

REVISIÓN

Influencia de la mutación C677T del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa en la enfermedad tromboembólica venosa

J.R. González-Porras^{a,*}, E. Pérez-López^a, I. Alberca^a y F.S. Lozano^b

^aServicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España

^bServicio de Cirugía Vasculat, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España

Recibido el 4 de agosto de 2010; aceptado el 30 de noviembre de 2010

PALABRAS CLAVE

Enfermedad tromboembólica venosa;
C677T MTHFR;
Trombofilia

KEYWORDS

Venous thromboembolism;
C677T methylenetetrahydrofolate reductase;
Thrombophilia

Resumen

La enfermedad tromboembólica venosa (ETV) es considerada como una enfermedad multifactorial. Es necesaria la presencia de factores genéticos, que predisponen al individuo a la trombosis, y factores ambientales, que desencadenan la trombosis (interacción gen-ambiente). En los últimos años se han descrito numerosos polimorfismos asociados con un mayor o menor riesgo a padecer una enfermedad trombótica en sus distintas variantes. Una de estas mutaciones de interés es la C677T del gen metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), que consiste en la sustitución de una citosina por una timina en el nucleótido 677. Este cambio de aminoácido genera una variante de MTHFR termolábil con capacidad reducida para metabolizar la homocisteína, pudiendo aparecer una hiperhomocisteinemia leve-moderada, factor de riesgo conocido en la ETV. Por tanto, C677T MTHFR podría predisponer a la aparición y recurrencia de la ETV. Este artículo pretende analizar el papel concreto desempeñado por este polimorfismo en la ETV, así como su aplicabilidad clínica.

© 2010 SEACV. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Influence of the C677T mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene in venous thromboembolic disease

Abstract

Venous thromboembolism (VTE) is a multifactorial disease in which both environmental and genetic factors are involved. The presence of mutations in genes coding for haemostatic, fibrinolytic and, also, inflammatory proteins is associated with an increased risk of first episode and recurrence of venous thrombosis. So, in the last years, several polymorphisms associated

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jrpg@usal.es (J.R. González-Porras).

with thrombosis have been reported. Recently, the 677C > T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene (a C > T substitution at base pair 677 leading to the exchange of alanine to valine) has been proposed by some studies to be a thrombophilic risk factor. This mutation causes moderate hyper-Hcy, and Hyper-Hcy is well known to cause VTE. We analysed the role of C677T MTHFR in VTE, as well as its clinical applicability.

© 2010 SEACV. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

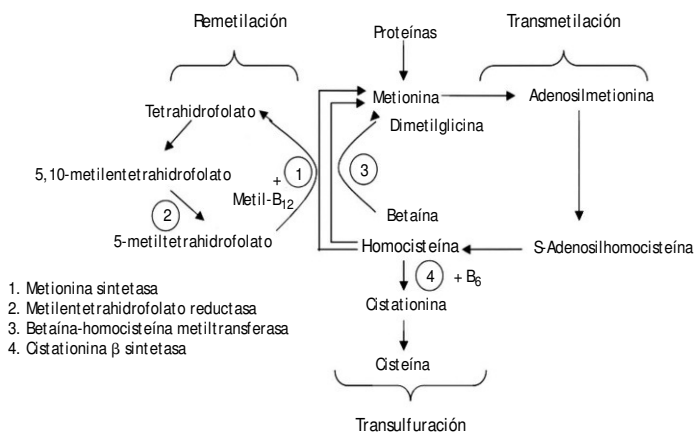
Introducción

La enfermedad tromboembólica venosa (ETV) es una patología frecuente y grave que constituye una de las principales causas de morbimortalidad en el mundo occidental¹. La incidencia anual de la trombosis venosa se estima en 1 de cada 1.000 personas en países desarrollados². No obstante, la incidencia se incrementa notablemente con la edad; de 1 por 100.000 personas año en la infancia a 1% en ancianos³. Esta enfermedad se manifiesta habitualmente como trombosis venosa profunda (TVP) de las extremidades inferiores o como embolismo pulmonar. Menos frecuentemente, la trombosis ocurre en otras localizaciones (senos cerebrales, venas de los brazos, retina, mesenterio, etc.).

La ETV es considerada como una enfermedad multifactorial. Es necesaria la presencia de factores genéticos, que predisponen al individuo a la trombosis, y factores ambientales, que desencadenan la trombosis (interacción gen-ambiente). La importancia de los factores genéticos en el riesgo de aparición de la ETV queda reflejada por la elevada presencia de un componente familiar en dichos casos. De tal modo, en los últimos años se ha observado un interés creciente en la definición de la influencia genética en la enfermedad trombótica para un mejor conocimiento de la fisiopatología y el desarrollo de estrategias terapéuticas y profilácticas.

El hecho de que la trombosis pudiera ser un rasgo hereditario no se reconoció hasta 1965, año en el que se describe el déficit de antitrombina⁴. Posteriormente, se describieron el déficit de proteína C⁵ en 1981, el déficit de proteína S en 1984⁶, la mutación factor V Leiden en 1994⁷ y la mutación G20210A del gen de la protrombina en 1996⁸.

En 1995 Frost et al⁹ describieron un nuevo gen candidato para el riesgo trombótico, la mutación C677T del gen de la 5, 10-metil-tetrahidrofolato reductasa (C677T MTHFR). Esta mutación sería responsable de una hiperhomocisteinemia leve-moderada, factor de riesgo establecido para la trombosis, tanto arterial como venosa.



1. Metionina sintetasa
2. Metil-tetrahidrofolato reductasa
3. Betaina-homocisteína metiltransferasa
4. Cistationina β sintetasa

Figura 1 Metabolismo intracelular de la homocisteína. Remetilación: la homocisteína se metila para formar metionina mediante dos rutas metabólicas independientes. Una de ellas es catalizada por la metionina sintetasa, que requiere al 5-metil-tetrahidrofolato como donante de grupos metilo y la vitamina B₁₂ como cofactor. Así, el 5-metil-tetrahidrofolato es convertido en tetrahidrofolato por la 5, 10-metil-tetrahidrofolato reductasa, entrando en el ciclo de los folatos para formar de nuevo 5-metil-tetrahidrofolato. Transulfuración: si hay un exceso de metionina o se precisa sintetizar cisteína, la homocisteína entra en la vía de la transulfuración uniéndose a un residuo de serina para formar cistationina catalizado por la cistationina-β-sintetasa que requiere vitamina B₆ como cofactor. La cistationina es hidrolizada posteriormente a cisteína, que se puede incorporar al glutatión o bien sufrir nuevas reacciones metabólicas hasta que el sulfato se excreta por la orina.

Fuente: De Stefano et al¹⁰.

Objetivos

C677T MTHFR podría predisponer a la aparición y recurrencia de la ETV. Sin embargo, el papel concreto desempeñado por este polimorfismo en la ETV y su aplicabilidad práctica es muy discutido. Pretendemos revisar la prevalencia de la mutación C677T del gen de la metil-tetrahidrofolato reductasa en diferentes zonas geográficas y su influencia en el desarrollo de la ETV.

Desarrollo

Mutación C677T del gen de la metil-tetrahidrofolato reductasa

La 5, 10-MTHFR es una enzima que interviene en el metabolismo de la homocisteína, aminoácido sulfurado producto intermedio del metabolismo de la metionina, que a su vez procede de las proteínas de la dieta. La homocisteína se metaboliza por dos vías posibles: remetilación o transulfuración (fig. 1).

Desde hace más de 40 años se sabe que la hiperhomocisteinemia grave se asocia a arterioesclerosis y trombosis arterial prematura, pero no ha sido hasta hace unos años

cuando la hiperhomocisteinemia leve-moderada se describe como factor de riesgo independiente de aterosclerosis y trombosis¹¹. A principios de la década de los sesenta, se comunica la presencia de homocisteína en la orina de pacientes con retraso mental y trombosis arterial prematura^{12,13}. Años más tarde, se demuestra que la enzima cistationina-β-sintetasa era deficiente en estos pacientes y que los trastornos tromboembólicos eran muy frecuentes (homocistinuria clásica tipo I)¹⁴. A finales de los sesenta, se concluye que los trastornos vasculares en este tipo de pacientes estaban asociados a los niveles elevados de homocisteína¹⁵. Posteriormente, se describe la homocistinuria por déficit de MTHFR (homocistinuria clásica tipo II)¹⁶.

Las alteraciones genéticas asociadas con hiperhomocisteinemia leve (16-24 mmol/l) o moderada (25-100 mmol/l) se describen más tarde, en la década de los noventa, fundamentalmente, la mutación C677T o variante termolábil de la MTHFR y el déficit heterocigoto de cistationina-β-sintetasa. La primera de ellas constituye la forma genética más común de hiperhomocisteinemia leve-moderada.

Como se observa en la tabla 1, la hiperhomocisteinemia no solo puede deberse a defectos genéticos en el metabolismo de la homocisteína, sino también a causas adquiridas. La causa adquirida más común es la carencia de folatos, piridoxina o cobalamina.

El gen de la MTHFR se localiza en el cromosoma 1p36.2 y la mutación C677T descrita por Frost⁹ consiste en la sustitución de una citosina por una timina en el nucleótido 677. Tal mutación origina la sustitución de una alanina por una valina en la posición 223 (fig. 2).

Este cambio de aminoácido genera una variante de MTHFR termolábil, caracterizada por una reducción del 50% de su actividad a 37°C, en comparación con la variante normal. En consecuencia, se reduce la capacidad del metabolismo de la homocisteína y puede aparecer una hiperhomocisteinemia leve-moderada, sobre todo cuando la mutación se encuentra en homocigosis, y especialmente si se asocian bajas concentraciones séricas de folatos.

Los mecanismos por los cuales la hiperhomocisteinemia actúa como aterogénica y trombogénica son parcialmente conocidos: a) incremento en la proliferación de las células musculares e inhibición de la síntesis de ADN endoteliales^{17,18}; b) aumento de la respuesta vasomotora y reducción de la expresión de la trombosmodulina¹⁹; c) aumento de la expresión de factor tisular²⁰; d) inhibición de la expresión de heparan-sulfato²¹; e) disminución de la liberación de óxido nítrico²² y prostacilinas²³, y f) reducción de la unión del activador tisular del plasminógeno a su receptor endotelial²⁴.

Por tanto, la variante termolábil de la MTHFR (mutación C677T) ocasiona una hiperhomocisteinemia leve-moderada, que a su vez ha sido relacionada con la ETV²⁵. Con estos datos se ha sugerido que la variante genética C677T MTHFR y la ETV podrían estar relacionadas.

Prevalencia general de C677T MTHFR

La mutación C677T MTHFR es un hallazgo frecuente en la población caucásica, encontrándose hasta en el 38% de los sujetos no seleccionados²⁶, pero es poco frecuente en raza negra, nativos de América del Sur y aborígenes de Oceanía. En el área geográfica de Salamanca la prevalencia es del

52% y la frecuencia alélica del 31% cifras similares a las del resto de España y Europa (tabla 2).

C677T MTHFR y riesgo de trombosis venosa

Aunque la presencia del alelo T del polimorfismo C677T de la MTHFR se asocia con unos niveles más altos de homocisteína, tanto en la población sana como en la población con ETV, no existe una asociación sólida entre este polimorfismo y la ETV. Inicialmente, esta mutación fue asociada con un riesgo aumentado de ETV^{39,40}. Sin embargo, no hubo confirmación en estudios posteriores^{41,42}.

Bajo nuestra experiencia no existe asociación entre C677T MTHFR y ETV. En una muestra de 300 pacientes consecutivos con un primer episodio de ETV comparada con 300 controles sanos pareados uno a uno según edad (± 2 años) y sexo, comprobamos que la distribución de los diferentes genotipos del polimorfismo C677T del gen MTHFR y la frecuencia alélica T fue similar en ambas poblaciones, pacientes y control (*odds ratio* [OR] = 1,0, intervalo de confianza [IC] 95% 0,7-1,5) (tabla 3).

Nuestros resultados concuerdan con aquellos procedentes de dos metaanálisis de 65 estudios^{41,42} que incluyeron en total 21.882 pacientes con trombosis y 26.664 controles. Ninguno de los dos estudios demostró una asociación

Tabla 1 Principales causas de hiperhomocisteinemia

Congénitas

Déficit de cistationina-β-sintetasa (homocistinuria congénita clásica tipo I)
Deficiencia de MTHFR (homocistinuria congénita clásica tipo II)
Variante termolábil de MTHFR

Adquiridas

Envejecimiento
Déficit nutricional de folatos, cobalamina y/o piridoxina
Insuficiencia renal crónica
Hipotiroidismo
Anemia perniciosa
Neoplasias
Tóxicos (tabaco)
Fármacos
Antifolatos: metotrexato, fenotiacinas, antidepresivos tricíclicos, trimetropin
Anticobalamina: óxido nítrico
Antipiridoxina: azabrina, isoniacida, carbamacepina, teofilina, cicloserina

MTHFR: 5, 10-metilentetrahidrofolato reductasa.

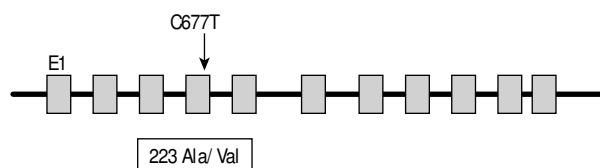


Figura 2 Polimorfismo C677T del gen metilentetrahidrofolato reductasa.

Tabla 2 Prevalencia del polimorfismo C677T del 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa en varios países del mundo

Región	N	Heterocigotos		Homocigotos		Prevalencia	Frecuencia alélica
		N	%	N	%		
Europa							
Grecia ²⁷	160	87	54,4	13	8,1	62,5	35,3
Francia ²⁸	133	70	53,3	13	10	62	36,1
Suecia ²⁹	220	84	38,2	22	10	48,1	29,9
Italia ³⁰	1.210	620	51,2	252	20,8	72	46
España							
Zaragoza ³¹	159	80	50	24	15	65,8	40,2
Valencia ³²	716	374	52,2	113	15,8	68	41,9
Salamanca	300	123	41	33	11	52	31
América							
Brasil Amazonas ²⁶	100	10	20	1	2	11	6
EE.UU. ^{33,34}							
Judíos Asquenazí	155	66	42,6	41	26,5	69,1	47,7
Caucasianos	187	65	32,5	25	12,5	48	30,7
Hispanos	100	26	52	5	10	62	36
Afroamericanos	526	89	16	8	1,5	19	10
África							
Zaire/ Camerún ²⁶	134	7	10,4	0	0	10,4	5,2
Asia							
Jordania ³⁵	200	32	16	16	8	24	16
China ³⁶	1.832	824	45	398	21,7	66	44,2
Japón ³⁷	778	360	46,4	79	10,2	56,7	33,2
Oceanía							
Australia ³⁸	225	113	50,2	24	10,7	60,8	36

Tabla 3 Distribución de los genotipos y frecuencia alélica del polimorfismo C677T en la población ETV y su grupo control

	ETV, n = 300	Controles, n = 300	OR: IC 95% p univariante	OR: IC 95% p multivariante
677T MTHFR				
CC (n)	147	142		
CT (n)	119	123		
TT (n)	34	33		
Prevalencia	51	52		
Frecuencia alélica T	31,1	31	OR: 1 (0,7-1,5); p = 0,44	ns

ETV: individuos consecutivos no seleccionados diagnosticados de un episodio de enfermedad tromboembólica venosa (trombosis venosa profunda de extremidades y/o embolismo pulmonar) por medios objetivos (eco-doppler, gammagrafía ventilación/perfusión o angio-tomografía computarizada).

Población control: personas sanas que carecían de historia personal de enfermedad trombótica, donantes de sangre de Salamanca. IC: intervalo de confianza; MTHFR: 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa; ns: no significativo; OR: *odds ratio*.

estadísticamente significativa entre homocigotos TT 677 MTHFR y ETV (OR = 1,2; IC 95% 0,92-1,37; OR = 1,09; IC 95% 0,97-1,24, respectivamente). Por el contrario, se han comunicado resultados discrepantes procedentes de otros metaanálisis^{43,44} que objetivaron una asociación estadísticamente significativa entre TT MTHFR y ETV, pero dicha asociación fue muy débil (tabla 4). Finalmente, en un estudio prospectivo con 9.238 sujetos libres de ETV que fueron seguidos durante 23 años, el ser homocigoto para TT MTHFR

no se asoció con el desarrollo de ETV (log-rank = 0,29)⁴⁵. Por tanto, el valor de TT MTHFR en ETV no se ha demostrado de forma concluyente.

El riesgo de ETV se ha evaluado específicamente en determinados subgrupos de pacientes portadores de TT MTHFR. Así, el riesgo de ETV en presencia del genotipo T677T MTHFR se ha relacionado en pacientes portadores también del factor V Leiden^{46,47}. Sin embargo, un metaanálisis⁴⁸ que específicamente ha evaluado la posible interacción entre TT

Tabla 4 Metaanálisis de T677T MTHFR frente a C677C MTHFR en la enfermedad tromboembólica venosa

Autor, año	N.º estudios	N.º casos	N.º controles	OR (IC 95%)
Brattström ⁴¹	13	5.869	6.644	1,1 (0,9-1,3)
Gohil ⁴²	50	16.013	20.020	1,09 (0,97-1,24)
Wald ⁴³	26	3.439	5.063	1,3 (1,1-1,5)
Ray ⁴⁴	31	4.901	7.886	1,2 (1,1-1,4)

IC: intervalo de confianza; MTHFR: 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa; OR: *odds ratio*.

MTHFR y factor V Leiden concluyó que no existe interacción entre ellos para la ETV; el exceso de riesgo relativo debido a la interacción (REPI) fue de 0,13 (IC 95%—3,60 a 3,86).

Se ha sugerido que la relación de C677T MTHFR y ETV no es igual en los diferentes grupos étnicos. Así, Gohil et al⁴² en su metaanálisis encuentran una asociación estadísticamente significativa entre TT MTHFR y ETV en la población china y tailandesa (OR= 1,57 [IC 95%1,23-2,00]). Según sus resultados, TT MTHFR tiene escaso valor en población caucásica, pero puede tener importancia en otros determinados grupos étnicos.

Por otro lado, la influencia de C677T MTHFR en la recurrencia de la ETV no ha sido demostrada. Tras un seguimiento prospectivo de una población de 259 pacientes tras un primer episodio de ETV, demostramos que el ser portador de CT MTHFR o TT MTHFR no se asocia con un aumento de la recurrencia trombótica⁴⁹. Ivanov et al⁵⁰, tras analizar de forma retrospectiva 51 pacientes con historia de ETV recurrente, concluyen resultados muy similares a los nuestros. Además, una interacción sólida entre TT MTHFR y factor V Leiden en la recurrencia trombótica no ha sido demostrada^{47,48}.

Recomendaciones finales

1. ¿Debe incluirse el estudio del polimorfismo C677T en los estudios de trombofilia?

La mayoría de los estudios no han mostrado una asociación entre C677T y la ETV. Por tanto, en pacientes con ETV y que cumplan criterios para descartar la presencia de trombofilia (por ejemplo, edad de aparición inferior a 40 años), la determinación rutinaria de C677T no está justificada. Además, la búsqueda de C677T MTHFR en portadores asintomáticos no es una medida coste-eficaz.

2. ¿Debe descartarse la presencia de C677T en pacientes con ETV e hiperhomocisteinemia?

Es difícil llegar a conclusiones claras con respecto a este interrogante, dada la gran cantidad de factores, incluyendo dietéticos, que pueden influir en la expresión de la hiperhomocisteinemia provocada o favorecida por dicha mutación. Pero, como C677T MTHFR, de forma aislada o asociada a otros defectos trombofílicos, no ha mostrado una influencia clara en la ETV, no se justifica la búsqueda de tal mutación.

Más interesante es aclarar si en los pacientes con ETV y C677T MTHFR puede recomendarse suplementación con ácido fólico para disminuir los niveles de homocisteína. La evidencia sobre si la suplementación con ácido fólico en pacientes con niveles elevados de homocisteína en plasma y ETV reduce el riesgo de recurrencia es

inconcluyente. Varios estudios observacionales muestran la asociación que hay entre hiperhomocisteinemia y ETV. No se ha establecido un punto de corte, pero habitualmente se considera hiperhomocisteinemia los niveles plasmáticos superiores a 16 mmol/l. Varios ensayos clínicos han evaluado la eficacia de los suplementos de ácido fólico o vitamina B en pacientes con ETV y que presentaban niveles elevados de homocisteína en plasma. Aunque todos ellos mostraron descensos, más o menos marcados, en los niveles plasmáticos de homocisteína, no hubo una reducción del riesgo de recurrencia trombótica en los pacientes que recibieron suplementos de ácido fólico frente a los que recibieron placebo^{51,52}. Por tanto, hasta la fecha de hoy no hay evidencia científica para tratar de forma sistemática a los pacientes con ETV y C677T MTHFR con suplementos de ácido fólico mediante vitaminas del complejo B para prevenir la trombosis venosa.

Conclusión

La prevalencia del polimorfismo C677T del gen MTHFR es muy frecuente en nuestro medio, siendo similar a la de los países de nuestro entorno. Sin embargo, esta variación genética, al menos en población de origen caucásico, no constituye un factor de riesgo de enfermedad tromboembólica venosa ni se relaciona con un incremento del riesgo de recurrencia. Por tanto, no se recomienda la búsqueda rutinaria de C677T MTHFR en la ETV.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *Lancet*. 1997;349:1269-76.
2. Nordstrom M, Lindblad B, Bergqvist D, Kjellstrom T. A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population. *J Intern Med*. 1992;232:155-60.
3. Rosendaal FR. Risk factors for venous thrombosis: prevalence, risk, and interaction. *Semin Hematol*. 1997;34:171-87.
4. Egeberg O. Thrombophilia caused by inheritable deficiency of blood antithrombin. *Scand J Clin Lab Invest*. 1965;17:92.

5. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest.* 1981;68:1370-3.
6. Comp PC, Esmon CT. Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S. *N Engl J Med.* 1984;311:1525-8.
7. Bertina RM, Koeleman BP, Kostert T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Rode H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994;369:64-7.
8. Poort SR, Rosendaal FR, Peitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* 1996;88:3698-703.
9. Frost P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995;10:111-3.
10. De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood.* 1996;87:3531-44.
11. D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and thrombotic disease. *Blood.* 1997;90:1-11.
12. Carson NA, Cusworth DC, Dent CE, Field CM, Neill DW, Westall RG. Homocystinuria: a new inborn error of metabolism associated with mental deficiency. *Arch Dis Child.* 1963;38:425-36.
13. Gerritsen T, Vaughn JG, Waisman HA. The identification of homocysteine in the urine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1962;9:493-6.
14. Laster I, Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F. Homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency: the metabolism of l-methionine. *J Clin Invest.* 1965;44:1708-19.
15. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol.* 1969;56:111-28.
16. Mudd SH, Uhlendorf BW, Freeman JM, Finkelstein JD, Shih VE. Homocystinuria associated with decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972;46:905-12.
17. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest.* 1986;77:1370-6.
18. Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsieh CM, Haber E, Schlegel R, et al. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:6369-73.
19. Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ, Bhopatkar MY, Faraci FM, Malinow MR, et al. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest.* 1996;98:24-9.
20. Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:1327-3.
21. Nishinaga M, Ozawa T, Shimada K. Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest.* 1993;92:1381-6.
22. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Rabbani IE, Mullins M, Singel D, et al. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest.* 1993;91:308-18.
23. Wang J, Dudman NP, Wilcken DE. Effects of homocysteine and related compounds on prostacyclin production by cultured human vascular endothelial cells. *Thromb Haemost.* 1993;70:1047-52.
24. Hajjar KA. Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J Clin Invest.* 1993;91:2873-9.
25. Ray JG. Meta-analysis of hyperhomocysteinemia as a risk factor for venous thromboembolic disease. *Arch Intern Med.* 1998;158:2101-6.
26. Franco RF, Araújo AG, Guerreiro JF, Elion J, Zago MA. Analysis of the 677 C→T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. *Thromb Haemost.* 1998;79:119-21.
27. Antoniadi T, Hatzis T, Kroupis C, Economou-Petersen E, Petersen MB. Prevalence of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR C677T mutations in a Greek population of blood donors. *Am J Hematol.* 1999;61:265-7.
28. Couturaud F, Oger E, Abalain JH, Chenu E, Guis B, Floch HH, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and venous thromboembolic disease. *Respiration.* 2000;67:657-1.
29. Brattström I, Zhang Y, Hurtig M, Refsum H, Ostensson S, Fransson I, et al. A common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation and longevity. *Atherosclerosis.* 1998;141:315-9.
30. Sacchi E, Tagliabue I, Duca F, Mannucci PM. High frequency of the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in northern Italy. *Thromb Haemost.* 1997;78:963-4.
31. Gutiérrez Revilla JI, Pérez HF, Calvo Martín MT, Tamparillas SM, Gracia RJ. [C677T and A1298C MTHFR polymorphisms in the etiology of neural tube defects in Spanish population]. *Med Clin (Barc).* 2003;120:441-5.
32. Guillén M, Corella D, Portolés O, González JI, Mulet F, Sáiz C. Prevalence of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C > T mutation in the mediterranean Spanish population. Association with cardiovascular risk factors. *Eur J Epidemiol.* 2001;17:255-1.
33. Rady PL, Tying SK, Hudnall SD, Vargas T, Kellner LH, Nitowsky H, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): the incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Med Genet.* 1999;86:380-4.
34. Conroy JM, Trivedi G, Sovd T, Caggana M. The allele frequency of mutations in four genes that confer enhanced susceptibility to venous thromboembolism in an unselected group of New York state newborns. *Thromb Res.* 2000;99:317-4.
35. Eid SS, Rihani G. Prevalence of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR C677T mutations in 200 healthy Jordanians. *Clin Lab Sci.* 2004;17:200-2.
36. Li Z, Sun I, 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;34:2085-90.
37. Morita H, Taguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara K, et al. Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation.* 1997;95:2032-6.
38. Wilcken DE, Wang XL, Sim AS, McCreddie RM. Distribution in healthy and coronary populations of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:878-82.
39. Arruda VR, Von Zuben PM, Chiapparini LC, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF. The mutation ala677→val in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 1997;77:818-21.
40. Cattaneo M, Tsai MY, Bucciarelli P, Taioli E, Zighetti ML, Bignell M, et al. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (C677T) increases the risk for deep-vein thrombosis in patients with mutant factor V (factor V:Q506). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1662-6.
41. Brattström I, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin I. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyper-

- homocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation*. 1998;98:2520-6.
42. Gohil R, Peck G, Sharma P. The genetics of venous thromboembolism. A meta-analysis involving \approx 120.000 cases and 180.000 controls. *Thromb Haemost*. 2009;102:360-70.
 43. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ*. 2002;325:1202.
 44. Ray JG, Shmorgun D, Chan WS. Common C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of venous thromboembolism: meta-analysis of 31 studies. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2002;32:51-8.
 45. Frederiksen J, Juul K, Grande P, Jensen GB, Schroeder TV, Tybjaerg-Hansen A, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism (C677T), hyperhomocysteinemia, and risk of ischemic cardiovascular disease and venous thromboembolism: prospective and case-control studies from the Copenhagen City Heart Study. *Blood*. 2004;104:3046-51.
 46. Agoşton-Coldea L, Rusu ID, Bobar C, Rusu ML, Mocan T, Procopciuc IM. Recurrent thromboembolic risk in patients with multiple thrombophilic disorders. *Fbm J Intern Med*. 2008;46:261-6.
 47. Suárez García I, Gómez Cerezo JF, Ríos Blanco JJ, Barbado FJ, Vázquez JJ. La homocisteína. ¿E factor de riesgo cardiovascular del próximo milenio? *An Med Interna*. 2001;18:212-4.
 48. Keijzer MB, Borm GF, Blom HJ, Bos GM, Rosendaal FR, den Heijer M. No interaction between factor V Leiden and hyperhomocysteinemia or MTHFR 677TT genotype in venous thrombosis. Results of a meta-analysis of published studies and a large case-only study. *Thromb Haemost*. 2007;97:32-7.
 49. González-Porrás JR, García-Sanz R, Alberca I, López ML, Balanzategui A, Gutiérrez O, et al. Risk of recurrent venous thrombosis in patients with G20210A mutation in the prothrombin gene or factor V Leiden mutation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2006;17:23-8.
 50. Ivanov P, Komsa-Penkova R, Kovacheva K, Ivanov Y, Stoyanova A, Ivanov I, et al. Impact of thrombophilic genetic factors on pulmonary embolism: early onset and recurrent incidences. *Lung*. 2008;186:27-36.
 51. Den Heijer M, Willems HPJ, Blom HJ, Gerrits WBJ, Cattaneo M, Eichinger S, et al. Homocysteine lowering by B vitamins and the secondary prevention of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Blood*. 2007;109:139-44.
 52. Ray JG, Kearon C, Yi Q, Sheridan P, Lonn E; Heart outcomes prevention evaluation 2 (hope-2) investigators. Homocysteine lowering therapy and risk for venous thromboembolism: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2007;146:761-7.