



**MINISTERIO DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD  
CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN CIENTÍFICA**

**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS  
ANTIFOSFOLÍPIDOS Y TRES  
MARCADORES GENÉTICOS ASOCIADOS  
A TROMBOSIS EN LA ENFERMEDAD  
CEREBROVASCULAR**

**SERIE INFORMES TÉCNICOS N°71**

**DORIS AGAPITO P.  
ANA ARCE C.  
ANGEL ANICAMA H.  
ERIC HUERTAS T.  
JOSÉ LUIS AGUILAR O.**

**2007**

## **I. Título del documento**

*Detección de Anticuerpos Antifosfolípidos y tres marcadores genéticos asociados a trombosis en la enfermedad cerebrovascular.*

## **II. Autores, indicando su filiación institucional**

Doris Agapito P<sup>1,2</sup>, Ana Arce C<sup>2</sup>, Angel Anicama H<sup>3</sup>, Eric Huertas T<sup>4</sup>, José Luis Aguilar<sup>2</sup> O.

- 1 Laboratorio Clínico y Banco Sangre – Sección Inmunología. Hospital Nacional Cayetano Heredia – Lima, Perú.
- 2 Sección de Inmunología – Departamento de Microbiología – Facultad de Ciencias y Filosofía – Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú.
- 3 Médico Neurólogo - Hospital Regional de Ica. Ica, Perú.
- 4 Médico Hematólogo – Hospital Santa María del Socorro – Ica, Perú.

## **III. Índice**

Título del documento .....	1
Autores, indicando su filiación institucional .....	1
Índice.....	2
Resumen en español .....	3
Introducción.....	3-4
Antecedentes .....	5
LA ECV EN EL PERÚ Y LATINOAMÉRICA.....	5
LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR, SUBTIPOS.....	6
FACTORES DE RIESGO PARA ACCIDENTE CEREBRO-VASCULAR ISQUÉMICO.....	6
SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO.....	7
Epidemiología.....	7
Manifestaciones clínicas del SAF.....	7
Trombosis.....	8
Abortos y muertes fetales.....	8
Trombocitopenia.....	8
Estudios de AFL asociados a ACV.....	9
POLIMORFISMOS GENÉTICOS.....	9
Factor V.....	9
Factor V Leiden.....	9
Factor II.....	10
Polimorfismo C677T de la enzima 5,10-Metilentetrahidrofolato reductasa y la Hiperhomocisteinemia.....	10-12
Polimorfismo C677T de la MTHFR y su relación con ACV.....	12
Objetivos Generales y Específicos.....	12
OBJETIVO GENERAL.....	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12-13
Metodología.....	13

TIPO DE ESTUDIO.....13

Agapito D. y col.

DEFINICIÓN DE CASOS.....13  
Criterios de Inclusión  
Criterios de Exclusión  
DEFINICIÓN DE CONTROLES.....13  
CONSENTIMIENTO INFORMADO.....14  
PARTICIPANTES Y LOCALIZACIÓN.....14  
TOMA DE MUESTRA .....14  
TAMIZAJE DE ANTIFOSFOLIPIDOS .....14-15  
ENSAYOS DE CARACTERIZACION DE ANTIFOSFOLIPIDOS.....15  
DETERMINACION CUANTITATIVA DE Anti-H2GPI, IgG e IgM.....15  
POLIMORFISMOS GENÉTICOS .....16  
Extracción de ADN.....16  
Detección del Factor V Leiden .....16  
Detección de Protombina o Factor II G20210A.....16  
Detección del polimorfismo C677T de la MTHFR.....17  
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....17  
Resultados.....17  
SUJETOS DEL ESTUDIO.....18  
ANTIFOSFOLIPIDOS .....19  
ANTI- J2GPI.....20  
POLIMORFISMOS GENÉTICOS.....21  
Factor V Leiden y Protombina (Factor II) G G20210A.....21  
Polimorfismo C677T de la MTHFR.....23  
VARIABLES DEL ESTUDIO ASOCIADAS CON LA TROMBOSIS EN  
PACIENTES CON ACV ISQUEMICO.....25-26  
Discusión.....26-30  
Conclusiones.....30  
Recomendaciones.....30  
Anexos.....30  
ANEXO I.....30  
ANEXO II.....31-32  
Referencias Bibliográficas.....33-36

Anticuerpos antifosfolípidos y tres marcadores genéticos asociados a la enfermedad cerebrovascular.

#### IV. Resumen en español

**Objetivos:** Evaluar la asociación de cuatro clases de anticuerpos antifosfolípidos (AFL) (anti-cardiolipina, fosfatidilserina, ácido fosfatídico y fosfatidilinositol) y anti-H2 Glicoproteína I de isotipos IgG e IgM y/o tres mutaciones genéticas (Factor V Leiden G1691A, Protombina G20210A, polimorfismo C677T de la Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)) con los accidentes cerebrovasculares y determinar su importancia como factores de riesgo de trombosis en pacientes con infartos cerebral.

**Materiales y métodos:** La concentración de AFL y anti- H2Glicoproteína I IgG e IgM se determinó por técnicas de ELISA y los polimorfismos genéticos: Factor V Leiden, Protombina G20210A y C677T de la MTHFR por análisis de PCR-RFLP; en muestras de sangre de 33 pacientes con accidente cerebrovascular (ACV) isquémico de causa no determinada frente a 92 controles sanos, de 18 a 60 años de edad.

**Resultados:** El polimorfismo del Factor II de coagulación (protrombina) G20210A se asoció en grado significativo a la trombosis en pacientes con ACV de tipo isquémico al presentarse en el 9,1% de los casos versus el 0% en los controles ( $p=0.017$ ). No hubo asociación significativa entre los anticuerpos antifosfolípidos, anti-H2GPI y polimorfismos genéticos Factor V Leiden G1691A y C677T MTHFR y el evento trombótico en pacientes con ACV isquémico.

**Conclusiones:** Se reporta por primera vez una investigación nacional que evalúa la presencia del polimorfismo protombrina G20210A asociado a ACV isquémico en pacientes adultos jóvenes sin factores de riesgo tradicionales.

**PALABRA CLAVE:** ACV isquémico, antifosfolípidos, anti-H2 glicoproteína I, protombina G20210A, Factor V Leiden, Metilentetrahidrofolato reductasa C677T, PCR-RFLP.

#### V. Introducción

La enfermedad cerebrovascular (ECV) es un problema de salud pública en el ámbito mundial actualmente. Constituye la segunda causa de muerte en el mundo después del infarto del miocardio (5,5 millones de personas mueren al año) y es la responsable de discapacidad en un alto porcentaje de los pacientes que sobreviven, provocando un enorme impacto en la calidad de vida individual y familiar, con repercusión social y económica<sup>1</sup>. Por lo tanto, cualquier avance en el conocimiento de esta enfermedad sea de prevención, diagnóstico o tratamiento, beneficiará en gran medida a estos pacientes. Según la Organización Mundial de la Salud, el accidente cerebrovascular (ACV) o stroke se define como los signos clínicos de trastornos focales de la función cerebral, desarrollados rápidamente, con síntomas que duran 24 horas o más, que podrían llevar a la muerte y sin otra causa aparente que un origen vascular. Existen diferentes tipos de ECV, siendo más frecuentes los eventos isquémicos que los hemorrágicos y que son el resultado de enfermedades como aterotrombosis a nivel de las bifurcaciones de los grandes vasos, embolias arterio-arteriales y embolias de origen cardíaco. Los factores de riesgo más comunes para una ECV han sido ampliamente reconocidos, entre ellos los que

más destacan son hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipidemia y tabaquismo. Sin embargo, existe un 30 % de las ECV isquémicas, que se desarrollan en pacientes jóvenes y no tienen una etiología definida. Dentro de los factores potenciales que expliquen este tipo de evento vascular se ha descrito cuadros de trombofilia cuyo origen puede ser adquirido, como el síndrome antifosfolípido e hiperhomocistinemia, y/o hereditario como la deficiencia de los inhibidores de la coagulación (proteína C y S, antitrombina III), las

Agapito D. y col.

mutaciones genéticas en los factores de la coagulación o la disfunción enzimática de Metilendetrahidrofolato reductasa (MTHFR). El 8 al 15% de pacientes con ACV menores de 50 años, son debido a los estados protrómbóticos.

En los últimos años se ha despertado un gran interés por el estudio de los anticuerpos antifosfolípidos (AFL). Estos constituyen una familia heterogénea de autoanticuerpos dirigidos contra ciertos fosfolípidos, preferentemente a aquellos de carga negativa que son constituyentes de las membranas celulares. Un subgrupo de pacientes portadores de estos autoanticuerpos presentan fenómenos de trombosis venosas y/o arteriales, trombocitopenias y abortos a repetición. La presencia de AFL en ACV isquémico varía del 1 al 46% y la presencia de estos anticuerpos es considerada como un modelo de trombosis mediado por el sistema inmune.<sup>2</sup> De este modo, podría reconocerse si existe asociación entre los AFL y la ECV. Además, los AFL pueden estar dirigidos también contra el complejo formado por el fosfolípido y la H2-glicoproteína I (H2GPI), o sólo contra la proteína H2GPI. Los anticuerpos anti-H2GPI pueden ser predictores más específicos del fenómeno de trombosis.

Asimismo, diversos trastornos hereditarios de la coagulación se han relacionado con el desarrollo de trombosis arteriales y venosas, en particular en los eventos vasculares cerebrales<sup>3</sup>. Análisis genéticos del factor V de la coagulación revelaron una sustitución de adenina por guanina en la posición 1691 (G1691A) llamado factor V Leiden,<sup>4</sup> el cual no es susceptible al clivaje en la posición 506 por la proteína C activada (PCA), una de nuestras proteínas anticoagulantes naturales, lo cual ocasiona un estado de hipercoagulabilidad y el incremento en la generación de trombina. Respecto al factor II de la coagulación (protrombina), una mutación (G20210A) en el codón no terminal 3' del gen ha sido asociada con el incremento plasmático de la concentración de protrombina y el riesgo incrementado de trombosis venosa.<sup>5</sup> En relación a la homocisteína, una sustitución de citosina por timina en el nucleótido 677 (C677T) del gen de la enzima Metilendetrahidrofolato reductasa (MTHFR)<sup>6</sup>, es la mutación responsable de la actividad reducida de la enzima y su termolabilidad incrementada lo que produce el aumento de homocisteína en sangre que afecta al sistema vascular arterial y/o venoso.

También, varios casos han sugerido que interacciones epistáticas (gen a gen) pueden incrementar el riesgo de trombosis sinérgicamente en personas portadoras de mutaciones protrombóticas y/o en hiperhomocistinemia como se ha demostrado en familias con desórdenes combinados<sup>7</sup>. Por ello se han realizado estudios con el fin de indagar las asociaciones de diferentes polimorfismos con una variedad de genes candidatos incluyendo genes hemostáticos, genes que controlan el metabolismo de la homocisteína, genes que convierten la enzima angiotensina, genes del óxido nítrico endotelial, entre otros.

Las investigaciones realizadas al respecto provienen de otras partes del mundo donde se difiere en raza, factores ambientales, hábitos alimenticios y estilo de vida. Por eso creemos necesario que en nuestro país se realicen estudios que brinden mayor información sobre las peculiaridades de esta enfermedad contribuyendo a disminuir el agobiante impacto en los que

la padecen. Investigaciones con AFL y las mutaciones genéticas referidas anteriormente relacionados a ACV, no han sido reportadas a nivel nacional.

Por todo ello, con la presente investigación, pretendemos profundizar los estudios encaminados a encontrar un marcador inmune fosfolipídico y/o genético que pueda constituir un criterio diagnóstico de la trombosis cerebral en pacientes jóvenes sin etiología definida.

Anticuerpos antifosfolípidos y tres marcadores genéticos asociados a la enfermedad cerebrovascular.

## **VI. Antecedentes**

### **LA ECV EN EL PERÚ Y LATINOAMÉRICA**

Los estudios de prevalencia e incidencia de ECV son escasos en nuestro medio. Sin embargo, existen publicaciones de las frecuencias de ECV en diferentes instituciones donde se reconoce un alto número de admisiones hospitalarias, lo cual indicaría tasas igualmente elevadas en la población.

En el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen (EsSALUD) - Lima, se realizó un estudio cuyo objetivo fue evaluar la historia natural de la ECV en el Perú, por un periodo de 11 años (1987-1998) abarcando a 1517 pacientes. Se observó que la ECV ha sido la principal causa de hospitalización en el servicio de neurología de modo constante y con tendencia a aumentar porcentualmente durante los años del estudio y se demostró que el 38,10% de los pacientes fue hospitalizado por motivo de un ACV<sub>1</sub>.

Similar resultado encuentra Aurazo y col. con la investigación realizada en el Hospital de Belén-Trujillo entre los años 1995 y 2004, demostrando que el 35,42% de pacientes ingresados al Servicio de Neurología presentaban un diagnóstico clínico y tomográfico de ACV<sub>8</sub>.

A diferencia de las ciudades desarrolladas, Perú tiene escasos recursos económicos, pocos hospitales y médicos especializados que atiendan a la población total. Es así, como sólo una minoría de los pacientes que padecen un ACV puede llegar a ser examinados por un médico o admitidos en un hospital en tiempo oportuno. Los estudios de prevalencia de ECV basados en hospitales son difíciles de realizar debido a los datos incompletos de las historias médicas y la mediana proporción de pacientes que son hospitalizados por esta causa <sup>9</sup>.

Es por esto que se tiene la impresión, que la ECV hasta la fecha, no ha sido atendida en nuestro medio en su real dimensión como problema de salud pública. El costo de capital humano (gastos de recuperación de salud y merma por lo que deja de producir el enfermo) motiva una marcada preocupación en países de gran desarrollo económico, contrastando con la exigua asignación de recursos dedicados a la ECV, en países como el nuestro<sub>1</sub>.

El conocimiento actual de esta enfermedad se basa principalmente en estudios de Norteamérica y de Europa. Saponisk y Del Brutto<sup>10</sup>, realizaron una revisión de 200 artículos sobre ACV en sudamérica, seleccionando sólo 18 que reunían los criterios de inclusión. De ellos 7 aportan información sobre la epidemiología del ACV (estudios de población); y 11 sobre los subtipos (registros hospitalarios). Los estudios revelan una prevalencia de ACV en Sudamérica de 1,74 a 6,51 por 1000 habitantes, con una incidencia de 0,35 a 1,83 por 1000 habitantes, por año. También, el patrón de los subtipos de ACV fue diferente al de los países desarrollados, con una frecuencia más alta de hemorragias cerebrales (26 al 40%, dos veces más alta), enfermedad de pequeños vasos y de lesiones ateroscleróticas intracraneales; debido probablemente a factores genéticos, ambientales o socioculturales y a diferencias en el control de los factores de riesgo. Mencionan que



una clasificación más específica en cuanto a razas resultaría de mayor valor dada la heterogeneidad de razas incluidas en las investigaciones. Reportan además, que el primer estudio epidemiológico en ECV fue realizado en el Perú-Cuzco<sup>9</sup>, ciudad con una población de 210,000 habitantes localizada a 3,380 msnm. Mencionan que de un total de 3,246 pacientes mayores de 15 años de edad, la prevalencia de ECV fue de 6,2 por 1000 habitantes con una incidencia de 1,83 por 1000 en un año, destacando como factores de riesgo: la edad, el consumo de alcohol y la policitemia.

Agapito D. y col.

## **LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR, SUBTIPOS**

La mayoría de enfermedades cerebro-vasculares se manifiestan al darse un déficit focal neurológico abrupto. Este déficit podría permanecer fijo o podría mejorar rápidamente o empeorar progresivamente. A este tipo de manifestación de déficit neurológico focal y no convulsivo se le define como ACV o Stroke o ictus<sup>8,11</sup>, considerándosele como la anomalía del encéfalo resultante de un proceso patológico de los vasos sanguíneos por oclusión de la luz por trombos o émbolos, rotura del vaso y lesión o trastorno de la permeabilidad de la pared vascular<sup>12</sup>. El ataque repentino se pone de manifiesto al tener pérdida de la función motora y/o sensorial en una mitad del cuerpo, cambios de la visión y/o de la marcha o incapacidad para hablar o entender, o un repentino y severo dolor de cabeza<sup>11</sup>.

Las categorías o subtipos de las ECV incluyen el infarto isquémico y la hemorragia intracraneal. Siendo sus frecuencias de 85% y 15%, respectivamente <sup>11,12</sup>. Entre las publicaciones nacionales, destaca la de Deza y colaboradores<sup>13</sup>, quienes determinan con mayor precisión las características clínicas específicas de los subtipos de ACV isquémico según la clasificación del Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment –TOAST realizado por Adams y col. En una población de 1,156 pacientes (828 varones y 328 mujeres) afectados por isquemia cerebral, atendidos en el Servicio de Neurología del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, desde Abril de 1987 hasta diciembre de 1998; los resultados más significativos destacan que la ECV isquémica fue la más frecuente (76,2%) a diferencia de la hemorrágica (23,8%); corroborando los valores encontrados en anteriores investigaciones. Resaltan que el mecanismo patogénico más frecuentemente asociado a isquemia es la aterosclerosis de arterias cerebrales grandes, detectado en el 69,9% de los pacientes con ECV, en segundo lugar se encontró a la arterioesclerosis, con una frecuencia de 15,74%; la embolia cardiogénica con el 11,25% y el subtipo “otras causas o causa desconocida” con frecuencia del 3,11%. Las ECV de causa no determinada estaban representadas dentro de este grupo con el 1,38% constituyendo un bajo porcentaje debido a que este hospital es un centro de referencia especializada, sólo para la población asegurada<sup>11</sup>. La edad promedio que tuvieron los pacientes al momento de ocurrir el primer evento fue 65,30 años para la aterosclerosis, 55 años en la arterioesclerosis y trombosis lacunar, 54 años en el cardioembolismo y 44 años para “otras causas”, correspondiendo este último valor a una edad productiva de la vida, sufriendo invalidez más del 50% de los casos luego del primer episodio. La mortalidad alcanzada fue de 5,36% en ECV isquémico y 24,10% en el hemorrágico.

La escasez de estudios en estos temas determina la urgente necesidad de promover la realización de mayores estudios epidemiológicos a gran escala y bien diseñados que brinden mayor información sobre las peculiaridades de esta enfermedad en nuestro país.

## **FACTORES DE RIESGO PARA ACCIDENTE CEREBRO-VASCULAR ISQUÉMICO**

Los factores de riesgos comprobados o probables para sufrir un ACV isquémico son el tener una edad avanzada, una historia familiar de ACV trombótico, diabetes mellitus, hipertensión arterial, ser fumador de tabaco y elevados niveles de colesterol en sangre. Los anticonceptivos orales también aumentan el riesgo de padecer un ACV<sup>11</sup>. Las evidencias señalan que la presencia de los factores de riesgo, en forma aislada, aumenta significativamente la posibilidad de adquirir un ECV y la amenaza es mayor cuando se asocia más de un factor de riesgo en una misma persona<sup>1</sup>.

Anticuerpos antifosfolípidos y tres marcadores genéticos asociados a la enfermedad cerebrovascular.

## **SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO**

El Síndrome antifosfolípido (SAF) es aceptado como una de las causas más frecuentes de hipercoagulabilidad. Es un desorden autoinmune que se presenta en pacientes que tienen evidencias de la presencia de AFL o de cofactores proteicos unidos a los AFL en su sangre. Se ha encontrado que está fuertemente asociado a trombosis venosa profunda o superficial recurrente, trombosis arterial recurrente, abortos espontáneos a repetición, muerte fetal, infartos múltiples o ataques isquémicos transitorios, trombocitopenia y anemia hemolítica<sup>14</sup>. Alrededor de la mitad de los pacientes con SAF, no tienen enfermedad sistémica acompañante y han sido clasificados como una forma primaria del trastorno (SAP)<sup>15</sup>. El resto de pacientes presenta un SAF que coexiste con el lupus eritematoso sistémico (LES) o cualquier otra forma de alteración del tejido conectivo y se le clasifica como un Síndrome antifosfolípido secundario (SAS). Los pacientes con SAP tienen 3 a 10 veces más probabilidad de tener trombosis recurrente que los sujetos sanos<sup>16</sup>.

### **Epidemiología**

En un análisis retrospectivo italiano sobre el SAP se examinó la prevalencia de complicaciones vasculares en 319 pacientes. La edad media fue 31 años, la proporción hombre a mujer fue 1:2,9. El 65% fue clasificado como SAP y el 35% como SAS. La trombosis venosa fue común en las venas profundas de las piernas y los sitios más frecuentes de trombosis arteriales fueron a nivel cerebral (81% y 85% respectivamente)<sup>17</sup>.

Otro estudio evaluó la prevalencia de anticuerpos anticardiolipina (ACA) y anticoagulante lúpico (AL) en donadores de sangre españoles, reportando una prevalencia de 6.5% para ACA IgG y 9.4% para ACA IgM. Ninguno de los pacientes tuvo manifestaciones clínicas durante el seguimiento por un año<sup>18</sup>. De estos datos se deduce que muchas personas pueden presentar AFL positivos pero no manifestaciones asociadas con esta positividad. De manera semejante, los AFL inducidos por fármacos o en el curso de infecciones no suelen provocar manifestaciones clínicas.

En la investigación realizada por Sasya y col. se demostró que el promedio de edad es menor en aquellos pacientes con AFL asociado a ACV. El tiempo medio de recurrencia para otro ACV fue de 7,9 meses; sin embargo, un título de anticuerpos mayor de 100GPL fue asociado con un tiempo menor de recurrencia<sup>14</sup>.

Manifestaciones clínicas del SAF Los AFL están asociados con una variedad de manifestaciones clínicas. La trombosis producida afecta comúnmente a las venas profundas de las piernas, circulación pulmonar, vena cava inferior, venas hepáticas, venas craneales y retinales. Los AFL también se asocian a accidentes isquémicos cerebrales, afectando mayormente a la vasculatura cerebral incluyendo las arteriolas. El 36% de los ACV en



personas menores de 50 años son debidos a AFL y el riesgo de recurrencia tras un primer episodio alcanza el 31% durante un periodo de tres años<sup>19</sup>. Otros eventos reportados frecuentemente son pérdida de embarazo recurrente, trombocitopenia, livedo reticularis, eventos neurológicos como episodios de confusión y demencia, corea, migraña, mielitis transversa, accidentes isquémicos transitorios (AIT) y epilepsia.

Agapito D. y col.

### **Trombosis**

Los resultados de estudios en animales son consistentes con la hipótesis de que algunos AFL son protrombóticos, por lo cual el SAF es ciertamente un desorden trombótico mediado por el sistema inmune<sup>20</sup>. Se han descrito muchas teorías sobre los mecanismos patogénicos de trombosis, pero probablemente ninguna de ellas la explica claramente, debido a que estos episodios tienen una patogénesis multifactorial. La tendencia trombogénica aumenta por disturbios en las vías anticoagulantes fisiológicas, por ejemplo los AFL interfieren con la activación y función de la proteína C y a la vez con la inactivación de los factores V y VIII. Algunos autores sugieren que la anexina V forma una barrera entre la superficie endotelial vascular y la circulación sanguínea, y la unión de AFL a las células endoteliales interfieren con estas barreras, provocando trombofilia<sup>21</sup>.

Las anomalías en la función de las células endoteliales también juegan un rol importante en el desarrollo de trombofilia<sup>22</sup>. Las funciones normales de estas células incluyen producción del óxido nítrico, prostaciclina, trombomodulina, inhibidor del factor tisular, además de mantener una superficie adecuada para el flujo sanguíneo. Recientes investigaciones realizadas in vitro sugieren que los AFL se unen a las células endoteliales por medio de la H2GPI, la cual actúa como un epítopo para los AFL circulantes. Esto induce a la activación celular y a la expresión incrementada de moléculas de adhesión resultando en incremento de leucocitos adheridos al endotelio y secreción de citocinas proinflamatorias<sup>23</sup>.

Se ha demostrado que en la presencia de SAF, se produce una respuesta incrementada de expresión del factor tisular en monocitos y células endoteliales<sup>24</sup>, así como, la interferencia en la vía anticoagulante de la proteína C y la inhibición de la fibrinólisis. Se discute aún si AFL activan directamente a las plaquetas<sup>25</sup>.

### **Abortos y muertes fetales**

Las pérdidas fetales recurrentes son otra de las manifestaciones más estrechamente relacionadas con la presencia de AFL. Las pérdidas pueden ocurrir en cualquier momento durante el embarazo pero alrededor del 50% de los casos se presentan en el segundo y tercer trimestre de la gestación. Este es un dato que diferencia los abortos de este síndrome de los de la población normal, cuyas pérdidas suelen ocurrir durante el primer trimestre del embarazo y generalmente están relacionados con causas no inmunológicas (alteraciones morfológicas y cromosómicas). En mujeres con historia de gestaciones normales sólo un 2% presentan títulos altos de los AFL, por lo que determinar estos anticuerpos en mujeres embarazadas sin antecedentes obstétricos patológicos sea de poco valor. La historia de los embarazos previos es importante para determinar la significación de una prueba positiva para AAF. Se estima que si una paciente con LES tiene AL o al menos títulos medios de isotipo IgG de los AC, el riesgo de aborto espontáneo en el primer embarazo es del 30% y si tiene historia de al menos 2 pérdidas fetales previas, el riesgo aumenta hasta el 70% en el siguiente embarazo<sup>26</sup>.

### ***Trombocitopenia***

La trombocitopenia es relativamente frecuente en pacientes con AFL, aunque no suele ser tan severa como para causar hemorragia. A menudo, el número de plaquetas permanece durante años y en un momento dado, sin que conozcamos las razones, se produce un descenso que ocasionalmente, puede ser importante. Algunos pacientes con SAF pueden presentar sólo trombocitopenia y más tarde desarrollar trombosis o pérdidas fetales. Algunos pacientes con AFL y trombocitopenia también desarrollan anemia hemolítica con test de Coombs directo<sup>26</sup>.

Anticuerpos antifosfolípidos y tres marcadores genéticos asociados a la enfermedad cerebrovascular.

### **Estudios de AFL asociados a ACV**

La asociación entre AFL y ACV isquémico ha sido sugerida en algunos estudios, pero no probada a cabalidad. Al respecto citamos la investigación hecha por Brey y col.<sup>27</sup>, quienes realizaron un estudio caso-control, evaluando AFL de tipo anti-cardiolipina IgG e IgM y AL en 160 casos y 340 controles mujeres jóvenes. Ellos encuentran una modesta asociación entre los AFL y el ACV en las pacientes de 15 a 44 años, con infarto cerebral único.

Detectan ACA en el 26,3% de los casos versus el 18,2% de los controles. El riesgo relativo de ACV en mujeres con ACA o AL fue de 1,87 (95% de IC, 1,24-2,83; P=0,0027). No encontraron diferencias significativas entre la asociación de AFL con la raza, edad, hipertensión, diabetes mellitus, enfermedad arterial coronaria, estado de fumadora u origen del ACV. Afirman que de los 160 casos de ACV, el 63% tuvo al menos un factor de riesgo para ACV (ateroesclerosis, cardioembolismo, lacunar y otras causas) y el 31% fueron ACV del subtipo no determinado. Con estos datos se destaca la importancia de los AFL como un factor de riesgo independiente para ACV en mujeres jóvenes.

Otro estudio realizado por Gonzales-Portillo y col.<sup>28</sup>, caracterizó y describió la distribución de ACA, anti-fosfatidilserina (AFS) y anti-fosfatidiletanolamina (AFE) de isotipo IgG, IgM e IgA en pacientes con ECV, realizado en el periodo de 1997 a 1999. Ellos identificaron 34/185 (18,3%) pacientes positivos para AFL, con mayor predominancia en las mujeres (26/185). Los rangos de edad fueron muy amplios de 1 a 82 años en las mujeres y 35 a 60 años en los hombres. Entre los pacientes afectados, 10 tuvieron stroke de causa no determinada. Los factores de riesgo más comunes entre los pacientes fueron consumo de cigarrillo, hipertensión arterial, migraña y Lupus eritematoso sistémico (LES). El isotipo IgA fue encontrado con mayor frecuencia y el AFL más común fue AFE. Los autores sugieren que este AFL podría interactuar directamente con el sistema nervioso central, sin embargo, faltarían más estudios para corroborarlo.

## **POLIMORFISMOS GENÉTICOS**

### **Factor V**

Es una glicoproteína de 330 KDa aproximadamente. Su concentración normal en el plasma es de 20nmol/L (0.007g/L). Circula en forma libre en el plasma, se encuentra en los gránulos de las plaquetas y es sintetizada en el hígado. El locus del gen se localiza en el cromosoma 1q23, tiene un tamaño de 80 kb y contiene 25 exones. Presenta una organización en varios dominios (A1-A2-B-A3-C1-C2). La trombina activa el factor V (factor Va) al actuar en tres posiciones: 709, 1018 y 1545. La proteína C activa actúa sobre el factor Va sobre las posiciones 306, 506 y 679, para inducir inactivación del mismo<sup>29</sup>.

### ***Factor V Leiden***

En el año 1993 se describe la resistencia a la proteína C activa (RPCa) y un año más tarde se conoce la alteración genética más frecuente relacionada con dicha resistencia que es llamado el factor V Leiden. En la actualidad, la RPCa es considerada como el factor trombofílico con mayor implicación en el Tromboembolismo venoso (TEV). En la mayoría de los casos en que se detecta una RPCa, ésta es debido a una mutación puntual en el gen del factor V, debido a una transición de G por A en el nucleótido 1691 (G1691A) del exón 10, que ocasiona una sustitución del aminoácido arginina por glutamina en la posición 506 (Arg 506--->Gln). Es lo que se conoce como factor V Leiden y que constituye la alteración genética que más frecuentemente contribuye a un estado de trombofilia. Así se produce una síntesis anómala del

Agapito D. y col.

factor V resistente a la degradación por la proteína C y se genera un estado de hipercoagulabilidad<sup>29</sup>.

### **Factor II**

La protrombina (factor II) es codificada por un gen localizado en el cromosoma 11. La mutación del gen de la protombina (extremo 3' no traducido) consiste en el cambio de la guanina por adenosina en el nucleótido 20210 (G20210A). Ello conlleva aumentos de hasta un 30% de protombina circulante, la cual es precursora de la trombina o proteína encargada de la formación del coágulo. Su incidencia en España es 2% en sanos, del 6% en trombosis no seleccionadas y del 18% en trombosis familiares. La presencia de esta mutación incrementa por tres el riesgo tromboembólico y éste incremento es superior a cinco en los pacientes con tromboembolismo venoso (TVE) recurrente. Respecto a las diferencias demográficas se ha sugerido que la prevalencia de la protombina 20210A es casi el doble en el sur de Europa respecto a los países nórdicos. Al igual que sucede con el factor V Leiden, existen datos contradictorios del papel de la mutación 20210A de la protrombina como factor de riesgo de trombosis arterial <sup>30</sup>.

De Stefano y cols, investigaron la presencia del polimorfismo G20210A en 72 sujetos con ACV isquémico menores de 50 años y sin factores de riesgo tales como hipertensión e hiperlipidemia, comparándolos con 198 controles. Ellos encuentran en los casos 7 heterocigotas (9,7%) y 2 homocigotas (2,7%) y en los controles, 5 heterocigotas (2,5%). El odds ratio (OR) para stroke isquémico asociado con ser portador de la mutación fue 5.1 (95% IC 1,6 a 16,3). El genotipo heterocigoto fue asociado con 3,8 veces más de riesgo incrementado para isquemia cerebral (95 % IC 1,1 a 13.1)<sup>31</sup>.

Hay múltiples estudios que demuestran asociación entre los polimorfismos factor V Leiden y la protrombina G20210A con el stroke isquémico y también otro grupo de investigaciones con resultados negativos para dichas alteraciones genéticas<sup>32</sup> (anexo I). Las explicaciones entre estas diferencias básicamente las atribuyen a la metodología empleada en los estudios: diferentes poblaciones, en algunos casos pequeños tamaños de muestra, dificultad para evaluar el verdadero fenotipo del stroke e inclusión de pacientes de diferentes edades.

### ***Polimorfismo C677T de la enzima 5,10-Metilentetrahidrofolato reductasa y la Hiperhomocisteinemia.***

Algunos estudios epidemiológicos muestran que un incremento mínimo de las concentraciones de homocisteína está asociado con un riesgo aumentado de sufrir ACV, enfermedades cardiovasculares y enfermedades vasculares (trombosis venosas y arteriales, problemas coronarios, estenosis)<sup>33</sup>.

En la década de 1970, apareció el primer trabajo que relaciona la hiperhomocisteinemia plasmática con un aumento de riesgo para aterotrombosis. En 1984, se publicó el primer trabajo que señala a la hiperhomocisteinemia como un factor de riesgo independiente de ECV arterial y venosa<sup>34</sup>.

La hiperhomocisteinemia produce trombosis de los vasos a través de un doble mecanismo; favorece la aterogénesis o formación de placas de ateroma y altera la función de la pared de los vasos favoreciendo la trombogénesis, sin producir alteraciones morfológicas<sup>34</sup>.

Anticuerpos antifosfolípidos y tres marcadores genéticos asociados a la enfermedad cerebrovascular.

El aumento de homocisteína plasmática puede deberse a causas adquiridas como hereditarias. Dentro de las primeras destacan la deficiencia de ácido fólico, vitamina B12 y vitamina B6, vitaminas involucradas en la conversión de homocisteína a metionina u otros compuestos menos tóxicos; también, falla renal, hipotiroidismo y drogas como el metotrexato, teofilina y fenitoina, conducen a un estado de hiperhomocisteinemia<sup>33,35</sup>.

Las causas hereditarias se deben a la alteración de algunas enzimas que están involucradas en el metabolismo de la homocisteína. De ellas, es de destacar la mutación genética más común de la hiperhomocisteinemia; el polimorfismo C677T del gen de la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)<sup>33,35</sup>.

La enzima MTHFR es la encargada de catalizar la conversión del 5,10- metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), el cual es la principal forma circulante de folato usado en muchas vías bioquímicas, como por ejemplo, al comportarse como un co-sustrato para la re-metilación de la homocisteína hacia metionina y otros compuestos, y también es usado para la síntesis de nucleótidos<sup>36, 37</sup>. Brevemente, la 5-MTHF, la forma metilada del folato, provee la molécula de carbono que es usada para convertir por ejemplo, la homocisteína en metionina, una reacción catalizada por la metionina sintetasa. La re-metilación de homocisteína hacia metionina es un importante paso en la red metabólica que regula la biosíntesis de nucleósidos, la metilación del ADN, proteínas y lípidos, y los niveles de homocisteína y metionina. Esta red metabólica es compleja y se vale de múltiples activadores e inhibidores. La evidencia crece indicando que la actividad normal de la MTHFR puede contribuir a mantener el pool de folato y metionina circulante y prevenir un exceso de homocisteína; contrariamente, una actividad baja anormal de la MTHFR, puede llevar a bajos niveles de folato circulante, baja disponibilidad de metionina y altos niveles de homocisteína<sup>37</sup>.

Goyette y col. Definieron la estructura del gen humano de la MTHFR, el cual está localizado en el cromosoma 1 en la posición 1p36.3, con una longitud de 2.2 kilobases y compuesto de 11 exones,. El principal producto del gen de la MTHFR en los humanos es una proteína catalíticamente activa de 77-kDa<sup>36,37</sup>.

En 1995, Frosst y col. identificaron la mutación de un solo par de bases en el cual se sustituye una citosina por timina en el nucleótido 677 del gen de la MTHFR, esto produce el cambio de un residuo de alanina (GCC) por una valina (GTC), originando Ala223Val dentro del dominio catalítico de la enzima MTHFR. Esta alteración crea un sitio de restricción denominado Hinf I y es responsable de la síntesis de una forma termolábil de la MTHFR<sup>35, 36, 37,38</sup>.

La mutación en los estados homocigotos o heterocigotos correlacionan con la actividad reducida de la enzima y termolabilidad incrementada. Funcionalmente, la proteína codificada tiene una actividad enzimática reducida a 37°C o más, de tal manera que a la mutación C677T

se le llama frecuentemente, "termolábil". Por ejemplo, muestras de homocigotos C677T tenían una actividad disminuida de la MTHFR al 50 o 60% a 37°C comparado con controles tratados de forma similar; es más, la actividad de la enzima disminuía a un 65% cuando la temperatura subía a 46°C. Los heterocigotes se encuentran en el rango intermedio<sup>37,38</sup>.

El alelo C677T causa una disfunción enzimática no severa que resulta en homocisteinemia moderada más aún en personas cuyo estatus de folato no es óptimo; el folato actúa estabilizando la enzima termolábil actuando en consecuencia sobre los niveles de homocisteína. También se ha reportado la corrección de una hiperhomocisteinemia moderada por tratamiento con ácido fólico en individuos con

Agapito D. y col.

enfermedad vascular prematura y portadores de la mutación de la MTHFR termolábil. En consecuencia, Frost y col. concluyeron que esta mutación podría representar un importante factor de riesgo genético en la enfermedad vascular <sup>36, 37, 38</sup>.

La prevalencia global del alelo C677T no ha sido establecida con precisión pero parece diferir a través de las poblaciones. La frecuencia del alelo tiene rangos que van desde menos del 10% en algunos grupos de africanos del África sub-sahariana y algunos negros de origen africano que viven en América, a un 40% o más entre hispanos de California e Italianos respectivamente <sup>37,39</sup>.

### ***Polimorfismo C677T de la MTHFR y su relación con ACV***

La comprensión de los efectos de la enzima MTHFR sobre la salud y la enfermedad aún presenta brechas críticas. El rol de la mutación de la MTHFR en la patogénesis del ACV está aún en debate. Varios estudios le asocian con un riesgo incrementado para enfermedades particulares, como las cardiovasculares o las malformaciones congénitas o el ACV<sup>37</sup>. Aunque es una mutación que ocurre muy frecuentemente en la población normal y aún no ha sido probado como factor de riesgo significativo, podría ser un factor patológico aditivo junto a otras condiciones relacionadas a estados pro-coagulantes<sup>40,37</sup>.

Salooja y col. en un estudio realizado en Londres no encontraron diferencia significativa entre pacientes con ACV isquémico y el grupo control, respecto a la frecuencia del genotipo mutante<sup>41</sup>. A diferencia del estudio realizado por Topic y col. en Croacia quienes hallaron asociación significativa entre el polimorfismo genético de MTHFR y el ACV, sugiriendo un alto riesgo del evento trombótico en aquellos sujetos homocigotos<sup>42</sup>. Una revisión de metaanálisis realizada por Kim y col. indica que las anomalías genéticas específicas para factor V de la coagulación, protrombina y el metabolismo de homocisteína incrementan el riesgo para infarto miocárdico y ACV isquémico, particularmente entre pacientes jóvenes y mujeres<sup>43</sup>.

El estudio realizado por Pezzini y col. investigó el efecto acumulativo de la presencia de los polimorfismos protrombina 20210A, del FV Leiden, el MTHFR C677T y el e4-transportador del gen de la apolipoproteína (APOE). Sus resultados presentaron el efecto sinérgico y una relación gen-dosis de estos polimorfismos en la patogénesis de ACV en jóvenes<sup>35</sup>.

Es por ello que se considera importante conocer en nuestra población si la existencia del polimorfismo C677T de la MTHFR constituye un factor de riesgo para el desarrollo de eventos trombóticos a nivel cerebro-vascular. En nuestro país, al momento, no se ha realizado ningún trabajo de casos o epidemiológico que relacione el ACV con el polimorfismo C677T de la MTHFR, por lo cual, este trabajo de investigación constituiría el primer estudio de esta



naturaleza para evaluar la asociación entre la presencia de este factor genético de riesgo a trombosis y el evento clínico de trombosis cerebral.

## VII. Objetivos Generales y Específicos

### OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de anticuerpos antifosfolípidos y/o mutaciones genéticas que predisponen a trombosis en pacientes con enfermedad cerebrovascular

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar la presencia de aFL anti-cardiolipina, anti-ácidofosfatídico, anti-fosfatidilinositol, anti-fosfatidilserina y anti-beta2glicoproteína I (H2GPI) de isotipo IgG e IgM mediante pruebas de ELISA en pacientes con Enfermedad Cerebrovascular (ECV).

Anticuerpos antifosfolípidos y tres marcadores genéticos asociados a la enfermedad cerebrovascular.

Determinar mediante la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y Digestión con Enzimas de Restricción (RFLP) la presencia de los factores genéticos de riesgo: FV Leiden, Protrombina 20210A y el polimorfismo C677T de la Metiltetrahidrofolato reductasa en pacientes con ECV. Evaluar si los anticuerpos antifosfolípidos y/o los factores genéticos están asociados con riesgo trombotico en los eventos cerebrovasculares.

## VIII. Metodología

### TIPO DE ESTUDIO

Este es un estudio analítico, prospectivo y de casos y controles.

### DEFINICIÓN DE CASOS

El grupo de casos fue conformado por pacientes con diagnóstico de ACV isquémico que cumplieron los siguientes criterios de inclusión y de exclusión:

#### ***Criterios de Inclusión***

Pacientes con ACV confirmado por tomografía axial computarizada (TAC) y/o resonancia magnética (RM), sin factores de riesgos tradicionales de enfermedad aterosclerótica, arterioesclerótica y cardioembólica (dislipidemias, hipertensión arterial, diabetes mellitus, tabaquismo, alcoholismo, fibrilación auricular), de 18 a 60 años de edad.

Aceptación de inclusión en el estudio, firmando el consentimiento informado por parte del paciente o un familiar directo.

#### ***Criterios de Exclusión***

Presencia de factores de riesgo tradicionales de enfermedad aterosclerótica, arterioesclerótica y cardioembólica (dislipidemias, hipertensión arterial, diabetes mellitus, tabaquismo, alcoholismo, fibrilación auricular), uso de anticonceptivos e inmunosupresores, pacientes con procesos infecciosos (cardiopatía infecciosa, hepatopatía crónica, HIV), portadores de otras enfermedades autoinmunes como LES, gestantes, drogadictos, post-quirúrgicos y pacientes en reposo prolongado.



## **DEFINICIÓN DE CONTROLES**

El grupo de controles fue conformado por personas sanas con edades de 18 a 60 años de edad, sin historia de ACV precedente, ni eventos tromboticos arteriales o venosos. Fueron donantes de sangre del Hospital Nacional Cayetano Heredia o personas naturales interesadas en participar del estudio, escogidos de forma secuencial.

Agapito D. y col.

## **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

El consentimiento informado fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Instituto Nacional de Salud, Hospital Nacional Cayetano Heredia y Hospital EsSALUD Edgardo Rebagliati Martins.

## **PARTICIPANTES Y LOCALIZACIÓN**

Entre enero del 2005 a Mayo del 2007 fueron captados un total de 33 pacientes con diagnóstico de ACV de causa no determinada, atendidos en el Hospital Nacional Cayetano Heredia y el Hospital EsSALUD Edgardo Rebagliati Martins. Los 92 controles fueron donantes en el Banco de Sangre del Hospital Cayetano Heredia y sujetos sanos que voluntariamente quisieron participar del estudio. La investigación se ejecutó en la Sección de Inmunología – Departamento de Microbiología – Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

## **TOMA DE MUESTRA**

A cada sujeto caso o control se le tomó la muestra de sangre periférica por venipuntura. Para la toma de sangre se usó 2 tipos de tubos vacutainer; uno que contiene solución anticoagulante K3EDTA 15%, 7,0 mL para el proceso de extracción de ADN, y otro tubo vacutainer sin aditivos ni anticoagulante de 5 cc. para las pruebas inmunológicas (Becton Dickinson, Germany) 44.

La muestra de sangre se obtuvo después del infarto cerebral, en el transcurso de una semana en la mayoría de los casos y con un tiempo máximo de 15 de ocurrido el evento (período agudo).

Luego de 20 minutos de reposo, los dos tubos fueron centrifugados por 10 min a 2500 rpm. Los sueros fueron alicuotados y el buffy coat separado inmediatamente. Todo fue almacenado a -20°C hasta su procesamiento.

## **TAMIZAJE DE ANTIFOSFOLIPIDOS**

El suero de cada paciente o control fue procesado para evaluar cuatro tipos de AFL de isotipo IgG e IgM por el método de ELISA, usando un kit de diagnóstico disponible comercialmente (Orgentec® Diagnostika GmbH, Mainz Germany). Se elaboró una curva de calibración empleando los estándares contenidos en el kit por duplicado, y luego se procesaron los sueros de los pacientes o controles siguiendo las indicaciones del productor. En breve, el suero colectado fue agregado en placas de microtitulación que contenían una mezcla altamente purificada de los fosfolípidos cargados negativamente: cardiolipina, fosfatidilserina, ácido fosfatídico y fosfatidilinositol (Anti-Phospholipid Screen Orgentec® Diagnostika). Debido a que los antifosfolípidos requieren H2GPI

como cofactor para la unión, las microplacas estuvieron saturadas con H2GPI. Los calibradores incluidos en el kit contenían concentraciones de AFL en un rango de 0 a 100 U/mL. En cada pozo se adicionó 100  $\mu$ L de cada uno de los calibradores, controles negativo y positivo y las muestras de pacientes previamente diluidas 1:100 en buffer de dilución provisto en el kit. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente (20 a 28°C), las microplacas fueron lavadas tres veces con el buffer de lavado provisto en el kit. Luego se añadió 100  $\mu$ L de conjugado de peroxidasa de rábano picante anti-IgG humano (o anti-IgM humano según corresponda). Después de 15 minutos de incubación los pozos fueron lavados tres veces y se dispensó 100  $\mu$ L de sustrato cromógeno conteniendo TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina). Luego de 15 minutos en la oscuridad se procedió a parar la reacción

Anticuerpos antifosfolípidos y tres marcadores genéticos asociados a la enfermedad cerebrovascular.

adicionando 100  $\mu$ L de solución de ácido clorhídrico 1 M. La densidad óptica de cada muestra fue leída con filtro de lectura de 450 nm y con filtro de referencia de 620 nm con equipo semiautomatizado Brios SEAC ©Radim Diagnostics. Italia.

Después de promediar las densidades ópticas de los calibradores se graficaron las curvas de calibración para IgG e IgM ploteando los datos de cada uno de los calibradores versus la concentración, posteriormente se evaluaron las concentraciones de AFL de las muestras. Los controles de calidad que se realizaron en cada corrida fueron:

- Las densidades ópticas de los estándares usados en la curva de calibración debían ser A <0,150 y F >1,300.
- El rango de los controles positivos (30-50 U/mL) y negativos (<5 U/mL) del kit cumplieron con los límites establecidos en el inserto.
- Todas las muestras se corrieron por duplicado y el error estándar no debía ser mayor al 5%, para dar por válido el resultado.

Tal como indica la compañía manufacturera el sistema de ensayo está calibrado en comparación al suero de referencia de anticardiolipina reconocido internacionalmente por E.N. Harris (Louisville, KY,USA)<sup>45</sup>. Fueron considerados como positivos los sueros con concentraciones a 10 U/mL para los antifosfolípidos con isotipos IgG e IgM. También suelen ser expresados como unidades GPL o MPL (para IgG e IgM respectivamente) correspondiente a 1  $\mu$ g/mL de ACA.

## **ENSAYOS DE CARACTERIZACION DE ANTIFOSFOLIPIDOS**

Cada uno de los sueros que resultaron positivos en el test de tamizaje fueron ensayados por separado usando un ELISA estandarizado diseñado para cuantificar anticuerpos IgG e IgM dirigidos contra cada uno de los fosfolípidos cargados negativamente: cardiolipina, fosfatidilserina, ácido fosfatídico y fosfatidilinositol (Anticardiolipin IgG/IgM, Anti phosphatidylserine IgG/IgM, Anti-phosphatidic acid IgG/IgM and anti phosphatidylinositol IgG/IgM Orgentec® Diagnostika). Las microplacas estaban fijadas con antígenos altamente purificados y saturadas con H2GPI como cofactor para la unión. Siguiendo las pautas del fabricante se realizó el procesamiento de las muestras de manera similar al descrito para los ensayos de screening, pero específico para cada anticuerpo.

## **DETERMINACION CUANTITATIVA DE Anti- $\beta$ 2GPI, IgG e IgM**

Para la medición cuantitativa de anticuerpos contra H2GPI, usamos el kit de ELISA disponible comercialmente llamado Anti-beta2-Glycoprotein I IgG/IgM (Orgentec® Diagnostika GmbH.

Mainz Germany). Los pozos de la microplaca cubiertos con antígenos altamente purificados de H2GPI fueron cargados con los calibradores o estándares por duplicado con el fin de realizar una curva de calibración para IgG e IgM. Los calibradores usados fueron de 0, 6.3, 12.5, 25, 50 y 100 U/ml. Se empleó 100<sup>μ</sup>L de los calibradores, controles y suero diluidos 1:100. La incubación se realizó a temperatura ambiente (20- 28°C) por 30 minutos en la primera fase. Después de realizar 3 lavados con buffer PBS, se agregó 100 <sup>μ</sup>L de conjugado conteniendo policlonal de conejo anti IgG o IgM humano marcado con peroxidasa de rábano picante. Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, se efectuaron 3 lavados y se adicionó 100 <sup>μ</sup>L de sustrato cromógeno TMB. Al finalizar los 15 minutos de incubación en la oscuridad se detuvo la reacción con ácido clorhídrico 1 M. Finalmente se realizó la lectura a 450nm con filtro de referencia de 620nm. Los valores normales fueron b8U/mL y positivos >8U/mL.

Agapito D. y col.

## POLIMORFISMOS GENÉTICOS

### *Extracción de ADN*

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de 7 mL de sangre anticoagulada por el método de "salting out" descrito por Miller y col. <sup>46</sup>. Mediante uso de SDS, Proteinasa K, NaCl y precipitación con etanol absoluto.

### *Detección del Factor V Leiden*

La presencia del factor V Leiden fue determinada por el método de PCR-RFLP. Se realizó la estandarización de las condiciones óptimas y ciclos termales de las reacciones de PCR. El volumen final fue de 30 <sup>μ</sup>L, conteniendo 10 mM de buffer de reacción 1x, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 156 <sup>μ</sup>M de cada dNTP y 1 U de AmpliTaq DNA polimerasa (Gene Amp PCR Core Reagents, Applied Biosystems, New Jersey USA). Los primers descritos por Coen<sup>47</sup> (Integrated DNA Technologies, Inc. Miami USA) se usaron a la concentración de 1<sup>μ</sup>M,. El primer forward fue una secuencia de 5' GGA ACA ACA CCA TGA TCA GAG CA 3' y el primer reverse tuvo una secuencia 5' TAG CCA GGA GAC CTA ACA TGT TC 3'. Se usó 50 a 100ng de ADN genómico.

Las condiciones programadas del PCR en el termociclador (Gene Cyler Termal Cyler Bio-Rad) fueron: denaturación inicial a 94°C por 4 min seguido de 35 ciclos a 94°C por 30s, 61°C por 30s, 72°C por 30s y la extensión final a 72°C por 5 min, las cuales fueron consecuencia de modificaciones de la metodología descrita por Coen y col. El producto amplificado de 287 pb (5-10 <sup>μ</sup>L) fue digerido por 4 horas a 37°C con 5U de la enzima de restricción MnlI (Fermentas UAB, Lithuania) y 2<sup>μ</sup>L de buffer de digestión 1x, de acuerdo a las indicaciones proporcionadas en el inserto. El producto digerido fue separado por electroforesis en gel de agarosa grado biología molecular al 3% (Sigma), teñido con bromuro de etidio y analizados bajo luz UV. Cuando se detectó la presencia de la mutación, la corrida fue confirmada con la repetición del proceso de PCR-RFLP.

En una persona normal se producen fragmentos de 157, 93 y 37 bp. La mutación de guanina (G) a adenina (A) (Posición del nucleótido 1691) en el codón para arginina (Arg<sub>506</sub>) resulta en la pérdida de un sitio de clivaje que produce fragmentos de 157 y 130 pb en individuos homocigotas y bandas de 157, 130, 93 y 37pb en los individuos heterocigotas.

### *Detección de Protombina o Factor II G20210A*

Se analizó mediante PCR-RFLP. La amplificación fue realizada en un volumen de reacción de 30 <sup>μ</sup>L de una mezcla conteniendo: 10 mM de buffer de reacción 1x, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 156<sup>μ</sup>M

de cada dNTP, y 1 U de AmpliTaq polimerasa. Los reactivos fueron provistos en el kit Gene Amp PCR Core Reagents-Applied Biosystems, New Jersey, USA. Se usó 1  $\mu$ M de cada primer, y 50 a 100 ng de ADN genómico. Los primers descritos por Poort et al<sup>5</sup> fueron: 5'-TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC-3' (Forward) y 5'ATA GCA CTG GGA GCA TTG AA\* GC-3' (Reverse), donde el asterisco indica el primer específico para el alelo mutado. Las condiciones de PCR fueron estandarizadas previamente en el laboratorio como se detalla a continuación: denaturación inicial a 94°C por 4 min seguido de 35 ciclos a 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s y la extensión final a 72°C por 5 min. Después de la amplificación se obtuvo un fragmento de 345 pb y 5-10  $\mu$ L del amplificado fue digerido por 4 horas a 37°C con 10 a 15 U de la enzima de restricción Hind III (Sigma-Aldrich, Inc Missouri USA) y 2.5  $\mu$ L de buffer de digestión 1x. El alelo normal carece de sitio de restricción para la Hind III y genera solamente un fragmento de 345 pb. Un nuevo sitio para HindII (-A/AGTC) introducido

Anticuerpos antifosfolípidos y tres marcadores genéticos asociados a la enfermedad cerebrovascular.

Dentro del fragmento amplificado del alelo mutante, produce dos fragmentos de 322 y 23 pb (homocigota). Los individuos heterocigotas exhiben ambos productos de digestión normal y mutado (345, 322 y 23pb). Se uso un control positivo para la mutación factor V y factor II gentilmente donado por la Dra. Desirée Cohen (Croacia).

#### **DetECCIÓN DEL POLIMORFISMO C677T DE LA MTHFR**

La detección de la variante C677T se detectó por PCR-RFLP. El procedimiento de amplificación de PCR fue adaptado del empleado por Ksiafek y col.<sup>48</sup> realizando algunas modificaciones tal como se detalla a continuación: el volumen de reacción de amplificación fue de 30  $\mu$ L consistente de 50 ng de ADN genómico, Buffer de PCR a 1X, 200  $\mu$ M de cada DNTPs, 0.8  $\mu$ M de cada primer y 1U de Taq Polimerasa (Gene Amp PCR Core Reagents-Applied Biosystems, New Jersey, USA). La mezcla de reacción fue colocada al termociclador (Gene Cycler Termal Cycler Bio-Rad) por 4 minutos iniciales a 94°C, seguido por 30 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de alineamiento a 56°C y 2 minutos de extensión a 72°C, con una extensión final de 7 minutos a 72°C. Se obtuvo un fragmento de 198 bp, que fue visualizado en gel de agarosa al 1% en 0.5X TBE mediante tinción con bromuro de etidio.

La secuencia de primers usados para la amplificación, fueron descritos por Frosst y col.<sup>38</sup> siendo el Primer Forward: 5'TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA3' y el primer Reverse: 5'AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG 3', que flanquean la secuencia completa del producto de PCR de 198 pb. El fragmento de ADN obtenido fue digerido con la endonucleasa de restricción Hinf I, a la concentración de 4U por cada 5  $\mu$ L del producto de PCR, 2 $\mu$ L de buffer de digestión 1x y 0.2 $\mu$ L de BSA durante 4 horas a 37°C. El alelo normal carece de sitio de restricción para la Hinf I y genera sólo un fragmento de 198 pb. La presencia de la mutación crea un sitio de restricción para Hinf I, dando dos fragmentos de 175 y 23 pb (homocigotos) y Los individuos heterocigotas exhiben ambos productos de digestión normal y mutado (198, 175 y 23pb). Los fragmentos de ADN fueron separados por electroforesis en agarosa grado biología molecular al 3%(Sigma) y visualizados a luz UV.

#### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el cálculo del N muestral se recurrió a la fórmula habitual para determinar el tamaño muestral mínimo necesario para la comparación de dos proporciones, con un intervalo de confianza de 95%, donde la frecuencia de exposición entre los casos fue del 20% y la frecuencia de exposición entre los controles varió del 2 al 8%, obteniendo un "n" muestral de 16 casos versus 80 controles guardando una proporción casos/control de 1:5.

Los datos fueron analizados mediante la prueba de independencia de chi-cuadrado y Fisher's para detectar asociación entre las variables de estudio y el ACV. El valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

El riesgo relativo de las variables en estudio con la presencia de ACV fue evaluado con Odds ratio. La prueba de regresión logística fue usada para correlacionar el total de las variables (nivel de los anticuerpos, cofactor y polimorfismos genéticos) con el ACV y determinar como influyen en la probabilidad de presentar o no el evento cerebrovascular.

## **IX. Resultados**

El presente estudio es una investigación para la evaluación de nuevos factores de riesgo para el ACV, auspiciado por el Fondo Concursable del Instituto Nacional de Salud.

Agapito D. y col.

(Proyecto de Investigación: 2-04-34-04-056). El protocolo de estudio fue revisado y aprobado por el comité de investigación y ética del Instituto Nacional de Salud y aprobado por los comités de ética de los hospitales participantes y la unidad operativa (Hospital Nacional Cayetano Heredia, Hospital EsSALUD Edgardo Rebagliatti Martins, Universidad Peruana Cayetano Heredia). Ambos grupos de estudio cumplieron con firmar el consentimiento informado o, en los casos que existía trastorno de conciencia o afasia severa, el familiar a cargo firmó el consentimiento.

## **SUJETOS DEL ESTUDIO**

Los casos y controles fueron reclutados desde Enero del 2005 a Mayo del 2007.

Se incluyeron 33 casos, de los cuales 23 fueron mujeres (69,70%) y 10 fueron varones (30,30%). Los pacientes fueron diagnosticados con ACV isquémico y fue basado en resultados de TAC (60,6%), RM (12,1%) o ambos tipos de prueba (27,3%). Para definir la causa de su enfermedad fueron evaluados mediante estudios auxiliares como doppler, angiografía, arteriografía, ecocardiografía, electroencefalografía, electrocardiografía, rayos X de tórax, test de microburbujas, estudio de líquido cefalorraquídeo, estudios de laboratorio para determinar alteraciones en la coagulación (TP, TTP, fibrinógeno), colesterol – HDL – LDL – triglicéridos, proteína C y S (en el 15% de los pacientes), homocisteína sérica (en el 30% de los pacientes), hemograma, serología para VDRL, VIH, hepatitis B y C, glucosa, entre otras pruebas. Ninguno de los pacientes tuvo pruebas serológicas positivas, ni trombocitopenia.

Los controles fueron 92 sujetos sanos (de los cuales 43,48% fueron mujeres y 56,52% fueron varones) conformado por 60 donantes del Banco de Sangre del Hospital Cayetano Heredia, 10 voluntarios sanos captados en la ciudad de Ica y 22 sujetos universitarios de la ciudad de Lima que aceptaron participar del estudio, con similares características al grupo de pacientes y con resultados negativo para VIH, VDRL, HCV, HBV, HTLV y Chagas.

Adicionalmente, se consignaron los datos clínicos de los casos en una ficha elaborada para esta investigación (Anexo II).

La mayoría de pacientes y controles fueron de raza mestiza (90,90% y 95,65% respectivamente). La edad promedio en los casos fue de 37,5 años (DS  $\pm 10,45$ ) y en controles fue de 34,76 años (DS  $\pm 10,25$ ). La edad predominante en los pacientes fue de 40 a 50 años y en los controles de 20 a 40 años. En relación al sexo se observó que las mujeres tienen mayor probabilidad de presentar ACV que los hombres, por cada 2 mujeres se observa 1 hombre,



donde los hombres tienen 0,666 veces menos probabilidad de presentar ACV (nivel de significación 0,010) (Tabla 1).

Tabla 1. Características de edad, sexo, raza de casos y controles

	Casos (n=33)	Controles (n=92)
Edad Media (DS)	37,5 ( $\pm 10,45$ )	34,76 ( $\pm 10,25$ )
Mujeres, %	69,7*	43,5
Hombres, %	30,3	56,5
Raza Mestiza, %	90,90	95,65

DS indica desviación estándar. \*P=0,010

Anticuerpos antifosfolípidos y tres marcadores genéticos asociados a la enfermedad cerebrovascular.

Además, en lo que concierne a los antecedentes personales de los pacientes, el 60,6 % de los casos presentó cefaleas, 30,3% insomnio, 27,3% artralgias, 15,2% ACV previos y 12,1% síncope. Dentro de los casos, el 30,43% de mujeres (7/23) tuvieron antecedentes de abortos. Con respecto a los antecedentes familiares, el 18,1% de los casos refirió tener familiares que sufrieron ACV y el 17,39% de las mujeres (4/23) tuvieron antecedentes familiares de abortos. (Tabla 2).

Tabla 2. Antecedentes personales y familiares de casos con ACV

	Casos (n=33)
<b>Antecedentes personales</b>	
Cefalea %	60.6
Insomnio, %	30.3
Artralgias, %	27.3
ACV previos, %	15.2
Síncope, %	12.1
Abortos, %	30.4
<b>Antecedentes familiares</b>	
ACV, %	18.1
Abortos, %	17.4

## ANTIFOSFOLÍPIDOS

Del grupo de 33 pacientes con ACV de causa no determinada, evaluados en la prueba de tamizaje, el 9,1% (3/33 pacientes) fueron positivos para AFL-IgG. En el grupo control se observó una positividad del 3,3% (3/92 controles) para AFL-IgG. En los controles, los títulos de anticuerpos alcanzaron rangos de 14,5 a 38 U/mL con un promedio global de 26U/mL (ó 26GPL), mientras en los pacientes los títulos fueron de 18,44 a 34,65 U/mL, con una media de 26,5 U/ml (ó 26,5 GPL) (Tabla 3). Ningún caso ni control resultó positivo para AFL IgM.



Tabla 3. Porcentaje de AFL IgG en casos y controles

Grupo de estudio	AFL IgG	Frecuencia	Porcentaje (%)	Rangos AFL U/mL
Control	Negativos	89	96,7	0,50 – 4,68
	Positivos	3	3,3	14,5 - 38,0
	Total	92	100,0	
Casos	Negativos	30	90,9	0,10 – 5,68
	Positivos	3	9,1	18,44 - 34,65
	Total	33	100,0	

Positivo  $\geq 10$  U/mL (ó  $\geq 10$  GPL)

Negativo  $< 10$  U/mL (ó  $< 10$  GPL)

Al realizar la caracterización del tipo de AFL se identificó que las 3 muestras positivas encontradas en los casos presentaron todos los anticuerpos evaluados: anti-ácido fosfatídico (AAF), anti-cardiolipina (ACA), anti-fosfatidilinositol (AFI) y anti-fosfatidilserina (AFS), en rangos de 13-46 U/mL. En los controles se observó que sólo uno de ellos presentó todos los anticuerpos (Tabla 4).

Agapito D. y col.

Tabla 4. Caracterización de antifosfolípidos en casos y controles

Casos / Controles	ACA U/mL	AFS U/mL	AFI U/mL	AAF U/mL
Caso 1	43,0	36,0	33,0	46,0
Caso 2	22,0	11,3	15,0	13,0
Caso 3	13,0	15,0	13,5	14,0
Control 1	13,5	8,0	9,0	27,0
Control 2	31,0	22,0	20,0	50,0
Control 3	8,0	6,3	7,0	25,0

Positivo  $> 10$  u/mL

ACL – Anticardiolipina

AFI – Anti-fosfatidilinositol

AFS – Anti-fosfatidilserina

AAF – Anti-ácido fosfatídico

### ANTI- ?2GPI

Se observaron resultados positivos para anti-H2GPI IgM en 6,1 % de los casos versus 4,3% registrado en los controles (Tabla 5).

Tabla 6. Anti- $\beta$ 2GPI IgG en casos y controles

Grupo de estudio	$\beta$ 2 GPI IgG	Frecuencia	Porcentaje (%)	$\beta$ 2GPI U/mL
Control	Negativos	86	93,5	0,17 - 5,42
	Positivos	6	6,5	35,28 - 100,0
	Total	92	100,0	
Casos	Negativos	29	87,9	0,10 - 4,28
	Positivos	4	12,1	8,89 - 85,0
	Total	33	100,0	

Positivo  $\geq$  8 U/mL

## POLIMORFISMOS GENÉTICOS

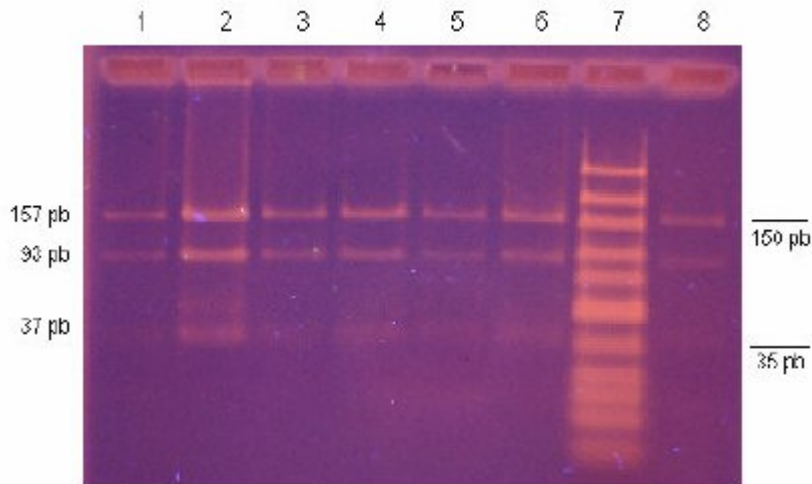
### *Factor V Leiden y Protombina (Factor II) G G20210A*

En el grupo de individuos sanos no se identificó ningún polimorfismo genético para el gen del factor V y el gen de protrombina. En los pacientes, 1/33 (3%) fue homocigota para el factor V Leiden G1691A y ninguno fue de genotipo heterocigoto (Fig 1 y 2). En

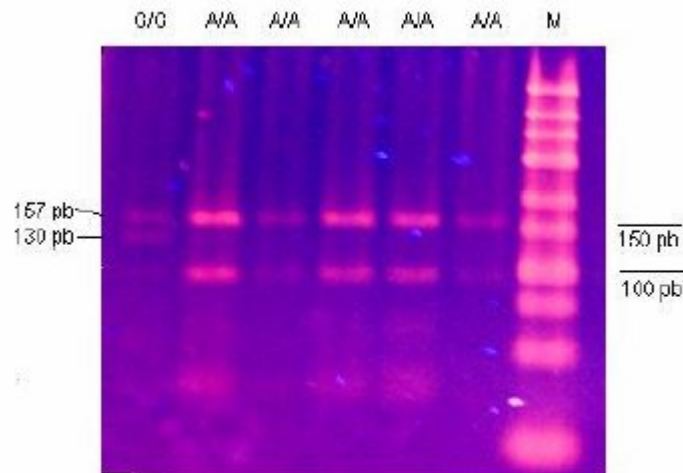
Anticuerpos antifosfolípidos y tres marcadores genéticos asociados a la enfermedad cerebrovascular.

contraste, la heterocigocidad para el polimorfismo del gen de la protrombina G20210A se encontró en 3/33 pacientes (9,1%) y ninguno fue homocigota (Fig 3 y 4).

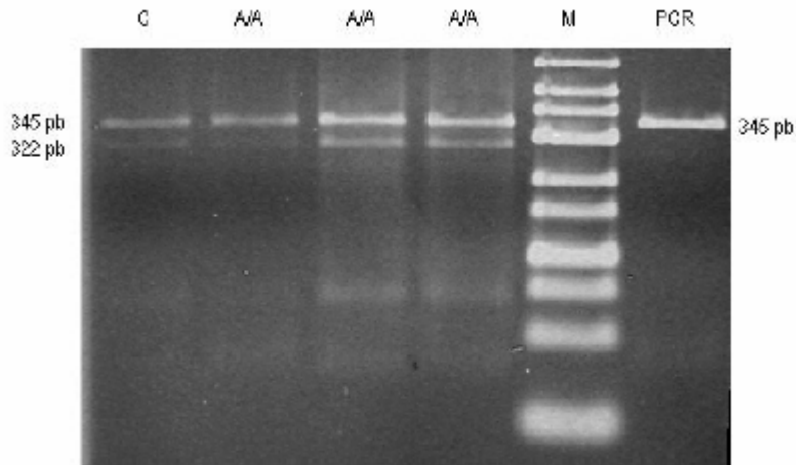
Se observaron resultados ligeramente elevados en fibrinógeno y tiempo de protrombina en los pacientes donde se detectaron los polimorfismos genéticos. Sin embargo, los análisis de proteína C y S fueron normales.



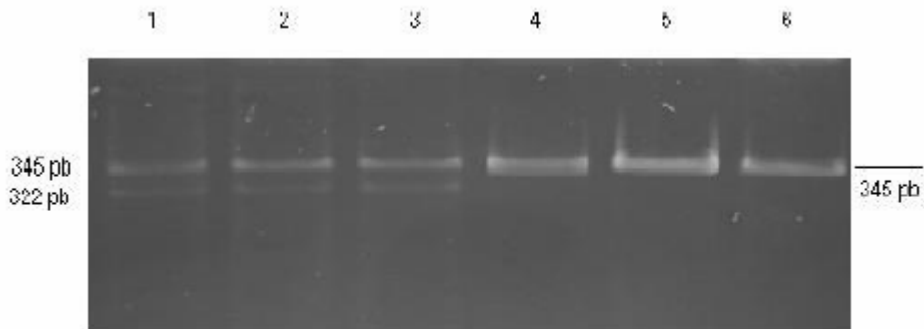
**Fig. 1** Gel de electroforesis del producto de PCR digerido con enzima de restricción Mnl I, mostrando los fragmentos 157, 93 y 37 pb correspondientes al factor V normal A/A (carril 1-6). El carril 7 muestra el marcador molecular (300pb) y el carril 8, el control negativo.



**Fig. 2** Gel de electroforesis del producto de PCR digerido con enzima de restricción Mnl I, mostrando los fragmentos de 157 y 130 correspondientes al factor V Leiden G1691A homocigota G/G (en el primer carril). A continuación se observan controles normales que presentan las bandas 157, 93 y 37 pb y por último el marcador molecular de 700 pb.



**Fig. 3** Gel de electrophoresis del producto de PCR digerido con enzima de restricción Hind III, mostrando los fragmentos de 345 y 322 pb correspondientes al Factor II G20210A heterocigota A/A. C es control heterocigota, A/A muestras de pacientes, M es marcador molecular, PCR Producto de amplificación sin digerir, mostrando un fragmento de 345 pb.



**Fig. 4** Gel de electrophoresis del producto de PCR digerido con enzima de restricción Hind III, mostrando los fragmentos de 345 y 322 pb del polimorfismo Factor II G20210A. El estado heterocigota es observado en los carriles del 1 al 3. El estado homocigota para el alelo normal es observado en los carriles del 4 al 6.

Anticuerpos antifosfolípidos y tres marcadores genéticos asociados a la enfermedad cerebrovascular.

### Polimorfismo C677T de la MTHFR

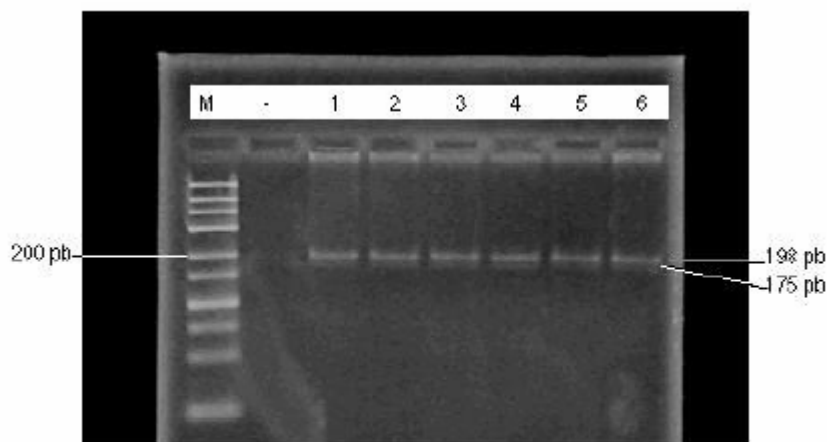
Para determinar si el polimorfismo C677T de la MTHFR está asociado al evento de ACV de tipo isquémico, se comparó las frecuencias genotípicas de 33 pacientes con las de 92 controles. En la tabla 7 se muestra los datos del alelo polimórfico de la MTHFR analizado en este estudio.

**Tabla 7. Alelo polimórfico C677T de la MTHFR**

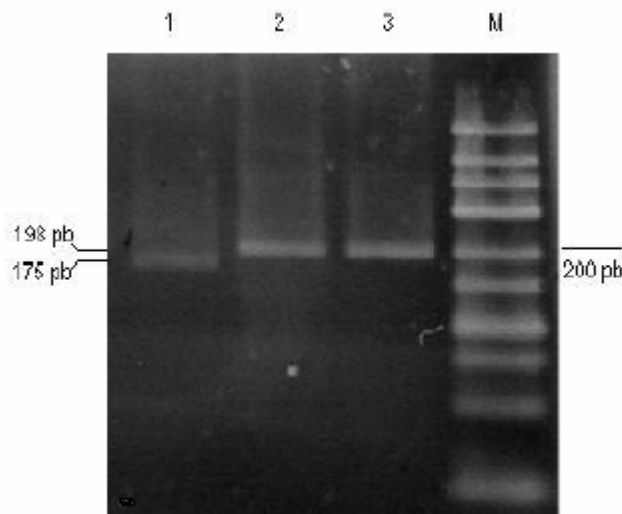
Nombre	Cambio de Nucleótido/aminoácido	Enzima polimórfica	Alelos
Polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR	Cambio de Citosina por Timina en el nucleótido 677 del gen de la enzima MTHFR	Hinf I	Alelo 1 ( C ) = 198pb Alelo 2 ( T ) = 175 y 23 pb

El polimorfismo C677T de la MTHFR denota el cambio del nucleótido citosina a timina en la posición 677 del gen de la MTHFR. El producto de PCR definido por los cebadores utilizados es un fragmento de 198 pares de bases (pb), el cual en presencia de la sustitución es dividido por la acción de la enzima de restricción Hinf I en sendos fragmentos de 175 y 23 pb. El fragmento de 198 pb representa el alelo dominante y el de 175 pb el alelo recesivo, el fragmento de 23 pb es tan pequeño que usualmente no se detecta.

Los individuos homocigotos para el alelo normal (C/C) fueron identificados por la presencia de una banda de 198 pb, los homocigotos para el alelo mutado (T/T) por la de una banda de 175 pb (Fig. 6) y los heterocigotos por la presencia de las dos bandas (198 y 175 pb) (Fig. 5).



**Fig. 5** Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio mostrando productos de PCR correspondientes a un fragmento del gen MTHFR después de la digestión con Hinf I. Del pozo 1 al 6 se muestran alelos mutados heterocigotes (C/T) con fragmentos de 198 y 175 pb.



**Fig. 6** Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio mostrando productos de PCR correspondientes a un fragmento del gen MTHFR después de la digestión con Hinf I. Pozo 1 corresponde al alelo mutado homocigoto (T/T) (175pb), pozos 2 y 3 muestran alelos normales (C/C) con un fragmento de 198 pb.

Se observó variación en la presencia del polimorfismo C677T de la MTHFR, donde en el grupo de los casos el 48,48% fueron pacientes no mutados, el 18,18% heterocigotos y el 33,33% homocigotos para el polimorfismo. En la población de controles, se observó que el 50% fueron sujetos sanos no mutados, el 27,17% heterocigotos y 22,83% homocigotos (Ver Tabla 8).

Un solo paciente que presentaba el alelo mutante homocigoto fue positivo también para homocisteína elevada (valor de 21,5 nmol/mL, rango de normalidad entre 5,0-18,0 nmol/mL) siendo diagnosticado con hiperhomocisteinemia.

**Tabla 8.** Frecuencia y riesgo relativo del polimorfismo C677T MTHFR en casos y controles.

	Polimorfismo C677T de la MTHFR	Paciente con ACV N=33	Controles N=92	Odds Ratio (95% CI)	P
Homocigoto, n(%)	T/T	11 (33,33)	21(22,83)	2,2 (0,7-6,9)	0,396
Heterocigoto, n(%)	C/T	6 (18,18)	25 (27,17)	0,7 (0,2-2,0)	
No mutado, n(%)	C/C	16 (48,48)	46 (50,00)		

Se obtuvo la frecuencia de genotipos y alélica del alelo C677T del gen MTHFR en nuestra población de 125 peruanos: 33 casos y 92 controles. Los valores obtenidos para la variante C677T fueron: Alelo 1 (C) = 0.62, Alelo 2 (T) = 0.38. Ver Tabla 9.



Tabla 9. Frecuencias de genotipos y alélica del polimorfismo C677T MTHFR en casos y controles.

Casos/Controles	N° personas	Frecuencia Genotípica			Frecuencia Alélica*	
		T/T	C/T	C/C	alelo 1 ( C )	alelo 2 ( T )
Casos	33	0,33	0,18	0,49	0,58	0,42
Controles	92	0,23	0,27	0,50	0,64	0,36
Totales	125				0,62	0,38

## VARIABLES DEL ESTUDIO ASOCIADAS CON LA TROMBOSIS EN PACIENTES CON ACV ISQUEMICO

El análisis estadístico utilizado fue la regresión logística, éste método nos sirvió para evaluar la asociación entre la presencia de alguna de las variables estudiadas con el desarrollo del evento trombótico en pacientes con ACV isquémico. Se observó que no existe asociación estadística significativa entre la presencia de las variables en los casos con respecto a los controles. (AFL IgG p=0,179, anti-H2GPI de isotipo IgG e IgM p=0,309, polimorfismos Factor V Leiden G1691A p= 0,264 y C677T de la MTHFR p=0,396).

En referencia al polimorfismo de la protrombina G20210A, destacamos la existencia de asociación entre este desorden genético y la trombosis en pacientes que sufrieron de ACV isquémico (p=0.017). No se pudo determinar si constituye un factor de riesgo adicional para este tipo de evento vascular cerebral por la ausencia de este polimorfismo entre los controles.

Adicionalmente, observamos 6 casos que presentaban resultados positivos para múltiples variables del estudio, destacando entre ellos un paciente de 19 años de edad con 2 polimorfismos genéticos presentes (Factor II G20210A y C677T MTHFR) y antecedente de ACV recurrente; y el caso de una paciente de 34 años de edad con presencia del polimorfismo C677T MTFR y AFL – H2GPI, con antecedentes de ACV y abortos recurrentes (Tabla 10).

Tabla 10. Casos de pacientes con presencia de múltiples variables de estudio

	Edad	Sexo	ACV Previo	Factor II G20210A	MTHFR C677T	AFL IgG	B2GPI IgM	B2GPI IgG
Caso 1	19	M	si	C/T	T/T	-	-	-
Caso 2	18	F	no	C/T	-	Elevado	-	Elevado
Caso 3	20	F	no	-	T/T	-	Elevado	-
Caso 4	34	F	si	-	T/T	Elevado	-	Elevado
Caso 5	56	F	no	-	C/T	-	Elevado	-
Caso 6	30	M	no	-	C/T	-	-	Elevado

Del registro de datos de los 33 casos con diagnóstico de ACV isquémico de causa no determinada, el 96,97% de los pacientes tuvo un infarto cerebral a nivel arterial (25 casos con ACV en la arteria cerebral media (ACM) y 7 casos con ACV en la arteria cerebral posterior (ACP)). Sólo un caso (3,03%) presentó un infarto cerebral del seno venoso.

## X. Discusión

El aumento en la magnitud y gravedad de las ECV, ha sobrepasado todas las expectativas a nivel mundial<sup>49</sup>. La identificación de nuevos factores de riesgo para ACV es importante, la predicción del riesgo y su regulación o modificación es de potencial ayuda para reducir la aparición de futuros eventos. En la mayoría de los casos, los infartos cerebrales afectan a adultos mayores de 60 años, pero también existe un porcentaje importante de adultos jóvenes que desarrollan ACV. Es en ellos donde se debe considerar un diagnóstico diferencial más amplio, porque que en algunos casos a pesar de un buen estudio etiológico del evento no se logra conocer la causa, y se les asigna el diagnóstico de ACV de causa no determinada.

En los últimos años se ha realizado la pesquisa de causas poco frecuentes de ACV como son las trombofilias genéticas (polimorfismos de genes protrombóticos) o adquiridas (AFL). Si bien se consideran de baja incidencia en relación a las otras causas más comunes de ACV, el número de pacientes jóvenes afectados se torna significativo. En nuestro estudio hemos encontrado un 15,2% de casos con ACV recurrentes, en pacientes que fluctúan entre edades de 18 y 50 años.

A nuestro conocimiento, esta es la primera investigación que aborda el tema de la presencia de diversos tipos de AFL y mutaciones genéticas de tipo factor V Leiden, protrombina A20210G y C677T del gen de la MTHFR en pacientes con ACV isquémico de causa no determinada. Esto hace imposible poder compararlo con otros similares en nuestro medio.

Entre los análisis de AFL, las determinaciones de ACL y el AL han sido los más frecuentemente investigados como indicadores de trombosis arterial y venosa. La presencia de éstos en ACV isquémico varía de 1 al 46% y el riesgo de trombosis en personas jóvenes, es ocho veces mayor<sup>50</sup>. Sin embargo, debido al amplio rango de variabilidad en su frecuencia, estudios previos han planteado la interrogante de si estos serían los mejores marcadores de la presencia de trombosis o faltaría indagar el rol que cumplen otros fosfolípidos aniónicos y su asociación clínica con los eventos trombóticos cerebro-vasculares.

En nuestro estudio hemos evaluado la presencia de diversos AFL aniónicos y anti-H2GPI en pacientes con isquemia cerebral arterial o venosa sin causa determinada. A pesar de no haber encontrado correlación estadísticamente significativa entre estas variables de estudio con la trombosis a nivel cerebral, hemos podido detectar la presencia de estos AFL aniónicos y anti-H2GPI IgG aunque en un bajo porcentaje (9,09% de casos con AFL IgG, 12,12% con anti-H2GPI IgG y 9,09% con anti-H2GPI IgM). Creemos que faltarían más estudios que esclarezcan su verdadero rol patogénico. Estos resultados también apoyan el concepto de que los AFL representan un grupo heterogéneo de anticuerpos y que ciertos pacientes pueden presentar todos ellos o sólo algunos en un determinado momento de su enfermedad.

La positividad detectada para anti-H2GPI en todos los pacientes con AFL positivos para IgG en nuestro estudio, sugiere el rol anticoagulante y procoagulante de la H2GPI aún no completamente dilucidado, en la cascada de coagulación. La neutralización del efecto anticoagulante por los anticuerpos anti- H2GPI-AFL conferiría los estados protrómbóticos que caracterizan a los incidentes trombóticos.

La mayor parte de los estudios de prevalencia en la literatura extranjera, muestran asociación significativa con la trombosis Sin embargo, los factores de riesgo ateroscleróticos concurrentes hacen difícil interpretar esta asociación significativa. Además

valdría la pena continuar tales investigaciones para asegurar el riesgo de recurrencia en estos pacientes evaluados. Por otro lado hay que tener en cuenta que los estudios extranjeros en ECV y trombofilias se basan en poblaciones que incluyen pacientes de edad avanzada, de diferente raza y donde los principales factores de riesgo no han sido excluidos, por lo tanto podrían aumentar la posibilidad de presentar ECV.

Los resultados que expone la literatura son controversiales. Mientras que algunos autores si demuestran asociación significativa otros; sugieren interpretar mejor los resultados positivos, habiéndose investigado cierto mimetismo molecular de diversos patógenos con la molécula de H2GPI unida a los fosfolípidos. Es importante también tratar de interpretar mejor los resultados, de acuerdo al tratamiento y a los antecedentes clínicos de los pacientes. Según Bushnell y Goldstein<sup>51</sup>, los falsos positivos o niveles séricos elevados de AFL, suelen darse también en edad avanzada, en partos múltiples, artritis reumatoide e hipergamaglobulinemia. Otra limitante podría ser el espectro de pacientes evaluados, donde la mayoría pacientes tienen SAS o LE y por lo tanto presentan mayor probabilidad de encontrar pacientes con títulos positivos de AFL.

Existe una serie de estudios sobre alteraciones hereditarias (como la deficiencia de antitrombina III, de proteína C y S) que han demostrado una clara asociación entre la presencia de éstas con el aumento de riesgo de presentar trombosis. Sin embargo, los factores de riesgo hereditario como el Factor V Leiden y protrombina G20210A, son más frecuentemente asociados con eventos trombóticos. Nuestro objetivo en este estudio fue evaluar la asociación de estos defectos moleculares en pacientes con trombosis a nivel cerebral sin factores de riesgo tradicionales. Estudios previos muestran mayor prevalencia de estas dos mutaciones en las trombosis venosas que en las arteriales<sup>52</sup>. Lane y col.<sup>53</sup> detectaron el factor V Leiden en el 20% de pacientes jóvenes con trombosis venosa profunda, en el 3% de trombosis arterial y en el 4,2% de caucásicos sanos. Otro estudio realizado en la India, no reporta ninguna de estas dos mutaciones en los controles. Mientras que en los pacientes con trombosis arterial, el factor V fue encontrado en 1/21 (4,7% heterocigoto)<sup>54</sup> La prevalencia para el factor V Leiden es mucho menor en otros grupos étnicos. En Argentina la frecuencia de individuos sanos es de 1,6-3%, en Chile 1,3%, Venezuela 1,6%, Costa Rica 2%, Italia: 2,5% y España 3,7%. Existe la hipótesis que esta mutación se originó en caucásicos de Europa Central y que se ha extendido por migración a otras partes del mundo<sup>55</sup>.

Nosotros en toda nuestra población de estudio, encontramos sólo una paciente de 22 años, portadora del Factor V Leiden de tipo homocigota. Se ha estimado que el incremento de riesgo para trombosis venosa debido al factor V Leiden es de 5-7 veces en portadores heterocigotas y 80 veces para portadores homocigotos de esta mutación<sup>56</sup>. Según Palomo y col.<sup>57</sup> el factor V Leiden no tendría mucha frecuencia en trombosis arteriales a nivel cerebral, pero parece si tener importancia en mujeres jóvenes. A pesar de ello, en este estudio no encontramos correlación entre la presencia de la mutación factor V Leiden G1691A y la trombosis en pacientes con ACV isquémico. Sin embargo, queda la posibilidad de indagar la frecuencia de otras mutaciones del factor V Leiden tales como Cambridge y Hong Kong o tal vez realizar otros estudios a gran escala para realmente asegurar la baja prevalencia del Factor V Leiden en nuestro medio.

Con respecto a la mutación de la protrombina G20120A, nuestros resultados si evidencian una correlación entre la presencia de este polimorfismo y los ACV isquémicos. Los portadores heterocigotas fueron pacientes jóvenes (menores de 41 años), donde se puede resaltar este desorden genético en una paciente mujer de 18 años de edad que además presentó positividad para AFL y H2GPI, corroborando de esta manera que la trombosis es de causa multifactorial en la que intervienen factores genéticos como adquiridos y por lo tanto deberían tomarse en cuenta para ser investigados.

Agapito D. y col.

Las prevalencias reportadas para la mutación de la protrombina G20210A son diversas, mientras algunos autores reportan asociación significativa con el ACV isquémico en menores de 50 años<sup>32</sup>, otros autores no encuentran asociación estadísticamente significativa. Su importancia en las trombosis arteriales aún no está lo suficientemente clara. Algunos autores sugieren que además podría ser un factor de riesgo para infarto agudo del miocardio.

Con respecto al polimorfismo C677T en el gen MTHFR, se conoce que es una causa reconocida de hiperhomocisteinemia moderada. El nivel de homocisteína total en plasma (tHcy) es un factor de riesgo candidato para ACV ya que diversos estudios clínicos indican que al encontrarse niveles elevados se promueve la aterosclerosis y la disfunción endotelial. Muchos estudios epidemiológicos retrospectivos han reportado asociación entre tHcy elevada y ACV mientras que otros estudios epidemiológicos prospectivos no demuestran una asociación, además, la variabilidad preanalítica que afecta a la determinación de homocisteína y la multitud de factores dietéticos que pueden influir en los niveles de esta sustancia hacen probable que la valoración laboratorial más fiable a nivel individual sea el estudio de las mutaciones relacionadas a la hiperhomocisteinemia, entre las cuales destaca por su frecuencia la mutación C677T MTHFR. Surge la interrogante si es necesario buscar líneas de evidencia independientes que soporten la relación entre tHcy y ACV<sup>58, 59</sup>.

En este contexto, la variante génica C677T MTHFR ha sido considerada como un polimorfismo genético candidato ideal para la predisposición a ACV isquémico, es común en muchas poblaciones estudiadas a la fecha y su genotipo correlaciona altamente con el nivel de tHcy en un modelo dosis dependiente. Sin embargo, los estudios epidemiológicos que examinan la asociación entre esta variante y ACV también reportan resultados contradictorios<sup>58,60</sup>.

En nuestra experiencia preliminar se demuestra que no existe asociación estadística significativa ( $p=0.396$ ) entre la presencia del polimorfismo en los casos con respecto a los controles. El riesgo de sufrir un ACV isquémico asociado al genotipo homocigoto T/T del polimorfismo fue de 2,2 (95% IC; 0,7-6,9) mostrando una tendencia positiva de asociación, pero sin alcanzar la significancia estadística.

Nuestros resultados concuerdan con aquellos del metanálisis realizado por Kelly y col. quienes reportaron un Odds Ratio (OR) de 1,23 (95% CI, 0,96 – 1,58;  $p=0,1$ ), demostrando una modesta influencia del genotipo T/T sobre el riesgo de ACV. A pesar de que dicho valor tampoco alcanzó la significancia estadística, resultados similares se han hallado en otros metanálisis que concluyen una asociación del genotipo homocigoto con el desarrollo de enfermedades vasculares<sup>58</sup>.

Sin embargo, existen otros estudios reportados en la literatura extranjera que demuestran asociación estadísticamente significativa, citando entre ellos al metanálisis realizado por Cronin y col.<sup>60</sup> que evaluó 32 estudios retrospectivos de diseño caso-control. Dicho estudio demuestra asociación en un modelo dosis-dependiente, donde el OR estimado en homocigotos T/T fue dos veces mayor que el observado en heterocigotes, sugiriendo una mayor influencia del alelo T sobre el ACV. Sus resultados son consistentes con estudios europeos y asiáticos. Al estratificar la población total dentro de la clasificación de continentes, revelaron que el OR más elevado fue el de Asia, sobrepasando al de Europa y al clasificar por sub-grupos étnicos, los estudios provenientes de Italia y Japón mostraron una asociación significativa, comparado con otras regiones. Se debe considerar que dentro de los estudios evaluados se incluyó solo 2 estudios sudamericanos provenientes de Brasil.

Los autores señalan que se requiere más investigaciones para saber si este hallazgo es debido a las diferencias poblacionales en la frecuencia del alelo T.

Para obtener el mejor resultado, el presente estudio enroló pacientes adultos jóvenes con diagnóstico de ACV isquémico sin factores de riesgo comunes, a diferencia del estudio realizado por Li y col.<sup>61</sup> quienes captaron pacientes con presencia de factores de riesgo como diabetes e hipertensión, encontrando asociación positiva entre el polimorfismo y el ACV isquémico en un tamaño grande de muestras (>1800). Este tipo de estudio es controversial debido a sus limitaciones en la metodología de exclusión, por las interacciones entre el factor de riesgo evaluado y los factores potenciales de stroke.

Por otro lado, el desarrollo de una enfermedad compleja como el ACV puede deberse a interacciones epistáticas de más de un gen predisponente. De nuestros resultados cabe resaltar el caso de un paciente de 19 años de edad con 2 polimorfismos genéticos presentes y antecedente de ACV recurrente (heterocigoto para Factor II G20210A y homocigoto para C677T MTHFR) como ejemplo de participación de múltiples factores de riesgo genéticos en la etiología del ACV.

La frecuencia de genotipos y alelos pueden ser diferentes entre grupos étnicos. La gran variabilidad de poblaciones genéticamente distintas y sus distintos hábitos dietéticos, hacen que las conclusiones acerca de la relación entre C677T MTHFR y ACV sean no aplicables a poblaciones concretas. En este estudio la frecuencia del alelo T (0,38) fue mayor que lo reportado en estudios similares con población de la China (0,22)<sup>61</sup>, India (0,19)<sup>62</sup> o Turquía (0,31)<sup>63</sup>; pero fue menor que en japoneses (0,45), corroborando así las diferencias de la frecuencia del alelo mutante a través de diversas poblaciones étnicas.

A pesar de no haber encontrado asociación estadísticamente significativa con las otras variables de estudio evaluados detectamos que el 60,60% (20/33) de los pacientes con infarto cerebral catalogados como de causa no determinada presentaron mutaciones genéticas tanto para factor V Leiden, la protrombina G2010A y la C677T MTHFR, en comparación al 50% en el grupo control, con estos resultados queremos resaltar ciertos indicios de una probable contribución a la patogénesis de los infartos cerebrales isquémicos.

## **XI. Conclusiones**

Los Anticuerpos antifosfolípidos, los anti-H2GPI y los polimorfismos genéticos Factor V Leiden G1691A y C677T MTHFR no están asociados significativamente al evento trombótico en pacientes con ECV de tipo isquémico.

El polimorfismo genético del factor II de coagulación (protrombina) G20210A se asoció en grado significativo a la trombosis en pacientes con ECV de tipo isquémico, aunque faltarían estudios que determinen su importancia como parte del amplio espectro de factores de riesgo.

La predisposición genética a trombosis (trombofilia) es una condición rara, pero que debería ser seriamente considerada en aquellos pacientes jóvenes, con eventos trombóticos recurrentes o historia familiar positiva de infartos cerebrales sin causa explicable, enfatizando su importancia en el diagnóstico y tratamiento.

## **XII. Recomendaciones**

Recomendamos promover estudios a gran escala, necesarios para conocer la prevalencia de la ECV y sus diferentes tipos en la población peruana. Además creemos que se deben

Agapito D. y col.



continuar las investigaciones en este tipo de trombofilias para conocer la prevalencia en diversas enfermedades trombóticas arteriales y venosas en la población peruana. En lo posible, realizar estudios de trombofilia en pacientes con ACV menores de 40 años, sin factores de riesgo tradicionales y/o con antecedentes protrombóticos personales o familiares, y con un mayor número de muestras que puedan evaluar si constituyen verdaderos factores de riesgo. Debido a la alta frecuencia encontrada del alelo mutante para el polimorfismo C677T de la MTHFR, sería importante realizar un estudio de prevalencia de la mutación en la población general junto a la evaluación de homocisteína total y la medición del estatus de folato, que en conjunto pudieran establecerse como un factor de riesgo adicional de enfermedades ateroscleróticas.

### XIII. Anexos

#### ANEXO I

**Anexo I. Estudios de asociación de los polimorfismos FV G1691A y FII G20210A con ACV**

Referencia	Polimorfismo	Metodología	Resultado
Catto et al. 1995	FV G1691A	Caso-control: 348 casos	Negativo
Forsyth and Dolan 1955	FV G1691A	Caso-control: 45 casos	Negativo
Kontula et al. 1995	FV G1691A	Caso-control: 236 casos	Negativo
Ridker et al. 1995	FV G1691A	Caso-control: 209 casos	Negativo
Albucher et al 1996	FV G1691A	Caso-control: 30 casos	Positivo
Chimowitz et al. 1996	FV G1691A	Caso-control: 53 casos	Positivo
Fisher et al. 1996	FV G1691A	Caso-control: 63 casos	Negativo
Martinelli 1997	FV G1691A	Caso-control: 155 casos	Negativo
Lalouschek et al.1999	FV G1691A	Caso-control: 81 casos	Positivo
De Lucia et al 1997	FV G1691A	Caso-control: 14 casos	Positivo
De Stefano et al 1998	FII G20210A	Caso-control: 72 casos	Positivo
Poort et al. 1996	FII G20210A	Caso-control:104 casos	Negativo
Ridker et al. 1999	FII G20210A	Caso-control: 259 casos	Negativo

Ahamad Hassan and Hugh Markus. Genetics and ischaemic stroke. Brain 2000; 123, 1784-1812.

#### ANEXO II

### FICHA DE RECOLECCION DE DATOS DE PERSONAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO ANTIFOSFOLIPIDOS Y TRES MARCADORES GENETICOS .

Ficha N°: \_\_\_\_\_  
 Nombre : \_\_\_\_\_ Historia Clínica : \_\_\_\_\_  
 Domicilio : \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_  
 Edad : \_\_\_\_\_ años . Sexo : F  M   
 Raza : Blanca  Mestiza  Negra  Amarilla

#### ANTECEDENTES

Diabético : SI NO Roncopatía : SI NO  
 Hipertensión arterial : SI NO Convulsiones: SI NO

Anticuerpos antifosfolipidos y tres marcadores genéticos asociados a la enfermedad cerebrovascular.



Hipercolesterolemia : SI NO Cefalea : SI NO  
Hipertrigliceridemia : SI NO Síncope : SI NO  
Palpitaciones : SI NO Amaurosis : SI NO  
Disnea : SI NO Insomnio : SI NO  
Arritmias : SI NO Somnolencia: SI NO  
Artralgias : SI NO Precordalgia . SI NO  
Abortos espontáneos : SI NO Alopecia : SI NO  
IMA : SI NO Fotosensibilidad: SI NO  
Ulceras orales : SI NO TVP : SI NO  
VDRL reactivo : SI NO  
Toma anticonceptivos: SI NO  
Toma café: SI NO Tazas por día \_\_\_\_\_  
Fuma: SI NO Cigarrillos por día \_\_\_\_\_  
Ingiere alcohol: SI NO Vasos por día \_\_\_\_\_  
Medicinas de Uso frecuente : SI NO Cuales \_\_\_\_\_



**ANTECEDENTES FAMILIARES**

DBM ( ) HTA ( ) Enfermedad Coronaria ( ) Tabaquismo ( )  
Abortos ( ) TEP ( ) TVP ( ) Dislipidemias ( ) Arritmias ( )

**HISTORIA ACTUAL**

Tiempo de enfermedad : \_\_\_\_\_  
Inicio : 1.Súbito ( ) 2.Insidiioso ( ) Curso:1. Agudo ( ) 2.Progresivo ( )  
Cefalea ( ) Convulsiones ( ) Trastorno del sensorio ( )  
Soplos carotídeos ( ) Arritmias ( ) Soplos cardiacos ( ) Glasgow <8 ( )  
Focalización: 1.Si 2. No 3.Tipo \_\_\_\_\_  
Babinsky unilateral ( ) Babinsky bilateral ( ) Hoffman ( )  
Sx Meningeos ( ) Clonus unilateral ( ) Clonus bilateral ( )  
Ataxia ( ) Dismetria ( ) Nistagmus ( )  
Compromisos campos visuales ( ) Fotomotor ( )  
Fondo de ojo: 1.Normal 2.Papiledema 3.Otros \_\_\_\_\_

**EXAMENES**

Rx de tórax.....  
Gases Arteriales.....  
ECO.....  
TAC : 1. Normal 2.Lesión isquémica única 3.Lesión isquémica múltiple  
4.HSA 5. Hemorragia Intraparenquimal 6. Otras.....

**DIAGNOSTICO**

ECV:  Arterio-Venosa  Hemorrágico  
 Arterial Trombótico  Infarto Lacunar  
 Cardioembólico  Venosa

**TERRITORIO VASCULAR:**

1.Carotídeo vaso grande 3.Vertebro-Basilar vaso pequeño  
2. Carotídeo vaso pequeño 4.Vertebro-Basilar vaso grande

Agapito D. y col.

**ANÁLISIS DE LABORATORIO**

Hto _____	Colesterol _____
Leucocitos _____	Triglicéridos _____
TTP _____	HDL-C _____
A:ùpico _____	LDL-C _____
Dimero D _____	VDRL _____
Plaquetas _____	Ac. Úrico _____
Otros _____	Otros _____

Análisis efectuados en la investigación

**Antifosfolípidos-ELISA**

ACL-G \_\_\_\_\_ ACL-M \_\_\_\_\_  
AFS-G \_\_\_\_\_ AFS-M \_\_\_\_\_  
AFI-G \_\_\_\_\_ AFI-M \_\_\_\_\_  
AAF-G \_\_\_\_\_ AAF-M \_\_\_\_\_  
β2GPI-G \_\_\_\_\_ β2GPI-M \_\_\_\_\_

**Factores Genéticos**

Factor V Leiden \_\_\_\_\_  
FactorII 20210 \_\_\_\_\_  
MTHFR \_\_\_\_\_

**XIV. Referencias Bibliográficas**

- 1 Deza L, Aldave R, Barrera J. Historia natural de la enfermedad vascular cerebral en el Perú. Rev neuropsiquiatr 2001; 64:105-32
- 2 Barinagarrementeria F, Gonzales Duarte, Cantel Brito C. Estados protrombóticos e isquemia cerebral. Rev Neurol 1996; (149):85-91
- 3 Pasquale M. and et al Hyperhomocysteinemia and other inherited Prothrombotic conditions in young adults with history of ischemic stroke. Stroke 2002;33:51-56
- 4 Bertina R M, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, De Ronde H, et al. Mutation en blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature 1994; 369: 64-7.
- 5 Poort SR, Rosendaal FR, Reistma PH. Ber Poort SR, Rosendaal FR, Reistma PH. Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and increase in venous thrombosis. Blood 1996; 88: 3698-703
- 6 Fields M. and Levine S. Trombophilias and stroke: Diagnosis, treatment, and prognosis. Journal of thrombosis and Thrombolysis 20(2), 113-126, 2005.
- 7 Mandel H, Brenner B, Berant M, Rosenberg N, Lanir N, Jacobs C, et al. Coexistence of hereditary homocystinuria and factor V Leiden-effect on thrombosis. N Engl J Med 1996; 334: 763-8
- 8 Aurazo G, Hidalgo M. Tendencias de mortalidad por accidente cerebrovascular en el Hospital Belén de Trujillo. 1995-2004. Esculapio.2005; 3(1):11-19.
- 9 Jaillard AS, Hommel M, Mazetti P. Prevalence of stroke at high altitude (3380m) in Cuzco, a town of Perú: a population-based study. Stroke. 1995;26:562-568.
- 10 Saponisk G. and Del Brutto O. Stroke in South America: A systematic Review of Incidence, Prevalence, and Stroke Suptypes. Stroke 2003;34:2103-2107

Anticuerpos antifosfolípidos y tres marcadores genéticos asociados a la enfermedad cerebrovascular.

- 11 Smith W, Hauser S, Easton JD. Cerebrovascular Disease. En: Kasper D. et al. Harrison: Principios de Medicina Interna. México, McGraw-Hill Interamericana;2003.p.2369-2385
- 12 Aldave R, Deza L, Vera J. Infarto cerebral aterotrombótico. Revista de Neuro-Psiquiatría. 64:432-461.2001.
- 13 Deza L, Aldave R, Barrera J. Características clínicas de los subtipos de enfermedad vascular cerebral isquémica. Estudio en 1156 pacientes. Revista de Neuro-Psiquiatría.2000; 63:19-36.
- 14 Sas\_a C, Borut B. Cerebrovascular manifestation in antiphospholipid syndrome. Biochemia medica god 2001; 11:3-4.
- 15 Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J. The primary antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. Medicine (Baltimore). 1989; 68:366-74.
- 16 Wahl DG, Guillemin F, De Maistre E, et al. Meta-analysis of the risk of venous thrombosis in individuals with antiphospholipid antibodies without underlying autoimmune disease or previous thrombosis. Lupus. 1998; 7:15-22.
- 17 Finazzi G. The Italian registry of antiphospholipid antibodies.Haematologica. 1997; 82:101-5.
- 18 Vila P, Hernandez MC, López-Fernández MF, Batlle J. Prevalence, follow-up and clinical significance of the anticardiolipin antibodies and normal subjects.Thromb Haemost. 1994; 72:209-13.
- 19 Levine SR, Brey RL, Sawaya KL, et al. Recurrent stroke and thrombo-occlusive events in the antiphospholipid syndrome. Ann Neurol. 1995; 38:119-24.
- 20 Blank M, Cohen J, Toder V, Shoenfeld Y. Induction of antiphospholipid syndrome in naïve mice with mouse lupus monoclonal and human polyclonal anti-cardiolipin antibodies. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88 (8):3069-73
- 21 Rand JH. Antiphospholipid antibody syndrome: new insights on thrombogenic mechanisms. Am J Med Sci . 1988; 316:142-51.
- 22 Meroni PL, Raschi E, Camera M, et al. Endothelial activation by aPL: a potential pathogenetic mechanism for the clinical manifestation of the syndrome. J Autoimmun. 2000; 15:237-40.
- 23 Del Papa N, Raíz E, Catelli L et al. Endothelial cells as a target for antiphospholipid antibodies: role of antibeta 2 glicoprotein I antibodies. Am J Reprod Immunol.1997;38:212-7.
- 24 Cuadrado MJ, Lopez-Pedreira C, Khamashta MA, et al. Thrombosis in primary antiphospholipid, a pivotal rol for monocyte tissue factor expression. Arthritis Rheuma. 1997; 40:834-41.
- 25 Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, Machin SJ. Platelet activation markers and the primary antiphospholipid syndrome (PAPS). Lupus. 1998; 7(2): 48-51.
- 26 Red alergia de la AAAeIC. Anticuerpos antifosfolípidos. [Enero 2002 Disponible en URL: <http://www.redalergia.com.ar/profesionales/contenidos/bibliodi/trabajos/fofolipidos.htm> ]
- 27 Brey RL, Stallworth CL, McGlasson DL, et al. Antiphospholipid Antibodies and Stroke in Young Women. Stroke. 2002; 33:2396-2401.

Agapito D. y col.

- 28 Gonzales-Portillo F, Mc Intyre J, Wagenknecht D, Williams L, Bruno A and Biller J. Spectrum of antiphospholipid antibodies (aPL) in patients with cerebrovascular disease. *J Stroke Cerebrov Dis.* 2001; 10:222-226.
- 29 Nicolaes GA and Dahlback B. Factor V and thrombotic Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:530-538.
- 30 Gómez S, Lozano FS, Alberca I, López M, Gómez A. Trombofilias y trombosis venosa profunda. *Mapfre Medicina.* 2002; 13(1).750-755.
- 31 De Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni K et al. Prothrombin G20210A Mutant Genotype Is a Risk Factor for Cerebrovasculare Ischemic Disease in Young Patients. *Blood.* 1988; 91(10) 3562-3565.
- 32 Hassan A and Markus H. Genetics and ischaemic stroke. *Brain.* 2000;123:1784-1812.
- 33 Seligsohn U and Lubetsky A. Genetic Susceptibility to venous trombosis. *N Engl J Med.* 2001; 344(16):1222-31.
- 34 Tapia J. Enfermedad Cerebrovascular y trombofilia. *Rev. Chil. Neuro-psiquiatr.* 2002; 40(2):37-46.
- 35 Fields M. and Levine S. Trombophilias and stroke: Diagnosis, treatment, and prognosis. *J Thrombosis and Thrombolysis.* 2005; 20(2):113-126.
- 36 Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase; MTHFR. John Hopkins University. [Junio 2007]. Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=607093> .
- 37 Botto L., Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene variants and congenital anomalies. *HuGE Review.* [junio 2007]. Disponible en URL: <http://www.cdc.gov/genomics/hugenet/reviews/MTHFR.htm> .
- 38 Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG et al. Candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics.* 1995; 10:111-113.
- 39 Gematti D, Serino M, Trivellato C, Fiorini S, Scapoli G. C677T substitution in the methylenetetrahydrofolate reductase gene as a risk factor for venous thrombosis and arterial disease in selected patients. *Haematologica.* 1999; 84:824-828.
- 40 Szolnoki Z, Somogyván F, Szólics M, Szabó M, Fodor L. Common genetic mutations as possible aetiological factor in stroke. *Eur Neurol.* 2001; 45:119-120.
- 41 Salooja N, Catto A, Carter A, Tudenham E and Grant P. Methylene tetrahydrofolate reductase C677T genotype and stroke. *Clin Lab Haematol.* 1998; 20(6): 357-61.
- 42 Topic E, Timundic AM, Ttefanovic M, Demarin V, Vukovic V, Lovrencic-Huzjan A et al. Polymorphism of apoprotein E(APOE), methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and paraoxonase (PON1) genes in patients with cerebrovascular disease. *Clin Chem Lab Med.* 2001; 39(4): 346-50.
- 43 Kim RJ and Becker RC. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a metaanalysis of published studies. *Am Heart J.* 2003; 146(6):948-57.

Anticuerpos antifosfolípidos y tres marcadores genéticos asociados a la enfermedad cerebrovascular.

- 44 BD Worldwide Company. Product Catalog. Venous Blood Collection Tubes. Product Number: 367665. [Mayo 2007]. Disponible en URL: <http://catalog.bd.com/bdCat/viewProduct.doCustomer?productNumber=367665> .
- 45 Harris, EN et al. Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international Workshop held 4 April 1986. *Clin.Exp.Immunol.* 1987; 68:215-222.
- 46 Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research.* 1988; 16(3):1215.
- 47 Coen D, Zadro R, Honovic, Banfic L, Stavljenic A. Prevalence and Association of the Factor V Leiden and Prothrombin G20210A in Healthy Subjects and Patients with Venous Thromboembolism. *Croatian Medical J.* 2001; 41(4): 488-492.
- 48 Ksiafek P, Bednarek-Skublewsk A, Buraczynska M. The C677T methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation and nephropathy in type 2 diabetes mellitus. *Med Sci Monit.* 2004; 10(2): 47-51.
- 49 Burneo de las Casas Jorge. Ataques Cerebrovasculares isquémicos en Pacientes Jóvenes. Reporte de casos y revisión de literatura. *Rev Med Hered.* 1999; 10(4).
- 50 Brey RI, Hart RG, Sherman DG, et al. Antiphospholipid antibodies and cerebral ischemia in young people. *Neurology.* 1990; 40: 1190-6.
- 51 Bushnell CH and Goldstein L. Diagnostic testing for coagulopathies in Patients with Ischemic Stroke. *Stroke.* 2003; 31; 3067-3078.
- 52 Ghosh K, Shetty S, Madkaikar M, Pawar A, Nair S, Khare A, et al. Venous thrombopembolism in young patients from Western India: a study. *Clin Appl. Thromb/Haemost.* 200; 7(2):158-65.
- 53 Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM et al. Inherited Thrombophilia. Pt1 and Pt2. *Thromb Haemost* 1996; 76:651-652 & 824-34.
- 54 Ahmed RP, Gupta Pk, kannan M, Chouldhry V, Saxena R. Factor V Leiden-the commonest molecular defect in arterial and venous thrombophilia in India. *Thrombosis Research.* 2003; 110:19-21.
- 55 Herman FH, Koesling M, Schroder W et al. Prevalence of factor V Leiden mutation in various populations. *Genet Epidemiol.* 1997; 14: 403-411.
- 56 Nicolaes GA and Dahlback B. Factor V and thrombotic Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:530-538.
- 57 Palomo G, Pereira G, Alarcón M et al. Factor V Leiden y mutación de la protrombina G20210A en pacientes con trombosis arterial. *Rev. Med Chile.* 2005; 133:1425-1433.
- 58 Kelly P, Rosand J, Kistler J, Shih V, Silveira S, Plomaritoglou A et al. Homocysteina, MTHFR 677 T-C polymorphism, and risk of ischemic stroke. Results of a metaanalysis. *Neurology.* 2002; 59:529-536.
- 59 Brattström L, Wilcken D, Öhrvik J, Brudin L. Common Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Mutation Leads to Hyperhomocysteinemia but Not to Vascular Disease : The Result of a Meta-Analysis. *Circulation.* 1998; 98:2520-2526.
- 60 Cronin S, Furie K, Kelly P. Dose-related association of MTHFR 677T allele with risk of ischemic stroke. Evidence from a cumulative meta-analysis. *Stroke.* 2005; 36:1581.

Agapito D. y col.

- <sup>61</sup> Li Z, Sun L, Zhang H, Liao Y, Wang D, Zhao B et al. Elevated Plasma Homocysteine Was Associated With Hemorrhagic and Ischemic Stroke, but Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene C677T Polymorphism Was a Risk Factor for Thrombotic Stroke. A Multicenter Case-Control. Study in China. *Stroke*. 2003; 34:2085-2090.
- <sup>62</sup> Panigrahi I, Chatterjee T, Biswas A, Behari M, Choudhry P, Saxena R. Role of MTHFR C677T polymorphism in ischemic stroke. *Neurology India*. 2006; 54(1): 48.
- <sup>63</sup> Fahri UC, Sonmez M, Ovalý E, O" Zmenogj M, Kartý S, Yýlmaz M et al. MTHFR C677T Polymorphism and Its Relation to Ischemic Stroke in the Black Sea Turkish Population. *Am J of Hematology*. 2004; 76:40-43.