencia alélica de esta variante en la población, ésta se correlaciona con diversos estudios que describen una elevada frecuencia de esta variante en población latinoamericana²⁰⁻²². En contraste, la distribución genotípica del polimorfismo CBS 844ins68 fue similar en pacientes y controles ($p=NS$). Similarmente, un reciente estudio a población norteamericana muestra una menor frecuencia de esta variante en hispanos comparados con otros grupos poblacionales²³.

Finalmente, al comparar los niveles plasmáticos de homocisteína basal, de acuerdo al genotipo de las variantes

analizadas en genes del metabolismo de la homocisteína, observamos que los portadores homocigotos de la variante C677T del gen MTHFR presentan mayores niveles de homocisteína que los portadores heterocigotos e individuos wildtype. Similarmente, estudios recientes demuestran una asociación significativa entre la presencia de esta variante con mayores niveles de homocisteína²³⁻²⁵. Por el contrario, no observamos una asociación similar entre el polimorfismo CBS 844ins68 y la presencia de niveles plasmáticos elevados de homocisteína.

En resumen, los resultados muestran que la variante MTHFR C677T constituye un biomarcador de riesgo de trombosis venosa profunda en población chilena, co-

relacionándose con niveles elevados de homocisteína basal. Esto permite sugerir que la detección molecular de la variante MTHFR C677T debería ser considerada en el estudio básico de trombofilia en población chilena, en conjunto con la cuantificación de homocisteinemia basal.

Agradecimientos

Trabajo financiado por la Dirección de Investigación, Universidad San Sebastián, Chile (Proyecto DIUSS N° 5005).

Referencias:

1. ROSENDAAL F. Venous Thrombosis: The Role of Genes, Environment, and Behaviour. *Hematology* 2005; 20: 1 – 12.
2. DAVEY SMITH G, EBRAHIM S. Mendelian randomization: can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? *Int J Epidemiol* 2003; 32: 1–22.
3. UNDAS A, BROZ J, JANKOWSKI M, SIUDAK Z, SZCZEKLIK A, JAKUBOWSKI H. Plasma Homocysteine Affects Fibrin Clot Permeability and Resistance to Lysis in Human Subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:1397-1404.
4. DEN HEIJER M, ROSENDAAL FR, BLOM HJ, GERRITS W, BOS G. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 1998; 80: 874–877.
5. DEN HEIJER M, LEWINGTON S, CLARKE R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 292–9.
6. FROSST P, BLOM H, MILOS R, GOYETTE P, SHEPPARD C.A, MATTHEWS RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular diseases: A common mutation in Metylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet* 1995; 10: 111-113.
7. ZHENG YZ, TONG J, DO XP, PU XQ, ZHOU BT. Prevalence of Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and its association with arterial and venous thrombosis in the Chinese population. *Br J Haematol* 2000; 109: 870–4.
8. HSU LA, KO YL, WANG SM, CHANG CJ, HSU TS, CHIANG CW, et al. The C677T mutation of themethylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with the risk of coronary artery disease or venous thrombosis among Chinese in Taiwan. *Hum Hered* 2001; 51: 41–5.
9. GROSSMANN R, SCHWENDER S, GEISEN U, SCHAMBECK C, MERATI G, WALTER U. CBS 844ins68, MTHFR TT677 and EPCR 4031ins23 genotypes in patients with deep-vein thrombosis. *Thromb Res* 2002; 107: 13–5.
10. SALAZAR LA, BELLO L, VARGAS C, LANAS F. Evaluación del impacto de la variante genética C677T de la enzima metilentetrahydrofolato reductasa en el pronóstico de trombosis venosa profunda. *Rev Chil Cardiol* 2007; 26: 35-42.
11. REFSUM H, SMITH D, UELAND P, EBBA NEXO E, CLARKE R, MCPARTLIN J, et al. Facts and recommendations about total homocysteine Determinations: An expert opinion. *Clin Chem* 2004; 50: 3–32.
12. ZIGHETTI M, CHANTARANGKUL V, TRIPODI A, MANNUCCI P.M, CATTANEO M. Determination of total homocysteine in plasma: comparison of the Abbott IMx immunoassay with high performance liquid chromatography. *Haematologica* 2002; 87:89-94.
13. SALAZAR LA, HIRATA M, CAVALLI S, MACHADO MO, HIRATA RD. Optimized procedure DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem* 1998; 44: 1748-50.
14. RAMSBOTTOM O, SCOTT J.M, MOLLOY A, WEIR DG, KIRKE PN, MILLS JL. Are common mutations of cystathionine β -synthase involved in the aetiology of neural tube defects?. *Clin Genet* 1997; 51: 39-42.
15. ABDOLLAHI M, CUSHMAN M, ROSENDAAL FR.

- Obesity: risk of venous thrombosis and the interaction with coagulation factors and oral contraceptive use. *Thromb Haemost* 2003; 89: 493-498.
16. PETRAUSKIENE V, FALK M, WAERNBAUM I, NORBERG M, ERIKSSON JW. The risk of venous thromboembolism is markedly elevated in patients with diabetes. *Diabetologia* 2005; 48:1017-1021.
 17. PRANDONI P, BILORA F, MARCHIORI A, BERNARDI E, PETROBELLI F, LENSING AWA, et al. An association between atherosclerosis and venous thrombosis. *N Engl J Med*. 2003; 348: 1435-1441.
 18. AGENO W, BECATTINI C, BRIGHTON T, SELBY R, KAMPHUISEN P. Cardiovascular Risk Factors and Venous Thromboembolism: A Meta-Analysis. *Circulation* 2008; 117: 93-102.
 19. DEN HEIJER M, LEWINGTON S, CLARKE R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 292- 299.
 20. ARRUDA V, SIQUEIRA L, GONÇALVES M, VON ZUBEN P, SOARES M, MENEZES R, et al. Prevalence of the mutation C677>T in the Methylenetetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet* 1998; 78: 332-335.
 21. PEPE G, CAMACHO V, GIUSTI T, BRUNELLI T, MARCUCCI R, ATTANASIO M, et al. Heterogeneity in world distribution of the thermolabile C677T mutation in 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J hum Genet* 1998; 63: 917-920.
 22. GENOUD V, CASTAÑÓN M, ANNICHINO-BIZZACCHI J, KORIN J, KORDICH L. Prevalence of Three Prothrombotic Polymorphisms: Factor V G1691A, Factor II G20210A and Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T in Argentina. *Thromb Res* 2000; 100: 127-131.
 23. YANG Q, BOTTO I, GALLAGHER M, FRIEDMAN JM, SANDERS C, KOONTZ D, et al. Prevalence and effects of gene-gene and gene-nutrient interactions on serum folate and serum total homocysteine concentrations in the United States: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey DNA Bank. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 232-246
 24. GUÉANT-RODRÍGUEZ R, GUÉANT JL, DEBARD R, THIRION S, HONG L, BRONOWICKI JP, et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 701-707.
 25. OUVIÑA SM, LA GRECA A, MARDARAZ C, ARAUJO G, NEGRO F, FERRO A. Homocysteine plasma levels and MTHFR C677T mutation. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1038.