

**ASOCIACION DEL POLIMORFISMO C677T DEL GEN DE LA ENZIMA  
METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (MTHFR) CON LOS NIVELES  
DE HOMOCISTEINA EN PACIENTES CON SINDROME CORONARIO AGUDO**

**DAISY JOHANA LOZANO ARIAS**

**PROYECTO DE TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR AL  
TITULO DE LICENCIADO EN BIOLOGIA Y EDUCACION AMBIENTAL**

**DIRECTORA:**

**PATRICIA LANDAZURI MSc. PhD.**

**ASESORAS:**

**NELSY LOANGO CHAMORRO Lic. Esp.**

**ANA MARIA LOPEZ Ing. Esp.**

**UNIVERSIDAD DEL QUINDIO**

**FACULTAD DE EDUCACION**

**PROGRAMA DE LIC. EN BIOLOGIA Y EDUCACION AMBIENTAL**

**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**

**GRUPO DE INVESTIGACION EN ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y**

**METABOLICAS (GECAVYME)**

**ARMENIA**

**2005**

**ASOCIACION DEL POLIMORFISMO C677T DEL GEN DE LA ENZIMA  
METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (MTHFR) CON LOS NIVELES  
DE HOMOCISTEINA EN PACIENTES CON SINDROME CORONARIO AGUDO**

**DAISY JOHANA LOZANO ARIAS**

**UNIVERSIDAD DEL QUINDIO  
FACULTAD DE EDUCACION  
PROGRAMA DE LIC. EN BIOLOGIA Y EDUCACION AMBIENTAL  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
GRUPO DE INVESTIGACION EN ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y  
METABOLICAS (GECAVYME)  
ARMENIA  
2005**

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>PAGINA</b>
1. RESUMEN	
2. INTRODUCCION	2
3. OBJETIVOS	4
3.1. Objetivo General	4
3.2. Objetivos Específicos	4
4. ESTADO DEL ARTE	6
5. MARCO TEORICO	9
5.1. La Homocisteína	9
5.2. Metabolismo de la homocisteína	10
5.3. Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)	11
5.4. Presión Arterial	13
5.5. Enfermedad coronaria	13
6. METODOLOGÍA	15
6.1. Tipo de estudio/ Población	15
6.2. Criterios de inclusión (individuos casos)	15
6.3. Criterios de exclusión (individuos casos)	16
6.4. Criterios de inclusión (individuos control)	16
6.5. Criterios de exclusión (individuos control)	17
6.6. Procedimiento general	17
6.7. Definición de variables	17
6.8. Procedimientos de laboratorio	18
6.8.1. Muestra	18
6.8.2. Determinación de los niveles de homocisteína sérica	18
6.8.2.1. Principio del análisis	18
6.8.2.2. Curvas de calibración	19
6.8.3. Determinación del polimorfismo C677T del gen de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa.	20

6.9. Análisis estadístico	22
7.0. RESULTADOS	23
7.1. Variables medidas	23
7.2. Parámetros clínicos de los pacientes con síndrome coronario agudo (casos)	24
7.3. Niveles de homocisteína	25
7.3.1. Niveles de homocisteína en casos y controles	25
7.3.2. Relación del género con los niveles de homocisteína (casos-controles)	26
7.3.3. Relación de la edad con los niveles de homocisteína (casos-controles)	27
7.4. Presión arterial (sistólica-diastrólica)	28
7.4.1. Relación de los niveles de homocisteína con la presión arterial sistólica en casos y controles	28
7.4.2. Relación de los niveles de homocisteína con la presión arterial diastrólica (casos-controles)	29
7.4.3. Relación del género con la presión arterial (sistólica-diastrólica) en casos y controles	30
7.5. Determinación del Polimorfismo C677T	31
7.5.1. Genotipos encontrados en los individuos del estudio	32
7.5.2. Distribución de los genotipos en casos y controles	32
7.5.3. Relación de los genotipos con los niveles de homocisteína (casos-controles)	33
7.5.4. Relación de los genotipos con el género (casos-controles)	34
7.5.5. Relación de los genotipos con la presión arterial (sistólica-diastrólica) en casos y controles.	35
7.6. Ley de Hardy-Weinberg	36
8.0. DISCUSION	37
9.0. CONCLUSIONES	42
10. BIBLIOGRAFIA	43

## LISTA DE TABLAS

	<b>PAGINA</b>
Tabla 1. Comportamiento de las variables en casos y controles	23
Tabla 2. Niveles de homocisteína (quintiles) en casos y controles	25
Tabla 3. Genotipos y alelos encontrados en los individuos del estudio.	32
Tabla 4. Genotipos y género de casos y controles	35

## LISTA DE FIGURAS

		<b>PAGINA</b>
Figura 1.	Metabolismo de la Homocisteína	11
Figura 2.	Representación del modelo del polimorfismo C677T del gen de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa	12
Figura 3.	Formación de placas de ateroma.	14
Figura 4.	Visualización de la amplificación y los productos de digestión enzimática del polimorfismo C677T	21
Figura 5.	Relación de las variables de diagnóstico de síndrome coronario agudo en pacientes casos	24
Figura 6.	Relación del género con los niveles de homocisteína (casos-contróles)	26
Figura 7.	Relación de la edad con los niveles de homocisteína (casos-contróles)	27
Figura 8.	Relación de los niveles de homocisteína con la presión sistólica (casos-contróles)	28
Figura 9.	Relación de los niveles de homocisteína con la presión diastólica (casos-contróles)	29
Figura 10.	Relación entre el género y la presión arterial sistólica en casos y contróles	30
Figura 11.	Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% que muestra los resultados de la digestión enzimática del polimorfismo C677T	31
Figura 12.	Relación de los genotipos con el número de individuos (casos-contróles)	33
Figura 13.	Relación de los genotipos con los niveles de homocisteína (casos-contróles)	34
Figura 14.	Relación de la presión arterial (sistólica-diastólica) con el genotipo (casos-contróles)	36

## LISTADO DE ANEXOS

	<b>PAGINA</b>
Anexo 1 Consentimiento informado	48
Anexo 2 Encuesta	49
Anexo 3 Protocolo Extracción de ADN	51

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por brindarme el derecho de vivir y por llenarme de paciencia y perseverancia.

A mis padres Orlando Lozano y Luz Stella Arias, por la educación que me han dado, por su apoyo y confianza.

A mi abuela Emma por estar siempre a mi lado dándome fuerzas para seguir adelante.

A Roberto y familia por su apoyo y comprensión.

A la Doctora Patricia Landazuri, directora del proyecto por el apoyo, dedicación y paciencia.

A la Magíster Nelsy Loango Chamorro, por la confianza que deposito en mi y por el apoyo y dedicación que me brindo durante todo el proyecto.

A Ana Maria López , Esp, por asesorarme en la parte práctica del proyecto.

Al grupo de Investigación GECAVYME (Juanita, Johany, Ramiro, Hernán, Mónica, etc) por brindarme apoyo para realizar el proyecto.

A todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de este proyecto.



## **DEDICATORIA**

*A mi familia por que son la inspiración de mi vida y por que sin ellos no hubiese sido posible salir adelante con mis metas.*

***“La fé es la garantía de lo que se espera, la certeza de lo que no se ve”***

Heb. 11:1

## 1. RESUMEN

Se realizó un estudio de casos y controles con muestra condicionada de 100 individuos, de los cuales 50 presentaron diagnóstico clínico de síndrome coronario agudo, y 50 se consideraron controles; ambos grupos ingresaron al hospital San Juan de Dios de Armenia – Quindío; el objetivo del estudio fue asociar el Polimorfismo C677T del gen de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), con los niveles de homocisteína.

En las muestras se determinaron los niveles de homocisteína sérica, encontrándose para casos un 56% dentro del rango normal, y un 34% en el nivel moderadamente elevado. Como era de esperarse la mayoría de los controles (84%) presentaron niveles normales; además la relación de los niveles de homocisteína con la edad fue acorde a lo reportado en la literatura, al aumentar con dicho parámetro; en cuanto a la relación de la homocisteína con el género los valores obtenidos fueron diferentes a los reportados en la literatura, encontrándose que tanto en casos como en controles, hombres y mujeres presentaron niveles similares de homocisteína, aunque los casos mostraron Hiperhomocisteinemia moderada.

Para identificar el polimorfismo C677T, se realizó una extracción de ADN, seguido de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y finalmente una digestión (RFLP) con la enzima de restricción *Hinf* I. Se encontró que el genotipo TT, tuvo mayor prevalencia en controles (11 individuos) que en casos (5 individuos); sin embargo este genotipo presentó niveles de homocisteína más elevados (18.58  $\mu\text{mol/L}$ ) en casos que en controles (9.04  $\mu\text{mol/L}$ ).

Se muestra entonces que la relación que existe entre el genotipo TT (casos) del polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR, con la elevación moderada de los niveles de homocisteína, puede ser un riesgo para padecer síndrome coronario agudo.

**Palabras claves:** Homocisteína, polimorfismo C677T, metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), síndrome coronario agudo.

## 2. INTRODUCCION

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) se han convertido en un problema muy serio de salud pública y es una causa frecuente de mortalidad en muchos países. En Colombia las enfermedades cardiovasculares representan la segunda causa de mortalidad, luego de las muertes violentas, ocupando el primer lugar en grupos de mayores de 45 años <sup>(1)</sup>.

En los últimos años, se han descubierto nuevos factores de riesgo que se relacionan con un aumento en la incidencia de enfermedades cardiovasculares. Entre ellos, la homocisteína (Hcy), el fibrinógeno, el aumento de la reactividad de las plaquetas, la lipoproteína, la hipercoagulabilidad, etc. Los factores de riesgo convencionales predicen menos de la mitad de los eventos cardíacos, por lo que estos nuevos factores podrían estar relacionados con gran parte de los casos de enfermedades cardíacas en los que ninguno de los factores convencionales está presente <sup>(2)</sup>.

Recientes estudios confirman que un aumento en la concentración de homocisteína sérica está relacionado en forma lineal con un aumento del riesgo de enfermedad cardíaca, mediante un mecanismo en el cual la homocisteína es un factor de daño vascular, ya que es un aminoácido fácilmente auto-oxidable, lo cual genera la formación de radicales libres, produciendo daño endotelial, exposición de la matriz subendotelial y en consecuencia, estimula la agregación plaquetaria y la formación de trombos<sup>(3,4)</sup>.

La enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) juega un papel esencial en el metabolismo de la homocisteína ya que participa directamente en la vía de remetilación, para esta enzima se han descrito varias mutaciones entre las cuales se encuentra la del

polimorfismo C677T, causante de una deficiencia del 50% en la actividad enzimática, dicha deficiencia interviene en la variación de los niveles de homocisteína, lo cual según Kang <sup>(5)</sup> se asocia con un incremento de riesgo cardiovascular.

En el Quindío no se han reportado estudios sobre la asociación del polimorfismo C677T del gen de la enzima metiletetrahidrofolato reductasa (MTHFR) con los niveles de homocisteína en individuos con síndrome coronario agudo; por consiguiente, se realizó el presente trabajo, con el fin de determinar dicha asociación.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Asociar el Polimorfismo C677T del gen de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) con los niveles de homocisteína en individuos con síndrome coronario agudo considerados como caso y un grupo de individuos control, que ingresaron al Hospital San Juan de Dios, Armenia-Quindío.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- ❖ Detectar el Polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR en individuos con síndrome coronario agudo considerados como caso y en individuos control que ingresaron al Hospital San Juan de Dios, Armenia-Quindío.
  
- ❖ Medir los niveles de homocisteína en los dos grupos de estudio.
  
- ❖ Relacionar el polimorfismo C677T del gen de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa con los niveles plasmáticos de homocisteína.
  
- ❖ Relacionar los niveles de homocisteína con la presión arterial (sistólica y diastólica) en los dos grupos de estudio.

- ❖ Relacionar la presión arterial (sistólica y diastólica) con el polimorfismo C677T, en los dos grupos de estudio.
  
- ❖ Asociar el polimorfismo C677T del gen de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa con síndrome coronario agudo.
  
- ❖ Establecer las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR en la población de estudio.

#### 4. ESTADO DEL ARTE

Gerritsen <sup>(6)</sup> y Carson <sup>(7)</sup> en 1962, identificaron inicialmente la homocisteína en la orina de unos niños con retraso mental; dos años más tarde Mudd y colaboradores <sup>(8)</sup> descubrieron la deficiencia de cistationina  $\beta$ -sintasa como la causante de elevadas concentraciones de homocisteína en plasma y homocistinuria, observaron además que estos pacientes sufrían frecuentes episodios tromboembólicos, falleciendo por causas cardiovasculares más del 25% de los mismos antes de los 30 años.

En 1969, Mc-Cully <sup>(9)</sup> relacionó la homocisteína con la enfermedad cardiovascular y propuso que la homocisteína plasmática elevada podría ser una de las causas de aterosclerosis, se basó en la evidencia de la trombosis arterial extensa, estenosis arterial progresiva y cambios hemostáticos, que presentaban 2 niños con homocistinuria, a los cuales se les realizó la autopsia.

En 1972, Mudd y colaboradores <sup>(10)</sup>, encontraron casos de homocisteinuria asociados a la deficiencia de la enzima MTHFR y a defectos en el metabolismo de la vitamina B-12.

Wilcken y Wilcken <sup>(11)</sup> en 1976, comunicaron por primera vez una patogénesis de las arterias coronarias de pacientes que implicaba un metabolismo anormal de homocisteína.

Kang y colaboradores en 1986, en estudios relacionados con homocisteína y enfermedad coronaria donde se tomaron 241 casos y 202 controles encontraron que 186 pacientes presentaban enfermedad coronaria <sup>(5)</sup>.

En 1988, Kang fue uno de los primeros investigadores en señalar que la homocisteinemia causada por la variante termolábil de la MTHFR es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad arterial coronaria <sup>(12)</sup>.

En 1991, Clarke y colaboradores <sup>(13)</sup>, en un estudio de casos y controles, demostraron la relación entre homocisteína y enfermedad vascular, tras sobrecarga con metionina; encontrando que todos los pacientes presentaban hiperhomocisteinemia, además un 42% padecían de enfermedad cerebrovascular, un 28% de enfermedad vascular periférica y el 30% restante de enfermedad coronaria.

En 1994, Goyette *et al* <sup>(14)</sup>, aislaron ADN complementario (ADNc) del gen MTHFR, descubrieron 9 mutaciones en este gen y entre ellas identificaron una variante polimórfica en la posición nucleotídica 677, que consistía en un cambio de base de citosina a timina produciendo la sustitución de alanina (GCC) por valina (GTC), denominando a dicho polimorfismo Ala225Val.

Boushey y colaboradores <sup>(15)</sup> en 1995, publicaron un metaanálisis de 27 estudios, en el cual demostraron que la homocisteína era un importante e independiente factor de riesgo de aterosclerosis, tanto en la enfermedad coronaria como en la enfermedad



cardiovascular y en la enfermedad vascular periférica. Estimaron que el 10% del riesgo de enfermedad coronaria en la población general es atribuible a la homocisteína, con una odds ratio de 1:6 para hombres y de 1:8 para mujeres <sup>(16)</sup>. Además sugirieron que un incremento en la ingesta diaria de ácido fólico de unos 200ug podría reducir en unos 4 umol/L la concentración de homocisteína, lo cual, podría suponer un descenso de la mortalidad cardiovascular <sup>(15)</sup>.

En 1995 Frosst y Hustad S *et al*, 2000 <sup>(17-18)</sup>, reportaron el polimorfismo C677T para el Gen de la Metilentetrahidrofolato Reductasa. El fenotipo T de esta variante genética está caracterizada por una reducción de la actividad catalítica y termolábil de la enzima, asociada a niveles elevados de la homocisteína con deficiencia de folatos.

En 1996, Kluijtmans <sup>(19)</sup> determinó que los portadores homocigotos (TT) para la mutación de la enzima MTHFR, tienen 3 veces más la probabilidad de desarrollar enfermedad cardiovascular prematura.

Motulsky en 1996 <sup>(20)</sup>, publicó la participación de la MTHFR y la homocisteína en el desarrollo de enfermedad vascular y defectos en el cierre del tubo neural (DCNT).

Hacia 1998 Donner <sup>(16)</sup> en un estudio de casos y controles encontró que la enfermedad coronaria podría ser atribuible a niveles elevados de Hcy con una odds ratio de 1:16. Estudios recientes 2002 – 2003 <sup>(21)</sup> del tipo metaanálisis casos y controles encontraron una odds ratio de 1:16 para pacientes con enfermedad coronaria.

~~4 del gen que se traduce en un cambio de Alanina por Valina en el aminoácido 222 de la proteína.~~

## 5. MARCO TEORICO

### 5.1. La Homocisteína

La homocisteína es un aminoácido que se sintetiza en el organismo a partir de la metionina, la cual contiene un grupo tiol que se produce por la desmetilación de la misma, siendo un intermediario en la biosíntesis de esta a partir de la cisteína.

Es una molécula fácilmente oxidable en el organismo, formando mezclas disulfuro con otros aminoácidos como la cisteína y con ella misma, su forma libre y su forma conjugada con otros aminoácidos representan el 20% del total en el organismo y el resto de Hcy se encuentra ligada a proteínas.

La única fuente de metionina es la ingesta, principalmente de proteínas de animales <sup>(22-23)</sup>; Sin embargo se puede encontrar en mayores concentraciones en el banano, cereales como el arroz y el maíz, en guisantes y en el pescado <sup>(24)</sup>.

Las concentraciones normales de homocisteína en humanos se encuentran entre los 5 y 12  $\mu\text{mol/L}$ , por encima de este valor se presenta la hiperhomocisteinemia, y según su concentración sérica se clasifica así: <sup>(25-26)</sup>.

1. Moderada: 12.1-30  $\mu\text{mol/L}$
2. Intermedia: 30.1-100  $\mu\text{mol/L}$
3. Severa: >100  $\mu\text{mol/L}$

La elevación de la homocisteína en sangre es multifactorial, se puede deber a diferentes causas, entre ellas, una elevada ingesta de metionina y/o medicamentos, una reducción en el metabolismo, una alteración genética que puede ocurrir en cualquiera de las enzimas involucradas en el metabolismo de la homocisteína o por deficiencia nutricionales de cofactores o cosustratos enzimáticos, tales como folatos, vitamina B6 o B12 <sup>(23-24)</sup>.

Se ha establecido que los niveles moderadamente elevados de homocisteína, están asociados con el riesgo de desarrollar enfermedad coronaria, cerebral y vascular periférica <sup>(23)</sup>.

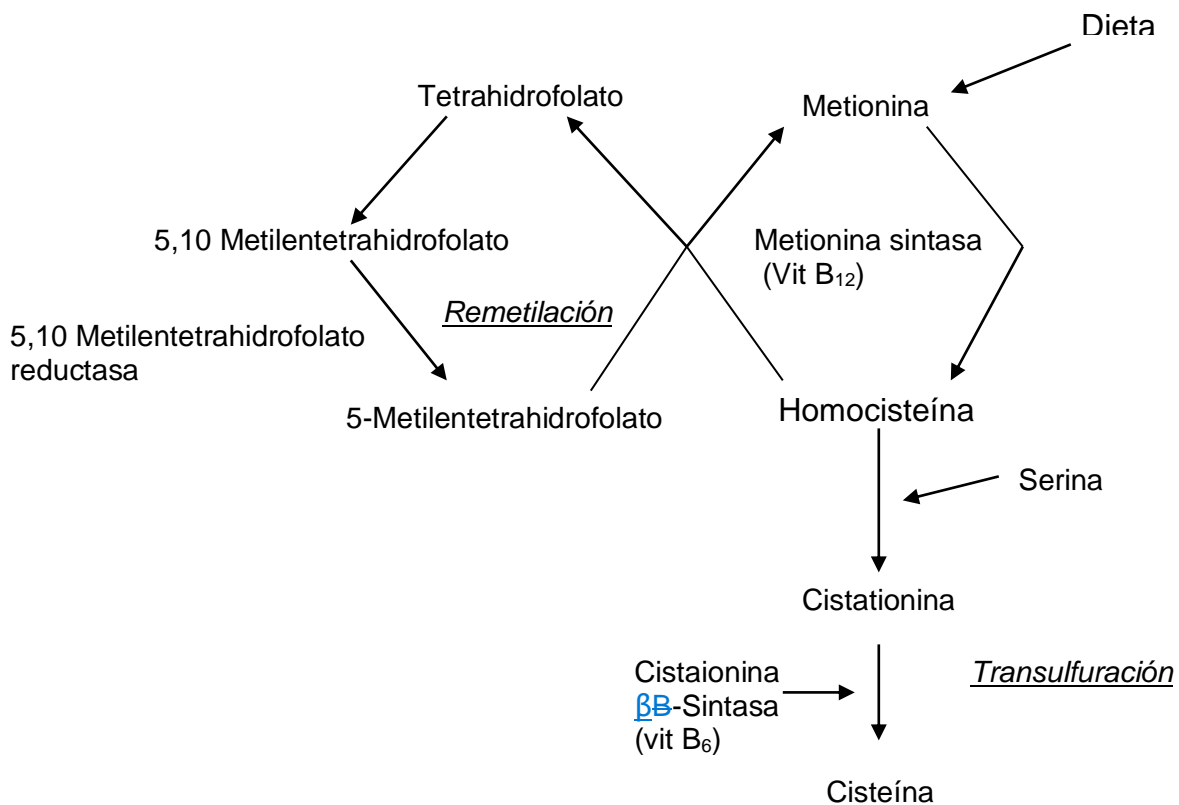
## 5.2. Metabolismo de la Homocisteína

El metabolismo de la homocisteína se relaciona con las vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y ácido fólico (Figura 1). La Hcy se encuentra en la intersección de dos vías metabólicas así:

- **Vía de Remetilación:** Para producir Metionina, donde intervienen un grupo de enzimas en las que se destaca MTHFR dependiente de folato (Figura 1).

- **Vía de Transulfuración:** Para producir cisteína, que se elimina por la orina; donde intervienen un grupo de enzimas como: la Cistationina  $\beta\beta$ -Sintasa dependientes de vitamina B6 <sup>(27)</sup> (Figura 1).

La concentración de metionina determina la ruta de Transulfuración o transmetilación que debe seguir la homocisteína <sup>(28)</sup>.



**Figura 1. Metabolismo de la Homocisteína <sup>(28)</sup>**

### 5.3. Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

El gen de la MTHFR contiene 2,2 kilobases, está localizado en el brazo corto del cromosoma 1 (1p36.3) y codifica para una proteína de 77KDa, que constituye una enzima clave en el metabolismo del folato y la homocisteína.

En dicho gen se produce un polimorfismo puntual del nucleótido que involucra un cambio de citosina por timina en la posición 677 (C677T) del exón 4 del gen (Figura 2), que se traduce en un cambio de alanina por valina en el aminoácido 225 de la proteína. La alteración (mutación) produce una versión termolábil de la enzima, por lo cual el genotipo TT está asociado con una deficiencia parcial de la misma, lo que se traduce en la disminución de un 50% en la actividad enzimática<sup>(29)</sup>, influyendo en los niveles séricos de la homocisteína, produciendo hiperhomocisteinemia<sup>(30-31)</sup>.

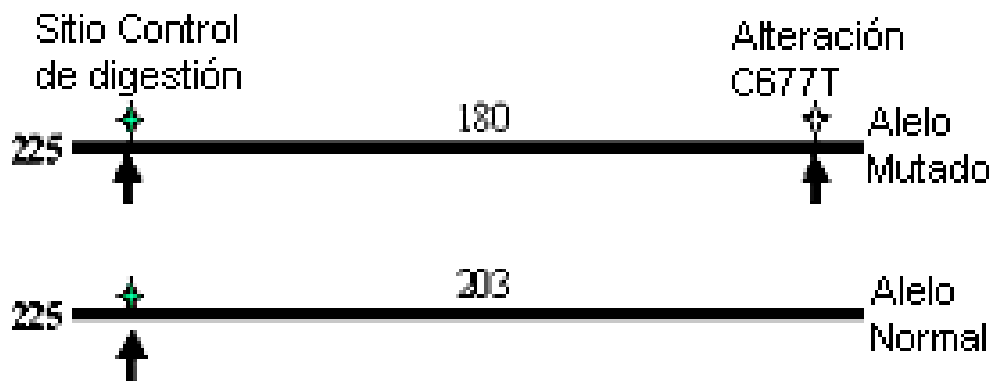


Figura 2. Representación del modelo del polimorfismo C677T del gen de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa<sup>(32)</sup>

En diversas publicaciones se han demostrado variaciones étnicas y regionales para las frecuencias alélicas y fenotípicas de esta mutación, en las cuales el alelo T presenta

frecuencias altas, 58.6% en Mexicanos <sup>(29)</sup>, en Europeos (>50%) <sup>(33)</sup>, 45% en Koreanos <sup>(34)</sup>, 43.8% en italianos <sup>(29)</sup>, 30% en USA <sup>(35)</sup> y 35% en Hispanos <sup>(36)</sup>, raramente en Áfricanos <sup>(37)</sup>, mostrándose niveles de Hcy más altos en homocigotos (TT) asociado a deficiencia de folatos. Así el genotipo (TT) homocigoto mutada, ha sido encontrado entre el 30 y el 50% de pacientes con hiperhomocisteinemia <sup>(17-38)</sup>.

Sin embargo entre el 5 y el 15% de las personas normales son homocigotos (TT) para la mutación de la enzima MTHFR <sup>(39,40,41,42)</sup>.

#### **5.4. Presión Arterial**

El término presión arterial se refiere al nivel de fuerza o presión que existe en el interior de las arterias; esta presión es producida por el flujo de sangre. Cada vez que late el corazón, sube la presión (sístole), y entre latidos, cuando el corazón está en reposo, esta presión vuelve a bajar (diástole) <sup>(45)</sup>.

Una **presión arterial óptima** sería de 120/80 mmHg o un poco menor. La **presión arterial** se considera **normal** hasta valores de 130/85 mmHg; hasta 139/89 mmHg sería **normal alta**. Sobre los 140/90 mmHg la presión está elevada y se comienza a hablar de **hipertensión arterial**.

Si sólo la presión sistólica está elevada (sobre 140 mmHg) y la diastólica es normal (bajo 90 mmHg), se habla de **hipertensión arterial de predominio sistólico** <sup>(46)</sup>.

## 5.5. Enfermedad coronaria

La enfermedad coronaria se desarrolla lentamente y puede llegar a causar la muerte instantáneamente en la mayoría de casos.

Los vasos sanguíneos que llevan oxígeno y nutrientes al músculo cardíaco (miocardio) son pequeños y forman una corona que rodea al corazón (vasos coronarios), la enfermedad coronaria empieza cuando en estos pequeños vasos se desarrollan las placas de ateroma (Figura 3), que son un acúmulo de colesterol, calcio y otras sustancias en las paredes de los vasos, lo que conlleva a una disminución en el calibre de las arterias por lo que se bloquean reduciendo el suministro de oxígeno al músculo cardíaco, generando un síndrome agudo coronario, que puede presentarse como una angina inestable o un infarto agudo al miocardio, dando lugar a la necrosis o muerte tisular <sup>(43)</sup>.

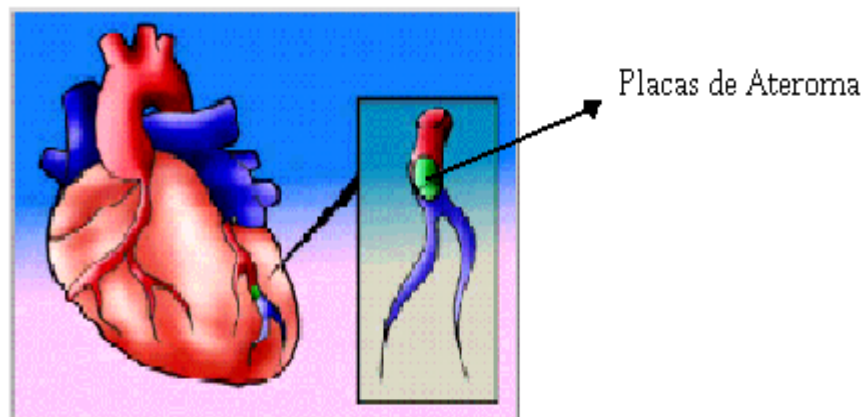


Figura 3. Formación de placas de ateroma <sup>(43)</sup>

La patología coronaria alcanza actualmente proporciones epidémicas; según cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta patología es responsable de un tercio de las muertes en varones entre 45 y 54 años de edad y de la muerte de 4 de cada 10 varones en todos los grupos de edades <sup>(44)</sup>.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Tipo de estudio/ Población

Se realizó un estudio de casos y controles con muestra condicionada, en individuos que ingresaron al hospital San Juan de Dios de Armenia – Quindío. La población fue de 50 individuos casos con diagnóstico clínico de síndrome coronario agudo y 50 individuos controles.

### 6.2. Criterios de inclusión (individuos casos)

Hombres y mujeres entre 20 y 60 años, que al ingreso presentaron síndrome coronario agudo (Enfermedad Coronaria (EC)) con alguno de los siguientes diagnósticos:

- **Angina Estable:** Dolor de tipo opresivo o sensación de peso o de ahogo, localizado en el hemitórax izquierdo, puede irradiarse a la región subxifoidea, brazo izquierdo, se presenta cuando se esta realizando algún tipo ejercicio o deporte.
- **Angina Inestable:** Cuadro de dolor anginoso que se presenta por una súbita e importante disminución del flujo sanguíneo y que se puede presentar: en reposo



(angina en reposo), o incrementando (angina acelerada) o angina de reciente comienzo (2 meses) o presentarse luego de infarto (angina post infarto),.

- **Infarto agudo del miocardio (IAM) con segmento T (ST) elevado**
- **Infarto agudo del miocardio con ST no elevado**

### **6.3. Criterios de exclusión (individuos casos)**

- Individuos menores de 20 años y mayores de 60 años
- Síndrome Coronario Agudo de causa diferente a Enfermedad Coronaria como :
  - Toxicidad por drogas
  - Anfetaminas
  - Cocaína: derivados
- Individuos que consumían medicamentos como:
  - Metotrexate, Oxido Nitroso, Fenitoina, Carbamazepina, estrógenos
- Individuos con consumo de medicamentos para el tratamiento de:
  - Anemia
  - Menopausia
- Individuos con patologías como:
  - Insuficiencia Renal Crónica
  - Insuficiencia Renal Aguda
  - Diabetes Mellitus
  - Hipotiroidismo

#### **6.4. Criterios de inclusión (individuos control)**

Hombres y mujeres con edad entre 20 y 60 años, sin diagnóstico de síndrome coronario.

#### **6.5. Criterios de exclusión (individuos control)**

Se tomaron los mismos criterios que para los casos.

#### **6.6. Procedimiento general**

A cada participante del estudio (casos-contróles) se les explicó por escrito el propósito de la investigación, y se le solicitó firmar un consentimiento informado acerca del trabajo (anexo 1). Además se les realizó una encuesta (anexo 2) que incluía información general como: Identificación del paciente, antecedentes personales, antecedentes familiares, consumo de medicamentos y diagnóstico.

#### **6.7. Definición de variables**

A. Edad: 20-60 años

B. Peso: Kg

C. Presión arterial

Normal: < 130/85 mmHg

Normal alto: 130/85 – 139/89 mmHg

Hipertensión: > 140/90 mmHg

D. Género:

Femenino

Masculino

## 6.8. Procedimientos de laboratorio.

### 6.8.1. Muestra

Las muestras fueron colectadas por la bacterióloga del grupo de investigaciones en enfermedades cardiovasculares y metabólicas GECAVYME; los individuos debían estar en ayunas para la toma de la muestra. Dichos individuos hacían parte de un proyecto macro de medición de homocisteína y ácido fólico en individuos con enfermedad coronaria y controles.

Por venopunción se tomarán 5 ml de sangre total (muestra) y se depositarán en tubos (vacutainer) con anticoagulante EDTA y en tubo seco. ~~Se tomarán 10 ml de sangre y se depositarán en tubos Vacutainer;~~

~~—— 5 ml sangre → EDTA~~

~~—— 5 ml sangre → sin EDTA~~

Las muestras fueron refrigeradas y depositadas en neveras de icopor para ser transportadas al laboratorio de bioquímica y genética de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Quindío, y posteriormente fueron analizadas.

## **6.8.2. Determinación de los niveles de homocisteína sérica**

### **6.8.2.1. Principio del análisis:**

Los niveles en suero de la homocisteína fueron determinados usando la técnica de inmunoensayo competitivo, utilizando el kit INMULITE-HOMOCISTEINA. La homocisteína presente en el plasma del paciente fue liberada de sus proteínas de unión y convertida en s-adenosil-homocisteína (SAH) durante una incubación de 30 minutos a 37°C en presencia de s-adenosil-L-homocisteína hidrolasa y ditioneitol (DTT).

La muestra tratada y anticuerpos anti-SAH marcados con fosfatasa alcalina fueron introducidos simultáneamente en la unidad de reacción que contenía una bola de poliestireno recubierta con SAH. Durante 30 minutos de incubación la SAH obtenida a partir de la muestra pretratada del paciente compitió con la SAH inmovilizada por la unión del anticuerpo anti-SAH unido a la fosfatasa alcalina. El conjugado enzimático no unido fue eliminado mediante un lavado por centrifugación. El sustrato se añadió y la emisión de quimioluminiscencia fue captada por el detector del equipo Inmulite 2000. El resultado obtenido fue dado a través del Software del equipo el cual realizó todos los cálculos y gráficos necesarios.

### **6.8.2.2. Curvas de calibración**

Los resultados son calculados con base en curvas de calibración almacenadas en la base de datos del sistema Inmulite 2000, las curvas son generadas por la casa fabricante

corriendo 20 veces el número total de calibraciones en un mismo equipo incluido en el estuche por medio del código de barras.

Para un mejor análisis de los resultados, los niveles séricos de homocisteína fueron distribuidos en quintiles (1-4.99  $\mu\text{mol/L}$ ; 5-12  $\mu\text{mol/L}$ ; 12.1-20  $\mu\text{mol/L}$ ; 20.1-28  $\mu\text{mol/L}$ ; >28.1  $\mu\text{mol/L}$ ).

### **6.8.3. Determinación del polimorfismo C677T del gen de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa.**

**A. Extracción ADN:** se utilizó el Kit Wizard Genomic DNA Purification. (Catálogo N<sup>o</sup>A 1120 Promega) (Ver descripción en anexo 3)

#### **B. Análisis PCR – RFLP**

1. Se tomó un muestra ADN genómico previamente aislado. Cantidad 100-200 ng.
2. Mezcla de reacción para PCR.  
300 nM Primers (Directo: C677T – F 5'-tgaaggagaaggtgtctgcggga-3'.  
Reverso: C677T – R 5'-aggacggtgcggtgagagtg-3'), Taq polimerasa 1U,  
dNTPs 0.1mM, Cloruro de magnesio 1.5mM, Buffer 1X (20mM Tris HCl;  
pH 8.4; 50 mM KCl).
3. Amplificación del ADN en termociclador : MJ Research PTC-100
  - Desnaturalización inicial T= 94°C durante 12 minutos

Seguida por 35 ciclos, con el siguiente programa:

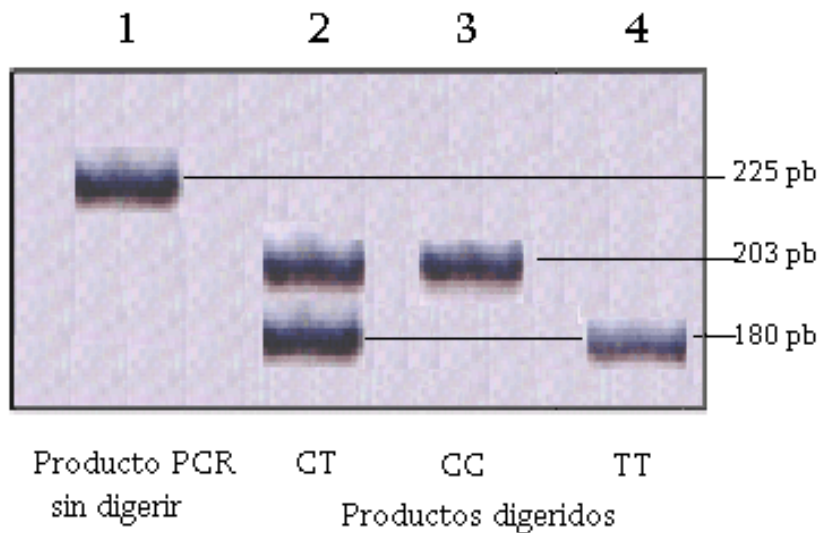
- Desnaturalización            T= 94°C durante 30 segundos
- Alineamiento                T= 60°C durante 30 segundos
- Extensión                      T= 60°C durante 1 minuto
- Y una extensión final        T=72°C durante 10 minutos

Los productos amplificados se visualizarán en un gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de etidio. La observación de una banda de 225pb indicó la amplificación positiva (Figura 4).

4. Digestión enzimática: volumen final 20ul

- a. 10 µl de producto amplificado.
- b. Enzima de restricción *HinF* I 5U
- c. Buffer de reacción 10X (60mM Tris-HCl (pH: 7.5); 500mM NaCl; 60mM MgCL<sub>2</sub>; 10mM DTT (37°C)).
- d. 0.2 µl de BSA 10mg/ml
- e. Incubación de la muestra a 37° C durante 2 horas
- f. Luego desnaturalización de la enzima a 60°C durante 10 minutos.

Los productos digeridos se visualizaron en un gel de agarosa al 2.5%, teñido con Bromuro de etidio. Los parámetros de digestión esperados fueron: Homocigoto nativo (CC): 203pb, Heterocigoto (CT): 203+180pb, Homocigoto mutada (TT): 180pb (figura 4).



**Figura 4.** Visualización de la amplificación y los productos de digestión enzimática del polimorfismo C677T; Línea 1: Producto PCR sin digerir; Línea 2: genotipo CT; Línea 3: genotipo CC; Línea 4: genotipo TT <sup>(35)</sup>.

### 6.9. Análisis estadístico

La información del estudio fue obtenida a través del diligenciamiento de encuestas, las cuales fueron almacenadas en una base de datos Excel 7.0 y el programa Epi Info versión 6.04; con estos programas se hizo el análisis de media y desviación estándar..

Con el fin de definir si existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, se utilizaron las pruebas de Chi cuadrado y T Student cuando fue necesario, se consideraron los resultados como significativos aquellos con  $p < 0.05$ ; no significativos con  $p > 0.05$  <sup>(47)</sup>.

Para saber si la población se encontraba en equilibrio en cuanto al polimorfismo C677T, se utilizó la ley de Hardy-Weinberg.

## **7. RESULTADOS**

La población estudiada fue de 100 individuos, de los cuales 50 fueron considerados como casos y 50 como controles, teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión planteados en la metodología; todos los individuos ingresaron al Hospital San Juan de Dios de Armenia-Quindío.

### **7.1. Variables medidas**

En la tabla 1, se describen las características generales de la población de estudio, los valores indican que no se presentaron diferencias significativas entre edad, peso, índice de masa corporal, presión arterial (sistólica y diastólica) y género, en los dos grupos estudiados.



**Tabla 1. Comportamiento de las variables en casos y controles**

Variable		Casos n = 50	Controles n = 50	P
Edad (Años)		52,2 ± 6,9	49,6 ± 9,8	N.S
Peso (Kg)		63,2 ± 11,5	64,4 ± 12,0	N.S
Presión arterial	Sistólica	128.16 ± 26.94	121.68 ± 23.43	N.S
	Diastólica	79.04 ± 15.93	71.12 ± 14.97	N.S
Género	FEMENINO	62.0%	50.0%	N.S
	MASCULINO	38.0%	50.0%	N.S

**P** = Nivel de significancia **NS** = no significativo

## 7.2. Parámetros clínicos de los individuos con síndrome coronario agudo (casos)

De los 50 pacientes con síndrome coronario agudo, 32 presentaron cuadro de angina inestable lo que equivale a un 64%, seguido de un 30% con Infarto agudo de miocardio con ST elevado que corresponde a 15 pacientes, posteriormente un 4% correspondiente a 2 pacientes con ST no elevado y por último se presenta un solo paciente representando el 2% con angina estable (Figura 5).

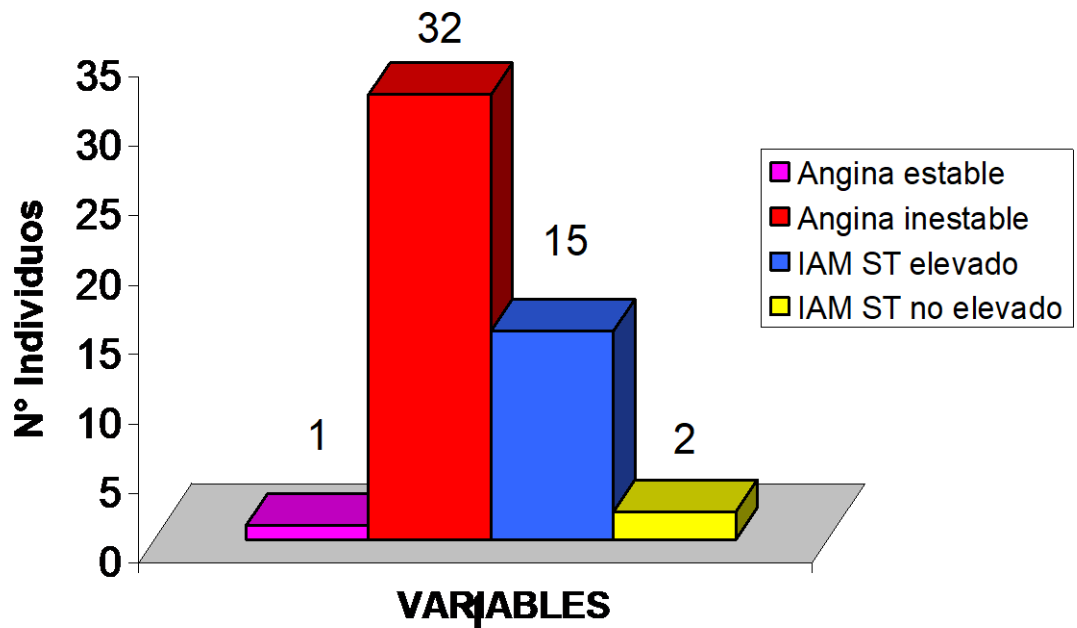


Figura 5. Relación de las variables del diagnóstico de síndrome coronario agudo en individuos casos.

### 7.3. Niveles de homocisteína

#### 7.3.1. Relación de los niveles de homocisteína (casos-contróles)

Los niveles de homocisteína fueron estadísticamente significativos entre casos y controles ( $P= 0.001$ ) siendo para casos los niveles séricos más elevados ( $12.4 \pm 6.0 \mu\text{mol/L}$ ), comparado con los controles ( $9.7 \pm 2.4 \mu\text{mol/L}$ ).

En la tabla 2, se observan los niveles séricos de homocisteína, distribuidos por quintiles. El 58% de los casos se encuentran en los quintiles 1 y 2 (nivel normal de homocisteína (5.0-12.0  $\mu\text{mol/L}$ )); sin embargo un 34% se encuentra en el quintil 3, un 6% en el quintil 4 y un 2% en el quintil 5, estos 3 últimos quintiles se ubican dentro de los niveles moderadamente elevados (12.1-30.0  $\mu\text{mol/L}$ ).

Como era de esperarse, los individuos controles en su mayoría (86%), tuvieron valores de homocisteína normales (5.0-12.0  $\mu\text{mol/L}$ ) y un 14% se encontró dentro del rango moderadamente elevado.

**Tabla 2. Niveles de homocisteína (quintiles) de casos y controles**

**P** = Nivel de significancia **NS** = no significativo

### 7.3.2. Relación del género con los niveles de homocisteína (casos-controles)

<b>Homocisteína (quintiles)</b>	<b>Casos (n/%)</b>	<b>Controles (n/%)</b>	<b>P</b>
1.0-4.99 $\mu\text{mol/L}$	1 (2%)	2 (4%)	-
5.0-12.0 $\mu\text{mol/L}$	28 (56%)	41 (82%)	N.S
12.1-20.0 $\mu\text{mol/L}$	17 (34%)	7 (14%)	N.S
20.1-28.0 $\mu\text{mol/L}$	3 (6%)	0	-
>28.1 $\mu\text{mol/L}$	1(2%)	0	-

La figura 6, muestra la relación del género (casos-contróles) con los niveles de homocisteína, dicha relación no presentó diferencias estadísticamente significativas en los dos grupos, pero tanto hombres como mujeres del grupo caso presentaron niveles moderadamente elevados de homocisteína, comparados con los controles que muestran niveles normales (9.39 y 9.58  $\mu\text{mol/L}$ ) para mujeres y hombres respectivamente.

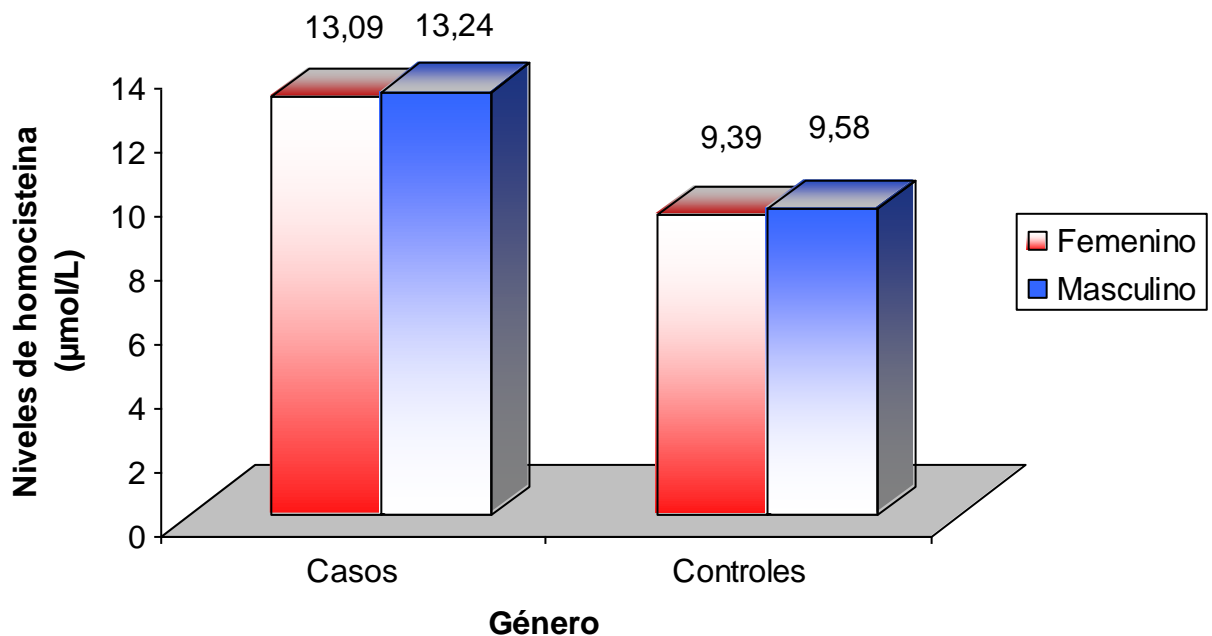


Figura 6. Relación del género con los niveles de homocisteína (casos-contróles)

### 7.3.3. Relación de la edad con los niveles de homocisteína (casos-contróles)

La figura 7, muestra que los controles presentan niveles normales de homocisteína (5.0-12.0  $\mu\text{mol/L}$ ) para todos los rangos de edad (20-60 años); mientras que en los casos los niveles de homocisteína aumentan con la edad. Sin embargo, no se encontraron relaciones estadísticamente significativas entre la edad y los niveles de homocisteína.

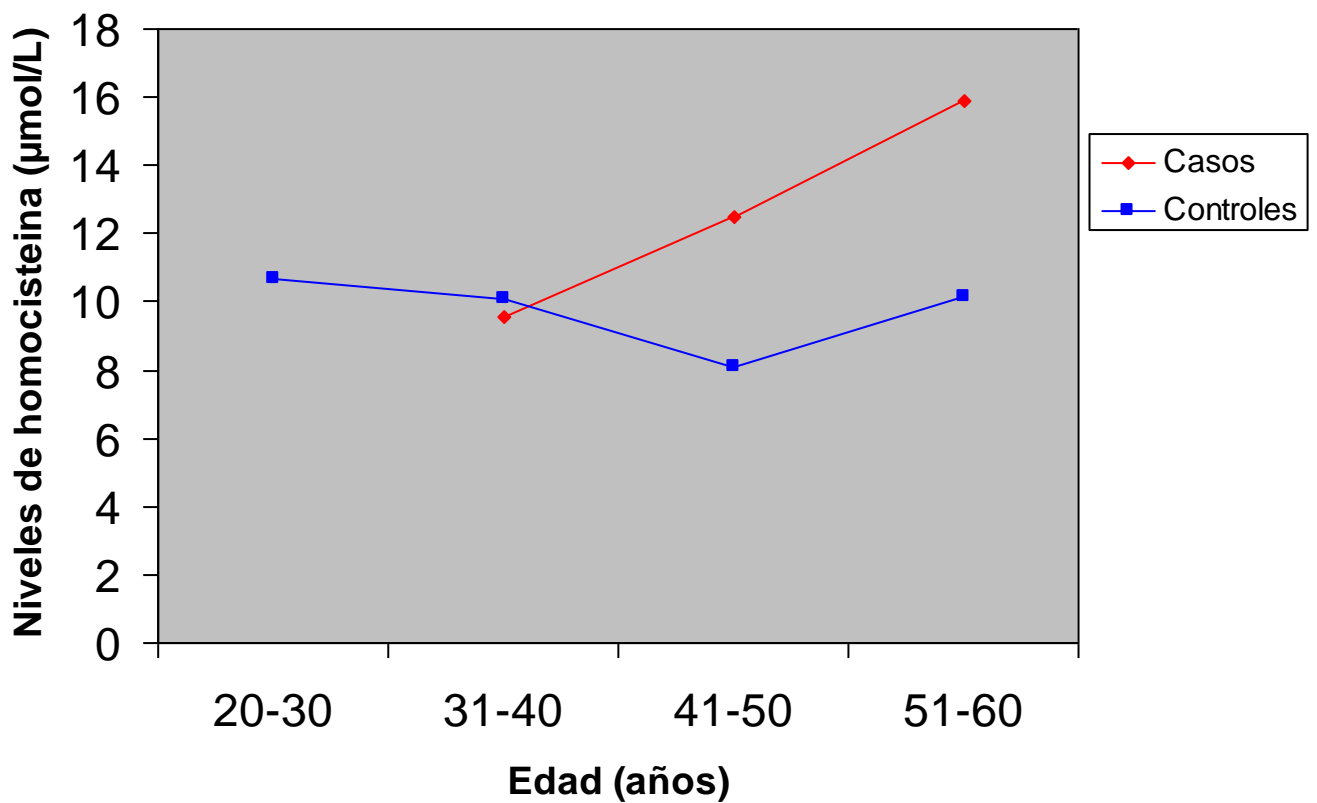


Figura 7. Relación de la edad con los niveles de homocisteína (casos-controles)

#### 7.4. Presión arterial (sistólica-diastólica)

#### 7.4.1. Relación de los niveles de homocisteína con la presión arterial sistólica en casos y controles.

En la figura 8, se muestra la relación entre los niveles de homocisteína y la presión sistólica; los casos y controles presentaron valores de presión sistólica similares y normales entre los quintiles 1-4.99  $\mu\text{mol/L}$  y 12.1-20  $\mu\text{mol/L}$ ; si embargo en el cuarto quintil (20.1-28  $\mu\text{mol/L}$ ) los casos presentaron una elevación (151 mmHg) en la presión sistólica, valor que corresponde a hipertensión; para el quinto quintil los casos presentaron de nuevo un valor normal de presión sistólica, esta declinación es estadísticamente significativa ( $P= 0.029$ ).

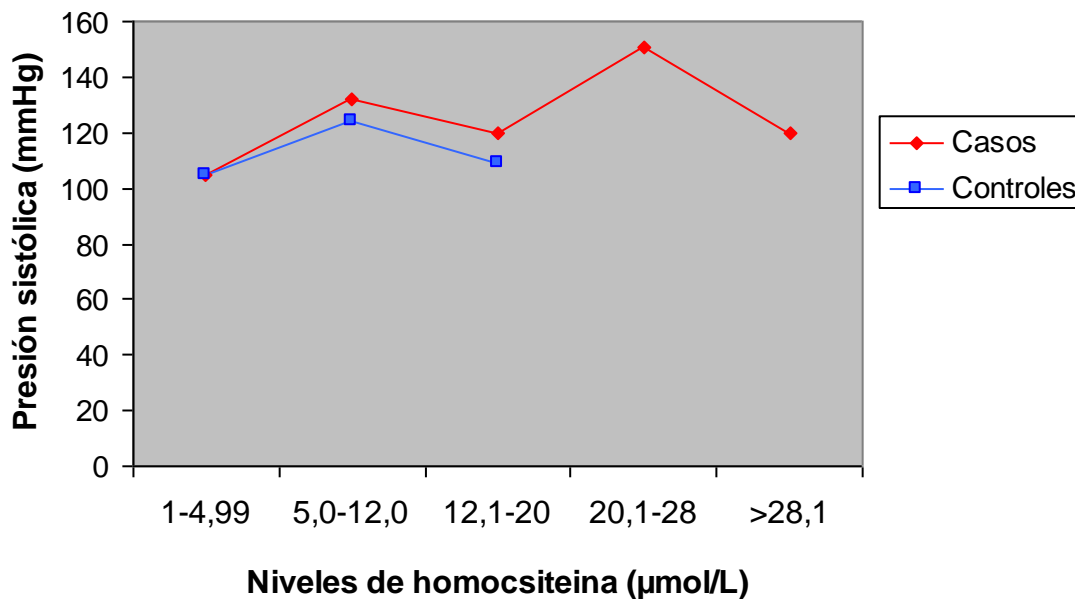


Figura 8. Relación de los niveles de homocisteína con la presión arterial sistólica (casos-controles)

#### 7.4.2. Relación de los niveles de homocisteína con la presión arterial diastólica (casos-controles)

La figura 9, muestra que la presión diastólica aumenta directamente proporcional con los niveles de homocisteína en los casos, mientras que en los controles permanece estable. Sin embargo este aumento no es estadísticamente significativo ( $P = >0.05$ )

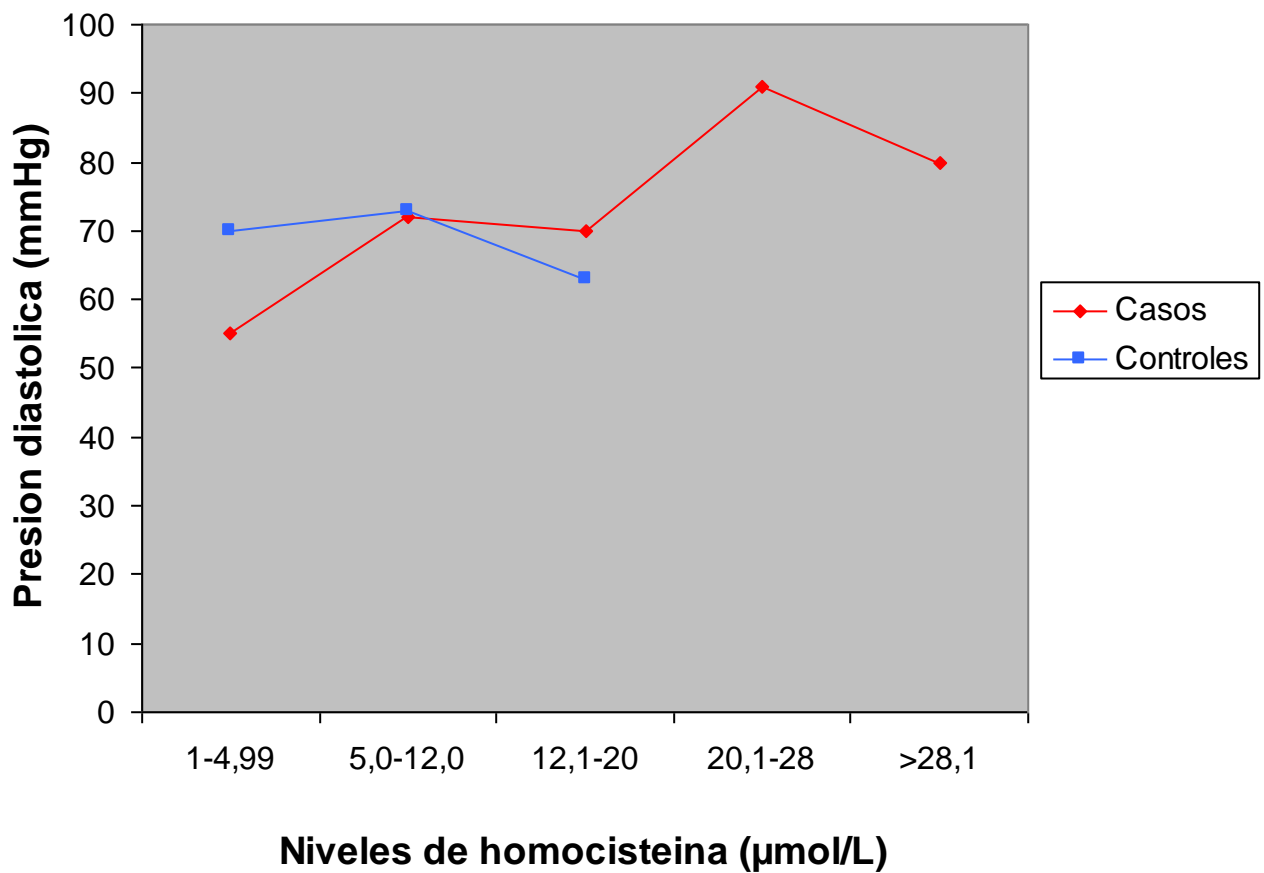
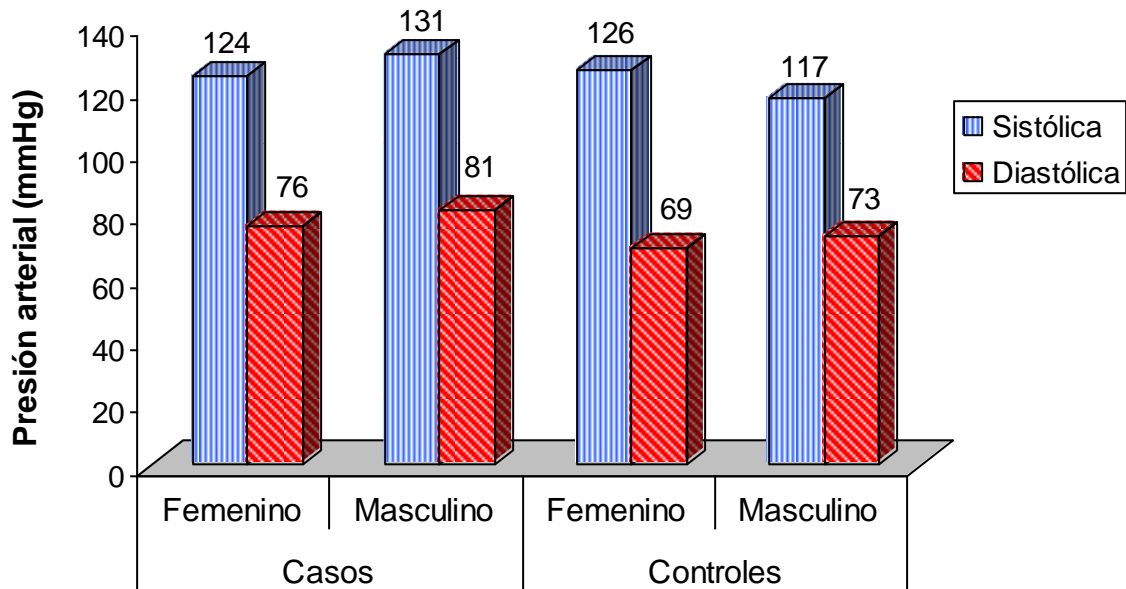


Figura 9. Relación de los niveles de homocisteína con la presión arterial diastólica (casos-controles).

#### 7.4.3. Relación del género con la presión arterial (sistólica-diastólica) en casos y controles.

En la figura 10, se observa que la presión sistólica fue normal para mujeres tanto en casos (124 mmHg) como en controles (126 mmHg), sin diferencias estadísticamente significativas ( $P= 0.70$ ); para hombres la presión sistólica fue normal alta para casos (131 mmHg) y normal para controles (117 mmHg), tampoco hubo diferencias significativas ( $P= 0.17$ ). No obstante, para los casos si se presentaron diferencias significativas entre hombres y mujeres ( $P= 0.01$ ).

En cuanto a la presión diastólica, tanto hombres como mujeres (casos-controles) presentaron valores normales.



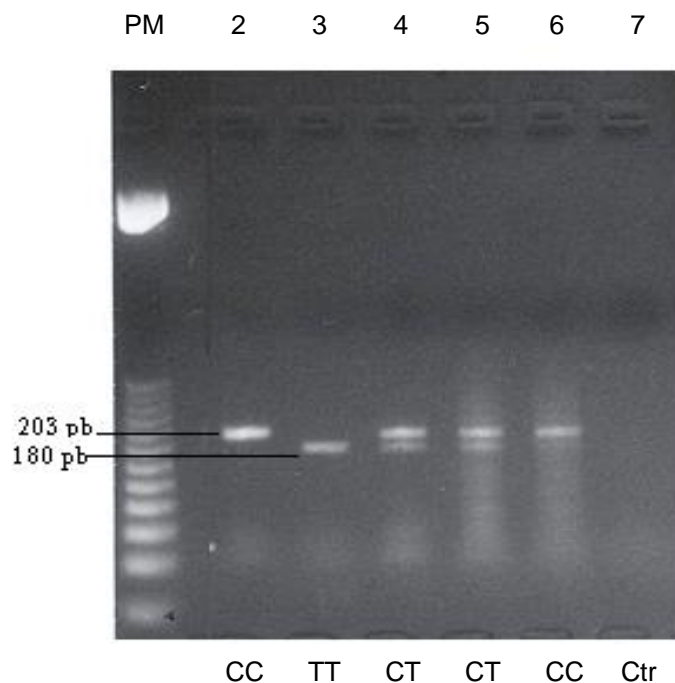
**Figura 10. Relación entre género y presión arterial (sistólica y diastólica) en casos y controles.**

### 7.5. Determinación del Polimorfismo C677T



De los 100 individuos estudiados, 97 amplificaron para el polimorfismo C677T del gen de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa. La figura 11, muestra los patrones esperados para la digestión.

En la figura 11, se observa la digestión enzimática de los individuos casos; en las líneas 2 y 6 se muestra una banda de 203pb lo que corresponde al genotipo CC; en las líneas 4 y 5 se observan dos bandas una de 203 pb y otra de 180 pb correspondientes al genotipo CT; en la línea 3 se muestra una banda de 180 pb lo que corresponde al genotipo TT.



**Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% que muestra los resultados de la digestión enzimática del polimorfismo C677T; Línea 1: Marcador de peso molecular; Línea 2 a 6: casos; Línea 7: control negativo.**

### **7.5.1. Genotipos encontrados en los individuos del estudio**

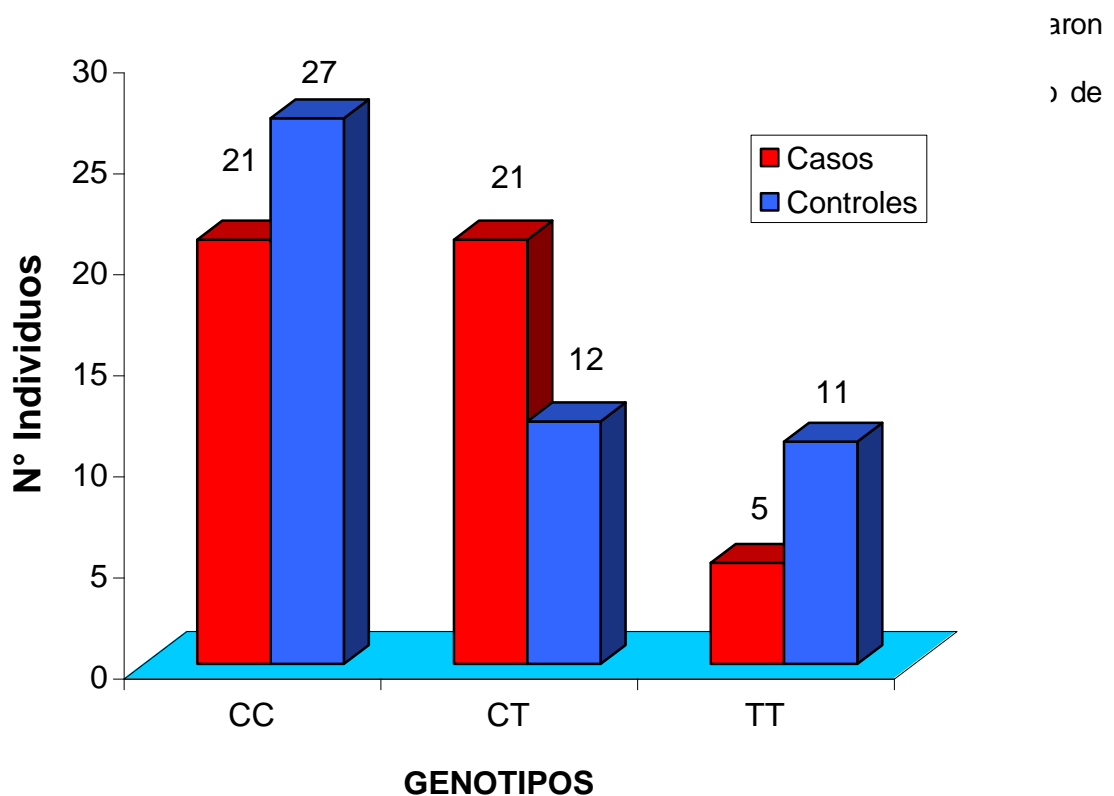
En la tabla 3, se muestran los genotipos encontrados en la población estudiada, el genotipo más frecuente fue CC con un 49.48%, seguido del genotipo CT con un 34.02% y finalmente el genotipo TT con un 16.49%. Además se observa las frecuencias alélicas, donde el alelo C presentó un 66.49% y el alelo T un 33.50%.

**Tabla 3. Genotipos y alelos encontrados en los individuos del estudio.**

GENOTIPO	FRECUENCIA GENOTIPICA	PORCENTAJE GENOTIPICO	ALELOS	FRECUENCIA ALELICA	PORCENTAJE ALELICO
CC	48/97	49.48%	C	129	66.49%
CT	33/97	34.02%	T	65	33.50%
TT	16/97	16.49%	-	-	-

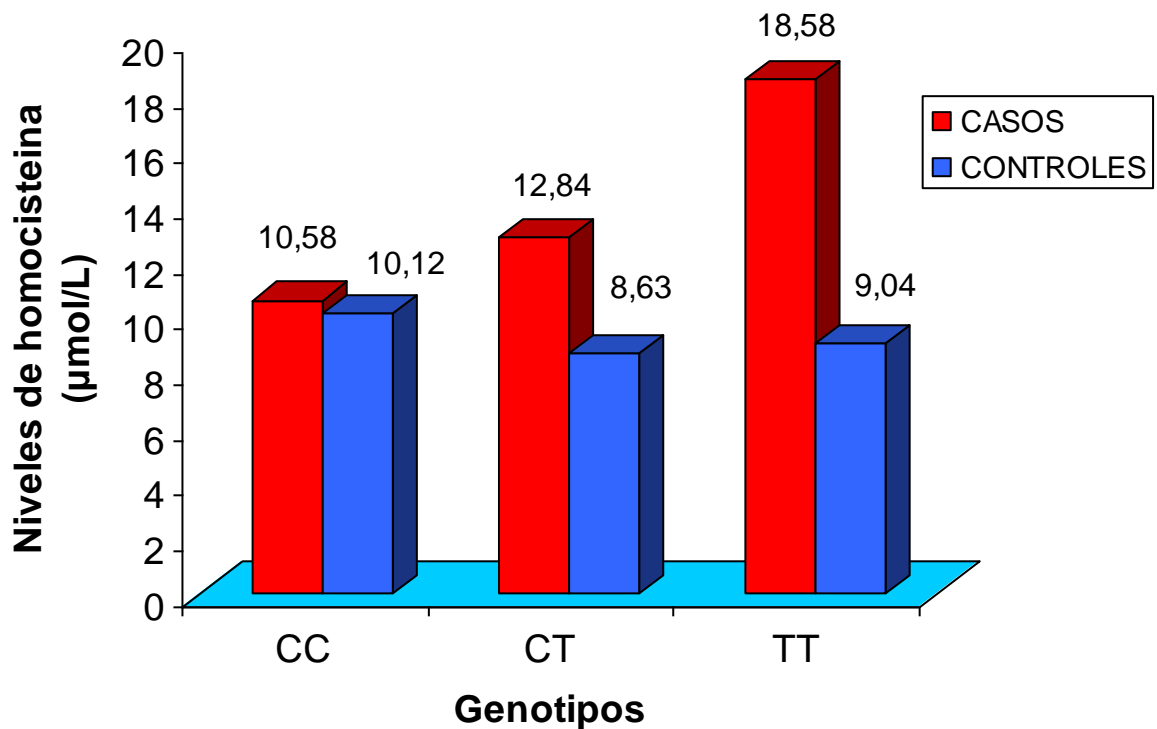
### 7.5.2. Distribución de los genotipos en casos y controles.

En la figura 12, se observa que el genotipo CC se presentó en mayor proporción en los



### 7.5.3. Relación de los genotipos con los niveles de homocisteína (casos-contróles)

En la figura 13, muestra que los niveles de homocisteína tanto para controles como para casos se encontraron en el rango normal para el genotipo CC; el genotipo CT presentó un aumento en los niveles de la homocisteína para los casos (12.84  $\mu\text{mol/L}$ ), mientras que los controles presentarán rangos normales; para el genotipo TT, los casos presentarán niveles moderadamente elevados (18.58  $\mu\text{mol/L}$ ) respecto a los controles (9.04  $\mu\text{mol/L}$ ) que se encuentran en el rango normal (5.0-12.0  $\mu\text{mol/L}$ ).



#### 7.5.4. Relación de los genotipos con el género (casos-contrroles)

En la Tabla 4, se muestra la relación entre genotipo y género en casos y controles, observándose que el genotipo CC en los controles presentó un número mayor de individuos tanto en hombres como en mujeres, respecto a los casos; lo contrario ocurrió para el genotipo CT ya que el mayor número de individuos de hombres y mujeres, se presentó en los casos; el genotipo TT presentó más individuos femeninos en los controles que en los casos, sin embargo los hombres tuvieron igual número de individuos en ambos grupos de estudio.

**Tabla 4. Genotipos y género de los casos y controles**

<b>Genotipos</b>	<b>Casos</b>		<b>Controles</b>	
	<b>Femenino (n/%)</b>	<b>Masculino (n/%)</b>	<b>Femenino (n/%)</b>	<b>Masculino (n/%)</b>
CC	9 (9.28)	12 (12.37)	14 (14.43)	13 (13.40)
CT	9 (9.28)	12 (12.37)	3 (3.09)	9 (9.28)
TT	2 (2.06)	3 (3.09)	8 (8.25)	3 (3.09)

#### 7.5.5. Relación de los genotipos con la presión arterial (sistólica-diastólica) en casos y controles

La figura 14, muestra la media de presión sistólica y diastólica para casos y controles; en la presión sistólica, los casos mostraron presiones normales altos para los genotipos CC ( $134 \pm 31$ ), CT ( $131 \pm 23$ ), mientras que el genotipo TT tuvo valores normales ( $108 \pm 8$ ).

En los casos el genotipo TT presenta una relación significativa con la presión arterial sistólica ( $P= 0.03$ ).

Los controles presentaron valores normales para todos los genotipos CC ( $118 \pm 20$ ), CT ( $123 \pm 20$ ) y TT ( $125 \pm 27$ ).

En la presión diastólica se observa que los casos tuvieron valores normales para CC ( $76 \pm 21$ ) y TT ( $66 \pm 11$ ), mientras que CT presentó valores normales altos ( $84 \pm 17$ ). Para los controles todos los genotipos se encontraron dentro de los valores normales de presión diastólica.

Ninguno de los genotipos presentó diferencias significativas, ya que la **P** oscilo entre 0.22 y 0.98.

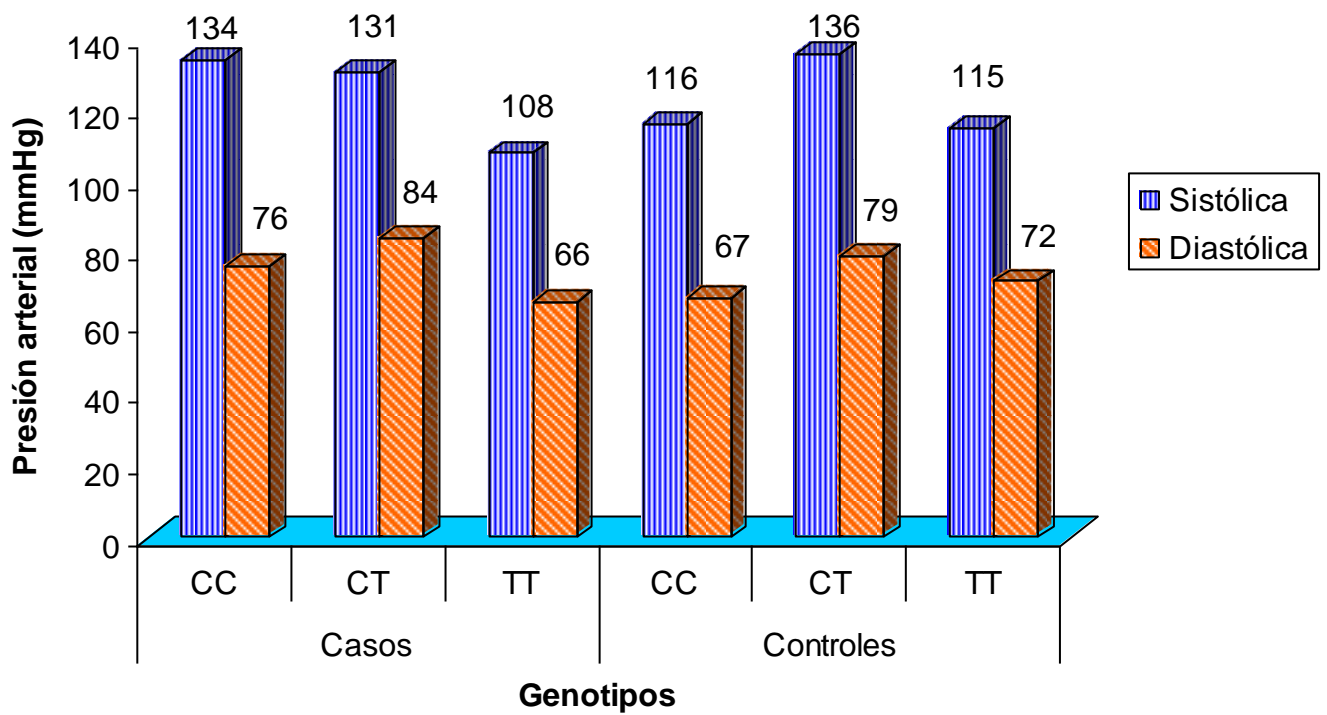


Figura 14. Relación de los genotipos con la presión arterial (sistólica-diastólica) en casos y controles

## 7.6. Ley de Hardy-Weinberg

De acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 31.02$ ), la población estudiada no se encuentra en equilibrio, debido a que el muestreo fue condicionado.

## 8. DISCUSION

Las concentraciones plasmáticas elevadas de homocisteína total se consideran un factor de riesgo para la aparición temprana de enfermedad cardiovascular <sup>(39-40-48-49)</sup>. Este estudio se realizó para establecer la asociación del polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR con los niveles de homocisteína y su relación con el síndrome coronario agudo, en pacientes con un rango de edad entre 20 y 60 años, con un primer evento coronario y en individuos controles.

La literatura reporta el rango de 5-12  $\mu\text{mol/L}$  como valores referenciales para homocisteína en adultos, con una media de 10  $\mu\text{mol/L}$  <sup>(25-26-50)</sup>, por encima de este rango se presenta hiperhomocisteinemia. De acuerdo a estos datos se observó que los niveles de homocisteína plasmática en la mayoría de la población estudiada (58% casos; 86% controles) estuvieron dentro de estos valores normales (5-12  $\mu\text{mol/L}$ ); No obstante en las muestras casos, un 42% de los individuos presentaron niveles moderadamente elevados

de homocisteína; presentándose una diferencia estadísticamente significativa ( $P= 0.001$ ) entre casos y controles. Esta situación corrobora que los niveles de homocisteína tienden a aumentar en las personas que padece síndrome coronario agudo, lo que permite sugerir la medición de los niveles de homocisteína como una prueba diagnóstica paraclínica de riesgo de desarrollo de síndrome coronario agudo.

Los datos anteriores son corroborados por estudios tanto retrospectivos, prospectivos y caso-control <sup>(51,52)</sup>, en los cuales se ha encontrado niveles de homocisteína moderadamente elevados en individuos con síndrome coronario, lo que puede sugerir que la hiperhomocisteinemia moderada, esta asociada con el incremento en el riesgo de desarrollar enfermedad coronaria.

Teniendo en cuenta esto, se podría pensar que si se reducen los niveles de homocisteína, disminuiría en parte el riesgo de enfermedad coronaria en individuos ancianos.

La relación del género con la homocisteína demuestra que los valores de homocisteína son más elevados en el hombre que en la mujer <sup>(53,54)</sup>, sin embargo en este estudio se observó que tanto en casos como en controles, hombres y mujeres presentaron niveles similares de homocisteína, aunque los casos mostraron niveles moderadamente elevados (13.24  $\mu\text{mol/L}$  y 13.09  $\mu\text{mol/L}$  respectivamente). Esto debido a que las mujeres presentaron una media de edad (55 años) mayor a la de los hombres (51 años).

La necesidad de escoger un rango de edades específico es elemental, ya que se observa que los valores de homocisteína varían notablemente con la edad <sup>(49)</sup>; existiendo una tendencia de incremento en los niveles de homocisteína en individuos mayores de 40 años <sup>(55-56)</sup>.

En este estudio se presentaron niveles de homocisteína estables para todos los rangos de edad de los controles, mientras que para los casos los niveles de homocisteína fueron moderadamente elevados con un aumento directamente proporcional a la edad, aunque tal aumento no fue significativo; esta situación se asemeja con lo reportado en otros estudios <sup>(55-56)</sup>. Esto puede deberse a que en los casos la media de edad (52 años) fue mayor que en los controles (49 años), además esta tendencia puede deberse a procesos de envejecimiento, disminución de cofactores enzimáticos (Folatos, vitamina B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub>), deterioro de la función renal, disminución de cistationina β sintasa <sup>(48-50)</sup>; factores que intervienen en el proceso de regulación de la homocisteína.

Balasa *et al* en 1999 <sup>(57)</sup>, demostraron mediante análisis de regresión múltiple, que la homocisteína se relaciona positivamente con la edad. Otros autores <sup>(48,58)</sup> corroboran esta información, además lo relacionan con el estilo de vida (tabaco, café, alcohol, vida sedentaria), que es mínimo en la infancia, pero se incrementa en la adolescencia y está más acentuado en la edad adulta, en la que se pueden sumar otros determinantes (función renal, estrógenos) y también otros factores convencionales de riesgo cardiovascular.



En este estudio se encontró que existe una relación estadísticamente significativa entre la presión arterial sistólica y los niveles de homocisteína en los casos, ya que aumentan directamente proporcional; pero no se presentó relación entre los niveles de homocisteína y la presión arterial diastólica; debido a esto que en los sujetos con síndrome coronario agudo, la formación de placas de ateroma disminuye el calibre de las arterias aumentando la resistencia al paso de la sangre y por ende el corazón debe ejercer más fuerza para su irrigación; se sugiere que para posteriores proyectos debe aumentarse el número de la población a estudiar, para definir de manera más significativa y precisa el efecto que ejerce la homocisteína sobre la presión.

La concentración de la homocisteína se encuentra influida por factores medioambientales y genéticos <sup>(39,40,48,49)</sup>. Uno de los factores genéticos conocidos que más influyen es el polimorfismo C677T del gen de la MTHFR <sup>(17)</sup>.

Algunos estudios han encontrado asociación entre elevadas concentraciones de homocisteína y el genotipo TT del polimorfismo C677T del gen de la MTHFR <sup>(48,59,60,61,62)</sup>. Sin embargo, a pesar que este genotipo es uno de los mayores determinantes de la hiperhomocisteinemia, muchos estudios no han encontrado su asociación con el riesgo cardiovascular <sup>(63)</sup>; además, han determinado cuestionar la relación entre hiperhomocisteinemia y riesgo cardiovascular, considerando la posibilidad de que la elevación de las concentraciones de homocisteína sea sólo un epifenómeno en el cual la homocisteína se comporta como un reactante de la fase aguda <sup>(63)</sup>.

En el presente estudio, a pesar de que sólo se presentaron 5 individuos con el genotipo TT en los casos, estos tuvieron niveles moderadamente elevados de homocisteína (18.58  $\mu\text{mol/L}$ ), de acuerdo a estudios, individuos con este genotipo y niveles elevados de homocisteína tienden a sufrir síndrome coronario agudo, lo cual se corrobora con el diagnóstico que presentaron los individuos en el momento de ingresar al estudio; la frecuencia del alelo T (33%) en nuestra población se asemeja a la encontrada en estudios de poblaciones norteamericanas donde este genotipo tuvo una frecuencia del 30% <sup>(35)</sup>.

Para los controles 11 individuos presentaron genotipo TT y niveles normales de homocisteína. La mutación TT reporta una prevalencia para individuos sanos entre el 6 y 10% en países Europeos y entre el 13 y 18% en los países mediterráneos, siendo este valor superior al del resto de países <sup>(66-67-68)</sup>; en este estudio se muestra una prevalencia del 11.34% para el genotipo TT, siendo este valor parecido a lo reportado en estudios Europeos; sin embargo es necesario ampliar la muestra tanto para casos como para controles para obtener datos más concluyentes.

Para estudios posteriores se podría realizar un análisis sobre el daño cardiovascular medido a través de arteriografía y su relación con los niveles de homocisteína y el polimorfismo C677T. Además se podría investigar sobre otros polimorfismos que se relacionen con dicha enfermedad; Así mismo debería tomarse una población mayor a la utilizada en este estudio, con el fin de obtener resultados más significativos, especialmente con relación a la presión arterial que es la variable que requiere un mayor número de individuos para evidenciar las diferencias.

## **9. CONCLUSIONES**

Los niveles de homocisteína fueron mayores en los casos comparados con los controles.

El estudio realizado mostró que los niveles de homocisteína aumentan en forma directamente proporcional con la edad.

Se encontró que existe una relación entre el genotipo TT (casos) y la elevación moderada de los niveles de homocisteína.

Se observó que la presión arterial sistólica aumenta de manera directamente proporcional con los niveles de homocisteína (casos).

Se encontró que los niveles de homocisteína son similares tanto para hombres como para mujeres en casos y controles.

Aunque algunos controles presentaron el genotipo TT, los valores de Hcy y presión arterial fueron normales.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- (1) Departamento Administrativo nacional de Estadísticas. Defunciones totales por sexo, según 20 principales causas 1996 – 2001.
- (2) Kullo I. J; Gau G. T; and Tajik A. J. "Novel Risk Factor for Atherosclerosis". Mayo Clinic Procedures. 2000; 75:369-380.
- (3) Yeun J. The role of homocysteine in end-stage renal disease. Seminars in dialysis 1998; 11:97.
- (4) Welch G, Loscalzo J. Homocysteine and altherothrombosis. NEJM. 1998; 338:1047-8.
- (5) Kang S, Wong PW, Cook HY, Norusis M, Messer JV. Protein-bound homocysteina. A possible risk factor for coronary artery disease, J. Clin invest. 1986; 77: 1482-1486.
- (6) Gerritsen T, Vaughn JG, Weisman HA. The identification of homocysteine in the urine. Biochem Biophys Res Commun. 1962; 9:493.
- (7) Carson NAJ y Neill DW. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. Arch Dis Child.1962; 37:505-13.
- (8) Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F, Laster L. Homocystinuria: an enzymatic defect. Science. 1964; 143:1443-1445.

- (9) McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Pathol.* 1969; 56:111-128.
- (10) Mudd SH, Uhlendorf BW, Freenab JM, Finfelstein JD, Shih VE. Homocystinuria associated with decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972; 46:905-912.
- (11) Wilken DEL y Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest.* 1976; 274:1049-1057.
- (12) Kang SS, Zhou J, Wong PWK, Kowalysyn J, Strokosh G. Intermediate Homocysteinemia: A thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am. J Hum Genet.* 1988; 43:414-421.
- (13) Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B *et al.* Hiperhomocisteinemia: an indepent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med.* 1991; 324:1149-1155.
- (14) Goyette P, Summer JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, *et al.* Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet.* 1994; 7:195-200.
- (15) Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assement of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA.* 1995; 274:1049-1057.
- (16) Donner MG, Klein gk, Mathes PB, Shwandt P, Richter WO. Plasma total Homocysteine levels in patient with early-onset coronary heart disease and a low Cardiovascular risk profile. *Metabolism.* 1998; 47: 273-279.
- (17) Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, *et al.* A Candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-113.
- (18) Hustad S, Ueland PM. Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine metabolic: effect modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T poluma phism. *Clin chem.* 2000; 46:1065-1071.
- (19) Kluijtmans LA, Van den Heuvel LPWJ, Boers GHJ, Frostt P, Stevens EMB, Van Oost BA, *et al.* Molecular genetic analysis in Mild hyperhomocysteinemia: A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet.* 1996; 58:35-41.
- (20) Motulsky AG. Nutritional Ecogenetics: Homocysteine related arteriosclerotic disease, neuronal tube defects, and folic acid. *Am J Hum Genet.* 1996; 58:17-20.
- (21) Rosenblatt DS. Inherited disorders of folate transport and metabolism. In: *Scriver inherited Disease.* New York, NY Mc Graw Hill Inc; 1995: 3111-3128.
- (22) Suarez-Garcia I, Gomez-Cerezo J.F, Rios-Blanco J.J, Barbado-Hernandez J.F, Vasquez-Rodriguez J.J. La homocisteina. ¿El factor de riesgo cardiovascular del próximo milenio? *Servicio de medicina interna. Hospital Universitario La Paz (Madrid). Anales de medicina interna (Madrid).* 2001;18 (4):211-217.

- (23) Jara-Prado, A y Santamaría del Angel, A. Homocisteína: un nuevo factor de riesgo para desarrollar enfermedades vasculares. Arch Neurocienc (Mex). 2002;7(1):43-50.
- (24) Ueland PM, Refsum H, Brattstrom L. Plasma Homocysteine and cardiovascular disease. In Francis R B Jr. editor Atherosclerotic Cardiovascular disease, Hemostasis, and Endothelial Function. New York: Marcel Delker, 1992:183-236.
- (25) Soberón M, Charaja A, Agüero Y, Oriondo M.S, Nuñez M. Estudio de los niveles plasmáticos de homocisteína, ácido fólico y vitamina B-12 en una población limeña de jóvenes adultos. Anales de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional mayor de San Marcos. 2004; 65 (2): 89-96.
- (26) Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocysteinemia as risk factor for occlusive vascular disease. Annu Rev Nutr 1992; 12:279-298.
- (27) Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. N Engl J Thromb Res 1980; 18:113-121.
- (28) Llorca Escuín I. La hiperhomocisteinemia: nuevo marcador de riesgo vascular. Servicio Análisis clínicos. Hospital Vega Baja. Orihuela (Alicante). <http://neurologia.rediris.es/congreso/index.html>.
- (29) Kluijtmans LAJ, Wendel U, Stevens EMB, Van Den Heuvel LPWJ, Trijbels FJM, Blom HJ. Identification of four novel mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase. Eur J Hum Genet 1998; 6: 257-265
- (30) Botto LD, Yang Q. 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies. A Huge Review. Am J of Epidemiol. 2000; 151: 862-77.
- (31) Arango JJ. Infarto Agudo de Miocardio. De la fisiopatología a la terapéutica moderna. Rev. Col. Anest. 1997;25:25.
- (32) MTHFR C677T. Casa comercial ATGen. Sistemas moleculares. [www.ategen.com.uy/productos/C677T.htm](http://www.ategen.com.uy/productos/C677T.htm).
- (33) Coull BM, Malinow MR, Beamer N Sexton G, Nordt F, deGarmo P. Elevated plasma Homocysteine concentration as a possible independent risk factor for stroke. Stroke 1990; 21:572-576.
- (34) Zheng YZ, Tong J, 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(4): 870-874. Abstract.
- (35) Controy JM, Trivedi G Saud T, et al. The allele frequency of mutations in your genes that confer enhanced susceptibility of Venous thromboembolism in an unselected group of New York State Newborns. Thromb. 2000; 999: 317-324.
- (36) Brattstrom L, Wilken DEL, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase mutation leads of hyperhomocysteinemia but not vascular disease. The result of a meta-analysis. Circulation 1998; 98: 2520-2526.
- (37) Tsai MY, Garg U Key NS, et al. Molecular and biochemical approaches in the identification of heterozygotes for homocystinuria. Atherosclerosis 1996; 1222: 69-77.

- (38) Jacques PF, Wilson PW, Bostom AG, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J, clin Nutr* 2001; 73: 613-621.
- (39) López-Quesada EL, Vilaseca MA, González S. Homocysteine and pregnancy. *Med Clin (Barc)* 2000; 115:352-356.
- (40) De Bree A, Verschuren WMN, Bjorke-Monsen AI, Van Der Put NMJ, Heil SG, Trijbels FJM. *et al.* Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C-T mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample. *AM J Clin Nutr.* 2003;77:687-693.
- (41) Van Der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJM, Eskes TKAB, Van Der Heuvel LP, *et al.* Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995; 346(21):1070-1071.
- (42) Papapetrou C, Lynch SA, *et al.* Methylentetrahydrofolate reductase and neural tube defects. *Lancet* 1996; 6:58.
- (43) Infarto agudo de miocardio. [www.tuotromedico.com](http://www.tuotromedico.com)
- (44) Candeber-Moren F. Infarto agudo de miocardio. Hospital Provincial Saturnino Lora. Santiago de Cuba. [www.monografias.com](http://www.monografias.com)
- (45) La presión arterial. American Heart Association. Learn and live. Marzo 16 de 2005. [www.americanheart.org](http://www.americanheart.org).
- (46) Manual de semiología. Presión arterial Universidad católica de Chile. <http://escuela.med.puc.cl/publ/manualsemiologia/presion.html>.
- (47) Daniel, W.W. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 1996. De la quinta edición en inglés. Uteha. México.
- (48) Mainou C, García N, Vilaseca MA, Ferrer I, Meco JF, Mainou A. *et al.* Hiperhomocisteinemia y polimorfismo 677C-T de la 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa en hijos de pacientes con enfermedad coronaria prematura. *An Esp Pediatr* 2002; 56:402-408.
- (49) Osganian SK, Stamfer MJ, Spiegelman D, Rimm E, Cutler JA, Feldman HA. *et al.* Distribution of and factors associated with serum homocysteine levels in children. *Child and adolescent trial for cardiovascular health.* *JAMA* 1999; 281:1189-1196.
- (50) Wouters MG, Moorrees MT, Van Der Mooren MJ, Blom HJ, Boers GH, Schellekens LA, *et al.* Plasma homocysteine and menopausal status. *Eur J Clin Invest.* 1995; 25:801-805.
- (51) Córdoba A, Meneses B. Riesgo cardiovascular y tratamiento de hiperhomocisteinemia. *Acta Medica Colombiana* 2001; Vol 26: 24-33.
- (52) Eikelboom JW, Eva Ionn, Jacques Genust, Grame Ilankey. Homocysteine and cardiovascular disease: A critical review of epidemiologic evidence. 1999; vol 131; No 5 .363-375

- (53) Hak AE, Polderman KH, Westendorp IC, Jakobs C, Hofman A, Witteman JC, *et al.* Increased plasma homocysteine after menopause. *Atherosclerosis*. 2000; 149:163-166.
- (54) Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, *et al.* Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: The European concerted action project. *JAMA*.1997; 277: 1775-1781.
- (55) Lussier- Cacan S, Xhignesse M, Pilot A, Selhub J, Davignon J, Genest J.Jr. *et al.* Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological traits. *Am J Clin Nutr*. 1996.; 64:587-593.
- (56) Andersson A, Brattstrom L, Israelsson B, Isaksson A, Hamfelt A, Holtberg B. Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender and menopausal status. *Eur J Clin Invest*. 1992; 22:79-87.
- (57) Balasa W, Gruppo RA, Glueck CJ, Stroop D, Becker A, Pillow A. *et al.* The relationship of mutations in the MTHFR, prothrombin, and PAI-1 genes to plasma levels of homocysteine, prothrombin and PAI-1 in children and adults. *Thromb Haemost*. 1999; 81:739-744.
- (58) Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Villset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med*. 1998;49:31-62.
- (59) Delvin EE, Rozen R, Merouani A, Genest J, Lambert M. Influence of methylentetrahydrofolate reductase genotype, age, vitamin B12, and folate status on plasma homocysteine in children. *Am J Clin Nutr*. 2000; 72:1469-473.
- (60) Saw S-M, Yuan J-M, Ong Ch-N, Arakawa K, Lee H-P, Coetzee GA, *et al.* Genetic, dietary, and other lifestyle determinants of plasma homocysteine concentrations in middle-aged and older Chinese men and women in Singapore. *Am J Clin Nutr*. 2001;73:232-239.
- (61) Morita H, Tauguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, KuriHara Y. *et al.* Genetic polymorphism of 5,10 methylentetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation*. 1997;95:2032-2036.
- (62) Ou T, Yamakawa-Kobayashi K, Amemiya H, Fujiwara H, Kawata K. *et al.* Methylentetrahydrofolate reductase and apolipoprotein E polymorphisms are independent risk factors for coronary heart disease in Japanese: A case-control study. *Atherosclerosis*. 1998;137:23-28.
- (63) Brattstrom L, Wilken DEL. Homocysteine and cardiovascular disease: Cause or effect? *Am J Clin Nutr*.2000.;73:315-323.
- (64) Fletcher O, Kessling AM. MTHFR association with arteriosclerotic vascular disease? *Hum Genet*. 1998;103:11-21.
- (65) Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22:195-201.



(66) Pinto X, Villaseca MA, García-Giralt N, Ferrer I, Pala M, Meco JF *et al.* Homocysteine and MTHFR 677C>T allele in Spanish patients with premature coronary artery disease. Case control and famili studies. Eur J Clin Invest. 2001;3:24-30.

(67) Cardo E, Monros E, Colome C, Artuch R, Campistol J, Pineda M *et al.* Children with stroke: Polymorphism of the MTHFR gene, mild hyperhomocysteinemia, and vitamin status. J Child Neurol. 2000; 15:295-298.

(68) Soriente L, Coppola A, Madonna P, Cerbone AM, DI Minno G, Orefice G *et al.* Homozygous C677T mutation of the 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase gene and hyperhomocysteinemia in Italian patients with a history of early-onset ischemic stoke. 1998;29:869-871.

## ANEXO 1

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

#### GRUPO DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y METABOLICAS

#### INVESTIGACIÓN: POLIMORFISMO DE LA ENZIMA MTHFR C677T DETERMINACIÓN DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON ENFERMEDAD CORONARIA.

Yo \_\_\_\_\_ con cédula de ciudadanía N° \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ acepto participar en el proyecto relacionado con enfermedades cardiovasculares (corazón, vasos sanguíneos) que afecta gran parte de la población, se me ha informado a través de el, se conocerá sobre uno de los factores de riesgo que se ha denominado niveles de Homocisteina y estudio de mi DNA, ayuda entre otros a establecer que tanto riesgo tengo de padecer una enfermedad cardiovascular de mayor compromiso, los resultados obtenidos se le informaron al médico tratante para realizar parte del manejo. Los beneficios recibidos por mi participación estarán dados por el conocimiento que tendré sobre los factores de riesgo que poseo, dejo claro que mi participación es voluntaria; no recibiré ningún pago, y que los resultados obtenidos individualmente no serán de conocimiento público; además que mi muestra de sangre puede utilizarse para estudios posteriores que han de servir a otras comunidades.

Finalmente deajo claro que en este trabajo, no he recibido ningún tipo de presión al respecto y su función es sin ningún ánimo de lucro; que está respaldada por la Universidad del Quindío; quien por intermedio del MD GILBERTO GARCÍA (Investigador) con c.c. 12.172.863 de Córdoba Quindío, quien labora en el programa de medicina, la Dra Patricia Landazury y Beatriz Restrepo; Docentes de postgrado a quienes puedo acudir en caso de dudas sobre este trabajo.

Acepto participar:

Responsable del trabajo

Nombre: \_\_\_\_\_

GILBERTO GARCÍA MD

Firma: \_\_\_\_\_

RM 63241 Univ. Quindío 1998

Gracias por su participación.

## ANEXO 2

### ENCUESTA

#### UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

#### GRUPO DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y METABOLICAS

#### INVESTIGACIÓN POLIMORFISMO DE LA ENZIMA MTHFR C677T

#### DETERMINACIÓN DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON ENFERMEDAD CORONARIA.

NOMBRE \_\_\_\_\_ HISTORIA CLINICA \_\_\_\_\_  
EPS \_\_\_\_\_ DIRECCIÓN \_\_\_\_\_ TEL \_\_\_\_\_  
OCUPACIÓN \_\_\_\_\_ ESCOLARIDAD \_\_\_\_\_  
EDAD \_\_\_\_\_ SEXO \_\_\_\_\_ PESO \_\_\_\_\_ TALLA \_\_\_\_\_ IMC \_\_\_\_\_  
PERÍMETRO ABDOMINAL \_\_\_\_\_.

#### ANTECEDENTES PERSONALES

PATOLÓGICOS: DIABETES \_\_\_\_\_ HTA \_\_\_\_\_ IRC \_\_\_\_\_ DISTRIMEDIA \_\_\_\_\_  
ENC CORONARIA \_\_\_\_\_ OBESIDAD \_\_\_\_\_ E. CEREBROVASCULAR \_\_\_\_\_  
OTROS \_\_\_\_\_.

HÁBITOS: FUMA \_\_\_\_\_ N° CIGARRILLOS / DÍA \_\_\_\_\_ TIEMPO \_\_\_\_\_  
CONSUMO LICOR: \_\_\_\_\_ TIEMPO \_\_\_\_\_ SEDENTARISMO \_\_\_\_\_  
EJERCICIO \_\_\_\_\_ VECES / SEM. \_\_\_\_\_ CUAL \_\_\_\_\_  
OTROS \_\_\_\_\_.

#### **ANTECEDENTES FAMILIARES**

PATOLÓGICOS: DIABETES \_\_\_\_ PARENTESCO \_\_\_\_ HTA \_\_\_\_ PARENTESCO \_\_\_\_  
ENFERMEDAD CORONARIA \_\_\_\_\_ OBESIDAD \_\_\_\_\_  
ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR \_\_\_\_\_ IRC \_\_\_\_\_  
OTROS: DISLIPIDEMIA \_\_\_\_\_ TABAQUISMO \_\_\_\_\_

#### **SIGNOS VITALES**

TENSIÓN ARTERIAL \_\_\_\_ POSICIÓN: PIE \_\_\_\_ SENTADO \_\_\_\_ ACOSTADO \_\_\_\_  
FRECUENCIA CARDIACA \_\_\_\_\_ PULSO \_\_\_\_\_ TEMP. \_\_\_\_\_ FR \_\_\_\_\_

#### **DIAGNOSTICO INGRESO**

ANGINA ESTABLE \_\_\_\_ ANGINA INESTABLE \_\_\_\_ I.AMQ. \_\_\_\_ I.AMNQ. \_\_\_\_  
OTRO \_\_\_\_ TIPO I.AM CARA \_\_\_\_\_ KILIP \_\_\_\_\_ EVALUA \_\_\_\_\_

#### **PARACLINICOS**

GLICEMIA \_\_\_\_\_ BUN \_\_\_\_\_ CREATININA \_\_\_\_\_ CPKT \_\_\_\_\_  
CPK MB \_\_\_\_\_ COLESTEROL TOTAL \_\_\_\_\_ HDL \_\_\_\_\_ LDL \_\_\_\_\_  
LA \_\_\_\_\_ TRIGLICÉRIDOS TOTAL \_\_\_\_\_ VLDL \_\_\_\_\_ PLR \_\_\_\_\_  
HB GLI \_\_\_\_\_ TROPONINA POSITIVA SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_ FIBROGENO \_\_\_\_\_  
ACIDO FOLICO \_\_\_\_\_ VITAMINA B 12 \_\_\_\_\_ HOMOCISTEINA \_\_\_\_\_

#### **MEDICAMENTOS CONSUMIDOS ANTES DE HOSPITALIZACIÓN**

ANTIHIPERTENSIVOS \_\_\_\_\_ CUALES \_\_\_\_\_  
HIPOLIPEMIANTES \_\_\_\_\_ CUALES \_\_\_\_\_  
ANTICONGESTIONANTES \_\_\_\_\_ CUALES \_\_\_\_\_  
VITAMINAS \_\_\_\_\_ CUALES \_\_\_\_\_  
OTROS : \_\_\_\_\_

**OBSERVACIONES :** \_\_\_\_\_

---

## **ANÁLISIS**

1. Los niveles de homocisteína se cruzaron con el polimorfismo estableciendo su relación.
2. Niveles de homocisteína y su relación con otros factores de riesgo.
3. Polimorfismo y su relación con enfermedades coronarias.
4. Niveles de homocisteína – Enfermedad coronaria.

### **Anexo 3**

#### **EXTRACCIÓN DE ADN.**

#### **Kit Wizard Genomic DNA Purification Kit**

#### **MATERIALES.**

- Tubos de micro centrífuga de 1.5 ml estériles.
- Baño María
- Isopropanol T° Ambiente.
- Etanol al 70% a T° Ambiente.

#### **PREPARACIÓN.**

1. Tomar 100  $\mu$ L de la muestra de sangre total y adicionar 300  $\mu$ L de la solución de lisis celular.
2. Mezcle por inversión, cinco a seis veces.

3. Incube la muestra durante 10 minutos a T<sup>o</sup> ambiente (Invierta 2 a 3 veces mientras la incubación). Hasta lizar las células rojas. Centrifugue a 13000 rpm durante 20 segundos.
4. Remueva y descarte el sobrenadante cuidando de no alterar el pellet blanco visible. Aproximadamente entre 10 y 20  $\mu$ L quedarán en el tubo de 1.5 ml. Si la muestra ha sido congelada repita los pasos 1 al 4 hasta que el pellet este blanco.
5. Aplique vórtex vigorosamente hasta que las células blancas se resuspendan de 10 15 segundos.
6. Adicione 100 $\mu$ L de la solución de lisis nuclear al tubo que contiene las células resuspendidas. Mezcle por pipeteo (5 a 6 veces). La solución podría tornarse muy viscosa. Si observa un exceso de células después de la mezcla, incube la solución a 37°C hasta que estas desaparezcan, si las células aun son visibles luego de una hora de incubación, adicione nuevamente 33.3 $\mu$ L de la solución de lisis nuclear. Y repita la incubación.
7. Adicione 33.0 $\mu$ L de la solución de precipitación proteica al lisado nuclear y aplique vórtex vigorosamente durante 10 a 20 segundos.
8. Centrifugue a 13000 rpm durante 3 minutos un pellet café debe ser visible.
9. Opcional. Nota: si no observa el pellet café enfrié la muestra a T<sup>o</sup> ambiente por lo menos durante 5 minutos o colóquela en hielo durante 5 minutos. Aplique vórtex durante 20 segundos y centrifugue a 13000 rpm por 3 minutos.
10. Transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5ml que contienen 100  $\mu$ L de Isopropanol a T<sup>o</sup> ambiente.
11. Mezcle la solución por inversión hasta que observe filamentos de ADN.

12. Centrifugue a 13000 rpm durante 1 minuto, observe el pellet blanco.

13. Decante el sobrenadante y adicione 100  $\mu$ L de Etanol al 70% a T<sup>o</sup> ambiente.

Mezcle por inversión varias veces para lavar el pellet de ADN. Centrifugue a 13000 rpm por 1 minuto.

14. Remueva cuidadosamente el etanol con la micropipeta y coloque el tubo boca abajo sobre un papel toalla, hasta que el etanol este totalmente seco.

15. Adicione 50  $\mu$ L de la solución de rehidratación. Incube a 65<sup>o</sup> C por 20 minutos.

16. Almacene el ADN entre 2 y 8<sup>o</sup> C.